



Wrocław, 05.10.2017

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Natalii Kmieciak zatytułowanej  
„Otrzymywanie chiralnych pochodnych fosfonianów metodami biokatalitycznymi”**

Praca doktorska Pani mgr inż. Natalii Kmieciak została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Żymańczyk-Dudy, prof. PWr.

Przedstawiona do oceny praca jest kontynuacją wieloletnich badań naukowych prowadzonych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej i wpisuje się w nurt badań związanych z syntezą oraz mikrobiologicznymi przekształceniami fosfonianów. Stanowiące przedmiot badań aminofosfoniany posiadają zróżnicowaną aktywność biologiczną (przeciwbakteryjną, antywirusową, przeciwnowotworową, neuroaktywną), która czyni je związkami o wysokim potencjale aplikacyjnym. Zatem badania ukierunkowane na uzyskiwanie nowych, zróżnicowanych strukturalnie pochodnych o wysokiej czystości optycznej jest jak najbardziej uzasadnione.

Celem swoich badań Autorka uczyniła wyselekcjonowanie oraz określenie aktywności grzybów nitkowatych zawierających układy enzymatyczne prowadzące do otrzymania chiralnych związków fosforoorganicznych. W obszarze dociekań badawczych Autorki znalazło się określenie możliwych ścieżek przebiegu procesu biotransformacji kwasów  $\alpha$ -aminofosfonowych wraz z optymalizacją, opracowaniem technik rozdziału, oczyszczania i identyfikacji produktów. Na podkreślenie zasługuje podjęcie próby określenia możliwości przeniesienia procesu biotransformacji aminofosfonianów ze skali laboratoryjnej na większą skalę, stanowiące o możliwym charakterze aplikacyjnym pracy.

Badania były współfinansowane ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego z projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” (POIG 01.03.01-00-158/09).



Przedstawiona do oceny dysertacja jest opracowaniem naukowym liczącym 156 stron zaopatrzoną w 17 tabel, 74 rysunki oraz 156 pozycji piśmiennictwa. Rozprawa została podzielona na 7 rozdziałów obejmujących: streszczenie, wstęp teoretyczny, cel pracy, badania własne, podsumowanie, materiały i metody oraz literaturę. Strukturę pracy wzbogaca wykaz stosowanych skrótów i symboli oraz najważniejszych związków wykorzystanych w badaniach własnych. Dołączony do dysertacji odrębny, zalaminowany wykaz struktur objętych badaniami stanowił pomocne narzędzie w analizowaniu wyników badań.

Wprowadzeniem do opisu zrealizowanych badań jest 34-stronnicowy „Wstęp teoretyczny” poprzedzony „Streszczeniem”. W syntetycznie napisanym, dwustronicowym „Streszczeniu” Doktorantka przedstawiła oprócz przesłanek do podjęcia badań, najistotniejsze wyniki swojej pracy. „Wstęp teoretyczny” został podzielony na dwie główne części. Pierwsza część zatytułowana „Proces biokatalizy” zawiera metodologię prowadzenia procesów biotransformacji, przykłady biotransformacji prowadzonych z udziałem grzybów nitkowatych oraz drożdży, przykłady biotransformacji  $\alpha$ -aminofosfonianów oraz charakterystykę i otrzymywanie chiralnych kwasów  $\alpha$ -hydroksyfosfonowych na drodze biokatalizy. Druga część charakteryzuje grzyby z rodzaju *Penicillium* oraz *Fusarium* pod kątem ich przydatności w procesach biokatalizy. Wstęp teoretyczny, zdaniem recenzentki, mógłby zostać wzbogacony o informacje dotyczące właściwości oraz szerokiego spektrum wykorzystania fosfonianów, kosztem opisu ogólnej metodologii prowadzenia procesów biotransformacji (str. 23-27). Odpowiednio przedstawioną metodologię prowadzenia procesów biotransformacji czytelnik odnajduje w opisie badań własnych oraz w rozdziale „Materiały i metody”. Zbędne, wydają się być zbyt szczegółowe opisy biotransformacji ksenobiotycznych substratów innych niż fosfoniany, dotyczące redukcji acetofenonu i jego pochodnych, redukcji karwonu czy hydrolizy wiązania epoksydowego w mieszaninie racemicznej benzyloksymetylooksiranu. Ten fragment pracy można byłoby zastąpić znanymi w literaturze przykładami biokatalitycznej redukcji ketofosfonianów czy hydrolizy epoksyfosfonianów, które to bezpośrednio korelowałyby z dalszą częścią pracy. Pozostała część „Wstępu teoretycznego” ściśle koresponduje z tematyką badawczą. Generalnie rozdział ten napisany jest ciekawie i wskazuje na dobrą orientację



Doktorantki w omawianym temacie, można w nim jednak odnaleźć kilka nieścisłości, które z obowiązku recenzentki wymieniam poniżej:

- Strona 30 (wers 7) – nazwa związku oznaczonego numerem 8 powinna brzmieć – (1*R*,2*R*,5*S*)-5-izopropenylo-2-metylocykloheksanol, a nie jak czytamy w pracy 1*R*,2*R*,4*S*-6-metylo-3-izopropylheksanol.
- Podpis po rysunkiem 5 zamiast „Stereoselektywny proces **biooksydacji** benzoiny...” powinien brzmieć – „Kinetyczny rozdział mieszaniny racemicznej benzoiny” (rysunek 5 nie przedstawia procesu utleniania).
- Strona 35 (wers 3) – zdanie „.....aminokwasów aromatycznych, które są **składnikiem** antocyjanów, flawonoidów...”, zawiera spore uproszczenie, ponieważ biosynteza pierścieni A i B flawonoidów zachodzi w dwóch szlakach - octanowym (A) i szikimowym (B). Pierścień A powstaje z trzech cząsteczek malonylo-CoA uzyskanych z przemian glukozy. Pierścień B jest utworzony z 4-kumaroilo-CoA, który powstaje w szlaku szikimowym z fenyloalaniny. Kondensacja pierścienia A i B prowadzi do powstania chalkonu, który z udziałem izomerazy ulega cyklizacji do flawanonu.
- Rysunek 9 powinien być wykonany bardziej precyzyjnie w kwestii połączeń między atomami C-P (struktura 15,16 i 18), P-O (struktura 17 i 19) oraz C-N (struktura 15-19).
- Strona 52 (wers 17) słowo „flawonu” powinno być zastąpione słowem „flawanonu”.
- Strona 52 (wers 18) zdanie „**Kolejna** reakcja hydroksylacji prowadzi do rozszczepienia wiązania.....” powinno być zmienione, ponieważ w opisywanej reakcji obserwujemy w pierwszym etapie hydroksylację w pozycję 4' pierścienia B układu flawanonu i następujące po niej otwarcie heterocyklicznego pierścienia C, przez co powstaje karbokation benzylowy o wysokiej trwałości. Następnie jeden z atomów wodoru ściągany jest przez wolną parę elektronową atomu tlenu, dając strukturę chalkonu, który w reakcji redukcji enzymatycznej przekształca się w dihydrochalkon (zatem nie ma tu drugiej reakcji hydroksylacji).
- W podpisie pod rysunkiem 23 słowo „flawonu” powinno być zmienione na słowo „flawanonu”.

Cel pracy został jasno sformułowany, a przedstawiona koncepcja rozwiązania problemu badawczego jest klarowna.



Rozdział zatytułowany „Badania własne” odzwierciedla duży wkład pracy, jaki Doktorantka włożyła w realizację zaplanowanych badań i pokazuje ich interdyscyplinarny charakter. Rozpoczyna go opis syntez trzech kwasów  $\alpha$ -aminofosfonowych: kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego, kwasu 1-aminofenylometanofosfonowego, kwasu 1-amino-2-metylobutanofosfonowego oraz fosfonianu zawierającego w swojej strukturze pierścień  $\beta$ -laktamowy – *O,O*-dimetylo-4-oksoazetyldyno-2-ylfosfonianu. W/w związki pełniły rolę substratów w procesach biokonwersji opisanych szczegółowo w dalszej części pracy. Pułę substratów wykorzystanych w procesach biotransformacji wzbogaciły cztery heterocykliczne aminofosfoniany uzyskane w ramach współpracy z dr hab. Tomaszem Olszewskim z Zakładu Chemii Organicznej Politechniki Wrocławskiej oraz trzy fenylowe pochodne związków fosforoorganicznych uzyskane dzięki współpracy z mgr inż. Patrycją Miszczyk z Zakładu Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej.

Autorka, będąc biotechnologiem sprawnie porusza się w obszarze syntezy organicznej. Udowadnia to umiejętnym planowaniem i wykonaniem kolejnych syntez kwasów  $\alpha$ -hydroksyfosfonowych oraz fosfonowych pochodnych kwasu asparaginowego, które miały stanowić wzorce produktów w procesach biotransformacji. Trudności w tym wątku badawczym napotyka jedynie w syntezie ketofosfonianów i wynikają one z niskiej stabilności tych związków. Dzięki temu proces biotransformacji dodatkowo zyskuje na znaczeniu, ponieważ pozwala na uzyskanie stabilnych fosfonowych ketokwasów. Należy podkreślić, iż uzyskane wyniki są odpowiednio udokumentowane i jednoznaczne, a interpretacja poszczególnych typów widm  $^{31}\text{P}$  NMR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR związków pośrednich jak i produktów końcowych poszczególnych przemian, jest wykonana skrupulatnie, co świadczy o biegłości Doktorantki w tej materii.

Sporym osiągnięciem Pani mgr inż. Natalii Kmieciak, uwieńczonym publikacją w czasopiśmie „Spectroscopy”, było opracowanie metody pozwalającej na określenie składu enancjomerycznego związków fosforoorganicznych uzyskanych w wyniku syntezy i biotransformacji, z wykorzystaniem spektroskopii  $^{31}\text{P}$  NMR z dodatkiem  $\alpha$ -cyklodekstryny jako chiralnego dyskryminatora. Stałą wartość stanowiło stężenie badanego substratu (10mM) oraz stężenie  $\alpha$ -cyklodekstryny (100mM). W analizowanych próbach manipulowano wartościami pH



roztworów kwasów aminofosfonowych oraz hydroksyfosfonowych. Należy dodać, iż analizowane pochodne fosfonianów należą do trudnych eksperymentalnie związków ze względu na ich zróżnicowaną rozpuszczalność, budowę oraz obecność w niektórych przypadkach dwóch centrów stereogenicznych.

Druga część rozdziału „Badania własne” dotyczy wykorzystania metod transformacji mikrobiologicznych do otrzymywania chiralnych związków fosforoorganicznych. Tu Autorka porusza się według określonej (bardzo czytelnej sekwencji). Z osobna dla każdego użytego w biotransformacjach substratu omawia: przeprowadzoną standardową procedurę biotransformacji, optymalizację procesu biotransformacji, podsumowanie wyników, identyfikację produktów otrzymanych w procesie biotransformacji oraz zwiększenie skali procesu.

Jednym z najważniejszych osiągnięć tej części badań jest potwierdzenie przez Doktorantkę hipotezy określającej ścieżkę przebiegu procesu biotransformacji chiralnych kwasów aminofosfonowych: utlenianie kwasu aminofosfonowego do ketofosfonianu, a następnie redukcja do odpowiedniego hydroksykwasu.

Wybrany przez Doktorantkę na podstawie badań selekcyjnych szczep *Penicillium funiculosum* okazał się najlepszym biokatalizatorem w biotransformacjach alifatycznych  $\alpha$ -aminofosfonianów. W pierwszym etapie katalizował proces oksydatywnej deaminacji odpowiedniego  $\alpha$ -aminofosfonianu do prochiralnego ketofosfonianu, a następnie reakcję redukcji w wyniku, której powstawał analog strukturalny kwasu  $\alpha$ -hydroksyfosfonowego. Taką samą ścieżkę przemian Doktorantka zaobserwowała w przypadku transformacji aromatycznego kwasu 1-amino-2-metylopirydynofosfonowego. Ze względu na brak selektywności procesu wprowadzała do mieszaniny biotransformacyjnej katalityczne ilości ketonu metylopropylowego lub pirogronianu sodu, które stanowiły element cyklu regeneracji kofaktorów wymaganych przez enzymy z klasy oksydoreduktaz. Zabieg ten spowodował w przypadku dodania pirogronianu sodu podniesienie stopnia przereagowania kwasu 1-amino-2-metylopirydynofosfonowego z 34% do 70%. Selektywność zachodzącej reakcji Doktorantka uzyskała poprzez zmianę sposobu prowadzenia procesu biokonwersji z reakcji okresowej na proces ciągły, dzięki której udało się uzyskać optycznie czysty kwas (*S*)-1-amino-2-metylopirydynofosfonowy.



Kolejnym istotnym osiągnięciem Doktorantki było przeprowadzenie hydrolytycznego kinetycznego rozdziału mieszaniny racemicznej *O,O*-dimetylo-4-oksoazetydino-2-ylofosfonianu, który prowadził do otrzymania czystego optycznie *O*-metylo-4-oksoazetydino-2-ylofosfonianu w enancjokonwergentnej reakcji.

Precyzyjna analiza wyników badań nie byłaby możliwa bez opracowanej przez Doktorantkę skutecznej, szybkiej oraz taniej metody izolowania produktów biotransformacji.

Mimo ogólnie bardzo pozytywnego wrażenia, co do uzyskanych wyników i ich prezentacji, pozwałam sobie mieć kilka pytań i uwag do tej części pracy. Wymieniam je poniżej.

- Strona 62 (podpis pod rysunkiem 35) zamiast „...przesunięcie chemiczne pochodzące od kwasu.....”, powinno być „...przesunięcie chemiczne sygnałów pochodzących od jąder fosforu grupy fosforylowej na widmach  $^{31}\text{P}$  NMR ...”.
- Strona 73 (wers 4 i 5) – należy wprowadzić zmiany zgodnie z powyższą sugestią
- Nazwa związku **69** pojawiająca się w pracy dwojako: *O,O*-dimetylo-4-oksoazetid-2-ylofosfonian (str. 58, 147) lub *O,O*-dimetylo-4-oksoazetidino-2-ylofosfonian (str. 103) powinna być ujednolicona oraz poprawiona na *O,O*-dimetylo-4-oksoazetydino-2-ylofosfonian.
- Strona 76 (wers 3) – powinno być „(Materiały i metody, podrozdział 6.3.2)”, a nie 6.2.4.
- Strona 85 (wers 33) – powinno być „(Materiały i metody, podrozdział 6.3.1)”, a nie 6.2.3.
- Strona 87 (wers 22-23) - Proszę o wyjaśnienie, z czego wynikają różnice w wartościach przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od jąder fosforu na widmach  $^{31}\text{P}$  NMR kwasu 1-okso-2-metylopropanofosfonowego **79** ( $\delta = -2,55$  ppm) oraz kwasu 1-hydroksy-2-metylopropanofosfonowego **73** ( $\delta = 24,04$  ppm) w porównaniu do wartości przesunięć chemicznych tychże związków przedstawionych na rysunku 52.
- Proszę o wyjaśnienie czy w trakcie biotransformacji kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego **21** prowadzonej w kulturze szczepu *P. feniculosum* oznaczany był nadmiar enancjomeryczny nieprzereagowanego aminofosfonianu (strona 88).



- Nazwa rodzajowa i gatunkowa szczepu w pełnym brzmieniu powinna być podana tylko w przypadku pierwszego użycia w tekście. Dalej należy posługiwać się formą skróconą.
- Strona 92 (wers 27) – Zdanie „...wykonano widmo IR (1674 cm<sup>-1</sup>), które potwierdziło otrzymanie kwasu 1-okso-2-metylopropanofosfonowego **79**...”, powinno być napisane precyzyjnie i brzmieć „...obecność pasma absorpcji (1674 cm<sup>-1</sup>) na widmie IR potwierdziło **obecność grupy karbonylowej** w strukturze związku **79**...”.
- Strona 95 (wers 20), strona 96 (wers 21 i 28), strona 98 (wers 4 i 6) – Kwas 1-aminofenylometanofosfonowy (Phg<sup>P</sup>) powinien być oznaczony **22**, a nie **23** jak czytamy w tekście.
- Strona 98 (wers 4) – nazwa związku powinna brzmieć kwas 1-aminofenylometanofosfonowy, a nie kwas 1-fenylometanofosfonowy.
- Proszę o wyjaśnienie, dlaczego na stronie 68 (wers 6) czytamy, iż dla związków **69** i **22** nie udało się dobrać odpowiedniej metodyki uwidocznienia i rozdzielenia sygnałów pochodzących od enancjomerów na widmie <sup>31</sup>P NMR, a za przyczynę upatruje się niedopasowanie tych związków do wnęki α-cyklodekstryny, podczas gdy na stronie 99 (wers 22) czytamy, że w przypadku fosfonowego analogu strukturalnego Phg<sup>P</sup> **22** rozdział enancjomerów widoczny na widmie <sup>31</sup>P NMR uzyskano w środowisku kwaśnym (pH ≈ 2).
- Strona 103 (wers 20 i 26), strona 105 (tabela 10) – *O,O*-dimetylo-4-oksoazetydino-2-ylofosfonian powinien być oznaczony **69**, a nie **68**.
- Strona 106 (wers 16) – W zdaniu „W warunkach kontrolnych (bez biokatalizatora) substrat wyjściowy .....pozostaje stabilny...”, należałoby usunąć słowo „wyjściowy”.
- Sporym sukcesem był rozdział mieszaniny racemicznej *O,O*-dimetylo-4-oksoazetydino-2-ylofosfonianu **69** zachodzący według mechanizmu enancjokonwergentnego w wyniku którego otrzymano czysty optycznie *O*-metylo-4-oksoazetydino-2-ylofosfonian **86**. Czy została podjęta próba oznaczenia konfiguracji absolutnej tego związku?
- Strona 134 i 136 – Brak jest dokładności w opisie widm <sup>1</sup>H NMR kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego **21**, kwasu 1-amino-2-metylobutanofosfonowego **59** oraz kwasu 1-



hydroksy-2-metylobutanofosfonowego **74** (nieprecyzyjnie zostały wskazane atomy, od których pochodzą poszczególne sygnały), ponadto w opisie widma  $^1\text{H}$  NMR związku **21** brakuje wartości drugich stałych sprzężenia w sygnałach będących dd.

- Strona 138 (wers 16) – W opisanej reakcji hydrolizy wykorzystano 5 mmoli *O,O*-dimetylo-4-oksoazetydino-2-ylofosfonianu **69**, a nie jak podano w tekście 4-oksoazetydino-2-ylofosfonianu **68**.
- Strona 146 (wers 3) – Opis procesu permeabilizacji znajduje się w podrozdziale 6.3.2, a nie 6.2.4, jak wskazano w pracy.

Sygnalizowane w recenzji sugestie, niedociągnięcia czy drobne pomyłki nie wpływają na wartość i pozytywny odbiór pracy. Oceniając wyniki uzyskane przez Doktorantkę należy podkreślić ich wartość merytoryczną, czego dowodem może być fakt, iż część z nich stała się przedmiotem dwóch opracowań zamieszczonych w czasopismach z listy filadelfijskiej ze znaczącym współczynnikiem oddziaływań (trzecie opracowanie jest aktualnie recenzowane). Doktorantka jest współautorką czterech innych publikacji oraz dwunastu prezentacji konferencyjnych. Przedstawione w dysertacji rezultaty świadczą o samodzielności i zręczności Autorki w wykonywaniu często niełatwych prac eksperymentalnych oraz dobrym opanowaniu metod syntezy chemicznej oraz biotransformacji.

W związku z powyższym uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszelkie wymagania i warunki ujęte w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 roku i niniejszym występuję z wnioskiem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Natalii Kmieciak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*E. Kostrzewa-Susłowa*

dr hab. inż. Edyta Kostrzewa-Susłowa, prof. nadzw.