

Dr hab. inż. Katarzyna Szymańska, prof. PŚ
Politechnika Śląska
Wydział Chemiczny
Katedra Inżynierii Chemicznej
i Projektowania Procesowego
ul. ks. M. Strzody 7
44-100 Gliwice
e-mail: Katarzyna.Szymanska@polsl.pl

Gliwice, 22.02.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Karoliny Marii Bachosz

pt. „Reaktywna konwersja składników biomasy z równoczesną regeneracją kofaktora enzymatycznego”

wykonanej w Instytucie Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej pod opieką prof. dra hab. inż. Teofila Jesionowskiego oraz dra hab. inż. Jakuba Zdarty (promotor pomocniczy).

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, Politechniki Poznańskiej z dnia 20 grudnia 2022 r.

Przedstawiona do recenzji praca zasadniczo opiera się na cyklu 5 spójnych publikacji opublikowanych w latach 2019-2022 w takich czasopismach jak: Bioorganic Chemistry, Bioresource Technology, Journal of Environmental Chemical Engineering czy Environmental Technology & Innovation. Praca rozpoczyna się od krótkiego streszczenia otrzymanych rezultatów, streszczenie to przedstawione jest zarówno w języku polskim jak i angielskim. Następnie w ramach wprowadzenia teoretycznego Doktorantka omawia kolejno: proces konwersji biomasy lignocelulozowej, aktualne trendy w immobilizacji i koimmobilizacji enzymów, oraz kofaktory enzymatyczne. W pierwszej części wstępu Autorka opisuje potencjalne źródła biomasy lignocelulozowej, metody obróbki wstępnej oraz enzymatyczną konwersję składników biomasy. Wykazuje Ona, że składnikami biomasy, które stanowią cenne i główne źródło związków o wysokim potencjale aplikacyjnym są celuloza i hemiceluloza gdyż to z nich uzyskiwane są odpowiednio glukoza i ksyloza. Związki te stanowią największą zawartość procentową roztworów po konwersji biomasy i są platformą do otrzymywania szerokiej gamy substancji. W tym miejscu Doktorantka opisuje również najważniejsze enzymatyczne procesy konwersji glukozy i ksylozy z wykorzystaniem m. in.

takich enzymów jak dehydrogenaza glukozy (GDH), dehydrogenaza ksylozy (XDH). Niestety większość enzymów charakteryzuje się małą stabilnością, niejednokrotnie pojawiają się problemy z ich wielokrotnym użyciem, a dodatkowo są to stosunkowo drogie biokatalizatory. Doktorantka wskazuje, że rozwiązaniem tych problemów może być immobilizacja enzymów. W rozdziale poświęconym temu tematowi omówiono podstawowe wady i zalety procesu immobilizacji oraz metody doboru nośnika. Szczególną uwagę poświęcono nośnikom krzemionkowym, w tym kompozytom magnetyt-krzemionka. Kolejno, Doktorantka przechodzi do omówienia współimmobilizacji enzymów zwracając uwagę, że kluczowym aspektem jest tutaj określenie warunków procesowych. W tej części głównie omawia współimmobilizację różnych dehydrogenaz m.in. na membranach, z wytworzeniem agregatów czy na heterogenicznych nośnikach. Ostatnią częścią wprowadzenia literaturowego jest omówienie najpopularniejszych kofaktorów enzymów oraz metod ich regeneracji. Autorka skupiła się głównie na kofaktorach typu $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ i ich enzymatycznej regeneracji. Rozważania te oparte są o literaturę, Doktorantka cytuje 220 pozycji literaturowych z czego znacząca większość jest z ostatniej dekady, co świadczy o aktualności podjętego przez nią tematu. Jednym z ważniejszych elementów rozprawy doktorskiej jest zaprezentowany przez Doktorantkę cel pracy. W związku z faktem wyczerpywania się zasobów naturalnych Autorka za cel postawiła sobie wykorzystywanie biomasy jako surowca do otrzymywania produktów o wysokim znaczeniu użytkowym. Jako surowce wyjściowe wytypowała glukozę i ksylozę, które przetwarzała odpowiednio do kwasu glukonowego i kwasu ksylonowego z wykorzystaniem enzymów z grupy dehydrogenaz. Jako, że enzymy te wymagają obecności kofaktora, Doktorantka podjęła się opracowania enzymatycznych układów do regeneracji kofaktora. Dodatkowo celem poprawy stabilności wykorzystywanych enzymów opracowała metody ich współimmobilizacji na nośnikach krzemionkowych i membranach. Zaplanowane prace podzieliła na kilka etapów:

1. Przygotowanie materiału nośnika
2. Proces współimmobilizacji enzymów
3. Analiza fizykochemiczna otrzymanych systemów biokatalitycznych
4. Testy aplikacyjne
5. Separacja produktów końcowych
6. Próba transferu zaprojektowanych systemów biokatalitycznych z roztworów modelowych na roztwory rzeczywiste.

Cele te były osiągane stopniowo a wyniki prezentowane w poszczególnych publikacjach. W publikacjach 1–3 skupiono się na zaprojektowaniu układów enzymatycznych opartych o współimobilizowane enzymy: dehydrogenazę ksylozy i dehydrogenazę alkoholową (enzym regenerujący kofaktor). Kluczowe na tym etapie było zdefiniowanie najkorzystniejszych warunków procesowych oraz zastosowanie wytworzonych systemów w konwersji ksylozy i jednoczesnej regeneracji NAD^+ . Natomiast w ramach prac zaprezentowanych w publikacjach 4–5 opracowano systemy enzymatyczne, w których z dehydrogenazą ksylozy i dehydrogenazą glukozy sprzężona była dehydrogenaza 3-hydroksymaślanowa, odpowiedzialna za regenerację NAD^+ , ale także umożliwiająca konwersję kwasu lewulinowego, który stanowi inhibitor biokatalizatorów stosowanych w procesie konwersji biomasy. W trakcie tych badań najistotniejsze było określenie wpływu wybranych parametrów procesowych na efektywność prowadzonych procesów konwersji ksylozy i glukozy, jak również porównanie zaprojektowanych systemów z układami, w których obecne były wolne enzymy oraz mieszane formy biokatalizatorów, tzn. jedno z białek brało udział w reakcji w formie natywnej, natomiast drugie w postaci zimmobilizowanej. Rozprawa kończy się podsumowaniem, gdzie Doktorantka w sposób zbiorczy omawia najważniejsze wnioski wynikające z pracy. Moją szczególną uwagę zwrócił rozdział poświęcony perspektywom rozwoju badań, wskazuje on na szerokie rozeznanie naukowe Doktorantki.

Jak już wspomniałam praca opiera się na cyklu 5 monotematycznych publikacji, jednakże należy podkreślić, że Doktorantka jest współautorką kolejnych 8 publikacji o łącznym współczynniku wpływu (IF) ok. 45. Ponadto jest współautorką 3 rozdziałów w książkach, jednego zgłoszenia patentowego, 21 wystąpień (referaty i postery) na konferencjach krajowych i zagranicznych. Pani Karolina Bachosz odbyła 4 staże naukowe, w tym 3 zagraniczne oraz brała czynny udział w 3 projektach badawczych. Jest to naprawdę imponujący dorobek jak na tak młodą osobę i zasługuje na docenienie.

Niezmiernie ważnym aspektem tej pracy jest jej tematyka. Doktorantka podjęła się przetwarzania surowców odnawialnych (biomasy lignocelulozowej) w kierunku produktów o wysokim znaczeniu użytkowym. Jest to niezmiernie ważne zwłaszcza w świetle ogólnoświatowego kryzysu surowcowego i promowanej przez Unię Europejską polityki zrównoważonego rozwoju i gospodarki o obiegu zamkniętym. Do przetwarzania składników biomasy wybrała enzymy z grupy dehydrogenaz. Enzymy znane są jako katalizatory o wysokiej specyficzności i selektywności, jednakże ich wykorzystanie w formie „wolnej” jest ograniczone ze względu na ich małą stabilność i problemy z ponownym wykorzystaniem. Celem eliminacji tych niedogodności Doktorantka zaproponowała nowoczesne techniki

immobilizacji enzymów. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Autorka podjęła się równoczesnej immobilizacji dwóch a nawet trzech (publikacja 5) enzymów. Zabieg ten miał na celu regenerację drogiego kofaktora. Prace, w których efektywnie udaje się unieruchomić więcej niż jeden enzym są niezwykle cenne i niestety wciąż mało popularne.

Z wielką przyjemnością i uwagą przeczytałam przesłaną mi do recenzji pracę oraz monotematyczny cykl publikacji. W trakcie lektury nasunęły mi się pewne uwagi, którymi chciałabym podzielić się z Doktorantką i poprosić o krótki komentarz.

Uwagi edytorskie do wprowadzenia teoretycznego:

Str. 40: „Opracowywanie takich systemów jest możliwe, ze względu na fakt, że krzemionka posiada na swojej powierzchni liczne grupy funkcyjne i dodatkowo jest podatna na modyfikacje powszechnie dostępnymi związkami, takimi jak APTES czy glutaraldehyd.”

Czy mówiąc o „licznych grupach funkcyjnych na powierzchni krzemionki” ma Pani na myśli ich ilość czy rodzaj? Wyrażenie, które Pani użyła jest nieprecyzyjne.

Str. 41: „Niemniej ponad 60-proc. zachowanie aktywności biokatalitycznej może zagwarantować także skuteczne przeprowadzenie pułapkowania lub enkapsulacji z wykorzystaniem żelu krzemionkowego lub immobilizacji adsorpcyjnej przy użyciu nanokrzemionki, która charakteryzuje się wysoko rozwiniętą strukturą porowatą.”

Czy wszystkie wymienione w tym zdaniu metody immobilizacji dają zawsze min. 60 % zachowanej aktywności? Wydaje mi się, że jest to zbyt duże uogólnienie.

Str. 43: „Koimmobilizacja, analogicznie jak immobilizacja, zapewnia wysoką specyficzność reakcji, jak również umożliwia kontrolowanie jej przebiegu, minimalizując lub nawet całkowicie eliminując tzw. *lag time*.”

Czy faktycznie immobilizacja lub koimmobilizacja może zapewnić specyficzność reakcji? Wydaje mi się, że jest to raczej „zasługa” enzymów.

Str. 44: „Należy jednak podkreślić, że przeprowadzenie koimmobilizacji białek wiąże się z ograniczeniami w dyfuzji i transferze masy.”

Bardzo proszę o sprecyzowanie tego stwierdzenia, w tej formie jest ono niejasne.

Uwagi do wyników zawartych w publikacjach:

Publikacja 1

1. Jaką metodą określano wielkość cząstek kompozytów $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$? Czy wielkość tą określano na podstawie obrazów z mikroskopii TEM? Czy w obrazowaniu z wykorzystaniem mikroskopii TEM widoczne są białka? Jakie inne techniki można wykorzystać w określaniu wielkości cząstek?
2. Czy określono porowatość otrzymanych kompozytów? Na jakiej podstawie wywnioskowano, że enzymy osadzone są w porach nośnika?
3. Enzymy XDH i ADH immobilizowano w stosunku 2:1. Jaki to był stosunek: masowy czy molowy ?
4. Z czego wynika, że maksymalna produktywność wynosi 60% dla wolnych enzymów i 80% dla koimmobilizowanych? Dlaczego pomimo regeneracji kofaktora nie udało się osiągnąć całkowitego przereagowania? Proszę o głos w dyskusji.
5. str. 72: „Ten rezultat wskazuje nie tylko na wytworzenie stabilnego wiązania pomiędzy enzymami a nośnikiem, ale także na znaczne ograniczenie wymywania biokatalizatora, co zostało potwierdzone badaniami elucji białek.”
W jaki sposób badała Pani elucję białek?
6. Czy wydajność immobilizacji określona na poziomie 92 % wyznaczana była dla obydwu enzymów jednocześnie? Czy badano wydajność immobilizacji dla każdego z enzymów osobno?

Publikacja 2

1. W trakcie pracy badała Pani inhibujący wpływ różnych związków na aktywność enzymów. Nie znalazłam tam metanolu, który jest jednym z produktów. Czy rozważała Pani możliwość toksycznego wpływu metanolu?
2. Czy wydzielala Pani kwas ksylonowy z mieszaniny poreakcyjnej? A jeśli tak to czy określała Pani jego czystość?
3. Jaki model kinetyki przyjęto do obliczeń stałych kinetycznych?

Publikacja 3

1. W ramach tej pracy jednym z etapów było określenie wpływu zmiany stężenia jednego z substratów na produktywność kwasu ksylonowego. W tym celu zmieniała Pani stężenie jednego z substratów w zakresie od 2 do 20 mM, a stężenie drugiego z substratów pozostawało stałe i równe 5 mM. Jaki był cel stosowania tak dużych

(nawet 4-krotnych) nadmiarów jednego z substratów (mowa tu o skrajnych przypadkach)?

2. str. 85: „Jak wiadomo w zależności od procesu, w którym uczestniczy biokatalizator, rodzaju substratu i jego stężenia, a także źródła pochodzenia enzymu, stała Michaelis-Menten przyjmuje różne wartości.”

Mogę się z Panią zgodzić, że stała Michaelisa-Menten zależy od rodzaju reakcji katalizowanej przez enzym, rodzaju substratu, czy źródła pochodzenia enzymu, ale nie jestem się w stanie zgodzić, że stała ta zależy od stężenia substratu.

Publikacja 4

1. W tej publikacji badała Pani wpływ stosunku substratów i immobilizowanych enzymów na wydajność procesu. O jakich stosunkach tu mowa, molowych czy masowych (publikacja punkt 2.5)
2. Publikacja, str. 4, kolumna lewa. Jest Fig. 2b and 2c a powinno być Fig.1b and 1c.

Publikacja 5

1. Prosiłabym o bardziej szczegółową charakterystykę nośnika typu SBA-15. Podała Pani (str. 100), że jest to nośnik o powierzchni ok 24 m²/g i średnicy porów ok 16 nm. Jest to dla mnie dość zaskakujące gdyż nośniki, które znam pod tą nazwą charakteryzują się heksagonalną strukturą porów, powierzchnią właściwą rzędu 500 m²/g i wielkością porów ok 6-10 nm. Nośniki o opisanych przeze mnie parametrach i nazwie SBA-15 dostępne są również handlowo w ofercie firmy Sigma-Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/aldrich/914614>).
2. W publikacji nie znalazłam informacji ile moli NAD⁺ i NADH było wprowadzane do reakcji? Jaki był stosunek molowy NAD⁺/NADH do ksylozy i do glukozy? Bardzo proszę o podanie tych informacji.
3. Czy roztwór rzeczywisty był rozcieńczony przed reakcją? Jaki był stosunek molowy ksylozy do kwasu lewulinowego oraz glukozy do kwasu lewulinowego w trakcie eksperymentu w którym badała Pani wpływ stężenia kwasu lewulinowego?
4. W opisie metodyki podana jest informacja, że produktywność (wydajność) była liczona „na podstawie początkowego i końcowego stężenia substratu”. Jeżeli badała Pani przebieg reakcji poprzez monitorowanie zmiany stężenia substratów, powinna

Pani policzyć stopień przereagowania substratu (konwersję). Zgodnie z definicją, wydajność można określić monitorując stężenia produktów.

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 Poznańskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Bachosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego