



Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

01-224 Warszawa
ul. Kasprzaka 44/52
Tel. (22) 343 20 54
Fax.: (22) 632 66 81
E-mail: ryszard.ostaszewski@icho.edu.pl

Warszawa, 16.07. 2020

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Ignacy Janicki

zatytułowanej

„Nowe zastosowania metod biokatalitycznych w asymetrycznej syntezie związków heteroorganicznych przy wykorzystaniu ene-reduktaz oraz katalitycznego promiskuityzmu enzymów”

Nowoczesna synteza organiczna jest bardzo dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauk przyrodniczych w ramach, której nieustannie trwają prace nad opracowywaniem nowych metod syntezy związków organicznych. Tworzone są i rozwijane takie metody syntezy, spośród których te wykorzystujące izolowane enzymy lub całe komórki stają się coraz bardziej wykorzystywane w laboratoriach badawczych, przemysłowych oraz procesach produkcyjnych. Związane jest to niewątpliwie z oczekiwaniami, jakie powinny obecnymi spełniać nowoczesne technologie, które muszą wypełniać zasady zielonej chemii oraz być przyjazne dla środowiska naturalnego. I w tym nurcie badań znajduje się przesłana do recenzji dysertacja doktorska magistra Ignacego Janickiego.

Jako główny cel swojej pracy mgr Janicki postanawia rozwinąć możliwości zastosowania enzymów z grupy ene-reduktaz do syntezy chiralnych fosfonianów. Pomimo tego, że tak postawiony cel pracy należy uznać, za bardzo ambitny nie ogranicza się tylko do niego. Zamierzał także sprawdzić czy enzymy będą dobrymi katalizatorami reakcji aza-Henry'ego. Jest to, więc przeniesienie tematyki badawczej na zupełnie inny obszar biokatalizy, czyli wykorzystania enzymów do syntezy związków chemicznych. Tak postawiony cel jest logiczną kontynuacją i rozwinięciem tematyki badawczej realizowanej w zespole profesora Piotra Kiełbasińskiego, który jest promotorem wymienionej dysertacji.

Dysertacja jest opracowaniem, podzielonym formalnie na następujące rozdziały: „Streszczenie”, „Abstract”, dwustronicowy „Cel i zakres pracy”, po którym następuje „Część literaturowa” liczącą 29 stron. Jest ona podzielona na następujące części ogólne: „Biokataliza”, „ α,β -Nienasycone fosfoniany”, „Reakcja Stilla-Gennariego”. Następnie znajdujemy rozdział „Badania własne” liczący 25 stron wraz z „Podsumowaniem”. Kolejny rozdział „Część eksperymentalna” liczy 24 strony. Po tej części następuje rozdział „Bibliografia” wymieniający aż 226 pozycji. Praca jest dobrze zredagowana i zawiera w sumie 109 stron tekstu. Całość pracy została przygotowana niezwykle starannie, schematy reakcji oraz struktury związków podane są bardzo czytelnie.

Część „Studia literaturowe” rozpoczyna omówienie biokatalizy, jako metody syntezy związków organicznych. Następnie Doktorant omawia chemiczne i stereoselektywne metody redukcji wiązania C=C pokazując ich wady oraz zalety. Do podanych w dysertacji wad chemicznych metod syntezy zaliczyłbym także zanieczyszczenie produktów reakcji metalami ciężkimi z katalizatorów, co w przemyśle farmaceutycznym nie może być tolerowane. Przeciwwstawia te metody ich biokatalitycznym odpowiednikom, jakim jest wykorzystanie enzymów, które nazywa ene-reduktazami. Dla recenzenta taka

nazwa jest trochę niezręczna i zaproponowana przez Doktoranta w przypisie na stronie 18 nazwa reduktazy enowe wydaje się być dogodniejsza. Należy jednak zaznaczyć, że polskie słownictwo i nomenklatura chemiczna ciągle się rozwija i badacz zajmujący się nowym obszarem aktywności naukowej ma prawo do zaproponowania własnej nazwy. Zastosowania i mechanizm reakcji katalizowanych przez te enzymy jest przedstawione bez przesadnego epatowania szczegółami, co wpływa na klarowność przekazu. Na stronie 27 znajdujemy sformułowanie „... na celu kontrolę efektu stereochemicznego”, co należy jak sądzę rozumieć, jako kontrolę stereochemicznego przebiegu katalizowanej reakcji. Zagadnienie to jest omówione w dwóch punktach i, co więcej, Doktorant umiejętnie analizuje dane literaturowe na podstawie, których zamierza kontrolować przebieg stereochemicznych wykonywanych przez siebie reakcji. Kolejna część dotyczy promiskuityzmu enzymów, który Doktorant omawia na wybranych sześciu przykładach, które dobrze ilustrują ten fenomen. Ponieważ jako substraty do reakcji enzymatycznych zamierza wykorzystać α,β -nienasycone fosfoniany poświęca syntezie tej klasy związków rozdział 2.2 wraz z metodami stereoselektywnej redukcji wiązania C=C występującego w tych związkach. Rozdział ten kończy podrozdział zatytułowany „Reakcja Stilla-Gennariego”, którą Doktorant zamierza wykorzystać do syntezy substratów. Ta część pracy napisana jest klarownie i czyta się ją z dużą przyjemnością.

Drugą część dysertacji zatytułowaną „Badania własne” doktorant zaczyna od opisu ogólnych założeń i syntezy substratów. Ponieważ zamierza wykorzystać reduktazy enowe do redukcji wiązania C=C w wybranych α,β -nienasyconych fosfonianach (**1**) pokazuje metody syntezy tych związków oraz wykonuje syntezę racemicznych produktów redukcji wiązania C=C na drodze redukcji katalizowanej wodorem na katalizatorze palladowym (związki o strukturze **9** na Schemacie 9). Następnie przedstawia wyniki badań nad enzymatyczną redukcją substratów **1** za pomocą izolowanych reduktaz enowych. Wyniki te, zestawione w Tabeli 2 są bardzo dobre i aby je uwiarygodnić postanawia wykonać transformacje substratów w skali preparatywnej. Uzyskane wyniki przedstawia w Tabeli 3 Dysertacji. Opis procedury eksperymentalnej 5.1.3 jest jednak dla recenzenta niejasny, ponieważ trudno z niego wywnioskować, jakie ilości substratów były rzeczywiście używane do poszczególnych reakcji. Przypisanie konfiguracji absolutnych poszczególnym produktom reakcji postanawia wykonać poprzez korelacje chemiczne w oparciu o dostępne dane literaturowe. Nie znalazłem, niestety, w Dysertacji tabeli zestawiającej uzyskane i literaturowe skręcalności właściwe odpowiednich związków. Opis ze strony 52 jest bardzo lakoniczny i dotyczy przypisania konfiguracji absolutnych dla produktów (+)-**9a** i (+)-**9b**. Uzyskane wyniki Doktorant dodatkowo uwiarygadnia poprzez obliczenia teoretyczne oraz eksperyment wykorzystujący znakowanie deuterem. Zastosowanie metod numerycznych do modulowania oddziaływania substratów z centrum aktywnym enzymu OYE3 do potwierdzenia wyników eksperymentalnych pokazuje dużą biegłość doktoranta w zakresie stosowania tych metod do analizy stereochemicznego przebiegu katalizowanych przez enzym reakcji redukcji i zasługuje na duże uznanie. Szkoda, że Doktorant nie pokusił się o zestawienie danych eksperymentalnych z danymi numerycznymi w formie tabeli. Pokazane wątpliwości dotyczące błędnego przypisania konfiguracji absolutnych produktów na podstawie danych literaturowych R. Kadyrova wydają się zasadne.

W kolejnym etapie badań postanawia wykorzystać reduktazy enowe do redukcji (*Z*)- α,β -nienasyconych fosfonianów, związków, które uzyskuje, po optymalizacji, w reakcji Stilla-Gennariego. Uzyskane wyniki zestawia w Tabeli 6. Stwierdza, że związki o konfiguracji (*E*) są przekształcane łatwiej i z większą wydajnością niż ich izomery geometryczne (*Z*). Napotyka duże trudności w opracowaniu metody analitycznej analizy składu enancjomerycznego produktów **9f**, **9u** i **9w** na drodze analiz GC, HPLC i NMR. Pomimo tego udaje mu się wykazać, że można kontrolować przebieg stereochemiczny reakcji enzymatycznej redukcji α,β -nienasyconych fosfonianów na drodze odpowiedniego doboru konfiguracji geometrycznej substratów biorąc izomery *E* lub *Z* jako substraty. Do lepszego wglądu w przebieg reakcji stosuje obliczenia teoretyczne, które zostały opisane w krótkim rozdziale 3.2.5 i umieszczone na Rysunku 3.

Aby rozwinąć enzymatyczne metody redukcji α,β -nienasyconych fosfonianów Doktorant postanawia zastosować nie tylko izolowane enzymy ale także całe komórki mikroorganizmów, którymi były grzyby strzępkowe *Mucor circinelloides* w postaci żywych komórek oraz w formie wysuszonej grzybni. Badania te wykonuje we współpracy z dr Mirosławą Szczęsną-Antczak oraz mgr Jakubem Szelażkiem z Instytutu Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Do badań wybiera dziewięć substratów pokazanych na Schemacie 57 Dysertacji. Uzyskane

wyniki biotransformacji α,β -nienasyconych- γ -ketofosfonianów za pomocą grzybów strzępkowych *Mucor circinelloides* zestawia w Tabeli 7 i szczegółowo analizuje na kolejnych trzech stronach dysertacji.

Mając dane z redukcji substratów izolowanymi reduktazami enowymi oraz całymi komórkami grzybów strzępkowych *Mucor circinelloides* trafnie zauważa, że transformacje z wykorzystaniem izolowanych enzymów są zdecydowanie bardziej praktyczne w małej, laboratoryjnej skali, a transformacje w skali większej lepiej wykonywać całymi komórkami grzybów, co opisuje w rozdziale 3.3.3.

W kolejnym etapie badań Doktorant postanowił zająć się reakcją aza-Henry'ego której przebieg zamierzał kontrolować poprzez dodatek enzymów. W badaniach testował 5 substratów (Schemat 60) oraz nitrometanem w obecności różnych enzymów. Uzyskane wyniki zestawione są w Tabeli 8 Dysertacji. Wykazuje, że lipaza TL z *Pseudomonas stutzeri*, oksynitrylaza AtHNL z *Arabidopsis thaliana*, oraz lipaza z trzustki wieprzowej są dogodnymi biokatalizatorami tej reakcji, ale reakcje nie będą w sposób stereoselektywny. Interpretacja uzyskanych wyników podana na stronie 71 Dysertacji jest satysfakcjonująca. Niestety opis eksperymentów wykonanych w ramach tego etapu badań jest niezwykle lakoniczny, co bardzo utrudnia ich, ewentualne, powtórzenie.

Oceniając uzyskane przez Doktoranta wyniki należy podkreślić ich wysoką wartość merytoryczną, czego dowodem jest fakt, iż stały się już przedmiotem pięciu publikacji zamieszczonych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, czterech wystąpieniach na konferencjach oraz siedmiu plakatów na imprezach naukowych. Pracę czyta się łatwo. Strona edytorsko-redakcyjna rozprawy jest bardzo dobra. Opis większości przepisów preparatywnych jest precyzyjny i nie pozostawia wątpliwości. Jednak z obowiązku recenzenta oprócz wymienionych powyżej niedociągnięć, wymieniam jeszcze kilka:

1. Deskryptory konfiguracji powinny być zawsze pisane kursywą,
2. Wyniki analiz elementarnych szeregu związków znaczeni różnią się od ich wartości teoretycznej (związki **(Z)-1a**, **(Z)-1s**, **(Z)-1t**, **(Z)-1f**, **(Z)-1**),
3. Obliczone wartości analiz elementarnych podajemy z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku (dane eksperymentalne dla produktów **9** i **13**; np. C, 52,5897 dla związku **9x**).

Powyzsze uwagi w niczym nie umniejszają mojej bardzo pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej magistra Ignacego Janickiego. Doktorant wykazała się dużą biegłością w planowaniu, wykonywaniu i interpretacji wyników eksperymentów. Zastosowanie metod numerycznych do interpretacji uzyskanych wyników należy na szczególne wyróżnienie.

W związku z powyższym uważam, że recenzowana praca doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu rozprawom przez *Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 15 września 2017 r. pozycja 1789 w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* i niniejszym występuję z wnioskiem do **Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN** w Łodzi o dopuszczenie Pana magistra inżyniera **Ignacego Janickiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto biorąc pod uwagę nakład pracy oraz uzyskane przez doktoranta wyniki, które zostały opublikowane w szeregu prestiżowych czasopiśmie naukowych takich jak: *Advanced Synthesis & Catalysis* - dwie prace, *Synthesis, Bioorganic Chemistry* - dwie prace, zwracam się do **Wysokiej Rady Naukowej CBMiM** z wnioskiem o **wyróżnienie niniejszej dysertacji**.

Warszawa 16 lipca 2020 roku.