Politechnika
Wrocławska

22.11.2022

Prof. dr hab. inż. Ewa Żymańczyk-Duda,
Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 29
50-370 Wrocław
email: ewa.zymanczyk-duda@pwr.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Darii Świętochowskiej**

**zatytułowanej**

*„Monolity krzemionkowe jako nośniki enzymów wykorzystywanych w wybranych procesach biotransformacji"*

Wykorzystanie różnych postaci biokatalizatorów w syntezie organicznej jest ważnym obszarem badawczym biotechnologii. Niezależnie od tego, czy stosowane są całe komórki mikroorganizmów czy też czyste preparaty enzymatyczne, w wielu przypadkach konieczna jest ich immobilizacja, zależna od przeznaczenia danego biokatalizatora, od substratu danej reakcji biokonwersji i jej przebiegu. Pomimo faktu, że znanych jest wiele metod immobilizacji biokatalizatorów, to jednak ich dopasowanie do wytypowanego procesu biotransformacji nie jest zadaniem trywialnym i wymaga niejednokrotnie opracowania unikalnej, dla danej reakcji i danego biokatalizatora, procedury. Naukowcy z Politechniki Śląskiej z sukcesami zajmują się badaniem monolitów krzemionkowych o hierarchicznej strukturze jako powierzchni do immobilizacji różnych enzymów. Materiały te wyróżniają się tym, że są nietoksyczne, wytrzymałe w szerokim zakresie temperatur, odporne mechanicznie, stabilne w rozpuszczalnikach organicznych oraz, co także jest istotne, nie poddają się łatwo biodegradacji. Dodatkowym atutem jest także to, że posiadają grupy hydroksylowe w swojej strukturze, co daje możliwość ich chemicznej modyfikacji, a to z kolei pozwala na wprowadzenie kolejnych grup funkcyjnych istotnych dla kowalencyjnej immobilizacji enzymów.

Politechnika
Wrocławska

*Oryginalnośc naukowa*

Przedstawiona mi do oceny praca naukowa Pani Darii Świętochowskiej wpisuje się w ten nurt badawczy. W rozprawie na uwagę zasługują elementy nowatorskie jak to, że doktorantka zaproponowała oryginalną z ścieżkę syntezy trehalozy z wykorzystaniem niestosowanej wcześniej, immobilizowanej pirofosforylazy UDP-glukozy w zestawieniu z immobilizowaną transferazą trehalozy, stosowaną w tym procesie już wcześniej. Enzymy te są aktywne w reakcji sekwencyjnej (kaskadowej) syntezy wspomnianego disacharydu. Trehaloza jest naturalnym cukrem występującym u różnych drobnoustrojów i jej rolą jest między innymi podniesienie odporności temperaturowej komórek. Ta, jak i inne cechy tego związku powodują, że istnieje duże zapotrzebowanie rynkowe na ten disachryd. Jest to jeden z powodów, dla których poszukiwanie ścieżek wydajnej syntezy trehalozy jest tematem aktualnym, pomimo faktu, że istnieje kilka procedur jej enzymatycznej syntezy. Inną reakcją kaskadową, z nowatorskim rozwiązaniem, badaną przez Panią mgr inż. Świętochowską była sekwencja reakcji prowadzących do syntezy L-erytrulozy, cukru o znaczeniu praktycznym, wykorzystywanego między innymi w przemyśle kosmetycznym. W tym przypadku najbardziej innowacyjnym elementem badań jest opracowana procedura immobilizacji dwóch z trzech enzymów na jednym nośniku, co w istotny sposób zmieniało charakterystykę biokatalizatrów w porównaniu do enzymów natywnych jak i do immobilizowanych w innych zestawieniach na nośniku krzemionkowym. Oryginalność osiągnięć mgr inż. Darii Świętochowskiej potwierdza cykl publikacji związany z tematyką pracy, które ukazały się w czasopismach o zasięgu międzynarodowym takich jak: *International Journal of Molecular Sciences*; *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*; *Microporous and Mesoporous Materials*; *Chemical Engineering Journal* o sumarycznym IF = 33.066 i punktacji MNiSW wynoszącej 540pkt.

*Ogólna ocena dysertacji*

Dokument został podzielony na typowe dla prac doktorskich paragrafy: streszczenie, wprowadzenie, cel pracy, część literaturową, eksperymentalną oraz omówienie wyników. Jest to spójny opis badań nad immobilizowanymi fizycznie i/lub chemicznie enzymami stanowiącymi odrębne biokatalizatory bądź element kaskady enzymatycznej. Aktywność i stabilność tak uzyskanych preparatów była badana wobec wybranych substratów.

I tak aktywność immobilizowanej lipazy CalB z *Candida antarctica* była badana w reakcji hydrolizy octanu p-nitrofenolu i estryfikacji kwasu lewulinowego, pirofosforylaza UDP-glukozy (TaGalU) z *Thermocrispum agreste* w reakcji syntezy UDP-glukozy oraz jako element kaskady enzymatycznej wykorzystanej do syntezy trehalozy wraz z transferazą trehalozy. Natomiast aktywność kaskady trójenzymatycznej z oksydazą d-aminokwasową (DAA z *Rhodotorula gracilis*), komercyjnie dostępną katalazą oraz transketolazą (TK z *Geobacillus stearothermophilus*) została sprawdzona w reakcji syntezy L-erytrulozy. Wyniki tych badań potwierdziły, że proces immobilizacji musi być dobierany indywidualnie i dopasowany do typu katalizowanej reakcji i warunków prowadzenia procesu. Lipaza okazała się efektywna niezależnie od metody immobilizacji, ale jej stabilność procesowa była różna. Immobilizacja kowalencyjna pozwoliła uzyskać stabilny preparat zarówno w procesie hydrolizy jak i estryfikacji, natomiast immobilizacja adsorpcyjna była skuteczna tylko dla reakcji estryfikacji. Lipaza z *Candida antarctica* (CalB) była osadzona na nośniku modyfikowanym dwoma typami grup funkcyjnych: aminowymi i/lub oktylowymi. Grupy aminowe umożliwiały modyfikację kowalencyjną, a grupy oktylowe zwiększały hydrofobowość nośnika. Stwarzało to możliwość zbadania aktywności i stabilności enzymu związanego kowalencyjnie z nośnikiem oraz enzymu osadzonego na nośniku poprzez adsorbcję, w przypadku modyfikacji jedynie resztami oktylowymi. Jednoczesna modyfikacja monolitu obydwoma typami grup funkcyjnych pozwoliłą za związanie kowalencyjne enzymu i zachowanie jego otwartej struktury. Przeprowadzone badania dowiodły, że modyfikowane monolity stanowią lepszy nośnik do immobilizacji niż nośnik stosowany w preparacie Novozym 435 – dotyczy to testów aktywności i stabilności w różnych rozpuszczalnikach organicznych. Nieco inaczej wyglądały wyniki badań dla pirofosforylazy UDP-glukozy, która w postaci immobilizowanej kowalencyjnie okazała się stabilna procesowo w mikroreaktorze, co umożliwiło wykorzystanie jej jako składowej kaskady enzymatycznej tworzonej wraz z transferazą trehalozy, a to z kolei zaowocowało syntezą trehalozy. W przypadku tego enzymu Pani mgr inż. Świętochowska wykorzystała technikę kowalencyjej immobilizacji i taki preparat był aktywny w szerszym zakresie temperatury i pH oraz dłużej niż enzym natywny. Immobilizowane enzymy tworzące kaskadę syntezy trehalozy: pirofosforylaza UDP-glukozy i transferaza trehalozy różniły się w zakresie optimów temperaturowych, co powodowało, że najlepszym rozwiązaniem w tym przypadku była ich immobilizacja na odrębnych nośnikach. Kolejnym ważnym wynikiem było również

opracowanie metody immobilizacji trzech kolejnych enzymów i wykorzystanie ich w reakcji kaskadowej syntezy L-erytrulozy. Najlepsze rezultaty Autorka uzyskała dla współimmoblilizacji kowalencyjnej oksydazy aminokwasowej i katalazy oraz osobnej immobilizacji transketolazy. Doktorantka przygotowała monolity krzemionkowe funkcjonalizowane grupami aminowymi. Takie podejście pozwoliło na podniesienie stabilności procesowej biokatalizatorów i uzyskanie najlepszego układu w kaskadzie. Praca doktorska Pani mgr inż. Świętochowskiej, pokazuje, że doktorantka posiada wiedzę i umiejętności w zakresie ocenianego obszaru badawczego, czego dowodem jest fakt, że zrealizowała zaplanowane eksperymenty zaczynając od samodzielnej syntezy nośników, czyli monolitów krzemionkowych o hierarchicznej strukturze, które były dobrym materiałem do immobilizacji enzymów i jednocześnie ich struktura nie ograniczała transportu reagentów wewnątrz monolitu i między jego ziarnami. Ponadto dowiodła, że otrzymane immobilizowane enzymy mogły być wykorzystywane zarówno w procesach okresowych jak i ciągłych. Opracowała oryginalne rozwiązania prowadzące do uzyskania aktywnych i stabilnych biokatalizatorów w tym układów dwu- i trójenzymatycznych umożliwiających otrzymanie cennych produktów: trhalozy i L-erytrulozy poprzez sekwencję reakcji kaskadowych.

*Ogólne uwagi do dysertacji*:

Poniższe uwagi dotyczą poszczególnych składowych dysertacji, które w opinii Recenzentki mogłyby być napisane inaczej, ułatwiając odbiór pracy.

*1. Streszczenie*

Streszczenie jest bardzo istotne, ponieważ z założenia powinno zawierać kluczowe, najlepsze wyniki osiągnięte w ramach pracy doktorskiej. W przypadku niniejszej pracy ten fragment zawiera trochę za mało danych, które ilustrowałyby otrzymane wyniki. Autorka posługuje się jedynie odniesieniami relatywnymi – porównaniami swoich preparatów do enzymów natywnych, bez wskazania konkretnych liczbowych parametrów, które pozwoliłyby prawidłowo ocenić wyniki badań. Można by było dodać bardziej szczegółową charakterystykę przynajmniej jednego procesu, który Autorka uznaje za najbardziej reprezentatywny w danym obszarze. Dodatkowo na końcu streszczenia jest informacja o tym, że monolity krzemionkowe sprawdzają się w procesach ciągłych i okresowych, o czym wcześniej nie ma żadnej wzmianki.

*2. Wprowadzenie*

Ta część zyskałaby znacznie, gdyby Autorka charakteryzując biotransformacje, oprócz zalet, wskazała również ograniczenia tych procesów. Jest to istotne, zwłaszcza, gdy chodzi o ich aplikacyjność, a zatem również o skalowanie biotransformacji, co niejednokrotnie jest przeszkodą i eliminuje daną technologię.

*3. Podsumowanie*

Ta część pracy wymagałby przeredagowania, ponieważ jest napisana w sposób ogólny i opisowy bez wyraźnego wskazania najlepszych wyników dla poszczególnych enzymów i technik ich immobilizacji, co znacznie utrudnia odbiór pracy. Np. w części dotyczącej pirofosorylazy UDP-glukozy brakuje pełnej informacji o nośnikach dla kolejnych enzymów tworzących kaskadę trehalozy, np. o aktywacji grup aminowych aldehydem glutarowym. Taka informacja pojawia się natomiast w kolejnych punktach podsumowania dotyczących kolejnych enzymów. Ta część tekstu zawiera zbyt mało kluczowych informacji. Przygotowanie zestawienia porównawczego, zawierającego dane liczbowe, dla reprezentatywnych eksperymentów w postaci tabelarycznej dałoby lepszy wgląd w wyniki badań.

*Pytania i uwagi z obszaru badań opisanych w dysertacji:*

1. Bardzo proszę o głos w dyskusji dotyczący tego, czy do oznaczania aktywności immobilizowanej lipazy z *Candida antarctica* (CalB) można by było zaproponować inną reakcję, taką, która miałaby znaczenie nie tylko walidacyjne, ale też praktyczne i aplikacyjne, tak jak to ma miejsce w przypadku opracowanych kaskad enzymatycznych, gdzie oznaczenie aktywności enzymów ma aspekt aplikacyjny i prowadzi do syntezy cennych związków - trehalozy i L-erytrulozy?

2. Istotną cechą immobilizowanych biokatalizatorów jest ich trwałość i stabilność nie tylko procesowa, ale także podczas przechowywania. Stąd też pytanie do Autorki jak długo preparaty enzymy po immobilizacji zachowują aktywność podczas przechowywania? Czy było to badane? Jeśli tak, to czy są istotne równice pomiędzy poszczególnymi preparatami?

Politechnika
Wrocławska

3. Wykorzystanie biokatalizatorów wymaga ich pełnej charakterystyki i powtarzalności parametrów procesu, dlatego też dla dalszego wykorzystania opracowanych rozwiązań istotna jest znajomość aktywności poszczególnych enzymów tworzących kaskady immobilizowanych biokatalizatorów. Bardzo proszę o informację o tym jak była badana aktywność poszczególnych enzymów współimmobilizowanych?

4. Jakie przesłanki decydowały o kolejności immobilizacji w przypadku enzymów koimmobilizowanych w danym układzie dwu-enzymatycznym?

5. Czy w przypadku koimmobilizacji pośredni pomiar ilości białek zimmobilizowanych był wykonywany dla każdego enzymu osobno, czy na końcu procesu współimmobilizacji?

6. Proszę o głos w dyskusji czy możliwy jest bezpośredni pomiar ilości białka zimmobilizowanego na nośniku zamiast wykorzystywania metody pośredniej?

7. Czy wykorzystanie desorpcji z użyciem preparatu Novozym można wykorzystać w przypadku obliczeń dla wszystkich enzymów czy ma to sens tylko w przypadku lipazy – proszę o głos w dyskusji?

8. Jakie przesłanki decydowały o wyborze rozpuszczalników organicznych, w których badana była stabilność immobilizowanej lipazy? Pytanie wynika z faktu, że lista zawiera również rozpuszczalniki raczej rzadko stosowane w biokatalizie, również z powodu ich toksyczności.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości dysertacji, dlatego konkludując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2020 *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2020, poz. 85) i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Darii Świętochowskiej do dalszych etapów postępowania.

*Podpisane odręcznie przez autora*