

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Serafin-Lewańczuk pt. „Biotransformacje związków fosforoorganicznych z zastosowaniem biokatalizatorów o aktywności hydrolitycznej”. Praca została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Żyłańczyk-Dudy, prof. PWR.

Potęga Chemii, jako wiodącej dziedziny nauki, wywodzącej swoje osiągnięcia z życia i jego przystawek, jest tak ogromna, że w zasadzie każdą próbę jej oceny należy uznać za niepełną, tendencyjną lub stronniczą. Po około 350 latach rozwoju, jak na każdy, nawet wielce zasłużony byt ziemski, na chemię zaczynamy obecnie patrzeć z pozycji realiów XXI dostrzegając konieczność jej dalszego rozwoju także poprzez zastępowanie czysto chemicznych metod syntezy metodami *delikatniejszymi*, wywodzącymi się z *biotransformacji* i *biosyntezy*. Tym bardziej, że metody te należą do tzw. „zielonych”, co obecnie jest bardzo twarzewym kolorem... a atomy, jako takie, chyba nie odczuwają różnicy. Przyspieszenie rozwoju chemii dzięki wspomaganemu naukami biologicznymi stanowi nowoczesną podstawę nauki.

Trzeba pamiętać, że natura posługuje się *biokatalizatorami* dla swoich celów, które nie zawsze obejmują paletę naszych bieżących potrzeb. Wiedząc co nieco, próbujemy odnaleźć nowe drogi wytwarzania produktów, do otrzymania których wykorzystujemy biokatalizatory w postaci całych mikroorganizmów, ich fragmentów lub enzymów. A, że czasem wymaga to więcej pracy to jednak w końcowym efekcie można odnieść sukces, łącznie z tytułem naukowym Doktora... na co wskazują rezultaty recenzowanej pracy doktorskiej.

Autorka na warsztat działań badawczych wzięła interesującą grupę związków o szeroki spektrum właściwości biologicznych, którymi są chiralne hydroksy- i aminofosfoniany, stanowiące też syntetyczną platformę do otrzymywania różnorodnych czynników terapeutycznych. Aktywność związków fosfonowych zależy od ich konfiguracji absolutnej, stąd synteza optycznie czystych enancjomerów jest bardzo ważna. Otrzymywanie optycznie czystych izomerów na drodze syntezy chemicznej wykazuje szereg wad (koszt, zanieczyszczanie środowiska), dlatego pojawiły się próby wykorzystania, do tego celu, procesów biotransformacji.

Substratami w badaniach opisanych w niniejszej pracy były pochodna hydroksyfosfinianu – kwas 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowy, oraz pochodne α -aminofosfonianów – kwas N-acetylo-1-

aminoetanofosfonowy (AlaP-Ac), kwas N-acetylo-1-amino-2-metylopropanofosfonowy (ValP-Ac) i kwas N-acetylo-1-amino-1-fenylometanofosfonowy (PhgP-Ac).

A oto krótkie streszczenie treści pracy, które ma za zadanie przybliżenie poruszanych przez Autorkę zagadnień w stopniu, który po zapoznaniu się z recenzją w Internecie, zachęci do sięgnięcia po oryginał w bibliotece.

Praca Pani mgr inż. Moniki Serafin-Lewańczuk posiada typowy układ rozprawy doktorskiej wypełniając 162 stron maszynopisu.

Rozdział – Streszczenie – na 4,5 stronach Autorka podała racjonalne powody rozpoczęcia badań, streściła swoje rozliczne działania naukowe oraz podała uzyskane rezultaty. Natomiast w *Rozdziale – Podsumowanie* na 3 stronach ostatecznie podsumowała uzyskane, wartościowe wyniki swej pracy.

Rozdział – Wstęp – Autorka opisuje, w sposób ogólny, procesy biotransformacji oraz biokatalizatory wykorzystywane w biotransformacjach by w dalszej części omówić kluczowy problem – zastosowanie biokatalizatorów o właściwościach hydrolitycznych w biotransformacjach (podaje przykłady procesów wykorzystania aminoacylaz, amidaz, nitrylaz, hydrolaz epoksydowych, proteaz i lipaz). Stwierdzam, że rozdział ten liczący 35 stron dobrze wprowadza czytelnika w aktualną tematykę badań. Dostrzegam jednakże, jak to bywa, drobne nieścisłości i niepełne sformułowania: np. Autorka opisując klasyfikację enzymów powinna skrótowo podać i opisać zasady klasyfikacji, np. co oznaczają poszczególne liczby w skrócie EC (Enzyme Classification) oraz omawiając dalej poszczególne klasy używać tego skrótu EC z kolejnymi cyframi (zrobiła to raz na stronie 28). Symbol EC jest ważnym dla enzymologa skrótem dobrze i z reguły jednoznacznie opisującym narzędzia, którymi są enzymy. Doktorantka omawiając to zagadnienie w pracy przyjęła formę opisową co jej niniejszym wytykam. Mam pytania do grupy enzymów, którymi szczególnie zajmowała się Doktorantka – Czy znane są Pani lipazy, które nie posiadają domeny polipeptydowej nazywanej też wieczkiem (ang. *lid*, *flap*)? A oto dostrzeżone, w tym rozdziale, drobne uchybienia – Tabela 1 – katalizator musi być *zdolny*... w moim przekonaniu raczej powinien *wykazywać właściwości*.

Rozdział – Cel pracy – Cytuję z pracy "Celem przeprowadzonych badań było opracowanie wydajnej metody biokatalitycznej hydrolizy pochodnych kwasu 2-hydroksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego oraz pochodnych kwasów α -aminofosfonowych (kwasu 1-aminoetanofosfonowego, 1-amino-2-metylopropanofosfonowego oraz 1-amino-1-fenylometanofosfonowego) do optycznie czystych związków fosfonowych. W celu realizacji zadania w badaniach zastosowano różnorodne biokatalizatory: całe komórki bakterii właściwych, cyjanobakterii, drożdży oraz grzybów, a w przypadku kwasów α -aminofosfonowych także preparaty

enzymatyczne, głównie z grupy lipaz”. Pani mgr inż. Monika Serafin-Lewańczuk podała także 5 celów szczegółowych.

Postawiony przez Doktorantkę cel uważam za bardzo ambitny. Stwierdzam, że zakres, prawdziwie nowoczesnych i pracochłonnych badań został zrealizowany z sukcesem w zakresie biokatalitycznej hydrolizy pochodnych kwasu 2-hydroksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego - i to jest dużo.

Rozdział – Badania własne – to, co stanowi esencję pracy Autorka opisała starannie na 66 stronach maszynopisu zawierającego 22 rysunki i 18 tabel. Nie mam merytorycznych zastrzeżeń do tego rozdziału choć chciałbym podzielić się następującymi uwagami.

Na stronie 92 – Autorka pisze, cytuję „... *niektóre lipazy posiadają osłonę z cząsteczek wody ściśle związaną z enzymem, która chroni hydrofilowe powierzchnie enzymu i umożliwia zachowanie natywnej konformacji nawet w obecności apolarnych hydrofobowych rozpuszczalników*”. Mam pytanie a co z innymi lipazami i innymi enzymami? Czy one także posiadają taką warstwę, związaną wielokrotnymi wiązaniami wodorowymi z polarnymi atomami, na powierzchni enzymu?. Strona 93, cytuję: „*Badanie stabilności enzymów w rozpuszczalnikach ma największe znaczenie przy wykorzystaniu lipaz w syntezie estrów oraz transestryfikacji, ponieważ w tych procesach jako rozpuszczalniki wykorzystuje się głównie rozpuszczalniki organiczne*”. Doskonale stabilność enzymów ma zawsze fundamentalne znaczenia. Zgadza się z Panią rozpuszczalniki hydrofilowe, a zwłaszcza woda, należą do silnych czynników denaturujących w porównaniu z rozpuszczalnikami apolarnymi. Upraszczając: to co hydrofilowe jest gorsze dla stabilności enzymu niż to co hydrofobowe, i to dla uczonych stanowiło ogromne zaskoczenie.

W pracy swej Autorka wykazała zasadność otrzymywania optycznie czynnych fosfonowych analogów aminokwasów jako związków o zróżnicowanej aktywności biologicznej. Jednak wśród testowanych biokatalizatorów nie udało się znaleźć takiego, który hydrolizuje wiązanie amidowe w badanych N-acylowych pochodnych kwasów α -aminofosfonowych. Doktorantka wskazała na prawdopodobną przyczynę niepowodzenia tych badań, cytuję (strona 116) „*Niepowodzenie w przeprowadzanych badaniach może być związane z potencjalną inhibitorową aktywnością badanych związków. Aminofosfoniany ze względu na swoją budowę, są analogami strukturalnymi aminokwasów, co prowadzi do rywalizacji tych dwóch grup związków o miejsce aktywne enzymów. Kwasy aminofosfonowe i ich pochodne są inhibitorami enzymów, wykazują właściwości antybakteryjne i antygrzybiczne, co może utrudniać transformacje ich na drodze biokatalizy*”. To prawdopodobne wytłumaczenie wskazuje na rozwinięty zmysł krytyczny i dobre przygotowanie merytoryczne Autorki.

Rozdział – Materiały i metody – został podzielony na 3 podrozdziały zajmujące 27 stron. Zawiera spis odczynników chemicznych do syntez, analiz, oczyszczania próbek oraz składniki podłoży

hodowlanych. Zawiera podstawowe opisy stosowanych preparatów enzymów w tym: 16 preparatów lipaz i 2 preparaty esteraz i jednej proteazy. Podaje 26 testowanych w badaniach przesiewowych szczepów mikroorganizmów (bakterii, sinic, drożdży i grzybów strzępkowych), pochodzących z kolekcji krajowych, zagranicznych oraz zasobów własnych. Zawiera opisy 5 nowoczesnych technik analitycznych stosowanych w pracy, takich jak: HPLC, FPLC, TLC, ^1H MNR, ^{31}P NMR. Tu mam jedno spostrzeżenie, być może przydatnym, do wstępnej analizy płytek TLC, byłby program analizy cyfrowej np. JustTLC, który dobrze sprawdza się w naszym laboratorium.

W rozdziale tym zawarto stosowane metody chemicznej syntezy substratów chemicznych oraz metody rozdzielenia ich par enancjomerów. Opisano metodyki: określania nadmiarów enancjomerycznych, konfiguracji absolutnej kwasu 2-hydroksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego, przygotowania biokatalizatorów (hodowla mikroorganizmów), modyfikacji podłoża hodowlanych oraz medium do biotransformacji substratów, sposobu badania wpływu dodatku induktorów syntezy lipaz, wyznaczania krzywych wzrostu i sposobu preinkubacji mikroorganizmów w warunkach deficytu substancji odżywczych, ich immobilizacji i oznaczenia aktywności lipolitycznej. Omawia procedury wykonanych biotransformacji oraz oczyszczania produktów, powiększania skali procesu z wykorzystaniem immobilizowanych komórek w warunkach wstrząsanych i w reaktorze ze złożem upakowanym.

W sumie część biotechnologiczna tego rozdziału została opisana starannie ale... mam drobne uwagi i pytania do tego rozdziału. Wg informacji zawartej w pracy, wytworzoną biomasę z jednej kolby przenoszono do kolby zawierającej *medium* reakcyjne, co znacznie upraszczało pracę. Mam pytanie o sposób kontroli czystości mikrobiologicznej prowadzonych hodowli? Pojawiające się zakażenia mogą bowiem bardzo zafałszować uzyskane wyniki. Z kolei, w przypadku stosowania gotowych (handlowych) preparatów enzymatycznych nie podano ich ilości (objętości, masy lub jednostek aktywności) stosowanych w poszczególnych biotransformacjach. Proszę też o wyjaśnienie, dlaczego do biotransformacji substratów zastosowano biomasę grzybów nitkowatych będącą w fazie logarytmicznego wzrostu?

Rozdział – Dorobek naukowy – Dorobek naukowy Pani mgr inż. Moniki Serafin-Lewańczuk składa się z 5 publikacji, w tym rezultaty pracy doktorskiej zostały częściowo opublikowane w renomowanym czasopiśmie *Bioorganic Chemistry* (IF 3.21), co dowodzi oryginalności badań. Doktorantka jest także współautorką 11 doniesień konferencyjnych.

Rozdział – Bibliografia zawierająca 168 pozycji literaturowych była dobrym zapleczem merytorycznym badań.

Ocena merytoryczna.

Podoba mi się klarowność koncepcji pracy zawartej w celu obejmującym wykorzystanie potencjału nauk podstawowych i aplikacyjnych do opracowania wartościowych biotechnologicznych innowacji. Nie zamierzam omawiać szczegółowo rezultatów pracy, chciałbym jedynie zwrócić uwagę na te elementy, które w moim przekonaniu, zgodnie z moimi kompetencjami, stanowią istotną wartość naukową pracy. Mam tu na myśl blok badań dotyczący rozległego problemu biotransformacji kwasu 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego oraz określenia konfiguracji absolutnej produktów hydrolizy.

W celu znalezienia biokatalizatora o pożądanej aktywności mgr inż. Monika Serafin-Lewańczuk przeprowadziła skrining wybranych mikroorganizmów, wśród których znajdowały się grzyby strzępkowe, drożdże oraz cyjanobakterie. Ostatecznie dalsze Jej szczegółowe badania skupiały się na optymalizacji warunków procesowych oraz na powiększaniu skali tego procesu dla szczepów *Penicillium commune* KKP 2513 i *Talaromyces purpurogenus* KKP 2512. Uważam, że Pani magister znalazła bardzo ciekawe szczepy wykazujące rzadką właściwość wytwarzania związków z mycelium lipaz/esteraz. To jest rzadko opisywana właściwość. W przyszłości Autorka mogłaby zastosować sposób indukcji grzybów strzępkowych bezpośrednio na podłożu stałym, dodając niewielkie ilości właściwego estru lub produktów jego hydrolizy.

Podoba mi się, że po preinkubacji biomasy w warunkach deficytu substancji odżywczych, dla *Penicillium commune* Doktorantka stwierdziła znaczący wzrost enancjoselektywności reakcji (e.e. sięgające 90% oraz enancjoselektywność E 52,8) w porównaniu do reakcji z wykorzystaniem biokatalizatora przygotowanego bez etapu głodzenia (e.e. sięgające odpowiednio 54% oraz E 3,5). To była nie rutynowa, acz prosta operacja a rezultat doskonały. Próba opisu ogólnych mechanizmów tego zjawiska, w ujęciu Doktorantki, wydaje się wiarygodna, choć może inspirować dalszą dyskusję szczególnie nad stwierdzeniem, cytuję (str. 99): „*Przedstawione powyżej eksperymenty pośrednio udowadniają, że testowany substrat jest transformowany, jako część szlaku metabolizmu drugorzędowego*”,... a Ona sama ukazuje się jako pomysłowa i dociekliwa młoda uczona. Muszę jednak wskazać pewną nieprawidłowość, prawdopodobnie będącą efektem tłumaczenia z języka angielskiego. W terminologii polskiej używa się pojęcia metabolizm wtórny a nie metabolizm drugorzędowy.

Doceniam wysiłek intelektualny i manualny, który zaowocował opracowaniem procesu biotransformacji kwasu 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego o wysokiej wydajności i enancjoselektywności. Biomasa *Penicillium commune* hodowana na podłożu H1 po preinkubacji w warunkach deficytu substancji odżywczych (przed etapem biotransformacji) katalizowała przemianę substratu ze stopniem przereagowania 49% oraz nadmiarami enancjomerycznymi w zakresie 82-90%.

Ze względu na naturę substratów mogących powodować inhibicję enzymów efektywne biokonwersje fosfonianów były do tej pory prowadzone jedynie na skalę laboratoryjną.

Doceniam powiększenie skali procesu polegające na immobilizacji bezpośrednio w procesie hodowli mycelium grzybów *Talaromyces purpurogenus* KKP 2512 oraz *Penicillium commune* na piankach poliuretanowych. Umożliwia ona, w jednej operacji, otrzymanie biokatalizatora unieruchomionego w nośniku, np. o wymiarach skorelowanych z wymiarami reaktora oraz zastosowanie tej formy biokatalizatora jako wypełnienie kolumny z recyrkulacją medium reakcyjnego. Taki system reaktorowy pozwala na efektywniejszy przepływ substratu przez osadzone w piankach mycelium i niwelował opory dyfuzyjne co pozwoliło na efektywne prowadzenie biotransformacji.

Przy wykorzystaniu immobilizowanego w piance mycelium *Penicillium commune* zhydrolizowano testowany związek w stężeniu 10,6 mM (500 mg), ze stopniem przereagowania równym 56% oraz nadmiarami enancjomerycznymi 82-91%. Taki wynik w biologicznej konwersji fosfonianów uzyskano wg słów Autorki, po raz pierwszy.

Zastosowanie w takim samym układzie biomasy *Talaromyces purpurogenus* KKP 2512 zapewniło stopień przereagowania substratu równy 26% oraz nadmiar enancjomeryczny produktu w zakresie 16-64%. Natomiast grzyb *Talaromyces purpurogenus* KKP 2512 - w odróżnieniu od *Penicillium commune* - charakteryzował się wysoką stabilnością w trakcie trzech cykli katalitycznych. Uwaga ogólna - biomasa grzybów nitkowatych stosowana w procesach biotransformacji nie jest stabilna mechanicznie, dlatego podejmuje się próby zwiększenia stabilności poprzez np. liofilizację, odwadnianie, chemiczne sieciowanie i inne. Być może w przyszłości należało by takie i inne próby wykonać.

Zastosowanie immobilizowanych biokatalizatorów (*Penicillium commune*, *Talaromyces purpurogenus* KKP 2512) jako wypełnienia kolumny pozwoliło na 10-krotne podniesienie skali procesu – z poziomu laboratoryjnego do preparatywnego. Pleśnie *Penicillium commune* wykazywały wyższą aktywność hydrolityczną oraz enancjoselektywność w badanych warunkach procesowych i mogą być brane pod uwagę w dalszych badaniach, mających na celu wykorzystanie opracowanej metody w dużej skali co uważam za znaczący sukces Autorki. Powyższe, wartościowe, osiągnięcia naukowe wskazują na znaczny potencjał aplikacyjny zrealizowanej przez nią pracy.

Stwierdzam, że w tej nowatorskiej pracy z zakresu biotechnologii przemysłowej wykorzystano nowoczesne techniki, adekwatny sprzęt badawczy i doskonałą analitykę, bez których wykonanie badań nie byłoby możliwe. Dziesięciokrotne powiększenie skali zbudowało solidne podstawy badań nad dalszym jej powiększaniem. Dla mnie, przemysłowego biotechnologa, jest to ważny i innowacyjny element badań. Moje uwagi i spostrzeżenia nie podważają wartości naukowej pracy.

Praca Doktorska Pani mgr inż. Moniki Serafin-Lewańczuk dowodzi, iż mamy przed sobą dojrzałą, dociekliwą, pracowitą i skuteczną młodą uczoną. Zakres doświadczeń i sposób ich przeprowadzenia oraz opis i interpretacja wyników wskazują na dobre przygotowanie merytoryczne i kreatywność tej młodej Badaczki.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Moniki Serafin-Lewańczuk, pt. „Biotransformacje związków fosforoorganicznych z zastosowaniem biokatalizatorów o aktywności hydrolitycznej” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane pracom doktorskim. Wnoszę zatem o dopuszczenie Autorki przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Tadeusz Antczak
Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka