



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

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra inż. Jakuba Szelağa
zatytułowanej**

*„Enzymatyczna alkoholiza katalizowana przez lipazy – modyfikacja
niewodnego środowiska reakcji”*

Wykorzystanie biokatalizatorów w reakcjach syntez chemicznych jest obszarem biotechnologii istotnym dla opracowywania nowych protokołów syntez ukierunkowanych na zmniejszanie obciążenia środowiska toksycznymi reagentami. Ten kierunek badań jest szczególnie istotny tam, gdzie realizowane są wielkoskalowe procesy przemysłowe. I tutaj jednym z ważnych tematów jest zastosowanie lipaz w reakcjach prowadzonych zarówno w środowiskach dwufazowych jak i o niskiej zawartości wody, co pozwala na znaczne rozszerzenie puli substratów takich reakcji o związki nierozpuszczalne, słabo rozpuszczalne czy niestabilne w obecności określonych stężeń wody. Lipazy w warunkach fizjologicznych katalizują reakcje hydrolizy trójglicerydów, co odbywa się na granicy faz, stanowiących środowisko tych reakcji. Badania nad możliwościami wykorzystania tych enzymów prowadzone są od wielu lat, a liczba rekordów w bazie Science Direct wynosi 159 012 (20.08.2023) i stale rośnie. Jest wiele powodów niesłabnącego zainteresowania tymi hydrolazami, między innymi możliwość ukierunkowania reakcji, znacznego podniesienia selektywności i szybkości procesu czy też możliwość wykorzystania różnych strukturalnie substratów, w tym także ksenobiotycznych. Cele te mogą być realizowane poprzez między innymi inżynierię środowiska reakcji i biokatalizatora. Jeszcze jednym ważnym aspektem jest to, że bardzo wiele organizmów (eukariotycznych i prokariotycznych), może być źródłem lipaz, a to powoduje, że można łatwo pozyskiwać biokatalizatory o odmiennym



profilu aktywności. Dodatkowo, w reakcjach katalizowanych z udziałem lipaz można wykorzystywać nie tylko preparaty enzymatyczne, ale też organizmy o aktywności lipolitycznej. Celem badań nad biokatalizą jest powiększenie skali procesów opracowanych w warunkach laboratoryjnych, a to jest już zadanie trudne, wymagające właściwej standaryzacji i optymalizacji oraz matematycznego opisu przebiegu procesu w zadanych warunkach.

Naukowcy Politechniki Łódzkiej z dużymi sukcesami badają możliwości wykorzystania organizmów lipolitycznych i lipaz w reakcjach o znaczeniu przemysłowym i w ten obszar wpisuje się przedstawiona mi do recenzji praca Pana mgra inż. Jakuba Szeląga, zrealizowana pod opieką prof. dr hab. Tadeusza Antczaka na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Dysertacja Pana mgra inż. Szeląga obejmuje opis kompleksowych badań porównawczych ukierunkowanych na podniesienie efektywności i obniżenie kosztów reakcji alkoholizy katalizowanej zarówno przez komercyjnie dostępne preparaty lipaz, w tym też immobilizowane, jak i przez lipazy produkowane przez *Mucor circinelloides*, określane jako preparaty własne. Istotną, z punktu widzenia znaczenia badań, częścią pracy jest próba znalezienia matematycznych zależności pomiędzy parametrami procesu z uwzględnieniem zmiennych, takich jak typ biokatalizatora, środowisko reakcji, rodzaj substratu i zastosowanie związków wpływających na efektywności lipaz. Stworzenie takiego opisu matematycznego jest ważne dla możliwości sterowania procesem, dla przewidywania skutków zmian poszczególnych parametrów, a co za tym idzie, dla skalowania biotransformacji. Z uwagi na powyższe uważam, że badania te są wartościowe dla rozwoju tego obszaru nauki.

Ogólna ocena dysertacji

Dokument został podzielony na typowe dla prac doktorskich paragrafy: wprowadzenie, część literaturowa, cel pracy, spis materiałów, opis metod, część eksperymentalna obejmująca wyniki i ich dyskusję, streszczenie i podsumowanie. Zakres opisanych przez doktoranta badań jest bardzo szeroki i ich cel został poprawnie zdefiniowany, a treść rozprawy pokazuje, że eksperymenty zostały zaplanowane i zrealizowane w sposób przemyślany, co, przy dużej liczbie zmiennych ma znaczenie kluczowe dla opracowania i końcowej analizy wyników. I tak, w przypadku mikrowodnego



środowiska, istotnym parametrem wpływającym na aktywność i stabilność enzymów w reakcji alkoholizy jest stężenie wody. Autor badał tę zależność wykonując serię eksperymentów z wykorzystaniem lipaz dostępnych handlowo i wytwarzanych przez *Mucor circinelloides* (preparaty własne) oraz z użyciem jako substratów oleju słonecznikowego i wybranych alkoholi o różnej strukturze i polarności. Eksperymenty obejmowały etap wstępny prowadzony w małej skali (1.5mL), a kończyły się badaniami z wykorzystaniem reaktorów kolumnowych, co pozwoliło na ostateczną ocenę stabilności danego biokatalizatora w warunkach procesowych. Ważnym osiągnięciem tej części pracy jest opracowanie parametrów procesu takich, które pozwoliły na utrzymanie wydajności reakcji na stałym poziomie przez 50 cykli tj. 2400 godz. ciągłej pracy kolumny. Wynik ten Autor otrzymał z wykorzystaniem jako źródła lipaz, immobilizowanej w piankach poliuretanowych grzybni *Mucor circinelloides*, która stanowiła wypełnienie kolumny. Pozostałe eksperymenty porównawcze potwierdziły, że stężenie wody jest kluczowe dla wydajności prowadzonych reakcji i stabilności operacyjnej biokatalizatora i, co jest charakterystyczne dla biokatalizy, parametr ten musi być dobierany indywidualnie dla poszczególnych biotransformacji. Kolejny etap badań obejmował próby podniesienia efektywności alkoholizy poprzez wykorzystanie dodatków chemicznych wpływających na aktywność lipaz. U podłoża tej części pracy leżał fakt, że w warunkach eksperymentów wcześniejszych, ukierunkowanych na zdefiniowanie optymalnego stężenia wody w środowisku mikrowodnym, nie uzyskano maksymalnej możliwej wydajności alkoholizy. Autor zastosował związki pomocnicze – aminy w reakcji katalizowanej przez sproszkowane mycelium grzyba *Mucor circinelloides* (MCG).

Do wykonania szeregu eksperymentów porównawczych, różniących się parametrami takimi jak między in. czas trwania czy zawartość wody, Pan mgr inż. Szelaąg wybrał dietyloaminę, którą dodawał do mieszanin reakcyjnych w różnych stężeniach. Przeprowadzone badania oraz obliczenia matematyczne nie pozwoliły na zdefiniowanie korelacji między poszczególnymi parametrami procesu oraz na określenie mechanizmu działania dietyloaminy. Autor proponuje na podstawie danych literaturowych możliwe mechanizmy oddziaływania tego związku pomocniczego na proces alkoholizy. Część eksperymentalna pracy kończy się badaniami, których zwieńczeniem ma być takie dobranie parametrów biotransformacji, w tym stężeń wody i dietyloaminy, które doprowadzi do opracowania najbardziej efektywnego procesu alkoholizy, prowadzonego z udziałem preparatu MCG. Autor podejmuje się przeanalizowania wyników serii eksperymentów (reakcji)



prorowadzonych w różnym czasie, czego efektem ma być znalezienie takich warunków, w których stężenie wody i dietyloaminy mają wpływ synergistyczny na biokatalizę. Wyniki tej części pracy mają wartość poznawczą, ponieważ Autor dowiódł, że efekt synergistyczny występuje i może w znaczący sposób podnieść wydajność badanej reakcji w porównaniu do odpowiednich reakcji analogicznych i z drugiej strony, że zależnie od zastosowanych substratów (różne alkohole) parametry muszą być dobierane indywidualnie. Podsumowując, szeroki zakres badań wykonanych przez pana mgra inż. Szeląga pozwolił na ocenę wpływu wybranych parametrów reakcji na efektywność alkoholizy prowadzonej w środowisku mikrowodnym oraz na ocenę wzajemnych korelacji między niektórymi z nich.

Ogólne uwagi do dysertacji:

Dysertacja jest napisana w sposób, który, w mojej opinii, utrudniał odbiór niektórych jej fragmentów. Przykładowe bardziej szczegółowe uwagi umieszczam poniżej.

1. Wprowadzenie do tematu

W tej części pracy występuje wiele skrótów myślowych i błędów, co powoduje, że niektórym opisom brak precyzji: np.

- cyt. ze str. 8...”wykonane z wysoką rozdzielczością struktury lipaz...” – brzmi tak jakby Autor stworzył strukturę lipazy, czy taki był zamysł? Czy też chodzi o zanalizowanie struktury białka?

- cyt. z tej samej strony: ”...lipazy z rodziny...*Rhizomucor*..” i tutaj, jeśli słowo rodzina odnosi do grzyba to jest to błąd merytoryczny, ponieważ *Rhizomucor* sp. to rodzaj w taksonomii

- podpis pod rysunkiem 3. – nazwa gatunku powinna być pisana kursywą i nie jest to nazwa lipazy – wymaga doprecyzowania

- Rys. 5. zawiera błąd merytoryczny – wirusy to nie są drobnoustroje, są to struktury, klasyfikowane jako nieożywione

- cyt. ze str. 21 ..” woda w środowisku niewodnym..” – raczej powinno być w środowisku o niskiej zawartości wody lub mikrowodnym

2. Materiały i metody

W tej części pracy są fragmenty wymagające doprecyzowania czy zmiany, np.



- str. 29, czy preparat MCG rozdrabniany młynkiem udarowym i nazywany sproszkowaną grzybnią składał się z całych komórek, czy też młynek powodował ich dezintegrację?
- str. 30 mało precyzyjny opis sposobu wytwarzania preparatu MCL, np. jak ekstrahowano białka z mycelium, czy było ono (mycelium) wcześniej dezintegrowane? Schemat na rys. 10 wskazuje na użycie detergentu i homogenizatora, co nie jest jasno opisane w metodzie. Proszę o doprecyzowanie różnic między preparatami MCG i MCL.
- str. 31, czy stosowano inną metodę oznaczania aktywności lipolitycznej, np. z p-nitrofenolem, czy tylko miareczkowanie opisane w pkt. 4.2.1.2, które nie należy do metod o wysokiej precyzyjności
- str. 34, tak szczegółowy opis nanoszenia próbek do analizy metodą TLC – zwłaszcza pkt 4.2.2.3, nie jest konieczny na poziomie pracy doktorskiej, podczas gdy w pkt. 4.2.2.1 skład eluentu jest podany nieprecyzyjnie – czy to są stosunki wagowe, procentowe, objętościowe?
- str. 35, - w chromatografii, rozwijane są chromatogramy- pkt 4.2.2.4

3. Wyniki i dyskusja

Połączenie paragrafów wyniki i dyskusja w jeden, skutkuje najczęściej brakiem dyskusji, ponieważ samo wymienienie uzyskanych rezultatów nie jest jeszcze dyskusją. Taka sytuacja ma miejsce w niektórych fragmentach dysertacji, np. str. 53 brakuje analizy wyników, czyli próby zdefiniowania przyczyn i znalezienia odpowiedzi na pytanie dlaczego w danych warunkach proces biotransformacji zakończył się w określony sposób.

Ponadto w tej części również są skróty myślowe, wymagające doprecyzowania, np.

- Autor nagminnie używa sformułowania cyt. „wydajność estrów” – jest to zbyt duży skrót myślowy, bardzo proszę o korektę tego określenia, wydajność jest cechą reakcji chemicznej prowadzącej do powstania określonych produktów, a nie produktów samych w sobie.
- opis osi wykresów, np. rys. 13, str. 50 i wiele kolejnych, powinien być poprawiony, ponieważ w [%] wyraża się stężenie, a nie ilość, którą wyraża się w [g] czy [mL] itd.

4. Podsumowanie i wnioski oraz streszczenie

Te części pracy są napisane w sposób zbyt ogólny i zawierają zbyt mało danych liczbowych, pozwalających ocenić wartość prowadzonych badań. Zestawienie kilku reprezentatywnych



Politechnika
Wrocławska

wyników eksperymentów np. tylko dla preparatów własnych, w postaci tabelarycznej dałoby lepszą możliwość analizy wyników.

Pytania i uwagi z obszaru badań opisanych w dysertacji:

1. W pracy brakuje informacji o tym, czy wszystkie opisane etapy poszczególnych eksperymentów były wykonane samodzielnie przez doktoranta, np. przygotowanie preparatów własnych lipaz, analiza wyników czy obliczenia matematyczne?

2. Proszę o głos w dyskusji na temat cyt. ze str. 7... "mniejszej toksyczności".. środowisk reakcji o niskiej zawartości wody w kontekście tego, że są w tych procesach stosowane rozpuszczalniki organiczne

3. Proszę o głos w dyskusji dotyczący zakresu badań, mianowicie, czy konieczne było badanie aktywności preparatów lipaz dostępnych komercyjnie i czy eksperymenty z preparatami własnymi służące badaniom porównawczym nie byłyby wystarczającym obiektem badawczym?

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca Pana mgr inż. Jakuba Szeląga zatytułowana „*Enzymatyczna alkoholiza katalizowana przez lipazy – modyfikacja niewodnego środowiska reakcji*” spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.).

Występuję zatem do Rady do spraw Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia Politechniki Łódzkiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Jakuba Szeląga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ewa Zippmayer