



dr hab. Tomasz Janeczko, prof. nadzw. UP

Wrocław, 24 08 2017

### Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Serafin-Lewańczuk

#### „Biotransformacje związków fosforoorganicznych z zastosowaniem biokatalizatorów o aktywności hydrolitycznej”

Rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Serafin-Lewańczuk została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Żymańczyk-Dudy, prof. PWr. Przedstawiona do oceny praca jest kontynuacją wieloletnich badań naukowych prowadzonych w zakładzie Chemii Bioorganicznej.

Podjęcie tematu badawczego jest uzasadnione zarówno ze względów naukowych (badania podstawowe) jak i wdrożeniowych (transfer badań akademickich do przemysłu). Na początku oceny rozprawy należy zaznaczyć, że hydroksy- i aminofosfoniany wykazują aktywność antybakteryjną, antynowotworową oraz antywirusową. Wykazano również, że połączenia tego typu mogą wykazywać aktywność inhibującą względem badanych hydrolaz. Szczególnie istotne w procesie uzyskania związków o potencjale wdrożeniowym jest określenie aktywności biologicznej jego poszczególnych enancjomerów. Jest to związane z dynamicznym wzrostem zapotrzebowania przemysłu na związki o określonej konfiguracji przestrzennej obserwowanym na przestrzeni kilku ostatnich dekad. Tak duże zainteresowanie tym tematem jest następstwem lepszego poznania procesów biologicznych zachodzących w organizmach żywych oraz znaczenia chiralności w naturze. Czyste enancjomery można otrzymać wykorzystując zdolność organizmów żywych do produkcji i przetwarzania związków chemicznych. Zjawisko to jest fundamentem wszystkich procesów życiowych i opiera się w większości przypadków na reakcjach katalizowanych przez enzymy. Wpisując się w ten nurt badań, Doktorantka zastosowała biokatalizatory o właściwościach hydrolitycznych w biotransformacjach amino- i hydroksyfosfonianów. Reakcje hydrolizy katalizowane lipazami są jednym z najczęściej stosowanych



przekształceń biotechnologicznych. Reakcje katalizowane tymi enzymami prowadzą do alkoholi drugorzędowych przeważni z wysoką indukcją asymetryczną.

Układ rozprawy doktorskiej jest typowy, monografia zawiera, w odpowiednich proporcjach, wszystkie niezbędne rozdziały dla opracowań tego typu. Przedstawiona praca liczy 162 strony i zawiera 46 rysunków oraz 30 tabel. Praca jest skonstruowana logicznie, w typowym kompletnym układzie. Napisana jest językiem naukowym, charakteryzującym się wysoką poprawnością i starannością stylistyczną. Nieliczne tylko błędy edytorskie nie wpływają na ocenę tej pracy. Bibliografia obejmuje 168 trafnie wybranych przez Autorkę pozycji literaturowych, głównie pochodzących z renomowanych czasopism o zasięgu międzynarodowym. Doktorantka umiejętnie posiłkuje się zebraną literaturą zarówno we wstępie pracy, jak i w omówieniu oraz dyskusji badań własnych.

W części literaturowej Autorka opisuje znaczenie biotransformacji oraz pracochłonność badań jakie należy przeprowadzić w celu przeniesienia interesującego procesu biotechnologicznego wykonanego w skali analitycznej na skalę przemysłową. W dalszej części tego rozdziału szczegółowo opisuje w oparciu o dane literaturowe trafnie wybrane przykłady zastosowań enzymów hydrolitycznych. Nie wszystkie opisywane związki i reakcje są przedstawione na rysunkach co utrudnia interpretację opisywanych procesów (strony: 25, 29, 32, 33, 35, 38, 43).

Proszę o zapoznanie się z zasadami graficznego przedstawiania trójwymiarowych struktur związków chemicznych z uwzględnieniem ich stereochemii w oparciu o informacje zawarte w opracowaniach IUPAC.

Rozdział – Badania własne, Autorka rozpoczyna od dokładnego opisu kolejnych etapów realizacji swojej pracy doktorskiej, a każdy z nich jest poparty studiami literaturowymi. Następujące po sobie doświadczenia są zaplanowane w bardzo logiczny sposób i są wynikiem wieloletniego doświadczenia w tej tematyce badawczej zespołu, z którego wsparcia mogła skorzystać doktorantka. Jednak pomimo skrupulatności w konstruowaniu tej części swojej pracy nie ustrzegła się kilku błędów:

rozdział 1.1.1. – proszę wyjaśnić rolę trietyloaminy?;

Rys. 22. który związek pełni rolę kwasu glioksalowego? Rys. 32. błędnie opisany rysunek;

w opisie Tabeli 17 pojawia się informacja o trzech cyklach katalitycznych, jednak dla większości biokatalizatorów przedstawiony jest tylko jeden;



Dla szczepu *T. purpurogenus* inne wyniki przedstawione w tabeli 18 i inne opisane w tekście (strona 102)

Zdecydowanie większość opisywanych w literaturze lipaz przeprowadza zarówno hydrolizę jak i estryfikację zgodnie z regułą Kazlauskasa. W przypadku stosowanego jako substrat kwasu 2-butyryloksy-(etoksyfenylofosfinylo)-octowego należałoby się spodziewać zdecydowanie *S*-selektywności badanych biokatalizatorów. Czyli reakcji hydrolizy powinny szybciej ulegać estry o konfiguracji  $R_p,S$  – tak jak to opisała Autorka, ale również związek o budowie przestrzennej zdefiniowany jako  $S_p,S$ . Jak wyjaśnić taką różnicę w enancjoselektywności badanych biokatalizatorów.

Na rysunkach 24-35 Autorka przedstawiła widma  $^{31}\text{P}$  NMR mieszanin reakcyjnych uzyskanych w wyniku biotransformacji badanego estru. Skoro są tak duże różnice w położeniach sygnałów pochodzących od poszczególnych związków w zależności od składu badanej mieszaniny (obecność chininy, oleju) to na jakiej podstawie Doktorantka przypisała sygnały odpowiednim związkom? Czy na pewno wszystkie sygnały pochodzą od opisywanych związków? Skoro biokatalizatorami były wzrostowe kultury grzybów strzępkowych (a te jak sama Autorka zauważyła posiadają bogaty arsenał enzymów katalizujących różne przekształcenia ksenobiotycznego substratu) to skąd pewność, że obecne w mieszaninie reakcyjnej odpowiednie estry i alkohole nie uległy innym przemianom? Przedstawione na Rysunku 32. chromatogramy badanych związków może nie są idealne, ale zastosowanie tej metody równoległe z  $^{31}\text{P}$  NMR do określenia składów badanych mieszanin, rozwiałoby kilka wątpliwości recenzenta.

Szkoda, że Autorka nie kontrolowała postępu reakcji w czasie (np. 1, 3, 6, 10 dni), pozwoliłoby to dokładniej zbadać enancjoselektywność badanych biokatalizatorów. Taki zabieg miałby szczególne znaczenie w przypadku enzymatycznej acylacji kwasu 2-hydroksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)-octowego. W przypadku tego doświadczenia konieczne byłoby również zwiększenie ilości stosowanych enzymów.

W tabelach 8, 9, 10, ... Autorka nie podała udziału procentowego poszczególnych par enancjomerów. Brak tej informacji utrudnia interpretację przedstawionych wyników. Pomimo tej trudności proszę o wyjaśnienia czego skutkiem są tak duże rozbieżności odczytania nadmiarów enancjomerycznych dla estrów i powstających z nich odpowiednich alkoholi. np.: Tabela 8; dla podłoża hodowlanego H1 skoro mieszanina estrów  $S_p,S$  oraz



$R_p, R$  hydrolizuje z 45% konwersją czyli pozostaje jeszcze 55% substratu z  $ee = 36\%$ , to jak wyjaśnić nadmiar enancjomeryczny  $> 5\%$  zmierzony dla produktu hydrolizy. Analogicznie między innymi w Tabelach 12 i 15.

Dużym zaskoczeniem jest również wyraźny spadek stopnia przereagowania, czego konsekwencją było znaczne obniżenie wartości nadmiarów enancjomerycznych substratów i produktów, uzyskane w badaniu wpływu różnych źródeł węgla na aktywność lipaz badanego szczepu *Penicillium commune*. W tym przypadku analiza postępu reakcji w czasie (np. 1, 3, 6, 10 dni), równoległe z kontrolą, pozwoliłaby dokładniej zbadać faktyczną aktywność badanego enzymu wytwarzanego przez ten szczep. Takie doświadczenie pozwoliło by określić dynamikę badanych procesów, ocenić czy enzymy przeprowadzające opisywane przemiany są konstytutywne czy indukowalne stosowanym substratem. Natomiast, czy wydłużenie inkubacji substratu nie spowoduje również hydrolizy pozostałych distereoizomerów.

Czy prowadzono poszczególne doświadczenia równoległe z kontrolą, czy kontrola była wynikiem uzyskanym w poprzednich doświadczeniach? Jeżeli zastosowano ten drugi wariant to na wyniki w poszczególnych doświadczeniach mogły mieć wpływ głównie czynniki fizjologiczne badanego szczepu np. ilość, dojrzałość biomasy.

Strona 99. Doktorantka pisze, że niska efektywność hydrolizy przy zastosowaniu stężenia substratu 32 mM jest spowodowana toksycznym działaniem substratu na biokatalizator. Jednak w tym doświadczeniu Doktorantka opisała rezultaty po trzech dniach, a przy zastosowaniu niższych stężeń po 5 i 7 dobach.

Kila szczepów było wyizolowanych i zidentyfikowanych przez dr hab. Magdalę Klimek-Ochab, Autorka jednak nie podaje metody identyfikacji tych mikroorganizmów. W tabeli 6. i konsekwentnie w kolejnych przedstawiane są wyniki uzyskane dla szczepu *Penicillium lipolyticum* pochodzącego z kolekcji własnej Politechniki Wrocławskiej, czy to prawidłowa nazwa? Używając jako biokatalizatorów konkretnych szczepów należy podać ich numer z kolekcji, w innym przypadku może to sugerować czytelnikowi, że podano informację dotyczącą całego gatunku.

Te wątpliwości nie mają na celu umniejszenia ogromu pracy jaką wykonała i opisała autorka, ale skłonić zespół zajmujący się tym tematem do kontynuowania opisanych przez Doktorantkę badań.



UNIwersytet  
Przyrodniczy  
we Wrocławiu

KATEDRA CHEMII  
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUK O ŻYWNOŚCI

Podsumowując, uznaję pracę doktorską pt. „Biotransformacje związków fosforoorganicznych z zastosowaniem biokatalizatorów o aktywności hydrolitycznej” za ciekawą, poruszającą niezwykle ważny aplikacyjny problem, a uzyskane wyniki są efektem przeprowadzenia wielu trudnych eksperymentów biotechnologicznych. Moim zdaniem recenzowana przeze mnie praca jest gotowym materiałem na co najmniej cztery bardzo dobre publikacje i z pewnością będzie stanowić inspirację do dalszych badań dotyczących tego tematu. Stwierdzam, że praca doktorska Pani Moniki Serafin-Lewańczuk spełnia wszystkie warunki, zarówno ustawowe jak i zwyczajowe, jakie stawia się opracowaniom tego typu i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Tomasz Janeczko