

Gdańsk, 30.11.2022 r.

dr hab. inż. n. farm. Magdalena Prokopowicz, prof. uczelni

### Ocena

Strona | 1

**rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Tomasza Machałowskiego pt.:**  
**„Naturally formed chitin-based scaffolds: characterization, functionalization, and practical utility”**  
**wykonana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Poznańskiej**  
**z dnia 11 października 2022 r.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Tomasza Machałowskiego została zrealizowana w ramach projektu POWER03.02.00-00-I011/16 interdyscyplinarnego programu studiów doktoranckich NanoBioTech. Promotorami rozprawy są Pan prof. dr hab. inż. Teofil Jesionowski z Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej i Pan prof. Hermann Ehrlich z Institute of Electronic and Sensor Materials w TU Bergakademie we Freibergu. Rozprawa doktorska dotyczy wytwarzania, oceny fizykochemicznej oraz oceny praktycznej przydatności naturalnych materiałów na bazie polisacharydu - chityny. Głównym celem rozprawy było uzyskanie wiedzy na temat, dotychczas mniej zbadanych, właściwości strukturalnych, fizykochemicznych i materiałowych chityny gąbczastej – głównego składnika szkieletowego gąbek morskich, jak i również próby wytworzenia w skali laboratoryjnej wielofunkcyjnych biomateriałów na jego bazie.

Tematyka badań, które prowadził Doktorant, jest aktualna i istotna z naukowego punktu widzenia. Od kilku lat obserwuje się rozwój technik otrzymywania materiałów na bazie polimerów naturalnych w formie trójwymiarowych rusztowań (scaffoldów), w celach wykorzystania ich, głównie, w inżynierii tkankowej oraz jako nowe nośniki substancji biologicznie aktywnych. Najczęściej wykorzystywanymi polimerami naturalnymi są związki cukrowe oraz białkowe. Jednakże ze względu na ograniczoną stabilność tych związków, zależną od temperatury i pH środowiska, znalezienie odpowiedniej metody wytwarzania rusztowań na ich bazie jest trudne. Ponadto, takie naturalne rusztowania są najczęściej niewytrzymałe mechanicznie. Dlatego Doktorant wybierając ten kierunek badań podjął się trudnego zadania, jakim było opracowanie metody izolacji, otrzymanie, oraz próba wykorzystania w celach aplikacyjnych trójwymiarowych chitynowych szkieletów gąbek morskich, czy też

chitynowych powłok otrzymanych w procesie linienia pająków. Nie ulega wątpliwości, że wnioski wynikające z wykonanych prac, mających charakter badań podstawowych, stanowią źródło cennych informacji i dają podstawy do dalszego rozwoju technologii wytwarzania nowych, naturalnych adsorbentów, katalizatorów czy rusztowań do hodowli komórkowej na bazie chityny.

Strona | 2

Rozprawa doktorska ma formę monograficzną i liczy 227 stron. Jest napisana w sposób logiczny i konsekwentny. Rozpoczyna się od wstępu i przeglądu literaturowego liczącego 57 stron, w których zawarto opis stanu wiedzy z zakresu biomimetyki, inżynierii tkankowej, oraz przedstawiono charakterystykę chityny. Na uwagę zasługuje przedstawienie w sposób przystępny źródeł pozyskiwania chityny, wybranych metod jej izolacji oraz możliwości jej wykorzystania, głównie, w inżynierii tkankowej. Część ta stanowi ciekawe kompendium wiedzy w tym obszarze. W celu i zakresie pracy przedstawiono hipotezy badawcze i opisano cząstkowe cele badawcze. Kolejny rozdział rozprawy, to materiały i metody liczący 25 stron, który zawiera opis materiałów, testów i zastosowanych technik i metod badawczych. Kolejne 6 rozdziałów zawiera opis wyników badań i ich omówienie. Następnym elementem rozprawy jest streszczenie i przedstawienie aktywności naukowej, na którą składają się publikacje, konferencje, nagrody i staże naukowe Doktoranta.

Doktorant wyznaczył następujące cele badawcze:

- uzyskanie chemicznie niezmienionej struktury chityny w formie trójwymiarowych chitynowych rusztowań z gąbek morskich i z naskórka pająków za pomocą wykorzystania techniki mikrofalowej ,
- przeprowadzenie charakterystyki morfologicznej i fizykochemicznej wyizolowanych ww. chitynowych rusztowań,
- wstępne zbadanie możliwości wykorzystania chitynowych rusztowań odpowiednio z gąbek morskich do hodowli ludzkich komórek keratynocytów i fibroblastów i z naskórków pająków do hodowli kardiomiocytów ludzkich,
- zbadanie możliwości biofunkcjonalizacji powierzchni chitynowych rusztowań w procesie biomineralizacji z wykorzystaniem hemolimfy ślimaka *C. aspersum*. w celu zwiększenia ich wytrzymałości mechanicznej,
- wstępne zbadanie możliwości wykorzystania chitynowych rusztowań z węglanem wapnia otrzymanych w procesie biomineralizacji do hodowli ludzkich komórek kostnych (osteoblastów),

- otrzymanie i przeprowadzenie charakterystyki fizykochemicznej dwuskładnikowych materiałów typu chitynowy nośnik – lakaza (enzym z klasy oksydoreduktaz) i następnie zbadanie ich możliwości do usuwania substancji leczniczych – tetracyklin z roztworów wodnych,
- otrzymanie i przeprowadzenie charakterystyki fizykochemicznej materiałów typu chitynowy nośnik pokryty mikrocząsteczkami srebra i bromku srebra i następnie zbadanie ich właściwości antybakteryjnych wobec szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*, jak również wykorzystania jako filtr antybakteryjny do oczyszczania wody z zanieczyszczeń bakteryjnych,
- otrzymanie i zbadanie właściwości sorpcyjnych naturalnych naskórków pająka wobec zanieczyszczenia ropą naftową wody i zaproponowanie mechanizmu tego procesu.

Wyznaczone cele badań Doktorant zrealizował poprzez prawidłowo zaplanowane i wykonane badania. W pierwszym etapie otrzymał chitynowy szkielet gąbek morskich z rzędu *Verongida*, oraz powstały w procesie linienia pająków z rodziny *Theraphosidae*, następnie przeprowadził zaplanowane modyfikacje otrzymanych szkieletów chitynowych uzyskując nowe materiały kompozytowe, które scharakteryzował pod względem strukturalnym i fizykochemicznym i zbadał wybrane możliwości aplikacyjne.

Jednym z celów badawczych Doktoranta, do którego chciałabym się odnieść, było zaproponowanie rozwiązania inspirowanego naturą, związanego z biofunkcjonalizacją powierzchni chitynowych rusztowań w procesie biomineralizacji z wykorzystaniem hemolimfy ślimaka *C. aspersum*. Doktorant otrzymał w tym procesie rusztowanie chitynowe, na powierzchni którego po przeprowadzonych badaniach fizykochemicznych, obserwował podstawowy składnik mineralny – węglan wapnia. Dodatkowo udowodnił ich potencjał mineralizacyjny w płynie symulującym osocze krwi człowieka. Tak jak Doktorant założył, otrzymane rusztowanie chitynowe z węglanem wapnia charakteryzowało się zwiększoną wytrzymałością mechaniczną, co niewątpliwie jest wielką zaletą i zwiększa możliwości aplikacyjne – głównie do hodowli komórek ludzkich osteoblastów. Chciałabym również się odnieść do wyników uzyskanych przez Doktoranta o potencjalnym znaczeniu w ochronie środowiska. Doktorant otrzymał stały nośnik enzymu – lakazy na chitynowym szkielecie w procesie adsorpcji i uzyskał poprawę stabilności enzymu w porównaniu do jego formy wolnej w różnych warunkach temperatury i pH. Następnie w badaniach możliwości wykorzystania nośnika do biokatalitycznej reakcji utleniania tetracyklin udowodnił ich potencjał aplikacyjny w ochronie środowiska związany z usuwaniem ze środowiska wodnego pozostałości leków

z ugrupowaniami fenolowymi. Z uwagi na fakt, że biokataliza jest także procesem ekologicznym, otrzymane przez Doktoranta innowacyjne wyniki stanowią podstawę do dalszych intensywnych badań nad opracowaniem efektywnej metody produkcji w skali większej niż laboratoryjnej. Ten ostatni wniosek dotyczy również wyników uzyskanych przez Doktoranta dotyczących otrzymania i zbadania chitynowych nośników srebra i bromku srebra do usuwania zanieczyszczeń bakteryjnych czy też hydrofobowych materiałów na bazie chityny pajaków do oczyszczania wody z ropy naftowej.

Warto podkreślić, że Doktorant realizując poszczególne etapy pracy doktorskiej wykorzystywał rekomendowane techniki analityczne do badań ciała stałego, takie jak np. spektroskopię w podczerwieni (FTIR), spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR) i Ramana, węglanowy magnetyczny rezonans jądrowy ( $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR), proszkową dyfrakcję promieni rentgenowskich (PXRD), skaningową mikroskopię elektronową (SEM), transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM), mikroskopię konfokalną, mikroskopię sił atomowych (AFM), mikrotomografię rentgenowską czy też termogravimetrię (TGA/DTG). Wytypowanie do badań wymienione techniki analityczne świadczą o dobrym analitycznym przygotowaniu Doktoranta do badań, co znalazło odzwierciedlenie w obszernych i prawidłowo sformułowanych wnioskach oraz dyskusji z przedstawieniem również dalszych, koniecznych badań pogłębiających wiedzę. Chciałabym również podkreślić, że recenzowana rozprawa doktorska o charakterze interdyscyplinarnym wymagała od Doktoranta szerokiej wiedzy i stosowania metod badań z różnych dziedzin nauki.

Biorąc pod uwagę fakt, że przedstawione wyniki zostały już opublikowane, co związane było z uzyskaniem pozytywnych recenzji, chciałabym poprosić o doprecyzowanie i wyjaśnienie pewnych kwestii, które nasunęły mi się w trakcie czytania rozprawy doktorskiej, co oczywiście nie podważa w żaden sposób wartości merytorycznej pracy oraz mojej wysokiej oceny pozytywnej.

1. Interesuje mnie w jaki sposób dokonano optymalizacji metody izolacji chitynowego szkieletu zarówno z gąbek morskich, jak i z naskórka pajaków z wykorzystaniem techniki mikrofalowej ?
2. W jakich warunkach (temperatura, wilgotność) przebiegał proces linienia pajaków i pozyskiwania materiału do badań ?
3. Na etapie badań związanych z immobilizacją enzymu – lakazy na powierzchni chitynowego nośnika (strona 66 rozprawy) nie jest dla mnie jasne, jak dokładnie został wyznaczony stopień immobilizacji enzymu ?

4. Przy wykorzystaniu układu chitynowy nośnik - lakaza do usunięcia tetracykliny z roztworu (strona 73 rozprawy) przy jakiej długości fali w zakresie UV-Vis zostały przeprowadzone analizy ilościowe tetracykliny i jaka była granica oznaczalności? Rozważając potencjalne zastosowanie ww. układu w oczyszczaniu śladowych ilości pozostałości leków w wodach użytkowych, czy brano pod uwagę wykorzystanie metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) np. z detekcją UV-Vis? Interesuje mnie również jaki był produkt enzymatycznej katalizy reakcji utleniania tetracykliny i czy uwzględniono jego potencjalny wpływ na proces sorpcji?
5. W badaniach o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym związanym z oczyszczaniem wody z ropy naftowej z wykorzystaniem otrzymanego naturalnego sorbentu chitynowego (strona 75 rozprawy) proszę o wyjaśnienie, czy każdy z punktów pomiarowych był niezależnym eksperymentem, czy też doświadczenie było przeprowadzone w funkcji czasu w sposób ciągły? Czy Doktorant mógłby doprecyzować w jaki sposób wyznaczył pojemność sorpcyjną badanego sorbentu (strona 169 rozprawy)? Czy istnieje możliwość wielokrotnego użycia proponowanego sorbentu (strona 76 rozprawy)?
6. W badaniach potencjału mineralizacyjnego, w których porównano rusztowanie chitynowe z węglanem wapnia vs rusztowanie chitynowe bez biofunkcjonalizacji powierzchni (strona 127 rozprawy) stwierdzono, że rusztowanie chitynowe bez biofunkcjonalizacji powierzchni również ulega powierzchniowej mineralizacji. Czy Doktorant mógłby przybliżyć potencjalne przyczyny powyższej obserwacji?

Po zapoznaniu się z wykazem osiągnięć w pracy naukowo – badawczej, stwierdzam, że jest to dorobek wyróżniający się. Obejmuje on 18 publikacji naukowych o łącznej punktacji IF ok. 95, w tym w 11 publikacjach (IF=58) Doktorant jest głównym – pierwszym autorem. Kilkakrotnie był również prelegentem na konferencjach naukowych. Przedstawione dane wskazują na bardzo dużą aktywność naukową Doktoranta, a sądząc po tematyce przedstawionych publikacji, można zauważyć konsekwencję w poszerzaniu wiedzy, zdobywaniu doświadczenia i budowaniu warsztatu związanego głównie z zastosowaniami chityny. Doktorant był na czterech stażach naukowych, co również świadczy o dojrzałości w naukowych wyborach Doktoranta. Za swoją działalność naukową Pan mgr inż. Tomasz Machałowski został czterokrotnie nagrodzony.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa wnosi nowe elementy do obszaru wiedzy na temat otrzymywania i fizykochemii zarówno chityny izolowanej ze szkieletu gąbek morskich jak i powstałej z naskórków pajaków, jak i również nowych dwuskładnikowych kompozytów typu: chityna z enzymem lakazą, z cząsteczkami srebra i bromku srebra, czy też z węglanem wapnia. Natomiast opisanie ich zastosowania jako (i) biokatalizator reakcji rozkładu tetracyklin, (ii) nośnik do usuwania ropy naftowej z roztworów wodnych, (iii) antybakteryjny filtr do oczyszczania wody z zanieczyszczeń bakteryjnych, wskazuje na możliwości ich zastosowania w ochronie środowiska zaś wstępne testy wykorzystania rusztowań chitynowych do hodowli osteoblastów, fibroblastów, czy kardiomiocytów ludzkich – w inżynierii tkankowej.

Strona | 6

Biorąc powyższe pod uwagę, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Poznańskiej wniosek o dopuszczenie Pana mgr. inż. Tomasza Machałowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Poznańskiej o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej** Pana mgr. inż. Tomasza Machałowskiego z uwagi na jej dużą wartość poznawczą, poszerzającą wiedzę na temat fizykochemii i potencjalnych zastosowań naturalnych materiałów na bazie chityny oraz upowszechnienie wyników rozprawy doktorskiej w publikacjach o zasięgu międzynarodowym.

Podpis recenzenta

