



Prof. dr hab. Jarosław Sączewski  
Katedra i Zakład Chemii Organicznej  
Wydział Farmaceutyczny,  
Gdański Uniwersytet Medyczny,  
Al. Gen. Hallera 107, 80-416 Gdańsk,  
tel. 58-349-16-48, e-mail: js@gumed.edu.pl

Gdańsk, dn. 30. 10. 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Jacka Dulęby „Ocena aktywności enancjoselektywnej i lipolitycznej lipaz z *Burkholderia* sp. Oraz *Aspergillus* sp. w formie wolnej oraz immobilizowanej na nośnikach polimerowych” wykonanej w Katedrze Chemii Leków Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum w Bydgoszczy, pod kierunkiem promotora prof. Michała Marszałła oraz promotora pomocniczego dra Tomasza Siódmiaka.**

Praca doktorska została przedstawiona w czterech artykułach opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Łączna wartość punktacji impact factor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 11,566, natomiast suma punktów ministerialnych 310. W trzech publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, aczkolwiek Autor rozprawy doktorskiej wskazuje, że w czwartej pracy istnieje dwóch równorzędnych pierwszych autorów. We wszystkich przedstawionych pracach autorem korespondencyjnym jest promotor pomocniczy dr Tomasz Siódmiak. Sensu stricto rozprawę doktorską stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych oraz komentarz do publikacji, w którym Kandydat zaprezentował ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że przedstawiana praca spełnia formalne wymagania Ustawodawcy.

Zakres niniejszej pracy doktorskiej obejmuje wykorzystanie lipaz pochodzących z organizmów *Burkholderia* sp. i *Aspergillus* sp. w procesach katalizy o kluczowym znaczeniu dla przemysłu farmaceutycznego. W badaniach wykorzystano lipazy w formie wolnej oraz związane na nośnikach polimerowych. Przeprowadzone badania obejmowały analizy zdolności enancjoselektywnej lipaz w kinetycznym rozdzielaniu chiralnego (*R,S*)-1-fenyletanolu oraz oceny aktywności lipolitycznej w procesach enzymatycznej hydrolizy naturalnych olejów zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe.



Komentarz do cyklu publikacji otwiera wstęp, w którym Kandydat przedstawił historię biokatalizy oraz medyczne, farmaceutyczne, biotechnologiczne i kosmetyczne zastosowania enzymów, zwłaszcza lipaz takich jak *Burkholderia cepacia* lub *Aspergillus niger*, które wykorzystywane są do hydrolizy lub syntezy estrów z wykorzystaniem reakcji chemicznych: transestryfikacji, interestryfikacji i acydolizy.

Przedstawiony cykl publikacji otwiera praca opublikowana w czasopiśmie *Current Organic Chemistry*, gdzie przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych z zastosowaniem komercyjnej lipazy *Burkholderia sp.* Enzym ten wykorzystano do kinetycznego rozdzielania racemicznej mieszaniny (*R,S*)-1-fenyletanolu w reakcjach transestryfikacji z wykorzystaniem octanu winylu oraz octanu izoprenylu jako donorów grupy acetylowej. Rzeczona lipaza katalizuje stereoselektywną reakcję, gdzie grupa acylowa jest kinetycznie transportowana w procesie transestryfikacji do (*R*)-1-fenyletanolu, który znajduje szereg zastosowań przemysłowych. W tym miejscu należy zaznaczyć, że transestryfikacja jest procesem równowagowym prowadzącym do mieszaniny produktów. Siłą napędową reakcji pozwalającą przesunąć równowagę w kierunku produktów jest izomeryzacja nienasyconych alkoholi winylowego i propen-2-olu do odpowiednio acetaldehydu i acetonu. Zatem zastosowanie nadmiaru donora grupy acylowej w warunkach bezwodnych powinno prowadzić do całkowitego przekształcenia alkoholu w ester. W przypadku reakcji transestryfikacji (acetylowania) racemicznej mieszaniny (*R,S*)-1-fenyletanolu prowadzonej wobec lipazy *Burkholderia sp.* katalizowana reakcja (*R*)-1-fenyletanolu jest **znacznie** szybsza niż niekatalizowany proces estryfikacji (acetylowania) (*S*)-1-fenyletanolu. Z tego powodu w mieszaninie produktów reakcji prowadzonej przez 24 lub 48 godzin powinien znaleźć się prawie wyłącznie produkt reakcji katalizowanej, czyli octan (*R*)-1-fenyletylu. W omawianej publikacji dla reakcji z octanem izoprenylu w *n*-hepatnie Autorzy podają enancjomeryczne nadmiary substratów  $ee_s$  i produktów  $ee_p$  odpowiednio 99% oraz 94%, a konwersja (*C*) sięga 51.3%. Z przedstawionych danych wynika, że w mieszaninie reakcyjnej jest 199 razy więcej (*S*)-1-fenyletanolu niż (*R*)-1-fenyletanolu oraz 32.3 razy więcej octanu (*R*)-1-fenyletylu niż octanu (*S*)-1-fenyletylu. Oznacza to, że część (*S*)-1-fenyletanolu została przekształcona w ester. Taki wynik skłania recenzenta do zadawania pytań:

1. Dlaczego zastosowano 3,12 nadmiar octanu izoprenylu względem (*R,S*)-1-fenyletanolu?
2. Dlaczego reakcję prowadzono w temperaturze 30°C?
3. Jaki wpływ na stałą szybkości reakcji ma temperatura? (Równanie Arrheniusa).
4. Szybkość reakcji zależy od stężenia reagentów – czy zbadano wpływ stężenia i czasu reakcji na enancjomeryczny nadmiar produktów  $ee_p$ ? Np. 0.41 mL rozpuszczalnika i 48 godzin inkubacji wobec np. 0.82 mL rozpuszczalnika i 96 godzin inkubacji.

Autorzy publikacji nie podali czy inkubację prowadzono szczelnie zamkniętym naczyniu. Zdaniem recenzenta kluczowym czynnikiem wpływającym na enancjoselektywny wynik reakcji jest zawartość wody w środowisku reakcyjnym. *n*-Hepatan jest rozpuszczalnikiem hydrofobowym aczkolwiek nie bezwodnym. Hydroliza octanów prowadzi do powstania wolnego kwasu octowego,



który katalizuje reakcję estryfikacji obu alkoholi oraz reakcję transestryfikacji octanu (*R*)-1-fenyletylu z wolnym (*S*)-1-fenyletanołem. Proces hydrolizy estrów jest równowagowy:

$$K = \frac{[R^1COOR^2][H_2O]}{[R^1COOH][HOR^2]}$$

Zawartość wody w środowisku reakcyjnym, zwłaszcza prowadzonej przez kilkadziesiąt godzin, prowadzi do powstania wolnego kwasu, który katalizuje nieenantjoselektywne reakcje. Przeprowadzone przez Kandydata eksperymenty z zastosowaniem rozpuszczalników o różnej lipofilowości (logP) wykazały, że najlepsze parametry kinetycznego rozdzielania (*R,S*)-1-fenyletanolu uzyskano dla eteru diizopropylowego ( $ee_s$  90%,  $ee_p$  98%, C = 47.9%, E = 308,5). Zdaniem recenzenta rezultat ten wynika z względnie niskiej zawartości wody w zastosowanym rozpuszczalniku oraz krótkiego czasu reakcji – 24 godziny. Wpływ wody na enantjoselektywność reakcji kinetycznego rozdzielania (*R,S*)-1-fenyletanolu za pomocą lipazy *Burkholderia sp.* został opisany w literaturze: Li et al. BMC Biotechnology 2013, 13:92 (<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/13/92>). Kolejnym czynnikiem, który może mieć wpływ stereoselektywność reakcji jest zastosowanie dodatku kwasu trifluorooctowego do fazy ruchomej w analizach przeprowadzonych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Zdaniem recenzenta analiza estrów nie wymaga zakwaszenia fazy, a kontakt silnego kwasu z analitem estrowym i alkoholowym może wpływać na wynik analizy.

W dalszej części pracy zbadano aktywność lipazy *Burkholderia sp.* wobec 13 olejów roślinnych o różnej zawartości kwasów  $\omega_3$ ,  $\omega_6$ ,  $\omega_9$ . Wyznaczono aktywność enzymatyczną U [ $\mu$ M/min] oraz aktywność względną [%] wolnej lipazy. Ciekawość recenzenta wzbudziło zastosowanie gumy arabskiej w eksperymentach hydrolizy. Czym było to spowodowane? Czy było to konieczne?

W drugiej publikacji w czasopiśmie *Process Biochemistry* Kandydat powtórzył powyżej przedstawione badania z zastosowaniem lipazy *Burkholderia sp.* immobilizowanej na komercyjnym apolarnym nośniku poliakrylowym IB-150A. Zgodnie z oczekiwaniami wykazano, że immobilizacja skróciła czas reakcji potrzebny do osiągnięcia wysokich parametrów katalitycznych do 12 godzin w *n*-heptanie. Stąd rodzi się pytanie: dlaczego nie wybrano eteru diizopropylowego? Dla reakcji przeprowadzonej z zastosowaniem immobilizowanej lipazy oraz octanu izoprenylu uzyskano enantjoselektywne parametry lepsze niż dla enzymu wolnego ( $ee_s$  95%,  $ee_p$  99%, C = 49%, E = 775,35 wobec  $ee_s$  99%,  $ee_p$  94%, C = 51.3%, E = 170,9), co wskazuje, że proces enzymatyczny przebiega znacznie szybciej niż katalizowane kwasem procesy nieenantjoselektywne. Niestety w tych eksperymentach także zastosowano analizy HPLC z udziałem kwasu trifluorooctowego.

W trzeciej pracy poglądowej wchodzącej w skład cyklu opublikowanej w czasopiśmie *Farmacja Polska* Doktorant oraz grupa współautorów przedstawili zastosowania lipaz *Burkholderia cepacia* w enantjoselektywnych procesach biokatalitycznych znajdujących zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym – np. otrzymywanie (*S*)-ibuprofenu, (*R*)-ketoprofenu oraz (*S*)-ketoprofenu.



Czwarta praca przedstawiona na łamach czasopisma *Catalysts* dotyczy oceny aktywności enancjoselektywnej i lipolitycznej lipazy Amano A z *Aspergillus niger*. Wykazano, że lipaza w formie wolnej i immobilizowanej na nośniku poliakrylowym nie jest przydatna do kinetycznego rozdzielania (*R,S*)-1-fenylloetanolu z powodu braku stereoselektywności. Opisano jednak znaczący wzrost aktywności lipolitycznej po immobilizacji badanego enzymu. Należy zaznaczyć, że aktywność lipazy znacznie różniła się w zależności od poddanego jej działaniu oleju. Wobec powyższego recenzent chciałby zapytać Kandydata: jakie są korzyści z zastosowania biokatalitycznej metody hydrolizy olejów w porównaniu do klasycznej saponifikacji?

Z obowiązku recenzenta przedstawiam błędy i niedopatrzona znalezione w pracy:

Strona 16

„5(*S*)-alkohol” – trudno dociec czym jest ten związek

Strona 22

„lipaza A z *Candida antarctica* (CALA) wykazywała selektywność wobec kwasów tłuszczowych (nasyconych, jednonienasyconych i wielonienasyconych) wraz ze wzrostem liczby wiązań podwójnych w ich strukturach.” – zdanie sformułowane jest nieprecyzyjnie

Strona 40

„Otrzymane wyniki wskazywały na obniżenie aktywności immobilizowanej APS-BCL w porównaniu z aktywnością lipazy w formie wolnej. Do dalszych badań lipolitycznych, z uwagi na wyższą aktywność immobilizowanej APS-BCL, w porównaniu w formą wolną, wybrano olej arachidowy jako substrat.” - zdania sformułowane jest nieprecyzyjnie i sprzecznie

Strona 41

„Ponadto, wykazano pozytywny wpływ środowiska reakcji na aktywność enancjoselektywną immobilizowanej APS-BCL.” – bez podania jakie to środowisko zdanie traci rację bytu

Strona 59

„Obecność wieczka umożliwia zmianę konformacji z zamkniętej na otwartą, co skutkuje odsłonięciem miejsca aktywnego enzymu [32]. – otwarcie wieczka następuje w skutek działania odpowiedniego środowiska reakcji


Strona 96

„Odnotowano korzystny wpływ rozpuszczalników oraz donorów grupy acylowej na aktywność immobilizowanej APS-BCL.” – bez podania jakie to rozpuszczalniki zdanie jest niepotrzebne, donory grupy acetylowej nie wywierają korzystnego wpływu

Strona 97

”Przeprowadzone eksperymenty wskazały na pozytywną rolę lipaz w katalizowaniu reakcji o znaczeniu farmaceutycznym” – pozytywna rola to nie to samo co przydatność

Przedstawioną do oceny pracę oceniam bardzo wysoko. Dysertacja spełnia wymagania Ustawodawcy, prezentuje zarówno aspekt poznawczy jak i praktyczny, wobec tego wnoszę o dopuszczenie Pana mgra Jacka Dulęby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Chemii Organicznej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
  
prof. dr hab. Jarosław Sączewski