

19.08.2014

Dr hab. Ewa Żymańczyk-Duda, Prof. PWr
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 29
50-370 Wrocław

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Sylwii Kaczmarczyk,
zatytułowanej „Chiralne hydroksylowe pochodne sulfotlenków i fosfinitlenków –
chemoenzymatyczne syntezy, przemiany i zastosowanie”**

Chemoenzymatyczne syntezy z zastosowaniem czystych preparatów enzymatycznych czy też cało-komórkowych biokatalizatorów są coraz powszechniej stosowane w chemii organicznej, szczególnie w przypadkach, gdy substratami i/lub produktami są związki chiralne. Zaletą takiej strategii jest możliwość dostosowania aktywności biokatalizatora do zaplanowanej syntezy, nawet, jeśli substraty biokonwersji są ksenobiotykami. Stosuje się metody inżynierii środowiska reakcji lub modyfikacje biotechnologiczne biokatalizatorów, dopasowując warunki do indywidualnych wymagań prowadzonego procesu. Jednym z niewielu zespołów naukowych w kraju, które podejmują tę tematykę badawczą – wykorzystanie biokatalizy jako wygodnego narzędzia syntetycznego - i realizują ją z powodzeniem jest grupa naukowa Prof. dr hab. Piotra Kielbasińskiego z Centrum badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Tam też Pani mgr inż. Sylwia Kaczmarczyk wykonywała badania naukowe stanowiące podstawę przedstawionej mi do oceny dysertacji. Problematyka będąca przedmiotem zainteresowań naukowych Pani mgr Kaczmarczyk jest niesłychanie istotna z punktu widzenia nie tylko badań podstawowych, ale przede wszystkim aplikacyjności, związanej z ciągłym poszukiwaniem nowych chiralnych związków odpowiadających na potrzeby różnych gałęzi przemysłu, w tym rolnictwa i przemysłu farmaceutycznego. Doktorantka wyznaczyła sobie sprecyzowane cele badawcze: 1. Syntezę czystych enancjomerycznie nowych typów związków heteroorganicznych drogą chemoenzymatyczną; 2. Zastosowanie otrzymanych struktur jako ligandów bądź katalizatorów w asymetrycznych reakcjach tworzenia wiązania węgiel-węgiel.

Dysertacja Pani mgr inż. Sylwii Kaczmarczyk jest napisana z dbałością o język polski, w sposób zrozumiały dla odbiorcy. Co więcej pierwszym wrażeniem po przeczytaniu pracy

jest odczucie, że jest to dokument kompletny, opisujący zaplanowane, zrealizowane i dobrze udokumentowane eksperymenty naukowe. Układ i podział pracy pozwala czytającemu dobrze orientować się w tekście, pomocny jest także zamieszczony indeks skrótów. Bardzo czytelne jest streszczenie, co pokazuje, że doktorantka potrafi w sposób syntetyczny opisać i wyodrębnić najistotniejsze wyniki swojej pracy. Autorka umiejętnie kreśli spójny cel badawczy w części „Zakres i cel pracy”. Idąc dalej, redakcja wstępu pracy, nazwanego tu „Częścią ogólną” i podzielonego na trzy sekcje: „Wstęp” – zawierający krótkie, ale bardzo istotne wprowadzenie do dwóch następujących zatytułowanych: „Chiralne ligandy siarkoorganiczne z centrum chiralności na atomie siarki” i „Chiralne ligandy fosforoorganiczne z centrum chiralności na atomie fosforu”, pokazuje, że autorka z dużą swobodą porusza się w obranej tematyce badawczej i potrafi dobrze uzasadnić celowość podjętych wysiłków naukowych. Dodatkowo taki podział części literaturowej bardzo ułatwia czytanie pracy, zwłaszcza, osobom (jak niżej podpisana), których obszar badawczy stanowią nauki bardziej biologiczne niż chemiczne. W tym paragrafie występują tylko drobne błędy jak np. na str. 7 „...autorzy użyli aldehyd benzoesowy...” raczej „aldehydu benzoesowego”, innych nie przytaczam. Kolejna część pracy: „Badania własne” nie pozostawia wątpliwości, co do kompetencji autorki. Obejmuje ona dwa obszernie działy (podzielone na 4 paragrafy): otrzymywanie i próby zastosowania w syntezie asymetrycznej, zróżnicowanych strukturalnie chiralnych ligandów z centrum stereogeniczności zlokalizowanym odpowiednio na atomie siarki lub na atomie fosforu. Autorka poprzedziła tę część pracy krótkim wprowadzeniem opisującym osiągnięcia zespołu badawczego Prof. Piotra Kiełbasińskiego, wskazując kierunek dalszych badań, ujętych w przedstawionym mi do oceny opracowaniu. Pani mgr Kaczmarczyk analizowała możliwość zastosowania opracowanych ligandów aminowych w asymetrycznej reakcji Mannicha. Dodatkowo określiła, które z grup funkcyjnych w strukturze ligandów mają decydujący wpływ na stereochemię omawianej reakcji trójskładnikowej. Sukcesem tej części eksperymentów jest synteza nowego chiralnego liganda, który w odróżnieniu od wcześniej opisywanych związków zawiera dodatkową, chiralną grupę aminową w miejsce hydroksylowej. Zastosowanie otrzymanego związku pozwoliło podnieść wydajność reakcji Mannicha do 94% oraz otrzymać produkt 15 z nadmiarem enancjomerycznym 99% (Tabela 3.). Kolejne eksperymenty wykazały, że zastosowanie innych substratów omawianej reakcji modelowej, w obecności nowego, diaminowego liganda również prowadzi do otrzymania produktów z dobrymi wydajnościami i dużymi nadmiarami enancjomerycznymi. W dalszej części dysertacji Autorka wykorzystwała chiralne ligandy

siarkoorganiczne z podstawnikiem azirydynowym, o różnej konfiguracji absolutnej, w reakcji Simmonsa-Smitha i tu w Tabeli 5, zawierającej wyniki eksperymentów pojawiają się oznaczenia konfiguracji absolutnej produktów (tego nie uwzględniały tabele wcześniejsze), co pozwala łatwo prześledzić stereochemię syntezy podstawionych cyklopropanów i powiązać ją z konfiguracją stosowanego chiralnego związku heteroorganicznego. Autorka wykazała kluczową rolę grupy azirydynowej dla kontroli stereochemicznego przebiegu reakcji i jej wydajności. Również w przypadku reakcji Simmonsa-Smitha Pani mgr Kaczmarczyk wytypowała najefektywniejszy ligand siarkoorganiczny, pozwalający na syntezę zróżnicowanych strukturalnie pochodnych cyklopropylowych z dobrymi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznymi. W dalszej części dysertacji Doktorantka podejmowała próby asymetrycznej syntezy wiązania węgiel-węgiel drogą reakcji allilowania oraz addycji dietylocynku do α -nitroalkenów, co zakończyło się niepowodzeniem. Następnie Autorka postanowiła sprawdzić wpływ grup funkcyjnych ligandów siarkoorganicznych na tworzenie wiązania węgiel-węgiel, badając produkty reakcji nitroaldolowej (Henry'ego) i stosując zmodyfikowany chiralny ligand – oznaczony numerem 5d. Autorka modyfikowała każdą z grup funkcyjnych tego związku – otrzymując produkty, które zastosowała w reakcji modelowej. Tak zaplanowane eksperymenty pozwoliły na potwierdzenie, że skuteczność katalityczna ligandów zależy od obecności grupy sulfinyłowej i hydroksylowej, a konfiguracja absolutna grupy aminowej decyduje o stereochemicznym przebiegu reakcji, czego dowiodło zastosowanie związku 26 (diaminowa pochodna). Zastosowanie tego ostatniego w reakcji nitroaldolowej z użyciem innych aldehydów jako substratów, pozwoliło potwierdzić jego efektywność jako chiralnego katalizatora. Opisane powyżej wyniki zachęciły Autorkę do dalszych poszukiwań, tym razem wśród połączeń fosforoorganicznych. Drogą analogii, Doktorantka wykorzystwała chemoenzymatyczną ścieżkę syntezy, stosując w pierwszym etapie lipazy różnego pochodzenia do enancjoselektywnej biokonwersji tlenku 2-hydroksymetylofenylo(metylo)fenylofosfiny 53, wyniki tej części pracy zawiera tabela 11, str. 126. Zestawienie to pokazuje, że niektóre reakcje prowadzone były kilkadziesiąt dni i dlatego też pojawia się pytanie, czy towarzyszyły temu odpowiednie reakcje kontrolne, wykazujące stabilność użytych enzymów w warunkach eksperymentu? Nie odnalazłam w pracy informacji czy stosowane enzymy były immobilizowane, wtedy prawdopodobieństwo długotrwałego zachowania zdolności katalitycznej w rozpuszczalnikach organicznych znacznie wzrasta. Drugie pytanie nasuwa się przy analizie wyniku z wiersza 7 tabeli – jakiemu stopniowi przereagowania odpowiada 65% wydajność,

czy wyższemu niż 50%, jeśli tak, to dlaczego eksperyment trwał aż 100 dni? W tej części pracy Pani mgr Kaczmarczyk pisze o zastosowanym „...triku..” – ten trik jest bardzo znaną metodą przesuwania równowagi reakcji enzymatycznej w kierunku tworzenia produktów, w przypadku procesów niefizjologicznych, zachodzących w rozpuszczalnikach organicznych, co okazało się skuteczne w przypadku omawianego rozdziału kinetycznego tlenku fosfiny 53. Zastosowanie lipaz pozwoliło Doktorantce również na skuteczną desymetryzację tlenku kolejnej, symetrycznej fosfiny 58. Warto byłoby skomentować, jakie mogą być przyczyny tego, że biokonwersja grupy funkcyjnej oddalonej o 4 wiązania od centrum stereogenicznego w przypadku fosfin zachodzi z dużą wydajnością? W dalszej części pracy Autorka zsyntetyzowała fosforoorganiczne chiralne ligandy funkcjonalizowane aminami i zastosowała mieszaniny diastereomeryczne tych ligandów w modelowych reakcjach asymetrycznych, dla których wcześniej wykorzystywała ligandy siarkoorganiczne. Wyniki nie były zadowalające zarówno dla reakcji nitroaldolowej jak i addycji dietylocynku do aldehydu. W tej części pracy bardzo wartościowa jest wnikliwa analiza, poparta eksperymentami, która pozwoliła na zaproponowanie mechanizmu racemizacji tlenków fosfin 53 i 59. Zaplanowane i wykonane eksperymenty świadczą o dużej dojrzałości naukowej Pani mgr Kaczmarczyk. Brak pozytywnych wyników asymetrycznych reakcji tworzenia wiązania węgiel - węgiel z wykorzystaniem wymienionych pochodnych związków 53 i 59, skłonił Autorkę do dalszych poszukiwań i tu pojawiły się problemy już na etapie desymetryzacji odpowiednich tlenków fosfin 82 i 86 – proces enzymatyczny był nieefektywny lub nie zachodził wcale. W tym miejscu brakuje próby wyjaśnienia dlaczego tak się działo? Próby porównania struktur związków, dla których biokataliza była skuteczna z tymi, dla których nie była efektywna (to wiąże się z wcześniejszą uwagą dotyczącą efektywności biokonwersji grup funkcyjnych substratu odległych o 4 wiązania od centrum chiralności). Podsumowując tę część pracy, chciałam podkreślić dużą staranność redakcyjną – podczas lektury tekstu nie napotkałam żadnej pomyłki w numerowaniu schematów, struktur czy tabel, ponadto rysunki wykonane są w sposób przejrzysty i bardzo ułatwiają czytanie i ocenę dysertacji. Ostatnia część „Część eksperymentalna” zawiera zestawienie stosowanych odczynników, aparatury, opis procedur syntetycznych i analitycznych, wykorzystanych do realizacji założeń naukowych przedstawionej mi do recenzji pracy. I tutaj także Autorka bardzo ułatwiła odbiór tekstu poprzez umieszczenie odpowiednich schematów związków chemicznych przy każdej omawianej procedurze syntezy. Dysertację kończy część literaturowa obejmująca 147 cytowanych w tekście, aktualnych artykułów naukowych. Przedstawioną mi do oceny

pracę oceniam wysoko, tym bardziej, że zawarte w niej wyniki stanowią znaczący dorobek naukowy Doktorantki, na który składa się 5 prac oryginalnych, liczne komunikaty konferencyjne oraz bardzo ważne uczestnictwo w realizacji Grantu MNiSzW i projektu wewnętrznego CBMiM PAN w Łodzi. Biorąc pod uwagę powyższe, chciałabym wystąpić do Wysokiej Rady Naukowej CBMiM o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Sylwii Kaczmarczyk.

Uwagi krytyczne. Wartości dysertacji nie obniżają nieliczne błędy takie jak:

1. Nieprecyzyjne opisy w indeksie skrótów:

np.: "AK – lipaza AK" – co nie wyjaśnia pochodzenia enzymu: jest to lipaza ze szczepu *Pseudomonas fluorescens*, podobnie nieprecyzyjnie jest opisany enzym o nazwie LPL – trzeba zaznaczyć, że jest on pochodzenia eukariotycznego, więc jego specyficzność jest zupełnie inna niż białek prokariotycznych. Pozostałych przykładów nie będę przytaczać.

2. Brak zaznaczenia konfiguracji centrów chiralności na schematach 8 – 10 dla produktów reakcji asymetrycznego tworzenia wiązania węgiel-węgiel.

3. Dyskusja wyników w niektórych przypadkach jest przedstawiona w sposób zbyt uproszczony, i tak np. dyskusja wyników zawartych w tabeli 1 (ale także następne) na str. 93, w opinii recenzentki wymagałaby uzupełnienia, ponieważ stwierdzenie, że konfiguracje absolutne znane są z literatury wydaje się niewystarczające, biorąc pod uwagę fakt, że autorka omawia wpływ chiralnego liganda na konfigurację absolutną powstającego produktu trójskładnikowej reakcji Mannicha, twierdząc: „...ligandy 5c i 5d.....różniące się konfiguracją na ugrupowaniu aminowym....prowadzą do utworzenia obydwu enancjomerów produktu..” w omawianym ustępie ani razu nie jest zdefiniowana konfiguracja absolutna centrów stereogenicznych produktu 15, a to bardzo ułatwiłoby śledzenie wyników i toku rozumowania Doktorantki.

4. Na schemacie 20 str. 108, ligand 5g opisany jako związek z achiralną azirydyną jest narysowany w sposób sugerujący obecność centrum chiralności, co może wprowadzić w błąd czytelnika.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja Pani mgr inż. Sylwii Kaczmarczyk, zatytułowana „Chiralne hydroksylowe pochodne sulfotlenków i fosfinitlenków – chemoenzymatyczne syntezy, przemiany i zastosowanie” **spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i w związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi o dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

