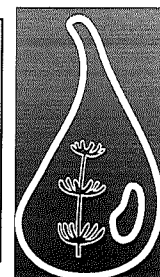


Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław  
Prof. dr hab. Jolanta Bryjak  
e-mail: [jolanta.bryjak@pwr.edu.pl](mailto:jolanta.bryjak@pwr.edu.pl)



Wrocław, 30 wrzesień 2019

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Michała Kołodzieja**  
**pt.: „ Krystalizacja jako metoda rozdzielania i oczyszczania białek”.**

wykonanej w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Rzeszowskiej, pod opieką merytoryczną prof. dr hab. inż. Doroty Antos.

Krystalizacja białek od połowy lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku przyciąga uwagę wielu badaczy. Początkowo były to studia nad strukturą przestrzenną białek, później poszerzone o krystalizację białek z ligandami, co pozwala poznać nie tylko budowę polipeptydów, ale również zrozumieć zasady ich funkcjonowania. Kolejnym ważnym etapem w rozwoju krystalizacji białek było zastosowanie insuliny w formie iniekcji kryształów. Analogicznie do chętnie stosowanych w przemyśle farmaceutycznym krystalicznych form leków, również kryształy białka posiadają wyjątkowo dobrą stabilność podczas przechowywania, niemożliwą do osiągnięcia w formie rozpuszczonej czy zliofilizowanej. Dodatkowo preparaty krystaliczne pozwalają na stopniowe uwalnianie cząsteczek z sieci oraz jest to w zasadzie jedyna forma białka, zapewniająca wymagany stopień czystości preparatu, przekraczający wartość 99,8%. Rozwój badań nad krystalizacją białek terapeutycznych w skali przemysłowej jest obserwowany do chwili obecnej, jakkolwiek dobór warunków krystalizacji nadal opiera się głównie na metodzie prób i błędów.

Krystalizacja białek znalazła się również w obszarze zainteresowań głównych producentów enzymów przemysłowych, jak Novozymes, Genencor International, Amano, czy Altus Biologics. Zbiegło się to w czasie z rozwojem katalizy w środowiskach z kontrolowaną zawartością wody, w których białka zazwyczaj się nie rozpuszczają, ale są w stanie przeprowadzać na przykład reakcje syntezy w miejsce reakcji hydrolizy, z substratami nierozpuszczalnymi w wodzie. W tym przypadku kryształy biokatalizatorów umożliwiają kontakt z substratami reakcji, przy niespotykanie mniejszej utracie aktywności. Rozszerzeniem tego nurtu zastosowań enzymów było opracowanie technik sieciowania kryształów, zwiększając ich stabilność operacyjną oraz umożliwiając prowadzenie

reakcji w środowiskach wodnych. W latach 1992-2000 zaczęto stosować kryształy lub sieciowane kryształy różnych enzymów w przemyśle biotechnologicznym. Na skalę komercyjną produkcję rozpoczął Altus Biologics ze stosowanymi do tej pory preparatami ChiroCLEC™ Lipase CR i PC (lipazy stosowane do rozdziału związków chiralnych, estryfikacji, transestryfikacji, hydrolizy estrów), PeptiCLEC™ TR i BL (termolizyna i subtylizyna do syntezy i hydrolizy peptydów) i Synth CLEC™ (acylaza penicylanowa do hydrolizy i syntezy wiązań amidowych). Gwałtowny rozwój technologii z wykorzystaniem kryształów i sieciowanych kryształów w ostatnich czasach nieco przyhamował, co ma związek z trudnościami w otrzymywaniu kryształów o rozmiarach 50-150 µm, a co ma prozaiczny związek z kompromisem pomiędzy zadawalającą aktywnością, a filtracją lub oporami przepływu przez złoże.

Proces krystalizacji białek w skali większej, niż laboratoryjna, jest zawsze zadaniem wieloaspektowym, poczynając od poszukiwań źródła białka, poprzez dobór warunków izolacji i oczyszczania, po formułację produktu. Pierwszy etap jest najczęściej realizowany poprzez nadprodukcję żądanego białka w komórkach mikroorganizmu, co zwykle prowadzi do uzyskania ciał inkluzyjnych, zawierających stosunkowo czyste białko, ale najczęściej o nieprawidłowej konformacji. Wymaga to opracowania warunków tzw. refoldingu, jednak zarówno kosztowne techniki z wykorzystaniem inżynierii genetycznej i ekspresji genów, jak i koszty technik przywracania aktywnej struktury białka, są kompensowane z nadmiarem znaczącym wzrostem ilości dostępnego surowca oraz mniejszą liczbą operacji jednostkowych, niezbędnych w kolejnym etapie. Białko, które ma zostać poddane krystalizacji musi być oczyszczone z stopniu umożliwiającym niezakłócony zanieczyszczeniami proces, czyli w praktyce powyżej 90% danego białka. Techniki takie jak chromatografie i oczyszczanie frakcjonujące, w różnych konfiguracjach, są najczęściej stosowane w przemyśle i jednocześnie jest to etap najdroższy w cyklu produkcyjnym. Natomiast stopień komplikacji etapu końcowego - formułacji produktu - jest zwykle zależny od stabilności produktu w warunkach przechowywania oraz od sposobu i stabilności podczas wykorzystania. W przemyśle farmaceutycznym czystość farmaceutyku i jego stabilność odgrywają kluczową rolę, co powoduje, że formy krystaliczne leków są zawsze preferowane, a rozmiary kryształów muszą być dostosowane do konkretnych zastosowań.

W krystalizacji białek, obok czystości materiału wyjściowego, dużą rolę odgrywa prawidłowy dobór warunków krystalizacji, co często ma charakter dość przypadkowy, jak miało to miejsce podczas krystalizacji insuliny w obecności śladowych ilości cynku. W chwili obecnej, mimo znaczącego postępu w tej dziedzinie, nadal trudno się doszukać reguł pozwalających na racjonalne zaprojektowanie procesu, co ogranicza możliwości poszerzenia gamy dostępnych białek farmakologicznych. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Michała Kołodzieja

dotyczy opracowania efektywnych procesów krystalizacji dwóch białek modelowych, lizozymu i owoalbuminy, poprzez jednostopniową lub dwustopniową krystalizację w siarczanie amonu oraz krystalizację owoalbuminy poprzez odparowanie rozpuszczalnika, również w obecności siarczanu amonu. Wybrane białka modelowe różnią się rozpuszczalnością i wartością pI, co stwarza nadzieję na znalezienie bardziej ogólnych zależności w doborze warunków procesowych. Zatem tematyka podjętych badań jest zarówno ambitna naukowo, jak aktualna zadaniowo.

Od strony formalnej praca doktorska została opracowana z nietypowym podziałem na poszczególne rozdziały. Opracowanie obejmuje 74 strony, w tym 17 stron to wstęp, 15-stronicowy przewodnik po dwóch publikacjach, dwustronicowe podsumowanie i wnioski, wykaz stosowanych symboli i oznaczeń, 99 pozycji literatury cytowanej oraz 2 pełnotekstowe artykuły, w których doktorant jest dominującym współautorem. Całość otwierają streszczenia w języku polskim i angielskim. Zabrakło jedynie wykazu dorobku naukowego Autora. Rozprawa doktorska w całości jest oparta o wyniki eksperymentów opisanych w dwóch załączonych publikacjach, które zostały zamieszczone w czasopiśmie *Crystal Growth and Design*, idealnie dobranym do tematyki przedstawionych badań. Wartość IF czasopisma na poziomie 4,15 świadczy o tym, że manuskrypty zostały wnikliwie recenzowane przez specjalistów w dziedzinie krystalizacji białek. Na tym właściwie powinnam zakończyć swoją recenzję. Pokuszę się jednak o krótki komentarz.

W części literaturowej Autor zwięźle przedstawił podstawowe informacje ułatwiające lekturę zamieszczonych artykułów. Jest to bardzo staranne opracowanie, w którym trudno doszukać się błędów, poprawne językowo i terminologicznie, co powoli staje się rzadkością. Autor systematycznie prowadzi czytelnika od zagadnień produkcji białek rekombinowanych, po termodynamikę krystalizacji, przedstawiając główne problemy związane z otrzymywaniem krystalicznych białek. Jest to bardzo dobry punkt wyjścia do klarownej koncepcji badań i celu pracy, które znajdują się przed wprowadzeniem. I ta kolejność, to jest jedyna rzecz, którą bym zmieniła.

Części dotyczące metodologii znajdują się w załączonych publikacjach, są bardzo zwarte i zawierają wszystkie niezbędne informacje, umożliwiające odtworzenie badań.

W ocenianej dysertacji zamieszczony jest również komentarz do dwóch publikacji, stanowiących rdzeń rozprawy doktorskiej. W tej części zwraca uwagę umiejętne przedstawienie głównych etapów badań, które wprowadzają elementy nowości w stan wiedzy dotyczącej krystalizacji białek. Autorzy publikacji 1 zaproponowali opis równowagi krystalizacyjnej w układzie trójskładnikowym, w miejsce zazwyczaj stosowanego układu dwuskładnikowego. Wymagało to uprzedniego wyznaczenia ilości wody wiązanej w strukturze kryształu, co umożliwia obliczenie wartości równowagowego składu fazy stałej. Następnie wyznaczone zostało eksperymentalnie tzw. okno operacyjne, a uzyskane wyniki zostały porównane z obliczonymi na podstawie danych z

krzywych rozpuszczalności i konod równowagowych, uzyskując ich dużą zbieżność. Autor dysertacji pojął również próbę zwiększenia wydajności procesu krystalizacji owoalbuminy poprzez zastosowanie dwustopniowej krystalizacji, polegającej na wstępnej krystalizacji w pH 6,6, a następnie dalszej krystalizacji w pH 5, w którym rozpuszczalność białka jest mniejsza. W efekcie, w jednostopniowej krystalizacji lizozymu i dwustopniowej owoalbuminy, wydajność procesów przekroczyła 90%. Ponieważ wartości pI obu białek różnią się znacząco, a w obu przypadkach zastosowano zbliżoną wartość pH w trakcie krystalizacji, należy przypuszczać, że opracowana procedura, z ewentualnym rozszerzeniem o zmianę pH w drugim stopniu, może znaleźć zastosowanie również w krystalizacji innych białek.

Dalsze badania były prowadzone nad krystalizacją owoalbuminy przez odparowanie rozpuszczalnika w konwekcji wymuszonej, a ich wyniki zamieszczono w drugiej załączonej publikacji. Idea prowadzenia krystalizacji w komorze suszarniczej jest w swej istocie prosta i piękna; wyjściowy roztwór białka zawiera relatywnie niewielkie stężenie siarczanu amonu, które wzrasta wraz odparowywaniem wody, powodując krystalizację białka. Takie rozwiązanie pozwala sterować wydajnością procesu i wielkością powstających kryształów poprzez temperaturę, przepływ i wilgotność powietrza w komorze oraz poprzez stosunek powierzchni cieczy do objętości roztworu. Co więcej, proces zaprojektowano w oparciu o analizę diagramu fazowego i kinetykę krystalizacji, a następnie zweryfikowano eksperymentalnie. W efekcie uzyskano wydajność na poziomie 85% w procesie jednostopniowym. Ponad wszelką wątpliwość, jest to duże osiągnięcie. W ostatnim zdaniu publikacji Autorzy zamieścili informację o kontynuacji badań nad modelem matematycznym krystalizacji, w połączeniu z równaniami kinetycznymi transportu masy i ciepła, aby móc bardziej precyzyjnie optymalizować przebieg procesu. Jest to kolejne bardzo ambitne zadanie na przyszłość.

Podsumowanie badań własnych i wnioski to syntetyczne przedstawienie głównych nurtów wykonanych badań, ze wskazaniem na ich potencjał naukowo-aplikacyjny. To bardzo krótkie opracowanie, w moim odczuciu, wskazuje na dużą dojrzałość Pana Michała Kołodzieja w selekcji rezultatów cząstkowych i umiejętności zogniskowania wieloetapowych badań na cel końcowy. Jako biolog specjalizujący się w inżynierii bioprocessowej, wysoko oceniam wysiłki pozwalające usprawnić procesy krystalizacji białek.

Podsumowując recenzję chciałabym podkreślić, że rolą recenzenta jest wskazanie wad i zalet ocenianej dysertacji, ale w tym przypadku nie mam żadnych zastrzeżeń, poza niewartymi wymieniania nielicznymi błędami interpunkcyjnymi i literowymi. Całościowo praca zawiera wiele interesujących wyników, które zostały przedstawione w dwóch publikacjach, zamieszczonych w bardzo dobrych czasopismach (łącznie IF powyżej 8,3). Stwarza to podstawę do stwierdzenia, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera bardzo wartościowe elementy o charakterze

poznawczym, oraz, co pragnę podkreślić, wskazuje na możliwości wykorzystania opracowanych rozwiązań w krystalizacji innych białek. Oprócz tego Doktorant jest współautorem dwóch innych publikacji z 2015 i 2019 roku (IF 3,37 i 3,28), co w sumie daje łączny IF 15. Jest to niewątpliwie imponująca wartość wskaźnika IF. Obie dodatkowe publikacje stanowią poszerzenie zakresu badań o etap wstępny, jakim jest przywracanie aktywnej formy białek zdenaturowanych, co często poprzedza proces krystalizacji oraz badania kinetyki krystalizacji lizozymu, co ma bardziej bezpośredni związek z ocenianą dysertacją doktorską. Wyjątkową aktywność naukową mgr inż. Michała Kołodzieja widać również w uczestnictwie w 11 konferencjach międzynarodowych i 7 krajowych, na których zaprezentowano 30 posterów i referatów. Warto dodać, że jest również współautorem jednego zgłoszenia patentowego, był wykonawcą w 3 projektach NCN i NCBiR oraz kierownikiem grantu w ramach konkursu Preludium. Zarówno projekty, jak i wystąpienia konferencyjne nie miały charakteru monotematycznego, ale dotyczyły także otrzymywania innowacyjnych nawozów, chromatograficznego rozdziału mieszanin i, dodatkowo, krystalizacji monoklonalnych przeciwciał (kierownik projektu). Ogólnie stwierdzam, że dysertacja z nadmiarem odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595, ze zm.) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej o dopuszczenie mgr inż. Michała Kołodzieja do publicznej obrony. Jednocześnie, uwzględniając dodatkowo Jego aktywność naukową, z przyjemnością wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej.

Małgorzata Bryzga