

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, 04.04.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Katarzyny Czyżewskiej

pt. „Immobilizacja powierzchniowa i objętościowa enzymów działających w systemie kaskadowym”

wykonanej w Katedrze Inżynierii Bioprocessowej, Mikro i Nanoinżynierii Politechniki Wrocławskiej pod opieką prof. dr hab. inż. Anny Trusek.

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna, Politechniki Wrocławskiej z dnia 07.02.2023 r.

Prace związane z unieruchamianiem enzymów, charakterystyką uzyskanych układów oraz ich zastosowaniem procesowym są przedmiotem badań wielu renomowanych ośrodków naukowych czego potwierdzeniem są liczne prace naukowe. Kataliza enzymatyczna obejmuje procesy, w których jako katalizatory wykorzystuje się enzymy przyspieszające reakcję poprzez obniżenie energii aktywacji. Niestety wadą tej grupy katalizatorów jest ich niska stabilność w warunkach procesu i brak możliwości wielokrotnego wykorzystania. Rozwiązaniem tego problemu może być proces immobilizacji enzymów na powierzchni lub we wnętrzu nośników. Wyzwaniem jest immobilizacja więcej niż jednego enzymu gdyż wymaga to odpowiedniego doboru warunków immobilizacji oraz ilości poszczególnych enzymów, a następnie odpowiedni dobór warunków całego procesu. Układy wieloenzymatyczne, w których dwa lub więcej enzymy pracują jednocześnie, a produkty reakcji są substratami kolejnej przemiany, cieszą się dużym zainteresowaniem. Pozwalają one na otrzymanie produktu finalnego bez potrzeby izolacji produktów pośrednich.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy doboru warunków immobilizacji, a następnie wykorzystania immobilizowanych enzymów w procesie otrzymywania mleka bezlaktozowego.

Tematyka ta jest niezwykle aktualna i istotna zwłaszcza z punktu widzenia konsumentów borykających się z nietolerancją laktozy. Celem prezentowanej rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie i przeprowadzenie procesu wieloenzymatycznego z wykorzystaniem β -galaktozydazy, oksydazy glukozowej i katalazy. Opracowany proces dotyczy otrzymywania mleka bezlaktozowego wykazującego podwyższoną słodkość wynikającą z enzymatycznej (z wykorzystaniem β -galaktozydazy) hydrolizy laktozy, której oba produkty glukoza i galaktoza wykazują wyższy indeks słodkości w stosunku do samej laktozy. Opracowano również proces otrzymywania mleka bezlaktozowego o obniżonej słodkości z przeznaczeniem do produktów o „charakterze wytrawnym”. W tym procesie laktozę hydrolizowano do glukozy (z wykorzystaniem β -galaktozydazy), którą następnie przekształcano w kwas glukonowy (z wykorzystaniem oksydazy glukozowej oraz katalazy) obniżając słodkość mleka bezlaktozowego. Enzymy immobilizowano na nośnikach pochodzenia naturalnego: membrany z regenerowanej celulozy lub z poliamidu, oraz we wnętrzu kapsułek alginianu sodu. Wybierając ten rodzaj nośników Autorka kierowała się wymogami stawianym przez przemysł spożywczy.

Rozprawa składa się z pięciu głównych rozdziałów: wstępu teoretycznego, celu pracy, prezentacji metod badawczych, omówienia wyników oraz podsumowania i wniosków. W ramach pierwszego rozdziału Doktorantka omawia problem nietolerancji laktozy oraz strategię usuwania laktozy z mleka poprzez czy to hydrolizę kwaśną, separację membranową lub hydrolizę enzymatyczną. Szczególną uwagę poświęca tej ostatniej metodzie uważając ją za jedną z najlepszych metod eliminacji laktozy. Autorka zwraca również uwagę, że enzymatyczny rozkład laktozy powoduje zwiększenie słodkości mleka bezlaktozowego, co w zależności od jego późniejszego zastosowania może być efektem pożądanym lub wprost przeciwnie. Zwiększona słodkość mleka bezlaktozowego jest korzystna dla jego zastosowań we wszelkiego rodzaju deserach mlecznych, jednakże w produktach o charakterze wytrawnym należy jej się pozbyć. W takiej sytuacji można zastosować konwersję glukozy do kwasu glukonowego z zastosowaniem oksydazy glukozowej. Jednocześnie, jak zaznacza Autorka, pojawia się problem obniżenia pH medium reakcyjnego oraz powstania toksycznego dla enzymów produktu ubocznego (H_2O_2). Następnie Doktorantka przechodzi do omówienia procesu immobilizacji, po krótko opisując najważniejsze metody immobilizacji i stosowane nośniki. Wstęp teoretyczny kończy rozdział poświęcony kaskadom wieloenzymatycznym, pokazujący ich istotne znaczenie w procesach biokonwersji. Rozważania te oparte są o literaturę, Doktorantka cytuje 266 pozycji literaturowych z czego znacząca większość jest z ostatniej dekady, co świadczy o aktualności podjętego przez nią tematu.

Kolejne strony rozprawy (ok. 30 stron) poświęcone są bardzo szczegółowemu opisowi metod badawczych i pomiarowych. Główny rozdział pracy liczący ok. 70 stron stanowi prezentacja otrzymanych wyników i ich omówienie. Doktorantka czytelnie przedstawia, omawia i interpretuje wyniki badań dzieląc je na kilka etapów. W pierwszym etapie charakteryzuje natywną β -galaktozydazę (preparat handlowy NOLATM FIT 5500) określając wpływ stężenia substratu na aktywność enzymu, stałe kinetyczne czy wpływ egzogennie dodawanych produktów. Następnie podobna seria eksperymentów wykonana została dla enkapsulowanej w alginianie sodu β -galaktozydazy, wykazując, że immobilizacja pozwoliła na obniżenie stałej inhibicji (w przypadku inhibicji galaktozą). Jednocześnie Doktorantka nie zaobserwowała znoszenia efektu inhibicji galaktozą poprzez dodatek glukozy do medium reakcyjnego, co było widoczne dla enzymu natywnego. Autorka określiła również stabilność procesową otrzymanego heterogenicznego katalizatora oraz określiła wpływ ograniczeń dyfuzyjnych na aktywność immobilizowanego enzymu. Kolejnym krokiem było kowalencyjne związanie β -galaktozydazy na powierzchni membrany z regenerowanej celulozy i membrany poliamidowej. Niestety w tym przypadku obserwowano bardzo mały stopień związania enzymu z nośnikiem, co przełożyło się na niską aktywność preparatu. Na kolejnych stronach tego rozdziału opisany jest proces otrzymywania mleka bezlaktozowego o zmniejszonej słodkości z wykorzystaniem oksydazy glukozowej i katalazy. Podobnie jak to miało miejsce w przypadku β -galaktozydazy najpierw scharakteryzowano natywne enzymy określając optymalne warunki pracy (pH, temperatura), po czym zastosowano je w konwersji glukozy do kwasu glukonowego z równoczesnym rozkładem nadtlenu wodoru. Dodatkowo Doktorantka zajęła się problemem regulacji pH w trakcie procesu stosując dodatek zasady sodowej lub węglanu wapnia oraz opracowała efektywny system napowietrzania układu. Kowalencyjna immobilizacja oksydazy glukozowej i katalazy na membranach wiązała się z bardzo małą wydajnością wiązania białka i niską aktywnością katalityczną. Zależność tą obserwowano zarówno w przypadku równoczesnej jak i dwuetapowej immobilizacji enzymów. Znacznie lepszą metodą immobilizacji okazała się enkapsulacja enzymów w alginianie sodu. Jednakże i w tym przypadku pojawiły się problemy związane z wymywaniem enzymów z sieci alginianu. Jako rozwiązanie tego problemu Autorka zaproponowała sieciowanie międzycząsteczkowe w obecności aldehydu glutarowego lub karbodiimidu. Kapsułki wzbogacone karbodiimidem odznaczały się wyższym stopniem retencji immobilizowanych enzymów, przy zachowaniu zadowalającej aktywności. Zabieg ten pozwolił również na wielokrotne wykorzystanie enkapsulowanych oksydazy glukozowej i katalazy (co najmniej 9 cykli reakcyjnych). Doktorantka podjęła się również zadania regulacji pH z wykorzystaniem zasady sodowej

i węglanu wapnia oraz stwierdziła, że celem efektywnej konwersji glukozy do kwasu glukonowego konieczne jest napowietrzanie mieszaniny reakcyjnej. Zwieńczeniem pracy był rozkład laktozy w próbce rzeczywistej mleka krowiego z wykorzystaniem natywnej β -galaktozydazy oraz enkapsulowanych oksydazy glukozowej i katalazy.

Do najważniejszych osiągnięć prezentowanej rozprawy doktorskiej zaliczam:

- Wskazanie efektywnej metody immobilizacji β -galaktozydazy, oksydazy glukozowej i katalazy.
- Określenie kluczowych parametrów mających wpływ na przebieg procesu otrzymywania mleka bezlaktozowego o zwiększonej lub zmniejszonej słodkości
- Określenie układu reakcyjnego pozwalającego na realizację niskotemperaturowej biokatalizy prowadzonej dla przemysłowych stężeń substratu.

Doktorantka jest współautorką 8 publikacji z Listy Filadelfijskiej oraz 19 publikacji spoza tej listy, brała również udział w licznych konferencjach naukowych.

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

1. Str. 31. *„Konwersja dużych substratów wymusza stosowanie nośników utworzonych z polimerów syntetycznych, zapewniających bezpośredni kontakt pomiędzy substratem a enzymem, jak również zwiększoną wytrzymałość mechaniczną w trakcie procesu. Z kolei porowate nośniki biopolimerowe umożliwiają katalizę substratów o mniejszej masie cząsteczkowej”*

Czy mogłaby to Pani szerzej wyjaśnić i uzasadnić.

2. Str. 36-38. Opisuje Pani strategie tworzenia układów wieloenzymatycznych. Czy mogłaby Pani bardziej szczegółowo wyjaśnić różnicę pomiędzy procesami *in vitro* a procesami typu *one-pot*?

3. Czy określała Pani stabilność mechaniczną otrzymanych kapsułek z alginianu sodu?

4. Str. 84. *„Interakcje zaobserwowane pomiędzy galaktozą a natywną β -galaktozydazą NOLA odpowiadają przebiegowi inhibicji kompetycyjnej”*

Jakie interakcje ma Pani na myśli? Jakie przesłanki wskazują, że mamy tutaj do czynienia z inhibicją kompetycyjną?

5. **Str. 87. Wykres 12.** Pokazuje Pani możliwość ponownego wykorzystania enkapsulowanego preparatu NOLA, wyraźnie widać spadek aktywności preparatu w kolejnych cyklach reakcyjnych. Czy rozważała Pani, w przypadku tego enzymu możliwość sieciowania międzycząsteczkowego, tak jak miało to miejsce dla oksydazy glukozowej i katalazy?
6. **Str. 89.** Pisze Pani, że do określenia ograniczeń dyfuzyjnych w procesach z wykorzystaniem enkapsulowanego preparatu NOLA wykorzystano moduł Thiego. Jednakże w pracy nie znalazłam wyznaczonej wartości tego modułu. Czy mogłaby to Pani wyjaśnić?
7. **Str. 89. Wykres 14.** Dlaczego porównując natywne i enkapsulowany preparat NOLA zastosowano inne stężenia enzymów (enkapsulowana NOLA 0,8 g/L, natywna NOLA 1,32 g/L)?
8. **Str. 87. Wykres 12.; Str.99. Wykres 23; Str.107. Wykres 24.** Opis osi OY :”Początkowa szybkość reakcji [%]”.
Szybkość reakcji nie może być wyrażona w procentach. Wydaje mi się, że chodzi tu o względną początkową szybkość reakcji.
9. **Str. 108.** Do regulacji pH mieszaniny reakcyjnej wykorzystano NaOH i CaCO₃. Czy związki te są dopuszczalne w przęśle spożywczym?

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 Inżynieria Chemiczna Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Czyżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Krzysztof Szymois