



Profesor dr hab. Maciej Szaleniec
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk
email: maciej.szaleniec@ikifp.edu.pl

Recenzja

Procedura habilitacyjna dr inż. Jakuba Zdarty

Tytuł osiągnięcia

„Projektowanie systemów biokatalitycznych i ich rola w procesach konwersji biomasy oraz unieszkodliwiania wybranych zanieczyszczeń środowiskowych”

Przebieg kariery zawodowej habilitanta

Habilitant uzyskał tytuł magistra chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu w roku 2010. Jeszcze w czasie studiów magisterskich na Uniwersytecie podjął edukację na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej gdzie w roku 2013 uzyskał tytuł zawodowy inżyniera w zakresie technologii chemicznej. I to właśnie praca inżynierska poświęcona immobilizacji lipazy A na powierzchni krzemionki okazała się punktem wyjścia do dalszej kariery naukowej habilitanta.

Pogłębianie swojej wiedzy na temat immobilizacji enzymów habilitant kontynuował w ramach studiów doktoranckich na Politechnice Poznańskiej pod opieką prof. dr hab. Teofila Jesionowskiego. Pan mgr inż. Jakub Zdarta uzyskał stopień naukowy doktora nauk chemicznych w zakresie technologii chemicznej 11 kwietnia 2017 roku na Wydziale Technologii Chemicznej. Doktorat dotyczył immobilizacji enzymów na nośnikach organicznych i nieorganicznych. Habilitant zaraz po obronie rozpoczął staż w Danii w Center for Bioprocess Engineering na Technical University of Denmark a od września 2018 był zatrudniony na stanowiska asystenta w Instytucie Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Od października 2020 pracuje w tej samej jednostce na stanowisku adiunkta. Habilitant prowadzi szeroko zakrojoną współpracę badawczą z ośrodkami w Europie (np. Duńskim Uniwersytetem Technicznym, Politechniką Warszawską czy Uniwersytetem Poznańskim) i na świecie (Chiny, Meksyk, Australia).

Kompleksowa ocena dorobku

Przedstawione osiągnięcie habilitacyjne zatytułowane „Projektowanie systemów biokatalitycznych i ich rola w procesach konwersji biomasy oraz unieszkodliwiania wybranych zanieczyszczeń środowiskowych” jest cyklem 13 prac oryginalnych i przeglądowych opublikowanych w latach 2017-2020 w czasopismach z listy JCR o sumarycznym współczynniku IF 69,7. We wszystkich pracach habilitant był pierwszym oraz korespondencyjnym autorem. Wszystkie prace zostały opublikowane w dobrych (min. 70 pkt ministerialnych) lub bardzo dobrych czasopismach z listy JCR (100-200 pkt ministerialnych), a na szczególną uwagę zasługują prace opublikowane w *Advances in Colloid and Interface Science*, *Biotechnology Advances* oraz *Science of the Total Environment*. Analiza oświadczeń współautorów nie pozostawia wątpliwości, że habilitant miał wiodącą rolę w planowaniu i przeprowadzeniu większości z eksperymentów w nich przedstawionych, analizie danych oraz napisaniu manuskryptów. Na szczególną uwagę zasługują oświadczenia prac H1, H3, H6, H7, gdzie



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

wszyscy autorzy, poza habilitantem, zadeklarowali jedynie „konsultację naukową oraz weryfikację ostatecznej wersji publikacji”.

Oprócz bogatego dorobku przedstawionego w cyklu habilitacyjnym dr Zdarta opublikował po doktoracie aż 34 publikacje z listy JCR (o średnim IF 3.8) oraz 4 rozdziały w wydawnictwach książkowych. Jego całkowita liczba cytowań bez autocytowań wynosi obecnie (04.2021) 1712 wg bazy Scopus i 1400 wg bazy Web of Science zaś indeks Hirscha wynosi odpowiednio 18 lub 19. Habilitant jest również współautorem w jednym zgłoszeniu patentowym. Fakt ten jest odrobinę zaskakujący, biorąc pod uwagę wysoce aplikacyjny charakter badań habilitanta, oraz miejsce pracy (Politechnika). Spodziewałem się znacznie bogatszego dorobku patentowego i mam nadzieję, że w przyszłości habilitant nie będzie zaniedbywał zabezpieczania praw własności intelektualnych do opracowywanych przez siebie innowacyjnych rozwiązań. W mojej ocenie wiele z nich wykazuje zdolność patentową.

Habilitant ma dorobek w kierowaniu projektami badawczymi, przed doktoratem kierował grantem NCN Preludium oraz uzyskał grant wyjazdowy Etiuda, po doktoracie kierował projektem Sonata oraz był głównym naukowym wykonawcą w przemysłowym projekcie badawczo-wdrożeniowym. Był również wykonawcą w projektach innych badaczy (OPUS, Juventus) czy projektów wewnętrznych swojej jednostki.

Dr inż. J. Zdarta jest bardzo aktywnym recenzentem wielu prac naukowych (128 recenzji), w tym w tak prestiżowych czasopismach jak ACS Sustainable Chemical Engineering, Chemical Engineering Journal, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, Critical Reviews in Biotechnology i Coordination Chemistry Reviews.

Jego dorobek dydaktyczny wiąże się przede wszystkim z prowadzeniem zajęć na Politechnice Poznańskiej (wykłady dotyczące wybranych zagadnień współczesnej wiedzy chemicznej oraz materiałów kompozytowych, ćwiczenia z technologii nieorganicznej, laboratoria z technologii chemicznej, materiałów hybrydowych i filtrów). Doświadczenie habilitanta w promowaniu prac dyplomowych to 6 prac inżynierskich oraz 3 magisterskie oraz pomocnicze promotorstwo dwóch prac magisterskich na Technical University of Denmark. Jest to wynik całkiem spory biorąc pod uwagę krótki okres od uzyskania uprawnień promotorskich (obrona doktoratu w 2017). W mojej ocenie wskazuje to na fakt, że prace badawcze prowadzone przez habilitanta są interesujące dla studentów co przyciąga ich pod jego skrzydła. Jest to bardzo dobry prognostyk dla jego dalszej kariery naukowej. W dokumentacji załączonej do autoreferatu nie znalazłem odniesień do popularyzacji nauki. Zwracam więc uwagę habilitanta na ten również bardzo ważny aspekt działalności uczonego.

Ocena cyklu habilitacyjnego

Przedstawione w dysertacji habilitacyjnej osiągnięcie w całości dotyczy różnych aspektów immobilizacji enzymów. Sam cykl otwiera szeroka praca przeglądowa dotycząca wyboru materiału do immobilizacji (H1), opublikowana w Catalysts (MDPI). Habilitant zasadniczo wydzielił dwie podgrupy publikacji, w których pierwsza dotyczy hydrolaz katalizujących hydrolizę polisacharydów pochodzących z biomasy, druga zaś oksydoreduktaz zaangażowanych w utlenianie chemicznych zanieczyszczeń wody. Do pierwszej grupy należą prace H2-4, zaś do drugiej H6-13, przy czym również tutaj prace H6 i H7 są wprowadzającymi przeglądówkami dotyczącą różnorodnych materiałów, które mogą zostać skutecznie zastosowane do immobilizacji oksydoreduktaz, oraz strategii usuwania zanieczyszczeń z wody metodami biokatalitycznymi. Na pograniczu tych dwóch tematów jest praca H5, gdzie proteaza (a więc enzym będący hydrolazą) został zastosowany do degradacji białek traktowanych jako zanieczyszczenie. W mojej ocenie z powodzeniem taki katalizator mógłby z powodzeniem znaleźć zastosowanie do celów bioanalitycznych, np. do cięcia białek na peptydy w analizie proteomicznej w układzie HPLC-reaktor z trypsyną – kolumna chromatograficzna – detektor qTOF (*vide E. Calleri et al. J. Chromatogr. A, 2011, 1218 (49), 8937-8945*).



W pracach tych, z oczywistych względów, habilitant koncentruje się na inżynierii materiałów do immobilizacji, ich charakterystyce fizykochemicznej oraz optymalizacji (czasami z wykorzystaniem zaawansowanych metod statystycznych takich jak analiza powierzchni odpowiedzi) samego procesu immobilizacyjnego. W mojej ocenie na szczególną uwagę zasługują kompozytowe materiały polimerowo-nieorganiczne, zapewniające duże możliwości formowania materiału nośnika przy jednoczesnym wsparciu separacji polem magnetycznym (w przypadku nośnika modyfikowanego Fe_3O_4) czy zwiększające odporność mechaniczną i procesową katalizatora (jak w pracy H2 w układzie celuloza/ TiO_2). Interesujące jest również równoczesne zastosowanie wielu technik immobilizacji (np. adsorpcji i enkapsulacji) do przygotowania jednego katalizatora. Bardzo pomysłowe jest zastosowanie nośnika MCF wzbogaconego w jony miedzi, co skutkuje podniesieniem aktywności metaloenzymu lakkazy (najprawdopodobniej w wyniku rekonstrukcji miedzowego centrum aktywnego enzymu), czy wykorzystanie naturalnych gąbek *Aplysina archeri* w charakterze nośnika.

Z punktu widzenia samej metodologii immobilizacji na uwagę zasługuje zastosowanie wielu metod, a więc zarówno adsorpcji na nośniku, jak i immobilizacji kowalencyjnej za pomocą linkerów, ale również enkapsulacji enzymu wewnątrz polimerowego nośnika. Ciekawym rozwiązaniem jest zastosowanie dwóch różnych metod dla jednego materiału – nie jest to podejście bardzo często spotykane w literaturze (co potwierdza Tabela 2 w pracy H1). Również koimmobilizacja więcej niż jednego enzymu na jednym nośniku jest przykładem, że prace habilitanta nawiązują do bardzo aktualnych trendów w rozwoju biokatalizy (kaskadowe układy reakcyjne), chociaż w tym akurat przypadku zastosowano dwa enzymy do bardziej kompleksowej przeróbki wieloskładnikowego substratu z biomasy. Bardzo istotnym elementem jest również fakt, że habilitant zdaje sobie sprawę, iż samo utlenianie związku stanowiącego zanieczyszczenie nie prowadzi do jego eliminacji. Często katalizowane przez enzymy utlenianie prowadzi do powstania związku bardziej rozpuszczalnego w wodzie (hydrofilowego) i niekoniecznie mniej toksycznego. Jak również habilitant pokazał, katalizowane przez metaloenzymy reakcje rodnikowe mogą prowadzić do polimeryzacji utlenianych związków co może utrudniać ich dalszą degradację.

Z oczywistych względów cykl habilitacyjny dotyka również tematu aktywności katalitycznej i charakterystyki enzymów po immobilizacji. Chociaż mój odbiór pracy jest zdecydowanie pozytywny to właśnie w tej części mam kilka wątpliwości co do treści zawartych w omówieniu osiągnięcia. Np. na stronie 14 habilitant napisał:

„Rezultaty analizy potencjału elektrokinetycznego hybrydy TiO_2 - lignina wskazują, że w całym analizowanym zakresie pH przyjmuje on negatywne wartości, co sprzyja powstaniu głównie jonowych oddziaływań enzym - nośnik. Ze względu na fakt, że celuloza posiada swój punkt izoelektryczny w pH ok. 5, prowadzenie immobilizacji w buforze octanowym o pH 5 skutkuje protonizacją aminowych grup funkcyjnych obecnych w jej strukturze”

Pomijając kuriozalny termin „protonizacja” (poprawnie „protonacja”) prowadzenie procesu immobilizacji przy pH równym pI białka powoduje, że efektywny jego ładunek jest obojętny a nie dodatni. Aby faktycznie wspierać elektrostatyczne oddziaływanie między ujemnie naładowaną powierzchnią i dodatnio naładowanym enzymem proces immobilizacji musiałby być prowadzony w pH poniżej punktu izoelektrycznego. Oczywiście ze względu na heterogeniczność ładunku powierzchniowego możliwe jest skuteczne osadzenie nawet ujemnie naładowanych białek na ujemnie naładowanej powierzchniach (np. Nattich-Rak i inni *Colloids Interfaces*, 4 (2020) 51, 1-15, Sofińska i inni *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.*, 1863 (2019) 1027-1039). Natomiast protonacja grup aminowych w powierzchniowych lizynach jest praktycznie jednakowa (t.j. NH_3^+) w niemal



całym zakresie fizjologicznego pH (pK_a grupy NzH_3 w wolnym aminokwasie 10.53). Tak więc nie jest prawdą, że akurat prowadzenie procesu w pH 5 prowadzi do szczególnej protonacji grup aminowych (również grupa N-końcowa ma pK_a w zakresie od 8-10, w zależności od typu aminokwasu i mikrootoczenia). Jeżeli już, to immobilizacja w niskim pH może skutkować dodatkową protonacją powierzchniowych reszt histydynowych (pK_a ok. 6) i w pH poniżej 6 reszty histydynowe mają właśnie ładunek dodatni.

Kolejne zadziwiające dla enzymologa stwierdzenie można znaleźć na stronie 17:

*„Konsekwencją jest znaczny, ponad 20-proc. spadek maksymalnej szybkości reakcji (V_{max}) katalizowanych przez systemy powstałe w oparciu o materiał SBA 15. **Ciekawą obserwacją stanowi jednak fakt, że w przypadku immobilizowanych enzymów, w porównaniu z ich wolnymi odpowiednikami, niemalże niezmienna pozostała wartość tzw. ilości obrotów katalizatora** (z ang. turnover number, k_{cat}), co wskazuje, że struktura enzymu nie została w znacznym stopniu naruszona na skutek immobilizacji i potwierdza głównie adsorpcyjny charakter powstałych oddziaływań.”*

Ponieważ z publikacji H4 wynika, że zastosowano model Michaelisa-Menten, V_{max} z definicji jest równe $[E] \cdot k_{cat}$. Jeżeli porównanie dotyczy takiej samej ilości enzymu w roztworze i na powierzchni (a tylko w takim wypadku ma ono sens) to wtedy niższa wartość szybkości skutkuje niższą wartością k_{cat} czyli właśnie ilością obrotów katalizatora. Nie może więc być prawdą stwierdzenie, że obserwowano różne szybkości i takie same wartości k_{cat} . Z kolei z tabeli 2 można jednak odczytać wartości aktywności właściwej w U na mg (domniemywam, że chodzi o masę katalizatora w roztworze i na nośniku, a nie nośnika) i z tych wartości jasno widać obniżenie V_{max} immobilizowanych dehydrogenaz. Jeżeli wartości te powstały w wyniku wydzielenia obserwowanej szybkości reakcji wyrażonej w U przez masę białka w reaktorze (czy to wolnego czy na powierzchni, parametr wyznaczony z efektywności immobilizacji), to stwierdzenie w rozprawie jest po prostu błędne. Natomiast kwestię czy spadek k_{cat} wynika ze zmiany struktury katalizatora czy z ograniczeń dyfuzyjnych powstałych na skutek heterogenizacji enzymu, jest rozstrzygnąć niezwykle trudno. Można jedynie spekulować, że w przypadku adsorpcji te zmiany są mniejsze. Jednak badania nad zmianami struktury białek w skutek adsorpcji wykazują, że podatność na zmiany wskutek adsorpcji zależy mocno od struktury białek (koncepcja tzw. miękkich i twardych białek W. Norde - Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 29 Sep 2007, 61(1):1-9).

Niezbyt fortunnie sformułowano również poniższe zdanie:

„Istotną obserwacją stanowi również fakt, że XDH oraz GDH unieruchomione na krzemionce SBA 15 utrzymały lepsze właściwości katalityczne, co koresponduje z wcześniej poczynionymi obserwacjami i dowodzi, że enzymy unieruchomione wewnątrz nośnika wykazują wyższą aktywność i stabilność w dłuższym okresie.”

Nie ma wątpliwości, że w wyniku immobilizacji enzymy wykazują większą odporność na procesy denaturacji i dezaktywacji. Oznaczamy ten fakt poprzez pomiar aktywności. Natomiast samo unieruchomienie bardzo rzadko skutkuje wzrostem wartości stałej kinetycznej k_{cat} jako takiej. Jest trochę doniesień demonstrujących taki efekt hiperaktywności po immobilizacji, osobiście jednak uważam, że wynika on częściej z błędów wyznaczania aktywności właściwej (gdyż pomiar ilości osadzonego enzymu polega na oznaczeniu bardzo małej ilości enzymu nieosadzonego szczególnie w przypadku wysokiej efektywności immobilizacji – przykład 120%



aktywności właściwej po immobilizacji M. Tataruch i inni, *Catalyst*, 10(12) (2020) 1460). Drugą sytuacją jest przypadek, gdy enzym homogeniczny ulega agregacji w roztworze, co prowadzi do spadku jego obserwowanej aktywności, zaś enzym immobilizowany ma oczywiście zahamowaną mobilność i do agregacji nie dochodzi. Zmianę konformacji reszt w centrum aktywnych tak aby uzyskać wzrost aktywności oczywiście nie sposób wykluczyć (jest to termodynamicznie możliwe), ale ze względu na wysokie zróżnicowanie sposobu immobilizacji enzymu w danym materiale uzyskanie globalnego wzrostu aktywności w wyniku takich przypadkowych odkształceń struktury uważam po prostu za niezwykle mało prawdopodobne.

Rozumiem jednak, że habilitantowi chodziło o nawiązanie do wolniejszego spadku w czasie procesu aktywności immobilizowanego enzymu względem enzymu wolnego. W takim przypadku poprawna jest druga część zdania nawiązująca do większej stabilności enzymów immobilizowanych w czasie procesu. Również wspomniana poniżej w rozprawie większa wydajność procesowa wiąże się z efektywnie wyższą średnią aktywnością katalizatora immobilizowanego, wynikającą właśnie z większej stabilności procesowej.

Podobne stwierdzenie spotykać możemy na stronie 30 rozprawy dotyczący lakkazy:

„Należy jednak podkreślić stabilizujący oraz ochronny wpływ matrycy, bowiem unieruchomione enzymy w całym analizowanym zakresie pH i temperatury wykazały ponad 20% wyższą aktywność niż ich wolny odpowiednik.”

Jako recenzent oczekiwałbym bardziej dogłębnej analizy obserwowanego zjawiska w omówieniu cykli. Ponieważ obserwowana aktywność enzymatyczna w funkcji temperatury jest pochodną wypadkowego wzrostu szybkości reakcji chemicznej wg. modelu Arrheniusa oraz spadku aktywności w wyniku postępującego w czasie procesu denaturacji, zwiększenie odporności enzymu na denaturację powoduje obserwowaną „wyższą aktywność” enzymu immobilizowanego względem enzymu homogenicznego. Jeśli chodzi o pH, sprawa jest bardziej skomplikowana, gdyż po pierwsze nośnik może działać jako lokalny bardzo silny bufor, szczególnie jeżeli jest sfunkcjonalizowany grupami kwasowo/zasadowymi. Dzięki temu zmiany otoczenia pH buforu mogą mieć mniejszy wpływ na zmianę protonacji reszt w centrum aktywnym lakkazy. Czy taki efekt miał miejsce w przypadku MCF (ujemnie naładowana powierzchnia zakończona grupami OH) z immobilizowaną lakkazą i jakimiś formami miedzi trudno mi jest na podstawie publikacji wyrokować. Z drugiej strony w pracy faktycznie przedstawiono parametry kinetyczne k_{cat} wyliczone z aktywności właściwej dla katalizatora immobilizowanego na materiale MCF+Cu względem enzymu wolnego (odpowiednio, 68 ± 4 względem $61 \pm 3 \text{ s}^{-1}$) i można wysnuć hipotezę, że obecność jonów miedzi w matrycy przyczyniła się do rekonstrukcji części centrów aktywnych apoenzymu.

Podsumowując, zdecydowanie zabrakło mi w omówieniu osiągnięcia elementów metaanalizy uzyskanych wyników, wykraczających poza streszczenie informacji przedstawionych w poszczególnych pracach.

Pomimo tych kilku uwag o charakterze polemicznym, zaadresowanych głównie względem omówienia osiągnięcia, a nie samych publikacji z cyklu habilitacyjnego, stwierdzam, że przedstawiony mi do oceny dorobek habilitacyjny z naddatkiem spełnia wymogi stawiane habilitantom. Jako enzymolog jestem również pod wrażeniem pisarskiej sprawności i niewątpliwej pracowitości habilitanta, który w tak krótkim czasie od doktoratu osiągnął tak wiele zarówno na polu naukowym, recenzenckim jak i dydaktycznym.



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Podsumowanie

W mojej ocenie dorobek habilitanta oraz przedstawiony przez niego cykl prac opisujący osiągnięcie w zakresie „Projektowania systemów biokatalitycznych i ich roli w procesach konwersji biomasy oraz unieszkodliwiania wybranych zanieczyszczeń środowiskowych” dobitnie wskazuje na jego naukową dojrzałość.

Stwierdzam, że wniosek dr inż. Jakuba Zdartego w postępowaniu habilitacyjnym został złożony wraz z kompletem wymaganych dokumentów.

Analiza osiągnięcia naukowego, dorobku naukowego i zawodowego oraz materiałów zawartych w rozprawie, pozwala stwierdzić, że habilitant spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm., rozdział 3, art. 219.1) upoważniające do starania się o stopień naukowy doktora habilitowanego. W związku z powyższym popieram wniosek o nadanie stopnia doktora habilitowanego dla dr inż. Jakuba Zdarty w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk chemicznych.

Prof. dr hab. Maciej Szaleniec