

### Recenzja

rozprawy doktorskiej „Funkcjonalne nośniki polimerowe dla biokatalizatorów do enzymatycznej hydrolizy celulozy”

autorstwa mgr Katarzyny Sokołowskiej

Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska dotyczy poszukiwania funkcjonalnych nośników unieruchamiających enzymy hydrolizujące celulozę.

Pragnąc podkreślić jak wielkie znaczenie teoretyczne i praktyczne mają procesy enzymatyczne chciałbym uniknąć ocen w stylu gombrowiczowskiego „Słowacki wielkim poetą był” czy też roztrząsania wyższości Bożego Narodzenia nad Wielkanocą lub odwrotnie, Wielkanocy nad Bożym Narodzeniem. Dlatego powołam się na książkę Marca Elsberga „Blackout” opisującego na szczęście na razie fikcyjne skutki globalnej awarii światowego systemu energetycznego. W każdej chwili ta fikcja może się stać rzeczywistością i dlatego reakcje i procesy enzymatyczne jako w małym stopniu zależne od światowego systemu energetycznego powinny być forowane.

Doktorantkę zainteresowały enzymatyczne przekształcenia celulozy i hemiceluloz, a więc surowców naturalnych i przy tym odnawialnych w produkty nadające się m. in. do produkcji biopaliw. Pomysł jest sensowny i na czasie i to się chwali.

Sukces w realizacji zamysłu zależy od doboru właściwych enzymów i stworzeniu warunków dla ich sprawnego działania. Pani Sokołowska wybrała trzy handlowo dostępne preparaty enzymatyczne, a to: pochodzenia grzybowego celulazę i mieszanekę endo-1,4-glukanaz dostępną pod nazwą Novozyme 476 oraz kompleks karbohydraz zawierający celulazy,  $\beta$ -glukanazy, hemicelulazy i ksylanazy znany jako preparat Viscozyme L. Następnie usiłowała wykorzystać te enzymy w optymalny sposób.

Czynnikiem prowadzącym do celu miało być unieruchamianie tych enzymów na polimerowych nośnikach i właśnie synteza takich nośników oraz sposób unieruchamiania

enzymów na nich stało się trzonem przeprowadzonych przez p. Sokołowską badań. Nośniki powstawały z *N*-winyloformamidu, który w jej w odwróconej suspensji polimeryzowano z równoczesnym sieciowaniem albo *N,N'*-metylenobisakryloamidem, dimetakrylanem glikolu etylenowego (etandiolu) albo diwinylobenzenem. Inicjatorem był dichlorowodorek 2,2'-azobis-(2-metylopropionoamidyny).

Reakcje te doktorantka prowadziła w oleju silikonowym przy stałych stosunkach *N*-winyloformamidu do czynnika sieciującego i inicjatora, oraz w stałym czasie, a parametrami zmienianymi była temperatura, szybkość mieszania i lepkość mieszaniny reakcyjnej. W przypadku poszczególnych sieciujących polimeryzacji *N*-winyloformamidu dokonywane zmiany parametrów dawały niezmiennie produkty o tym samym stopniu sieciowania i kulistym kształcie ziaren.

Nośnik otrzymany z użyciem diwinylobenzenu z racji swej budowy wymagał przed dalszym użyciem dodatkowych zabiegów, a to katalizowanej zasadą hydrolizy grup formamidowych a potem aktywacji aldehydem glutarowym.

Tożsamość chemiczna, czystość, kształt i rozmiar ziarenek nośników oraz pęcznienie zostały określone stosownymi metodami i wyniki tych oznaczeń nie budzą wątpliwości. Okazało się, że największe ziarenka ma nośnik sporządzony z diwinylobenzenem a najmniejsze nośnik z *N,N'*-metylenobisakryloamidem.

Następnie na otrzymanych nośnikach p. Sokołowska osadzała trzy wyżej wymienione enzymy. Efektywność zastosowanego postępowania sprawdzano oznaczając metodą Lowry zawartość niezwiązanego enzymu (ogólnie białka) w przesączu po oddzieleniu nośnika z unieruchomionym na nim enzymem.

Kryterium sukcesu lub niepowodzenia działania unieruchomionych enzymów stanowiło oznaczenie zawartości cukrów redukujących po hydrolizie celulozy mikrokryształicznej, a w przypadku nośników sporządzonych z udziałem *N,N'*-metylenobisakryloamidu także hydrolizy ścieru drzewnego. Okazało się, że osadzony na tych nośnikach Viscozyme hydrolizował oba modelowe polisacharydy wyraźnie gorzej niż enzym swobodny ale, co ciekawe, chociaż w obu przypadkach hydroliza przebiegała w trzech etapach szybkość hydrolizy w poszczególnych etapach zależała ona od nośnika i od hydrolizowanego polisacharydu.

W przypadku nośników otrzymanych z udziałem diwinylobenzenu badano tylko przebieg hydrolizy celulozy mikrokrystalicznej osadzonym na nich Nowozymem. Również i w tych badaniach, poza jednym przypadkiem, osadzony enzym działał gorzej niż enzym nieosadzony. Najbardziej obiecująco wypadły sprawdziany dla nośników sporządzonych z dimetakrylanem glikolu etylenowego, na których osadzono celulazy i z tego powodu dalsze, już systematyczne, badania doktorantka przeprowadziła na jednym wybranym nośniku z tej serii z osadzonymi a nim wszystkimi trzema enzymami.

Po przeprowadzeniu tej serii badań wybór padł na nośnik sporządzony z N-winyloformamidu sieciowanego polimeryzowanym dimetakrylanem glikolu etylenowego w oleju silikonowym o lepkości 2000 cSt w 80°C przy mieszaniu z szybkością 370 rpm. Na tym nośniku unieruchomiono celulazę, oraz preparaty enzymatyczne Nowozyme i Viscozyme i systematycznie przeprowadzono tymi biokompozytami hydrolizę celulozy mikrokrystalicznej, celulozy długołańcuchowej,  $\alpha$ -celulozy, papieru celulozowego oraz ścieru drzewnego.

Do części badań nad selekcjonowaniem najlepszego nośnika enzymów mam następującą uwagę. Rozumiem, że systematyczne badanie wszystkich nośników z osadzonymi na nich wszystkimi enzymami byłoby zbyt czasochłonne. Nie jestem jednak pewien, czy doktorantka nie zrezygnowała zbyt pochopnie z badania pozostałych biokompozytów. Ciekawe byłoby sprawdzenie składu hydrolizatów choćby tylko celulozy mikrokrystalicznej posługując się żelową chromatografią podziałową (size exclusion chromatography). Skład hydrolizatu też mógłby być interesującym kryterium doboru biokompozytu. Moje sugestie są potwierdzane wynikami tej części badań. Okazuje się, że wydajność produktów hydrolizy preparatów celulozowych i szybkości tej reakcji w poszczególnych etapach nijak się mają do wydajności unieruchomienia poszczególnych enzymów na nośniku i że działanie enzymów jest swoiste dla poszczególnych hydrolizowanych materiałów. Potwierdza to też sama doktorantka. Uwaga moja nie ma formy zarzutu. Zgłaszam ją dla podkreślenia, że prowadzone przez doktorantkę badania mają charakter rozwojowy a nie przyczynkowy. I to się chwali

Druga moja uwaga dotyczy sposobu graficznej prezentacji części wyników. Nie mam zastrzeżeń co do wykresów słupkowych, natomiast w przypadku wykresów liniowych może warto byłoby podać parametry liczbowe stosownych równań opisujących te krzywe.

Rozprawa kończy się następującymi wnioskami:

- otrzymane usieciowane kopolimery doskonale sprawdzają się jako nośniki immobilizujące enzymy celulolityczne
- badane heterofazowe biokatalizatory unieruchomione na ziarnach polimerowych, efektywnie hydrolizują surowce celulozowe i celulozopochodne, łatwo dają się wydzielić z mieszaniny reakcyjnej i mogą być używane wielokrotnie;
- w większości przypadków, unieruchamianie enzymów na nośnikach korzystnie wpływa na aktywność oraz stabilność immobilizowanych enzymów oraz podnosi wydajności hydrolizy
- biokatalizatory typu enzym-nośnik należy dobierać indywidualnie dla każdego z substratów.
- zaproponowana metoda unieruchamiania enzymów celulolitycznych na polimerowych nośnikach opartych na *N*-winyloformamidzie stanowi obiecującą metodę stabilizacji enzymów.

Tekst rozprawy zajmujący 175 stron jest starannie przygotowany i napisany z bardzo nielicznymi potknięciami, stąd łatwo i przyjemnie się go czyta, tym bardziej, że jest on ilustrowany licznymi dobrze dobranymi rysunkami. Niedoskonałości stylistyczne i edytorskie absolutnie nie są warte wymieniania w tym miejscu, przekazałem je Autorce w osobnym liście. Autorka bardzo dobrze i przekonująco interpretuje obserwowane zjawiska, nawet te mniej istotne przywołując 268 pozycji literaturowych, oraz wyciąga prawidłowe wnioski z przeprowadzonych badań. Dlatego bez wahania przedstawiam następujące podsumowanie:

Recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm. Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365). Przewożę o dopuszczenie mgr Katarzyny Sokołowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto stawiam wniosek o wyróżnienie tej pracy

