



Opole 28 sierpnia 2017

dr hab. Jacek Lipok, prof. UO

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Kmiecik,
pt.: „Otrzymywanie chiralnych pochodnych fosfonianów metodami biokatalitycznymi ”
wykonanej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej
Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej,
pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Żymańczyk-Dudy, prof. PWr

Związki fosforoorganiczne, a szczególnie fosfonowe analogi strukturalne aminokwasów, od lat cieszą się nieustannie zainteresowaniem międzynarodowego grona badaczy. Szerokie spektrum aktywności biologicznej licznych pochodnych aminofosfonowych, związane z modyfikowaniem (najczęściej hamowaniem) aktywności enzymów ważnych szlaków metabolicznych sprawia, że główny nurt badań dotyczy wpływu tych substancji na funkcjonowanie żywych organizmów. Od pewnego czasu, rosnącym zainteresowaniem badaczy cieszą się przemiany pochodnych fosfonowych, katalizowane przez organizmy. Coraz liczniejsze doniesienia naukowe dotyczące intrygujących zdolności mikroorganizmów do prowadzenia różnorodnych przemian ksenobiotyków fosfonowych, wskazują na wyraźne poszerzenie spektrum badań o tego typu zagadnienia.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Natalii Kmiecik jest znakomitym przykładem tej tezy, bowiem w myśl słów Autorki podstawowym celem przeprowadzonych przez Nią badań było wykorzystanie biokatalizy jako narzędzia syntezy chiralnych pochodnych fosfonianów. Realizując cel pracy, Doktorantka wykorzystwała hodowle odpowiednio dobranych grzybów strzępkowych, co warto zaznaczyć – całe komórki, jako biokatalizatory. Substratami zaś były w większości kwasy α -aminofosfonowe; alifatyczne oraz z podstawnikami aromatycznymi. Rozszerzając zakres przeprowadzonych eksperymentów, Pani Natalia wykorzystwała ten sam rodzaj biokatalizatorów do enancjokonwergentnej biotransformacji mieszaniny racemicznej O,O-dimetylo-4-oksoazetydyn-2-ylofosfonianu, której efektem było otrzymanie czystego optycznie O-metylo-4-oksoazetydyn-2-ylofosfonianu. Poszukując sposobu na zwiększenie wydajności prowadzonych przemian, Autorka zastosowała także enzymy dostępne

komercyjnie, w tym penicilinazę z *Enterobacter cloacae*, co skutkowało niewielkim wzrostem wydajności pożądanego procesu. Naturalnym i racjonalnym pomysłem w tak zaprojektowanym toku badań, było sprawdzenie aktywności immobilizowanych biokatalizatorów. Wynik tych eksperymentów, był bardziej interesujący niż pierwotnie oczekiwane zwiększenie wydajności procesu. Bowiem w tym przypadku zastosowanie *P. funiculosum* immobilizowanego na piankach poliuretanowych, w procesie ciągłym, doprowadziło do otrzymania optycznie czystego kwasu S-1-amino-2-metylopirydynofosfonowego, w rezultacie enancjokonwergentnego przekształcenia kwasu 1-amino-2-metylopirydynofosfonowego. O ile opisane enancjokonwergentne przemiany wymienionych substancji uważam za interesujące procesy biokatalityczne i niewątpliwie, oryginalne osiągnięcie Doktorantki, o tyle nazwy nadane substratom tych procesów wzbudzają wątpliwości. W przypadku „O,O-dimetylo-4-oksoazetidin-2-ylofosfonianu”, to jedynie prośba do Doktorantki by w miejsce nazwy „azetidin” używać polskiego odpowiednika „azetydyna”. Natomiast przypisanie nazwy: kwas 1-amino-2-metylopirydynofosfonowy, strukturze substancji podanej w pracy jako związek 63, wywołuje większe wątpliwości. Zgodnie z zasadami nazewnictwa, przyjętymi przez Autorkę w odniesieniu do innych związków, bardziej odpowiednia dla tej struktury jest nazwa: kwas 1-amino-1-(pirydyn-3-ylo)metylofosfonowy lub prościej: kwas (amino(pirydyn-3-ylo)metylo)fosfonowy. Pomimo ich wyrażenia, chcę podkreślić, że wspomniane wątpliwości związane z nazewnictwem, mają jedynie charakter porządkowy, gdyż omówienie i dyskusję wyników procesów biokatalitycznych oparto na wynikach rzetelnie i precyzyjnie przeprowadzonych pomiarów spektroskopowych, które pozwoliły na jednoznaczne ustalenie struktury centrum chiralnego molekuł fosfonianów.

Odnosząc się do kompozycji dysertacji, pragnę zwrócić uwagę na klarowny, klasyczny układ, liczącego łącznie 156 stron opracowania, w którym wyróżniono (w zakresie merytorycznym): wykaz stosowanych skrótów, informacje o dorobku naukowym Doktorantki, streszczenie pracy, prezentację zagadnień badawczych w oparciu o literaturę przedmiotu, zwięźle sformułowany cel badań, omówienie wyników, podsumowanie oraz część zawierającą opis zastosowanych materiałów i metod badawczych. W ostatniej ze wspomnianych części pracy, zatytułowanej „Materiały i metody”, Autorka umieściła również informacje charakteryzujące produkty przeprowadzonych przez Nią syntez chemicznych oraz dane obrazujące dynamikę rozwoju hodowli grzybów. Charakter i sposób prezentacji tych wartościowych, w mojej opinii, danych wskazują, że z powodzeniem mogły one znaleźć się w części poświęconej omówieniu wyników, w ten sposób pełniej odzwierciedlając wysiłek i wszechstronność Pani mgr inż. Natalii Kmieciak, jako młodej adeptki Nauki. Rysunki, których liczbę Autorka ustaliła na siedemdziesiąt cztery (74), chociaż sądzę, że jeszcze kilka grafik zasługuje na umieszczenie w tym wykazie oraz zestawienia tabelaryczne w liczbie

siedemnastu (17), są dobrze wkomponowane w tekst i odzwierciedlają istotne dla omówienia dane.

Omówienie wyników badań własnych, Doktorantka rozpoczyna od prezentacji substratów i przewidywanych produktów procesów biotransformacji, które zsyntezowała osobiście, bądź pozyskała w wyniku współpracy z innymi badaczami. W ten sposób Autorka zyskała możliwość scharakteryzowania tych związków metodami spektroskopowymi, dzięki czemu mogła analizować dynamikę zmian ich zawartości w hodowlach grzybów. Takie podejście do rozwiązania problemu świadczy o dobrze przemyślanej koncepcji badań. Warto podkreślić, iż do oznaczania nadmiarów enancjomerycznych, Autorka umiejętnie wykorzystwała i zoptymalizowała metodę, bazującą na zastosowaniu cyklodekstryn, jako chiralnych odczynników solwatujących, opracowaną wcześniej w Jej macierzystym zespole. Drugą z zastosowanych metod oznaczenia nadmiaru enancjomerycznego był rozdział chromatograficzny (HPLC) na kolumnach z wypełnieniem chiralnym. O ile zastosowanie pierwszej z wymienionych metod uważam za kluczowe dla wyników ocenianej pracy, o tyle zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z bezpośrednią detekcją UV, do oznaczeń związków nie tworzących odpowiedniego układu chromoforowego w podanych warunkach rozdziału, można potraktować co najwyżej jako próbę poszukiwania metody alternatywnej.

Zasadniczym nurtem badań przeprowadzonych przez Panią mgr inż. Natalię Kmiecik było katalizowane przez całe komórki grzybów pleśniowych, tworzenie chiralnych hydroksyfosfonianów z ich aminowych prekursorów. Starając się, co warto podkreślić z dobrym skutkiem, zaprezentować wyniki procesów biotransformacji pochodnych fosfonowych w sposób klarowny, Doktorantka zastosowała pewien schemat toku narracji, który powielala w odniesieniu do każdego z substratów. Dzięki temu, już na etapie omówienia wyników, stworzyła możliwość wskazania podobieństw (i różnic) toku przemian w odniesieniu do każdego z testowanych związków. Dobrym pomysłem jest także wprowadzanie czytelnika w tok badań, poprzez wyjaśnianie kontekstu prowadzonych eksperymentów w poszczególnych podrozdziałach. Dzięki konsekwencji Autorki, tę część pracy uważam za dobrze napisaną i tej opinii nie zmieniają nieliczne, niejednoznaczne elementy opisu. Na przykład nie jest dla mnie jasne na jakiej podstawie Doktorantka identyfikuje hydroksypochoodne związku nr 21 – wspomniany „wzrost intensywności” (str. 93-94; rys. 57), skoro różnica wartości przesunięć sygnałów substratu i odpowiedniego produktu, czyli po prostu odległość pomiędzy odpowiednimi pikami zmienia się (o ok. 1 ppm) po dodaniu wzorca wewnętrznego. Jeżeli jest to efekt np. zmiany odczynu, to warto o tym wspomnieć. Z kolei na stronach 100-101 znalazło się sformułowanie rozpoczynające się od frazy „Analizowane aminofosfoniany stanowią egzogenne źródło równoważników redukujących dla grzyba, ...”, które uważam za nadmiernie spekulacyjne. Nie znalazłem w

ocenianej pracy dowodów wskazujących na to, że „...wbudowują się w przemiany redoks żywych komórek ...”, tym bardziej, że grzyby znane są ze swoich zdolności do katalizowanych zewnątrzkomórkowo przemian składników podłoża. Byłbym rad, gdyby Doktorantka zechciała rozwinąć tę myśl w toku wystąpienia, wyjaśniając również, czy podjęła jakiegokolwiek próby oznaczenia białek wydzielanych przez grzyby do podłoża w warunkach procesu biokatalizy, szczególnie po etapie głodzenia hodowli, które niewątpliwie pogłębiało stres fizjologiczny mikroorganizmów. Intryguje mnie także wspomniany na str.104 brak stabilności substratu 69 w wodzie destylowanej i dla odmiany stabilność tej substancji w wodzie dejonizowanej. Czy udało się ustalić przyczyny tego zjawiska porównując np. skład chemiczny obu tych mediów?

W każdym ze znanych mi, tak obszernym zbiorze różnorodnych informacji tworzących dysertację doktorską, zdarzają się niedostatki natury edytorskiej. Z obowiązku Recenzenta chciałbym zwrócić uwagę jedynie na te, które mogą budzić wątpliwości czytelnika co do klarowności przekazu merytorycznego:

Rys. 9 str. 36 – nie struktura nr 17, a struktura nr 19 obrazuje molekułę fosfinotricyny, natomiast w podanym zestawieniu nie ma wzoru wymienionej tam alafosfaliny,

Rys. 15 str. 43 – struktura nr. 35 nie odpowiada wymienionemu w tekście „S-O-fosforylowanemu dietylohydroksyfosfonianowi”,

Str. 52 – Jest mało prawdopodobne aby to „Kolejna reakcja hydroksylacji”, jak twierdzi Autorka w ostatnim na tej stronie akapicie, doprowadziła do rozszczepienia wiązania w pierścieniu zw. 53,

Str. 87 – wartości przesunięć przypisanych produktom biokonwersji zw. 21 w podrozdziale 6.1.1, nie odpowiadają tym, które zaznaczono na rys. 52, obrazującym te przemiany

Str. 115 – w opisie toku oznaczeń metodą TOF MS ESI zapewne chodzi o jony Na^+ , a nie wymienione „cząsteczki Na”

Wymienione nieścisłości i drobne potknięcia edytorskie nie wpływają na bardzo pozytywny odbiór ocenianej dysertacji. Chciałbym zauważyć, że Pani mgr inż., Natalia Kmieciak zmierzyła się, jak uważam z powodzeniem, z interesującym i niełatwym problemem badawczym. Jej osiągnięcia i aktywność znalazły odzwierciedlenie w dotychczasowym dorobku naukowym. Doktorantka jest pierwszą autorką dwóch już wydanych, współautorskich publikacji w czasopismach wymienianych na tzw. liście A MNiSW oraz jednej obecnie recenzowanej – także z listy A. Ponadto jest pierwszą autorką pracy opublikowanej w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (Biotechnology Research International; 2013) oraz czterech prac wydanych w czasopismach o zasięgu lokalnym. Chciałbym podkreślić, że publikacje te powstały w oparciu o metodologię i wyniki

eksperymentów prezentowanych w ocenianej dysertacji. Dorobek Autorki dopełnia dwanaście doniesień konferencyjnych, z których cztery to komunikaty ustne.

Doceniając walory przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Kmiecik, chciałbym stwierdzić, że opracowanie to dostarcza wartościowych naukowo informacji, posiadających dodatkowo potencjał aplikacyjny i jest rezultatem oryginalnych dociekań badawczych Autorki.

W moim przekonaniu rozprawa ta spełnia warunki ujęte w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. z późniejszymi zmianami. Wnoszę zatem o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, Pani mgr. inż. Natalii Kmiecik, do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Ponadto, biorąc pod uwagę poziom merytoryczny niniejszej dysertacji, doceniony także przez recenzentów czasopism o zasięgu międzynarodowym, proponuję Wysokiej Radzie rozważenie możliwości wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Kmiecik.

