

**Załącznik 3** do wniosku

o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

# AUTOREFERAT

Biokatalityczne otrzymywanie hydroksyfosfinianów  
i hydroksyfosfonianów z zastosowaniem lipaz i całych komórek  
bakterii o właściwościach lipolitycznych oraz określanie  
konfiguracji absolutnej powstałych produktów

**dr Paulina Majewska**

Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Wydział Chemiczny

Politechnika Wrocławska

Wrocław 2021

## Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne .....	2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych .....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego .....	4
4.2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych .....	4
4.3. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	8
4.4. Omówienie wyników badań.....	12
4.5. Podsumowanie .....	33
4.6. Plany badawcze .....	33
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.36	
5.1. Cyklolinopeptydy .....	36
5.2. Biotransformacje hydroksyfosfinianów z dwoma centrami stereogenicznymi (prace niewchodzące w skład osiągnięcia opisanego w punkcie 4).....	36
5.3. Modyfikowane polimery dekstranu .....	37
5.4. Biokataliza hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów (prace niewchodzące w skład osiągnięcia opisanego w punkcie 4) oraz aminofosfonianów .....	39
5.5. Biokatalityczne otrzymywanie antyoksydantów .....	41
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę .....	42
6.1. Działalność dydaktyczna .....	42
6.2. Działalność organizacyjna.....	43
6.3. Działalność popularyzująca naukę .....	43
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej .....	44

## 1. Imię i nazwisko

---

**Paulina Majewska**

ORCID: 0000-0003-0388-7180

Researcher ID: AAL-5614-2020

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne

---

(Z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.)

***Doktor Nauk chemicznych w dyscyplinie chemia***, 30.05.2007, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska

Rozprawa doktorska: „Biotransformacje hydroksyfosfinianow z asymetrycznym atomem fosforu”

Promotor: prof. dr hab. Barbara Lejczak

Recenzenci: prof. dr hab. Kazimierz Michał Pietrusiewicz (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie)

prof. dr hab. Tadeusz Gajda (Politechnika Łódzka)

***Magister chemii***, 02.07.2001, Wydział Chemii, Uniwersytet Wroclawski

Kierunek: Chemia

Specjalność: Chemia środowiska

Praca magisterska: „Izolacja i badanie cyklicznych peptydów z lnu austriackiego”

Promotor: prof. dr hab. Ignacy Z. Siemion

Opiekun: dr Bolesław Picur

### 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

---

01.01.2020 – obecnie      **Adiunkt naukowo-dydaktyczny**, Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska

01.10.2011 – 31.12.2019      **Adiunkt naukowo-dydaktyczny**, Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska

03.03.2008 – 30.09.2011      **Asystent naukowo-dydaktyczny**, Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska

Urlop macierzyński: 23.02.2011 – 26.07.2011

01.02.2007 – 31.01.2008      **Staż podoktorski**, Département de Chimie Bioorganique, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Illkirch Graffenstaden, France (Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Louisa Pasteura, Illkirch Graffenstaden, Francja).

#### 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.)

---

(Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.)

##### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

*Biokatalityczne otrzymywanie hydroksyfosfinianów i hydroksyfosfonianów z zastosowaniem lipaz i całych komórek bakterii o właściwościach lipolitycznych oraz określanie konfiguracji absolutnej powstałych produktów*

##### 4.2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych

Zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt 2b Ustawy - Prawo o szkolnictwie Wyższym (Dz. U. 2018 poz. 1668) oraz zgodnie z art. 179 ust. 6 pkt 2a i 2b Ustawy z dnia 3 lipca 2018 - Przepisy wprowadzające Ustawę (Dz. U. 2018 poz. 1669, z późn. zm.) wraz z określeniem indywidualnego merytorycznego wkładu w ich powstanie.

H1 **Majewska P.\***, Doscocz M., Lejczak B., Kafarski P.; Enzymatic resolution of  $\alpha$ -hydroxyphosphinates with two stereogenic centers and determination of absolute configuration of obtained stereoisomers; *Tetrahedron: Asymmetry*; 20 (2009) 1568-1574.

IF: **2,625**; liczba cytowań: **13**; MNiSW: **25**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich doświadczeń poza zastosowaniem technik chemii teoretycznej (badania obliczeniowe),
- analizie i interpretacji wszystkich doświadczeń opisanych w manuskrypcie,
- napisaniu rozdziałów manuskryptu poza rozdziałami 2.4 i 3.6.
- udziale w redagowaniu manuskryptu.

H2 **Majewska P.\***, Kafarski P., Lejczak B.; Enzymatic resolution of ethyl  $\alpha$ -hydroxyphosphinates in a modified reaction environment; *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*; 185 (2010) 1915-1920.

IF: **0,621**; liczba cytowań: **5**; MNiSW: **15**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- a) zaplanowaniu, wykonaniu, analizie i interpretacji wszystkich doświadczeń,
- b) udziale w napisaniu i redagowaniu manuskryptu.

H3 Malinowska B.\*, **Majewska P.**, Szatkowski P., Kafarski P., Lejczak B.; Kinetic resolution of ( $\pm$ )-diethyl- and dibenzyl hydroxy(phenyl)methanephosphonates and their acyl derivatives with lipases; *Biocatalysis and Biotransformation*; 29 (2011) 271-277.

IF: **0,905**; liczba cytowań: **2**; MNiSW: **15**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- a) udziale w planowaniu koncepcji pracy,
- b) zaplanowaniu, analizie i interpretacji doświadczeń związanych z mikrobiologiczną hydrolizą,
- c) udział w planowaniu, analizie i interpretacji pozostałych doświadczeń,
- d) wykonaniu doświadczeń związanych z mikrobiologiczną hydrolizą, poza kilkoma doświadczeniami, które wykonał mgr. inż. Paweł Szatkowski, gdy byłam na urlopie macierzyńskim,
- e) udziale w planowaniu i wykonaniu syntez oraz określaniu konfiguracji absolutnej związków opisanych w manuskrypcie,
- f) napisaniu rozdziałów manuskryptu dotyczących mikrobiologicznej hydrolizy, udziale w napisaniu rozdziałów dotyczących syntezy i określania konfiguracji absolutnej związków opisanych w manuskrypcie, udziale w napisaniu rozdziałów dotyczących materiałów i metod oraz wniosków,
- g) udziale w redagowaniu manuskryptu.

H4 Szyszkowiak J., **Majewska P.\***; Microbial biotransformation of two phosphonoacetic acid derivatives bearing two stereomeric centres; *BioTechnologia*; 94 (2013) 425-431

IF: -; liczba cytowań: -; MNiSW: **13**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- a) zaplanowaniu koncepcji pracy,
- b) zaplanowaniu wszystkich doświadczeń,
- c) wykonaniu większości doświadczeń, poza doświadczeniami związanymi z hydrolizą za pomocą szczepu *Bacillus subtilis*.
- d) analizie i interpretacji wszystkich doświadczeń opisanych w manuskrypcie,
- e) napisaniu większości rozdziałów manuskryptu.
- f) redagowaniu manuskryptu.

H5 Szyszkowiak J., **Majewska P.\***; Determination of absolute configuration by  $^{31}\text{P}$  NMR; *Tetrahedron: Asymmetry*; 25 (2014) 103-112

IF: **2,155**; liczba cytowań: **5**; MNiSW: **25**;

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- a) zaplanowaniu koncepcji pracy,
- b) wyszukaniu części literatury,
- c) wyborze całej literatury uwzględnionej w artykule,
- d) udziale w napisaniu manuskryptu,
- e) redagowaniu manuskryptu.

H6 **Majewska P.\***; Biotransformations of 2-hydroxy-2-(ethoxyphenylphosphinyl)acetic acid and the determination of the absolute configuration of all isomers; *Bioorganic Chemistry*; 61 (2015) 28-35

IF: **2,252**; liczba cytowań: **2**; MNiSW: **25**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- a) zaplanowaniu, wykonaniu, analizie i interpretacji wszystkich doświadczeń,
- b) napisaniu i redagowaniu manuskryptu.

H7 **Majewska P.\***, Serafin M., Klimek-Ochab M., Brzezińska-Rodak M., Żymańczyk-Duda E.; Lipases and whole cell biotransformations of 2-hydroxy-2-(ethoxyphenylphosphinyl)acetic acid and its ester; *Bioorganic Chemistry* 66 (2016) 21-26

IF: **3,231**; liczba cytowań: **6**; MNiSW: **25**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- a) udziale w planowaniu koncepcji pracy,
- b) zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń związanych z enzymatyczną hydrolizą i acylacją,
- c) zaplanowaniu i wykonaniu syntez związków opisanych w manuskrypcie,
- d) analizie i interpretacji doświadczeń związanych z enzymatyczną hydrolizą i acylacją oraz określaniem konfiguracji absolutnej związków opisanych w manuskrypcie.
- e) napisaniu rozdziałów manuskryptu związanych z enzymatyczną hydrolizą i acylacją oraz rozdziałów dotyczących syntezy i określania konfiguracji absolutnej związków opisanych w manuskrypcie,
- f) udział w redagowaniu manuskryptu.

H8 **Majewska P.\***; Whole-cell biotransformation of diethyl 1-hydroxy-1-phenylmethanephosphonate in a modified reaction environment; *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*; 192 (2017) 418-421

IF: **0,674**; liczba cytowań: **1**; MNiSW: **15**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- a) zaplanowaniu, wykonaniu, analizie i interpretacji wszystkich doświadczeń,
- b) napisaniu i redagowaniu manuskryptu.

H9 **Majewska P.\***; The new way to synthesize ethyl 1-butyryloxy-1-phenylmethane(P-phenyl)phosphinate and whole-cell biocatalysis by *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*; *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*; 194 (2019) 1048-1053.

IF: **1,046**; liczba cytowań: -; MEiN: **40**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- a) zaplanowaniu, wykonaniu, analizie i interpretacji wszystkich doświadczeń,
- b) napisaniu i redagowaniu manuskryptu.

H10 **Majewska P.\***; Biocatalytic hydrolysis of diethyl 1-butyryloxy-1-carboxymethylphosphonate and determination of the absolute configuration of obtained products; *Journal of Molecular Structure*; 1225 (2021) 129084

IF: **3,196**; liczba cytowań: -; MEiN: **70**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- a) zaplanowaniu, wykonaniu, analizie i interpretacji wszystkich doświadczeń,
- b) napisaniu i redagowaniu manuskryptu.

H11 **Majewska P.\***; Lipase-catalyzed kinetic resolution of dimethyl and dibutyl 1-butyryloxy-1-carboxymethylphosphonates; *Catalysts*, 11 (2021) 956

IF: **4,146**; liczba cytowań: -; MEiN: **100**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

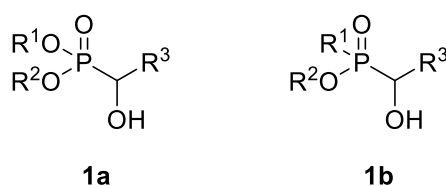
- a) zaplanowaniu, wykonaniu, analizie i interpretacji wszystkich doświadczeń,
- b) napisaniu i redagowaniu manuskryptu.

\* autor korespondencyjny



#### 4.3. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Hydroksyfosfoniany **1a** i hydroksyfosfiniany **1b** zawierają w swojej strukturze stabilne, kowalencyjne wiązanie C-P, które tylko w nielicznych przypadkach ulega fotolizie,<sup>1</sup> chemicznej hydrolizie czy rozpadowi termicznemu,<sup>2</sup> oraz ważne z punktu widzenia aktywności biologicznych ugrupowanie hydroksylowe (Rysunek 1).



Rysunek 1. Hydroksyfosfoniany **1a** i hydroksyfosfiniany **1b**.

Dzięki strukturalnemu podobieństwu do naturalnych hydroksykwasów wykazują inhibicję receptorów oddziałujących z tymi substratami.<sup>3</sup> Do hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów należą między innymi związki będące potencjalnymi lekami na nadciśnienie (Rysunek 2a).<sup>4,5</sup> Są one inhibitorami ludzkiej reniny – enzymu katalizującego przekształcenie angiotensynogenu do angiotensyny I. Jest to początkowy etap działania układu renina-angiotensyna-aldosteron kontrolującego ciśnienie tętnicze. Innym przykładem jest związek (Rysunek 2b) będący inhibitorem tyrozynowej fosfatazy CD-45, należącej do rodziny białkowych fosfataz tyrozynowych (PTP).<sup>6</sup> Enzym ten jest odpowiedzialny za regulację aktywacji komórek i proliferację komórek macierzystych krwi. Wśród hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów możemy znaleźć również związki wykazujące aktywność przeciwwirusową. Przykładem może być bardzo dobrze znany lek stosowany przeciwko cytomegalowirusowi i ospie – cydofowir (Rysunek 2c).<sup>7</sup> Hydroksybisfosfoniany (Rysunek 2d) są natomiast powszechnie stosowane jako leki przeciwko osteoporozie.<sup>8</sup> Związki te są strukturalnymi analogami pirofosforanu, które między innymi dzięki silnemu powinowactwu do wapnia tworzą stabilny kompleks z hydroksyapatytem kostnym i przeciwdziałają uwapnieniu kości i ich resorpcji.<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Murai T., Tomizawa C. J.; *Environ. Sci. Health, Part B*, 11, (1976) 185-197

<sup>2</sup> Freedman L. D., Doak G. O.; *Chem. Rev.*, 57 (1957) 479-523

<sup>3</sup> Olszewski T. K.; *Synthesis*, 46 (2014) 403-429

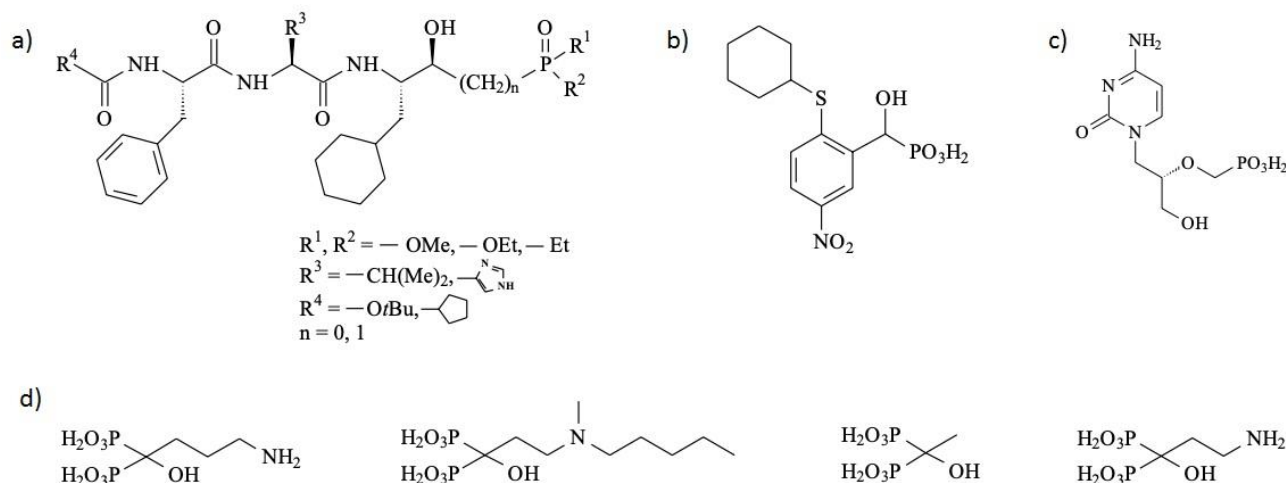
<sup>4</sup> Dellaria J. F. Jr, Maki R. G., Stein H. H., Cohen J., Whittern D., Marsh K., Hoffman D. J., Plattner J. J., Perun T. J.; *J. Med. Chem.*, 33 (1990) 534-542

<sup>5</sup> Patel D. V., Rielly-Gauvin K., Ryono D. E., Free C. A., Rogers W. L., Smith S. A., DeForrest J. M., Oehl E. W., Petrillo E. W. Jr.; *J. Med. Chem.*, 38 (1995) 4557-4569

<sup>6</sup> Frechette R., Ackerman C., Beers S., Look R., Moore J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7 (1997) 2169-217

<sup>7</sup> Srinivas R. V., Connely M., Fridland A.; *Antivir. Res.*, 35 (1997) 23-27

<sup>8</sup> Russell R. G. G., Rogers M. J.; *Bone*, 25 (1999) 97-106



Rysunek 2. Przykłady hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów aktywnych biologicznie.

Ponadto hydroksyfosfoniany mają zastosowanie jako prekursorzy różnych innych związków fosforoorganicznych.<sup>9,10</sup> Wysoką aktywność biologiczną zawdzięczają głównie swojej budowie, również trójwymiarowej związanej z obecnością centrum stereogenicznego na atomie węgla związanego bezpośrednio z atomem tlenu grupy -OH.

Otrzymywanie związków chiralnych ma ogromne znaczenie w wielu dziedzinach nauki i przemysłu, gdyż często tylko jeden z enancjomerów wykazuje pożądane właściwości biologiczne.<sup>11</sup> Dlatego ważne jest opracowanie metod umożliwiających otrzymywanie związków w formie enancjomerycznie czystej.<sup>12</sup> Można je uzyskać między innymi poprzez reakcje syntezy asymetrycznej, gdzie najczęściej stosuje się chiralne katalizatory.<sup>13</sup> Jednak ze względu na szkodliwość używanych reagentów oraz koszty asymetrycznych katalizatorów od dawna poszukuje się metod alternatywnych, bardziej przyjaznych dla środowiska i tańszych. Należą do nich między innymi reakcje biotransformacji, w których katalizatorami są enzymy – w postaci czystej lub jako aparat enzymatyczny mikroorganizmów, tkanek roślin wyższych czy zwierząt.<sup>14</sup> W ten sposób od lat wytwarzane są chiralne leki.<sup>15,16,17,18</sup>

<sup>9</sup> Sobhani S., Tashrfi Z.; *Tetrahedron*, 66 (2010) 1429-1439

<sup>10</sup> Rádai Z.; *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 194 (2019) 425-437

<sup>11</sup> Nguyen L. A., He H., Pham-Huy C.; *Int J Biomed Sci.: IJBS*, 2 (2006) 85-100

<sup>12</sup> Lin G.-Q., Li Y.-M., Chan A. S. C.; *Principles and Applications of Asymmetric Synthesis*; John Wiley: Chichester (2001)

<sup>13</sup> Chinchilla R.; *Molecules*, 22 (2017) 1504

<sup>14</sup> Faber K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th ed., Springer-Verlag, Berlin (2000)

<sup>15</sup> Nestl, B.M.; Nebel, B.A., Hauer B.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 15 (2011) 187-193

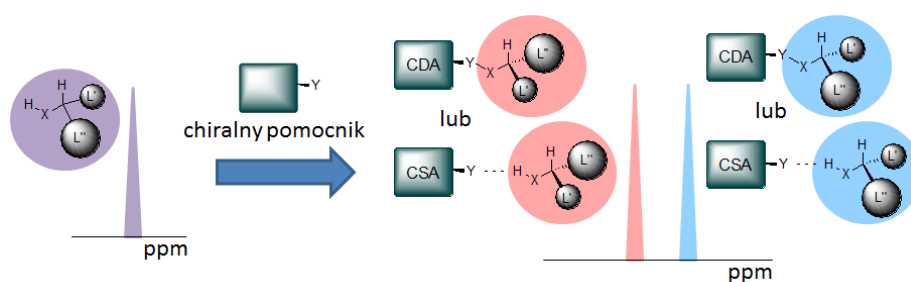
<sup>16</sup> Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C.; *Int J Biomed Sci.: IJBS*, 2 (2006) 85-100

<sup>17</sup> Calcaterra, A.; D'Acquarica, I.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 147 (2018) 323-340

<sup>18</sup> Pollard, D.J.; Woodley, J.M.; *Trends Biotechnol.*, 25 (2007) 66-73

Ogromne znaczenie mają również metody określania budowy przestrzennej chiralnych związków i ich czystości enancjomerycznej. Obecnie dominującą metodą oznaczania nadmiarów enancjomerycznych (*enantiomeric excess* – ee) jest chromatografia cieczowa lub gazowa z zastosowaniem kolumn z chiralnym wypełnieniem, jednak znacząco wzrosło zainteresowanie metodami NMR, ze względu na powszechną dostępność aparatury w placówkach badawczych, możliwość zastosowania niewielkiej ilości badanego związku, ale przede wszystkim ze względu na łatwość przygotowania próbki i szybkość otrzymania wyniku.<sup>19</sup> Jest to również przyczyną popularyzacji metody NMR do oznaczania konfiguracji absolutnej (pomimo tego, że nadal prym wiodą metody oparte na pomiarach i interpretacji dyfrakcji promieni X lub widm CD). Jest to związane między innymi z tym, że dzięki metodzie NMR można określić konfigurację absolutną zarówno ciał stałych jak i cieczy (co jest niemożliwe przy zastosowaniu krystalografii), a także badane związki nie muszą być w 100% czyste optycznie.

Metoda NMR nie pozwala na rozróżnienie enancjomerów znajdujących się w achiralnym środowisku, jakim jest zwykły rozpuszczalnik deuterowany, ponieważ sygnały pochodzące od enancjomerycznych jąder mają identyczne przesunięcia chemiczne. Aby je rozróżnić potrzebne jest przekształcenie badanych enancjomerów w układy diastereomeryczne (Rysunek 3). Pierwsza z dwóch najbardziej popularnych metod polega na utworzeniu pochodnych z chiralnym czynnikiem derywatyującym (*Chiral Derivatizing Agent* – CDA), poprzez utworzenie wiązania kowalencyjnego i wprowadzenie dodatkowego centrum stereogenicznego.<sup>19</sup> Druga metoda polega na analizie próbki z zastosowaniem chiralnych czynników solwujących (*Chiral Solvating Agent* – CSA), które tworzą z analizowanym związkiem diastereomeryczne kompleksy za pomocą słabych oddziaływań (np.: wiązania wodorowe, czy siły van der Waalsa).<sup>20</sup>



Rysunek 3. Układy diastereomeryczne badanego związku z CDA lub CSA.

Metoda z zastosowaniem CDA jest bardziej skomplikowana niż metoda z wykorzystaniem CSA, gdyż wymaga przeprowadzenia analizowanego związku w jego pochodną za pomocą reakcji chemicznej.

<sup>19</sup> Błażewska K. M., Gajda T.; *Tetrahedron: Asymm.*, 20 (2009) 1337-1361

<sup>20</sup> Wenzel T. J., Chisholm C. D.; *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 59 (2011) 1-63

W drugim przypadku wystarczy dodać chiralny pomocnik do analizowanej próbki. W praktyce do określania konfiguracji absolutnej badanej substancji ma zastosowanie tylko metoda CDA. Niestety użycie konkretnego czynnika jest ograniczone tylko do pewnych grup związków organicznych. Jest to determinowane przez reaktywność grup tworzących wiązanie kowalencyjne, które powstaje pomiędzy grupą funkcyjną czynnika (np.: karboksylową) i odpowiadającą jej grupą funkcyjną analizowanego związku (np.: hydroksylową, aminową, tiolową).

Prostota metody z zastosowaniem CSA jest przyczyną szerokiego jej zastosowania do oznaczania czystości enancjomerycznej, chociaż i w tym przypadku zastosowanie konkretnego czynnika ograniczone jest komplementarnością CSA i analizowanej substancji, i wymaga w praktyce doboru tego czynnika do struktury badanych związków. Dodatkowo czynniki te nie są powszechnie stosowane do oznaczania konfiguracji absolutnej ze względu na nie do końca poznane korelacje pomiędzy wynikami otrzymanymi z widm NMR i konfiguracją absolutną badanych związków wynikające stąd, że dany CSA może w różny sposób kompleksować dwa związki z tej samej grupy połączeń.<sup>21</sup>

Do określania nadmiarów enancjomerycznych oraz konfiguracji absolutnej badanych związków można wykorzystać każdy rodzaj spektroskopii (między innymi:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  NMR), zależy to tylko od rodzaju atomów (o niezerowym spinie jądrowym), jakie posiada badany związek i chiralny pomocnik oraz od dostępnej aparatury. Jednakże należy zaznaczyć, że analiza na podstawie zarówno widm  $^1\text{H}$  jak i  $^{13}\text{C}$  NMR jest skomplikowana. Wiąże się to z liczbą tych atomów w strukturze związków organicznych. Dodatkowo metoda z zastosowaniem  $^{13}\text{C}$  NMR wymaga zastosowania dużo większej ilości badanego związku ze względu na niewielką zawartość izotopu  $^{13}\text{C}$  (1,1%) w związkach organicznych. Zastosowanie chiralnego pomocnika zawierającego w swojej strukturze atom fosforu umożliwi wykorzystanie łatwej w interpretacji wyników spektroskopii  $^{31}\text{P}$  NMR.

Celem naukowym prowadzonych przeze mnie badań było wykorzystanie bakterii o właściwościach lipolitycznych oraz preparatów enzymatycznych (lipaz) pochodzących z różnych źródeł do otrzymywania hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów z jak największymi nadmiarami enancjomerycznymi oraz określenie konfiguracji absolutnej produktów biotransformacji.

Wyniki badań będących przedmiotem opisu osiągnięć mają znaczenie nie tylko dla rozwoju obszaru naukowego obejmującego biotransformacje związków fosforoorganicznych, do których należą hydroksyfosfoniany i hydroksyfosfiniany, ale są także podstawą do poszukiwań użytecznego chiralnego pomocnika, który można będzie zastosować do określania nadmiarów enancjomerycznych

---

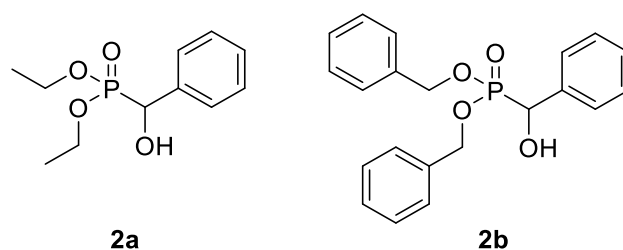
<sup>21</sup> Seco J. M., Quiñoá E., Riguera R.; *Chem. Rev.*, 104 (2004) 17-118

i konfiguracji absolutnych chiralnych kwasów karboksylowych, alkoholi, amin, tioli oraz innych związków chiralnych zawierających grupy nukleofilowe. Stosowane dzisiaj chiralne czynniki derywatyzujące pozwalają na analizę czystości enancjomerycznej i konfiguracji absolutnej głównie na podstawie analizy widm  $^1\text{H}$  NMR. Zastosowanie związku fosforoorganicznego o prostej budowie chemicznej umożliwi wykorzystanie dodatkowo mniej skomplikowanej w interpretacji spektroskopii  $^{31}\text{P}$  NMR.

#### 4.4. Omówienie wyników badań

##### 4.4.1. Synteza hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów

W zespole, w którym wykonywałam badania naukowe, od końca lat 90-tych są prowadzone badania nad otrzymywaniem optycznie czystych hydroksyfosfonianów zarówno na drodze asymetrycznej syntezy<sup>22</sup> jak i biokatalizy.<sup>23</sup> W swojej pracy badawczej zajęłam się początkowo biotransformacjami prostych hydroksyfosfonianów **2** z jednym centrum stereogenicznym (prace **H3**<sup>24</sup> i **H8**<sup>25</sup>) oraz hydroksyfosfinianów **3** zawierających dwa centra stereogeniczne - na atomie węgla i atomie fosforu (prace **H1**<sup>26</sup> i **H2**<sup>27</sup>). Związki **2** (Rysunek 4) są przykładem modelowych hydroksyfosfonianów, dla których znana jest korelacja ich konfiguracji absolutnej i skręcalności optycznej,<sup>28,29</sup> dlatego też stanowiły dobrą podstawę do badań nad enancjoselektywnością biokatalizatorów. Zanim rozpoczęłam badania nad tymi związkami była znana tylko jedna publikacja dotycząca enancjoselektywnych biotransformacji tych związków.<sup>23</sup>



Rysunek 4. Hydroksyfosfoniany z jednym centrum stereogenicznym.

<sup>22</sup> Drąg M., Latajka R., Gumienna-Kontecka E., Kozłowski H., Kafarski P.; *Tetrahedron: Asymm.*, 14 (2003) 1837-1845

<sup>23</sup> Skwarczyński M., Lejczak B., Kafarski P.; *Chirality*, 11 (1999) 109-114

<sup>24</sup> **[H3]** Malinowska B., Majewska P., Szatkowski P., Kafarski P., Lejczak B.; *Biocatalysis and Biotransformation*, 29 (2011) 271-277

<sup>25</sup> **[H8]** Majewska P., *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 192 (2017) 418-421

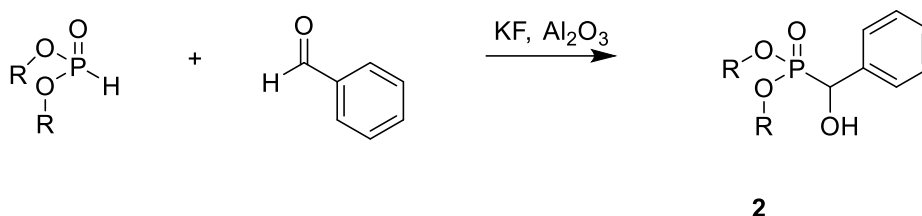
<sup>26</sup> **[H1]** Majewska P., Doskocz M., Lejczak B., Kafarski P.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 20 (2009) 1568-1574

<sup>27</sup> **[H2]** Majewska P., Kafarski P., Lejczak B.; *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 185 (2010) 1915-1920

<sup>28</sup> Hammerschmidt F., Hanbauer M.; *Journal of Organic Chemistry*, 65 (2000) 6121-6131

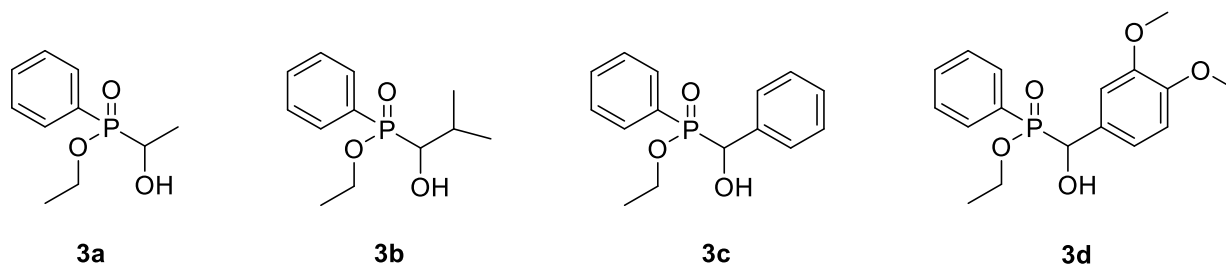
<sup>29</sup> Hoffmann M.; *Synthesis*, 1 (1988) 62-64

Hydroksyfosfoniany **2** zsyntetyzowałam razem z dr Barbarą Malinowską (wtedy doktorantką wykonującą pracę pod kierunkiem prof. Barbary Lejczak) zgodnie z procedurą opisaną przez Texier-Boullet i Lequitte,<sup>30</sup> w której jako katalizatora używa się mieszaniny KF i Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Schemat 1, praca H3<sup>24</sup>).



Schemat 1. Otrzymywanie hydroksyfosfonianów **2**.

W momencie, gdy rozpoczynałam pracę nad biotransformacjami hydroksyfosfinianów **3** znana była też tylko jedna publikacja w tej tematyce.<sup>31</sup> Związki te ze względu na posiadane dwa centra stereogeniczne są bardzo ciekawą grupą hydroksyfosfinianów, ponieważ pozwalają na zdefiniowanie preferencji biokatalizatorów wobec centrum stereogenicznego zlokalizowanego na określonym atomie w cząsteczce, w tym przypadku atomie węgla lub atomie fosforu. Postanowiłam więc sprawdzić jaką stereoselektywność wykazują stosowane przeze mnie biokatalizatory. W tym celu wybrałam cztery przykładowe hydroksyfosfiniany **3a-d** (Rysunek 5) różniące się między sobą podstawnikiem przy  $\alpha$ -atomie węgla (prace H1<sup>26</sup> i H2<sup>27</sup>).



Rysunek 5. Hydroksyfosfiniany z dwoma centrami stereogenicznymi.

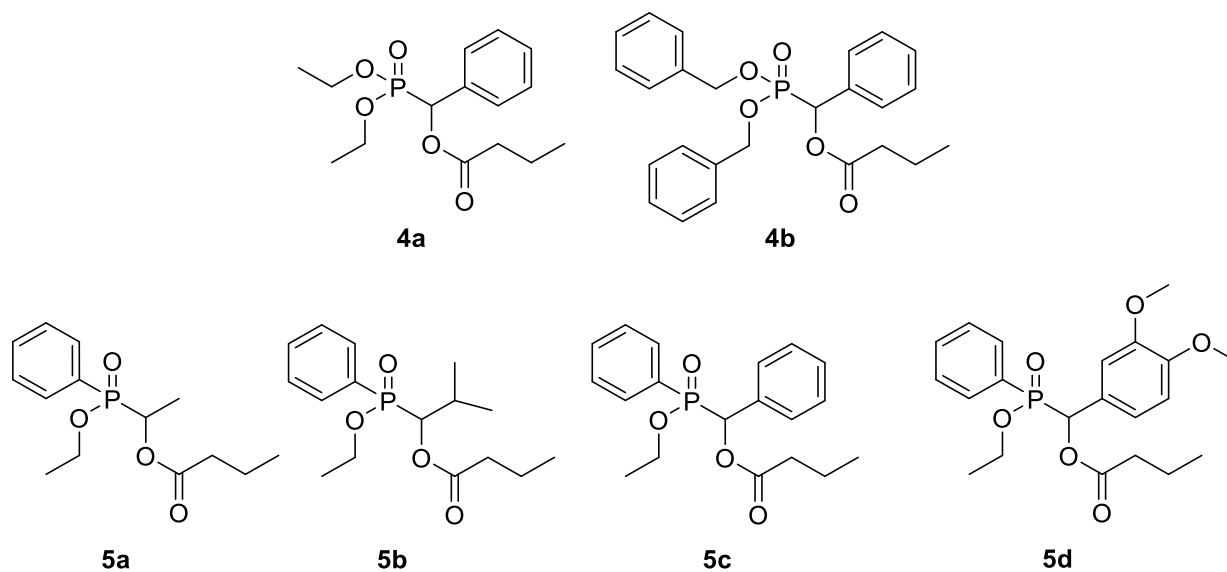
Związki te zsyntetyzowałam metodą taką samą jak opisana wcześniej z zastosowaniem mieszaniny KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> jako katalizatora.

Aby można było przeprowadzić reakcje hydrolizy z wykorzystaniem bakterii lub preparatów enzymatycznych o właściwościach lipolitycznych należy zsyntetyzować estry otrzymanych hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów. Specyficzność substratowa lipaz wobec związków

<sup>30</sup> Texier-Boullet F., Lequitte M.; *Tetrahedron Lett.*, 27 (1986) 3515-3516

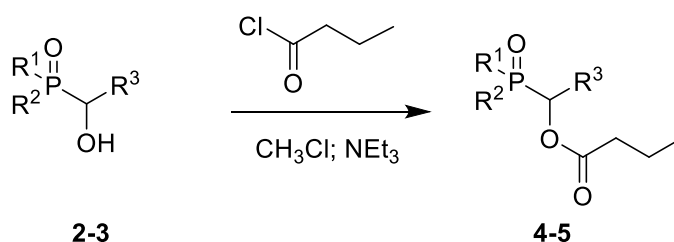
<sup>31</sup> Shioji K., Toshiro A., Shibata S., Okuma K.; *Tetrahedron Lett.*, 44 (2003) 1103-1105

będących estrami kwasów karboksylowych zależy od długości ich łańcucha (liczby atomów węgla w cząsteczce kwasu karboksylowego) i jest różna dla różnych enzymów.<sup>32</sup> Syntetyzowanie wielu pochodnych estrowych badanych alkoholi byłoby jednak dużym utrudnieniem i dlatego zazwyczaj w reakcjach hydrolizy enzymatycznej jak i hydrolizy całymi komórkami o właściwościach lipolitycznych stosuje się pochodne kwasu masłowego, o których wiadomo, że mogą być dobrymi substratami dla takich reakcji.<sup>33</sup> Również w swoich badaniach zastosowałam to podejście i otrzymałam maślany hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów (Rysunek 6).



Rysunek 6. Butyryloksyfosfoniany **4** i butyryloksyfosfiniany **5**.

Związki te zsyntetyzowałam stosując reakcję acylowania otrzymanych wcześniej hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów chlorkiem butyrylu w obecności trietyloaminy (Schemat 2). Metoda ta została przedstawiona w publikacjach **H1-H3**.<sup>24,26,27</sup>



Schemat 2. Otrzymywanie butyryloksyfosfinianów i butyryloksyfosfonianów.

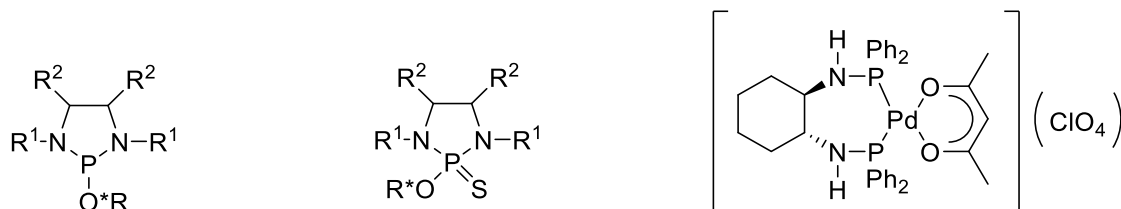
W pracy **H1**<sup>26</sup> podjęłam próbę udowodnienia, że chiralny czynnik solwujący – chinina wpływa na przesunięcia chemiczne sygnałów na widmach <sup>31</sup>P NMR. Dodatkowo zweryfikowałam

<sup>32</sup> Vaysse L., Ly A., Moulin G., Dubreucq E.; *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (2002) 648-655

<sup>33</sup> Wu P., Li Q., Zhang Y-J., Wang Z., Zheng J-Y.; *Chemical Papers*, 74 (2020) 3039-3045

możliwość określenia konfiguracji absolutnej hydroksyfosfinianów z dwoma centrami stereogenicznymi (na  $\alpha$ -atomie węgla i atomie fosforu) na podstawie tych widm. Praca ta zapoczątkowała moje zainteresowanie otrzymaniem uniwersalnego chiralnego pomocnika, dzięki któremu możliwe będzie określanie konfiguracji absolutnej i nadmiarów enancjomerycznych wielu klas związków chiralnych.

Przygotowując się merytorycznie do obranego przeze mnie kierunku badań dokonałam razem z mgr inż. Jagodą Szyszkowiak (wtedy studentką, która wykonywała projekt inżynierski oraz pracę magisterską pod moim kierunkiem) aktualnego ówczesnie przeglądu literatury dotyczącej określania konfiguracji absolutnej za pomocą spektroskopii  $^{31}\text{P}$  NMR (praca H5<sup>34</sup>). Informacji w literaturze na temat związków posiadających atom fosforu przydatnych jako CDA lub CSA było niewiele. Pierwsze próby zastosowania takich związków były podjęte przez Chauvin'a i współpracowników<sup>35,36</sup> oraz Bravo i współpracowników<sup>37</sup> (Rysunek 7). Jednak nie są one do tej pory powszechnie stosowane.



Rysunek 7. Związki fosforoorganiczne – potencjalne CDA i CSA do określania konfiguracji absolutnej.

Opisane w mojej pracy (H5<sup>34</sup>) pozostałe CDA i CSA nie posiadają w swojej budowie atomu fosforu, a konfiguracja absolutna była możliwa do określenia za pomocą spektroskopii  $^{31}\text{P}$  NMR, gdyż taki atom posiadały analizowane związki. Pomimo tego, że praca nie ma charakteru eksperymentalnego, to płynące z niej wnioski o słabo rozwiniętej dziedzinie fosfonowych chiralnych pomocników zachęciły mnie do poszukiwania struktur związków fosforoorganicznych, które miałyby takie zastosowanie. Mój udział w tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, wstępnym wyszukaniu literatury i końcowym wyborze całej literatury uwzględnionej w artykule. Ponadto uczestniczyłam w napisaniu manuskryptu i go redagowałam zarówno pod względem edytorskim jak i merytorycznym.

Aby chiralny pomocnik mógł być wykorzystywany do określania nadmiarów enancjomerycznych i konfiguracji absolutnej musi być otrzymany w formie optycznie czystej. Do tego celu coraz częściej wykorzystuje się biokatalizę jako alternatywę dla asymetrycznej syntezy. Biokatalizatory wykazują wysoką aktywność katalityczną, dzięki czemu przyspieszają reakcje bardziej

<sup>34</sup> [H5] Szyszkowiak J., Majewska P.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 25 (2014) 103-112

<sup>35</sup> Chauvin, A.-S., Bernardinelli, G., Alexakis, A.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15, 1857–1879

<sup>36</sup> Chauvin, A.-S., Bernardinelli, G., Alexakis, A.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, 17, 2203–2209

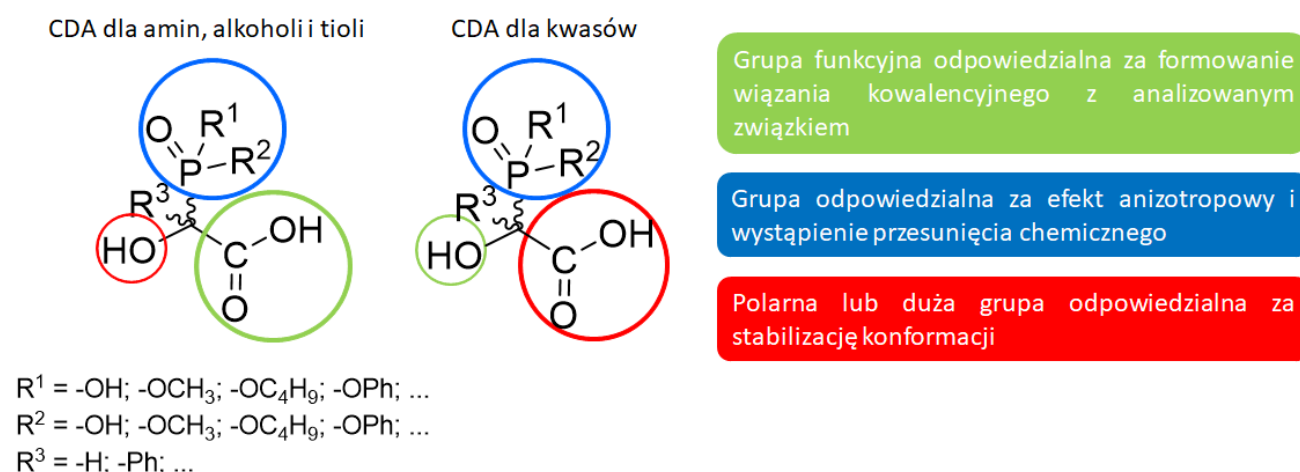
<sup>37</sup> Bravo, J., Cativiela, C., Chaves, J. E., Navarro, R., Urriolabeitia, E. P.; *Inorg. Chem.*, 42 (2003) 1006–1013



niż katalizatory niebiałkowe. Ponadto w reakcjach biokatalizy można zastosować zarówno podczyszczone enzymy, jak i żywe komórki mikroorganizmów. Często stosuje się również metody poprawy ich działania poprzez immobilizację, permeabilizację czy liofilizację, a także stosując różnego rodzaju modyfikacje płynów hodowlanych czy medium biotransformacyjnego. Enzymy wykazują w zależności od przeprowadzanych reakcji wysoką chemo- regio- i stereoselektywność, co może mieć zastosowanie do otrzymywania konkretnych związków, również chiralnych.

Dzięki zastosowaniu fosfonowego chiralnego pomocnika jest możliwa analiza badanych związków o nieznannej konfiguracji absolutnej i czystości enancjomerycznej za pomocą spektroskopii  $^{31}\text{P}$  NMR, która ma przewagę nad spektroskopią  $^1\text{H}$  NMR ze względu na prostotę otrzymywanych widm. Zastosowanie w strukturze fosfonianu dwóch dodatkowych grup funkcyjnych: hydroksylowej i karboksylowej powinno umożliwić analizę wielu klas związków (między innymi: amin, alkoholi, tioli oraz kwasów karboksylowych).

Bazując na tych założeniach zaproponowałam strukturę nowych hydroksyfosfonianów zawierających dodatkową grupę karboksylową (Rysunek 8) użytecznych jako chiralne pomocniki.



Rysunek 8. Optymalne struktury potencjalnych CDA.

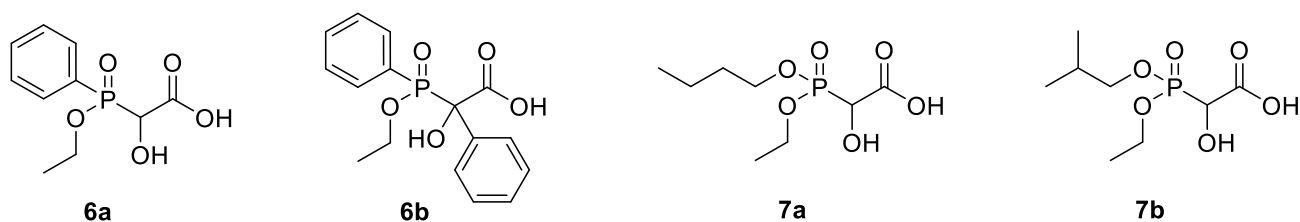
Pracę nad tą nową grupą związków rozpoczęłam od syntezy podobnych strukturalnie do wcześniej przeze mnie badanych hydroksyfosfinianów posiadających dwa centra stereogeniczne. Nowe związki jednak różnią się przede wszystkim dodatkową grupą karboksylową przyłączoną do  $\alpha$ -atomu węgla (Rysunek 9, prace [H4](#),<sup>38</sup> [H6](#),<sup>39</sup> [H7](#)<sup>40</sup> i [H9](#)<sup>41</sup>).

<sup>38</sup> [\[H4\]](#) Szyszkwowski J., Majewska P.; *BioTechnologia*, 94 (2013) 425-431

<sup>39</sup> [\[H6\]](#) Majewska P.; *Bioorganic Chemistry*, 61 (2015) 28-35

<sup>40</sup> [\[H7\]](#) Majewska P., Serafin M., Klimek-Ochab M., Brzezińska-Rodak M., Żymańczyk-Duda E.; *Bioorganic Chemistry*, 66 (2016) 21-26

<sup>41</sup> [\[H9\]](#) Majewska P.; *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 194 (2019) 1048-1053.

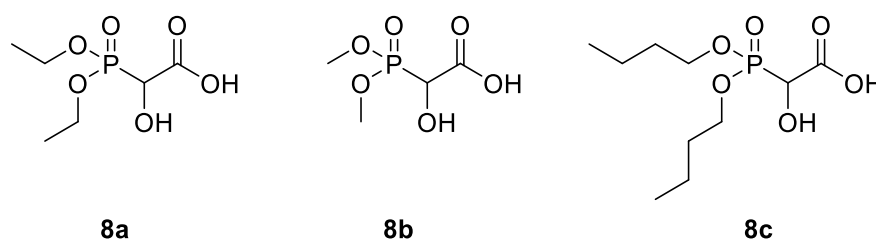


Rysunek 9. Struktury 1-hydroksy-1-karboksyfosfinianów **6** oraz 1-hydroksy-1-karboksyfosfonianów **7** z dwoma centrami stereogenicznymi.

Początkowo stosowałam metodę z użyciem katalizatora  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$ , jednak rezultaty były niesatysfakcjonujące. Kolejną metodą była metoda z zastosowaniem trietyloaminy jako zasadowego katalizatora i oczyszczanie produktów na żelu krzemionkowym. Cała procedura była jednak mało wydajna i czasochłonna. Kończącym efektem moich prac nad metodą otrzymywania związków fosforoorganicznych 1-hydroksy-1-karboksyfosfinianów **6** i 1-hydroksy-1-karboksyfosfonianów **7** było zastosowanie trietyloaminy jako katalizatora i usunięcie jej z mieszaniny poreakcyjnej poprzez zatrzymanie na jonicie kationowym (prace [H4](#)<sup>38</sup>, [H6](#)<sup>39</sup> i [H7](#)<sup>40</sup>), a sposoby wytwarzania tych związków zostały opatentowane.<sup>42,43,44</sup>

Otrzymanie rozbudowanego strukturalnie hydroksyfosfinianu **6b** okazało się bardziej złożone, gdyż jako substrat karbonylowy został zastosowany kwas fenyloglioksalowy. W tym przypadku reakcja musiała przebiegać w temperaturze wrzącego chloroformu (praca [H9](#)<sup>41</sup>).

W kolejnych etapach badań nad otrzymaniem związku przydatnego jako CDA i/lub CSA postanowiłam opracować prostsze struktury, dlatego też wybrałam związki posiadające tylko jedno centrum stereogeniczne. W tym celu zsyntetyzowałam trzy 1-hydroksy-1-karboksyfosfoniany **8a-c** (Rysunek 10).



Rysunek 10. Struktury 1-hydroksy-1-karboksyfosfonianów **8a-c** z jednym centrum stereogenicznym.

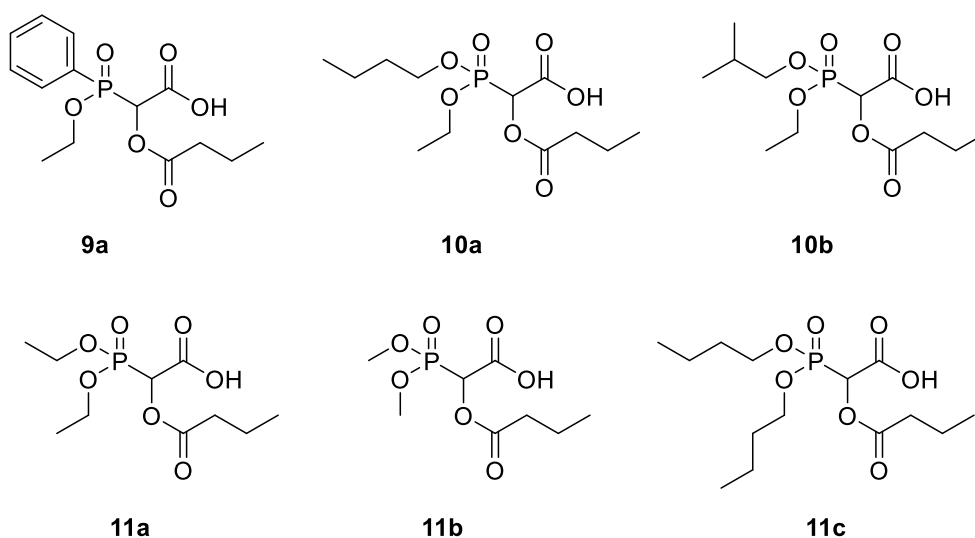
<sup>42</sup> Majewska P.; Patent. Polska, nr 227612. Sposób wytwarzania kwasu (2R,S)-2-hydroksy-2-[(P,R,S)-etoksyfenylofosfinylo]octowego. Zgłosz. nr P 402779 z 15.02.2013. Opubl. 31.01.2018. 4 s.

<sup>43</sup> Majewska P.; Patent. Polska, nr 225335. Kwas (2R,S)-2-hydroksy-2-[(P,R,S)-izobutoksyetoksyfosfinylo]octowy oraz sposób jego wytwarzania. Zgłosz. nr 402781 z 15.02.2013. Opubl. 31.03.2017. 3 s.

<sup>44</sup> Majewska P.; Patent. Polska, nr 217068. Kwas (2R,S)-2-hydroksy-2-[(P,R,S)-butoksyetoksyfosfinylo]octowy oraz sposób jego wytwarzania. Zgłosz. nr 402780 z 15.02.2013. Opubl. 30.06.2014. 3 s.

Podobnie jak poprzednio zastosowałam metodę syntezy opartą na dodatku trietyloaminy jako zasadowego katalizatora (prace H10<sup>45</sup> i H11<sup>46</sup>).

Ponieważ głównym celem tych badań było uzyskanie 1-hydroksy-1-karboksyfosfinianów **6** oraz 1-hydroksy-1-karboksyfosfinianów **7** z jak największymi nadmiarami enancjomerycznymi (najlepiej czyste enancjomery), a cel ten pragnęłam osiągnąć również przez hydrolizę ich pochodnych estrowych, w związku z tym dla każdego z nowo zsyntetyzowanych związków przeprowadziłam reakcje estryfikacji grupy hydroksylowej za pomocą chlorku butyrylu. W ten sposób otrzymałam butyryloksyfosfinian **9a**, butyryloksyfosfiniany **11a-c**, a także butyryloksyfosfiniany **10a** i **10b**, które zostały opatentowane<sup>47,48</sup> (Rysunek 11).



Rysunek 11. 1-Butyryloksy-1-karboksyfosfinian **9a** oraz 1-butyryloksy-1-karboksyfosfiniany **10a**, **10b** i **11a-c**.

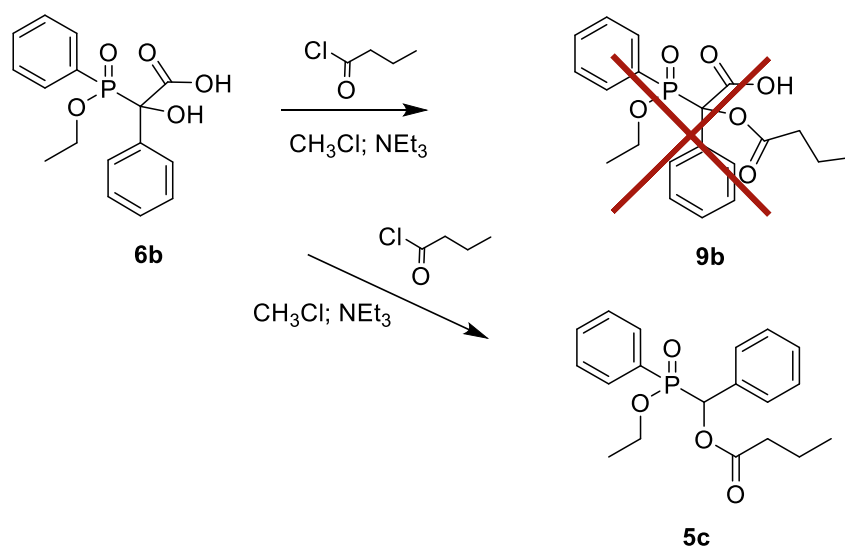
Niestety w przypadku próby syntezy butyryloksyfosfinianu **9b** reakcja acylowania zaszła, ale nastąpiła jednocześnie dekarboksylacja związku i wynikiem tej syntezy był butyryloksyfosfinian **5c** (praca H9<sup>41</sup>). Próbowałam wykonać różne modyfikacje tej reakcji, tak, aby możliwe było otrzymanie związku **9b**, jednak nie przyniosły one pożądanego rezultatu (Schemat 3).

<sup>45</sup> [H10] Majewska P.; *Journal of Molecular Structure*, 1225 (2021) 129084

<sup>46</sup> [H11] Majewska P.; *Catalysts*, 11 (2021) 956

<sup>47</sup> Majewska P.; Patent. Polska, nr 220691. Kwas (2R,S)-2-butyryloksy-2-[(P)R,S]-butoksyetoksyfosfinylo]octowy oraz sposób jego wytwarzania. Zgłosz. nr 402783 z 15.02.2013. Opubl. 30.11.2015. 4 s.

<sup>48</sup> Majewska P.; Patent. Polska, nr 220064. Kwas (2R,S)-2-butyryloksy-2-[(P)R,S]-izobutoksyetoksyfosfinylo]octowy oraz sposób jego wytwarzania. Zgłosz. nr 402782 z 15.02.2013. Opubl. 31.08.2015. 4 s.

Schemat 3. Schemat reakcji acylacji hydroksyfosfinianu **6b**.

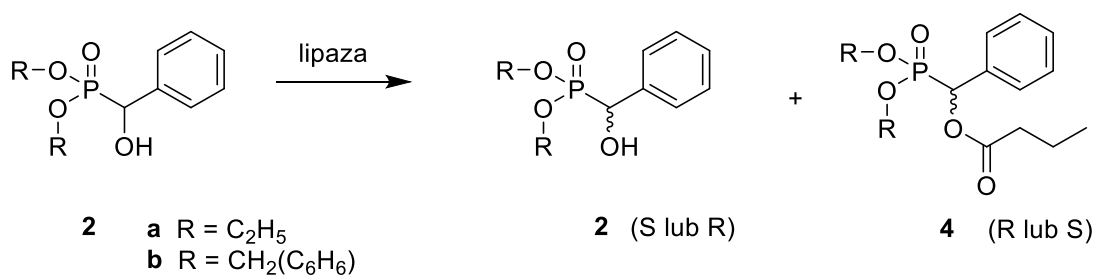
#### 4.4.2. Biotransformacje

Celem opisywanych badań było otrzymanie hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów pokazanych na rysunkach 4-5 oraz 9-10 z jak najwyższymi nadmiarami enancjomerycznymi.

Cel ten starałam się osiągnąć stosując jako katalizatory zarówno całe komórki bakterii posiadających aktywność lipolityczną, jak i wykorzystując podczyszczone preparaty enzymatyczne dostępne handlowo lub, jak w przypadku jednego z enzymów, pozyskane od zespołu badawczego z Politechniki Łódzkiej, z którym współpracowałam.

##### 4.4.2.1. Estryfikacje hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów za pomocą lipaz

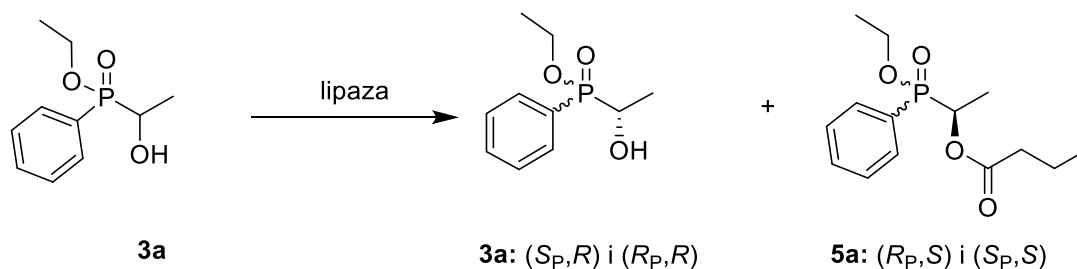
Jednym ze sposobów realizacji tego celu było zastosowanie enancjoselektywnej nieodwracalnej transestryfikacji, z zastosowaniem maślanu winylu jako donora grupy acylowej, w celu otrzymania z dużymi nadmiarami enancjomerycznymi hydroksyfosfonianów **2a** i **b** oraz butyryloksyfosfonianów **4a** i **b** (Schemat 4).

Schemat 4. Estryfikacja hydroksyfosfonianów **2** za pomocą lipaz.

Reakcje estryfikacji tych hydroksyfosfonianów zostały przeprowadzone zgodnie z procedurą opisaną przez Shioji i współpracowników<sup>49</sup> w bezwodnym środowisku organicznym (eter diizopropylowy) z dodatkiem sit molekularnych 3Å, które usuwają wodę (praca H3<sup>24</sup>). Tylko nieliczne lipazy były zdolne do estryfikacji tych związków, a najlepsze rezultaty zostały osiągnięte w przypadku estryfikacji hydroksyfosfonianu **2a** lipazą z *Candida cylindracea*, gdzie enancjoselektywność sięgała prawie 48, a nadmiar enancjomeryczny powstającego butyryloksyfosfonianu **4a** dochodził do 95%. Ważnym odkryciem podczas tych badań był fakt, że różne lipazy posiadają różną stereoselektywność co do konfiguracji absolutnej acylowanego enancjomeru. W przypadku reakcji acylowania związku **2a** chętniej tworzył się butyryloksyfosfonian **4a** o konfiguracji absolutnej (*S*), jednak w przypadku wspomnianej już lipazy z *Candida cylindracea*, powstawał enancjomer (*R*). Odwrotnie było, gdy zastosowany został związek **2b**. Prawdopodobnie ze względu na występowanie dużych grup benzyloksylowych przy atomie fosforu substrat ten inaczej się układa (w porównaniu do hydroksyfosfonianu **2a**) w centrum aktywnym lipazy. Chociaż nie wykonałam osobiście badań dotyczących enancjoselektywnej estryfikacji lipazami hydroksyfosfonianów **2**, opisanych w pracy H3<sup>24</sup>, gdyż przeprowadziła je dr Barbara Malinowska, to jednak opisałam je tutaj, gdyż brałam udział w tworzeniu koncepcji tych badań oraz ich interpretacji, a także pomagałam w doborze metod, które wcześniej sama testowałam.<sup>50,51</sup>

W przypadku pozostałych związków wszystkie reakcje nieodwracalnej transestryfikacji przeprowadziłam osobiście.

Na początku próbowałam zestryfikować hydroksyfosfiniany **3a-d**. Niestety reakcja estryfikacji z zastosowaniem lipaz zaszła tylko dla jednego z badanych hydroksyfosfinianów – związku **3a** (Schemat 5).



Schemat 5. Acylacja hydroksyfosfinianu **3a**.

<sup>49</sup> Shioji K., Ueno Y., Kurauchi Y., Okuma K.; *Tetrahedron Lett.*, 42 (2001) 6569-6571

<sup>50</sup> Majewska P., Kafarski P., Lejczak B.; *Polish J. Chem.*, 79 (2005) 561-566

<sup>51</sup> Majewska P., Kafarski P., Lejczak B.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 17 (2006) 2870-2875

Część wyników z tych badań została opisana w pracy H2<sup>27</sup>. Pomimo tego, że reakcje te zaszły z bardzo wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi sięgającymi >98%, to jednak możliwość zastosowania tylko bardzo małej ilości substratu (0,023 mmol), oraz fakt, że większość z badanych przez mnie hydroksyfosfinianów (**3b-d**) w ogóle nie uległa estryfikacji, powoduje, że nie jest to dobra metoda otrzymywania tych związków. Bardzo mała ilość substratu sprawia, że metoda detekcji produktów za pomocą spektrometrii <sup>31</sup>P NMR i chininy jako CSA jest niemożliwa. Dobrą metodą okazało się zastosowanie HPLC i chiralnej kolumny analitycznej AD, jednak utrudnieniem było dobranie odpowiedniej metody detekcji wszystkich powstających izomerów produktów. Pomimo wielu prób dobrania metody analitycznej z zastosowaniem chiralnych kolumn (testowane były 4 różne kolumny) nie udało mi się uzyskać metody pozwalającej na określenie nadmiarów enancjomerycznych dla związków **7a-b** oraz **8a-c**.

Próbę zastosowania estryfikacji lipazami podjęłam jeszcze dla hydroksyfosfinianu **6a**, dla którego udało się dobrać metodę detekcji na chiralnej kolumnie AD, a rezultaty tych biotransformacji zostały opisane w pracy H7<sup>40</sup>. Niestety tylko lipaza z trzustki wieprzowej wykazała zdolność do estryfikacji tego związku. Po 4 dniach biotransformacji stopień konwersji osiągnął 45%, a nadmiar enancjomeryczny powstającego estru wyniósł 11% dla izomeru (*S<sub>P</sub>,S*) i 43% dla izomeru (*S<sub>P</sub>,R*). W przypadku innych enzymów konwersja była niższa niż 10% po 7 dniach prowadzenia eksperymentu.

#### 4.4.2.2. Hydroliza butyryloksyfosfonianów i butyryloksyfosfinianów za pomocą lipaz

Drugim sposobem realizacji celu było zastosowanie enancjoselektywnej hydrolizy lipazami. Metoda ta jest często wykorzystywana w biokatalitycznej syntezie chiralnych alkoholi, a ze względu na budowę i mechanizm działania lipaz,<sup>52</sup> przeprowadzana jest zazwyczaj w układzie dwufazowym. W reakcjach hydrolizy butyryloksyfosfonianów **4** za pomocą lipaz testowanych w pracy H3<sup>24</sup> wykorzystana została metoda opisana przez Li i Hammerschmidta,<sup>53</sup> gdzie jako fazę wodną stosuje się 0,05M bufor fosforanowy o pH = 7,0, a jako fazę organiczną mieszaninę rozpuszczalników: heksan/eter *tert*-butylometylowy w stosunku 3:1. Najlepsze rezultaty zostały osiągnięte w przypadku zastosowania lipazy z *Aspergillus niger* i z *Candida cylindracea* do hydrolizy butyryloksyfosfonianu **4a**, jednak w żadnym przypadku enancjoselektywność nie przekroczyła wartości *E* = 4. Podobnie jak dla reakcji acylowania hydroksyfosfonianów **2**, tak dla hydrolizy ich estrów masłowych **4** można

<sup>52</sup> Grochulski P., Li Y., Schrag J. D., Bouthillier F., Smith P., Harrison D., Rubin B., Cygler M.; *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (1993) 12843-12847

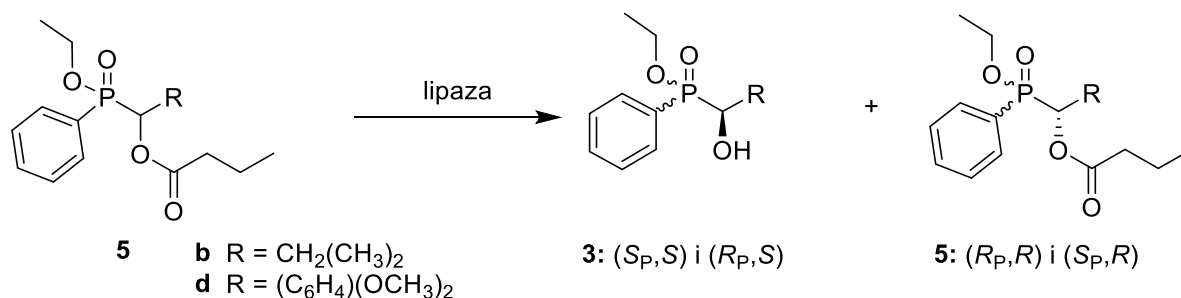
<sup>53</sup> Li Y.-F., Hammerschmidt F.; *Tetrahedron: Asymm.*, 4 (1993) 109-120

zaobserwować różną stereoselektywność w stosunku do enancjomerów o określonej konfiguracji absolutnej. Niektóre lipazy hydrolizowały enancjomery o konfiguracji (*S*), inne te o konfiguracji (*R*) i zazwyczaj można było obserwować odwrotną preferencję dla enancjomeru związku **4b** w stosunku do związku **4a**. Jak można zauważyć grupy benzyloksylowe hydroksyfosfonianu **2b** oraz butyryloksyfosfonianu **4b** powodują, że całe ugrupowanie fosfonowe jest znacznie bardziej rozbudowane przestrzennie niż w przypadku hydroksyfosfonianu **2a** oraz jego estru **4a** posiadających grupy etoksyloze przy atomie fosforu. W związku z tym można przypuszczać, iż zaobserwowana odwrotna stereoselektywność lipaz wobec tych związków związana jest z wielkością podstawników przy atomie fosforu (inaczej układają się w centrum aktywnym lipaz).

Podobnie jak w przypadku reakcji estryfikacji hydroksyfosfonianów **2** opisanych powyżej, również i tutaj nie wykonałam osobiście badań dotyczących enancjoselektywnej hydrolizy lipazami butyryloksyfosfonianów **4**, opisanych w pracy **H3**<sup>24</sup>, gdyż, tak jak powyżej, przeprowadziła je dr Barbara Malinowska, a mój wkład polegał na udziale w tworzeniu koncepcji tych badań oraz ich interpretacji i w doborze metod, które wcześniej sama testowałam.<sup>50,51</sup>

W przypadku pozostałych związków wszystkie reakcje hydrolizy za pomocą lipaz przeprowadziłam osobiście.

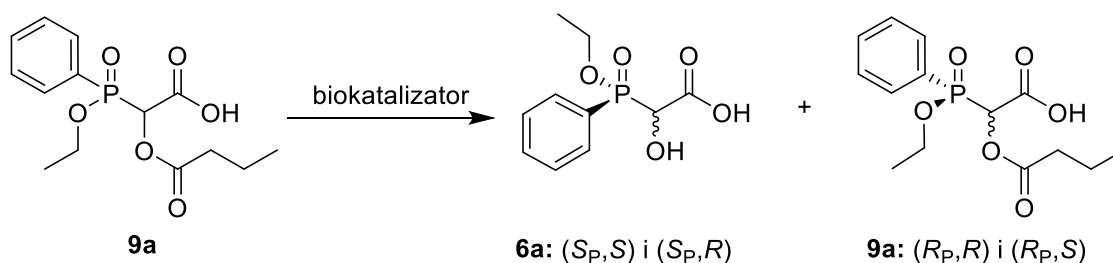
W przypadku hydrolizy butyryloksyfosfinianów **5a-d** zastosowałam układ dwufazowy opisany powyżej. Rezultaty hydrolizy lipazami dwóch z nich **5b** i **5d** zostały opisane w pracy **H1**<sup>26</sup> (Schemat 6). Najlepsze wyniki osiągnęłam w przypadku hydrolizy butyryloksyfosfinianu **5b** za pomocą lipazy z trzustki wieprzowej, a powstający hydroksyfosfinian otrzymywałam z nadmiarami enancjomerycznymi przekraczającymi 98% dla obu par enancjomerów.



Schemat 6. Reakcje hydrolizy butyryloksyfosfinianów **5** lipazami.

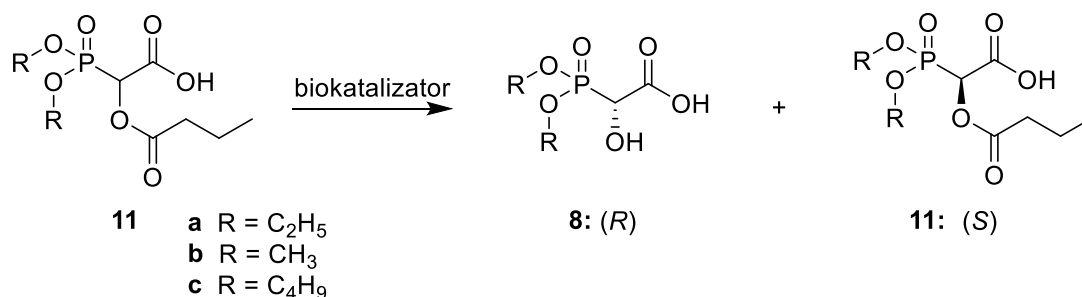
Kolejnym związkiem, który poddałam enancjoselektywnej hydrolizie lipazami był 1-butyryloksy-1-karboksyfosfinian **9a** (Schemat 7). Zastosowanie lipazy z *Candida cylindracea* dało dobre rezultaty, gdyż nadmiary enancjomeryczne dochodziły do 75% i 85%, w zależności od pary enancjomerów powstającego produktu, natomiast enancjoselektywność dla jednej pary enancjomerów sięgała 16,8, a dla drugiej 32,9. Praca **H7**,<sup>40</sup> w której opisane są wyniki tych doświadczeń jest

wieloautorska, jednak wszystkie badania związane z enancjoselektywną hydrolizą lipazami (podobnie jak w przypadku transestryfikacji) wykonałam osobiście, zaplanowałam je i zanalizowałam otrzymane wyniki. Opisane w tej pracy badania nad enancjoselektywną hydrolizą związku **9a** z zastosowaniem całych komórek grzybów zostały wykonane przez dr Monikę Serafin-Lewańczuk, z którą współpracuję, jednak nie dotyczą tematu moich badań opisanych w niniejszym autoreferacie.



Schemat 7. Reakcje biokatalitycznej hydrolizy butyryloksyfosfinianu **9a**.

Przeprowadziłam również badania nad reakcjami hydrolizy związków **10a** i **10b**, jednak wyniki nie były satysfakcjonujące i nie zostały opublikowane. Natomiast reakcje hydrolizy butyryloksyfosfonianów **11** zostały opisane w pracach **H10**<sup>45</sup> i **H11**<sup>46</sup> (Schemat 8). Najlepsze rezultaty zostały osiągnięte dla reakcji hydrolizy związku **11b** lipazą z *Candida rugosa*, gdyż nadmiar enancjomeryczny powstającego produktu sięgał >98%, a enancjoselektywność dochodziła do 126, jednak stopień konwersji nie przekraczał 12% nawet przy reakcjach trwających 7 dni.



Schemat 8. Reakcje biokatalitycznej hydrolizy 1-butyryloksy-1-karboksyfosfonianów **11**.

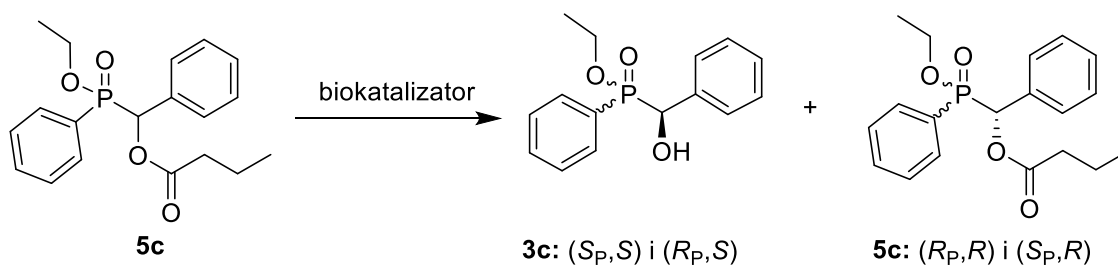
#### 4.4.2.3. Hydroliza butyryloksyfosfonianów i butyryloksyfosfinianów całymi komórkami bakterii

Moje badania nad trzecim sposobem otrzymywania hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów z jak największymi nadmiarami enancjomerycznymi, czyli zastosowaniem biokatalizatora w formie całych komórek bakterii o aktywności lipolitycznej do rozdziału izomerów poprzez enancjoselektywną hydrolizę estrów masłowych omówię rozpoczynając podobnie jak w poprzednich przypadkach od publikacji **H3**.<sup>24</sup> Opisane w niej badania wykonane tym sposobem robiłam osobiście, jedynie tylko w kilku przypadkach przy ostatnim powtórzeniu uzyskanych



rezultatów pomógł mi mgr inż. Paweł Szatkowski, gdyż w tym czasie byłam na urlopie macierzyńskim i nie mogłam tych badań dokończyć samodzielnie. Najlepsze rezultaty osiągnęłam stosując komórki szczepu *Bacillus subtilis* do enancjoselektywnej hydrolizy butyryloksyfosfonianu **2a**. Nadmiar enancjomeryczny powstającego produktu sięgał 95%, a enancjoselektywność dochodziła do 88.

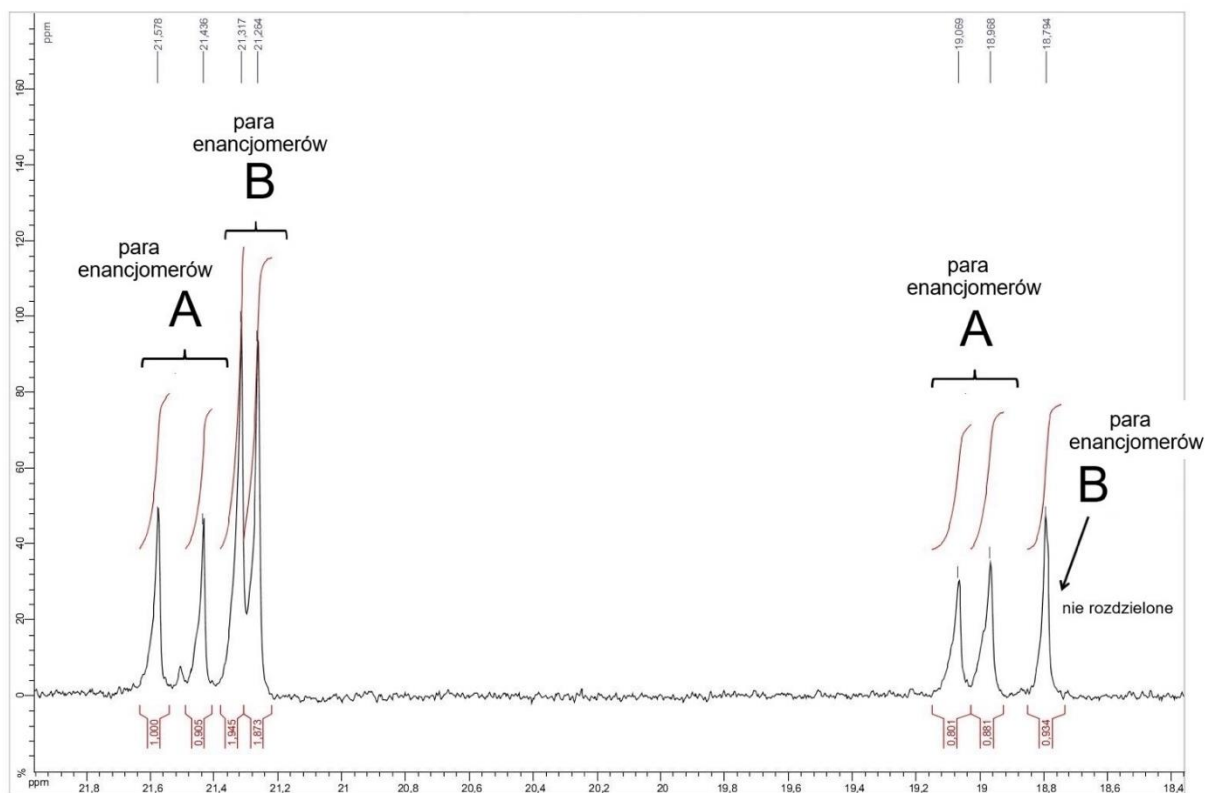
Prowadziłam również badania nad enancjoselektywną hydrolizą butyryloksyfosfinianów **5**, część tych badań została opisana w pracy **H9**,<sup>41</sup> gdzie jako substrat biotransformacji został użyty związek **5c** powstały podczas reakcji opisanej na schemacie 3. Reakcje biotransformacji (Schemat 9) z zastosowaniem całych komórek szczepu *E. coli* zaszły z dosyć wysoką enancjoselektywnością sięgającą 32,1, a nadmiary enancjomeryczne nieprzereagowanego substratu przekraczały 99%.



Schemat 9. Reakcje biokatalizacyjnej hydrolizy związku **5c**.

Biotransformacje butyryloksyfosfinianu **9a** z użyciem całych komórek szczepów *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* oraz *Serratia liquefaciens* wykonałam i opisałam w pracy **H6**.<sup>39</sup> Komórki tych bakterii przed zastosowaniem ich jako biokatalizatorów były hodowane w specjalnych pożywkach lipolitycznych składających się z: 1% (w/v) skrobi rozpuszczalnej, 0,1% (w/v) ekstraktu z drożdży, 0,5% (w/v) siarczanu amonu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2% (w/v) wodorofosforanu potasu K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,01% (v/v) tributyryny, rozpuszczone w wodzie destylowanej. Natomiast reakcje biotransformacji prowadzone były w 0,017 M buforze fosforanowym (pH = 7,0). Niestety wszystkie reakcje zaszły z niewielką enancjoselektywnością sięgającą tylko 1,9 w przypadku zastosowania komórek *B. subtilis* jako biokatalizatora.

Ciekawe rezultaty osiągnęłam w przypadku hydrolizy butyryloksyfosfonianów **10** całymi komórkami bakterii (praca **H4**).<sup>38</sup> W większości przypadków, szczególnie podczas biotransformacji szczepem *B. subtilis*, doszło do reakcji hydrolizy nie poszczególnych enancjomerów, gdyż nadmiary enancjomeryczne były poniżej 5%, ale całych par enancjomerów (Rysunek 12), pozwoliło to rozdzielić diastereoizomery z nadmiarami dochodzącymi do 59% (7 dni biotransformacji związku **10b**).



Rysunek 12. Widmo  $^{31}\text{P}$  NMR z chininą (jako chiralnym czynnikiem solwującym) po reakcji biotransformacji związku **10a** całymi komórkami szczepu *Bacillus subtilis* po 6 dniach. Po lewej produkt – hydroksyfosfonian **7a**, po prawej – nieprzereagowany substrat **10a**.

Ostatnim etapem prowadzenia enancjoselektywnych reakcji całymi komórkami biokatalizatorów była hydroliza 1-butyryloksy-1-karbosyfosfonianów **11**. W przypadku wyników opisanych w publikacji H10<sup>45</sup> zastosowałam szczepy *B. subtilis*, *E. coli* i *P. fluorescens* do reakcji hydrolizy związku **11a**. Reakcje te zaszły z umiarkowaną enancjoselektywnością sięgającą 7,6 w przypadku zastosowania szczepu *B. subtilis*, a nadmiary enancjomeryczne powstającego hydroksyfosfonianu **8a** sięgały 72%. Gdy stosowałam całe komórki bakterii, podobnie jak w przypadku enzymatycznej hydrolizy lipazami powstający produkt **8a** miał konfigurację (*R*).

#### 4.4.3. Badania nad poprawą enancjoselektywności reakcji

Reakcje estryfikacji hydroksyfosfonianów i hydrolizy ich pochodnych estrowych za pomocą lipaz i całych komórek mikroorganizmów nie zawsze zachodzą enancjoselektywnie, zależy to przede wszystkim od aktywności enzymu (jak można było zobaczyć na przykładzie modelowych

hydroksyfosfonianów **2** w pracy H3<sup>24</sup>), ale także od środowiska reakcji.<sup>54</sup> W trakcie badań opisanych w pracy H2<sup>27</sup> próbowałam zmieniać środowisko reakcji enzymatycznych poprzez zastosowanie różnych dodatków. W przypadku reakcji hydrolizy butyryloksyfosfinianów **5** katalizowanej enzymatycznie zastosowałam czynniki zapobiegające agregacji białek enzymatycznych (roztwory soli LiCl, MgCl<sub>2</sub> oraz triton X-100). Przeprowadziłam na początku reakcje hydrolizy lipazą z *Candida cylindracea* związków **5a** i **5c** w eterze diizopropylowym nasyconym wodą lub roztworami wodnymi soli: LiCl i MgCl<sub>2</sub> oraz 2% roztworem Tritonu X-100 metodą opisaną przez Okamoto i Ueji.<sup>54</sup> Jednak nie zauważyłam znaczącego wpływu tych substancji na szybkość reakcji enzymatycznej czy enancjoselektywność reakcji. Natomiast zmiana środowiska reakcji hydrolizy z układu dwufazowego na rozpuszczalnik organiczny nasycony wodą wiąże się ze znacznym spadkiem aktywności lipazy. Pomimo zastosowania ponad pięciokrotnie większej ilości enzymu, czas reakcji wymagał siedmiokrotnego wydłużenia w przypadku reakcji hydrolizy związku **5c**. W związku z tym postanowiłam sprawdzić, jak wpłyną powyższe dodatki na aktywność lipazy z *Candida cylindracea* w układzie dwufazowym. Niestety również i w tym przypadku nie zaobserwowałam zwiększenia enancjoselektywności reakcji, a jedynie w przypadku zastosowania roztworu Tritonu X-100 można zaobserwować wzrost szybkości reakcji (wyższy stopień przereagowania).

W tej samej publikacji (praca H2)<sup>27</sup> opisałam zastosowanie zasadowych dodatków takich jak pirydyna i trietyloamina w celu poprawy enancjoselektywności lipaz z *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger* i *Mucor javanicus*. Wszystkie te lipazy wykazują średnią lub dobrą enancjoselektywność wobec związku **3a**. Jak można było zaobserwować w przypadku dodania trietyloaminy do reakcji transestryfikacji wszystkimi zastosowanymi lipazami wzrosły nadmiary enancjomeryczne otrzymanego produktu **5a**.

Poprawę enancjoselektywności biotransformacji w przypadku reakcji całymi komórkami można uzyskać wpływając na różne parametry hodowli komórkowych. Aktywność większości lipaz bakteryjnych jest zwykle indukowana poprzez dodatek kwasów tłuszczowych i olejów do podłoża, w którym są hodowane.<sup>55,56,57</sup> Również inne dodatki takie jak tributyrina, czy środki powierzchniowo czynne, mogą indukować aktywność lipolityczną.<sup>58,59</sup> Dotychczas stosowałam dobrze poznane podłoże hodowlane dla bakterii składające się z: 1% (w/v) skrobi rozpuszczalnej, 0,1% (w/v) ekstraktu z drożdży, 0,5% (w/v) siarczanu amonu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2% (w/v) wodorofosforanu potasu K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

<sup>54</sup> Okamoto T., Ueji S.; *Biotechnology Lett.*, 22 (2000) 1169-1171

<sup>55</sup> Joseph, B., Ramteke, P.W., Kumar, P. A. J.; *Gen. Appl. Microbiol.*, 52 (2006) 315-320

<sup>56</sup> Immanuel G., Esakkiraj P., Jebadhas A., Iyapparaj P., Palavesam A.; *Food Technol. Biotechnol.*, 46 (2008) 60-65

<sup>57</sup> Kiran G. S., Shanmughapriya S., Jayalakshmi J., Selvin J., Gandhimathi R., Sivaramakrishnan S., Arunkumar M., Thangavelu T., Natarajaseenivasan K.; *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 31 (2008) 483-492

<sup>58</sup> Sharma R., Chisti Y., Banerjee U. C.; *Biotechnol Adv.*, 19 (2001) 627- 662

<sup>59</sup> PrasannaRajeshkumar M., Mahendran V. S., Balakrishnan V.; *I.J.S.N.*, 6 (2015) 183-187

0,01% (v/v) tributyny, rozpuszczone w wodzie destylowanej (prace H3<sup>24</sup> i H6<sup>39</sup>). Również stosowana dotychczas procedura była ustalona, a mianowicie po 24 godzinach inkubacji, mikroorganizm odwirowywałam i przenosiłam do 0,017 M buforu fosforanowego o pH = 7,0, w którym przeprowadzałam reakcje biotransformacji. W badaniach opisanych w publikacji H8<sup>25</sup> opisałam zmiany jakie dokonałam zarówno w rodzaju podłoża hodowlanego, jak i w metodzie przeprowadzania reakcji biotransformacji. W badaniach tych zastosowałam butyryloksyfosfonian **4a**. We wcześniejszych badaniach przeprowadziłam cało-komórkową hydrolizę tego związku (praca H3<sup>24</sup>), dzięki czemu mogłam wybrać odpowiedni szczep, którym okazał się *Bacillus subtilis*. Jak można zauważyć zmiana metody procesu reakcji biotransformacji na proste dodawanie substratu do podłoża hodowlanego zawierającego badany mikroorganizm (metoda 1) znacząco przyspiesza sam proces biotransformacji (jest to związane z tym, że potrzebne lipazy już zostały wydzielone przez mikroorganizm do podłoża), a jednocześnie w większości przypadków poprawia enancjoselektywność reakcji. Stosowanie w tym przypadku dodatku indukującego lipazy jakim była tributyna miało w większości przypadków niewielki pozytywny efekt na zwiększenie ilości wyprodukowanych przez mikroorganizm tych enzymów i przyspieszenie reakcji biotransformacji (gdy zastosowana została metoda 2 polegająca na odwirowywaniu mikroorganizmu hodowanego na podłożu bulionowym i zawieszeniu biomasy w buforze można zaobserwować wręcz wydłużenie czasu reakcji biotransformacji). To niewielkie przyspieszenie czasu reakcji odbyło się jednak kosztem enancjoselektywności. Porównując wyniki otrzymane dla metody dotychczas stosowanej (metoda 2) gdy hodowla jest przeprowadzana w podłożach A1 czy A2 (podłoże dotychczas stosowane bez dodatku tributyny, oraz z takim dodatkiem), oraz B1 (podłoże bulionowe) można zauważyć, że zastosowanie zwykłego podłoża bulionowego powoduje zwiększenie ilości wyprodukowanych przez mikroorganizm lipaz, a tym samym reakcje biotransformacji zachodzą szybciej. Wyniki tych badań mocno sugerują, że dodatek tributyny w przypadku hodowli bakterii wykorzystywanych do reakcji biotransformacji estrów hydroksyfosfonianów jest niepotrzebny i dodatkowo lepiej jest zastosować proste podłoże bulionowe niż skomplikowane i trudne w przygotowaniu podłoże lipolityczne A2. Wnioski te zostały dodatkowo potwierdzone dla 1-butyryloksy-1-karboksyfosfinianu **9a** (praca H6<sup>39</sup>). W tym przypadku szybkość reakcji biotransformacji tego związku do hydroksyfosfinianu **6a** zwiększyła się nieznacznie (stopień konwersji z 49/47% wzrósł do 54/51%), natomiast można zauważyć znaczącą poprawę enancjoselektywności (wzrost z 2,4/2,9 do 27,6/9,4).

#### 4.4.4. Nazewnictwo hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów oraz przypisanie deskryptorów konfiguracji absolutnej na stereogenicznym atomie fosforu

Zanim przejdę do omówienia zagadnienia związanego z samym określeniem konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów omówię tutaj różnice w nazewnictwie, które występują w moich publikacjach, a także różnice w przypisywaniu konfiguracji absolutnej na stereogenicznym atomie fosforu.

Jeżeli chodzi o różnice w nazewnictwie, to wynikają one przede wszystkim z ewoluowania mojej wiedzy na temat hydroksyfosfinianów z dwoma centrami stereogenicznymi zawierającymi w swojej strukturze zarówno ugrupowanie fosforylowe, estrowe, hydroksylowe oraz karboksylowe. Trzon nazwy początkowo (zresztą poprawnie) opierał się na starszeństwie struktury macierzystej, czyli grupie fosfonowej (lub fosfinowej) pochodzącej od kwasu fosfonowego (lub kwasu fosfinowego). W publikacjach **H1**<sup>26</sup> i **H2**<sup>27</sup> związki **3a** (1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinian etylu), **3b** (1-hydroksy-2-metylopropano(*P*-fenylo)fosfinian etylu), **3c** (1-hydroksyfenylometano(*P*-fenylo)fosfinian etylu) i **3d** (1-hydroksy-3,4-metoksyfenylometano(*P*-fenylo)fosfinian etylu) zostały nazwane właśnie w oparciu o taką konstrukcję. W kolejnych latach rozpoczęłam badania nad hydroksyfosfinianami zawierającymi dodatkowo grupę karboksylową. W publikacjach **H4**<sup>38</sup>, **H6**<sup>39</sup> i **H7**<sup>40</sup>, które ukazały się w latach 2013-2016, nazewnictwo oparłam o strukturę macierzystą, którą stanowił kwas octowy. Zaproponowałam dla związku **6a** nazwę kwas 2-hydroksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowy ze względu na znalezione w bazie Reaxys<sup>60</sup> nazwy podobnych związków pochodnych kwasu fosfonooctowego. Zresztą sama nazwa „kwas fosfonooctowy” jest zgodna z rekomendacjami IUPAC (*Preferred IUPAC Name* – PIN). Dodatkowo po przeczytaniu rekomendacji IUPAC, które ukazały się w książce: „Nomenclature of Organic Chemistry: IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013”,<sup>61</sup> w których znalazłam informację, że nazwy powinny brać pod uwagę struktury macierzyste oparte na starszeństwie klas, gdzie kwasy mają starszeństwo przed estrami utwierdziłam się w przekonaniu, że prawidłowo wybrałam strukturę macierzystą. Jednak nie do końca prawidłowo nazwałam związek **6a**, gdyż powinien on mieć nazwę kwas 2-hydroksy-2-(etoksyfenylofosforylo)octowy. W kolejnych latach, po głębszych analizach nazw związków fosforoorganicznych, postanowiłam powrócić do pierwotnej wersji nazewnictwa opierającego się na strukturze macierzystej pochodzącej od kwasu fosfonowego (lub kwasu fosfinowego), gdyż aby nazwać związki organiczne zawierające atomy pierwiastków z grup 14-17 lub Bor można użyć

<sup>60</sup> <https://www.reaxys.com>

<sup>61</sup> H. A. Favre, W. H. Powell; Nomenclature of Organic Chemistry: IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013; ISBN 978-0-85404-182-4; published by The Royal Society of Chemistry (2013)

nomenklatury podstawnikowej. Aby nazwać tą metodą związki fosforoorganiczne najpierw należy wybrać nazwy dla macierzystych wodorków lub innych struktur macierzystych nie zawierających atomów węgla. Kolejno związki **8a-c** oraz **11a-c** zostały nazwane odpowiednio 1-hydroksy-1-karboksyfosfonianami dietylu, dimetylu i dibutyłu oraz 1-butyryloksy-1-karboksyfosfonianami dietylu, dimetylu i dibutyłu.

Podobną ewolucję również można znaleźć w moich publikacjach, jeśli chodzi o przypisywanie deskryptorów konfiguracji absolutnej na stereogenicznym atomie fosforu. O ile jednak nazwy, w przypadku zmiany trzonu, dalej opisują te same związki i nie są one niepoprawne, co najwyżej mogą nie być rekomendowane (inne niż PIN), o tyle zmiana deskryptorów określających konfigurację może pociągnąć niepotrzebne konsekwencje złego zrozumienia budowy przestrzennej izomerów hydroksyfosfinianów. Problem jest o tyle istotny, że sami naukowcy nie są zgodni (choć w tym miejscu należałoby, mam nadzieję, użyć czasu przeszłego) co do tego jaki atom połączony z atomem fosforu ma starszeństwo zgodnie z regułą Cahn-Ingolda-Preloga (CIP). Z jednej strony, jeżeli zasady dotyczące wiązań podwójnych pomiędzy atomem tlenu i atomem węgla (C=O) mówiące, że wiązanie to traktuje się jak dwa pojedyncze wiązania, w tym jedno C-O-(C), oraz drugie C-O, zastosujemy do związków fosforoorganicznych, to wiązanie podwójne pomiędzy atomem tlenu, a atomem fosforu (P=O) możemy potraktować jak dwa wiązania pojedyncze P-O, w tym jedno P-O-(P). W takim przypadku tlen grupy fosforylowej (-P=O) będzie miał starszeństwo nad ugrupowaniem estrowym (-P-O-C-) przyłączonym do atomu fosforu. Takie podejście stosowałam na początku swoich badań naukowych (prace **H1**<sup>26</sup> oraz **H2**<sup>27</sup>). Jednak wielu innych autorów publikacji, związanych z badaniami nad związkami fosforoorganicznymi, uważa, że grupa estrowa (-P-O-C-) jest starsza od grupy fosforylowej (-P=O), gdyż wiązanie P=O traktowane jest jak wiązanie semipolarne P→O.

W 2013 roku ukazały się rekomendacje IUPAC dotyczące nomenklatury związków organicznych w postaci wspomnianej już książki,<sup>61</sup> w której znalazłam (w rozdziale P-9 str. 1216) rysunek (*S*)-[metylo(fenylo)fosfinianu] metylu – związku zawierającego stereogeniczny atom fosforu oraz wyjaśnienie, że wiązanie P=O należy traktować jak pojedyncze P-O, ponieważ w konfiguracji tetraedrycznej mogą wystąpić tylko cztery ligandy (atomy lub grupy). Chociaż w książce tej są rekomendacje dotyczące nazewnictwa związków, to jednak uznałam ten przykład jako wskazówkę do poprawnego przypisywania konfiguracji absolutnej na stereogenicznym atomie fosforu i od roku 2013 stosuję już takie podejście oznaczania starszeństwa podstawników połączonych z tym atomem. Dodatkowo w 2016 roku ukazała się książka pt.: „Asymmetric Synthesis in Organophosphorus

Chemistry: Synthetic Methods, Catalysis, and Applications”<sup>62</sup> autorstwa jednego z najwybitniejszych naukowców zajmujących się związkami fosforoorganicznymi Olega I. Kolodiazhnyi’ego, w której (rozdział 1 str. 4) autor wskazując między innymi na rekomendacje IUPAC wyjaśnia, że wiązanie P=O nie jest takim samym wiązaniem podwójnym jak C=O i starszeństwo podstawników należy przypisywać w kolejności Alk < P=O < R–O–P.

#### 4.4.5. Określanie konfiguracji absolutnej

Jednym z największych wyzwań podczas mojej pracy naukowej było ustalenie konfiguracji absolutnej produktów biotransformacji. W przypadku związków **2a** i **2b** korelacja pomiędzy skręcalnością optyczną a konfiguracją absolutną była znana, więc w tym przypadku jedynym wyzwaniem było powiązanie tych danych z sygnałami otrzymanymi na widmach <sup>31</sup>P NMR z dodatkiem chininy oraz z pikami na chromatogramach HPLC. W ten sposób można było określić konfigurację absolutną zarówno hydroksyfosfonianów **2** jak i ich estrów **4**.

W przypadku związków zawierających tylko jedno centrum stereogeniczne na atomie węgla od dawna wykorzystuje się metody oparte na technikach NMR z zastosowaniem chiralnych pomocników. W przypadku analizowanych związków zawierających w swojej strukturze atom fosforu możliwe jest określenie konfiguracji absolutnej nie tylko za pomocą widm <sup>1</sup>H NMR, ale również <sup>31</sup>P NMR. W publikacji H5<sup>34</sup> omówiłam szerzej to zagadnienie. Do określania konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów najczęściej stosuje się chiralne czynniki derywatywizujące takie jak: kwas  $\alpha$ -metoksy- $\alpha$ -trifluorometylofenylooctowy (MTPA) i kwas  $\alpha$ -metoksyfenylooctowy (MPA), za pomocą podwójnej derywatywizacji. Jednak ze względu na racemizację powstających estrów kwasu  $\alpha$ -metoksyfenylooctowego (wiąże się to z obecnością kwasowego protonu w pozycji  $\alpha$ ),<sup>63</sup> związek ten jest mniej popularny. Pomimo iż można wyeliminować ten problem stosując optymalizację warunków derywatywizacji,<sup>64</sup> to i tak korzystniejsze jest stosowanie czystych enancjomerów MTPA (najlepiej w postaci chlorków kwasowych). Właśnie takie podejście zastosowałam w przypadku określenia konfiguracji na stereogenicznym atomie węgla wszystkich hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów, dla których udało mi się określić konfigurację absolutną.

Hydroksyfosfiniany **3a-c** były już wcześniej badane przeze mnie<sup>50,51,65</sup> oraz przez Shioji i współpracowników.<sup>31</sup> W przypadku związku **3a-c** określili oni konfigurację na atomie węgla dla

<sup>62</sup> Kolodiazhnyi O. I.; *Asymmetric Synthesis in Organophosphorus Chemistry: Synthetic Methods, Catalysis and Applications*, First Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. (2017)

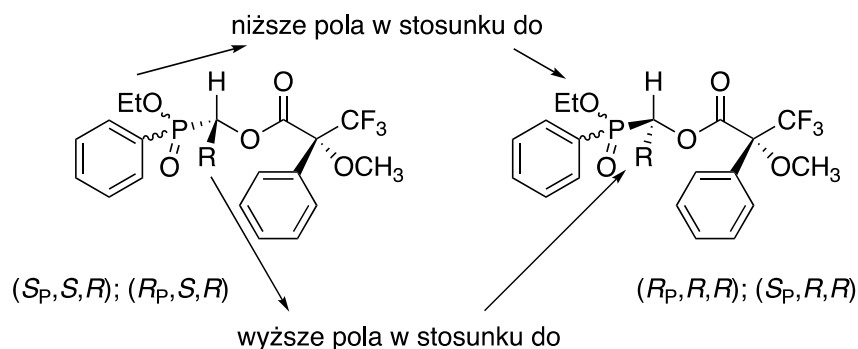
<sup>63</sup> Dale J., Mosher H.; *J. Am. Chem. Soc.*, 95 (1973) 512-519

<sup>64</sup> Trost B. M., Belletire J. L., Godleski S., McDougal P. G., Balkovec J. M.; *J. Org. Chem.*, 51 (1986) 2370-2374

<sup>65</sup> Majewska P., Kafarski P., Lejczak B., Bryndal I., Lis T.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 17 (2006) 2697-2701

jednej pary enancjomerów stosując (*R*)-MTPA-Cl. Chociaż popełnili błąd, gdyż chlorek MTPA o konfiguracji (*R*) daje po derywatywacji ester o konfiguracji (*S*), to jednak dzięki tej pracy mogłam ustalić konfigurację absolutną wszystkich hydroksyfosfinianów **3a-c** i ich estrów **5a-c**, gdyż ustalili oni również konfigurację na stereogenicznym atomie fosforu dla jednej pary enancjomerów związków **3a-c**. Określania konfiguracji absolutnej związków **3a** oraz **3c** nie będę tutaj opisywać, gdyż zostało to przeze mnie omówione w publikacjach<sup>51,65</sup> niewchodzących w skład osiągnięcia, o którym mowa w punkcie 4.2 niniejszego autoreferatu.

W publikacji **H1**<sup>26</sup> opisałam metodę określania konfiguracji absolutnej na atomie węgla dla wszystkich izomerów związków **3b** oraz **3d** za pomocą (*S*)-MTPA-Cl. W przypadku, gdy stosowany jest jeden enancjomer CDA, należy otrzymać różnomolową mieszaninę enancjomerów analizowanego związku. Jednak oba omawiane hydroksyfosfiniany zawierają dwa centra stereogeniczne, co utrudnia analizę. Musiałam otrzymać różnomolową mieszaninę wszystkich izomerów. Pozwoliło mi to na dokładne zbadanie korelacji pomiędzy konformacją izomerów, a przesunięciami chemicznymi derywatów na widmach <sup>1</sup>H (Rysunek 13).



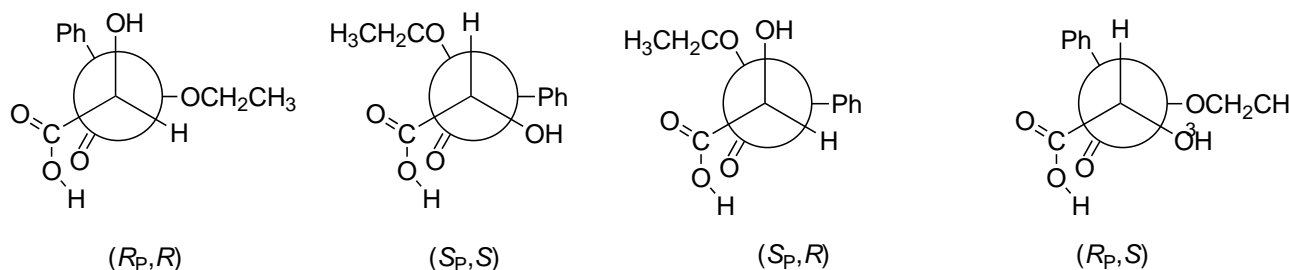
Rysunek 13. Określanie konfiguracji absolutnej na atomie węgla.

Dzięki badaniom Shoi i współpracowników<sup>31</sup> mogłam określić konfigurację absolutną wszystkich izomerów hydroksyfosfinianu **3b** i jego estru **5b**. W przypadku związku **3d** nie było takich badań, a dodatkowo nie udało mi się otrzymać kryształów na badania krystalograficzne, co pozwoliłoby na określenie konfiguracji na atomie fosforu. W pracy **H1**<sup>26</sup> podjęłam próbę opisanie zależności konfiguracji absolutnej na atomie fosforu od przesunięć chemicznych na widmach <sup>31</sup>P NMR z dodatkiem chininy. Dodatkowo założenia te zostały potwierdzone przez badania teoretyczne wykonane przez dr Marka Doscocza. Dzięki temu możliwe było określenie konfiguracji absolutnej wszystkich izomerów związku **3d** oraz jego estru **5d**.

Kolejnym hydroksyfosfinianem zawierającym dwa centra stereogeniczne jest związek **6a**. W publikacji **H6**<sup>39</sup> opisałam określenie jego konfiguracji absolutnej na podstawie dwuwymiarowych



widm NMR tego związku oraz widm  $^1\text{H}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR estru powstałego po derywatywacji z (*S*)-MTPA-Cl. Na początku założyłam, że związek zawierający wolną grupę kwasową będzie tworzył wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe pomiędzy atomem wodoru (-COOH), a atomem tlenu grupy fosforylowej (-P=O), co będzie stabilizowało konformacje pokazane na projekcji Newmana (rysunek 14).



Rysunek 14. Projekcja Newmana izomerów związku **6a**.

Założenie to zostało potwierdzone w praktyce dzięki analizie widm  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  NMR oraz dwuwymiarowych NOESY hydroksyfosfinianu **6a** oraz jego estru **9a** zawierających różnomolowy stosunek par enancjomerów. Dzięki temu możliwe było przypisanie konfiguracji absolutnej wszystkich izomerów produktów biotransformacji.

Natomiast w przypadku hydroksyfosfinianu **6b** możliwe było jedynie przypisanie konfiguracji absolutnej par enancjomerów, których sygnały na widmie  $^{31}\text{P}$  NMR mają inne przesunięcia chemiczne (są względem siebie diastereoizomerami), co opisałam w pracy **H9**<sup>41</sup>. Podobnie jak w poprzednim przypadku było to możliwe dzięki analizie widm  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  i NOESY różnomolowej mieszaniny par enancjomerów hydroksyfosfinianu **6b**. Ponieważ jednak nie udało mi się otrzymać jego estru, w związku z tym nie mogłam przeprowadzić reakcji biotransformacji pozwalającej na uzyskanie różnomolowej mieszaniny wszystkich izomerów.

Niestety również z powodu braku różnomolowej mieszaniny wszystkich izomerów związków **7a-b** nie udało mi się określić ich konfiguracji absolutnej oraz ich estrów **11a-b**.

Z kolei badania takie wykonałam dla hydroksyfosfinianów **8a-c**, co zostało opisane w publikacjach **H10**<sup>45</sup> i **H11**<sup>46</sup>. Podobnie jak w poprzednich przypadkach zastosowałam metodę opartą na użyciu (*S*)-MTPA-Cl jako CDA. Początkowo dzięki reakcjom biotransformacji otrzymałam różnomolową mieszaninę enancjomerów tych związków, co pozwoliło na analizę korelacji struktur otrzymanych estrów MTPA z widmami  $^1\text{H}$  oraz  $^{31}\text{P}$  NMR. Dzięki tej metodzie mogłam określić konfigurację absolutną hydroksyfosfinianów **8 a-c** oraz ich estrów **11a-c**.

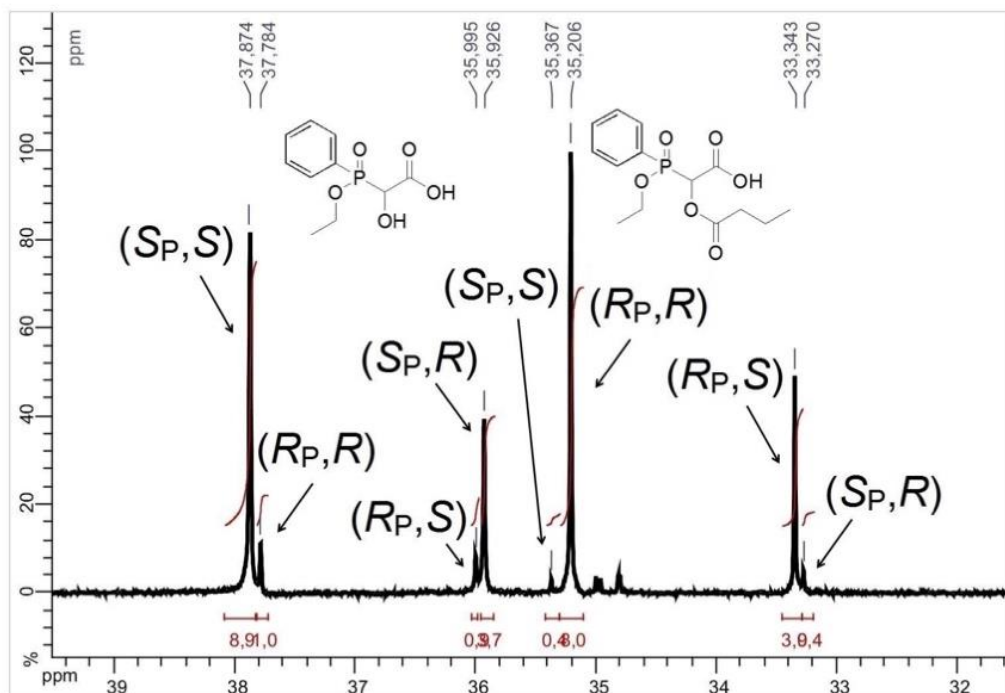
#### 4.5. Podsumowanie

W przedstawionym cyku publikacji można wyróżnić następujące osiągnięcia:

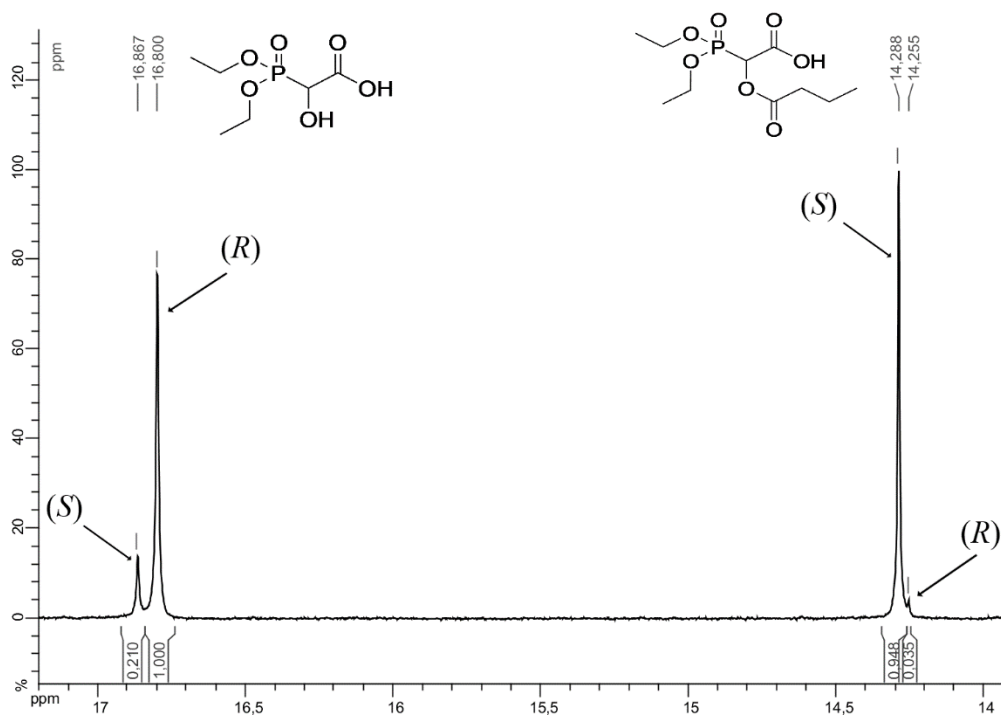
- zbadanie potencjału hydrolitycznego lipaz różnego pochodzenia i mikroorganizmów o właściwościach lipolitycznych wobec modelowych hydroksyfosfonianów, oraz sprawdzenie możliwości wykorzystania lipaz w reakcjach estryfikacji tych związków,
- otrzymanie z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (w niektórych przypadkach sięgającymi >99%) szeregu związków fosforoorganicznych zawierających ugrupowanie hydroksylowe, dzięki czemu będę mogła w przyszłości sprawdzić ich zastosowanie jako chiralne pomocniki,
- zbadanie zależności pomiędzy modyfikacją medium reakcyjnego różnymi dodatkami, a enancjoselektywnością lipaz, dzięki czemu możliwe było wytypowanie trietyloaminy jako związku, który może poprawić wyniki dla reakcji transestryfikacji,
- znalezienie optymalnego medium hodowlanego oraz medium reakcyjnego dla biotransformacji całymi komórkami bakterii, które z powodzeniem stosowałam w kolejnych etapach moich badań,
- zbadanie zależności wpływu chiralnego czynnika solwującego – chininy na konfigurację absolutną hydroksyfosfinianów zawierających dwa centra stereogeniczne, dzięki czemu można było określić konfigurację na atomie fosforu dla jednego z hydroksyfosfinianów,
- ustalenie konfiguracji absolutnej większości badanych związków, co było dużym wyzwaniem szczególnie jeśli chodzi o hydroksyfosfiniany zawierające w swojej strukturze dwa centra stereogeniczne (na atomie fosforu i na  $\alpha$ -atomie węgla).

#### 4.6. Plany badawcze

Hydroksyfosfoniany i hydroksyfosfiniany (a także ich estry) zawierające w swojej strukturze dodatkowe ugrupowanie karboksylowe otrzymane z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi okazały się posiadać właściwości chiralnych czynników solwujących wobec samych siebie (tzw. samodyskryminacja) i na widmach  $^{31}\text{P}$  NMR można wyraźnie zauważyć sygnały od wszystkich enancjomerów nawet przy zastosowaniu achiralnego środowiska (rysunki 15 i 16, prace H6<sup>39</sup> i H10<sup>45</sup>).

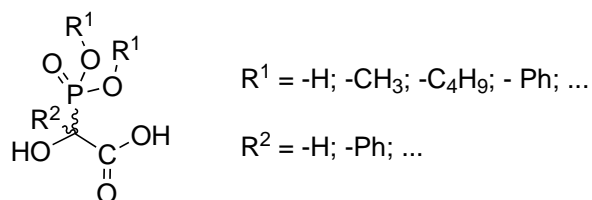


Rysunek 15. Widmo  $^{31}\text{P}$  NMR po biotransformacji związku **9a** za pomocą całych komórek *Bacillus subtilis*.



Rysunek 16. Widmo  $^{31}\text{P}$  NMR po biotransformacji związku **11a** za pomocą lipazy pochodzącej z grzyba *Aspergillus niger*.

Obserwacja ta potwierdza założenia, że związki te mogą być dobrymi chiralnymi pomocnikami, jednak wymaga to dalszej weryfikacji. Próby zastosowania hydroksyfosfinianu **6a** jako chiralnego pomocnika zostały podjęte przeze mnie i opisane w *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*.<sup>66</sup> Problemem w tym przypadku była obecność w strukturze dwóch centrów stereogenicznych (na atomie węgla i atomie fosforu), co znacznie utrudnia otrzymanie tych związków w postaci czystych optycznie izomerów. Natomiast analiza oparta na różnomolowej mieszaninie izomerów jest trudna w interpretacji nawet w przypadku widm <sup>31</sup>P NMR. Zastosowanie związków zawierających jedno centrum stereogeniczne da odpowiedź, czy hydroksykarboksyfosfoniany są dobrymi chiralnymi pomocnikami. Aby móc to sprawdzić należy otrzymać te związki z jak największymi nadmiarami enancjomerycznymi i w dużej ilości. W związku z tym w pierwszym etapie planuję poprawić enancjoselektywność biokatalizatorów poprzez dalsze modyfikacje środowiska reakcji (w przypadku całych komórek mikroorganizmów również medium hodowlanego). Wstępne badania dotyczące zastosowania całych komórek grzybów (prace H7<sup>40</sup> i H10<sup>45</sup>) też dały dobre rezultaty i planuję kontynuację tych badań. W kolejnym etapie wybiorę metodę, która da najlepsze nadmiary enancjomeryczne i powiększę skalę w celu otrzymania hydroksykarboksyfosfonianów w ilości pozwalającej na sprawdzenie ich zastosowania jako chiralnych pomocników. Ta część będzie obejmowała przeprowadzenie szeroko zakrojonych kompleksowych badań, mających na celu wyselekcjonowanie najlepszych i posiadających najszerszy zakres działania jako CDA. Wykonam to poprzez derywatyzację z czystymi optycznie i racemicznymi komercyjnie dostępnymi aminami, alkoholami, kwasami karboksylowymi, tiolami oraz związkami zawierającymi kilka centrów asymetrii i posiadającymi ugrupowania nukleofilowe. Ponadto czyste enancjomerycznie chiralne pomocniki zostaną przebadane pod względem możliwości ich zastosowania jako CSA poprzez badania spektroskopowe z zastosowaniem <sup>31</sup>P NMR. Planuję również poszerzyć ilość badanych hydroksykarboksyfosfonianów o nowe struktury (Rysunek 17).



Rysunek 17. Przykładowe struktury planowanych potencjalnych chiralnych pomocników.

<sup>66</sup> Majewska P.; *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements.*, 194 (2019) 585-590

## 5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

---

### 5.1. Cyklolinopeptydy

Poza osiągnięciem opisanym w punkcie 4 aktywnie rozwijam się naukowo również w innych tematach należących do dyscypliny naukowej: nauki chemiczne. Już podczas pracy magisterskiej wykonywanej pod kierunkiem prof. Ignacego Zenona Siemiona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego brałam udział w badaniach naukowych, które były prezentowane na dwóch konferencjach i stały się podstawą rozdziałów w książkach opublikowanych po tych konferencjach.<sup>67,68</sup>S, 4*R*]  $\gamma$ -amino-N-metyloprolina) z lnu austriackiego. Ten cykliczny peptyd był wcześniej wyizolowany z lnu zwyczajnego i scharakteryzowany przez dr Bolesława Picura. Podczas pracy badawczej poznałam wiele technik laboratoryjnych takich jak NMR, HPLC, MS, dzięki czemu mogłam je wykorzystywać w późniejszej karierze naukowej, w szczególności w osiągnięciach opisanych w punkcie 4.

### 5.2. Biotransformacje hydroksyfosfinianów z dwoma centrami stereogenicznymi (prace niewchodzące w skład osiągnięcia opisanego w punkcie 4)

W latach 2002-2007 kontynuowałam karierę naukową na studiach doktoranckich na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Lejczak oraz nieformalną opieką prof. dr hab. inż. Pawła Kafarskiego. Podczas moich studiów doktoranckich powstały 3 publikacje<sup>50,51,65</sup> związane z tematyką pracy, a osiągnięte wyniki prezentowałam na 4 konferencjach krajowych i zagranicznych. Rozprawę doktorską zatytułowaną „Biotransformacje hydroksyfosfinianów z asymetrycznym atomem fosforu” obroniłam z wyróżnieniem w dniu 23.05.2007, a stopień doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia uzyskałam 30.05.2007.

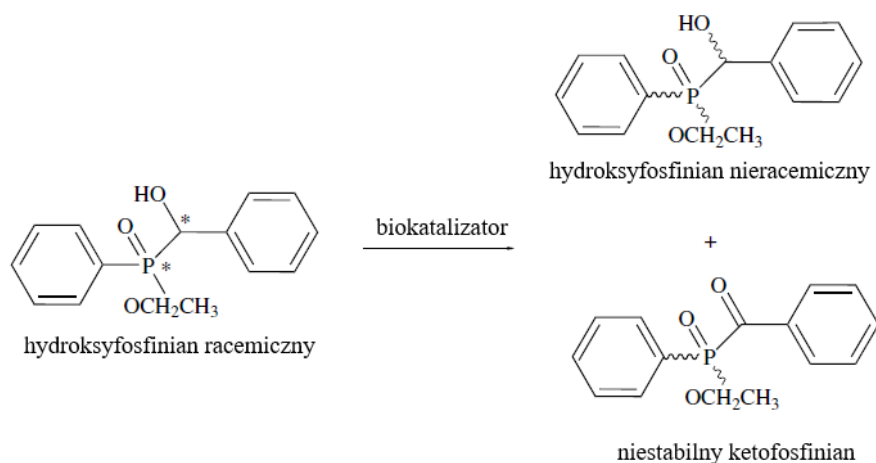
---

<sup>67</sup> Brzezicka A., Chliszcz P., Lisowski M., Olejarnik M., Ruchała P., Śpiewak K., Siemion I. Z., Picur B.; Cyclic peptides from different flaxes; Chemical products in agriculture and environment. Ed. by H. Górecki, Z. Dobrzański, CZECH-POL TRADE, Prague (2002) 182-187; ISBN 80-238-8784-X

<sup>68</sup> Picur B., Ruchała P., Cierpicki T., Lisowski M., Chliszcz P., Siemion I. Z.; The structure of new cyclolinopeptide CLX; Arthropods: chemical, physiological and environmental aspects 2001 ed. by Danuta Konopińska; Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław (2002) 198-203; ISBN 83-229-2289-2

W trakcie pracy naukowej opisanej w pracy doktorskiej poznałam i udoskonalałam wiele technik laboratoryjnych, które mogłam wykorzystać w późniejszej karierze naukowej.

W trakcie studiów doktoranckich podejmowałam również współpracę z innymi członkami Zakładu, w którym wykonywałam badania opisane w pracy doktorskiej. W pracy opisanej w *Tetrahedron: Asymmetry*<sup>69</sup> podjęliśmy próbę zastosowania całych komórek grzybów w reakcji biokatalitycznego utleniania hydroksyfosfinianu **3c** zawierającego dwa centra stereogeniczne (Rysunek 18). Z uwagi na to, że  $\alpha$ -ketofosfoniany prawdopodobnie są bardzo niestabilne w środowisku wodnym, nie udało nam się zaobserwować momentu powstawania tego związku, jednak można było zauważyć ubytek enancjomerów podczas reakcji biotransformacji z zastosowaniem komórek *Geotrichum candidum* i dodatkiem szczawiooctanu (nadmiar enancjomeryczny ee sięgający 99%).



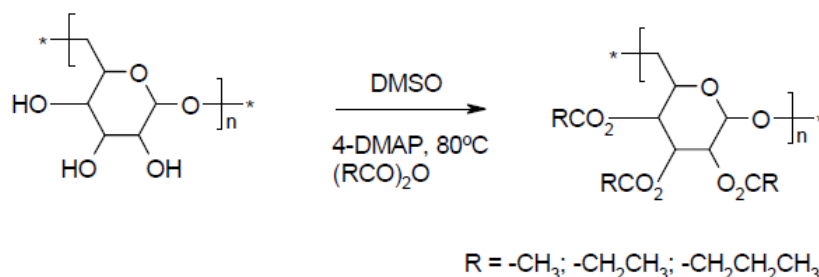
Rysunek 18. Schemat zakładanej drogi biokatalitycznego utleniania hydroksyfosfinianu.

### 5.3. Modyfikowane polimery dekstranu

Od 1 lutego 2007 zostałam zatrudniona na stanowisku stażysty podoktorskiego w Zakładzie Chemii Bioorganicznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Louisa Pasteura w Illkirch Graffenstaden we Francji (obecnie Uniwersytet Strasburski). Głównym moim zadaniem było otrzymanie modyfikowanego polimeru dekstranu mającego potencjalne zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako materiał do wytwarzania kapsulek w docelowym podawaniu leków do jelita grubego. Praca ta była prowadzona pod opieką prof. Thiery F. Vandamme i przy współpracy z dr Mustafą Beesh (wtedy doktorantem). Początkowo zajęliśmy się syntezą pochodnych estrowych

<sup>69</sup> Klimek-Ochab M., Żymańczyk-Duda E., Brzezińska-Rodak M., Majewska P., Lejczak B.; *Tetrahedron: Asymmetry*; 19 (2008) 450-453.

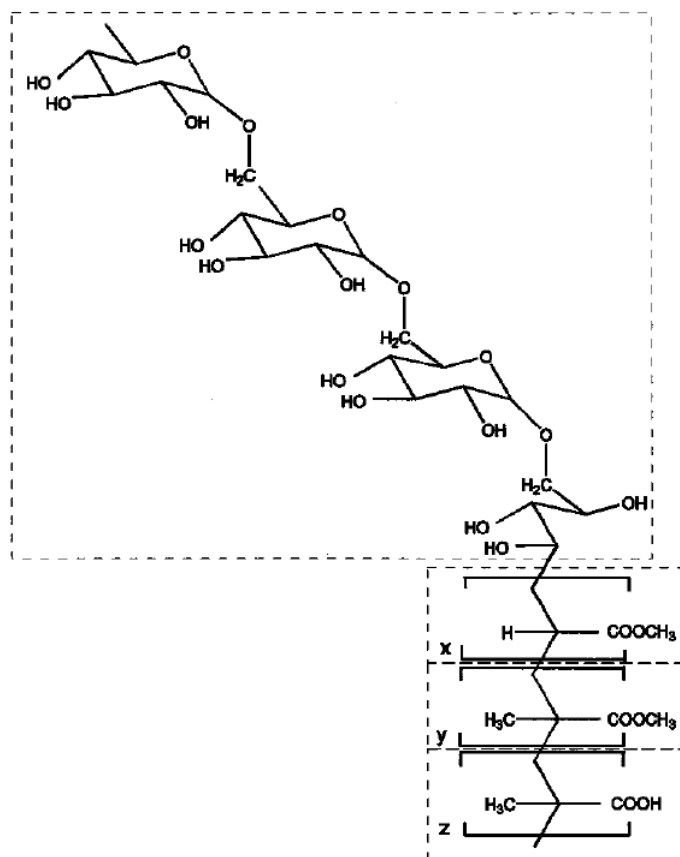
dekstranu modyfikowanych bezwodnikami kwasów: butanowego, propanowego oraz etanowego (Rysunek 19). Każda z tych pochodnych została otrzymana ze stopniem podstawienia zbliżonym do 1, 2 lub 3 (zestryfikowane 1, 2 lub 3 grupy -OH cząsteczek glukozy w polimerze dekstranu).



Rysunek 19. Schemat reakcji estryfikacji dekstranu.

Wszystkie 9 polimerów zostało przebadanych pod kątem ich rozpuszczalności oraz degradacji przez dekstranazę. Ponadto dekstran modyfikowany bezwodnikiem octowym ze stopniem podstawienia 1 został wykorzystany do wytworzenia cienkich foli (filmów), które następnie były testowane na zdolność do permeabilizacji w roztworach zbliżonych do płynów znajdujących się w przewodzie pokarmowym. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *International Journal of Drug Delivery*.<sup>70</sup> W kolejnym etapie zastosowaliśmy reakcję kopolimeryzacji do wytworzenia polimerów blokowych składających się z łańcucha dekstranu i dołączonego do niego łańcucha polimeru opartego na monomerach takich jak: metakrylan metylu (MMA), akrylan metylu (MA), czy kwas metakrylowy (MAA). Najpierw zostały zsyntetyzowane kopolimery posiadające w swojej budowie łańcuch dekstranu oraz dołączony do niego łańcuch polimeru opartego na jednym monomerze. Podobnie jak dla pochodnych estrowych dekstranu, kopolimery zostały przebadane pod kątem rozpuszczalności i degradacji dekstranazą, a także sprawdzona została długość utworzonego łańcucha. Sprawdzane były również pod kątem ich użyteczności jako materiału do tworzenia kapsułek (test permeabilizacyjny). W ostatnim etapie naszych badań z sukcesem udało nam się otrzymać kopolimer wieloblokowy (Rysunek 20) składający się z łańcucha dekstranu i kolejno do niego dołączanych łańcuchów pochodnych akrylowych (DEX-MA-MMA-MAA).

<sup>70</sup> Beesh M., Majewska P., Vandamme Th. F.; *International Journal of Drug Delivery*, 2 (2010) 22-31



Rysunek 20. Struktura kopolimeru wieloblokowego.

Badania te stały się podstawą patentu zgłoszonego we Francji (nr zgłoszenia: FR2932485A1), a następnie zgłoszenia patentu międzynarodowego (nr zgłoszenia: WO 2009/153447 A1).<sup>71</sup> Badania te nie tylko wzbogaciły mój dorobek naukowy, ale również pozwoliły mi na poznanie nowych technik analitycznych, a także na poszerzenie wiedzy i umiejętności dotyczących technik, które już znałam. Między innymi miałam okazję samodzielnie obsługiwać aparaturę NMR oraz FTIR, co pomogło mi w późniejszej pracy badawczej.

#### 5.4. Biokataliza hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów (prace niewchodzące w skład osiągnięcia opisanego w punkcie 4) oraz aminofosfonianów

W marcu 2008 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej w grupie badawczej, w której realizowałam pracę doktorską. Od tego czasu kontynuowałam badania nad biotransformacjami hydroksyfosfonianów (osiągnięcia opisane w punkcie 4), a także współpracowałam z innymi

<sup>71</sup> Vandamme T. F., Majewska P., Beesh M.; Zgłoszenie patentowe nr WO 2009/153447 A1. Forme galenique orale, procede de fabrication du polymere et utilisation. Zgłosz. nr 08/03292 z 12.06.2008. Opubl. 23.12.2009. 35 s.



członkami Zakładu oraz z innymi grupami badawczymi realizując różne tematy z dziedziny nauk chemicznych. Między innymi byłam współwykonawcą projektu badawczego POIG 01.03.01-00-158/09-00 zatytułowanego: „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym”. Projekt ten był realizowany przez konsorcjum badawcze składające się z siedmiu laboratoriów z różnych uczelni z całej Polski, a liderem był Zakład Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

Grupa badawcza prof. dr hab. inż. Jolanty Bryjak, od wielu lat zajmuje się badaniem reakcji prowadzonych przez różne enzymy oraz sprawdzaniem ich stabilności. Naturalnym więc było podjęcie współpracy dotyczącej immobilizacji lipazy z *Candida rugosa* na różnych nośnikach i sprawdzeniem wpływu tych nośników w reakcjach prowadzonych w środowisku wodnym, dwufazowym oraz w rozpuszczalnikach organicznych. W tym celu został wybrany modelowy butyryloksyfosfonian **4a**, który zsyntetyzowałam. Współpraca ta zaowocowała publikacją w *Acta Biochimica Polonica*.<sup>72</sup>

Poza zastosowaniem lipaz i mikroorganizmów o właściwościach lipolitycznych interesowały mnie również inne sposoby enancjoselektywnego otrzymywania hydroksyfosfonianów i hydroksyfosfinianów, takie jak biokatalityczne utlenianie hydroksyfosfonianów, czy redukcja ketofosfonianów. Dlatego też podjęłam współpracę z innymi członkami mojego zespołu, która dotyczyła między innymi biotransformacji hydroksyfosfinianu **6a** za pomocą grzybów strzępkowych. Podczas tych badań okazało się, że dwa z badanych mikroorganizmów (*Fusarium culmorum* oraz *Fusarium oxysporum*) mają zdolność do całkowitej biodegradacji tego związku.<sup>73</sup> Jest to bardzo ważne odkrycie, gdyż związki fosforoorganiczne posiadają z swojej budowie stabilne wiązanie C-P, które jest trudno degradowalne, a są coraz częściej stosowane między innymi w rolnictwie (glifosat). Stąd niesłabnące zainteresowanie poszukiwaniem metod usuwania tych związków ze środowiska naturalnego. Mój udział w tej pracy polegał głównie na opracowaniu procedury syntezy i analizy substratu reakcji biotransformacji i opiece nad syntezą wykonywaną przez dr inż. Natalię Dunal (nazwisko panięskie Kmieć) w ramach realizacji pracy magisterskiej kierowanej przez prof. dr. hab. Ewę Żyłańczyk-Dudę, oraz pomocy przy interpretacji widm NMR. Prace te koordynowała dr. hab. Magdalena Klimek-Ochab, która od wielu lat zajmuje się biodegradacjami związków fosforoorganicznych.

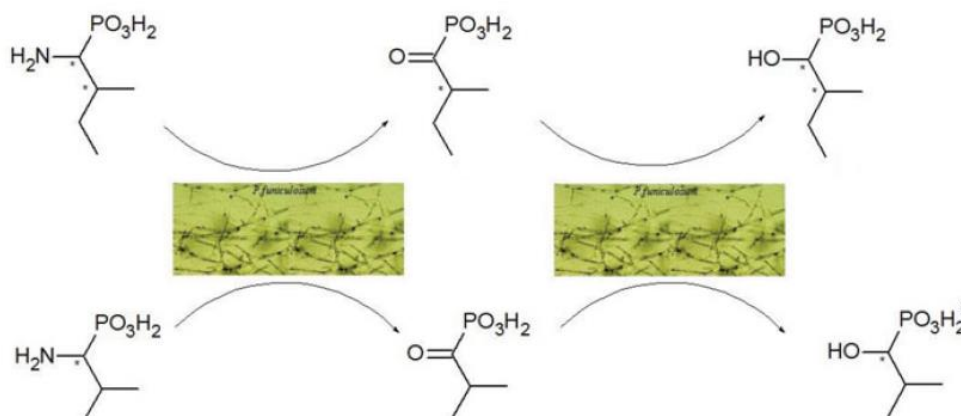
Pani Natalia Dunal kontynuowała badania naukowe na studiach doktoranckich w naszym zespole pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Żyłańczyk-Dudy, zajmując się otrzymywaniem chiralnych

---

<sup>72</sup> Hrydziuszko Z., Dmytryk A., Majewska P., Szymańska K., Liesiene J., Jarzębski A., Bryjak J.; *Acta Biochimica Polonica*; 61 (2014) 1-6

<sup>73</sup> Kmieć N., Klimek-Ochab M., Brzezińska-Rodak M., Majewska P., Żyłańczyk-Duda E.; *Biotechnology Research International*, 2013 (2013) 1-5

pochodnych fosfonianów na drodze biokatalitycznej. W tym czasie wspierałam Panią Natalię radami i pomocą, głównie w planowaniu i wykonywaniu syntez hydroksyfosfonianów, a także w analizie i interpretacji widm NMR oraz IR. Współpraca ta zaowocowała publikacją dotyczącą biokonwersji aminofosfonianów do hydroksyfosfonianów z produktem przejściowym w postaci niestabilnego ketonu (schemat 10).<sup>74</sup>



Schemat 10. Reakcja biokonwersji aminofosfonianów do hydroksyfosfonianów.<sup>73</sup>

W 2020 roku podjęłam kolejny raz współpracę z dr inż. Moniką Serafin-Lewańczuk, która pod kierownictwem prof. Ewy Żymańczyk-Dudy zajmowała się biokonwersją kwasów aminofosfonowych. Zastosowanie biokatalizy całymi komórkami różnych mikroorganizmów dało możliwość otrzymania tych związków z czystością enancjomeryczną sięgającą >99%.<sup>75</sup> Mój udział w tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu badań dotyczących określenia konfiguracji absolutnej związków opisanych w manuskrypcie i interpretacji tych badań, a także na udziale w analizie pozostałych danych dotyczących biokonwersji kwasów aminofosfonowych i udziale w napisaniu manuskryptu.

### 5.5. Biokatalityczne otrzymywanie antyoksydantów

W naszym zespole prowadzone są również badania nad związkami o właściwościach antyoksydacyjnych. Koordynuje je dr. hab. inż. Małgorzata Brzezińska-Rodak, która specjalizuje się w tej tematyce. Podczas reakcji biotransformacji resweratrolu całymi komórkami *Phanerochaete chrysosporium* powstawał dodatkowy produkt 3,5-dihydroksybenzaldehyd. Z racji mojego dużego

<sup>74</sup> Kmieciak N., Majewska P., Kozyra K., Żymańczyk-Duda E.; *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 193 (2018) 232-238

<sup>75</sup> Serafin-Lewańczuk M., Brzezińska-Rodak M., Lubiak K., Majewska P., Klimek-Ochab M., Olszewski T., Żymańczyk-Duda E.; *Microbial Cell Factories*, 20 (2021) 1-14

doświadczenia w analizie związków za pomocą spektroskopii NMR zaangażowałam się w ten projekt i wykonałam badania dotyczące separacji tego produktu i określenia jego struktury.<sup>76</sup>

Od początku swojej naukowej kariery interesowałam się nie tylko spektroskopią NMR, ale również chromatografią HPLC, między innymi do oznaczania nadmiarów enancjomerycznych na chiralnych kolumnach. Jednocześnie podnosiłam swoje kwalifikacje uczestnicząc w różnych szkoleniach dotyczących HPLC. Dzięki tym umiejętnościom, wiedzy i doświadczeniu zdobytemu podczas stażów w Laboratorium Chemicznym w firmie Maco Pharma mogłam pomóc w pracy doktorskiej dr Beacie Szmigiel-Merena (wtedy doktorantce) w kwestiach związanych z chromatografią HPLC oraz spektroskopią NMR. Pani Beata swoją pracę doktorską wykonywała pod kierunkiem prof. Ewy Żymańczyk-Dudy (promotor) oraz dr hab. Małgorzaty Brzezińskiej-Rodak (promotor pomocniczy), a tematyka dotyczyła zastosowania biotransformacji do syntezy antyoksydantów. Razem z Panią Beatą zoptymalizowałyśmy metodę analityczną do oznaczania produktów biotransformacji oraz zwalidowałyśmy tę metodę. W przypadku reakcji hydroksylacji 2-feniloetanolu dodatkowo pomogłam zaplanować i wykonać badania związane z separacją produktów biotransformacji oraz określiłam ich strukturę za pomocą spektroskopii NMR. Badania te zostały opisane w publikacji w czasopiśmie *Symmetry*<sup>77</sup> oraz są podstawą dwóch patentów.<sup>78,79</sup>

## 6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

---

### 6.1. Działalność dydaktyczna

Moje zainteresowanie wykorzystaniem mikroorganizmów mam okazję przekazywać również studentom w ramach zajęć dydaktycznych. Od wielu lat prowadzę zajęcia laboratoryjne z Mikrobiologii przemysłowej i przygotowałam do tych zajęć korekty do instrukcji, a od 2017 roku nieformalnie opiekuję się tym kursem. Prowadziłam również inne zajęcia laboratoryjne dla studentów

---

<sup>76</sup> Brzezińska-Rodak M., Lubiak K. D., Klimek-Ochab M., Majewska P., Ewa Żymańczyk-Duda E.; *BioTechnologia*, 100 (2019) 241-250

<sup>77</sup> Szmigiel-Merena B., Brzezińska-Rodak M., Klimek-Ochab M., Majewska P., Żymańczyk-Duda E.; *Symmetry*, 6 (2020) 1-14

<sup>78</sup> Szmigiel-Merena B., Brzezińska-Rodak M., Majewska P., Żymańczyk-Duda E.; Patent. Polska, nr 234344. Sposób otrzymywania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego. Zgłosz. nr 425896 z 12.06.2018. Opubl. 28.02.2020. 4 s.

<sup>79</sup> Szmigiel-Merena B., Brzezińska-Rodak M., Klimek-Ochab M., Majewska P., Żymańczyk-Duda E.; Patent. Polska, nr 236624. Sposób otrzymywania 1-feniloetan-1,2-diolu. Zgłosz. nr 425894 z 12.06.2018. Opubl. 08.02.2021. 4 s.

(Biologia II, Mikrobiologia I, Microbiology II – kurs dla studentów programu Erasmus w j. angielskim, Technologia enzymów). Miałam okazję prowadzić wykład z Biodegradacji (II stopień, kierunek Biotechnologia, specjalność Biotechnologia molekularna i biokataliza), oraz wykład z Podstaw biologii (I stopień, kierunek Biotechnologia) do których częściowo opracowywałam prezentacje. Od października 2020 prowadzę również wykład w j. angielskim Biotechnology with introduction to industrial microbiology (II stopień, kierunek Biotechnologia), do którego sama przygotowałam większość materiałów i prezentacje. Odpowiedziałam też jako jedna z pierwszych na potrzeby nauczania online w czasie pandemii proponując kręcenie filmów, na których prezentowałam w jaki sposób wykonać ćwiczenia z zajęć laboratoryjnych z Mikrobiologii przemysłowej. W ten sposób opracowałam cały kurs online na e-Portalu. Aktywnie wspomagam studentów jako promotor prac inżynierskich (28 prac ukończonych) oraz magisterskich (15 prac ukończonych). Większość z nich, to interdyscyplinarne prace laboratoryjne łączące mikrobiologię, chemię organiczną i analityczną. Brałam również udział w wizytach studyjnych jako opiekun ze strony Uczelni w takich przedsiębiorstwach jak PCC Rokita SA w Brzegu Dolnym, czy Maco Pharma we Wrocławiu. Sama zorganizowałam jedną z takich wizyt w dniu 21.11.2017 w przedsiębiorstwie Maco Pharma dla dwóch grup studentów kierunku Biotechnologia.

## 6.2. Działalność organizacyjna

Do moich osiągnięć organizacyjnych z pewnością mogę zaliczyć współautorstwo dwóch Raportów Samooceny kierunku Biotechnologia dla Uniwersyteckiej Komisji Akredytacyjnej (z 2008r. oraz z 2013r.). Ponadto w latach 2016-2017 byłam odpowiedzialna za dużą część projektu remontu laboratoriów dydaktycznych Wydziału Chemicznego usprawniającego możliwości prowadzenia zajęć oraz realizacji prac badawczych z zakresu biotechnologii w obszarze wykorzystania drobnoustrojów pochodzenia zarówno pro- jak i eukariotycznego.

## 6.3. Działalność popularyzująca naukę

Od wielu lat staram się promować naukę wśród dzieci i młodzieży. Listę warsztatów i wykładów jakie przeprowadziłam przedstawiam poniżej:

- XVIII Dolnośląski Festiwal Nauki; Wrocław, Politechnika Wrocławska, 17-23 września 2015; j. polski; warsztaty (5 grup) pt.: „Makrocząsteczki komórkowe – podstawa życia”.
- Uniwersytet dziecięcy w Gorzowie Wlkp. 19.03.2016; wykład na zaproszenie pt.: „Makrocząsteczki komórkowe – podstawa życia”.

- Uniwersytet dziecięcy w Gorzowie Wlkp. 19.03.2016; warsztaty na zaproszenie (2 grupy) pt.: „Jak zamienić kuchnię w laboratorium naukowe”?
- XIX Dolnośląski Festiwal Nauki; Wrocław, Politechnika Wrocławska, 16-21 września 2016; warsztaty (6 grup) pt.: „Jak przemienić kuchnię w laboratorium naukowe?” oraz (3 grupy) pt.: „Makrocząsteczki komórkowe – podstawa życia”.
- Szkoła Podstawowa Nr 2 w Sobótce 30.11.2017; pokaz na zaproszenie (2 grupy) pt.: „Jak zamienić kuchnię w laboratorium naukowe?”
- „LabDay”, 30.03.2019, Wrocław, Politechnika Wrocławska, warsztat pt.: „Makrocząsteczki” (1 grupa)
- XXIII Dolnośląski Festiwal Nauki, Wrocław, Politechnika Wrocławska, 18 -23 września 2020, zajęcia on-line, pokaz pt.: „Jak zamienić kuchnię w laboratorium naukowe?”

Brałam również udział w IX Dolnośląskich Prezentacjach Edukacyjnych TARED 2003 we Wrocławiu w Hali Ludowej 12-15 marca 2003, gdzie udzielałam informacji o Kierunku Biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

## 7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

---

W 2008 roku dostałam wyróżnienie w konkursie na najlepszą pracę doktorską nadane przez Polskie Towarzystwo Chemiczne (Łódź, 12.09.2008).

Do samodzielnej pracy naukowej przygotowywałam się między innymi uczestnicząc w studiach podyplomowych na kierunku: Menedżer projektów badawczych w Wyższej Szkole Ekonomii i Innowacji w Lublinie. Studia te ukończyłam 03.04.2013 pisząc pracę dyplomową „Otrzymywanie nowego typu uniwersalnych dyskryminatorów chiralności” pod kierunkiem mgr. inż. Andrzeja Zbroi.

Dzięki licznym szkoleniom poszerzałam wiedzę i doskonaliłam swój warsztat naukowy. Były to między innymi:

- „Projektowanie i realizacja instalacji technologicznej do produkcji leków biotechnologicznych”; Warszawa; 13.09.2008; j. angielski/j. polski; 6 godzin
- „Metrologia pipet tłokowych – wzorcowanie i sprawdzanie”; Wrocław; 22.05.2009; j. polski; 4 godziny

- "Najnowsze rozwiązania dla laboratoriów chemicznych XXI wieku"; Wrocław; 28.05.2009; j. polski; 5 godzin
- „Dobra praktyka laboratoryjna (GLP) – praktyczne aspekty wdrożenia w laboratorium”; Wrocław; 21.11.2009; j. polski; 8 godzin
- „Dobra praktyka wytwarzania (GMP) – wymagania prawne, zasady i wdrożenie systemu”; Wrocław; 12.12.2009; j. polski; 8 godzin
- „Walidacja metod analitycznych według wymagań farmaceutycznych oraz normy ISO 17025”; Wrocław; 27.02.2010; j. polski; 6 godzin
- „Podstawy zastosowania technik chromatograficznych w analityce oraz optymalizacja metod HPLC”; Wrocław; 20.03.2010; j. polski; 7 godzin
- „Zarządzanie projektami miękkimi finansowanymi ze środków EFS”; Wrocław; 8.04 – 20.05.2010; j. polski; 21 godzin
- „Analiza ryzyka w procesach pomiaru wagi”; Wrocław; 13.10.2010; j. polski; 4 godziny
- „Wiedza chroniona w procesie komercjalizacji”; Wrocław; 29.11.2010; j. polski; 4 godziny

*Paulina Majewska*

(podpis wnioskodawcy)