



Wrocław, dn. 10.09.2024 r.

Dr hab. inż. Filip Boratyński, prof. uczelni
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Ocena Pracy doktorskiej
Pana mgr inż. Jakuba Hoppe**

pt. „Mieszanki eutektyczne zawierające sole choliny jako modyfikatory środowiska enzymatycznych reakcji hydrolizy”

Podstawę formalną wykonania niniejszej recenzji stanowi pismo Prodziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, prof. dr. hab. Roberta Pietrzaka, odnośnie powierzenia mi funkcji recenzenta zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne z dnia 12 lipca 2024 r.

Praca doktorska Pana mgr. inż. Jakuba Hoppe została wykonana w Zakładzie Chemii i Technologii Związków Krzemu Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką merytoryczną dr. hab. inż. Marcina Śmigłaka, pełniącej funkcję promotora w przewodzie doktorskim oraz dr. hab. inż. Radosława Drozda, będącego promotorem pomocniczym.

Charakterystyka formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl trzech oryginalnych publikacji naukowych, opublikowanych w latach 2019 - 2022 w zagranicznych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Report (JCR)*. W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. **Jakub Hoppe**, Radosław Drozd, Ewa Byzia, Marcin Śmiglak, Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 2019, 296-304 (IF = 5,482; MEiN = 100 pkt).



2. **Jakub Hoppe**, Ewa Byzia, Magdalena Szymańska, Radosław Drozd, Marcin Śmiglak, Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents, *Food Chemistry*, 384, 2022, 132498 (IF = 7,512; MEiN = 200 pkt).
3. **Jakub Hoppe**, Ewa Byzia, Radosław Drozd, Magdalena Szymańska, Patryk Bielecki, Marcin Śmiglak, An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 216, 2022, 112518 (IF = 5,268; MEiN = 100 pkt).

Wszystkie prace opublikowano w czasopismach o uznanej wartości, które zostały wcześniej poddane recenzji. Łączna liczba punktów obliczona wg daty opublikowania prac wynosi 400 pkt. MEiN, a sumaryczny IF wynosi ponad 18. Powyższe dane naukometryczne oceniam bardzo wysoko. Przedstawione prace są opracowaniami zbiorowymi, gdzie Pan mgr inż. Jakub Hoppe jest pierwszym, a zarazem wiodącym autorem. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami wkład Doktoranta w oryginalne prace twórcze obejmował syntezę cieczy jonowych, preparatykę mieszanin eutektycznych, ich charakterystykę spektroskopową FT-IR oraz przeprowadzenie pomiarów gęstości, lepkości, przewodnictwa, stabilności termicznej, jak również omówienie wyników badań w ujęciu całościowym, oraz przygotowanie manuskryptu i dyskusję z recenzentami. Analizując powyższe zaangażowanie, można uznać przedstawioną rozprawę doktorską za autorskie dzieło Pana mgr. inż. Jakuba Hoppe.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Jakuba Hoppe jest oparta na cyklu trzech oryginalnych artykułów naukowych wraz z komentarzem. Rozprawa liczy 161 stron i jest skonstruowana zgodnie z systemem, gdzie publikacje stanowią jej zasadniczą część. Zostały one dołączone na końcu pracy wraz z oświadczeniami współautorów. Rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, ankietę dorobku naukowego Doktoranta, oraz następujące działy: wprowadzenie, cel pracy, omówienie wyników badań, wnioski oraz cytowaną literaturę. Wprowadzenie poświęcone jest charakterystyce i zastosowaniu mieszanin eutektycznych, zarówno mieszanin typu DES (*deep eutectic solvents*), jak i mieszanin typu LTTM (*low temperature transition mixtures*), które stanowią nowatorski obszar badań z dziedziny zielonej chemii. Druga część wprowadzenia dotyczy zastosowania mieszanin eutektycznych w obszarze biokatalizy, ze szczególnym nastawieniem na wykorzystanie ich w reakcjach enzymatycznej hydrolizy. W dalszej części autoreferatu zostały postawione hipotezy oraz sformułowane cele badawcze wraz z celami szczegółowymi. Rozdział dotyczący omówienia wyników został podzielony na osiem sekcji, w których każdorazowo na początku znajduje się informacja, iż opis metodyki prowadzenia poszczególnych badań został zamieszczony w publikacjach. Autoreferat podsumowany został w formie serii wniosków dotyczących postawionych na początku pracy dwóch głównych celów badawczych. Wykaz cytowanej literatury zawiera 144 pozycje bibliograficzne, przy czym jedynie 15% to piśmiennictwo



opublikowane przed rokiem 2010, co świadczy o aktualnej tematyce podjętych badań. Podsumowując, od strony formalnej praca nie budzi moich zastrzeżeń. Niestety strona edytorska rozprawy jest niedopracowana, zawiera liczne błędy językowe, nieadekwatne sformułowania, błędy w spójnym i chronologicznym oznaczaniu Rysunków i Wykresów wraz z brakiem odniesień do nich w tekście, co utrudnia analizę danych.

Merytoryczna ocena

Biokatalizatory naturalnie ewoluowały, aby działać optymalnie w środowisku wodnym, a zatem prowadzenie reakcji biokatalitycznych w warunkach wodnych jest tradycyjnym podejściem do maksymalizacji wydajności enzymu (aktywności i stabilności). Woda jest uważana za nietoksyczny i łatwo dostępny zielony rozpuszczalnik, chociaż jej wysoka polarność jest kluczową przeszkodą, gdy stosuje się hydrofobowe substraty. Powoduje to, że stężenia słabo rozpuszczalnych w wodzie substancji chemicznych są niesatysfakcjonujące. W tym kontekście wprowadzenie niekonwencjonalnych mediów może stać się prostym rozwiązaniem dla intensyfikacji procesu. Systematyczny rozwój biotransformacji w środowiskach niewodnych sięga lat 80. ubiegłego wieku (lipazy w rozpuszczalnikach organicznych), następnie w kolejnych dekadach opracowano ciecze jonowe i ciecze w stanie nadkrytycznym, które posiadają swoje mocne i słabe strony. Największym problemem w ich stosowaniu jest toksyczność. W związku z tym skupiono się na opracowaniu alternatywnych rozpuszczalników produkowanych na bazie biomasy roślinnej, a nie paliw kopalnianych. W tym obszarze mieszaniny głęboko eutektyczne (DES) zyskały ogromną uwagę od czasu ich debiutu w pionierskich badaniach Abbotta i zostały określone jako „rozpuszczalniki XXI wieku”. DES-y to ciecze o unikalnych właściwościach, które powstają w wyniku zmieszania dwóch ciał stałych, HBD (*hydrogen bond donor*) oraz HBA (*hydrogen bond acceptor*), w temperaturze pokojowej lub przy nieznacznym ogrzewaniu. Charakteryzują się one znacznie niższymi temperaturami topnienia niż ich pojedyncze składniki. Są obecnie uznawane za tanie, biodegradowalne i nietoksyczne rozpuszczalniki. Z jednej strony mają one podobne właściwości fizykochemiczne do cieczy jonowych (niska lotność, wysoka termostabilność, niepalność, zmienna polarność). Z drugiej strony są rozpuszczalnikami, których skład można modyfikować, co zapewnia im dużą wszechstronność i możliwość dostosowania do określonych celów. Poprzez zdefiniowaną kombinację składników, DES-y o pożądanej hydrofilowości/hydrofobowości mogą być stosowane do rozpuszczania różnych substancji chemicznych. Poza tym, silne wzajemne oddziaływania przyciągające między składnikami DES zmniejszają ich reaktywność, tym samym minimalizując reakcje uboczne. Dzięki temu znalazły one potencjalne zastosowania w wielu dziedzinach, w tym metalurgii, technologii produkcji baterii, syntezie organicznej i nanotechnologii. W przypadku stosowania mieszanin DES do celów biokatalitycznych mogą one działać jako rozpuszczalniki, współrozpuszczalniki, a nawet jako substraty, oferując wiele korzyści, m. in. zwiększając wydajność reakcji oraz selektywność



biokatalizatorów. Racjonalne projektowanie mieszanin eutektycznych do zastosowań biokatalitycznych wymaga holistycznego rozważenia kilku aspektów, w tym zawartości wody w celu zachowania aktywności enzymu, polarności w celu rozpuszczania substratów i lepkości w celu umożliwienia praktycznej z nimi pracy.

Praca Pana mgr. inż. Jakuba Hoppe świetnie wpisuje się w trend badań nad prowadzeniem reakcji biokatalizy w środowisku zawierającym mieszaniny eutektyczne. Założona przez Doktoranta hipoteza proponowanych badań stanowi, iż „różnicowany skład mieszanin eutektycznych może mieć wpływ na parametry operacyjne badanych enzymów, a oddziaływania pomiędzy mieszaninami soli choliny oraz strukturą enzymu, mogą dostarczyć podstawowej wiedzy na temat użyteczności mieszanin soli choliny w enzymatycznych reakcjach hydrolizy z udziałem enzymów z grupy hydrolaz”. W badaniach Pana mgr. inż. Jakuba Hoppe można wyróżnić dwa nurty. Pierwszy związany z syntezą i charakterystyką mieszanin typu DES i LTTM z kationem choliny oraz anionami nieorganicznym chlorkowym oraz organicznymi: octanowym, lewulinowym i mleczanowym. Drugi poświęcony możliwości zastosowania mieszanin eutektycznych, jako nowego środowiska w reakcjach enzymatycznej hydrolizy. W związku z powyższym Doktorant postawił sobie dwa główne cele badawcze, które następnie konsekwentnie realizował w kolejnych etapach badań.

Realizując pierwszy cel zsyntezował, a następnie dokonał analizy spektroskopowej oraz charakterystyki fizykochemicznej, oznaczając liczne parametry takie jak: gęstość, lepkość, przewodnictwo jonowe, stabilność termiczną oraz przemiany fazowe soli choliny i ich mieszanin. W związku z dość nielicznymi doniesieniami literaturowymi dotyczącymi innych anionów niż chlorkowy w solach choliny, w swoich badaniach skupił się również na wyjaśnieniu rodzaju oddziaływań w solach choliny zawierających organiczne aniony: octanowy, lewulinowy oraz mleczanowy. Jednym z kluczowych parametrów analizowanych przez Doktoranta jest gęstość rozpuszczalnika, która dostarcza informacji o interakcjach międzycząsteczkowych. Analizując przedstawione wyniki można zauważyć, że gęstość względem anionu w soli choliny w mieszaninie kształtuje się następująco: chlorek > mleczan > octan > lewulinian, co jest efektem struktury przestrzennej powstałej sieci wiązań wodorowych i innych oddziaływań międzycząsteczkowych. Kolejną analizowaną w pracy charakterystyką rozpuszczalnika jest jej lepkość, która zależna jest od siły wiązań wodorowych i wyrażana jest jako energia aktywacji przepływu. W przeprowadzonych eksperymentach jej najwyższe wartości określono dla mieszanin zawierających mocznik (jako HBD) oraz mleczan choliny (jako HBA). Z kolei analizując wyniki dotyczące przewodnictwa jonowego mieszanin eutektycznych soli choliny zaobserwowano następującą zależność: mleczan > lewulinian > octan > chlorek. Kolejny omawiany parametr stanowi stabilność termiczna soli choliny i ich mieszanin, w szczególności temperatura początku degradacji, która również pozwala określić siłę wiązań wodorowych w danej mieszaninie. Zaobserwowano, że temperatury początku degradacji mieszaniny znacznie różnią się



w zależności od zastosowanego związku HBD. Podobnie, kluczowy wpływ na przemiany fazowe soli choliny i ich mieszanin ma rodzaj związku HBD. Szczególnie można to zaobserwować dla układu mleczan choliny:glicerol, gdzie jest to jedyny układ, dla którego w badanym przez Doktoranta zakresie temperatur określono temperaturę zeszklenia powyżej -80°C . Przeprowadzona analiza spektroskopowa z udziałem spektroskopii w podczerwieni FT-IR pozwoliła określić siłę wiązań wodorowych w mieszaninach soli choliny z analizowanymi związkami HBD, zgodnie z następującą kolejnością anionów: mleczan > octan > chlorek > lewulinian. W przypadku związków HBD, najsilniejsze wiązania wodorowe wśród badanych mieszanin, występowały w układzie z glicerolem w stosunku molowym 1:2. Stwierdzam, że Doktorant zastosował adekwatne podejście eksperymentalne do postawionego celu badawczego i opanował w tym zakresie szereg metod pozwalających określić parametry fizykochemiczne mieszanin eutektycznych. Zarówno opisany w rozprawie wkład Doktoranta, jak i oświadczenia współautorów, świadczą o samodzielnym przeprowadzeniu eksperymentów dotyczących tej części badań.

Drugi cel zakładał badania nad wpływem cieczy eutektycznych, szczególnie soli choliny oraz ich mieszanin ze związkami HBD, na stabilność oraz aktywność enzymów z klasy hydrolaz: β -galaktozydazy z *Kluyveromyces lactis* oraz lipazy z *Candida antarctica*. W pierwszym etapie oceniono stabilność badanych enzymów w poszczególnych mieszaninach eutektycznych, tym samym eliminując możliwość działania inhibicyjnego środowiska reakcji enzymatycznej. Okazało się, że wszystkie sole choliny zawierające organiczny anion wzmacniały aktywność β -galaktozydazy, natomiast w przypadku lipazy jedynie mleczan choliny. Obserwacje Doktoranta wykluczają zatem proponowaną w literaturze hipotezę, o wyłącznym wpływie związków HBD, na stabilność i aktywność enzymów w mieszaninie eutektycznej. Ponadto, wzrost aktywności β -galaktozydazy w środowisku mieszanin soli choliny był znaczący względem próby kontrolnej oraz zależny od stosowanego substratu: naturalnej laktozy czy substratu modelowego (*o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozy, ONPG). Powyższe badania dotyczące oznaczenia aktywności enzymatycznej były prowadzone, według oświadczeń autorów, we współpracy z dr Ewą Byzią.

Podsumowując, określone na początku cele pracy, które stanowią złożone problemy badawcze, zostały skrupulatnie zrealizowane, a wyniki uzyskane podczas przeprowadzonych prac eksperymentalnych pozwoliły na sformułowanie dziesięciu wniosków. Zapewne nie oznacza to, że tematyka badawcza została w tym obszarze wyczerpana. W związku z tym prosiłbym Doktoranta o zaprezentowanie możliwości podjęcia kolejnych kroków badawczych dotyczących wpływu środowiska reakcji na aktywność enzymów w oparciu o uzyskane dotychczas wyniki, a także wskazania potencjalnych ograniczeń w przedstawionych badaniach.



Znaczące osiągnięcia naukowe

Oceniając wartość merytoryczną pracy doktorskiej Pana mgr. inż. Jakuba Hoppe, do kluczowych osiągnięć naukowych zaliczam:

- udowodnienie, że charakter oraz strukturalne cechy anionów soli choliny determinują ich zdolność do tworzenia wiązań wodorowych i mieszanin DES oraz LTTM, co znacząco wpływa na ich właściwości fizykochemiczne (gęstość, lepkość, przewodnictwo, stabilność termiczną);
- wykazanie, iż to rodzaj anionu obecnego w soli choliny (HBA) ma równie znaczący, a nawet większy wpływ na właściwości fizykochemiczne mieszanin eutektycznych, niż rodzaj związku HBD;
- udowodnienie, że wzrost aktywności enzymatycznej jest bezpośrednio związany z rodzajem anionu soli choliny oraz z oddziaływaniem anion soli choliny – związek HBD;
- wykazanie, że niskie stężenie mieszanin soli choliny ze związkami HBD w środowisku wodnym może stabilizować enzymy hydrolityczne, zwiększając ich stabilność termiczną;
- wykazanie dużego potencjału mieszanin soli choliny z anionem octanowym lub lewulinowym (HBA) oraz odpowiednio glicerolem lub glikolem etylenowym (HBD) jako środowiska reakcji zwiększającego aktywność β -galaktozydazy;
- udowodnienie zasadności użycia mieszanin LTTM pod kątem stabilności termicznej lipazy CALB oraz wysokich wydajności reakcji transestryfikacji z jej zastosowaniem.

Komentarze

Podczas lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się pewne uwagi, głównie dotyczące strony edytorskiej, które poniżej wymieniam:

- co oznaczają następujące niefortunne sformułowania: „oraz innych rozpuszczalników bioaktywnych” (str. 23); „koenzymów hydrolitycznych” (str. 36); „w przekształceniu impulsu neuronowego w grupę octanową” (str. 64); „z ograniczeń chemicznych trudnych reakcji” (str. 47)?
- poprawne określenia to: przewodnictwo jonowe, a nie przewodność jonowa (str. 54); temperatura rozkładu, a nie rozpadu (str. 56/57); pasmo absorpcji, a nie pik absorpcji (str. 61);
- błędne podpisy Rys. 9 i 11 - przedstawione są mechanizmy reakcji z udziałem enzymów; poprawny zapis nazwy szczepu to *Candida antarctica* (str. 35, 67);
- niezgodna numeracja Rysunków i Wykresów (m.in. str. 16/17, 46/47, 52/53, 56/57/58, 63/65);



- wykaz stosowanych skrótów powinien być ujednolicony (słownictwo polskojęzyczne lub angielskie);
- rozdział wprowadzenie powinien składać się z dwóch podrozdziałów, a nie z jednego: Biokataliza z udziałem enzymów. Dodałbym na początku podrozdział: Ciecze eutektyczne - charakterystyka i zastosowanie.

Konkludując, nie mam wątpliwości, że praca ma charakter oryginalny, a wszystkie trzy prace wchodzące w skład cyklu charakteryzuje wysoki poziom naukowy, co pozwoliło na ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopismach naukowych o uznanej renomie. Podczas lektury rozdziału dotyczącego dorobku naukowego Pana mgr. inż. Jakuba Hoppe można zauważyć, że Doktorant jest również współautorem czterech innych publikacji naukowych w czasopismach indeksowanych na liście JCR, jednego zgłoszenia patentowego, a także ośmiu zgłoszeń konferencyjnych.

Wniosek końcowy

Uznając oryginalność i wartość merytoryczną ocenianej rozprawy, jako spełniające formalne i zwyczajowe wymagania stawiane dysertacjom doktorskim stwierdzam, że niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 ust. 1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) z późniejszymi zmianami, i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, o dopuszczenie Pana mgr. inż. Jakuba Hoppe, do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Feliks Boratyński