

Łódź, 1.10.2019

Prof. dr hab. inż. Stanisław Ledakowicz
Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska
Politechnika Łódzka

**Recenzja rozprawy doktorskiej mg inż. Michała Kołodzieja
pt. „Krystalizacja jako metoda rozdzielania i oczyszczania białek”**

Promotor: prof. dr hab. inż. Dorota Antos

Promotor pomocniczy: dr inż. Izabela Poplewska

1. Treść i zakres rozprawy doktorskiej

Krystalizacja białek jest znana od 170 lat, jednakże w przeciwieństwie do małych molekuł, proces krystalizacji białek nie jest powszechnie stosowany w przemyśle. A zapotrzebowanie na terapeutyczne proteiny, czy enzymy w przemyśle farmaceutycznym i produkcji żywności stale rośnie. Oprócz zastosowania do formulacji leków krystalizacja może być wykorzystana jako stosunkowo tani, w porównaniu z metodami chromatograficznymi, proces selektywnej separacji i efektywnego oczyszczania protein. Literatura dotycząca krystalizacji białek jest obszerna ale ukierunkowana jest głównie na otrzymywanie kryształów w celu wyznaczenia ich struktury poprzez dyfrakcję promieniowania rentgenowskiego - są to metody krystalizacji w mikroskali (μL). Owszem, przyczyniły się te badania do poznania podstaw fizykochemicznych mechanizmu krystalizacji białek, mimo to proces ten nie jest do końca poznany a ustalenie warunków krystalizacji (tzn. parametrów procesowych aby uzyskać optymalną wydajność, czystość oraz rozmiar kryształów) w większej skali wymusza stosowanie metody prób i błędów. Zrozumienie mechanizmów zachodzących w trakcie krystalizacji pozwoli zastosować strategie umożliwiające uzyskanie kryształów o określonych właściwościach i wysokiej wydajności. Ponadto brakuje literatury przedmiotu dotyczącej termodynamiki (diagramów fazowych) i kinetyki procesy krystalizacji białek. Dlatego uważam, że wybór tematyki rozprawy, egzemplifikowanej procesami krystalizacji preparatywnej, poprzez wysalanie i przez odparowanie rozpuszczalnika w konwekcji wymuszonej, uważam za w pełni uzasadniony.

Na recenzowaną pracę doktorską składają się dwie publikacje w renomowanych czasopismach o obiegu światowym :

[D1] Kołodziej, M.; Poplewska, I.; Piątkowski, W.; Antos, D. Design of Bulk Protein Crystallization Based on Phase Diagrams Accounting for the Presence of Interfacial Water. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (1), 393–401. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01398>.

[D2] Kołodziej, M.; Olbrycht, M.; Poplewska, I.; Piątkowski, W.; Antos, D. Forced Convection Evaporation for Bulk Protein Crystallization. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (9), 5194–5201. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00638>,

w których pierwszym autorem jest doktorant mgr inż. Michał Kołodziej, o większościowym udziale (50%). Ponadto, doktorant jest współautorem jeszcze dwóch publikacji w renomowanych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej (Chem. Eng. Sci. 130 (2015), 290–300, i Chem. Eng. Res. Des., 141 (2019), 580-590). Publikacjom składających się na pracę doktorską towarzyszy obszernie omówienie w języku polskim na 57 stronach. Z tego do 30 strony autor podaje podstawy teoretyczne dotyczące produkcji i procesów rozdzielania i oczyszczania białek terapeutycznych, koncentrując się na procesie krystalizacji, a kolejne 27 stron zajmuje komentarz do wymienionego cyklu publikacji.

Celem pracy było “zaprojektowanie na podstawie odpowiednio zaplanowanych cykli doświadczeń nowych koncepcji realizacji procesu krystalizacji dla wybranych białek modelowych, które mogą być w przyszłości wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym”. Tymi białkami modelowymi były owoalbumina (OVA) i lizozym (LYZ).

Praca obejmowała 5 celów szczegółowych:

1. Opracowanie sposobu postępowania przy projektowaniu procesu krystalizacji uwzględniającego dobór buforu, czynnika strącającego oraz wyznaczenie okna operacyjnego,
2. Wyznaczenie równowagi krystalizacyjnej białek modelowych z uwzględnieniem wpływu wody wiązanej przez fazę krystaliczną na stężenie równowagowe,
3. Określenie kinetyki krystalizacji dla zaprojektowanych procesów,
4. Opracowanie i zrealizowanie procesu jednostopniowej oraz frakcjonowanej krystalizacji przez wysalanie dla białek modelowych,
5. Opracowanie i zrealizowanie krystalizacji przez odparowanie rozpuszczalnika w konwekcji wymuszonej oraz wyznaczenie wpływu parametrów procesowych na równowagę oraz kinetykę procesu.

Bardzo często w pracach doktorskich wymagane jest określenie tezy pracy, tu być może ze względu na inną podstawę prowadzenia przewodu doktorskiego nie sformułowano takiej tezy ale cel i zakres rozprawy zostały wyraźnie określone.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Oceniając rozdział 2 pracy doktorskiej, który zawiera podstawy teoretyczne procesu, uważam, że niepotrzebnie doktorant opisał produkcję, procesy oczyszczania i rozdzielania białek rekombinowanych oraz rynek farmaceutyczny, bo przecież obiektami badań była owoalbumina i lizozym a nie przeciwciała monoklonalne. Powinien bardziej skupić się na krystalizacji preparatywnej, której poświęcił zaledwie 8 stron, nie wspominając o interakcjach molekularnych (elektrostatycznych, hydrofobowych itd.) i ich wpływie na proces krystalizacji białek, a w szczególności na morfologię i rozmiary kryształów.

Podrozdział „Aplikacje przemysłowe krystalizacji białek” to jest to czego oczekiwałem i tylko bardziej bym na miejscu doktoranta rozszerzył przegląd literatury dotyczący zagadnień krystalizacji preparatywnej i powiększenia skali procesu, o którym jedynie doktorant nadmienia. Dobrym zwyczajem prac doktorskich w zachodnich uniwersytetach jest tzw. outlook, czyli wskazanie, po sformułowaniu wniosków, perspektyw dalszych badań w danej tematyce, czego jest tu brak. Ale zanim przejdę do omawiania wniosków ocenię merytorycznie uzyskane wyniki badań zawarte w 2 publikacjach i komentarzu (tj. w rozdz. 3).

W publikacji D1 wyznaczono równowagę krystalizacyjną dla obu modelowych białek zarówno w układzie binarnym (białko-sól) jak i trójskładnikowym (białko-sól-woda). Przy czym w tym drugim przypadku należało wyznaczyć zawartość wody w fazie krystalicznej, co osiągnięto dzięki zastosowaniu różniczkowej kalorymetrii skaningowej DSC. Zawartość tej związanej z białkiem wody stanowi 18% mas. całkowitej masy fazy krystalicznej OVA i 29% mas. w przypadku LYZ. Ilościowe określenie diagramu fazowego jest kluczowe dla ustalenia warunków krystalizacji i dlatego z pełnym uznaniem odnoszę się do przedstawienia równowagi krystalizacyjnej w diagramie trójskładnikowym, jakkolwiek dalsze wyniki badań są prezentowane na rysunkach w układach binarnych (stężenie białka w funkcji stężenia soli). Przy okazji chcę nadmienić, że w oryginalnej publikacji D1 na rys. 1A zamiast *protein solubility* na osi rzędnych powinno być *protein concentration* x_p .

Dla krystalizacji lizozymu zaprojektowano jednostopniowy proces poprzez wysalanie za pomocą siarczanu amonu o stężeniu $x_p = 0,125 - 0,210$ mas., przy pH 7, co zostało już wcześniej ustalone w publikacji [28], w której doktorant nie był współautorem. Dzięki tak dobranym warunkom krystalizacji LYZ uzyskano wysoką wydajność procesu rzędu 90%.

W przypadku krystalizacji owoalbuminy należało wcześniej usunąć agregaty białkowe z początkowego stężenia 30% mas., do 9% mas., co udało się dzięki zastosowaniu strącania 1,6 M roztworem siarczanu amonu. Sprawdzenie stopnia oczyszczenia dokonano poprzez

zastosowanie chromatografii SEC, dostępnej w Katedrze Inżynierii Chemicznej, specjalizującej się m.in. w chromatografii adsorpcyjnej. Mimo, że postępowanie było analogiczne jak w przypadku krystalizacji lizozymu uzyskano w jednostopniowym procesie wydajność jedynie rzędu 50%. Dlatego zdecydowano się na dwustopniową krystalizację, obniżając wcześniej pH z 6,5 do 5. To obniżenie pH spowodowało spadek rozpuszczalności OVA i jej dalszą krystalizację, przy czym osiągnięto całkowitą wydajność procesu równą 92%. Dla obu poziomów pH 5 i 6,5 wyznaczono „okno operacyjne” krystalizacji OVA i przedstawiono to bardzo poglądowo na rysunku 16 w Komentarzu (Fig. 5A w D1). Ustalenie tych warunków operacyjnych pozwalających uzyskiwać tak wysokie wydajności procesowe jest bez wątpienia dużym sukcesem, podobnie jak wyznaczenie bardzo użytecznej, ilościowej zależności (w postaci wielomianu) rozpuszczalności OVA od stężenia soli, dla różnych wartości pH.

Wyznaczono również krzywe kinetyczne procesu krystalizacji obu białek, dla różnych stężeń początkowych, ale bez żadnego opisu ilościowego – szkoda! Przy okazji mam pytanie do doktoranta: co kontroluje szybkość procesu krystalizacji badanych białek, czy też w jakim obszarze (reżimie) zachodzi ten proces?

Pewien niedosyt pozostawia brak szczegółowego opisu morfologii uzyskanych kryształów, podano jedynie zdjęcia fazy krystalicznej dla obu białek ale bez rozkładu wielkości uzyskanych kryształów.

Publikacja D2 przedstawia oryginalną metodę krystalizacji OVA poprzez odparowanie rozpuszczalnika w konwekcji wymuszonej. Eksperymenty przeprowadzono w komorze suszarniczej, przez którą przepuszczano suche ogrzane powietrze o kontrolowanej temperaturze i liniowej prędkości przepływu. Jedynym zmiennym parametrem mierzonym była względna wilgotność powietrza w zakresie 10-20%. Wodny roztwór OVA w siarczanie amonu o początkowym stężeniu 0,19 mas. był mieszany za pomocą mieszadła magnetycznego i ważony w sposób ciągły. Na podstawie ubytku masy roztworu wyznaczano ilość odparowanej wody w czasie (szybkość odparowania), a tym samym kinetykę krystalizacji. Powolny ubytek wody zapewniał powolny wzrost stężenia czynnika strącającego, co zapobiegało powstawaniu fazy amorficznej, i umożliwił prowadzenie procesu o stosunkowo niskim stężeniu początkowym białka. Okazało się, że szybkość krystalizacji rosła, ze wzrostem temperatury powietrza, przy czym temperatura roztworu (przykładowo 35°C) pozostawała zawsze znacznie niższa niż temperatura powietrza (45°C). Z bilansu ciepła i masy doktorant mógł obliczyć temperaturę jaką osiągnie roztwór podczas krystalizacji zastosowaną metodą. Doktorant uważa, że „...kinetyka krystalizacji OVA nie

zależy od stężenia soli w analizowanym zakresie parametrów procesowych” - rys. 22B. Jednakże, analizując wyniki badań zamieszczone na rys. 22B uważam, że to nie jest całkiem prawdziwe stwierdzenie, bo szybkość początkowa krystalizacji maleje ze spadkiem stężenia początkowego soli. Nie ma to większego wpływu na ustalenie równowagi, bo nawet przy niewielkim przesyleniu równowaga ustala się po upływie 1 godziny. Na podstawie danych równowagowych i kinetycznych wyznaczono warunki operacyjne procesu krystalizacji OVA przez odparowanie rozpuszczalnika w konwekcji wymuszonej, a przebieg tego procesu przedstawiono graficznie wykazując, że punkty eksperymentalne mieszczą się w wyznaczonym „oknie operacyjnym”.

Co jest godne podkreślenia zbadano wpływ szybkości odparowania na rozkład wielkości kryształów OVA. Okazało się, że średni rozmiar kryształów rośnie ze wzrostem szybkości odparowania, co jest spowodowane wcześniejszym osiągnięciem stanu przesylenia roztworu krystalizacyjnego oraz skróceniem czasu trwania procesu.

Komentarz doktoranta kończy się wnioskami, które są właściwie podsumowaniem najważniejszych osiągnięć, a powinny być wypunktowane stwierdzenia, nowe spostrzeżenia, nowo uzyskane zależności takie jak np. wcześniej podkreślana potrzeba wyznaczenia zawartości wody w fazie krystalicznej w celu ustalenia trajektorii procesu krystalizacji w diagramie trójskładnikowym, czy też ostatnio wspomniane, że średni rozmiar kryształów rośnie ze wzrostem szybkości odparowania itp. itd.

Uwagi przedstawione powyżej, poczynione z obowiązku recenzenta, nie umniejszają wartości poznawczej rozprawy.

3. Wniosek końcowy

Praca nie budzi zastrzeżeń zarówno pod względem formalnym, jaki i merytorycznym. Została sformułowana poprawnie i wnosi wiele elementów nowości naukowej. Analiza danych doświadczalnych jest prawidłowa. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat metod krystalizacji i oczyszczania białek. Opracowanie stanowi oryginalny dorobek autora.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska p. mgr inż. Michała Kołodzieja spełnia wymagania formalne w odniesieniu do pracy doktorskiej, odpowiada wymogom obecnie obowiązujących przepisów. Zwracam się, zatem do Rady Naukowej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej o przyjęcie pracy oraz dopuszczenie p. mgr inż. Michała Kołodzieja do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim.

