



UNIWERSYTET GDAŃSKI



dr hab.  
JANUSZ MADAJ  
profesor nadzwyczajny UG

Gdańsk, 17.02.2017r.

**Recenzja pracy doktorskiej  
mgra inż. Przemysława Hahna**

**pt.: Badania nad otrzymywaniem preparatów enzymatycznych i zastosowaniem  
ich w reakcjach glikozylacji**

Przedstawiona mi do recenzji praca Pana mgra inż. Przemysława Hahna pt.: *Badania nad otrzymywaniem preparatów enzymatycznych i zastosowaniem ich w reakcjach glikozylacji*, została zrealizowana w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej pod opieką naukową Profesora Wiesława Szeji i dr inż. Anny Kasprzyckiej.

Synteza wiązania glikozydowego należy w chemii węglowodanów do najważniejszych reakcji. Od ponad stu lat trwają poszukiwania wygodnej metody glikozylowania, która pozwoliłaby otrzymywać z dobrą wydajnością produkty o zaplanowanej konfiguracji. Przez ten czas zaproponowano szereg metod wykorzystujących różne donory glikozyłu. Wśród nich m.in.: halogenki glikozyłu (metoda Koenigsa-Knorra i jej modyfikacje opracowane przez Helfericha i Hanessiana), glikozydy *n*-pentenyłu (metoda Frasiera-Reida), aż po trichloroacetoimidany (zaproponowane przez Schmidta). Warto na pewno też wspomnieć o pracach Danishefsky'ego, który jako donory glikozyłu używał, podobnie jak Autor tej pracy, 1,2-nienasyconych cukrów (glikali).

Mimo ciągłych prac nad zagadnieniem glikozylowania nie udało się opracować jednej uniwersalnej metody. Dużo lepiej z syntezą glikozydów radzi sobie natura, stąd też próby jej podglądania i naśladowania. Coraz częściej pojawiają się doniesienia o możliwości wykorzystania katalizy enzymatycznej do otrzymywania glikozydów. Właśnie w tym nurcie



tematycznym lokuje się praca Pana mgra inż. Przemysława Hahna.

Praca została napisana na 156 stronach i posiada układ klasyczny, typowy dla dysertacji w dziedzinie chemii. Zawiera: Część literaturową, Omówienie wyników, Podsumowanie i wnioski oraz Część eksperymentalną. Całość uzupełnia cytowana literatura (193 pozycje), z których, co warto podkreślić, znakomitą większość stanowi literatura najnowsza pochodząca z lat powyżej roku 2000.

Ponieważ Doktorant w swojej pracy jako donory glikozyłu wybrał glikale część literaturową rozpoczyna krótki wstęp dotyczący syntezy 2-deoksyglikozydów. W tym fragmencie na stronie 11 znajduje się schemat przedstawiający mechanizm addycji do glikali. Moim zdaniem zawiera on sporo nieścisłości, jak choćby trudna do wyjaśnienia zmiana konfiguracji niektórych atomów węgla. Zależałoby mi aby Doktorant odniósł się do tego mechanizmu i spróbował go przedstawić raz jeszcze np. podczas dyskusji.

Dalej znajduje się wprowadzenie w tematykę reakcji enzymatycznych. Ten fragment był dla mnie bardzo pomocny, ponieważ jako klasyczny syntetyk miałem wyłącznie podstawową wiedzę na temat izolowania enzymów, ich immobilizowania czy wpływu środowiska reakcji na jej przebieg.

W pracy Doktorant postawił sobie za cel opracowanie tanich i efektywnych metod uzyskiwania preparatów enzymatycznych zawierających  $\beta$ -glikozydazy oraz przebadanie możliwości ich wykorzystania do otrzymywania 2-deoksy- $\beta$ -glikozydów. Wymagało to wykonania szeregu różnych prac badawczych. Począwszy od wyboru techniki hodowli mikroorganizmów, tu Autor zdecydował się na metodę hodowli wglębnej lub na podłożu stałym, przez analizę wpływu rozpuszczalnika na aktywność enzymów po badania możliwości immobilizowania enzymów na różnych żywicach. Jako substancje referencyjne do badania aktywności wybrane zostały salicyna i *o*-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktozyd. Wyniki każdorazowo przedstawiane były za pomocą wykresów, co stanowi duże ułatwienie pozwalające śledzić i porównywać rezultaty kolejnych eksperymentów. Moją uwagę zwrócił Schemat IV-1 zawarty na stronie 45 oraz jego opis. Jak wspomina Autor substancją wybraną do badania aktywności  $\beta$ -glukozydazy była salicyna. W tekście jest mowa, że w wyniku hydrolizy rozpada się ona na glukozę i *o*-nitrofenol. Jednak salicyna nie jest glukozydem *o*-nitrofenolu a saligeniny (alkohol salicylowy). Domyślam się, że schemat przedstawia nie





hydrolizę salicyny a *o*-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktozydu, który był używany do testowania  $\beta$ -galaktozydazy.

Realizując swoje badania Doktorant wykonał ogrom prac badawczych. Przeprowadził wiele reakcji w bardzo różnych warunkach i przeanalizował ich wyniki, co pozwoliło na wyciągnięcie bardzo ciekawych wniosków. Moje zainteresowanie wzbudziła reakcja, która miała prowadzić do otrzymania glikozydów metylu. Zamiast oczekiwanych produktów powstawał 2-deoksycukier, będący wynikiem addycji cząsteczki wody do glikalu. Tymczasem w reakcji np. z alkoholem allilowym, prowadzonej w praktycznie identycznych warunkach, powstawał glikozyd. Zastanawia mnie czy Autor ma jakiś pomysł z czego to może wynikać?

Bardzo interesujący jest moim zdaniem również wynik prac nad otrzymywaniem 2-deoksyglikozydów bezpośrednio z acetyloglikali. Okazało się, że badane preparaty nie tylko katalizowały reakcje tworzenia wiązania glikozydowego, ale jednocześnie powodowały hydrolizę ugrupowań *O*-acetylowch. Wynik ten wskazuje, że można w sposób istotny uprościć procedurę otrzymywania tą metodą glikozydów poprzez pominięcie etapu deprotekcji glikalu.

Ostatecznie Doktorantowi udało się otrzymać z różnymi wydajnościami szereg 2-deoksyglikozydów. Dodatkowo dla uzyskanych glikozydów przeprowadzono badania aktywności biologicznej wobec klinicznych szczepów drożdży i patogenów bakteryjnych. Pewna aktywność zaobserwowano wobec przebadanych szczepów bakterii.

Kończąc opis prac badawczych Część eksperymentalna zawiera opis procedur użytych do przeprowadzenia poszczególnych eksperymentów oraz metody otrzymywania i charakterystykę produktów. Na ogół nie budzi ona wątpliwości i w przypadku poszczególnych produktów jednoznacznie wskazuje na poprawność zaproponowanych struktur. Jedyne co wzbudziło pewne moje zdziwienie to opis analiz masowych. Zastanawiam się dlaczego, skoro wyznaczano jony molekularne niskorozdzielczą techniką, to jako masę odniesienia podawano jon monoizotopowy, którego tą techniką się nie wyznacza. Np. strona 117 „...m/z 243.1208, oznaczono: m/z 243.2”. Wyliczona wartość jonu monoizotopowego wynosi właśnie 243,1208 podczas gdy techniką MS mierzony jest jon uśredniony, którego wyliczona wartość wynosi 243,2526 i bardziej odpowiada wartości

zmierzonej.

Z obowiązku recenzenta załączam też spis innych błędów i nieścisłości, które zauważyłem w pracy. Chciałbym jednak podkreślić, że wspomniane uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji.

Str.

- 3 W spisie treści mamy rozdziały 6.1.4 i potem 6.1.6. Brakuje rozdziału 6.1.5 ze strony 97.
- 10 Brak konsekwencji w pisaniu nazwy deoksycukry (raz pisane z myślnikiem raz bez). W nomenklaturze angielskiej piszemy deoxy sugar. Po polsku według „Nomenklatury węglowodanów” założenia 1996, Teresa Sikołowska, Andrzej Wiśniewski poprawna pisownia to deoksycukry.
- 13 Schemat III-3 zatytułowany jest Reakcja transglikozylacji. Tymczasem jedna z reakcji prezentowanych na nim jest hydrolizą.
- 15 W ostatnim akapicie powtarza się słowo „szczególnie”.
- 16 „...produkty o konfiguracji  $\beta$  wiązania glikozydowego.” O konfiguracji mówimy raczej w przypadku anomerycznego atomu węgla, a nie wiązania.
- 23 Jest „stabilność” powinno być „stabilnością”.
- „...hydroliza wiązanie glikozydowego w obecności wody.” Czy może być reakcja hydrolizy bez udziału wody?
- 25 „...zdeprotonowana częściowo cząsteczka wody..” Nie bardzo rozumiem jak może być tylko częściowo zdeprotonowana cząsteczka wody?
- 42 Po słowie Optymalizacje brak jest odstępów.
- 46 Jest „...jony miedzi (II) do jonów miedzi (I)” powinno być „...jony miedzi(II) do jonów miedzi(I)”
- 52 Jest „porządanego” powinno być „pożądanego”.
- i inne „...przesącz zwirowano..” chyba raczej odwirowano.
- 68 W Tabeli IV-10 jako akceptory przedstawiono wzorami zamiast alkoholi węglowodory.
- 70 „...konfiguracja na węglu anomerycznym...”. Raczej konfiguracja anomerycznego atomu węgla.
- 72 Jest „...stosując” powinno być „...stosując..”.
- 76 Oznakowanie czasu retencji jako Tr jest trochę zaskakujące. Zazwyczaj używa się oznaczenia R<sub>t</sub>.
- Jakość zamieszczonych chromatogramów niestety jest tak niska, że praktycznie uniemożliwia ich analizę.
- 79 Strony 79 i 80 dzielą dwie puste kartki.
- 90 Jest „min.” Powinno być „min”.
- 109 „Reakcję przeprowadzono według wychodząc....”.
- 110 Jest „metylo 2-deoksy- $\beta$ -D-glikopiranozydu” powinno być „2-deoksy- $\beta$ -D-glikopiranozydu metylu”.
- 113 Na rysunku przedstawiona jest 2-deoksy- $\alpha$ -D-glukopiranoza choć z tekstu wynika, że była to mieszanina anomerów.





UNIWERSYTET GDAŃSKI



Podsumowując uważam pracę za bardzo interesującą i wnoszącą wiele nowych informacji dotyczących możliwości wykorzystania preparatów enzymatycznych w syntezie glikozydów, a szczególnie 2-deoksyglikozydów, w których brak podstawnika przy atomie węgla C-2 bardzo utrudnia stereokontrolowaną reakcję przy anomerycznym atomie węgla.

Biorąc to wszystko pod uwagę, mogę z przekonaniem stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami. Zatem wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgra inż. Przemysława Hahna do dalszych etapów przewodu doktorskiego.