



Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk

Instytut Chemii Organicznej PAN
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa
Polska

Dr hab. inż. Dominik Koszelewski

+48 22 343 20 12
dominik.koszelewski@icho.edu.pl

Warszawa, 4 listopada 2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Darii Świętochowskiej zatytułowanej
„Monolity krzemionkowe jako nośniki enzymów wykorzystywanych w wybranych
procesach biotransformacji”**

wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach, pod opieką merytoryczną Pani dr hab. inż. Katarzyny Szymańskiej (prof. Pol. Śl.) oraz Pani dr hab. inż. Danuty Gillner (prof. Pol. Śl.).

Uwagi wstępne

Pani Daria Świętochowska uzyskała tytuł zawodowy magistra na kierunku Biotechnologia, na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej, specjalność: Biotechnologia przemysłowa. Obrona dyplomu miała miejsce 15 września 2016 roku. Kandydatka nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora. Kariera naukowo-zawodowa Doktorantki związana jest wyłącznie z Wydziałem Chemicznym Politechniki Śląskiej.

Recenzja została przygotowana na podstawie decyzji Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej w Gliwicach z dnia 21 września 2022 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów, w tym mojej osoby, w przewodzie doktorskim Pani mgr inż. Darii Świętochowskiej. Decyzja Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne została zawarta w piśmie nr RDNCh.512.15.2022 z dnia 21 września 2022 r., doręczonym wraz z rozprawą doktorską dnia 28 września 2022 r.

W przygotowaniu recenzji kierowałem się art. 13 ust. 1 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. 2017 poz. 1789), mającym zastosowanie w sprawie w związku z art. 179 Przepisów wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 poz. 1669). W szczególności oceniałem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a także, czy przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Tematyka i struktura pracy

Procesy katalityczne to jedne z najbardziej efektywnych procesów wykorzystywanych w syntezie związków o wysokiej wartości dodanej. W związku z tym, m.in. ze względów ekonomicznych, stosowane katalizatory powinny cechować się wysoką aktywnością, selektywnością i niską ceną. Wskazane jest również, aby katalizator był biodegradowalny i zachowywał swoją aktywność w układach wodnych. Obecnie bardzo dużą wagę przywiązuje się do rozwiązań technologicznych przyjaznych dla środowiska, zgodnych z wymogami tzw. „zielonej chemii”. Poszukiwanie nowych, bardziej zrównoważonych metod syntezy związków chemicznych jest jednym z wyzwań nowoczesnej nauki i technologii. Wyżej wymienione wymagania mogą być spełnione poprzez



zastosowanie naturalnych katalizatorów- enzymów, których zadaniem jest przyspieszanie i regulowanie procesów zachodzących w organizmach żywych. Jednocześnie okazały się one zdolne do akceptowania szerokiej gamy substratów nienaturalnych i przekształcania ich w sposób wysoce chemo-, regio- i stereoselektywny. Ze względu na te cechy, enzymy znajdują się coraz częściej na liście katalizatorów stosowanych w syntezie organicznej. Niestety, istotnym problemem związanym ze stosowaniem biokatalizatorów jest ich niska stabilność, gdyż w warunkach odbiegających od fizjologicznych (temperatura, pH i rozpuszczalnik), mogą ulegać denaturacji. Jedną z podstawowych metod stosowanych do poprawy stabilności i właściwości enzymu jest unieruchomienie go na stałym nośniku. Po immobilizacji enzym staje się bardziej stabilny. Można go łatwo wydzielić z mieszaniny reakcyjnej, jak również wielokrotnie zawracać, co wpływa na obniżenie kosztów syntezy. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się enzymatyczne reakcje kaskadowe, w wyniku których na skutek działania kilku enzymów z prostych związków organicznych tworzą się bardzo złożone produkty wykorzystywane m.in. w chemii leków i kosmetyków. Podejście takie, w odróżnieniu od klasycznej wieloetapowej syntezy, eliminuje konieczność izolacji produktów pośrednich, a tym samym znacząco zmniejsza ilość powstających odpadów, co doskonale wpisuje się w założenia „zielonej chemii”.

Przedstawiona do recenzji praca Pani mgr inż. Darii Świętochowskiej wpisuje się w ten aktualny i nowoczesny nurt badawczy i dotyczy opracowania metody immobilizacji wybranych enzymów celem zwiększenia zarówno ich stabilności, jak i aktywności w wybranych reakcjach chemicznych. Rozprawa porusza również bardzo ciekawy aspekt katalizy z wykorzystaniem immobilizowanych układów wieloenzymatycznych w reakcjach kaskadowych. Naukowa ranga w dziedzinie biokatalizy Zespołów kierowanych przez promotorki niniejszej rozprawy, Panią dr hab. inż. Katarzynę Szymańską (prof. Pol. Śl.) oraz Panią dr hab. inż. Danutę Gillner, upoważniają mnie do stwierdzenia, że mgr inż. Daria Świętochowska wykonywała swoją pracę w nowoczesnym laboratorium, dysponującym możliwościami technicznymi koniecznymi do przeprowadzenia badań związanych z tematem pracy.

Dysertacja doktorska, w której pani mgr inż. Daria Świętochowska przedstawiła studia literaturowe dotyczące tematyki pracy oraz uzyskane wyniki doświadczalne, ma formę tradycyjną liczącą 114 ponumerowanych stron i ma bardzo przejrzystą szatę graficzną, co niewątpliwie ułatwia jej czytanie. Rozprawa podzielona jest na 7 rozdziałów, poprzedzonych wykazem skrótów i nazw zwyczajowych wykorzystywanych w pracy, spisem treści, streszczeniem w języku polskim oraz celem pracy. Na końcu rozprawy znajdujemy dorobek naukowy doktorantki oraz spis cytowanej literatury liczący 219 pozycji. Streszczenie wraz tytułem rozprawy w języku angielskim zostały dołączone do pracy w postaci oddzielnego załącznika. Układ pracy odwzorowuje organizację niektórych czasopism chemicznych, tj. po wstępie, wprowadzeniu literaturowym i zarysowaniu celów następuje metodyka eksperymentalna, po której znajdujemy omówienie badań własnych wraz z wnioskami. Uważam, że jest to bardzo praktyczny układ, który na wstępie prezentuje niezbędny warsztat chemiczny, potrzebny do osiągnięcia przez Doktorantkę zamierzonych celów badawczych. Pod względem edytorskim praca prezentuje się dobrze i nie budzi większych zastrzeżeń.

Pracę rozpoczyna niespełna dwustronicowe streszczenie, w którym Doktorantka zwięźle formułuje cel pracy, po czym w rozdziałach zatytułowanych *Wprowadzenie* i *Cel pracy* wyjaśnia przyczyny podjęcia danej tematyki oraz szczegółowo przedstawia zaplanowane badania. Jak doktorantka słusznie wskazuje, zastosowanie różnego typu immobilizowanych enzymów do



procesów kaskadowych, a tym bardziej kilku enzymów umieszczonych jednocześnie na tym samym nośniku może prowadzić do zintensyfikowania syntezy wybranych węglowodanów, w tym trehalozy i L-erytrulozy które znalazły szerokie zastosowanie m.in. w farmacji i kosmetologii. Proponowane przez Doktorantkę badania dotyczące enzymatycznej syntezy tych związków z wykorzystaniem immobilizowanych/współimmobilizowanych biokatalizatorów w reakcji kaskadowej uważam za szczególnie ważne zarówno ze względów poznawczych jak i aplikacyjnych.

Studia literaturowe zawarte w rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. D. Świętochowskiej liczące 27 stron to rozdział wielowątkowy, w którym Autorka postawiła sobie za cel przybliżenie czytelnikowi wszystkich aspektów związanych z podjętą tematyką badań. Właściwy układ części literaturowej i przemyślany dobór treści, świadczy o dobrym rozeznaniu Doktorantki w literaturze przedmiotu i stanowi duże ułatwienie dla czytelnika rozprawy. Na początku części literaturowej Autorka zwięźle przedstawiła podstawowe informacje dotyczące immobilizacji enzymów, w tym metod unieruchamiania białek na powierzchni poprzez adsorpcję fizyczną bądź utworzenie wiązania kowalencyjnego. Autorka zwraca uwagę na zalety i wady płynące z zastosowania poszczególnych technik immobilizacji. Następnie mgr inż. Świętochowska przechodzi do omówienia różnego typu nośników stosowanych do unieruchamiania enzymów. Doktorantka skupiła się głównie na omówieniu ziół krzemionkowych stanowiących przedmiot jej badań. W tej części pracy znajdujemy metody przygotowywania nośników, jak również ich parametry fizykochemiczne, które tłumaczą ich wysoką funkcjonalność w procesach immobilizacji enzymów. Wybór tego typu nośników przez Doktorantkę jest nieprzypadkowy, gdyż monolity krzemionkowe znalazły szerokie zastosowanie jako mikroreaktory w procesach chemicznych prowadzonych zarówno w sposób okresowy jak i ciągły. W dalszej części Doktorantka opisała zastosowanie wybranych klas enzymów w procesach biotransformacji. Doktorantka zaczyna opis od hydrolaz skupiając się głównie na lipazach, w tym szczególnie na lipazie B z *Candida antarctica*. Enzym ten jest jednym z najczęściej stosowanych biokatalizatorów w przemianach chemicznych i doczekał się komercjalizacji w postaci immobilizowanego preparatu znanego pod handlową nazwą Novozym 435. Doktorantka słusznie zauważa, że pomimo licznych zalet tego katalizatora, niestabilność poliakrylowego złoza użytego do unieruchomienia enzymu ogranicza jego stosowalność, gdyż może dochodzić do degradacji nośnika, a co za tym idzie zanieczyszczenia mieszaniny reakcyjnej.

W kolejnym podrozdziale, poświęconym chemoenzymatycznym reakcjom kaskadowym, Autorka wymienia korzyści płynące z takiego podejścia do syntezy związków chemicznych z naciskiem na aspekt „zielonej chemii”. Część ta zawiera opis zastosowania układów wieloenzymatycznych do otrzymywania związków o wysokiej wartości dodanej. Doktorantka zapoznaje czytelnika z problemami wynikającymi z niekompatybilności poszczególnych enzymów w kaskadzie wieloenzymatycznej, jak również tzw. „wąskimi gardłami” reakcji kaskadowych, które wpływają na efektywność omawianych procesów. Ostatni podrozdział części literaturowej dysertacji poświęcony jest omówieniu enzymatycznych metod syntezy wybranych sacharydów w tym UDP-glukozy (urydynodifosforan glukozy), trehalozy oraz L-erytrulozy, z zastosowaniem enzymów należących do glikotransferaz, oksydoreduktaz aminokwasowych oraz transaminaz. Zwraca uwagę fakt, że cytowana w tym fragmencie literatura jest aktualna – pochodzi głównie sprzed kilku lat, co może świadczyć o bardzo dobrym rozeznaniu mgr inż. D. Świętochowskiej w najnowszych trendach biokatalizy. Dodatkowo, Pani D. Świętochowska jest współautorką cytowanego artykułu przeglądowego dotyczącego glikotransferaz opublikowanego w czasopiśmie *International Journal of*



Molecular Sciences w roku 2019. . Podsumowując, studia literaturowe prezentują szeroki zakres zainteresowań oraz znamionują dobre przygotowanie teoretyczne Kandydatki do stopnia doktora. Dowodzą odczytania i szerokiej wiedzy w dyscyplinie. Uważam tę część rozprawy za przygotowaną dobrze i napisaną ciekawie, chociaż Autorka nie ustrzegła się różnych drobnych błędów stylistycznych, wynikających prawdopodobnie z pewnego pośpiechu. Niektóre z nich pozwolę sobie wymienić. Kilukrotnie powtarzające się stwierdzenie dotyczące „otrzymywania wydajności” oraz „konwersji produktu”-powinno być „otrzymywanie produktu z wydajnością” i „konwersja substratu”. Stosowanie skrótu dla godzin (h), a powinno być godz. Odnośnik literaturowy [79], który dotyczy czasopisma *Przemysł Chemiczny* ma błędny skrót *Chem. Rev.* 1. Strona 25 „ścieżka syntezy trehalozy wykorzystuje dwa enzymy” powinno być np.: w metodzie tej wykorzystano dwa enzymy; Rys 10. strona 29 „synteza UDP-galaktozy katalizowana przez wieloenzymatyczną immobilizowaną kaskadę” chodziło raczej o syntezę UDP-galaktozy w wieloenzymatycznej reakcji kaskadowej z zastosowaniem immobilizowanych biokatalizatorów.

Następny rozdział „Część eksperymentalna” zajmujący strony od 34 do 45 dokumentuje przeprowadzone badania. Wszystkie eksperymenty zostały w większości należycie opisane. Do rzetelnego określenia parametrów fizykochemicznych uzyskanych nośników krzemionkowych Doktorantka zastosowała szeroki wachlarz metod spektroskopowych, m.in. takie techniki jak porozymetrię rtęciową i transmisyjną mikroskopię elektronową. Skład chemiczny zmodyfikowanych nośników określono na podstawie analizy elementarnej, a obecność odpowiednich grup funkcyjnych potwierdzono wykorzystując spektroskopię fourierowską w podczerwieni (FTIR). Aktywność otrzymanych immobilizatów Doktorantka wyznaczyła stosując wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) w oparciu o przygotowane krzywe wzorcowe dla związków modelowych. W celu wyeliminowania potencjalnych artefaktów zniekształcających przedmiot badań, Doktorantka kilkakrotnie powtarzała eksperymenty, a następnie dokonywała analizy statystycznej uzyskanych wyników podając ostatecznie wartość uśrednioną.

Odnosząc się do Części eksperymentalnej” mam kilka uwag dotyczących materiału zawartego w tej części pracy. Najważniejsza z nich dotyczy braku analiz magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) dla produktów izolowanych. Doktorantka do wyznaczenia krzywych wzorcowych używała komercyjnie dostępnych związków o zadeklarowanej przez producenta czystości. Jednakże, sposób transportu do klienta, jak i sposób późniejszego przechowywania przed pierwszym użyciem, może mieć ogromne znaczenie dla ich jakości. Dobrą praktyką byłoby więc sprawdzenie ich czystości chemicznej przed zastosowaniem, tym bardziej, jeśli sami nie syntezujemy tych substancji. Kolejna uwaga dotyczy estru *n*-butylowego kwasu lewulinowego otrzymywanego przez Doktorantkę w reakcji katalizowanej przez immobilizowaną lipazę B z *Candida antarctica*. Jak dokonano identyfikacji powstającego w reakcji enzymatycznej produktu? Nie znalazłem tego estru na liście wymienianych przez Doktorantkę związków, umieszczonej na wstępie omawianego rozdziału, jak również nie została podana procedura syntezy tego wzorca. **Dodatkowo proszę o komentarz dotyczący eseju w którym Doktorantka wykorzystowała octan *p*-nitrofenolu.** Doktorantka w opisie podała, iż przed dodaniem badanego preparatu enzymatycznego (strona 41, 5.9.1. Hydroliza octanu *p*-nitrofenolu) dokonuje inkubowania wspomnianego estru przez 15 min w 37 °C. Spodziewałbym się szybkiej hydrolizy wskaźnika w opisanych warunkach. Czy Doktorantka obserwowała ten proces i czy został on uwzględniony przy szacowaniu aktywności katalizatorów?



Przechodząc do omówienia najważniejszego, liczącego 47 stron, rozdziału „Badania własne”, chciałbym podkreślić systematyczny i uporządkowany sposób prezentacji obszernego materiału doświadczalnego. Autorka konsekwentnie przechodzi od pewnych badań o charakterze podstawowym do coraz bardziej skomplikowanych procedur, polegających na łączeniu kolejnych przemian w procesy kaskadowe. Należy tu również podkreślić przeprowadzoną przez Doktorantkę bardzo dużą liczbę pomiarów które zostały zaprezentowane w klarowny sposób w 6 wielopozycyjnych tabelach, 48 wykresach, 2 schematach i 12 rysunkach. Wykonane eksperymenty wielokrotnie prowadziły do ciekawych obserwacji na tyle zróżnicowanych, że nie wydaje się nawet możliwe skrótowe ich przedstawienie w recenzji, której celem jest przecież streszczenie wyników. Ograniczę się więc do ogólnego podsumowania, skróowego omówienia najbardziej interesujących rezultatów i kilku uwag.

Do najważniejszych osiągnięć pracy należy zaliczyć:

- Otrzymanie sfunkcjonalizowanych nośników krzemionkowych o ściśle określonych parametrach fizykochemicznych zapewniających dogodnie podłoże do unieruchamiania różnego typu enzymów. Wprowadzenie grup hydrofobowych na powierzchnię nośnika wpłynęło na wzrost aktywności immobilizowanych enzymów w porównaniu do natywnych katalizatorów. Efekt ten wynikał z aktywacji międzyfazowej immobilizowanego katalizatora. Dalsze polepszenie aktywności i stabilności badanych enzymów uzyskano poprzez utworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy nośnikiem a enzymem.
- Biokatalizatory unieruchomione na nieorganicznych nośnikach krzemionkowych wykazywały znacznie lepszą stabilność w większości testowanych rozpuszczalników organicznych w porównaniu do komercyjnie dostępnego preparatu Novozym 435, w przypadku którego w tych samych rozpuszczalnikach dochodzi do degradacji polimerowej matrycy użytej do unieruchomienia lipazy. Uzyskane przez Doktorantkę biokatalizatory zostały następnie z powodzeniem użyte do waloryzacji kwasu lewulinowego polegającej na syntezie estru. W tym miejscu brakuje mi przykładu pokazującego, czy sposób immobilizacji lipazy B z *Candida antarctica* miał również wpływ na enancjoselektywność w wybranej reakcji rozdziału kinetycznego racemicznego związku. Niewątpliwie pokazałoby to dodatkowy walor płynący z immobilizacji enzymu.
- Podjęcie prób unieruchomienia pirofosforylasy UDP-glukozy z *Thermocrispum agreste* (TaGalU) na nośnikach krzemionkowych. Zastosowanie aldehydu glutarowego jako łącznika do utworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupami aminowymi sfunkcjonalizowanego nośnika a grupami aminowymi w enzymie umożliwiło otrzymanie aktywnego biokatalizatora. Uzyskany katalizator charakteryzował się podwyższoną stabilnością i aktywnością w szerszym zakresie stosowanych temperatur oraz pH w porównaniu do natywnego enzymu. W następstwie przeprowadzonej optymalizacji dokonano immobilizacji TaGalU wewnątrz monolitu krzemionkowego, będącego rdzeniem mikroreaktora, co umożliwiło prowadzenie syntezy UDP-D-glukozy w sposób ciągły. Ostatecznie, współpraca Pani mgr inż. D. Świętochowskiej z Panią mgr inż. Martą Przypis, która opracowała warunki immobilizacji dla transferazy trehalozy zaowocowała opracowaniem metody syntezy trehalozy w systemie ciągłym. Niestety immobilizacja nie zapobiegła dezaktywacji biokatalizatorów przez mikroorganizmy namnażające się



w układzie reakcyjnym. Problem ten został rozwiązany poprzez okresowe przemywanie mikroreaktora 0.05% roztworem NaN_3 .

- Podjęcie ambitnej próby opracowania metody współimmobilizacji trzech typów enzymów: oksydazy D-aminokwasowej (DAAO), katalazy (KAT) oraz transketolazy (TK) na monolitach krzemionkowych w celu przeprowadzenia reakcji kaskadowej prowadzącej do otrzymania L-erytrulozy. Współimmobilizacja DAAO z katalazą zapewnia skuteczną ochronę DAAO przed destruktywnym działaniem nadtlenu wodoru, ubocznego produktu powstającego podczas pierwszego etapu badanej kaskady i związanego z enzymatycznym utlenianiem seryny do kwasu hydroksypirogronowego. Dodatkowo, otrzymane preparaty cechowały się zwiększoną stabilnością temperaturową w porównaniu do swoich form natywnych. Ostatecznie współimmobilizacja DAAO i katalazy oraz immobilizacja transketolazy na monolitach krzemionkowych z grupami aminowymi umożliwiła kilkukrotne wykorzystanie biokatalizatorów w syntezie docelowej L-erytrulozy, co znacząco obniża koszt prowadzenia syntezy. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż omawiane badania prowadzone były w reaktorze nowego typu, opracowanego przez Zespół Pani Promotor prof. Katarzyny Szymańskiej i będącego przedmiotem zgłoszenia patentowego, którego współautorką jest Doktorantka. Główną zaletą opracowanego reaktora jest ochrona znajdującego się w nim ziarna katalizatora przed uszkodzeniami mechanicznymi, wywołanymi pracą mieszadła.

Wyniki przedstawione w pracy niewątpliwie posiadają elementy nowości naukowej i zostały już opublikowane w trzech pracach w czasopismach o wysokim standardzie międzynarodowym. Warto wspomnieć, że mgr inż. Świętochowska jest też współautorem pracy przeglądowej oraz 2 zgłoszeń patentowych, a wyniki jej badań prezentowane były na licznych konferencjach naukowych. O zaangażowaniu i pracowitości Doktorantki świadczą odbyte szkolenia i staże, jak również Jej udział jako wykonawcy w sześciu projektach naukowych. Osiągnięcia Doktorantki zostały nagrodzone dwoma jednorazowymi stypendiami Rektora oraz grantem w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza.

Przedstawione w recenzji uwagi mające przede wszystkim charakter dyskusyjny, nie wpływają na ogólną wysoką ocenę rozprawy. Uzyskane wyniki oraz sposób ich interpretacji i prezentacji dowodzą dużej wiedzy Autorki w dziedzinie biokatalizy. Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Z pełnym przekonaniem składam do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Politechniki Śląskiej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Darii Świętochowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki i bardzo dobry sposób ich prezentacji oraz fakt opublikowania rezultatów w wysoko notowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, wnoszę do Rady Dyscypliny o przyznanie wyróżnienia Autorce dysertacji, Pani mgr inż. Darii Świętochowskiej.

4.11.2022

Dariusz Kordecki