

Prof. dr hab. Piotr Kiełbasiński  
Kierownik Zakładu Chemii Heteroorganicznej  
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk  
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź  
Tel: (42) 680 32 21 (42) 681 58 32, Fax.: (42) 680 32 61  
E-mail: [piokiel@cbmm.lodz.pl](mailto:piokiel@cbmm.lodz.pl)

---

## **RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ**

**mgr inż. Anny Brodzkiej**

zatytułowanej

### ***Badania nad opracowaniem chemoenzymatycznej syntezy enancjomerycznie czystych kwasów 3-arylo-4-pentenowych***

Enzymy, stworzone przez naturę katalizatory, mające za zadanie przyspieszanie i regulowanie procesów zachodzących w organizmach żywych, okazały się zdolne do akceptowania również szerokiej gamy substratów nienaturalnych i przekształcania ich w sposób wysoce chemo-, regio- i stereoselektywny. Ze względu na te cechy znajdują się one coraz częściej na liście reagentów stosowanych w syntezie enancjomerycznie czystych lub wzbogaconych związków chiralnych. Stanowią niejednokrotnie atrakcyjną alternatywę dla typowych odczynników chemicznych, będąc dla nich skuteczną konkurencją w wyścigu o spełnienie wymogów zielonej chemii. Należy dodać, że synteza związków enancjomerycznie czystych stanowi nadal jeden z najważniejszych celów badawczych stawianych chemikom. Wynika to zarówno z zainteresowań poznawczych ukierunkowanych na badanie mechanizmów różnych reakcji jak i z ciągle rosnących wymagań komercyjnych, związanych z powszechnym już obowiązkiem badania aktywności biologicznej każdego stereoizomeru nowo wprowadzanego na rynek produktu chemicznego. Przedstawiona do recenzji praca Pani mgr inż. Anny Brodzkiej wpisuje się w ten aktualny i nowoczesny nurt, stanowiąc jednocześnie fragment rozległych badań prowadzonych w zespole kierowanym przez Pana profesora Ryszarda Ostaszewskiego i poświęconych zarówno stereoselektywnej syntezie wybranych, na ogół biologicznie aktywnych, związków chiralnych, jak i usprawnianiu metodologii procedur chemoenzymatycznych.

Chiralne, enancjomerycznie czyste lub wzbogacone kwasy karboksylowe, w szczególności te zawierające w cząsteczkach dodatkowe grupy funkcyjne, umożliwiające ich dalsze transformacje, są ważnymi prekursorami i blokami budulcowymi w syntezie

różnorodnych użytecznych substancji biologicznie czynnych. Stosowane do ich syntezy znane metody enzymatyczne opierają się na enancjoselektywnej hydrolizie odpowiednich estrów w warunkach kinetycznego rozdziału racematów. Słabo są natomiast zbadane reakcje enzymatycznej estryfikacji kwasów za pomocą alkoholi, co wynika z kłopotliwej konieczności usuwania tworzącej się w jej efekcie wody, powodującej przebieg niepożądanego reakcji odwrotnej. Pani mgr inż. Anna Brodzka postawiła sobie w swojej pracy ambitny cel ominięcia tej niedogodności na drodze poszukiwania innych donorów grup alkoksylowych. Dodatkowo, postanowiła sprawdzić, czy uda się opracować warunki dynamicznego kinetycznego rozdziału racemicznych kwasów, pozwalającego na znaczne zwiększenie wydajności określonego enancjomeru produktu.

Dysertacja jest stutrzydziestosześcioronicowym opracowaniem, podzielonym formalnie na osiem rozdziałów, uzupełnionym streszczeniem w języku polskim i angielskim, podsumowaniem osiągnięć publikacyjnych oraz wykazem stosowanych skrótów. Poza „Wstępem”, uzasadniającym podjętą tematykę, rozdziały 2 – 5 można potraktować jako część literaturową, chociaż nie została ona w ten sposób wyodrębniona. Rozdziały 2 – 4.1 zawierają informacje o charakterze podstawowym, znane już z podręczników i opracowań przeglądowych. Natomiast rozdziały 4.2 i 4.3 przynoszą interesujący przegląd metod deracemizacji opartych na zastosowaniu metalicznych katalizatorów racemizacji, a rozdział 5 przybliży czytelnikowi wiedzę dotyczącą ważności kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Taki układ staje się zrozumiały przy czytaniu dalszej części pracy, gdyż stanowi niejako wprowadzenie do badań własnych. Rozdziały 2 – 5 opierają się w sumie na 124 odnośnikach literaturowych, w kilku przypadkach składających z więcej niż jednej cytowanej pozycji, przy ogólnej liczbie cytowań w całej dysertacji wynoszącej 194. Zamieszczanie odpowiednich odnośników na stronach, gdzie są one cytowane zasługuje na pochwałę, chociaż z niezrozumiałych powodów ta sama publikacja bywa cytowana kilkakrotnie z innymi numerami (np.: 27 i 51, 71 i 89, 136a, 137 i 138, 127 i 152, 179 i 180). Nie jest to rozwiązanie właściwe, gdyż w sposób sztuczny trochę zawyża liczbę cytowań. Zaskakuje również brak sumarycznego spisu literatury, zwykle umieszczanego na końcu pracy.

Do tej części dysertacji mam kilka drobnych uwag krytycznych:

- Str. 11, Schemat 1 w części dotyczącej syntezy asymetrycznej, w punkcie a) niejasne jest równanie; wydaje się być zbyt uproszczone.
- Str. 12, wiersz 6 od góry: „acylosulfamat” to automatyczne przeniesienie wyrażenia angielskiego; po polsku powinno być „acylosulfaminian”.
- Str. 16, w dolnej części Schematu 4 nukleofilem jest  $\text{H}_2\text{C}^- \text{-NO}_2$ , a nie  $\text{NO}_2^-$ .

- Str. 21, pod równaniami 1,2 i 3: stwierdzenie: „Równanie 3, które opisuje zależność parametru  $E$  jedynie od nadmiarów enancjomerycznych, a nie od konwersji” jest niezupełnie właściwe. Równanie to jest bowiem wynikiem matematycznego przekształcenia równania 1, w którym  $c$  określono na podstawie wzoru  $c = e.e.(S) / e.e.(S) + e.e.(R)$ , w ten sposób unikając bezpośredniego pomiaru *stopnia konwersji* kłopotliwego w przypadku jego granicznych wartości. Stąd, stopień konwersji jest tu również uwzględniony, bo bez tego parametr  $E$  nie miałby sensu.
- Str. 23, Schemat 7 pokazuje mechanizm transestryfikacji, a nie estryfikacji/hydrolizy.
- Str. 42, wiersz 1 i 2 od dołu: niewłaściwe jest stwierdzenie ”chiralność optycznie czynnych alkoholi (...) nie (...) jest zachowana”. Chiralność jest cechą strukturalną i jest zachowana, natomiast obniżona lub utracona może być czystość optyczna lub nadmiar enancjomeryczny.
- Str. 46, wiersz 2 pod Schematem 29, prawidłowa nazwa to: (*R*)-octan 1-fenyletylu.
- Str. 51, Rysunek 7: pokazane strzałki stosuje się dla opisania retrosyntezy, a nie wyniku rzeczywistych przemian chemicznych; lepsze byłyby podwójne równoległe strzałki informujące o kilku przejściach syntetycznych.
- W kilku miejscach niewłaściwa jest numeracja podrozdziałów (np.: 1.1 zamiast 4.1 itp.).

Przechodząc do omówienia najważniejszego rozdziału 6 „Badania własne” chciałbym podkreślić bardzo dużą liczbę eksperymentów przeprowadzonych przez Autorkę. Uzyskane przez Nią rezultaty zostały zaprezentowane w 12 wielopozycyjnych tabelach, którym towarzyszy 8 rysunków (od 9 do 16) i 23 schematy (od 31 do 54) obrazujących w formie graficznej najważniejsze wyniki. Warto podkreślić determinację Autorki, której nie zniechęciła znaczna liczba niezbyt obiecujących wyników badań screeningowych, a która uparcie badała wpływ na reakcje enzymatycznej estryfikacji różnych czynników, co w rezultacie pozwoliło Jej otrzymać spodziewane kwasy w postaci enancjomerycznie czystej. Do najważniejszych osiągnięć pracy należy zaliczyć:

- Opracowanie enzymatycznego rozdziału kinetycznego wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych, polegającego na enzymatycznej estryfikacji racemicznych kwasów, za pomocą nowatorskich donorów grupy alkoksylowej (ortoestry, acetale, ketale i ortowęglany). Optymalizacja tych procedur polegająca na doborze rozpuszczalnika, donora grupy alkoksylowej i enzymu pozwoliła otrzymać odpowiednie estry z

wydajnościami 50% i o nadmiarach enancjomerycznych sięgających 99%. Ich stereospecyficzna hydroliza dała oczekiwane kwasy.

- Opracowanie, nieznanego dotąd w literaturze, procesu dynamicznego kinetycznego rozdziału kwasów 3-arylo-4-pentenowych, polegającego na zastosowaniu kompleksów metali przejściowych jako czynników racemizujących *in situ* substraty w trakcie enzymatycznego rozdziału kinetycznego. Odpowiednia optymalizacja procedur, z uwzględnieniem doboru właściwych kompleksów metali przejściowych, pozwoliła w kilku przypadkach uzyskać produkty z wydajnościami do 99% i o nadmiarach enancjomerycznych powyżej 99%.
- Podjęcie próby wyjaśnienia mechanizmu enzymatycznej estryfikacji kwasów za pomocą niestereotypowych donorów grup alkoksylowych oraz dynamicznego kinetycznego rozdziału z użyciem katalizatorów racemizacji.

Wszystkie syntezy i eksperymenty są skrupulatnie opisane w rozdziale 8 - „Część eksperymentalna” - liczącym 25 stron. Zwraca w niej uwagę, zgodna z regułami pisania publikacji, prezentacja danych spektralnych, w tym danych HPLC. Warto podkreślić dobre i logiczne oznaczenie poszczególnych substratów (dotyczy to zarówno „Badań własnych” jak i „Części eksperymentalnej”) ułatwiające ich identyfikację i śledzenie pracy.

Oceniając uzyskane przez Doktorantkę wyniki należy podkreślić ich oryginalność i dużą wartość merytoryczną. Trzeba również dodać, że opisane w dysertacji rezultaty świadczą o dużej zręczności Autorki w wykonywaniu prac eksperymentalnych oraz o dobrym opanowaniu metod analitycznych, stosowanych w sposób niepozostawiający wątpliwości co do rzetelności przedstawianych danych. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż część wyników stała się przedmiotem 2 publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej i 4 zgłoszeń patentowych (te ostatnie oceniam wyłącznie na podstawie tytułów, nie mając możliwości zapoznania się z ich treścią). O zaangażowaniu i pracowitości Doktorantki świadczy również Jej udział autorski w 4 wartościowych publikacjach i jednym zgłoszeniu patentowym.

Pozytywnie ocenić należy również stronę edytorsko-redakcyjną rozprawy oraz logiczną i jasną prezentację materiału, chociaż przyznam, że wolałbym, aby opis badań własnych był przedstawiony w pierwszej osobie. Dostrzegłem niestety sporo błędów literowych oraz pomyłek w numeracji związków i podrozdziałów. Tych pierwszych nie wymieniam, bo nie mają wpływu na merytoryczną wartość pracy. Natomiast te drugie trochę utrudniają czytanie

(np.: na str. 88 związku **21-26** zamiast **22-27**; Rysunek 10 zamiast 13; na str. 91 związek **24** zamiast **23**; Tabela 9 produkt **34** zamiast **35** itp.).

Korzystając z przywileju recenzenta, pozwolę sobie na kilka uwag krytycznych i próśb o wyjaśnienia.

1. Wydaje mi się, że lepiej brzmi wyrażenie „we wrzącym toluenie”, niż użyte przez Doktorantkę „w gotującym toluenie”; str. 63.
2. Dlaczego nie podjęto próby wyodrębniania nieprzereagowanego kwasu po enzymatycznej estryfikacji? Pozwalałoby to uzyskać drugi enancjomer kwasu i nie prowadziło do utraty połowy substratu.
3. Przedstawiony na Schemacie 44 proponowany mechanizm enzymatycznej estryfikacji kwasów za pomocą ortoestrów itp. wydaje się wysoce prawdopodobny. Jaki zatem byłby mechanizm takiej samej reakcji bez udziału enzymów, która, mimo iż opornie, jednak przebiega?
4. Schemat 48 na str. 97: Jak wytłumaczyć brak racemizacji estru **2** w obecności katalizatorów metalicznych, w tym tu pokazanego związku **27**? Z faktami się nie dyskutuje, ale nie widzę specjalnego powodu, dla którego kompleks  $\pi$ -allilowy tworzyłby się wyłącznie w przypadku kwasu, a nie powstawałby w ogóle w przypadku estru. Jeśli znaczenie miałyby wymiana grupy octanowej w katalizatorze **27**, to jak wytłumaczyć podobne zachowanie pozostałych katalizatorów, w których taka wymiana nie ma miejsca?
5. Str. 107, Tabela 12, poz. 4 i str. 108 wiersz 8 od góry: niespójność w znaku skręcalności związku **45**.
6. Str. 116 i 117: czym się różnią „Procedura ogólna 3” od „Procedury ogólnej 4”?
7. Str. 117, wiersz 1 od dołu: brakuje zaznaczenia, że zastosowano tu jako substrat kwas wzbogacony enancjomerycznie.

W podsumowaniu stwierdzam, że oceniana praca wnosi istotny wkład w rozwój biokatalizy i jej wykorzystania w asymetrycznej syntezie chiralnych związków organicznych. Zapowiadane we „Wstępie” i rozdziale 6.1 „Koncepcja i cel badań” założenia i zamiary dotyczące syntez wybranych enancjomerycznie czystych kwasów 3-arylo-4-pentenowych zostały w dużej mierze z powodzeniem zrealizowane. Przedstawione w recenzji uwagi mające przede wszystkim charakter dyskusyjny, odnoszące się do proponowanych mechanizmów i interpretacji wyników, bądź dotyczące błędów technicznych, nie wpływają na ogólną wysoką

ocenę rozprawy. Uzyskane wyniki oraz sposób ich interpretacji i prezentacji dowodzą dużej wiedzy Autorki w dziedzinie biokatalizy i syntezy organicznej.

W związku z powyższym uważam, że recenzowana praca doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu rozprawom przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (z późniejszymi zmianami) i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Brodzkiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, wielkość przedstawionego materiału doświadczalnego i bardzo dobry sposób jego prezentacji oraz fakt opublikowania rezultatów w dwóch wysoko notowanych czasopismach o cyrkulacji międzynarodowej, wnoszę do Rady Wydziału o przyznanie wyróżnienia Autorce dysertacji, Pani mgr inż. Annie Brodzkiej.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mielbauer', with a long horizontal flourish extending to the right.

Łódź, 1 grudnia 2015 r.