

Prof. dr hab. Waldemar Iwanek  
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach  
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy  
Świętokrzyska 15  
25-406 Kielce

Kielce, 25 listopada 2015 r.

---

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Cataliny Wiśniewskiej

p.t.: „Zastosowanie hydrolaz do reakcji transestryfikacji w rozpuszczalnikach organicznych”

wykonanej w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda Ostaszewskiego

Recenzowana praca wpisuje się w obszar badań nad enzymami i ich wykorzystaniem w syntezie organicznej oraz możliwościami ich aplikacyjnego zastosowania, w jakim od kilku lat lokuje się Zespół XX pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda Ostaszewskiego.

Praca dotyczy ważnego zagadnienia, jakim jest możliwość wykorzystania enzymów z grupy hydrolaz do reakcji estryfikacji, transestryfikacji oraz reakcji hydrolizy estrów. Zagadnienie to ma ogromne znaczenie z punktu widzenia stosowania estrów w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, kosmetycznym, które jednak wymagają nie tylko odpowiedniej czystości chemicznej, ale również enancjomerycznej. Poszukiwanie wydajnych biokatalitycznych metod ich syntezy, które nie są obciążone stosowaniem toksycznych katalizatorów chemicznych, w wielu przypadkach prowadzi do otrzymywania produktów reakcji z dużą wydajnością, enancjoselektywnością, jak również enancjomerycznie czystych.

Z formalnego punktu widzenia, praca zawiera 151 stron, z raczej typowym układem treści, spotykanym w pracach doktorskich, podzielonej na części główne takie jak: wstęp (str. 14 - 15), część literaturową (str. 16-53), badania własne (str. 54-114), wnioski końcowe (str. 115-116), część eksperymentalną (str. 117-143) oraz literaturę (str. 114-151). Należy dodać, że na str. 6 znajdujemy informację, że wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej ukazały się w postaci 4 publikacji, z których 3 w czasopismach zagranicznych o współczynniku oddziaływania (IF) w zakresie od 0.69 do 3.06.

Wprowadzenie literaturowe czytelnika do problemów przedstawionych w pracy doktorskiej następuje w rozdziale drugim, zatytułowanym „Część literaturowa”. Znajdujemy w nim ogólne omówienie katalizy enzymatycznej wraz z przedstawieniem kinetycznego opisu przebiegu reakcji enzymatycznych poprzez model Michaelis-Menten, opis enzymów typu

hydrolaz oraz mechanizm ich działania, omówienie selektywności reakcji enzymatycznych poprzez przybliżenie pojęć takich jak: chemo, regio- stereo- i enancjoselektywność. Na kolejnych stronach tego rozdziału znajdujemy opis na bazie pojedynczych wręcz przykładów literaturowych zagadnienia enzymatycznej enancjoselektywnej reakcji hydrolizy, stereoselektywnej i distereoselektywnej enzymatycznej reakcji estryfikacji. W kolejnym rozdziale tej części pracy Autorka przedstawia podstawy katalizowanych enzymami reakcji tworzenia pierścieni heterokarbocyklicznych wraz z omówieniem reguł Baldwina oraz stereoselektywnymi enzymatycznymi reakcjami laktonizacji i laktamizacji. Dalsza część tego wprowadzenia literaturowego omawia metody chemiczne oraz enzymatyczne syntezy  $\beta$ -ketoestrów z uwzględnieniem ich znaczenia jako produktów pośrednich w syntezie wielu związków naturalnych. Ostatni podrozdział poświęcony jest metodom syntezy i funkcjonalizacji estrów tert-butyłowych kwasów karboksylowych, gdzie przedstawiono zależności między ich strukturą a funkcją centrum aktywnego enzymów takich jak: *Pseudomonas fluorescens*, *Candida antarctica*, *Bacillus subtilis*.

Czytając wstęp literaturowy pozostaje jednak pewien niedosyt. Treści przedstawiane w poszczególnych podrozdziałach są raczej podstawowe i dokumentowane zaledwie 38-oma odnośnikami literaturowymi. Odnoszę wrażenie, że poziom naukowy tej części pracy bardziej byłby odpowiedni dla pracy magisterskiej aniżeli doktorskiej. Już na tym etapie pragnę zauważyć, że praca zawiera bardzo dużo błędów i niedociągnięć np. w postaci niespolszczonych dokładnie nazw związków (np. str. 21, 22), pustych miejsc w zdaniach (np. str. 23), opisy tabel pod, a nie jak to zwykle czynimy nad tabelami, brak odnośników literaturowych w miejscach do tego predysponowanych, wnosząc z omawianego materiału, mało komunikatywne nazwy podrozdziałów w postaci pojedynczych słów (np. diastereoselektywność, enancjoselektywność), brak powoływania się w tekście na konkretny numer rysunku (np. str. 30), nieodpowiednia pisownia słowa  $\beta$ -ketoestry (np. str. 35), brak konsekwencji w pisowni nazw związków (np. raz beta-ketoestry, bataketoestry, innym razem  $\beta$ -ketoestry), niezrozumiałe i niepoprawne nazwy związków (np. str. 37 „kompleksowy cyny”), błędy w legendzie schematów (np. str. 37, schemat 19, nr. związku 38c; schemat 26 podstawnik  $R_3$ ), niestaranność załączonych schematów (np. schemat 20), brak konsekwentnej numeracji związków (np. w tabeli 3, związek 54d) oraz systematycznie prowadzonej numeracji odnośników literaturowych, odniesienia w tekście do numeru rysunku nie zgadzają się z numerem tego rysunku (np. rysunek 12). Również opis prezentowanych w pracy rysunków i tabel jest nieprecyzyjny i nie zawiera właściwej informacji o ich zawartości. Jakość niektórych rysunków powinna być moim zdaniem lepsza (np. rys. 12, 13, 14). Dostrzegłem również niezgodność podpisu pod rysunkiem z jego zawartością (rys. 14, str. 50). Odnoszę wrażenie, że praca była redagowana w ogromnym pośpiechu, stąd też taka masa błędów, do których odniosę się również w następnej części mojej oceny. W bardzo wielu fragmentach pracy autorka operuje pojęciem enancjoselektywność reakcji enzymatycznych, odnosząc się poprzez ten parametr do opisu prowadzonych reakcji z udziałem enzymów. Nie znalazłem w tekście, w jaki sposób liczony był ten parametr, a podrozdział nt. temat jest obecny w części

literaturowej pracy. Bardzo proszę zatem o odniesienie się autorki w trakcie publicznej obrony do tego zagadnienia.

Zasadniczą część pracy stanowią jednak badania własne autorki, przedstawione w rozdziale trzecim. Otwiera go przedstawienie celów badań, wśród których w sposób opisowy znajdujemy:

1. opracowanie nowych metod syntezy estrów, wykorzystujących przede wszystkim reakcje enzymatycznej transestryfikacji;
2. wykorzystanie estrów kwasu acetylooctowego jako nowych substratów dla tej reakcji;
3. wpływ położenia grupy karbonylowej w ketoestrach na wydajność i stereoselektywność enzymatycznych reakcji transestryfikacji;
4. porównanie nowo opracowanych metod ze znanymi metodami enzymatycznych reakcji hydrolizy estrów i estryfikacji alkoholi oraz kwasów karboksylowych.

Postawione cele realizowano poprzez badania nad kinetycznymi rozdzielaniami katalizowanymi wybranymi enzymami następujących związków: estru metylowego kwasu 2-benzyl-2-metylo-3-oksymasłowego, adduktów w reakcji Baylisha-Hillmana, kwasu trans-2-fenylcyklopropano-1-karboksylowego i jego pochodnych, kwasu 3-fenyl-3-metylopropionowego. Zbadano możliwości enzymatycznej reakcji estryfikacji kwasów karboksylowych węglanem dietylu oraz acetylooctanem etylu i jego pochodnymi. Przeprowadzono z powodzeniem reakcję transestryfikacji alkoholi estrami kwasu acetylooctowego wykorzystując mieszaninę enzymów jako efektywny czynnik katalizujący taką reakcję. Zoptymalizowano ilość enzymu katalizującego tę reakcję. Podobnie jak dla alkoholi, zastosowano kombinację enzymów do przeprowadzenia reakcji estryfikacji kwasu fenyl-3-oksooctowego acetylooctanem etylu. Na przykładzie kwasów pirogronowego, lewulinowego, 5-okso-heksanowego, 6-okso-heptanowego oraz ich katalizowanej enzymami reakcji z enancjomerami 1-fenyl-2-etanolu prześledzono wpływ położenia grupy ketonowej w stosunku do grupy estrowej na wydajność reakcji transestryfikacji oraz zaproponowano mechanizm wyjaśniający zaobserwowane fakty. Niewątpliwą zaletą tej części pracy jest zwięzłe, syntetycznie przedstawione podsumowanie każdego z podrozdziałów.

Zapoznając się z materiałem doświadczalnym recenzowanej pracy należy zwrócić uwagę na ogrom pracy eksperymentalnej, jaką musiała wykonać Doktorantka, realizując zamierzone cele. Duża ilość przeprowadzanych reakcji, wielokrotnie wykonywanie wstępnych badań skryningowych enzymów, synteza substratów oraz ich oczyszczanie poprzez chromatografię kolumnową, bardzo duża ilość przeprowadzanych rozdzielan chromatograficznych z użyciem techniki HPLC i GC pozwalają sądzić o zdobyciu dużego doświadczenia eksperymentalnego w prowadzeniu i analizie reakcji biokatalitycznych. Podobnie jednak jak w części literaturowej można znaleźć dość dużą liczbę błędów i niedociągnięć. Zwróć uwagę tylko na niektóre z nich: indeksy przy podstawnikach w złym miejscu (str. 55, schemat 31), oznaczenia literowe enzymów napisane są w tekście małą literą, natomiast w tabeli 4 (str.57), odnoszącej się do tekstu literą dużą, brak przyporządkowania konfiguracji absolutnych wg. reguł CIP do centrów

stereogenicznych związków na schemacie 33 (str. 58) i w kilku innych miejscach, błąd w nazwisku typu reakcji Baylisa-Hillmana (str. 60), brak przyporządkowania na schemacie 35 (str. 61) numerów związków i jak poprzednio brak przyporządkowania konfiguracji absolutnych do centrów stereogenicznych i ..... wiele, wiele innych. Szczegółowe wymienianie ich zabrałoby zbyt dużo miejsca w prezentowanej opinii.

Mam również zastrzeżenia co do rzetelności opisu części eksperymentalnej pracy. W większości przypadków przy oznaczaniu nadmiarów enancjomerycznych nie przyporządkowano czasu retencji do określonego enancjomeru, co budzi moje mieszane uczucia w zakresie przedstawienia i użyteczności tych danych do analizy otrzymanych wyników. Dane spektroskopowe dla kilku związków są niepełne (np. 110c, str. 138; 118c i 120c str.139), a w przypadku diastereoizomerów nr. 63 i 64 (str. 119) dane spektroskopowe je opisujące są wręcz takie same. Dla zaledwie kilku związków, do ich opisu spektroskopowego dołączone są dane ze spektrometrii mas. Mimo wszystko bardzo proszę Autorkę o komentarz w sprawie tak dużej ilości błędów pojawiających się pracy.

Analizując przedstawione badania własne oraz materiał doświadczalny je dokumentujący stwierdzam, że stawiane sobie cele Doktorantka całkowicie zrealizowała. Do najważniejszych osiągnięć Jej pracy doktorskiej zaliczam:

- opracowanie metodyki reakcji transestryfikacji kwasów karboksylowych z użyciem węgla dietylu;
- wykazanie efektu synergii mieszaniny enzymów w reakcji transestryfikacji  $\beta$ -ketoestrów z wybranymi alkoholami. Metoda ta pozwala otrzymać związki z wysokimi wydajnościami a ponadto jest przyjazna środowisku;
- zaobserwowanie silnego wpływu stężenia acetonu jako rozpuszczalnika na enancjoselektywność reakcji hydrolizy kwasu 2-fenilo-cyklopropano-1-karboksylowego. W tym punkcie proszę Doktorantkę o skomentowanie tego wyniku między innymi poprzez informację, na ile jest to wynik jednorazowego pomiaru wraz z możliwością popełnienia błędu a na ile stwierdzony na podstawie udokumentowanych statystycznie prób.

Biorąc pod uwagę z jednej strony nieco rozczarowujący wstęp literaturowy oraz dużą ilość niedociągnięć i błędów pojawiających się w przedkładanej pracy doktorskiej, z drugiej zaś ogrom włożonej pracy w jej realizację, osiągnięcie zamierzonych celów oraz obiektywne uznanie wyników naukowych przez niezależnych recenzentów opublikowanych z tego zakresu prac stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Cataliny Wiśniewskiej spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Rozporządzenia MNiSW z dnia 22 września 2011 roku i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Cataliny Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Waldemar Iwanek

