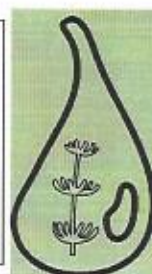




Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
Prof. Paweł Kafarski
e-mail: pawel.kafarski@pwr.wroc.pl
web: bioorganic.ch.pwr.wroc.pl



Wrocław 09.08.2016

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Zielińskiej

„Badania nad rozdziałem kinetycznym kwasów 1-(N-acyloamino)alkilofosfonowych, 1-(N-acyloamino)alkilofosfinowych oraz ich estrów za pomocą acylazy penicylinowej G w postaci natywnej i immobilizowanej”.

Pani mgr inż. Katarzyna Zielińska pracę doktorską wykonała na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach pod opieką Pana profesora Romana Mazurkiewicza. Recenzowałem już kilka prac wykonanych pod opieką tego promotora i zawsze były to prace wyróżniające się – tak jest także w tym przypadku. Jej rozprawa doktorska to typowy przykład wykorzystania biotransformacji w syntezie asymetrycznych związków organicznych. Autorka postawiła sobie pozornie nieskomplikowane zadanie jakim było wykorzystanie dość popularnego enzymu – acylazy penicylinowej G dla rozdziału fosfonowych analogów aminokwasów na enancjomery. Zadanie wydaje się proste, ale w literaturze informacje na temat zastosowania acylaz są sprzeczne i niewiarygodne.

Rozprawa Pani mgr inż. Katarzyny Zielińskiej to przykład bardzo przemyślanego i konsekwentnie zrealizowanego projektu badawczego. Aby rozpocząć badania należało otrzymać N-acylowane aminofosfoniany i aminofosfiniany. Znowu zadanie otrzymania tych substratów wydaje się proste, ale takim nie jest. Dlatego też Doktorantka zdecydowała się użyć metody opracowanej w macierzystej grupie badawczej wychodząc z łatwo dostępnych aminokwasów. Hydrolazy najczęściej stosuje się w procesach rozdziału kinetycznego. Autorka użyła tu zarówno enzymu natywnego jak i immobilizowanego kowalencyjnie (za pomocą aldehydu glutarowego) na modyfikowanej powierzchniowo mezoporowatej krzemionce. W ostatnim etapie pracy wykorzystano układ monolityczny jako katalizator i reakcję w układzie przepływowym. Uzyskane wyniki pokazują użyteczność badanego enzymu i to zastosowanego w dowolnej formie. Aby lepiej planować procedury preparatywne badania stanowiące cel pracy poprzedzone zostały zmuśnym badaniem kinetyki reakcji. Autorka nie potrafiła mnie przekonać, że ich wyniki wnoszą istotny wkład w to planowanie. Pani mgr inż. Katarzyna Zielińska opracowała także metody badania czystości enancjomerycznej otrzymanych produktów – użyła tu techniki hplc dobierając odpowiednie kolumny dla estrów i kwasów oraz techniki ^{31}P i ^1H NMR. Tu pozwolę sobie stwierdzić, iż moim zdaniem zastosowanie techniki ^1H NMR daje

mało precyzyjne wyniki, mimo tego że są one porównywalne z uzyskanymi za pomocą metody chromatograficznej.

Podsumowując trzeba stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Zielińskiej wymagała wykonania znacznej liczby eksperymentów, starannego planowania badań i szczegółowej analizy wyników. Jest to bardzo ciekawa rozprawa, a wyniki uzyskane w czasie jej realizacji są znaczące o czym stanowi fakt ich opublikowania w postaci trzech artykułów w czasopiśmie naukowych o uznanym standardzie międzynarodowym. Mają one też znacznie praktyczne i dlatego stanowią podstawę dwóch zgłoszeń patentowych.

Tradycyjnie, rozprawa poprzedzona jest przeglądem literatury, który wprowadza w tematykę pracy. Wstęp jest bardzo obszerny (ponad 40% objętości pracy), dobrze pomyślany i porządnie napisany.

Znacznie niżej oceniam opis wyników – jest on bardzo lakoniczny a dodatkowo przeładowany tabelami, których znaczny odsetek mógłby znaleźć się w części eksperymentalnej. Co gorsza, schematy reakcji są nad tabelami, a to znakomicie utrudnia czytanie tego rozdziału. Pod koniec każdego rozdziału podane są cechy charakterystyczne widm IR i NMR. Chińskie przysłowie mówi, że „jeden rysunek wart jest stu słów” i znajduje tutaj dobre zastosowanie – chyba lepiej było omówić te dane posługując się przykładowymi widmami. Natomiast część eksperymentalna napisana jest bardzo porządnie i często się nią posiłkowałem gdy gubiłem się w analizie części opisowej. Z kolei rozdział zatytułowany „Wnioski” nie dość, że jest bardzo obszerny to nosi raczej znamiona streszczenia wyników badań. A właśnie tutaj było dobre miejsce aby porównać efektywność zastosowanych form enzymów, zastanowić się jak immobilizacja zmienia ich powinowactwo do substratów i wykazać (lub nie) użyteczność badań kinetycznych w planowaniu eksperymentu preparatywnego. Pewne zastrzeżenia budzi też spis literatury – Autorka jest tu bardzo niekonsekwentna w podawaniu nazw czasopism (raz pełne nazwy a innym razem skróty).

Jak każdy recenzent mam kilka uwag i komentarzy, które pojawiły się w trakcie czytania rozprawy doktorskiej. A oto one:

- Nie bardzo rozumiem na czym polega różnica między mechanizmem reakcji zaproponowanym przez Srirangana i Doktorantkę (str. 56 i 57). W moim odczuciu są one tożsame. Przy okazji – amidy nie posiadają ładunku ujemnego na azocie;
- Nie bardzo rozumiem jak „miejsce aminowe” odpowiada za szeroką tolerancję substratową omawianej acylazy (str. 58). Reszta aminowa seryny ma za zadanie wiązanie reszty kwasowej substratu i tylko tyle;
- Czy ampicylina jest degradowana tylko przez penicylinazy ze *Staphylococcus*? Chyba nie (str. 59);
- Jak w reakcji hydrolizy enzymatycznej powstają ketony (rys. 2.20 str. 60)?;
- Nie bardzo również rozumiem dlaczego immobilizacja czystego enzymu mogłaby skutkować niższą aktywnością niż immobilizacja enzymu nieoczyszczonego. Jak Autorzy cytowanej pracy to wyjaśniają? (str.71)

- Doktorantka podaje skręcalności właściwe otrzymanych związków, ale nie znalazłem w jakich rozpuszczalnikach były one mierzone. To ważne, bo porównywanie wartości skręcalności otrzymanych z literaturowymi powinno być dokonywane w tych samych rozpuszczalnikach, a w przypadku aminokwasów w tym samym pH;
- Z mojego doświadczenia wynika, że zastosowane warunki hydrolizy reszt estrowych *N*-acyloaminofosfonianów są zbyt łagodne (str. 149 i 150) i w najlepszym przypadku otrzymane kwasy fosfonowe powinny być zanieczyszczone monoestrami;

W zasadzie nie mam poważniejszych uwag co do redakcji pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Zielińskiej. Jest w niej bardzo niewiele błędów edytorskich. Z obowiązku recenzenta chciałby zwrócić uwagę na niektóre niefortunne sformułowania i proszę Doktorantkę aby ich nie komentowała w odpowiedziach na uwagi recenzenta, gdyż odpowiedzi są oczywiste:

- △ Racemizacja jakkolwiek by nie zachodziła (katalizowana lub spontaniczna) jest reakcją chemiczną (str. 43);
- △ Chromatografia cieczowa i sączenie molekularne to nie są synonimy (str. 53);
- △ Rysunek 2.17 nie pokazuje centrum aktywnego enzymu, ale cały enzym (str. 54) – centrum aktywne pokazane jest na rysunku 2.19;
- △ Nie mogę się zgodzić z twierdzeniem, że enzymy immobilizowane na drodze adsorpcji nie nadają się do zastosowań przemysłowych (str. 64);
- △ Podział sposobów immobilizacji podany w pracy (pewnie na podstawie literatury) jest dość dziwny. Nie powinno się mieszać sposobów immobilizacji z immobilizacją na różnego typu materiałach. Na przykład enzym można związać z nośnikiem magnetycznym za pomocą wiązań kowalencyjnych, adsorpcji czy oddziaływań jonowych. Nie ma zatem potrzeby wymieniać go jako oddzielnej kategorii sposobów immobilizacji;
- △ Grupy oksiranowe na powierzchni nośnika będą też chętnie wiązać się z resztami tiolowymi seryn obecnymi w strukturze enzymu (str. 66);
- △ Enzym posiada wiele, a nie jedną, wolnych grup aminowych (np. boczne reszty lizyny; str. 102);
- △ Tetraetoksylan nie jest prekursorem krzemu (str. 102);
- △ Autorka omawia specyficzność substratową zastosowanego enzymu wobec substratów fosfonowych. Tu pomocne dla zrozumienia sposobu ich wiązania byłoby modelowanie molekularne. Pozwoliłoby to uniknąć nadmiernych spekulacji (str.110).

Wymienione przeze mnie błędy i usterki, choć nieco umniejszają wartość rozprawy Pani mgr Katarzyny Zielińskiej, nie zmieniają mojego zdania, że to dobra i wartościowa praca doktorska. Dlatego też stwierdzam, że praca ta spełnia wszystkie warunki, zarówno te ustawowe jak i te zwyczajowe, jakie stawia się rozprawom tego typu w Polsce i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zakres badań przedstawionych w pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Zielińskiej jest szeroki, a samo wykonanie badań wprost wzorowe. Wyniki uzyskane w trakcie badań zostały już opisane w postaci trzech porządných publikacji i są obiektem dwóch zgłoszeń patentowych. Co więcej, Doktorantka jest współautorem aż siedmiu dodatkowych prac opublikowanych w czasopismach o wysokim standardzie międzynarodowym oraz dodatkowego patentu luźno związanego z ocenianą pracą doktorską. Dlatego stawiam wniosek o wyróżnienie jej pracy doktorskiej stosowaną nagrodą – oczywiście pod warunkiem, że spełnione są wszystkie inne wymagania, jakie stawia w tej kwestii Rada Naukowa Wydziału.

