

Prof. dr hab. Andrzej Gzella
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytetu im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu
ul. Rokietnicka 3, 60-806 Poznań



e-mail: akgzella@ump.edu.pl
tel.: 61/641-85-07, 61/641-85-05

Poznań, dnia 10 grudnia 2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Jacka Dulęby pt.

*”Ocena aktywności enancjoselektywnej i lipolitycznej lipaz z *Bulkholderia sp.* oraz *Aspergillus sp.* w formie wolnej oraz immobilizowanej na nośnikach polimerowych”*

wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Michała Marszałła i dr. Tomasza Siódmiaka
/promotor pomocniczy/ na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum
w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu

Przekazana mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Dulęby wpisuje się w nurt badań naukowych dotyczących biokatalizy. Jak wiadomo, biokatalizatory stanowią interesującą alternatywę dla katalizatorów chemicznych, zwiększając w znaczący sposób wydajność reakcji chemicznych i/lub ich selektywność. Reakcje biokatalityczne charakteryzują się łagodnymi warunkami i przyjaznością dla środowiska, co sprawia, że zaliczane są do tak zwanej "zielonej chemii" nieobciążającej środowiska naturalnego. Biokatalizatory są często stosowane w reakcjach otrzymywania terapeutycznie czynnych enancjomerów leków.

Doktorant w swoich badaniach zwrócił uwagę na lipazy (hydrolazy triacylogliceroli, EC 3.1.1.3), to jest enzymy pełniące istotną rolę w metabolizmie tłuszczów w organizmach żywych. Cechą szczególną lipaz jest ich zdolność do działania na granicy faz woda-olej. Interesującym zjawiskiem jest tak zwana "aktywacja międzyfazowa", czyli ekspozycja centrum aktywnego lipazy poprzez ruch charakterystycznego "wieczka". Konsekwencją jest zmiana konformacji lipazy z formy zamkniętej na otwartą, co skutkuje zwiększoną jej aktywnością enzymatyczną. Lipazy są szeroko wykorzystywane w licznych reakcjach chemicznych, na przykład w reakcjach syntezy estrów czy transestryfikacji, pozwalających otrzymać chiralnie czyste związki. Stąd duże i rosnące zainteresowanie tą grupą enzymów w przemysłach takich jak farmaceutyczny, biotechnologiczny, chemiczny, kosmetyczny, spożywczy. Lipazy, mimo

że wykazują wysoką aktywność w formie wolnej (natywnej), często są poddawane różnym zabiegom w celu dalszego zwiększenia ich aktywności. Najpopularniejszą strategią w tym zakresie jest immobilizacja, m.in. na stałych nośnikach, której celem jest zwiększenie nie tylko aktywności, ale również stabilności enzymu.

Celem rozprawy doktorskiej mgr. Dulęby była ocena aktywności enancjoselektywnej i lipolitycznej lipaz z *Burkholderia sp.* i *Aspergillus sp.* w formie wolnej (natywnej) i immobilizowanej na nośnikach polimerowych. Doktorant badania prowadził z zastosowaniem komercyjnie dostępnych lipaz Amano PS z *Burkholderia cepacia* (APS-BCL) i Amano A z *Aspergillus niger* (AA-ANL). Obydwa enzymy należą do najczęściej stosowanych w reakcjach biokatalitycznych.

Na pracę doktorską mgr. Dulęby składa się zbiór spójnych tematycznie 4 publikacji wydanych drukiem w recenzowanych czasopismach naukowych, jak *Current Organic Chemistry* (2020), *Process Biochemistry* (2022), *Catalysts* (2022), *Farmacja Polska* (2022), w tym trzy stanowiące oryginalne prace twórcze, jedna pracę poglądową. Trzy czasopisma naukowe znajdują się na „Liście Filadelfijskiej”. Łączna wartość współczynnika oddziaływania (ang. *impact factor*) wynosi 11,612, zaś liczba punktów MEiN 380. We wszystkich czterech publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem względnie równorzędnym pierwszym autorem. Fakt ten oraz dodatkowo załączone oświadczenia współautorów wskazują jednoznacznie, iż mgr Dulęba jest również głównym wykonawcą prac. Do odbitek publikacji, stanowiących podstawę postępowania doktorskiego Autor dołączył komentarz w języku polskim obejmujący 44 strony maszynopisu.

W publikacji o charakterze pracy poglądowej, wydrukowanej w czasopiśmie naukowym *Farmacja Polska*, mgr Dulęba przedstawił w oparciu o 39 doniesień literaturowych najważniejsze informacje na temat budowy i zastosowania lipazy z *Burkholderia cepacia* w enancjoselektywnej biokatalizie farmaceutycznej. Praca poglądowa stanowi dobrą podstawę teoretyczną i pokazuje dobre przygotowanie Doktoranta do przeprowadzenia badań opisanych w dwóch kolejnych publikacjach, obydwu wydrukowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, pierwsza nosząca tytuł „Amano Lipase PS from *Burkholderia cepacia* – Evaluation of the Effect of Substrates and Reaction Media on the Catalytic Activity”, zaś druga „The influence of substrate systems on the enantioselective and lipolytic activity of immobilized Amano PS from *Burkholderia cepacia* lipase (APS-BCL)”.

W publikacji dotyczącej oceny wpływu substratów i rozpuszczalników na aktywność katalityczną komercyjnie dostępnej lipazy Amano PS z *Burkholderia cepacia* (APS-BCL) w

formie wolnej (natywnej) Doktorant przeprowadził kinetyczny rozdział (*R,S*)-1-feniloetanolu z zamiarem poddania analizie wpływ substratów i mediów reakcji na aktywność enancjoselektywną lipazy. W pierwszej kolejności w reakcji transestryfikacji katalizowanej przez APS-BCL w formie wolnej (natywnej) jako donora grupy acylowej Autor wybrał octan izopropenyłu, jako rozpuszczalnik *n*-heptan, zaś czas inkubacji 48 h. Przeprowadzona reakcja pozwoliła otrzymać optycznie czysty octan (*R*)-1-feniloetylu. Wyliczone dla niej parametry katalityczne ($ee_p = 94\%$, $ee_s = 99\%$, $C = 51\%$, $E = 170$) potwierdziły wysoką zdolność lipazy do katalizowania rozdziału (*R,S*)-1-feniloetanolu w testowanych warunkach. Analiza porównawcza uzyskanych wyników z danymi dla tej samej reakcji, w której zastosowano jako donora grupy acylowej popularny octan winylu zamiast octanu izopropenyłu, pokazała, że uzyskane wyniki dla reakcji z udziałem octanu winylu były tylko nieznacznie lepsze stopniu. Dlatego też Autor uznał, że octan izopropenyłu można uważać za odpowiedni donora grupy acylowej, głównie z uwagi na wysoką konwersję i enancjoselektywność reakcji.

W ramach badań wpływu środowiska reakcji na aktywność katalityczną APS-BCL w formie wolnej (natywnej) mgr Dulęba przeprowadził analizę wpływu rozpuszczalników o różnych wartościach współczynnika podziału logP na aktywność enancjoselektywną APS-BCL. W tym celu przeprowadził On badania kinetycznego rozdziału (*R,S*)-1-feniloetanolu w ośmiu rozpuszczalnikach o różnych wartościach logP. Przeprowadzone badania wykazały brak liniowej zależności pomiędzy wartością logP i wielkościami parametrów katalitycznych. Jednocześnie wykazały one przydatność wszystkich testowanych rozpuszczalników w biokatalizie z uwagi na wysoką enancjoselektywność reakcji, wśród których najbardziej korzystnym dla przeprowadzenia reakcji biokatalizy okazał się eter diizopropylowy.

Badania aktywności lipolitycznej lipazy APS-BCL w formie wolnej (natywnej) Doktorant przeprowadził w trzynastu różnych olejach pochodzenia roślinnego charakteryzujących się różną zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych ω -3, ω -6 i ω -9. W przeprowadzonej analizie wykazał On, że skład ilościowy kwasów tłuszczowych zawartych w badanych olejach ma wpływ na aktywność lipolityczną lipazy APS-BCL. Autor stwierdził również, że w przypadku olejów, w których stosunek ilościowy kwasów ω -6/ ω -9 był równy lub wyższy niż 2,3, APS-BCL wykazywała wyższą aktywność lipolityczną, aniżeli w przypadku olejów, gdzie stosunek ilościowy kwasów ω -6/ ω -9 przyjmował wartości niższe. W oparciu o poczynione obserwacje, szczególnie tę ostatnią Doktorant zaproponował granicę odcięcia dla wartości 2,3. Mgr Dulęba wyraził nadzieję, że obserwowaną zależność będzie można w przyszłości wykorzystać w projektowaniu enzymatycznych układów katalitycznych. W badaniach aktywności lipolitycznej APS-BCL w formie wolnej Doktorant odnotował, że zależność

pomiędzy wzrostem ilościowego stosunku kwasów ω -6/ ω -9 a wzrostem aktywności lipolitycznej lipazy nie jest liniowa. Doktorant, posiłkując się literaturą przedmiotu, wyraził pogląd, że stwierdzone dla badanej grupy olejów roślinnych różnice w dostępności substratów do lipazy mogą być związane z długością łańcucha oraz liczbą i położeniem wiązań podwójnych.

W publikacji dotyczącej wpływu substratów na aktywność enancjoselektywną i lipolityczną lipazy Amano PS z *Burkholderia cepacia* (APS-BCL) immobilizowanej na nośniku poliakrylowym IB-150A Doktorant przeprowadził reakcję transestryfikacji, używając octanu izopropenylu oraz octanu winylu jako donorów grupy acylowej, zaś *n*-heptanu jako rozpuszczalnika. W oparciu o analizę porównawczą uzyskanych wyników badań aktywności enancjoselektywnej APS-BCL immobilizowanej oraz wolnej (natywnej) Autor stwierdził, że immobilizacja lipazy sprzyja zwiększeniu jej enancjoselektywności niezależnie od użytego substratu (dotyczy octanu izopropenylu i octanu winylu). Wysoką zdolność lipazy do katalizowania rozdziału (*R,S*)-1-fenylloetanolu w testowanych warunkach mgr Dulęba poparł uzyskanymi dla obydwu donorów grupy acylowej wielkościami parametrów konwersji (*C*) (odpowiednio 49 i 50 %), nadmiaru enancjomerycznego produktów (ee_p) (odpowiednio 99 i 96 %), nadmiaru enancjomerycznego substratów (ee_s) (odpowiednio 95 i 97 %) oraz enancjoselektywności (*E*) (odpowiednio 775.4 and 206.9). Analiza wielkości wymienionych parametrów pokazała, że jakkolwiek immobilizacja lipazy sprzyja zwiększeniu jej enancjoselektywności w przypadku obydwu użytych substratów, to przy podobnych wartościach parametru konwersji (*C*), wielkość parametru enancjoselektywności (*E*) odnotowana dla octanu izopropenylu jako donora grupy acylowej była wyższa niemalże czterokrotnie aniżeli ta uzyskana dla octanu winylu. W tym miejscu warto również odnotować, że uzyskana wielkość parametru enancjoselektywności (*E*) dla APS-BCL immobilizowanej w odniesieniu do wielkości tego samego parametru ($E = 170$) dla APS-BCL w formie wolnej (natywnej) była wyższa aż ponad czterokrotnie. Doktorant zaobserwował, że immobilizacja APS-BCL pozwoliła znacznie skrócić czas reakcji niezbędny do osiągnięcia wysokich parametrów katalitycznych. W oparciu o uzyskane wyniki badań Autor wykazał przydatność octanu izopropenylu jako donora acylowego w otrzymywaniu chiralnie czystego (*R*)-1-fenylloetanolu również w reakcji katalizowanej przez immobilizowaną APS-BCL. W tym miejscu należy zauważyć, że kinetyczny rozdział (*R,S*)-1-fenylloetanolu katalizowany przez immobilizowaną APS-BCL z octanem izopropenylu jako donorem grupy acylowej został przeprowadzony po raz pierwszy. Z uwagi na pionierski charakter badań z zastosowaniem

octanu izopropenyłu jako donora grupy acylowej w reakcji katalizowanej przez APS-BCL immobilizowaną na nośniku poliakrylowym IB-150A, analiza porównawcza z innymi immobilizowanymi lipazami okazała się bardzo trudna, wręcz niemożliwa.

W analizie wpływu rozpuszczalników o różnych wartościach współczynnika podziału logP na aktywność enancjoselektywną APS-BCL immobilizowanej na nośniku poliakrylowym IB-150A mgr Dulęba przeprowadził badania kinetycznego rozdziału (*R,S*)-1-fenylloetanolu w siedmiu różnych niewodnych rozpuszczalnikach. W oparciu o uzyskane wyniki badań Autor stwierdził, że wśród testowanych rozpuszczalników najbardziej korzystnymi dla przeprowadzenia reakcji biokatalizy były eter diizopropylowy oraz *n*-heksan. Wykazał On brak liniowej zależności pomiędzy wartością logP i wielkościami parametrów katalitycznych, a także określił optymalne warunki reakcji transestryfikacji katalizowanej przez immobilizowaną APS-BCL, pozwalające otrzymać wysoką czystość produktów.

Analizę aktywności lipolitycznej APS-BCL unieruchomionej na podłożu poliakrylowym IB-150A mgr Dulęba przeprowadził nowatorską metodą wieloskładnikowych nienasyconych kwasów tłuszczowych (MC-UFAs) z zastosowaniem trzynastu olejów pochodzenia roślinnego o różnej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych ω -3, ω -6 i ω -9. W oparciu o przeprowadzone badania Doktorant wykazał, że w przypadku większości olejów, użytych jako substraty, aktywność lipolityczna APS-BCL po immobilizacji była niższa od APS-BCL w formie wolnej (natywnej). Doktorant wyraził przekonanie, że na spadek aktywności immobilizowanej APS-BCL mogą mieć wpływ m. in. skład i struktura wielo- i mononienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w oleju. Wykazał On wpływ stosunku ilościowego wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ω -3 i ω -6 (PUFAs) do jednonienasyconych kwasów tłuszczowych ω -9 (MUFAs) na aktywność lipazy oraz potwierdził granicę odcięcia ω -6/ ω -9 = 2,3. Olej arachidowy Autor zaproponował jako najbardziej odpowiedni substrat do testu aktywności lipolitycznej ze względu na hiperaktywację immobilizowanej APS-BCL ($A_{rec} = 104,9\%$, $A_{ret} = 110,2\%$). Uzyskane przez Doktoranta wyniki badań potwierdziły sugestie innych autorów, że właściwości fizyczne i chemiczne PUFAs i MUFAs oraz stopień ich nienasycenia mają znaczący wpływ na aktywność lipazy, nawet po jej unieruchomieniu.

Wyniki badań odnoszące się do aktywności enancjomerycznej i lipolitycznej drugiej analizowanej lipazy Amano A z *Aspergillus niger* (AA-ANL), mgr Dulęba zawarł w publikacji pt. „The High ‘Lipolytic Jump’ of Immobilized Amano A Lipase from *Aspergillus niger* in Developed ‘ESS Catalytic Triangles’ Containing Natural Origin Substrates”. Doktorant

stwierdził, że komercyjnie dostępną AA-ANL charakteryzuje wysoki poziom aktywności, stabilności i specyficzności. Zauważył On ponadto, że lipaza wykazuje specyficzność substratową zarówno wobec grup acylowych w pozycji 1- i 3-gliceroli, jak i kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha. Dzięki swoim właściwościom AA-ANL wykorzystywana jest, i to w obydwu formach natywnej i immobilizowanej, w katalizowaniu licznych reakcji chemicznych. Z uwagi na dominujące trendy badawcze, ciągle są modyfikowane i poprawiane właściwości enzymatyczne lipazy. Najpopularniejszą strategią w tym zakresie jest immobilizacja AA-ANL. Doktorant zwrócił uwagę, że w przypadku AA-ANL zachodzi zjawisko "aktywacji międzyfazowej", czyli odsłonięcia centrum aktywnego lipazy, co umożliwia wzrost aktywności katalitycznej.

W ramach badań aktywności lipazy Amano A z *Aspergillus niger* (AA-ANL) mgr Dulęba w pierwszej kolejności przeprowadził kinetyczny rozdział (*R,S*)-1-fenylloetanolu w reakcji transestryfikacji katalizowanej przez AA-ANL w obydwu formach, to jest immobilizowanej na nośniku poliakrylowym IB-150A oraz wolnej (natywnej). Z uwagi na uzyskane wyniki badań pokazujące niską **aktywność enancjoselektywną lipazy Autor uznał reakcję za nioselektywną**. W dalszej kolejności Doktorant dokonał oceny aktywności lipolitycznej AA-ANL w formie immobilizowanej na nośniku poliakrylowym IB-150A i w formie wolnej (natywnej). Reakcję hydrolizy enzymatycznej przeprowadził On w dwudziestu dwóch olejach pochodzenia roślinnego oraz dodatkowo w jednym oleju rybnym. Autor przeanalizował wpływ trzech nośników (IB-150A, IN-D152 i IB-EC1), sześciu mieszanin substratów oraz dodatkowo temperatury i pH na aktywność lipolityczną immobilizowanej AA-ANL. U większości substratów Doktorant zaobserwował prawdziwy "skok w górę" aktywności enzymatycznej immobilizowanej AA-ANL w porównaniu z niską aktywnością lipazy w formie wolnej (natywnej). Przy tym najwyższą aktywność lipazy odnotował w oleju z pestek dyni ($I_e = 2400\%$). Doktorant wykazał wpływ stosunku ilościowego wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ω -3 i ω -6 (PUFAs) do jednonienasyconych kwasów tłuszczowych ω -9 (MUFAs) na aktywność lipazy oraz zaproponował granicę odcięcia ω -6/ ω -9 na poziomie 3,44. Potwierdził korzystny wpływ na aktywność AA-ANL wszystkich trzech nośników poliakrylowych (IB-150A, IB-D152, IB-EC1), różniących się typem oddziaływań z lipazą. Autor w badaniach wpływu temperatury (25–65 °C) i odczynu mieszaniny reakcyjnej (pH = 4–9) na aktywność immobilizowanej AA-ANL odnotował skok lipolityczny dla całego przewidzianego w badaniach zakresu temperatur i pH. W badaniach stabilności lipazy w kompleksie AA-ANL-//IB-150A stwierdził On, że AA-ANL wykazywała znaczną aktywność nawet po czterech cyklach reakcji z jej udziałem. Drastyczny spadek aktywności lipolitycznej

lipazy i dużą niestabilność kompleksu lipaza–nośnik Doktorant odnotował dopiero po 168 h jej przechowywania w komorze klimatycznej w temperaturze 40 °C.

Wyniki badań uzyskane w ramach pracy doktorskiej mgr Dulęba zaprezentował w formie komunikatu ustnego na konferencjach naukowych w Lublinie (2021) i Brnie (Czechy, 2022).

Charakterystyka redakcji rozprawy.

Błędów merytorycznych w rozprawie doktorskiej nie znalazłem. Komentarz do publikacji jest napisany logicznie i poprawną polszczyzną. Potknięcia językowe i błędy redakcyjne, które zauważyłem podczas lektury pracy, są nieliczne. Wymienione uchybienia nie mają wpływu na moja pozytywną wysoką ocenę pracy. Również konieczność opublikowania w czasopiśmie naukowym *Catalysts* ‘erraty’ dla publikacji pt. „The High ‘Lipolytic Jump’ of Immobilized Amano A Lipase from *Aspergillus niger* in Developed ‘ESS Catalytic Triangles’ Containing Natural Origin Substrates” w mojej opinii nie zmniejsza wagi merytorycznych osiągnięć Doktoranta.

Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie zadać dwa pytania, jakie nasunęły mi się podczas zapoznawania się z lekturą pracy doktorskiej:

- czy w przypadku zastosowania w reakcjach transestryfikacji octanu izopropenylu względnie octanu winylu nie należało określić te związki jako donory grupy acetylowej zamiast acylowej?
- czym kierował się Pan określając zakres temperatur 25–65 °C oraz wartości pH (4–9) w badaniach wpływu temperatury i pH na aktywność immobilizowanej AA-ANL?

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pana mgr. Jacka Dulęby świadczy o dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia badań w zakresie chemii leku. Doktorant umiejętnie korzysta ze specjalistycznej aparatury oraz swobodnie operuje terminologią z zakresu farmacji, biologii i biochemii. Uważam, że recenzowana praca spełnia wymagania prawne w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) oraz wnioskuję o dopuszczenie mgr. Jacka Dulęby do publicznej obrony oraz o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

