



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; e-mail: gamian@iitd.pan.wroc.pl

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych
Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wrocław, 14.03.2017 r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Przemysława Hahna pt. „Badania nad otrzymywaniem preparatów enzymatycznych i zastosowaniem ich w reakcjach glikozylacji” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Wiesława Szeji

Użycie enzymów do syntezy złożonych cząsteczek nadal stanowi poważne wyzwanie dla badaczy, szczególnie w odniesieniu do węglowodanów, gdzie wymaga optymalizacji wielu parametrów. Włączenie enzymów do metod syntezy pozwala na uzyskanie wielofunkcyjnych i często mniej stabilnych cząsteczek, nowych związków o pożądanym lepszymi właściwościami, zazwyczaj bardziej czystych. Otrzymywanie nowych złożonych substancji o określonych właściwościach biologicznych na drodze reakcji syntez enzymatycznych wymaga optymalizacji warunków, które każdorazowo stanowią oryginalne podejście, nowe drogi syntezy o unikalnych parametrach, dlatego badania te są niezwykle ważne dla chemii, biochemii, biologii i medycyny. Zespół kierowany przez Profesora Wiesława Szeję zajmuje się z sukcesem już od ponad dwóch dekad użyciem enzymów w syntezie organicznej węglowodanów i niniejsza rozprawa jest kontynuacją dobrze znanych w świecie badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Instytutu Chemii Politechniki Śląskiej. Temat podjęty jest uzasadniony i bardzo aktualny, szczególnie wobec potrzeb opracowania nowych metodologii, istotny też ze względu na potrzebę skrócenia etapów technologicznych, ograniczenia zanieczyszczenia środowiska, obniżenia kosztów, wykorzystania materiałów odpadowych do hodowli drobnoustrojów przemysłowych, zamiany środków trujących na biodegradowalne enzymy. Wypracowany w tej pracy model doświadczalny jest też cennym narzędziem badawczym.

Rozprawa ma układ powszechnie stosowany w pracach doświadczalnych, typowy dla rozprawy doktorskiej i zawiera 156 stron maszynopisu, w tym 18 schematów, 15 wykresów i 57 tabel, 193 pozycje piśmiennictwa, ponadto wykaz stosowanych skrótów, spis tabel, schematów i wykresów, podsumowanie i wnioski oraz spis dorobku naukowego autora rozprawy.

We wstępie pracy nazwanym jako część literaturowa, autor, po krótkim wprowadzeniu czytelnika w główne tezy pracy, omawia biologiczne i aplikacyjne znaczenie węglowodanów, w tym galaktooligosacharydów i 2-deoksy-cukrów w aspekcie syntetycznym. Następnie opisuje chemoenzymatyczne metody syntezy glikozydów, by przejść do omawiania enzymów ze szczególnym uwzględnieniem glikozydaz, ich źródeł pozyskiwania, przebiegu reakcji. Dalej autor omawia metody syntezy glikozydów z udziałem glikozylotransferaz i szerzej glikozylohydrolaz, ze względu na bardziej powszechne użycie glikozydaz. Opisuje parametry tych reakcji biotechnologicznych, w środowisku niewodnym, w obecności cieczy jonowych jako kosolwentów, a ostatnią część wstępu autor poświęcił metodom immobilizacji enzymów i permeabilizacji komórek dla uzyskania biokatalizatora. Wstęp pracy jest napisany zwięźle i czytelnie, jest dobrze skonstruowany, dlatego wszystkie części są przyporządkowane przedmiotowi badań. Tutaj nasuwa się pytanie do doktoranta, czy są podejmowane próby zastosowania do syntezy rekombinowanych enzymów lub ich aktywnych fragmentów zawierających centrum aktywne i co przemawia za otrzymywaniem enzymów z hodowli.

Oceniana praca miała na celu opracowanie metod otrzymywania preparatów β -glikozydaz i ich użycia w stereoselektywnej syntezie 2-deoksy β -D-glikozydów z glikali jako donorów i alkoholi jako akceptorów glikozylowych.

Opis stosowanych materiałów, metod badań i eksperymentów jest poprawny, podany w sposób wyczerpujący, dobór metod jest trafny dla realizacji zadań. Autor poza procedurami syntezy organicznej stosował wiele metod analitycznych oraz niełatwe postępowanie w pracy z enzymami. Enzymy były otrzymywane w postaci ekstraktów z komórek drożdży, przez sonifikację i liofilizację, następnie wysalanie siarczanem amonu. Preparaty β -glukozydaz i β -galaktozydaz immobilizowano z użyciem alginianu, karagenanu, z dodatkiem jonowymieniacza. Następnie autor opisuje otrzymywanie szeregu 2-deoksyglikozydów z użyciem przygotowanych preparatów. W końcu podaje wyniki analiz aktywności przeciwgrzybiczej syntezowanych glikozydów w odniesieniu do klinicznych szczepów 4 gatunków *Candida* oraz 4 gatunków *Mycobacterium*. Do tej części mam kilka pytań, mianowicie odnośnie tabeli VI-1 w jakiej postaci były składniki 1-4 podłoża hodowlanego dla grzybów, ekstrakty, fermentaty, hydrolizaty czy jeszcze inna postać, jaką albuminę używano jako standardu w metodzie 6.1.5.1, na str. 101 w metodzie 6.1.6.2 nie jest jasne co liofilizowano, skoro sonifikacji poddawano komórki, czy duże stężenie siarczanu amonu nie przeszkadzało w analizach i syntezach, gdyż nie podano czy siarczan amonu był usuwany z preparatów enzymatycznych.

Wyniki uzyskane przedstawiono i opisano jasno i rzeczowo, zostały dobrze udokumentowane na rycinach i w tabelach. Najpierw wyselekcjonowano z 8 szczepów grzybów 3 szczepy z hodowli wglębnej z najwyższą aktywnością β -galaktozydazową i 3 z hodowli na podłożu stałym o najlepszej aktywności β -glukozydazowej. To pozwoliło zoptymalizować warunki otrzymywania białkowych preparatów enzymatycznych, które służyły jako biokatalizatory do syntezy. Odnośnie kwestii czy β -glikozydazy (wydzielane poza komórkę) są

egzo- (pkt 4.2.2) czy endoenzymami (pkt. 4.2.4), sama liofilizacja nie jest metodą dezintegracji komórek, natomiast aktywność enzymatyczna liofilizatów może oznaczać powierzchniową lokalizację enzymów. Preparaty enzymatyczne immobilizowano według zoptymalizowanej procedury z alginianem i jonowymieniaczem. Substratami glikozydowymi były cukry nienasycone, glikale, a jako akceptory stanowiły alkohole. Wykazano, że w układzie stacjonarnym reakcja przebiega wydajniej niż w układzie przepływowym, ale sposób przepływowy ułatwia separację produktu. Spośród kilku cieczy jonowych jedna okazała się dobrym kosolwentem. W dalszej kolejności autor otrzymał szereg 2-deoksy β -D-glikozylopiranozydów, z których wykazano 4 pochodne o aktywności grzybobójczej wobec oportunistycznych szczepów *Candida*, w szczególności jeden związek o najwyższej aktywności, 3,4-dimetoksybenzylo- β -D-galaktopiranozyd. Interesujące wyniki otrzymano także w odniesieniu do szczepów *Mycobacterium*.

Dyskusja eksperymentów i wyników jest dobrze przeprowadzona w kolejnych częściach pracy, gdzie metody i wyniki są omówione krytycznie, są porównane do danych z piśmiennictwa. Poszczególne etapy pracy są rzeczowo uzasadniane, a konsekwentnie i logicznie wyciągane wnioski z kolejnych doświadczeń służą całościowej realizacji zamierzonego celu. Autor opracował procedurę otrzymywania preparatów enzymatycznych o aktywności β -glikozydazowej, zoptymalizował warunki zastosowania tych preparatów do wysoko stereoselektywnej syntezy nowych związków o aktywności biologicznej.

Kilka uwag natury redakcyjnej zaznaczono na marginesie pracy, jednak nie mają one znaczenia merytorycznego i nie wpływają na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Niezgodność w tytule „otrzymaniem” i „otrzymywaniem” w dokumentach nie ma znaczenia. Natomiast przed wysłaniem manuskryptu do druku należy uwzględnić poniższe uwagi, mianowicie na stronie 10 w jednym zdaniu jest deoksycukier i deoksy-cukier, co należy ujednotlić, na stronie 12 powinno być ...uczestniczące w metabolizmie, zwłaszcza katabolizmie węglowodanów..., w tabeli III-1 *Homo sapiens* mógłby być źródłem glikozydaz, ale nie jest mikroorganizmem, skróty nie wyjaśnione w spisie należy rozwinąć, dotyczy to głównie cieczy jonowych, co autor miał na myśli pisząc na str. 39 ...alginian (wielowartościowe kationy)...? Powtórzenie czterech tabel i wykresu nie było niezbędne, używanie terminu falkon jest żargonem laboratoryjnym, tabele IV8-9 powinny być oznaczone jako IV9-10, tabela IV-20, a nie IV-19. Uwagi te wynikają z obowiązku recenzenta, ale nie wpływają na wartość merytoryczną ocenianej pracy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosi nowe elementy do wiedzy o mechanizmach reakcji enzymatycznych, o nowych związkach glikozydowych i możliwościach syntezy. Doktorant opanował wiele metod badań i analizy węglowodanów, wykazał się znajomością piśmiennictwa, które jest właściwie wykorzystane, co dowodzi swobodnego poruszania się w omawianym zagadnieniu, interdyscyplinarnym z zakresu chemii, biologii, biotechnologii i mikrobiologii. Uzyskane wyniki mają znaczenie podstawowe oraz potencjalnie aplikacyjne.

Uważam, że rozprawa mgr inż. Przemysława Hahna zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami, o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki. Dlatego wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Przemysława Hahna do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych

Gamian
Prof./dr hab. Andrzej Gamian