



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

**INSTYTUT KATALIZY I FIZYKOCHEMII POWIERZCHNI  
im. Jerzego Habera  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

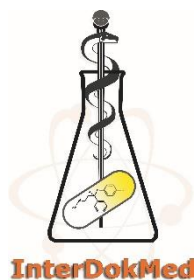
**Justyna Prajsnar**

**Opracowanie ścieżki chemicznej oraz  
enzymatycznej modyfikacji grupy aminowej kwasu  
6-aminopenicylanowego poprzez wprowadzenie  
do cząsteczki  
3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego**

**Praca doktorska**

Promotorzy: dr hab. Maciej Guzik,  
prof. dr hab. Andrzej Bojarski

**KRAKÓW 2023**



Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji  
Środowiskowych Studiów Doktoranckich  
w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16,  
"Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej" InterDokMed,  
realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020,  
współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego



## Spis treści

Streszczenie.....	1
Abstract .....	2
Skróty .....	3
Podziękowanie .....	5
Współpraca.....	6
1. Wstęp teoretyczny .....	7
1.1. Antybiotyki $\beta$ -laktamowe.....	7
1.1.1. Historia odkrycia antybiotyków $\beta$ -laktamowych .....	7
1.1.2. Grupy antybiotyków $\beta$ -laktamowych i ich charakterystyka.....	8
1.1.3. Mechanizm działania antybiotyków $\beta$ -laktamowych.....	12
1.1.4. Rodzaje $\beta$ -laktamaz oraz ich mechanizmy działania.....	14
1.1.5. Wpływ modyfikacji antybiotyków $\beta$ -laktamowych na zakres ich działania.....	15
1.1.6. Inhibitory $\beta$ -laktamaz .....	17
1.2. Polihydroksyalkaniiny (PHA) .....	19
1.2.1. Wprowadzenie.....	19
1.2.2. Struktura chemiczna PHA .....	21
1.2.3. Biosynteza PHA w komórce bakteryjnej .....	24
1.2.3.1. Szlaki biosyntezy krótkołańcuchowych PHA (scl-PHA).....	25
1.2.3.2. Szlaki biosyntezy średniołańcuchowych PHA (mcl-PHA).....	28
1.2.4. Charakterystyka monomerów PHA i ich modyfikacje.....	31
1.2.5. Cel i zakres wykorzystania PHA oraz jego pochodnych w pracy badawczej .....	32
2. Cel naukowy badań .....	33
3. Badania własne.....	34
3.1. Otrzymywanie wybranych modyfikatorów dla kwasu 6-Aminopenicylanowego .....	34
3.1.1. Wprowadzenie.....	34
3.1.2. Biosynteza polihydroksyalkanianów alifatycznych oraz aromatycznych .....	36
3.1.2.1. Media hodowlane i szczepy bakteryjne.....	36
3.1.2.2. Wstępna hodowla bakteryjna .....	37
3.1.2.3. Hodowla fermentorowa w produkcji P(3HN) .....	37
3.1.2.4. Oznaczenie CDW, zawartości P(3HN) oraz stężenia fosforanów i azotanów w hodowli reaktorowej.....	38
3.1.2.5. Hodowla okresowa z dozowaniem pulsacyjnym substratu w produkcji P(3H5PV) .....	39
3.1.3. Ekstrakcja PHA z masy bakteryjnej.....	40
3.1.4. Otrzymanie chiralnych estrów metylowych ( <i>R</i> )-3-hydroksykwasów PHA .....	40
3.1.4.1. Rozdział estrów metylowych ( <i>R</i> )-3-hydroksykwasów P(3HN).....	41
3.1.5. Synteza chemiczna estrów metylowych <i>rac</i> -3-hydroksykwasów PHA .....	42
3.1.6. Otrzymywanie ( <i>R</i> )-3-hydroksykwasów oraz <i>rac</i> -3-hydroksykwasów.....	43

3.1.7.	Analiza UHPLC-MS/MS otrzymanych modyfikatorów dla kwasu 6-APA.....	44
3.1.8.	Potwierdzenie struktury otrzymanych związków metodami: <sup>1</sup> H-NMR, IR oraz CD.....	47
3.1.9.	Wyniki.....	48
3.1.9.1.	Otrzymanie polihydroksyalkanianów: P(3HN) oraz P(3H5PV) .....	48
3.1.9.2.	Kompozycja monomerów P(3HN) oraz P(3H5PV) .....	50
3.1.9.3.	Otrzymanie estrów metylowych <i>rac</i> -3-hydroksykwasów .....	52
3.1.9.4.	Otrzymywanie 3-hydroksykwasów na drodze syntezy chemicznej .....	52
3.1.9.5.	Biblioteka otrzymanych modyfikatorów kwasu 6-APA oraz ich charakterystyka .....	53
3.1.10.	Podsumowanie .....	58
3.2.	Otrzymywanie zmodyfikowanych penicylin na drodze syntezy chemicznej oraz biosyntezy enzymatycznej .....	60
3.2.1.	Wstęp.....	60
3.2.2.	Synteza estru benzyłowego kwasu 6-aminopenicylanowego.....	62
3.2.3.	Odczynniki kondensujące w syntezie chemicznej wiązania amidowego pomiędzy estrem benzyłowym kwasu 6-APA, a 3-hydroksykwasami .....	63
3.2.3.1.	Bezwodnik kwasu propanofosfonowego (T3P) .....	63
3.2.3.2.	<i>N,N'</i> -Dicykloheksylokarbodiimid (DCC).....	65
3.2.3.3.	Heksafluorofosforan O-(7-azabenzotriazol-1-ilo)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouro- niowy (HATU) .....	66
3.2.3.4.	Odczynnik Mukaiyama .....	67
3.2.4.	Biosynteza wiązania amidowego pomiędzy estrem benzyłowym kwasu 6-APA, a estrami metylowymi 3-hydroksykwasów przy wykorzystaniu lipaz .....	68
3.2.5.	Otrzymywanie soli sodowych zmodyfikowanych penicylin.....	72
3.2.6.	Analiza UHPLC-MS/MS, <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR, FT-IR oraz CD otrzymanych penicylin i ich estrów benzyłowych. ....	73
3.2.7.	Wyniki i dyskusja.....	75
3.2.7.1.	Synteza chemiczna estrów benzyłowych penicylin z wykorzystaniem odczynników kondensujących .....	75
3.2.7.2.	Biosynteza wiązania amidowego katalizowana lipazami w produkcji nowych penicylin ..	76
3.2.9.	Podsumowanie .....	90
3.3.	Ocena aktywności biologicznych otrzymanych penicylin .....	91
3.3.1.	Wstęp.....	91
3.3.2.	Ocena potencjału przeciwbakteryjnego nowych pochodnych 6-APA .....	92
3.3.2.1.	Wyznaczenie spektrum działania związków na podstawie testu dyfuzyjno-krążkowego... ..	92
3.3.2.2.	Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) dla pochodnych 6-APA .....	94
3.3.3.	Ocena genotoksyczności przy wykorzystaniu analizy „rec” z <i>Bacillus subtilis</i> .....	95
3.3.4.	Ocena cytotoksyczności zmodyfikowanych penicylin przy wykorzystaniu testu FDA/PI ..	96
3.3.5.	Wyniki.....	97



3.3.5.1. Testy dyfuzyjno-krażkowego .....	97
3.3.5.2. Minimalne stężenie hamujące oraz minimalne stężenie bakteriobójcze nowych pochodnych 6-APA.....	99
3.3.5.3. Działanie genotoksyczne oraz cytotoksyczne związków .....	102
3.3.6. Podsumowanie wyników.....	104
3.4. Podsumowanie globalne wyników pracy eksperymentalnej.....	105
4. Literatura .....	107
Spis tabel .....	120
Spis ilustracji.....	121
Suplement.....	124
Karta wzorów .....	182

## Streszczenie

Penicyliny półsyntetyczne stanowią jedną z najważniejszych i najczęściej stosowanych antybiotyków pierwszego wyboru w leczeniu zakażeń na całym świecie. Ich spektrum działania obejmuje wiele gatunków bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Penicyliny hamują wzrost drobnoustrojów poprzez inhibicję syntezy ich ściany komórkowej. Brak peptydoglikanu w komórkach eukariotycznych, będącego celem dla tej grupy antybiotyków, sprawia, że ich stosowanie jest nietoksyczne dla ludzi oraz zwierząt. Szybko rozprzestrzeniająca się lekooporność wśród szczepów bakteryjnych ograniczyła skuteczność terapeutyczną wielu antybiotyków  $\beta$ -laktamowych. Z tego względu prace nad otrzymywaniem nowych antybiotyków lub inhibitorów  $\beta$ -laktamaz, a także opracowanie nowych sposobów ich modyfikacji stanowi obecnie bardzo ważne zagadnienie naukowe.

Przedstawione w niniejszej pracy badania skupiają się na opracowaniu ścieżek otrzymywania nowych penicylin, poprzez wprowadzanie modyfikacji do ich łańcucha bocznego w pozycji C6. Rdzeniem  $\beta$ -laktamowym, będącym cząsteczką wyjściową w syntezie nowych penicylin był kwas 6-aminopenicylanowy (6-APA). Grupą związków wybraną do modyfikacji kwasu 6-APA były pochodne polihydroksyalkanianów (PHA), które stanowią zróżnicowane strukturalnie źródło chiralnych (*R*)-3-hydroksykwasów. Na drodze fermentacji bakteryjnej otrzymano dwa polimery PHA: poli-3-hydroksynonanoanian (P(3HN)) oraz poli-3-hydroksy-5-fenylowalerianian (P(3H5PV)). Monomery P(3HN) oraz P(3H5PV), a także ich odpowiedniki w formie mieszaniny racemicznej zostały połączone wiązaniem amidowym z estrem benzylovym 6-APA poprzez syntezę chemiczną z wykorzystaniem odczynnika kondensującego T3P oraz przez biosyntezę katalizowaną lipazą TL-IM pochodzącą z *Thermomyces lanuginosus*. Na drodze obu opracowanych ścieżek otrzymano sześć pochodnych 6-APA z wprowadzonymi modyfikacjami w ich łańcuchu bocznym. Nowe penicyliny zmodyfikowane pochodnymi PHA wykazały wysoką aktywność przeciwbakteryjną względem bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnym z rodzaju *Proteus*, a ich spektrum działania jest podobne do tego, które wykazuje penicylina G. Dodatkowo potwierdzono, że nowe penicyliny nie mają efektu cytotoksycznego względem komórek eukariotycznych, a wyznaczona dla nich genotoksyczność była niższa niż ta otrzymana dla penicyliny G oraz ampicyliny.

Opracowane ścieżki otrzymywania zmodyfikowanych penicylin obejmowały różne strukturalnie monomery pochodzące z PHA. Warsztat ten pozwoli w przyszłości na wykorzystanie innych monomerów PHA do modyfikacji rdzenia 6-APA, otwierając tym drogę do otrzymywania związków przeciwbakteryjnych o wyższej efektywności.

## Abstract

Semi-synthetic penicillins are one of the most important and most widely used antibiotics of first choice for the treatment of infections worldwide. Their spectrum of activity includes many pathogenic species of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Penicillins inhibit the growth of microorganisms by inhibiting the synthesis of their cell wall. The lack of peptidoglycan in eukaryotic cells, which is the target for this group of antibiotics, makes their use non-toxic to humans and animals. The rapidly spreading drug resistance among bacterial strains has limited the therapeutic effectiveness of many  $\beta$ -lactam antibiotics. For this reason, work on the discovery of new antibiotics or  $\beta$ -lactamase inhibitors, as well as the development of new methods of their modification, is currently a very important scientific issue.

The research presented in this scientific project focuses on the development of new penicillin production pathways by introducing modifications to their side chain at the C6 position. The starting molecule in the synthesis of new penicillins was 6-aminopenicillanic acid (6-APA). The group of compounds selected for the modification of 6-APA were derivatives of polyhydroxyalkanoates (PHA), which are structurally diverse source of chiral (*R*)-3-hydroxy acids. Two PHA polymers were obtained by bacterial fermentation: poly-3-hydroxynonanoate (P(3HN)) and poly-3-hydroxy-5-phenylvalerate (P(3H5PV)). P(3HN) and P(3H5PV) monomers, as well as their counterparts in the form of a racemic mixture, were linked by an amide bond with 6-APA benzyl ester by chemical synthesis using T3P condensing reagent and by biosynthesis catalyzed by TL-IM lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*. Six 6-APA derivatives with modifications in their side chains were obtained by these pathways. The new penicillins modified with PHA derivatives showed high antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria from the genus *Proteus*, and their spectrum of action was similar to penicillin G. Additionally, it was confirmed that the new penicillins do not have a cytotoxic effect on eukaryotic cells, and genotoxicity was lower comparing to penicillin G and ampicillin.

The pathways developed to obtain modified penicillins included structurally different PHA-derived monomers. This workshop will allow, in the future, the use of other PHA monomers to modify the 6-APA core, thereby paving the way for obtaining more effective antimicrobial compounds.

## Skróty

6-APA	Kwas 6-aminopenicylanowy
7-ACA	Kwas 7-aminocefalosporanowy
ACN	Acetonitryl
CD	Dichroizm kołowy ( ang. Circular Dichroism)
CDW	Sucha masa bakteryjna (ang. Cell Dry Weigh
DCC	<i>N,N'</i> -Dicykloheksylokarbodiimid
DCM	Dichlorometan
DCU	<i>N,N'</i> -dicykloheksylomocznik
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropylloetyloamina
DMAP	4-dimetyloaminopirydyna
DMF	Dimetyloformamid
DMRM	Dynamiczne Monitorowanie wybranych reakcji (ang. Dynamic Multiple Reaction Monitoring)
ESBL	$\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym
ESI	Jonizacja przez rozpylenie w polu elektrycznym (ang. Electrospray Ionization)
FID	Detektor płomieniowo-jonizacyjny (ang. Flame Ionization Detector)
GC	Chromatografia gazowa
$g_C L^{-1}$	Ekwiwalent stężenia związku wyrażony w gramach węgla organicznego pochodzącego z cząsteczki na litr medium hodowlanego
$g_N L^{-1}$	Ekwiwalent stężenia związku wyrażony w gramach azotu organicznego pochodzącego z cząsteczki na litr medium hodowlanego
$g_P L^{-1}$	Ekwiwalent stężenia związku wyrażony w gramach fosforu pochodzącego z cząsteczki na litr medium hodowlanego
HATU	Heksafluorofosforan <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-ilo)- <i>N,N,N',N'</i> - tetrametylouroniowy
IR	Spektroskopia w podczerwieni ( ang. Infrared Spectroscopy)
LOD	Limit wykrywalności (ang. Limit Of Detection)
LOQ	Limit oznaczalności (ang. Limit Of Quantification)
MBC	Minimalne stężenie bakteriobójcze

MIC	Minimalne stężenie hamujące
MSM	Mineralne medium hodowlane (ang. Mineral Salts Medium)
NMR	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. Nuclear Magnetic Resonance)
P(3H5PV)	Poli-3-hydroksy-5-fenylwalerianian
P(3HB)	Poli-3-hydroksymaślan
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	Poli(3-hydroksymaślan- <i>co</i> -4-hydroksymaślan)
P(3HN)	Poli-3-hydroksynonanian
P(3HV)	Poli-3-hydroksywalerian
PHA	Polihydroksyalkaniany
SD	Odchylenie standardowe
T3P	Bezwodnik kwasu propanofosfonowego
THF	Tetrahydrofuran
UHPLC MS/MS	Ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. Ultra High Performance Liquid Chromatography) połączona z tandemową spektrometrią mas

## **Podziękowanie**

*Dziękuję wszystkim osobom zaangażowanym w realizację tej pracy, zarówno tym, którzy włożyli merytoryczny trud w jej powstanie, ale również przyjaciołom i rodzinie za wsparcie w tym niełatwym czasie.*

*Ogromne podziękowania dla mojego promotora dr hab. Maciej Guzika, który przez cały okres realizowania projektu był obecny i gotowy do stawiania czoła wszystkim wyzwaniom, które zgotował nam los.*

*Dziękuję Profesorowi Andrzejowi Bojarskiemu za opiekę merytoryczną nad projektem oraz profesjonalną ocenę uzyskanych rezultatów.*

*Podziękowania dla dr Rysia Bugno za nieocenioną pomoc, cierpliwość i dobroć, która mi ofiarował podczas pracy w Instytucie Farmakologii. To niezwykła przyjemność pracować z tak bezinteresownymi i wspaniałymi ludźmi, jak Zespół Zakładu Chemii Leków*

## Współpraca

Praca doktorska powstała przy współpracy z Zakładem Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, a także z Laboratorium Mikrobiologii Farmaceutycznej w Centrum Badań Przedklinicznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Zakładem Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.



WARSAWSKI  
UNIwersytet  
MEDYCZNY



## 1. Wstęp teoretyczny

### 1.1. Antybiotyki $\beta$ -laktamowe

#### 1.1.1. Historia odkrycia antybiotyków $\beta$ -laktamowych

Odkrycie pierwszego antybiotyku  $\beta$ -laktamowego zostało dokonane w 1929 roku przez znanego już wtedy bakteriologa Aleksandra Fleminga. Nie był to jednak pierwszy odkryty antybiotyk pochodzenia naturalnego, bowiem na przełomie lat 1888-1889 Freudenreich zaobserwował przeciwbakteryjne działanie picyjaniny w hodowli *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>1</sup> Związek ten wprawdzie wykazywał obiecujące działanie przeciw bakteriom, grzybom oraz pierwotniakom, jednak okazał się również toksyczny dla komórek eukariotycznych, poprzez hamowanie oddychania komórkowego.<sup>2,3</sup> Z tego właśnie powodu za pierwszy antybiotyk o znaczeniu terapeutycznym uważa się słynną penicylinę G, odkrytą przypadkiem przez A. Fleminga na zakażonej pleśnią szalce ze szczepem gronkowca złocistego.<sup>4</sup> Odkryty antybiotyk  $\beta$ -laktamowy wyróżniał się wysoką aktywnością przeciw takim grupom bakterii jak: gronkowce, paciorkowce czy beztlenowe laseczki. Z tego powodu podjęto wiele działań, aby jak najszybciej doprowadzić do ekstrakcji i oczyszczenia tego związku, ustalenia jego struktury, a przede wszystkim zwiększenia wydajności biosyntezy i rozpoczęcia jego produkcji na skalę przemysłową.<sup>5</sup> W rezultacie penicylina G została podana człowiekowi po raz pierwszy dopiero w roku 1941, jako lek na sepsę. Za pracę nad otrzymaniem pierwszego, skutecznego antybiotyku  $\beta$ -laktamowego, trzech najbardziej zaangażowanych naukowców (Fleming, Florey oraz Chain) zostało docenionych i w 1945 roku uhonorowanych Nagrodą Nobla.<sup>6</sup>

Niezwykle ważnym wydarzeniem w historii antybiotyków  $\beta$ -laktamowych było rozwiązanie struktury chemicznej penicyliny G, dokonane przez Roberta Robinsona w 1943 roku.<sup>5</sup> Następstwem tego odkrycia było bowiem rozpoznanie w cząsteczce antybiotyku kluczowego elementu struktury odpowiadającego za jego aktywność przeciwbakteryjną, a mianowicie pierścienia  $\beta$ -laktamowego. Spowodowało to ukierunkowanie badań nad poszukiwaniami nowych antybiotyków na chemiczne modyfikacje rdzenia penicyliny G, tj. kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA).<sup>6</sup> Na drodze chemicznej modyfikacji 6-APA powstało wiele penicylin półsyntetycznych stanowiących do dziś podstawowe leki przeciwbakteryjne.

Mimo dominującego nurtu badań, koncentrującego się na modyfikacjach chemicznych kwasu 6-APA, poszukiwania nowych związków o aktywnościach przeciwbakteryjnych były kontynuowane. Dzięki temu została odkryta nowa grupa antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, którą stanowiły cefalosporyny. Pierwszą naturalną cefalosporynę wyizolowano ze szczepu *Cephalosporium acremonium* w 1945 r, a jej budowa została wyjaśniona w 1961 roku przez

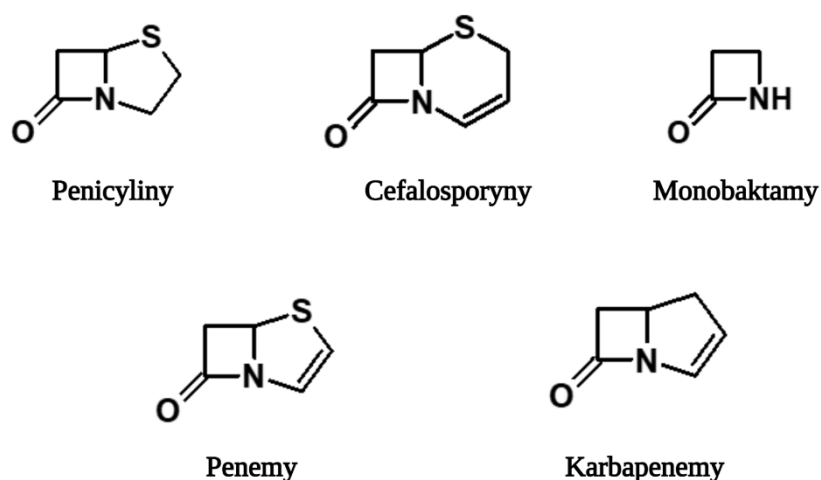


Newtona i Abrahama.<sup>7</sup> Rdzeniem strukturalnym w tej grupie antybiotyków jest kwas 7-aminocefalosporynowy (7-ACA), który stanowi cząsteczkę wyjściową w syntezach zmodyfikowanych, półsyntetycznych cefalosporyn. Inne bardzo ważne współcześnie grupy antybiotyków, również zostały wyizolowane z bakterii występujących w naturze, jak np. karbapenemy, produkowane przez *Streptomyces* spp<sup>8</sup> oraz monobaktamy wytwarzane przez *Pseudomonas acidophila*.<sup>6,9</sup>

Ogólna definicja antybiotyków określa je jako wytwarzane przez różne gatunki mikroorganizmów substancje chemiczne, posiadające właściwości przeciwbakteryjne, tj. zarówno bakteriobójcze jak i bakteriostatyczne.<sup>5</sup> Definicja ta wymaga jednak uaktualnienia, ponieważ obecnie największe znaczenie kliniczne mają antybiotyki półsyntetyczne, których podstawowa struktura została zmodyfikowana.

### 1.1.2. Grupy antybiotyków $\beta$ -laktamowych i ich charakterystyka

Niezwykle ważną grupę związków o aktywności przeciwbakteryjnej stanowią antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, których nazwa wywodzi się od czteroatomowego pierścienia obecnego w ich strukturze. Pierścień  $\beta$ -laktamowy może być połączony z drugim pierścieniem tworząc struktury bicykliczne lub występować w formie nieskondensowanej. Niezależnie jednak od rodzaju sprzężonego z nim układu, jego otwarcie powoduje utratę aktywności bakteriobójczej związków.<sup>6</sup> Ze względu na chemiczną naturę pierścienia przyłączonego do farmakoforu  $\beta$ -laktamowego, można je podzielić na pięć podstawowych grup, a mianowicie: penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, penemy oraz monobaktamy (**Rysunek 1**). Najstarszą



**Rysunek 1.** Podstawowa struktura chemiczna antybiotyków  $\beta$ -laktamowych

i najbardziej znaną grupę antybiotyków tej klasy stanowią penicyliny, w których występują dwa pierścienie:  $\beta$ -laktamowy oraz tiazolidynowy. Do najpopularniejszych antybiotyków tej grupy zaliczamy wspomnianą już penicylinę G, a także drugą, naturalnie produkowaną fenoksymetylopenicylinę.<sup>1,5</sup> Antybiotyki te znalazły zastosowanie głównie w leczeniu infekcji wywołanych przez takie bakterie Gram-dodatnie, jak gronkowce, paciorkowce, ale także Gram-ujemne – dwoinki rzeżączki i zapalenia opon mózgowych.<sup>1</sup> Trzeba jednak podkreślić, że większość bakterii Gram-ujemnych jest zdolnych do hydrolizy penicyliny G. Szersze spektrum działania wykazują penicyliny półsyntetyczne posiadające w łańcuchu bocznym pierwszorzędową grupę aminową (ampicylina oraz amoksycylina).<sup>10</sup> Antybiotyki te są skuteczne względem takich bakterii Gram-ujemnych jak: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, a także *Proteus mirabilis*. Są powszechnie stosowane również ze względu na stabilność w niskim pH żołądka i możliwość aplikacji drogą doustną. W tej grupie leków znajdują się także inne ważne klinicznie antybiotyki, jak np. metycylina, skuteczna względem penicylinaz występujących u gronkowców, karbenicylina i ticarcylina działające przeciwko większości szczepów *Pseudomonas aeruginosa* oraz bakteriom z rodzaju *Proteus* opornym na ampicylinę, a także uroidopenicyliny w tym piperacylina i azlocylina, których spektrum działania obejmuje paciorkowce, enterokoki oraz większość szczepów *Klebsiella* spp.<sup>1,5</sup>

Drugą, bardzo ważną grupę antybiotyków  $\beta$ -laktamowych stanowią cefalosporyny, w których  $\beta$ -laktam połączony jest z pierścieniem dihydrothiazynowym. Obecność sześcioczłonowego pierścienia w strukturze cefalosporyn, zmniejsza napięcie w układzie  $\beta$ -laktamowym, co w konsekwencji obniża ich podatność na atak nukleofilowy oraz hydrolizę.<sup>11</sup> Ma to również bezpośredni wpływ na oporność cefalosporyn względem penicylinaz - enzymów zdolnych do hydrolizy pierścienia  $\beta$ -laktamowego, naturalnie występujących u niektórych gatunków bakterii.<sup>7</sup> Pierwszym odkrytym antybiotykiem tej grupy była cefalosporyna C wyizolowana z grzyba *Cephalosporium acremonium* przez Giuseppe Brotzu w 1948 roku.<sup>12</sup> Naturalnymi producentami cefalosporyn są również promieniowce, a ich głównym przedstawicielem jest *Streptomyces clavuligerus*.<sup>1</sup> Kwas 7-aminocafalofosporanowy (7-ACA) stanowi cząsteczkę wyjściową w syntezie cefalosporyn półsyntetycznych. Rdzeń kwasu 7-ACA modyfikowany jest poprzez wprowadzenie różnych podstawników do węgla C3 lub C7.<sup>13</sup> Cefalosporyny ze względu na ich spektrum działania oraz oporność względem różnych grup enzymów hydrolizujących pierścień  $\beta$ -laktamowy dzieli się na pięć generacji. Głównymi przedstawicielami cefalosporyn I generacji są takie antybiotyki jak: cefaleksyna, cefazolina czy cefalotyna, które są aktywne głównie względem bakterii Gram-dodatnich, w tym szczepom posiadającym penicylinazy.<sup>14,15</sup> Drugą generację cefalosporyn

reprezentują antybiotyki wykazujące działanie przeciwko bakteriom Gram-ujemnym oraz w mniejszym stopniu Gram-dodatnim. Są odporne na działanie penicylinaz oraz niektórych  $\beta$ -laktamaz. Główną różnicą pomiędzy cefalosporynami I i II generacji jest charakter podstawnika przy węglu C3, który w przypadku cefalosporyn II generacji wpływa na wzrost ich hydrofilowości. Hydrofilowość cefalosporyn II generacji przesuwa ich spektrum działania w stronę bakterii Gram-ujemnych, ale powoduje słabsze działanie względem gronkowców, w porównaniu do mniej hydrofilowych cefalosporyn I generacji.<sup>5</sup> Do głównych przedstawicieli tej grupy należą: cefamandol oraz cefuroksym.<sup>15</sup> Kolejną, trzecią generację cefalosporyn tworzą antybiotyki odporne na większość  $\beta$ -laktamaz, zwłaszcza tych występujących w bakteriach Gram-ujemnych. Dodatkowo wykazują aktywność przeciwko *P. aeruginosa* – pałeczce odpornej na większość antybiotyków. Przedstawicielami tej grupy są cefotaksym oraz ceftriakson, będące antybiotykami polarnymi o różnym stopniu hydrofilowości.<sup>5,15</sup> Do cefalosporyn IV generacji należą cefepim oraz cefpirom. Antybiotyki te charakteryzują się wysokim spektrum działania wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych, są odporne na penicylinazy oraz  $\beta$ -laktamazy, również te, które są zdolne do hydrolizy cefalosporyn III generacji. Dodatkowo wykazują wysoką aktywność przeciwko *P. aeruginosa* oraz jelitowym pałeczkom Gram-ujemnym.<sup>15,16</sup> Ostatnia, piąta generacja cefalosporyn to grupa antybiotyków o szerokim działaniu przeciwbakteryjnym, charakteryzująca się aktywnością przeciw bakteriom opornym na metycylinę. Głównymi przedstawicielami wykorzystywanymi w medycynie są ceftobiprol oraz ceftarolina.<sup>17-19</sup>

Do rodziny antybiotyków  $\beta$ -laktamowych zalicza się również niewielką grupę antybiotyków monocyklicznych tzw. monobaktamów. Związki przeciwbakteryjne tej grupy są produkowane przez różnego rodzaju bakterie glebowe, jednak ze względu na ich bardzo słabą aktywność nie znalazły zastosowania w medycynie. Ich głównym, syntetycznym przedstawicielem znajdującym się na rynku farmaceutycznym jest aztreonam. Antybiotyk ten charakteryzuje bardzo dobrą aktywnością względem bakterii Gram-ujemnych, w tym skutecznie działa przeciw *P. aeruginosa* oraz jest odporny na większość  $\beta$ -laktamaz występujących u tych bakterii. Nie wykazuje natomiast dobrej aktywności bakteriobójczej w stosunku do bakterii Gram-dodatnich oraz beztlenowych.<sup>20,21</sup>

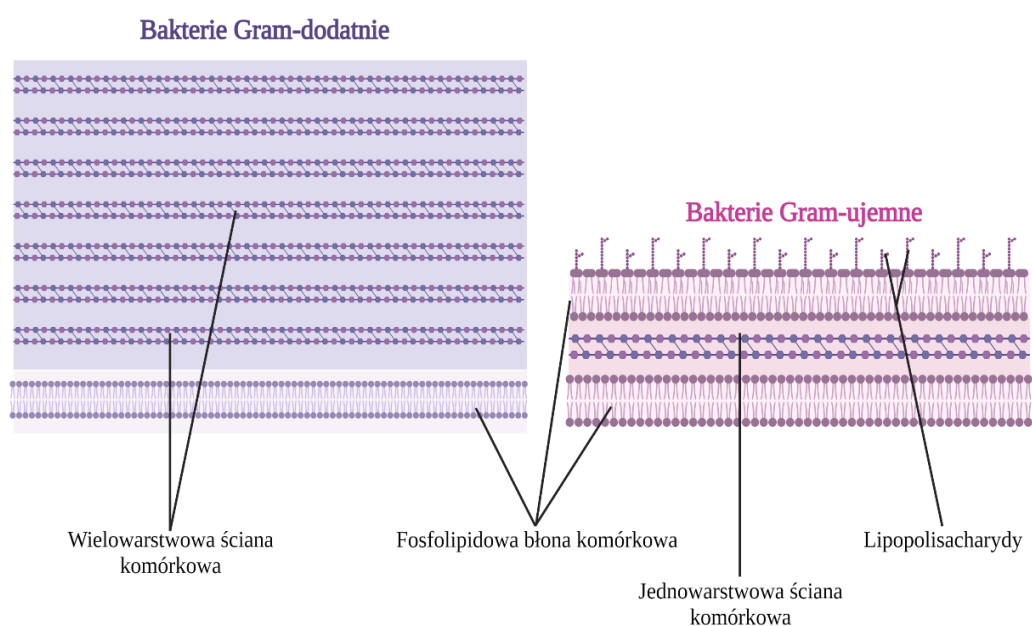
Strukturę penemów, kolejnej grupy antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, stanowią dwa połączone ze sobą pierścienie:  $\beta$ -laktamowy oraz pięcioczłonowy pierścień posiadający atom siarki oraz wiązanie podwójne pomiędzy węglem C2 i C3.<sup>22</sup> Obecność podwójnego wiązania w cząsteczce penemów zwiększa reaktywność  $\beta$ -laktamu względem nukleofili. Penemy nie występują naturalnie w środowisku, a główni przedstawiciele tej grupy tj. faropenem oraz sulopenem są

otrzymywane na drodze syntezy chemicznej. Leki te charakteryzują się wyższą stabilnością w wodnym środowisku kwaśnym niż pozostałe  $\beta$ -laktamy.<sup>23,24</sup> Dodatkowo odznaczają się wyjątkową opornością na działanie  $\beta$ -laktamaz, co jest bezpośrednio związane ze strukturą cząsteczki penemów. Charakter łańcucha bocznego penemów (hydroksyetylu), który znajduje się w pozycji C6 oraz konfiguracja *trans* atomów wodorów przy węglu C5 (*R*) oraz C6 (*S*) odróżnia je od penicylin oraz cefalosporyn. Konfiguracja stereochemiczna, z która mamy do czynienia w przypadku penemów jest przyczyną wysokiej wytrzymałości tej grupy antybiotyków na degradację przez  $\beta$ -laktamazy.<sup>22</sup> Spektrum działania tych antybiotyków obejmuje bakterie Gram-dodatnie oraz Gram-ujemne. Penemy są odporne na działanie prawie wszystkich rodzajów  $\beta$ -laktamaz, także tych o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL). Nie są skuteczne względem gronkowców opornych na metycylinę oraz enterokoków opornych na wankomycynę, a także nie działają przeciw *P. aeruginosa*.<sup>22,23,25</sup>

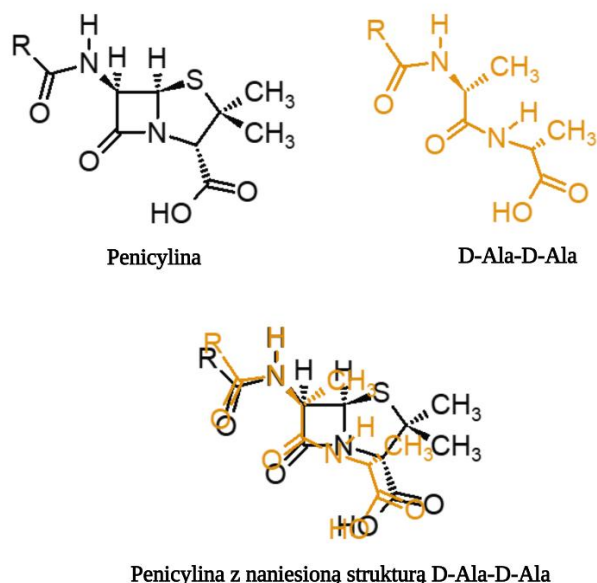
Ostatnią grupę antybiotyków  $\beta$ -laktamowych stanowią karbapenemy – jedna z najważniejszych klinicznie grup antybiotyków. Antybiotyki tej grupy są naturalnie produkowane przez promieniowce z rodzaju *Streptomyces*. Pierwszym karbapenemem była tienomycyna wyizolowana ze szczepu *S. cattleya*.<sup>26</sup> Najważniejszymi przedstawicielami tej grupy są: imipenem, meropenem oraz doripenem i ertapenem.<sup>27</sup> Karbapenemy są strukturalnie bardzo podobne do penemów. Odróżnia je jedynie atom siarki w pierścieniu skondensowanym z  $\beta$ -laktamem obecny w penemach, który jest zastąpiony przez grupę metylenową w pierścieniu karbapenemów.<sup>22</sup> Wysoka stabilność antybiotyków tej grupy względem  $\beta$ -laktamaz wynika, podobnie jak w przypadku penemów, z konfiguracji *trans* podstawników pierścienia  $\beta$ -laktamowego w pozycji 5 oraz 6.<sup>28</sup> Karbapenemy charakteryzują się bardzo szerokim spektrum działania, które obejmuje bakterie Gram-dodatnie (z wyjątkiem bakterii opornych na metycylinę) oraz Gram-ujemne w tym *P. aeruginosa* oraz bakterie z rodzaju *Neisseria* spp., *Enterobacter* spp., *Clostridium* spp., *Haemophilus* spp., a także *Proteus* spp.<sup>26,28</sup> Antybiotyki z tej grupy są odporne na działanie większości  $\beta$ -laktamaz występujących u bakterii, w tym  $\beta$ -laktamaz ESBL, które przyczyniają się do występowania większości oporności klinicznych względem penicylin oraz cefalosporyn różnych generacji. Karbapenemy łatwo wiążą się w miejscu aktywnym  $\beta$ -laktamaz serynowych, natomiast ich hydroliza i uwolnienie następuje bardzo powoli, w związku z tym niektóre związki z tej grupy działają jak inhibitory tych enzymów (tienomycyna).<sup>28</sup>

### 1.1.3. Mechanizm działania antybiotyków $\beta$ -laktamowych

Antybiotyki  $\beta$ -laktamowe należą do grupy związków, które hamują wzrost bakterii, wchodząc w interakcję z enzymami odpowiedzialnymi za syntezę ich ściany komórkowej. Stabilność i właściwa struktura ściany komórkowej bakterii jest kluczowa do jej prawidłowego funkcjonowania oraz przetrwania komórki wystawionej na działanie zewnętrznych czynników środowiskowych. Ze względu na budowę ściany komórkowej, bakterie dzieli się na podstawowe dwie kategorie: bakterie, które w barwieniu metodą Grama barwią się na kolor fioletowy (bakterie Gram-dodatnie) oraz barwiące się na różowo (bakterie Gram-ujemne). Różnica ta jest bezpośrednio związana z ilością peptydoglikanu budującego ścianę komórkową mikroorganizmów należących do obu grup (**Rysunek 2**).<sup>1,29,30</sup> Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich jest zbudowana z wielu, nałożonych na siebie warstw peptydoglikanu, pod którymi znajduje się dwuwarstwa fosfolipidowa stanowiąca ich błonę komórkową. W przypadku bakterii Gram-ujemnych pojedyncza warstwa peptydoglikanu otoczona jest przez dwie błony komórkowe. Peptydoglikan jest heteropolimerem zbudowanym z występujących naprzemiennie reszt *N*-acetyloglucozozaminy oraz kwasu *N*-acetylmuraminowego połączonych wiązaniem  $\beta$ -1,4.<sup>1,29</sup> Podczas syntezy ściany komórkowej do występującego w peptydoglikanie kwasu *N*-acetylmuraminowego przyłączone są krótkie, składające się z kilku aminokwasów łańcuchy peptydowe, na końcach których znajduje się dipeptyd: D-alanylo-D-alanina (D-Ala-D-Ala).<sup>6,29</sup>



**Rysunek 2.** Różnice w budowie ściany komórkowej u bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Rysunek sporządzony przy wykorzystaniu programu Biorender



**Rysunek 3.** Strukturalne podobieństwo penicylin oraz D-alanylo-D-alaniny. Rysunek sporządzono na podstawie pracy Lima et al.<sup>5</sup>

Wydłużanie łańcucha cukrowego podczas biosyntezy ściany komórkowej następuje w reakcji transglikozylacji. Sieciowanie łańcuchów cukrowych, które prowadzi do usztywnienia struktury ściany komórkowej, związane jest z wytwarzaniem wiązań peptydowych pomiędzy aminokwasami przyłączonymi do reszt kwasu *N*-acetylmuraminowego w reakcji transpeptydacji. Podczas biosyntezy ściany komórkowej bakterii obie reakcje tj. transglikozylacji oraz transpeptydacji są katalizowane przez tzw. białka wiążące penicylinę (ang. *Penicillin Binding Proteins*, w skrócie PBP).<sup>29</sup> Do tej pory zostało poznanych wiele rodzajów PBP, które pełnią w komórkach różne funkcje związane zazwyczaj z syntezą peptydoglikanu, a ich typ jest różny u różnych rodzajów bakterii. Z uwagi na podobieństwo strukturalne, geometryczne i stechiometryczne antybiotyków  $\beta$ -laktamowych oraz dimeru D-Ala-D-Ala, będącego naturalnym substratem dla białek PBP, są one wiązane w ich centrum aktywnym (**Rysunek 3**).<sup>6</sup> Wszystkie białka PBP mają zdolność wiązania penicyliny, natomiast inne antybiotyki  $\beta$ -laktamowe mają zróżnicowane powinowactwo, które jest zależne od rodzaju białka. Zahamowanie aktywności enzymatycznych białek PBP, wywołanych trwałym związaniem antybiotyku w ich centrum aktywnym serynowym, prowadzi do upośledzenia biosyntezy ściany komórkowej, a w konsekwencji do jej przepuszczalności, a finalnie gwałtownej autolizy komórek.<sup>5,30</sup> Brak peptydoglikanów oraz enzymów aparatu ich biosyntezy w komórkach eukariotycznych zapewnia selektywną toksyczność antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, a tym samym plasuje antybiotyki tej grupy jako bezpieczne zarówno dla zwierząt, jak i ludzi.<sup>5</sup>

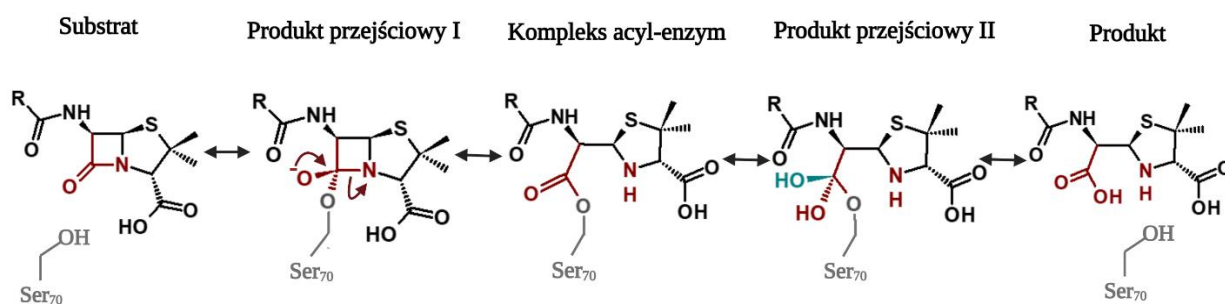
#### 1.1.4. Rodzaje $\beta$ -laktamaz oraz ich mechanizmy działania

Oporność na różnego rodzaju antybiotyki, które wykształciły sobie bakterie na przestrzeni lat, jest narastającym problemem klinicznym oraz poważnym zagrożeniem dla użyteczności terapeutycznej leków przeciwbakteryjnych stosowanych powszechnie do leczenia ludzi i zwierząt. Obecnie jedną z najbardziej problematycznych oporności na antybiotyki występująca u bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza u gronkowców, jest ich niewrażliwość na metycylinę i inne antybiotyki  $\beta$ -laktamowe oraz antybiotyki z grupy: tetracyklin, aminoglikozydów, makrolidów czy fluorochinolonów.<sup>5,31</sup> W przypadku bakterii Gram-ujemnych największym zagrożeniem epidemiologicznym jest ich zdolność do wytwarzania  $\beta$ -laktamaz różnych typów, inaktywujących antybiotyki tej grupy. Niewrażliwość na różnego rodzaju antybiotyki może być wykształcana przez bakterie na drodze mutacji lub nabyta przez transfer horyzontalny oraz wertykalny już istniejących genów oporności.<sup>1,5</sup>

Pierwsze doniesienia o oporności bakterii pochodzą z 1942 roku i dotyczą niewrażliwości szczepów gronkowca złocistego względem popularnej wtedy penicyliny G. Oporność szczepów *S. aureus* była wywołana przez obecność w ich plazmidach genów kodujących penicylinazy ( $\beta$ -laktamazy), warunkujące niewrażliwość na naturalne penicyliny. Innym mechanizmem oporności spotykanym u *S. aureus* jest wytwarzanie białek wiążących penicylinę (PBP) o niskim powinowactwie do antybiotyków  $\beta$ -laktamowych takich jak PBP2a, PBP2b oraz PBP2c. Zdolność gronkowców do wytwarzania tego rodzaju białek zapewnia im oporność na niemal wszystkie antybiotyki  $\beta$ -laktamowe stosowane obecnie w medycynie. Oporność tego typu określa się jako MRSA, czyli *S. aureus* oporny na metycylinę (ang. methicillin-resistant *S. aureus*). Nazwa ta pochodzi od pierwszej oporności tego typu zaobserwowanej względem metycyliny występującej u gronkowca złocistego.<sup>1,31</sup>

Niemniej jednak za jeden z najmniejbezpiecznych oraz najszerzej rozpowszechnionych mechanizmów oporności wśród bakterii, zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych uważa się oporność na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe uwarunkowaną wytwarzaniem przez szczepy enzymów hydrolizujących ich pierścien  $\beta$ -laktamowy. Wspomnianymi enzymami hydrolizującymi antybiotyki do nieaktywnej ich formy, która nie wiąże się do białek PBP, są  $\beta$ -laktamazy.  $\beta$ -laktamazy różnią się od siebie masą cząsteczkową, strukturą, sekwencją aminokwasową, preferencją substratową, a także interakcjami z inhibitorami  $\beta$ -laktamaz oraz charakterem miejsca aktywnego decydującego o mechanizmie przeprowadzanego otwarcia pierścienia  $\beta$ -laktamowego. Ze względu na wymienione cechy, enzymy te można podzielić według klasyfikacji Ambler na cztery klasy – A, B, C oraz D.<sup>32,33</sup>

$\beta$ -laktamazy klasy A, C oraz D charakteryzują się bardzo podobnym mechanizmem katalitycznym, pomimo hydrolizy substratów różnego rodzaju. W centrum aktywnym tych enzymów znajduje się seryna (Ser70), która aktywowana przez lizynę (Lyz73) przeprowadza atak nukleofilowy na grupę karbonylową rdzenia  $\beta$ -laktamowego i wiąże się kowalencyjnie z cząsteczką tworząc kompleks acyl-enzym. Dołączenie do kompleksu aktywowanej przez kwas glutaminowy (Glu166) wody prowadzi do otwarcia pierścienia  $\beta$ -laktamowego oraz uwolnienia enzymu (**Rysunek 4**).<sup>33,34</sup> Inne reszty katalityczne znajdujące się w centrum aktywnym  $\beta$ -laktamaz uczestniczą w transporcie protonów podczas reakcji hydrolizy. Do  $\beta$ -laktamaz klasy B należą tak zwane metalo- $\beta$ -laktamazy o bardzo szerokim spektrum substratowym, zdolne do hydrolizy wszystkich grup antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, łącznie z karbapenemami. Swoją nazwę zawdzięczają kationowi metalu, zazwyczaj jonowi cynku  $Zn^{2+}$ , który bierze udział w aktywacji cząsteczki wody oraz prowadzi do otwarcia pierścienia  $\beta$ -laktamowego oraz inaktywacji antybiotyku.<sup>34</sup>



**Rysunek 4.** Mechanizm hydrolizy penicylin przez  $\beta$ -laktamazy serynowe (klasa A, C oraz D). Rysunek sporządzony na podstawie pracy Brem et al.<sup>34</sup>

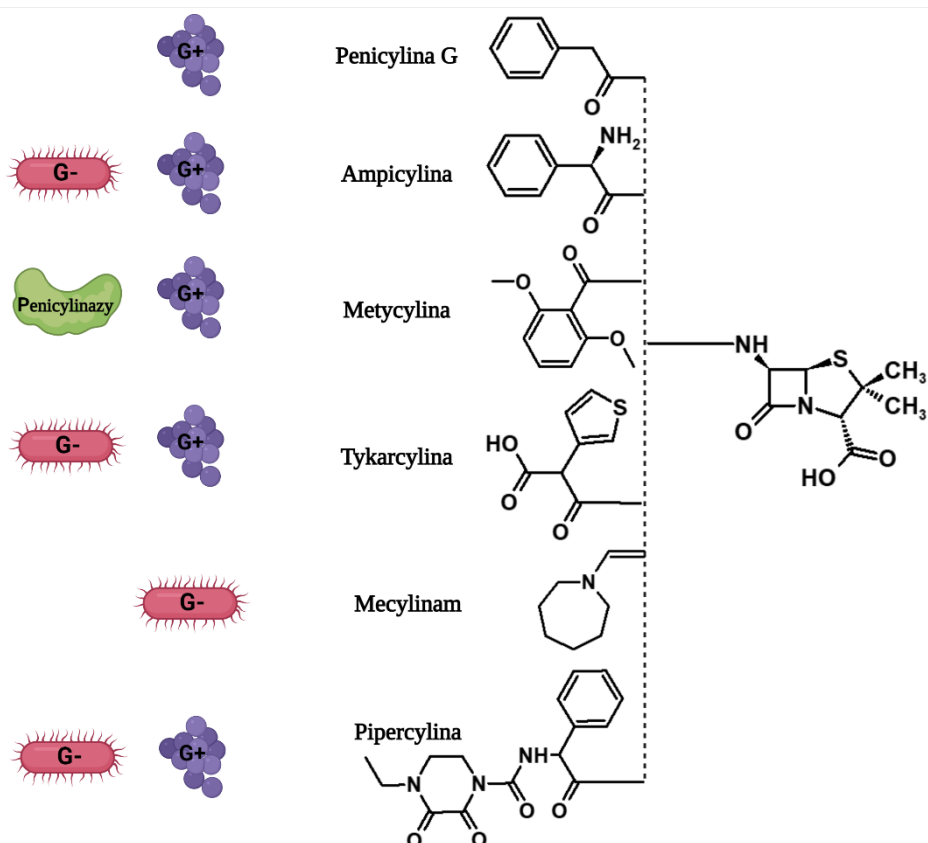
### 1.1.5. Wpływ modyfikacji antybiotyków $\beta$ -laktamowych na zakres ich działania

Spektrum działania pierwszych naturalnych penicylin obejmuje głównie bakterie Gram-dodatnie, nieposiadające penicylinaz, ani innych rodzajów oporności, takich jak wrażliwe *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. pyogenes*, ale także niektóre Gram-ujemne bakterie jak: *P. mirabilis* czy *N. gonorrhoeae*.<sup>35,36</sup> Penicylina G jest wrażliwa na niskie pH, dlatego nie mogła być lekiem podawanym doustnie. Wprowadzenie grupy fenoksymetylowej do łańcucha bocznego kwasu 6-APA, w penicylinie V, znacznie podniosło jej odporność na środowisko kwaśne oraz umożliwiło podawanie leku drogą doustną. Przełomowym wydarzeniem w historii antybiotyków, było wspomniane wcześniej odkrycie struktury penicylin oraz opracowanie produkcji kwasu 6-aminopenicylanowego stanowiącego podstawę w późniejszej produkcji penicylin półsyntetycznych.<sup>36</sup>



Niezwykle ważnymi penicylinami półsyntetycznymi, powszechnie stosowanymi na całym świecie w leczeniu infekcji wywołanych przez szczepy wrażliwe, są ampicylina i amoksycylina powstałe poprzez połączenie kwasu 6-aminopenicylanowego odpowiednio z D(-)-fenyloglicyną oraz D(-)-*p*-hydroksyfenyloglicyną.<sup>1</sup> Wprowadzona modyfikacja rozszerza spektrum działania tych antybiotyków na bakterie Gram-ujemne. Dodatkowo ich cząsteczki nie ulegają degradacji pod wpływem niskiego pH, dlatego mogą być stosowane jako leki doustne. Niektóre z półsyntetycznych penicylin są odporne na działanie penicylinaz oraz innych  $\beta$ -laktamaz. Przykładałem takich antybiotyków są metycylina, kloksacylina albo flukoksacylina. Antybiotyki tego typu charakteryzują się wąskim spektrum działania, ponieważ są aktywne tylko względem bakterii Gram-dodatnich. Niemniej jednak stanowią ważną grupę leków w walce z bakteriami opornymi na penicyliny naturalne.<sup>36</sup> Dalsze prace nad poprawą właściwości przeciwbakteryjnych penicylin doprowadziły do powstania tzw. penicylin o szerokim spektrum działania. Do tej grupy penicylin zalicza się karboksypenicyliny oraz ureidopenicyliny, w tym: karbenicylina, tykarcylina, temocylina oraz piperacylina, mezlocylina, a także azlocylina. Ich spektrum działania obejmuje zarówno bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Niektóre z nich wykazują oporność względem części  $\beta$ -laktamaz produkowanych przez bakterie Gram-ujemne. Antybiotyki z grupy ureidopenicylin są niezwykle aktywne względem paciorkowców, enterokoków, a także szczepom z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym bakteriom z grupy *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp. (także *P. aeruginosa*) oraz *Proteus* spp.<sup>1,36,37</sup> Z uwagi na związek polarności oraz hydrofilowości antybiotyków  $\beta$ -laktamowych z ich spektrum działania, wprowadzane modyfikacje rozszerzające ich działanie na bakterie Gram-ujemne często wiązało się z obniżeniem ich aktywności względem bakterii Gram-dodatnich. Przykładem antybiotyku, który stosowany jest wyłącznie w zakażeniach bakteriami Gram-ujemnymi jest mecylinam. Penicylina ta bardzo dobrze hamuje wzrost pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, natomiast jest nieskuteczna przy infekcjach wywołanych ziarenkowcami.<sup>1,38</sup> Pomimo szerokiego spektrum aktywności przeciwbakteryjnych penicylin półsyntetycznych, rozwój lekooporności wśród bakterii ogranicza ich stosowanie bez dodatku inhibitorów  $\beta$ -laktamaz.

## SPECTRUM DZIAŁANIA

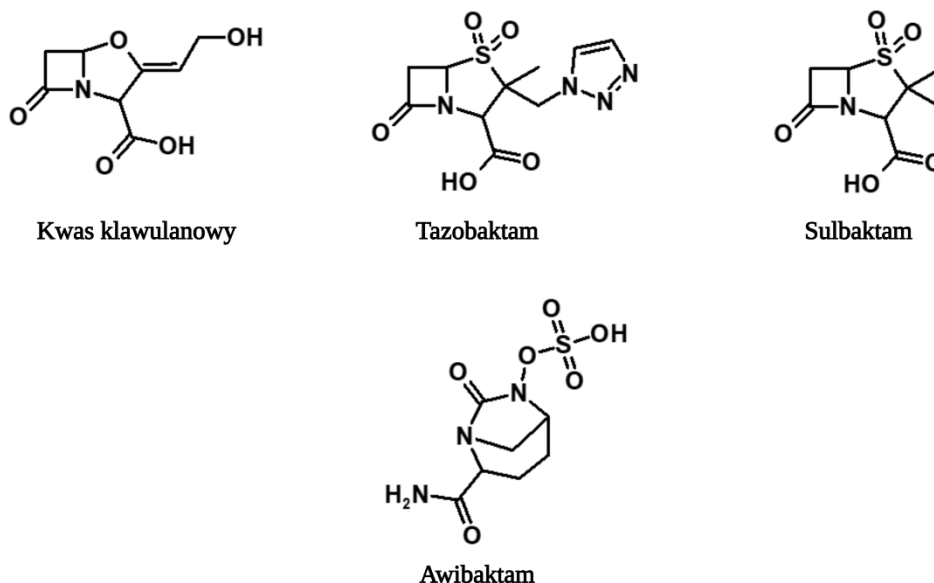


Rysunek 5. Penicyliny z różnymi grupami bocznymi ze wskazaniem ich głównego spektrum działania

### 1.1.6. Inhibitory $\beta$ -laktamaz

Rozprzestrzeniająca się lekooporność spowodowana wykształceniem u bakterii enzymów hydrolizujących antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, skłoniła naukowców do poszukiwania związków o właściwościach inhibicyjnych względem tej grupy enzymów. Pierwszym poznany inhibitorem  $\beta$ -laktamaz był kwas klawulanowy, naturalnie produkowany przez szczep *S. clavuligerus*.<sup>39</sup> Związek ten posiada w swojej budowie pierścień  $\beta$ -laktamowy, który skondensowany jest z pięcioczłonowym pierścieniem zawierającym tlen. Z tego względu kwas klawulanowy zalicza się do grupy oksapenamów. Ze względu na brak podstawnika przy węglu C6, kwas klawulanowy wykazuje słabe działanie przeciwbakteryjne, natomiast jego strukturalne podobieństwo do antybiotyków  $\beta$ -laktamowych sprawia, że jest doskonałym substratem dla  $\beta$ -laktamaz. Kwas klawulanowy wiąże się kowalencyjnie z centrum aktywnym enzymu prowadząc do jego nieodwracalnej inaktywacji. Należy do inhibitorów o szerokim spektrum działania, które obejmuje wszystkie  $\beta$ -laktamazy serynowe z grupy A, w tym  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), a także niektóre karbapenemazy

serynowe.<sup>40</sup> Jest szeroko stosowany we współczesnej medycynie w połączeniu z amoksycyliną, a także tikarcyliną.<sup>5,40</sup>



**Rysunek 6.** Struktury chemiczne głównych inhibitorów  $\beta$ -laktamaz

Innymi inhibitorami, których działanie opiera się na podobieństwie do antybiotyków  $\beta$ -laktamowych są dwa skomercjalizowane i stosowane obecnie w medycynie inhibitory: tazobaktam oraz sulbaktam. W wyniku utleniania siarki obecnej w pierścieniu dołączonym do  $\beta$ -laktamu oraz braku łańcucha bocznego w pozycji C6, związki nie wykazują znaczącej aktywności przeciwbakteryjnych. Aktywność sulbaktamu jest nieco mniejsza w stosunku do  $\beta$ -laktamaz klasy A, w porównaniu do kwasu klawulanowego oraz tazobaktamu.<sup>41</sup> Oba inhibitory sulfonowe wykazują jednak znacznie lepsze działanie w stosunku do  $\beta$ -laktamaz klasy C. Podobnie jak w przypadku kwasu klawulanowego, sulbaktam oraz tazobaktam są łączone z antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi w celu poprawy ich działania terapeutycznego względem bakterii lekoopornych. Sulbaktam najczęściej podawany jest w połączeniu z ampicyliną, natomiast tazobaktam na ogół łączony jest z piperacyliną w leczeniu ciężkich zakażeń szpitalnych.<sup>39</sup>

Istnieje również nowa grupa inhibitorów  $\beta$ -laktamaz, nieposiadająca w swojej strukturze pierścienia  $\beta$ -laktamowego. Przedstawicielem tej grupy związków jest awibaktam, którego działanie ma znacznie szerszy zakres, w porównaniu z inhibitorami  $\beta$ -laktamowymi i obejmuje  $\beta$ -laktamazy klasy A, w tym ESBL, karbapenemazy serynowe,  $\beta$ -laktamazy klasy C, a także

niektóre oksacyliny, należące do  $\beta$ -laktamaz klasy D. Chociaż awibaktam strukturalnie nie przypomina antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, to podobnie jak inhibitory  $\beta$ -laktamowe, wiąże się kowalencyjnie do centrum aktywnego enzymu, tworząc stabilny kompleks i powodując inaktywację enzymów. Awibaktam jest podawany w połączeniu z ceftazydymem oraz stosowany w leczeniu ciężkich lekoopornych infekcji.<sup>42</sup>

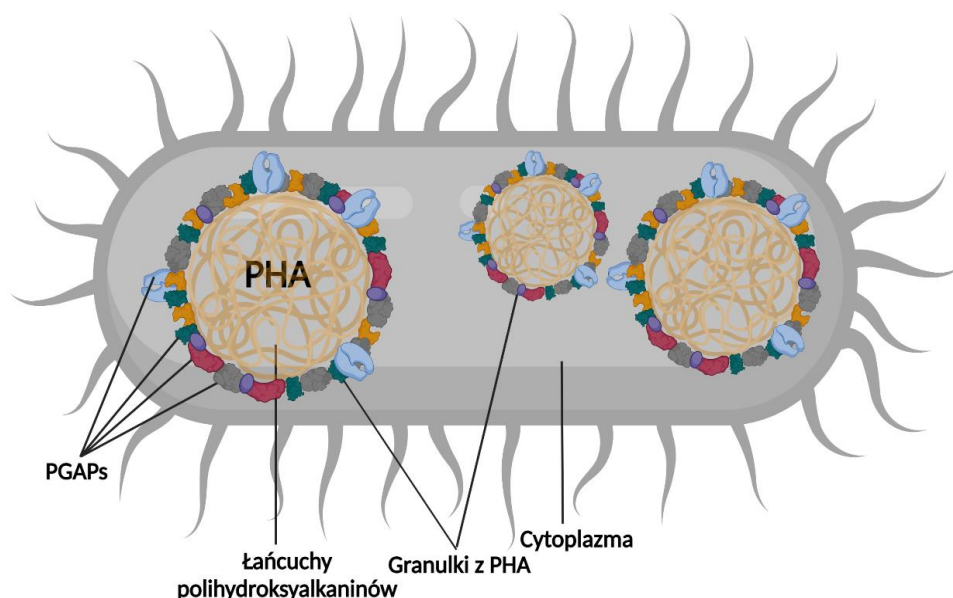
## 1.2. Polihydroksyalkaniany (PHA)

### 1.2.1. Wprowadzenie

Polihydroksyalkaniany (PHA) to bakteryjne polimery należące do rodziny biodegradowalnych poliestrów. Są syntetyzowane przez różne mikroorganizmy naturalnie występujące w środowisku, jak również przez szereg organizmów modyfikowanych genetycznie. Za odkrywcę PHA uznaje się francuskiego mikrobiologa Maurice Lemoigne, który w 1926 roku zidentyfikował obecne w *Bacillus megaterium* granulki z hydrofobowym polimerem, a także potwierdził, że jest nim poli-3-hydroksymaślan (P(3HB)).<sup>43,44</sup>

Hydrofobowe łańcuchy PHA stanowiące rdzeń granulki są otoczone przez tzw. białka PGAPs (ang. PHA granule-associated proteins), czyli białka związane z granulkami PHA, które tworzą w cytoplazmie bakterii struktury o średnicy 0,2–0,5  $\mu\text{m}$ ,<sup>45,46</sup> zwane karbonosomami. Białkami wchodzącymi w skład amfifilowej warstwy otaczającej polimer są m.in. białka bezpośrednio zaangażowane w biosyntezę i metabolizm PHA w komórce takie jak: białka powierzchniowe PhaP (ang. phasins), depolimerazy PhaZ, syntazy PhaC oraz białka regulatorowe PhaR i białka PhaM (**Rysunek 7**).<sup>46–49</sup> Charakter białek otaczających PHA umożliwia solubilizację nierozpuszczalnego w wodzie polimeru w cytoplazmie komórki bakteryjnej. Wiele doniesień literaturowych przedstawia granulkę PHA, jako polimer otoczony przez monowarstwę fosfolipidową z białkami PGAP zakotwiczonymi w błonie. Taki model karbonosomów został zaproponowany w roku 1968 po odkryciu kwasu fosfatydowego oraz innych lipidopodobnych związków zidentyfikowanych w granulkach P(3HB) wyizolowanych z *B. megaterium*.<sup>50</sup> Dodatkowym potwierdzeniem słuszności tego założenia było pierwsze obrazowanie granulek w mikroskopii elektronowej, z którego odczytano grubość ich powierzchniowej warstwy (4 nm),<sup>51</sup> odpowiadający grubości monowarstwy fosfolipidowej. Podobny wynik otrzymano później przy wyznaczaniu grubości otoczki granulki P(3HB) wyizolowanej z *Cupriavidus necator* (2,9–3,8 nm), co stanowi w przybliżeniu połowę grubości błony cytoplazmatycznej.<sup>52</sup> Model granulki PHA otoczony monowarstwą, której grupy polarne

są skierowane do cytoplazmy, a niepolarne do hydrofobowego polimeru, dobrze odpowiadał charakterowi materiału gromadzonemu w karbonsomach. Najnowsze badania wykazują jednak, że nie ma żadnych dowodów potwierdzających obecność fosfolipidów w granulce PHA *in vivo*, a ich obecność w wyizolowanych karbonsomach może być wynikiem ich wiązania do polimeru przy procesie izolacji z rozerwanych komórek bakteryjnych.<sup>46,47</sup>



**Rysunek 7.** Schemat budowy granulki PHA zlokalizowanej w cytoplazmie bakterii

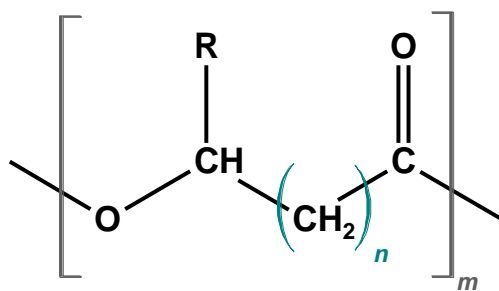
Polihydroksyalkaniany są produkowane przez niektóre gatunki Eubakterii i Archeonów, na ogół, gdy w środowisku występuje nadmiar węgla organicznego, który drobnoustroje są zdolne przyswajać, przy jednoczesnym oddziaływaniu stresora niesprzyjającego procesowi namnażania komórek. Warunkami niesprzyjającymi podziałom komórek może być np. niedobór ważnego składnika odżywczego (innego niż węgiel) albo inne czynniki chemiczne lub fizyczne zaburzające normalny wzrost bakterii.<sup>47,53</sup> Zmagazynowane w granulkach PHA jest wykorzystywane przez bakterię jako źródło węgla i energii, jednak nie jest to jedyna funkcja jaką pełnią w komórce. Udowodniono, że bakterie zdolne do produkcji PHA posiadają zwiększoną odporność na różne niekorzystne czynniki środowiskowe takie jak: niska temperatura i mrożenie,<sup>54,55</sup> wysoka temperatura,<sup>56,57</sup> stres osmotyczny,<sup>57</sup> obecność metali ciężkich<sup>58</sup> czy promieniowanie UV,<sup>57,59</sup> co znacząco zwiększa ich przeżywalność w złych warunkach środowiskowych. Rola ochronna PHA ma ściśle powiązanie z ich przemianami w komórce bakteryjnej, ale również z innymi kluczowymi ścieżkami metabolicznymi jak oddychanie komórkowe, liponeogeneza, czy cykl Calvin-Bensona.<sup>60-62</sup>

W zależności od rodzaju dostępnego w środowisku rodzaju węgla organicznego oraz od drobnoustroju, który produkuje PHA, pula budujących je monomerów jest różna. Polihydroksyalkaniny występują w postaci zarówno homo- jak i heteropolimerów. Należą do grupy poliestrów biodegradowalnych w środowisku naturalnym, gdzie rozkładane są przez mikroorganizmy wyposażone w depolimerazy PHA lub inne enzymy hydrolizujące wiązania estrowe.<sup>63</sup> Następnie produkty degradacji są dalej metabolizowane przez bakterie środowiskowe do wody i dwutlenku węgla,<sup>64</sup> a w przypadku rozkładu beztlenowego do dwutlenku węgla oraz metanu. Polihydroksyalkaniny wyprodukowane przez bakterie oraz odzyskane z biomasy i poddane procesom post-produkcyjnym są tworzywami będącymi świetną alternatywę dla tworzyw sztucznych. Oprócz wyróżniającej je biodegradowalności, PHA odznaczają się dodatkowo nietoksycznością oraz biokompatybilnością, dlatego znalazły szerokie zastosowanie w rolnictwie, przemyśle, a także w medycynie.<sup>65,66</sup>

### 1.2.2. Struktura chemiczna PHA

Polihydroksyalkaniny zbudowane są zazwyczaj z różnych *R*-3-hydroksykwasów, ale zidentyfikowano również monomery z grupą hydroksylową występującą na węglu C4, C5 lub C6.<sup>67</sup> Monomery budujące łańcuchy PHA występują głównie jako *R*-enancjomery. Poszczególne cząsteczki hydroksykwasów występujące w polimerze są połączone wiązaniem estrowym, powstałym w reakcji połączenia grupy karboksylowej jednego monomeru z grupą hydroksylową drugiego.<sup>68</sup> Grupy boczne monomerów PHA są bardzo zróżnicowane i mogą zawierać szereg interesujących grup funkcyjnych takich jak: tiofenoksylova, acetylotioestrowa, ketonowa, dimetylowa, fluorofenoksylova, cyjanowa czy nitrofenoksylova. Do tej pory odkryto i scharakteryzowano ponad 150 rodzajów monomerów produkowanych przez mikroorganizmy występujące w naturze, a liczba ta ciągle rośnie.<sup>62,67,69</sup>

Ze względu na ilość atomów węgla w cząsteczce monomeru, polihydroksyalkaniny można zaklasyfikować do trzech grup: krótkołańcuchowe PHA (ang. short-chain length PHA, scl-PHA), które zawierają w cząsteczce od 3-5 atomów węgla, średniołańcuchowe PHA (ang. medium-chain length PHA, mcl-PHA) posiadające od 6-14 atomów węgla w łańcuchu oraz długołańcuchowe PHA (ang. long-chain length PHA, lcl-PHA) składające się z 15 lub więcej atomów węgla.<sup>62</sup>

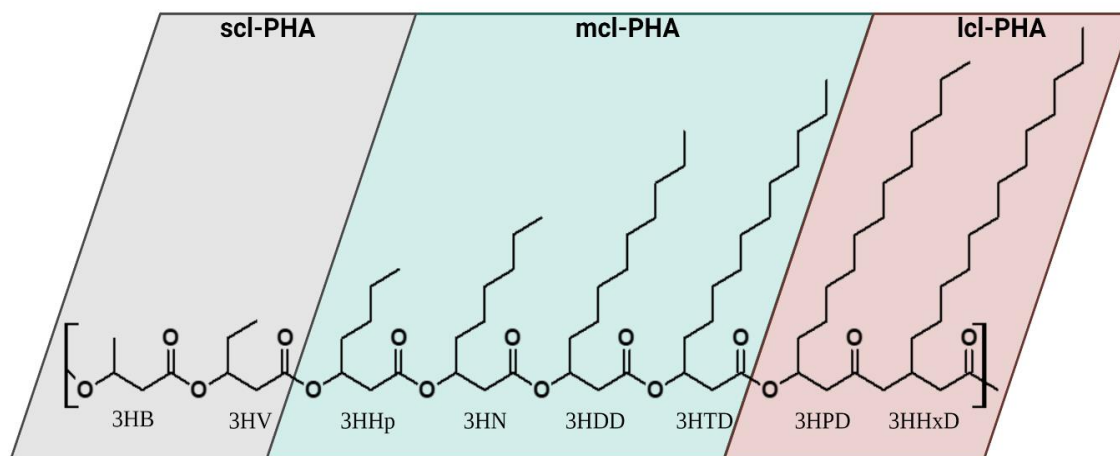


**Rysunek 8.** Schemat budowy chemicznej PHA, będącego homopolimerem, gdzie: R-grupa boczna zawierająca od 1–13 atomów węgla,  $n = 1, 2$  lub  $3$ ,  $m = 600–35000$ .

Polimery PHA mogą być zbudowane z jednego rodzaju monomeru (**Rysunek 8**) lub kilku, różniących się od siebie zazwyczaj długością łańcucha bocznego (różnica o wielokrotność C2 w cząsteczce).<sup>45</sup> Do najbardziej rozpowszechnionego w środowisku homopolimeru PHA należy poli-3-hydroksymaślan (P(3HB)) i razem z poli-3-hydroksywalerianem (P(3HV)) oraz poli-4-hydroksymaślanem P(4HB) są głównymi reprezentantami scl-PHA. Zidentyfikowano wiele szczepów bakteryjnych zdolnych do syntezy scl-PHA, w tym bakterie Gram-ujemne (*Azotobacter*, *Cupriavidus* lub *Burkholderia*) czy Gram-dodatnie (*Bacillus*, *Rhodococcus*, *Nocardia*) oraz archeony (*Haloferax mediterranei*).<sup>70</sup> Niektóre mikroorganizmy, w zależności od dostępnego węgla organicznego w środowisku, potrafią produkować kopolimery scl-PHA takie jak: poli(3-hydroksymaślan-co-3-hydroksywalerian) lub poli(3-hydroksymaślan-co-4-hydroksymaślan) (P(3HB-co-4HB)). Przykładami bakterii produkujących krótkołańcuchowe heteropolimery są: *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus* *Alcaligenes eutrophus*, oraz *Comamonas acidovorans*, *Hydrogenophaga pseudoflava*.<sup>62,71</sup> Krótkołańcuchowe PHA są polimerami termoplastycznymi o wysokim stopniu krystaliczności. Poli-3-hydroksymaślan odznacza się dodatkowo wysoką sztywnością i kruchością, co ma wpływ na jego potencjał aplikacyjny. Połączenie monomerów 3HB z monomerem 4HB lub 3HV, znacząco wpływa na poprawę elastyczności tworzywa, dzięki czemu kopolimery takie jak P(3HB-co-4HB) znalazły szerokie zastosowanie w medycynie i farmacji jako materiały biokompatybilne.<sup>71</sup>

Polihydroksyalkaniany o średniej długości łańcucha (mcl-PHA) należą do rodziny elastomerów oraz charakteryzują się niską krystalicznością i temperaturą topnienia.<sup>72</sup> Ze względu na dużą różnorodność monomerów, które mogą je budować, stanowią znacznie bardziej zróżnicowaną grupę polimerów niż scl-PHA. Znalazły one głównie zastosowanie w inżynierii tkanek twardych i miękkich (głównie poli-3-hydroksyoktanian),<sup>73,74</sup> a w połączeniu z scl-PHA są wykorzystywane jako nośniki leków, sztuczne naczynia krwionośne i zastawki sercowe, a także jako stenty, opatrunki na rany i inne szeroko pojęte wyroby medyczne.<sup>75</sup> Dodatkowo polimery, które w swoim łańcuchu bocznym zawierają

przynajmniej jedno wiązanie podwójne są bardzo atrakcyjne ze względu na możliwość ich chemicznej funkcjonalizacji, a także wytwarzanie polimerów hybrydowych (organiczno-nieorganicznych).<sup>76,77</sup> Mcl-PHA występują najczęściej jako heteropolimery, jednak można przy wykorzystaniu niektórych zmodyfikowanych szczepów lub specjalnych strategii hodowlanych otrzymywać średniołańcuchowe homopolimery PHA.<sup>67</sup> Do głównych producentów mcl-PHA należą takie szczepy jak: *Pseudomonas oleovorans* czy *Pseudomonas putida*. Szczepy te do wydajnej biosyntezy polimeru potrzebują zastosowania w medium hodowlanym czynnika limitującego, to znaczy niedoboru ważnego składnika odżywczego.<sup>78</sup> Źródłem węgla najczęściej stosowanym przy produkcji mcl-PHA są różnej długości kwasy tłuszczowe, od których zależy później budowa polimeru oraz kompozycja jego monomerów.



**Rysunek 9.** Główni przedstawiciele monomerów wchodzących w skład polihydroksyalkanianów krótkołańcuchowych (scl-PHA), średniołańcuchowych (mcl-PHA) oraz długołańcuchowych (lcl-PHA), **3HB**-kwas 3-hydroksymasłowy, **3HV**-kwas 3-hydroksywalerianowy, **3HHp**-kwas 3-hydrokseyheptanowy, **3HN**-kwas 3-hydroksynonanowy, **3HDD**-kwas 3-hydroksydodekanowy, **3HTD**-kwas 3-hydroksytetradekanowy, **3HPD**-kwas 3-hydrokspentadekanowy, **3HHxD**-kwas 3-hydrokseyheksadekanowy.

Lcl-PHA są grupą polimerów bakteryjnych rzadko występujących w przyrodzie. Charakteryzują się niską twardością oraz wysoką lepkością,<sup>79</sup> dlatego nie znalazły szerokiego zastosowania w przemyśle. Polihydroksyalkaniany długołańcuchowe są częściej spotykane w formie kopolimerów scl-lcl-PHA, mcl-lcl-PHA lub stanowią niewielki udział przy biosyntezie heteropolimerów mcl-PHA. Szczepy zdolne do produkcji kopolimerów z udziałem lcl-PHA to np. *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925, a także niedawno odkryte szczepy *Enterobacter* sp TS3 oraz TS1L.<sup>80,81</sup>



### 1.2.3. Biosynteza PHA w komórce bakteryjnej

Polihydroksyalkaniany są produkowane i magazynowane w komórce bakteryjnej na drodze szeregu złożonych przemian biochemicznych. Ich szlaki biosyntezy są siecią skomplikowanych reakcji powiązanych z centralnymi ścieżkami metabolicznymi takimi jak: synteza kwasów tłuszczowych *de novo*, glikoliza, cykl kwasu cytrynowego,  $\beta$ -oksydacja, cykl Calvina-Bensona, szlak serynowy, a także katabolizm aminokwasów.<sup>62,82</sup> Do tej pory zostało odkrytych i opisanych 14 szlaków syntezy PHA, w których udział bierze ponad 60 różnych syntaz PHA.<sup>83</sup> Syntazy naturalnie występujące w bakteriach produkujących PHA można podzielić na cztery klasy, ze względu na rozmiar, ilość budujących je podjednostek, specyficzność substratową enzymów oraz ich strukturę pierwszorzędową. Enzymy wchodzące w skład klasy I zbudowane są tylko z jednego typu podjednostek **PhaC**, których masa cząsteczkowa wynosi 61-73 kDa.<sup>84</sup> Występują często u mikroorganizmów, które produkują scl-PHA (*Cupriavidus necator*). Syntazy klasy II również tworzone są z pojedynczej podjednostki **PhaC1** lub **PhaC2**, a ich masy cząsteczkowe wynoszą 60-65 kDa.<sup>84,85</sup> Białka tej klasy występują najczęściej u bakterii produkujących mcl-PHA, takich jak: *P. oleovorans*, *P. aeruginosa* czy *Pseudomonas putida* oraz występują w postaci homodimerów (tak samo jak syntazy klasy I).<sup>79,86</sup> W klasie III syntaz PHA znajdują się heterodimery zbudowane z podjednostek **PhaC** (~40 kDa) oraz **PhaE** (~40 kDa), występujące u takich bakterii jak np. *Allochromatium vinosum*. Podjednostki PhaC tej klasy (w przeciwieństwie do PhaE) wykazują podobieństwo w sekwencji aminokwasów do PhaC klasy I oraz II. Syntazy klasy IV są heterodimerami złożonymi z podjednostek PhaC oraz PhaR (~20 kDa), a bakteriami, które są w nie wyposażone są m.in. *Bacillus megaterium*.<sup>86,87</sup>

Wiele produktów przemian materii występuje również w szlakach syntezy i degradacji PHA. Przykładem cząsteczki, wspólnej dla różnych ważnych szlaków metabolicznych oraz biosyntezy PHA jest acetylo-koenzym A (acetylo-CoA). Bakteria znajdująca się w medium bogatym w składniki odżywcze produkuje duże ilości koenzymu A, blokującego syntezę PHA poprzez inhibicję PhaC. Acetylo-CoA jest natomiast przekierowywany do cyklu Krebsa, w którym uczestniczy w wytwarzaniu energii oraz wzroście komórki. W przypadku wzrostu bakterii w środowisku z limitowaną ilością ważnego składnika odżywczego, takiego jak azot czy fosfor, ilość koenzymu A w komórce nie osiąga poziomu hamującego syntazę PHA. Acetylo-CoA trafia natomiast do szlaku biosyntezy polihydroksyalkanianów, a polimer zostaje akumulowany w komórce bakteryjnej.<sup>62</sup>

W zależności od wykorzystywanego szczepu bakteryjnego stosowane są różne strategie hodowlane. Przy biosyntezie PHA najczęstszym podejściem jest ograniczenie w medium hodowlanym nieorganicznego składnika odżywczego przy jednoczesnym nadmiarze źródła węgla.<sup>88</sup> Szczepami, które wykorzystuje się w tego rodzaju hodowlach są np. *Cupriavidus necator*, *Methylobacterium organophilum*, czy różne bakterie z grupy *Pseudomonas*. Znane są też szczepy rekombinowane *E. coli* oraz *A. vinelandii*, które są zdolne do produkcji mcl-PHA bez konieczności stosowania specjalnych limitów substancji odżywczych.<sup>78,89</sup> Ze względu na mechanizm akumulacji PHA można zatem podzielić mikroorganizmy na dwie grupy: bakterie syntetyzujące PHA przy zastosowaniu czynnika limitującego w medium oraz bakterie niewymagające ograniczenia składników odżywczych w trakcie hodowli.<sup>90</sup>

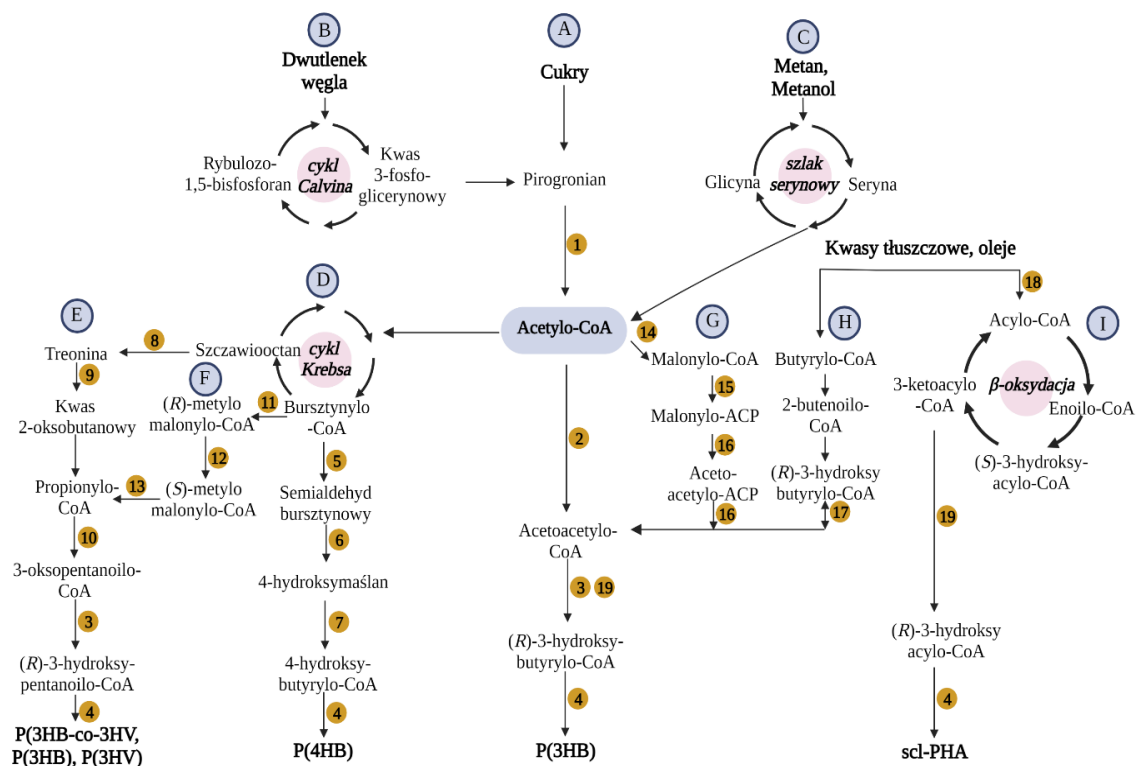
### 1.2.3.1. Szlaki biosyntezy krótkołańcuchowych PHA (scl-PHA)

Polihydroksyalkaninem najczęściej występującym w przyrodzie jest poli-3-hydroksymaślan, a jego główny szlak biosyntezy jest jednym z najdokładniej poznanych. Źródłem węgla, najczęściej wykorzystywanym do wytwarzania P(3HB) na skalę przemysłową, są różnego rodzaju cukry, które podczas przemian metabolicznych zostają przekształcane do acetylo-CoA. Następnie w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek acetylo-CoA przez  $\beta$ -ketotiolazę (PhaA) otrzymywany jest acetoacetylo-CoA. W kolejnym etapie związek ten jest redukowany przez stereospecyficzną PhaB do (*R*)-3-hydroksybutyrylo-CoA. Zakończeniem procesu jest katalizowane przez syntazę P(3HB) (PhaC) połączenie grup karboksylowych i hydroksylowych reszt (*R*)-3-hydroksymaślanu w długie łańcuchy P(3HB) (**Rysunek 10, ścieżka A**).<sup>79,83</sup>

Niektóre bakterie autotroficzne zdolne do utlenienia wodoru, takie jak *C. necator*, *Rhodospirillum rubrum* czy *Cupriavidus eutrophus*, syntetyzują PHA wykorzystując jako źródło węgla CO<sub>2</sub> lub CO.<sup>91,92</sup> Węgiel nieorganiczny zostaje wprowadzany do szlaku metabolicznego bakterii autotroficznej dzięki kluczowemu enzymowi, którym jest karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO). Enzym ten katalizuje reakcję przyłączenia cząsteczki CO<sub>2</sub> do rybulozo-1,5-bisfosforanu w cyklu Calvina, którego produkty są następnie wykorzystane w biosyntezie scl-PHA (**Rysunek 10, ścieżka B**).<sup>79</sup>

Innym przykładem związków, które mogą stanowić źródło węgla dla bakterii produkujących scl-PHA jest metanol oraz metan (**Rysunek 10, ścieżka C**). Bakterie metylotroficzne, takie jak *Methylobacterium extorquens* AM1, *Methylocystis parvus* OBBP oraz *Methylosinus trichosporium* OB3b są zdolne do asymilacji związków C1 w cyklu

serynowym.<sup>93</sup> Powstająca w cyklu cząsteczka acetylo-CoA, może być następnie wykorzystana w szlaku biosyntezy P(3HB).<sup>94</sup> Wykazano, że niektóre szczepy metylotroficzne mogą produkować również kopolimer P(3HB-co-3HV) przez wprowadzenie dodatkowego źródła węgla takiego jak propionian sodu lub walerianian sodu.<sup>93,95</sup>



**Rysunek 10.** Główne szlaki biosyntezy scl-PHA w komórce bakteryjnej z uwzględnieniem różnych źródeł węgla występujących w środowisku. Literami oznaczono wybrane ścieżki biosyntezy, a liczbami od 1 do 19 enzymy biorące udział w poszczególnych przemianach. Pełne nazwy enzymów oraz ich skróty umieszczono w Tabeli 1. Schemat przygotowano w oparciu o prace Tan et al. 2014<sup>62</sup>, Meng et al. 2014<sup>83</sup> oraz Lu et al. 2009<sup>100</sup> i wykonano w programie BioRender.

Produkcja kopolimeru P(3HB-co-3HV) na skalę przemysłową oraz badanie nowych ścieżek jego biosyntezy z uwzględnieniem różnych źródeł węgla, stanowi ważny temat z uwagi na coraz szersze wykorzystanie tego tworzywa w przemyśle oraz medycynie. Zwykle biosynteza P(3HB-co-3HV) przebiega w bakteriach, które wykorzystują jako źródło węgla glukozę oraz sole propionianu. Istnieje jednak alternatywny szlak produkcji tego rodzaju heteropolimeru, a mianowicie **ścieżka E (Rysunek 10)**.<sup>82</sup> Niektóre szczepy bakteryjne takie jak rekombinowany *Halomonas* TD08 są zdolne do metabolizowania różnego rodzaju cukrów i innych niepowiązanych źródeł węgla do propionylo-CoA poprzez cykl Krebsa oraz szlak biosyntezy treoniny. Następnie propionylo-CoA jest konwertowany do 3-(R)-

hydroksypentanoilo-CoA, który może ulec polimeryzacji przy udziale PhaC do kopolimeru P(3HB-co-3HV).<sup>96</sup>

**Ścieżka F** przedstawia kolejny sposób wytwarzania P(3HV) wśród bakterii, poprzez wykorzystanie cyklu Krebsa oraz powstającego w nim bursztynylo-CoA, bez wprowadzenia do medium hodowlanego dodatkowego źródła węgla w postaci soli propionianów. Trzy główne enzymy (mutaza metylomalonylo-CoA, racemaza metylomalonylo-CoA oraz dekarboksylaza metylomalonylo-CoA) biorą udział w przekształceniu bursztynylo-CoA do propionylo-CoA, który może być następnie wprowadzony na ścieżkę biosyntezy P(3HV) lub P(3HB-co-3HV).<sup>62,97</sup> Bursztynylo-CoA stanowi również wyjściową cząsteczkę (pochodzącą z cyklu Krebsa) w wytwarzaniu 4-hydroksybutyrylo-CoA (**ścieżka D**), który następnie polimeryzowany jest przy udziale PhaC do P(4HB) lub kopolimeru P(3HB-co-4HB).<sup>98,99</sup>

**Tabela 1. Enzymy zaangażowane w biosyntezę PHA**

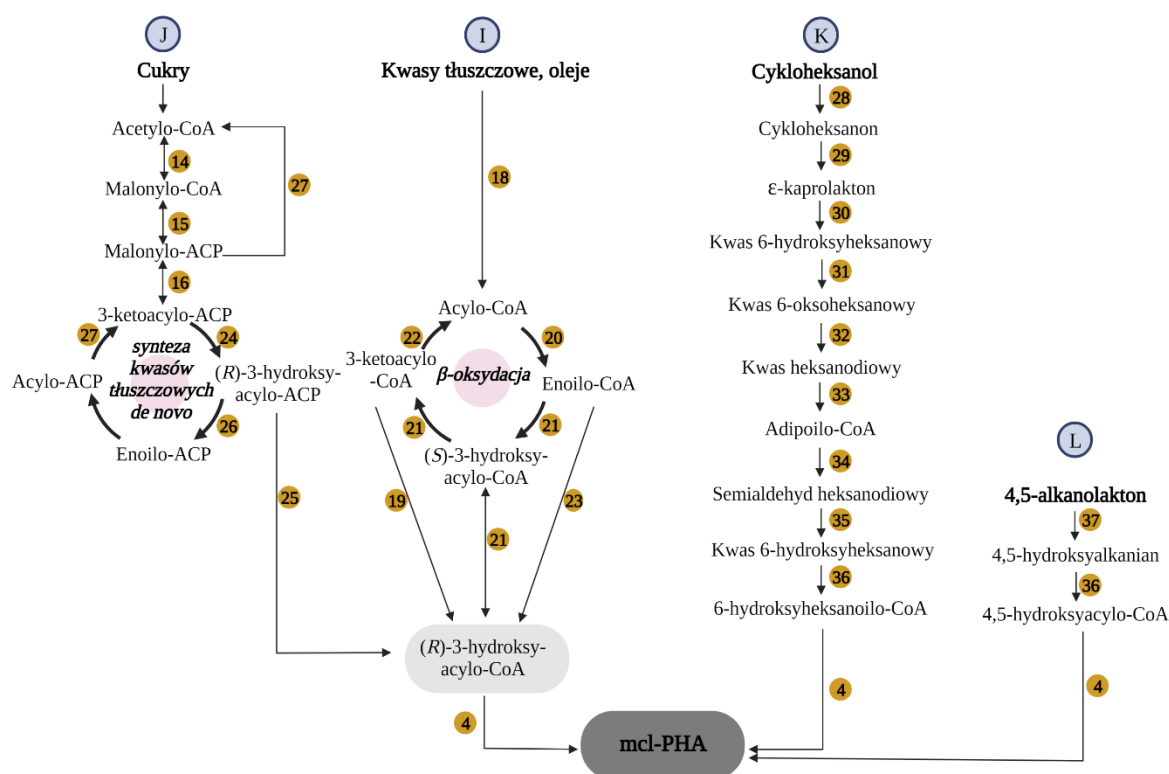
Numer	Ścieżka	Skrót	Nazwa enzymu
1	A	–	Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej <sup>82</sup>
2		PhaA	$\beta$ -Ketotiolaza <sup>82</sup>
3		PhaB	NADPH-zależna reduktaza acetoacetylo-CoA <sup>82</sup>
4		PhaC	Syntaza PHA <sup>82</sup>
5	D	SucD	Dehydrogenaza semialdehydu bursztynowego <sup>99</sup>
6		4hbD	Dehydrogenaza 4-hydroksymaślanowa <sup>83,99</sup>
7		OrfZ	Transferaza 4-hydroksymaślanowa <sup>99,100</sup>
8	E	ThrA, ThaB, ThrAC	Aspartokinaza I, Kinaza homoserynowa, Syntaza treoninowa <sup>83</sup>
9		IlvA	Deaminaza treoninowa <sup>82,83</sup>
10		BktB	3-ketotiolaza <sup>82,97</sup>
11	F	Sbm	Mutaza metylomalonylo-CoA <sup>62,97</sup>
12		-	Racemaza metylomalonylo-CoA <sup>62,101</sup>
13		YgfG	Dekarboksylaza metylomalonylo-CoA <sup>62,97</sup>
14	G	kompleks accABCD	Karboksylaza acetylo-CoA <sup>102,103</sup>
15		FabD	Malonylo-CoA: transacylaza ACP <sup>102,104</sup>
16		FabH	Syntaza III 3-ketoacylo-ACP <sup>100</sup>
17	H	–	NADPH-zależna reduktaza acetoacetylo-CoA
18	I	FadD	Syntetaza acylo-CoA
19		FabG	NADPH-zależna reduktaza 3-ketoacylowa <sup>105</sup>

Produkcja PHA z kwasów tłuszczowych jest bardzo popularną ścieżką w syntezie mcl-PHA. Znane są jednak bakterie (*Pseudomonas oleovorans* NRRL B14682, *C. necator* DSM 428 oraz *C. necator* NRRL B-4383) zdolne do produkcji scl-PHA z kwasów tłuszczowych i olejów o różnej długości łańcuchów.<sup>106</sup> Dokładny opis **ścieżki I** znajduje się w **podrozdziale 1.2.3.2.**

### 1.2.3.2. Szlaki biosyntezy średniołańcuchowych PHA (mcl-PHA)

Wiele szczepów bakteryjnych, w tym *Pseudomonas* spp., do biosyntezy mcl-PHA wykorzystuje kwasy tłuszczowe poprzez ich  $\beta$ -oksydację, z której komórka pozyskuje energię oraz substraty niezbędne do wzrostu. Każdy cykl szlaku  $\beta$ -oksydacji skraca długość łańcuchów wchodzących do komórki kwasów tłuszczowych o dwa atomy węgla. W konsekwencji, polimeryzacji ulegają różnej długości monomery PHA, generując heteropolimer.<sup>107</sup> Kwasy tłuszczowe wprowadzone do komórki bakteryjnej przekształcane są przez syntetazę FadD w acylo-CoA i wprowadzane do szlaku  $\beta$ -oksydacji. Następnie dehydrogenaza FadE, katalizuje tworzenie podwójnego wiązania w acylo-CoA, w wyniku czego powstaje enoilo-CoA.<sup>79</sup> Enoilo-CoA powstający w szlaku, może zostać przekształcony przez hydrolazę PhaJ do (*R*)-3-hydroksyacylo-CoA lub dalej w szlaku  $\beta$ -oksydacji do (*S*)-3-hydroksyacylo-CoA i 3-ketoacylo-CoA (**Rysunek 10 i 11, ścieżka I**), przy udziale kompleksu białek FadBA.<sup>79</sup> NADPH-zależna reduktaza 3-ketoacylowa katalizuje następnie redukcję 3-ketoacylo-CoA do (*R*)-3-hydroksyacylo-CoA. Dodatkową ścieżką wprowadzającą cząsteczkę (*S*)-3-hydroksyacylo-CoA do szlaku biosyntezy PHA jest reakcja przeprowadzana przez epimerazę 3-hydroksyacylo-CoA (FadB), w wyniku której powstaje (*R*)-3-hydroksyacylo-CoA. W ostatnim etapie szlaku, syntaza PhaC katalizuje reakcję polimeryzacji PHA.<sup>79,108,109</sup> Spośród możliwych źródeł węgla w biosyntezie mcl-PHA, substancje strukturalnie odmienne od kwasów tłuszczowych czy też samych monomerów PHA (np. węglowodory aromatyczne czy węglowodany), mogą zostać przekształcone na drodze różnych przemian do acetylo-CoA, a następnie skierowane do szlaku syntezy kwasów tłuszczowych *de novo* (**ścieżka J**). W pierwszym etapie szlaku biosyntezy kwasów tłuszczowych, cząsteczka acetylo-CoA zostaje przekształcona do malonylo-CoA przez karboksylazę acetylo-CoA. Następnie transacylaza FabD przeprowadza transestryfikację malonylo-CoA, w wyniku czego powstaje cząsteczka malonylo-ACP.<sup>104</sup> Dalej otrzymany malonylo-ACP jest kondensowany z acetylo-CoA przez syntazę FadH do 3-ketoacylo-ACP. Następnie utworzony 3-ketoacylo-ACP zostaje zredukowany do (*R*)-3-hydroksyacylo-ACP przez reduktazę FabG i dalej może ulec konwersji do (*R*)-3-hydroksyacylo-CoA przez PhaG

i zostać włączony do cyklu biosyntezy mcl-PHA.<sup>79,110</sup> Część cząsteczki (*R*)-3-hydroksyacylo-ACP, która pozostaje w szlaku biosyntezy kwasów tłuszczowych *de novo*, zostaje przekształcona przez dehydratazę FabA lub FanZ do enoilo-ACP,<sup>111</sup> a następnie zredukowana do acylo-ACP. W kolejnych cyklach biosyntezy, do cząsteczki 3-ketoacylo-ACP dołącza się acylo-ACP przy udziale syntaz FabB lub FabF, wydłużając łańcuchy produkowanych kwasów tłuszczowych.<sup>79,112</sup>



**Rysunek 11.** Główne szlaki biosyntezy mcl-PHA w komórce bakteryjnej z uwzględnieniem różnych źródeł węgla występującego w środowisku. Literami oznaczono wybrane ścieżki biosyntezy, a liczbami enzymy biorące udział w poszczególnych przemianach. Pełne nazwy enzymów oraz ich skróty umieszczono w Tabeli 2. Schemat przygotowano w oparciu o prace Tan et al.,<sup>62</sup> Meng et al.,<sup>83</sup> Możejko-Ciesielska i Kiewisz.<sup>86</sup> Ilustracja wykonana w programie BioRender.

Utlenianie cyklicznych alkoholi (**Rysunek 11, ścieżka K**) przy wykorzystaniu mikroorganizmów prowadzi zazwyczaj do otrzymania kwasów dikarboksylowych. Do bakterii przeprowadzających enzymatyczny rozkład cykloheksanolu i jego pochodnych należą bakterie takie jak: *Acinetobacter* oraz *Brevibacterium*.<sup>113,114</sup> W pierwszym etapie biodegradacji cykloheksanolu jest on poddany dehydrogenacji przez ChnA do cykloheksanonu, który następnie jest utleniany przez monooksygenazę ChnB, a do pierścienia zostaje wprowadzony atom tlenu, w wyniku czego powstaje kaprolakton. Utworzony pierścień laktonowy zostaje następnie rozszczepiony przez hydrolazę ChnC i powstaje kwas 6-hydroksyheksanowy. Następnie dehydrogenaza ChnD, przekształca ten kwas do jego keto-pochodnych, a w wyniku

działania dehydrogenazy ChnE otrzymywany jest kwas heksanodiowy.<sup>111</sup> Dalsze konwersje tego ostatniego i jego włączenie do biosyntezy PHA nie zostało jeszcze dokładnie opisane, ale prawdopodobne przemiany zachodzące w bakterii, która wykorzystuje cykliczne związki jako źródło węgla do produkcji PHA, zostały zaproponowane w przez G.-Q. Chen<sup>115</sup> i przedstawione na **Rysunku 11**.

**Tabela 2. Enzymy biorące udział w biosyntezie mcl-PHA**

Numer	Ścieżka	Skrót	Nazwa enzymu
18	I	FadD	Syntetaza acylo-CoA <sup>109</sup>
19		FadG	NADPH-zależna reduktaza 3-ketoacylowa <sup>105,109</sup>
20		FadE	Dehydrogenaza acylo-CoA <sup>116,117</sup>
21		FadB	Hydrataza enoilo-CoA / NAD-zależna dehydrogenaza (S) -3-hydroksyacylo-CoA/ epimeraza 3-hydroksyacylo-CoA <sup>79,109</sup>
22		FadA	Tiolaza ketoacylo-CoA <sup>109</sup>
23		PhaJ	(R)-specyficzna hydrataza enoilo-CoA <sup>109</sup>
14		J	kompleks accABCD
15	FabD		Malonylo-CoA: transacylaza ACP <sup>102,104</sup>
16	FabH		Syntaza III 3-ketoacylo-ACP <sup>112</sup>
24	FabG		Podjednostka reduktazy 3-oksoacylo-ACP <sup>112</sup>
25	PhaG		Transferaza 3-hydroksyacylo-CoA-ACP <sup>110</sup>
26	FabA, FabZ		Dehydrataza (R)-3-hydroksydekanoilo-ACP, Dehydrataza 3-hydroksyacylo-ACP <sup>112</sup>
27	FabB, FabF		Syntaza 3-oksoacylo-ACP, syntaza II β-ketoacylo-ACP <sup>112</sup>
28	K	ChnA	Dehydrogenaza cykloheksanolowa <sup>111</sup>
29		ChnB	Monooksygenaza cykloheksanonowa <sup>111</sup>
30		ChnC	Hydrolaza kaprolaktonowa <sup>111</sup>
31		ChnD	Dehydrogenaza 6-hydroksyheksanianowa <sup>111</sup>
32		ChnE	Dehydrogenaza 6-oksoheksanianowa <sup>111</sup>
33		-	Dehydrogenaza semialdehydowa <sup>115</sup>
34		-	Dehydrogenaza 6-hydroksyheksanianowa <sup>115</sup>
35		-	Syntaza hydroksyacylo-CoA <sup>115</sup>
36	-	Syntaza hydroksyacylo-CoA <sup>115</sup>	
37	L		Laktonaza <sup>118</sup>

#### 1.2.4. Charakterystyka monomerów PHA i ich modyfikacje

Otrzymywane podczas fermentacji bakteryjnej poliestry PHA odznaczają się bardzo dużym zróżnicowaniem budujących je monomerów. Ich depolimeryzacja dostarcza chiralnie czyste związki, będące w większości przypadków (*R*)-3-hydroksykwasami. Czyste optycznie monomery PHA są cennym źródłem związków, zwłaszcza dla przemysłu farmaceutycznego, z uwagi na możliwość ich wykorzystania w syntezie i modyfikacji nowych związków biologicznie czynnych.<sup>119</sup> Poszczególne monomery budujące długie łańcuchy polihydroksyalkanianów połączone są wiązaniem estrowym, powstającym w reakcji pomiędzy grupą hydroksylową (znajdującą się w większości przypadków na węglu C3) jednego monomeru, a grupą karboksylową występującą w drugim monomerze.<sup>68</sup> Związki uzyskane po depolimeryzacji PHA posiadają zatem co najmniej dwie wolne grupy funkcyjne: hydroksylową oraz karboksylową.

W zależności od długości łańcucha bocznego monomerów oraz posiadanych grup funkcyjnych, związki te wykazują różnorodne właściwości fizjologiczne. Wykazano, że monomery PHA posiadające w łańcuchu grupę aromatyczną mają właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwgrzybiczne. Stężenie bójcze względem bakterii takich jak *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii* albo *L. innocua* wynosi 3–6 mM.<sup>120</sup> Ciekawymi właściwościami charakteryzuje się również kwas (*R*)-3-hydroksymasłowy, który stymuluje aktywność metaboliczną komórek nerwowych mózgu oraz poprawia komunikację pomiędzy neuronami wpływając pozytywnie na procesy uczenia się i zapamiętywania.<sup>121</sup> Co więcej, wykazano że monomer 3HB może przekraczać barierę krew-mózg oraz zapewnić częściową ochronę przed neurodegeneracją dopaminergiczną, co może zostać wykorzystane w walce z chorobą Parkinsona.<sup>122</sup> Dodatkowo stwierdzono, że (*R*)-3-hydroksymaślan naturalnie występuje w organizmach ssaków jako ciało ketonowe, dzięki czemu poprzez sterowanie jego poziomem można skutecznie przeciwdziałać takim dolegliwościom jak niedotlenienie mózgu, wstrząs krwotoczny czy pozawałowe uszkodzenia serca.<sup>123</sup>

Występujące w monomerach grupy poddawane są dodatkowym modyfikacjom, dzięki którym uzyskuje się związki o jeszcze szerszym zróżnicowaniu pod względem właściwości chemicznych, fizycznych oraz ich aktywności biologicznych. Do grupy hydroksylowej, powstającej podczas depolimeryzacji PHA, można wprowadzać związki fluoropochodne, chloropochodne czy też boropochodne. To znacznie wpływa na aktywności biologiczne podstawionych monomerów, a także zmienia ich właściwości fizykochemiczne.<sup>124,125</sup> Podstawione monomery wykazują zarówno właściwości przeciwbakteryjne jak również



odznaczają się silnym potencjałem antygrzybicznym względem *Candida albicans* oraz *Microsporium gypseum*.<sup>125</sup> Grupa karboksylowa monomerów stosunkowo łatwo przekształcana jest do różnego rodzaju estrów takich jak: metylowe, etylowe, benzyłowe<sup>125,126</sup> czy cukrowe.<sup>127</sup> Dodatkowo często uczestniczy w tworzeniu wiązania amidowego pomiędzy monomerem PHA a modyfikowanymi cząsteczkami, na przykład krótkimi peptydami.<sup>128,129</sup>

### 1.2.5. Cel i zakres wykorzystania PHA oraz jego pochodnych w pracy badawczej

Czystość chiralna produkowanych leków ma ogromne znaczenie ze względu na często występującą różnicę w aktywności biologicznych pomiędzy enancjomerami. Większość z ponad 150 odkrytych dotąd monomerów PHA jest czystymi optycznie izomerami prawoskrętnymi. Inną cechą tej rodziny związków, ważną z punktu widzenia projektowania nowych leków jest obecność dwóch grup funkcyjnych – hydroksylowej i karboksylowej, które można modyfikować by otrzymać nowe pochodne o różnych właściwościach i zastosowaniach. Co więcej, monomery PHA są wytwarzane w naturalnym procesie biosyntezy, przeprowadzanej przez bakterie środowiskowe, a proces ich otrzymywania jest zaliczany do ekologicznych.

Celem wykorzystania monomerów PHA do modyfikacji kwasu 6-aminopenicylanowego jest opracowanie uniwersalnej ścieżki syntezy i biosyntezy nowych penicylin, angażującej związki pochodzenia naturalnego, do późniejszej produkcji projektowanych związków biologicznie czynnych. W ścieżce obejmującej syntezę chemiczną wykorzystano kwasy karboksylowe monomerów PHA, natomiast przy biosyntezie enzymatycznej ich estry metylowe. Związkami wytypowanymi jako przykład cząsteczek z rodziny alifatycznej były: kwas (*R*)-3-hydroksynonanowy oraz (*R*)-3-hydrokseyheptanowy, natomiast przedstawicielem związków aromatycznych był kwas (*R*)-3-hydroksey-5-fenyłowalerianowy.

## 2. Cel naukowy badań

Celem projektu było opracowanie nowych ścieżek otrzymywania penicylin poprzez wprowadzenie do cząsteczki kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA) 3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego. Modyfikatorami wykorzystywanymi w syntezie nowych pochodnych 6-APA, były monomery polihydroksyalkanianów (PHA), będące naturalnymi polimerami o bardzo dużym zróżnicowaniu i potencjale farmakologicznym, produkowanymi przez bakterie środowiskowe. Zaproponowane dwie ścieżki otrzymywania antybiotyków, zarówno chemiczna, jak i enzymatyczna, charakteryzują się szerokim spektrum substratowym, co można wykorzystać przy projektowaniu nowych analogów  $\beta$ -laktamów, skutecznych względem bakterii lekoopornych. Ponadto, jako źródło związków wykorzystywanych do modyfikacji 6-APA wybrano związki chemiczne produkowane przez bakterie, obecne w naturze, biodegradowalne i nietoksyczne, a co za tym idzie, przyjazne środowisku. Zwieńczeniem projektu było otrzymanie na drodze opracowanych ścieżek sześciu nowych związków  $\beta$ -laktamowych oraz określenie ich potencjału przeciwbakteryjnego.

### 3. Badania własne

#### 3.1. Otrzymywanie wybranych modyfikatorów dla kwasu 6-Aminopenicylanowego

##### 3.1.1. Wprowadzenie

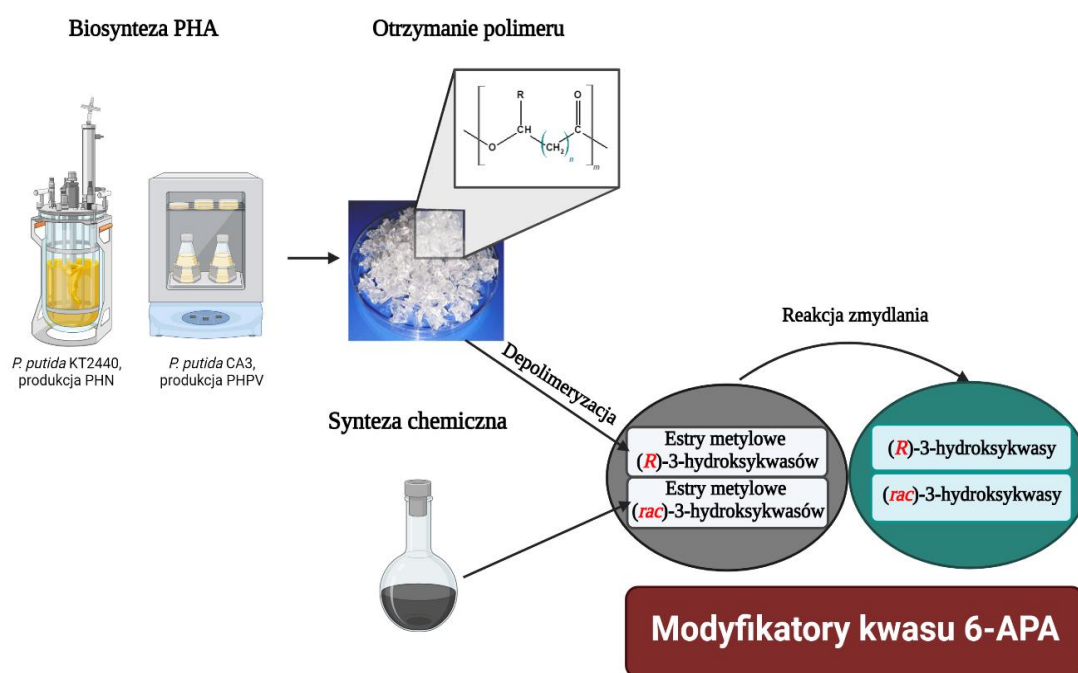
W celu opracowania uniwersalnej ścieżki syntezy nowych penicylin, jako źródło związków do modyfikacji kwasu 6-aminopenicylanowego, wybrano polihydroksyalkaniany. Wybrane monomery PHA zostały połączone z rdzeniem  $\beta$ -laktamowym wiązaniem amidowym przez połączenie grupy karboksylowej monomeru oraz grupy aminowej kwasu 6-APA. Jako przedstawiciele polihydroksyalkanianów wybrano dwa typy różnych strukturalnie polimerów bakteryjnych, tj. poli-3-hydroksynonanoanian (P(3HN)) należący do grupy polimerów alifatycznych oraz poli-3-hydroksy-5-fenyłowalerianianu (P(3H5PV)) z grupy aromatycznej.

Produkcję polimerów prowadzono według dwóch strategii hodowlanych uwzględniających typ i koszt substratu stanowiącego w hodowlach źródło węgla oraz preferencję substratową zastosowanych szczepów bakteryjnych. Alifatyczny P(3HN) otrzymano na drodze fermentacji okresowej z zasilaniem (ang. fed batch culture) w 5-litrowym reaktorze, z użyciem szczepu bakteryjnego *Pseudomonas putida* KT2440, gdzie czynnikiem limitującym w medium hodowlanym był niedobór fosforanów. Źródłem węgla dla wybranego szczepu były płynne kwasy tłuszczowe (kwas nonanowy oraz masłowy), bezpośrednio dozowane do reaktora i dobrze przyswajane przez bakterie. Do biosyntezy aromatycznego polimeru P(3H5PV) zastosowano szczep *Pseudomonas putida* CA3. Hodowlę typu okresowego z dozowaniem pulsacyjnym prowadzono w kolbach Erlenmeyera z wytrząsaniem, a medium do wzrostu bakterii było ubogie w azotany. Ze względu na słabą rozpuszczalność kwasu 5-fenyłowalerianowego w medium hodowlanym, który stanowił źródło węgla dla szczepu, niezbędnym etapem poprzedzającym fermentację było otrzymanie jego soli sodowych (**Tabela 3**). Mała skala eksperymentu była również spowodowana wysokim kosztem substratu.

Na drodze syntez chemicznych otrzymano odpowiedniki monomerów PHA, będące mieszaniną racemiczną. Wyprodukowane *rac*-3-hydroksykwasy były ważnym elementem w optymalizacji ścieżki enzymatycznego otrzymywania pochodnych 6-APA, z uwagi na enancjoselektywność zastosowanych lipaz. Dodatkowo, otrzymane nowe związki  $\beta$ -laktamowe złożone z enancjomerów *R* oraz *S* posłużyły również później, jako porównanie dla penicylin z wprowadzoną chiralną modyfikacją.

**Tabela 3. Porównanie strategii biosyntezy P(3HN) oraz P(3H5PV)**

Szczep	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> CA3
Źródło węgla	Kwas nonanowy/ kwas masłowy (4:1)	Sól sodowa kwasu 5-fenylowalerianowego
Typ hodowli	Hodowla okresowa z zasilaniem (5 L)	Hodowla okresowa z zasilaniem impulsowym (0,5 L)
Czynnik limitujący	Niedobór fosforanów	Niedobór azotanów
Produkt	P(3HN)	P(3H5PV)



**Rysunek 12.** Schemat otrzymywania modyfikatorów kwasu 6-aminopenicylanowego na drodze biosyntezy oraz syntezy chemicznej.

### 3.1.2. Biosynteza polihydroksyalkanianów alifatycznych oraz aromatycznych

#### 3.1.2.1. Media hodowlane i szczepy bakteryjne

Podłoże hodowlane MSM (ang. Minimal Salt Medium) zostało użyte we wszystkich fermentacjach bakteryjnych przeprowadzonych w ramach w tej pracy. Skład stężenia składników podłoża był różny dla hodowli reaktorowych i prowadzonych w kolbach oraz w hodowli starterowej (**Tabela 4**). Pożywki MSM zostały wzbogacone w mikroelementy (**Tabela 5**),  $MgSO_4$  oraz źródła węgla, które stanowiły w zależności od rodzaju fermentacji sole sodowe kwasów oktanowego i fenylowalerianowego lub mieszania kwasu nonanowego i masłowego.

**Tabela 4.** Skład podłoża mineralnego MSM

Składnik	Hodowla		
	starterowa [ $g L^{-1}$ ]	w kolbach [ $g L^{-1}$ ] <sup>130</sup>	w reaktorze [ $g L^{-1}$ ]
$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$	9	20	8,23
$KH_2PO_4$	1,5	3,4	1,39
$NH_4Cl$	1	1	–
$(NH_4)_2SO_4$	–	–	4,7
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2	3	3,33
Mikroelementy	1	1	1
Źródło węgla	0,96	2,88	0,71

**Tabela 5.** Skład roztworu wzbogacającego w mikroelementy (sporządzone na podstawie pracy Sun Z. i współautorów<sup>131</sup>)

Składnik	Ilość [ $g L^{-1}$ ]
$CaCl_2$	20
Cytrynian amonu żelaza (III)	1,2
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	4
$FeSO_4 \times 7H_2O$	10
$CuCl_2 \times 2H_2O$	1
$MnCl_2 \times 4H_2O$	1
$Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$	1
$NiCl_2 \times 6H_2O$	0,2
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,3

Do produkcji PHA wybrano dwa szczepy bakteryjne: *P. putida* KT2440 oraz *P. putida* CA3. Szczepy przechowywano w postaci suspensji bakteryjnych w medium LB z dodatkiem 20% glicerolu (v/v) oraz ampicyliny ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.2.2. Wstępna hodowla bakteryjna

Przed rozpoczęciem hodowli szczepy rozmrożono, wysiano na podłoże stałe LB z dodatkiem ampicyliny ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) oraz inkubowano przez 24 h w  $30^{\circ}\text{C}$ . Następnie szczepy dwukrotnie pasażowano posiewem redukcyjnym na pożywkę stałą MSM z nielimitowaną ilością azotanów (skład jak MSM dla hodowli starterowej) oraz dodatkiem agaru ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) i również inkubowano w  $30^{\circ}\text{C}$  przez 24 h. Wyizolowaną czystą kolonię bakteryjną szczepów *P. putida* przeniesiono do jałowego medium MSM (**Tabela 4**), w którym sól sodowa kwasu oktanowego o stężeniu 10 mM stanowiła źródło węgla. Hodowlę starterową *P. putida* CA3 sporządzono w objętości 50 mL, natomiast objętość wstępnej hodowli wykorzystywanej do zaszczepienia reaktora wynosiła 200 mL. Płynne hodowle starterowe inkubowano w  $30^{\circ}\text{C}$  przez 12–16 h z ciągłym mieszaniem (250 RPM).

### 3.1.2.3. Hodowla fermentorowa w produkcji P(3HN)

Hodowlę okresową z zasilaniem prowadzono w pięciolitrowym reaktorze Biostat B+ (Sartorius, Niemcy) zgodnie z procedurą opisaną w pracy Guzik et al.<sup>132</sup> Medium hodowlane złożone z komponentów wymienionych w **Tabeli 4** poddano sterylizacji ( $121^{\circ}\text{C}$ , 30 min). Do jałowego medium dodano następnie 5 mL mieszaniny mikroelementów (**Tabela 5**) oraz źródło węgla, które stanowiła mieszanina kwasów tłuszczowych (kwas nonanowy/kwas masłowy, 4:1) uzyskując stężenie początkowe  $0,71 \text{ g C L}^{-1}$ . Tlen wprowadzano do medium hodowlanego w postaci powietrza. Ilość rozpuszczonego tlenu w medium hodowlanym była automatycznie utrzymywana na poziomie 20% poprzez zmiany przepływu powietrza oraz szybkości mieszania. Hodowla była utrzymywana w stałym pH ( $6,9 \pm 0,1$ ), korygowanym poprzez automatyczne dozowanie 20% roztworu amoniaku lub 15% kwasu siarkowego VI. Kwasy tłuszczowe stanowiące źródło węgla dla bakterii *P. putida* KT2440 były dozowane według zaadoptowanego profilu z pracy Guzik et al.<sup>132</sup> Wprowadzanie substratu do hodowli rozpoczęto po upływie 4 h fermentacji, tj. po wykorzystaniu przez bakterie początkowego źródła węgla. Dokarmianie zwiększano wykładniczo do 11 h trwania hodowli, po czym zostało stopniowo

zmniejszane, a po 14 h pozostawione na poziomie  $26 \text{ mL h}^{-1}$  aż do końca fermentacji. W zastosowanej strategii czynnikiem limitującym w pożywce była ilość fosforanów, która wynosiła  $1,03 \text{ g}_P \text{ L}^{-1}$  podłoża hodowlanego. Początkowe parametry hodowli reaktorowej przedstawiono w **Tabeli 6**. Fermentację zakończono po 31 h. Hodowlę bakteryjną wirowano przez 40 minut w  $4^\circ\text{C}$  przy obrotach 4000 RPM. Uzyskaną biomasę bakteryjną zamrożono i poddano liofilizacji.

**Tabela 6. Początkowe parametry hodowli reaktorowej szczepu *P. putida* KT2440**

Parametr	wartość
Objętość medium MSM	3 L
Saturacja	98%
Szybkość mieszania	500 RPM
pH	6,9
Temperatura	$30^\circ\text{C}$

#### 3.1.2.4. Oznaczenie CDW, zawartości P(3HN) oraz stężenia fosforanów i azotanów w hodowli reaktorowej

Przez cały okres trwania hodowli reaktorowej pobierano próbki, które następnie odwirowywano (5 minut, 13000 RPM). Uzyskany supernatant rozdzielano od mokrej masy bakteryjnej, a następnie całość mrożono w  $-80^\circ\text{C}$ . Zamrożone próbki z biomasą poddano liofilizacji, a następnie ważono, uzyskując przyrost suchej masy bakteryjnej w czasie trwania hodowli.

Zawartość P(3HN) w suchej masie bakteryjnej wyznaczono poprzez poddanie zliofilizowanych komórek bakteryjnych, zawierających polimer, kwaśnej metanolizie zgodnie z opisanym wcześniej protokołem.<sup>133</sup> 10–15 mg suchej masy bakteryjnej zawieszono w 2 mL zakwaszonego metanolu (15%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) oraz 2 mL chloroformu z dodatkiem standardu wewnętrznego (benzoesan metylu,  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Mieszaninę inkubowano w szklanych, zamkniętych naczyniach typu Pyrex w  $100^\circ\text{C}$  przez 3h, z częstym mieszaniem. Następnie próbki schłodzono na lodzie i ekstrahowano 1 mL wody. Fazę organiczną zawierającą estry metylowe (*R*)-3-hydoksykwasów osuszono bezwodnym  $\text{MgSO}_4$ , przefiltrowano i poddano analizie GC. Do oznaczeń wykorzystano chromatograf gazowy Varian CP-3800 (Palo Alto, CA) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) oraz kolumną HP-INNOWAX

(25 m × 0,20 mm × 0,20 μm, Agilent, SantaClara, CA). Rozdział przebiegał w następujących warunkach temperaturowych: temperatura początkowa: 120°C - 4 minuty, przyrost: 7°C min<sup>-1</sup> do 180°C, 180°C - 5 minut. Jako standardy estru metylowego kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego oraz estru metylowego kwasu (*R*)-3-hydroksyheptanowego wykorzystano monomery PHA uzyskane w procesie opisanym w **podrozdziale 3.1.4**, których strukturę potwierdzono przy użyciu metod: UHPLC-MS, NMR oraz RT-IR. Na podstawie uzyskanych wyników oznaczono wzrost zawartości polimeru w suchej masie bakteryjnej w czasie trwania hodowli oraz określono stosunek ilościowy monomerów budujących P(3HN), tj. estrów metylowych kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego w stosunku do estrów metylowych kwasu (*R*)-3-hydroksyheptanowego.

Zmiany zawartości azotu w medium hodowlanym w czasie przebiegu biosyntezy P(3HN) były oznaczane w supernatancie uzyskanym po odwirowaniu pobieranych próbek. Azot amonowy znajdujący się w pożywce hodowlanej, a pochodzący z (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)Cl oraz amoniaku, był oznaczony metodą indofenolową opisaną w pracy Scheiner'a<sup>134</sup>. W środowisku alkalicznym i w obecności katalizatora (nitroprusydek sodu), jony amonowe w reagowały z podchlorynem sodu oraz fenolem. Produktem reakcji był mocno niebieski błękit indofenolowy, którego intensywność była proporcjonalna do zawartości jonów amonowych w roztworze i mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali λ = 635 nm. Spadek stężenia ortofosforanów w pożywce MSM w czasie fermentacji oznaczono metodą kolorymetryczną. Metoda opiera się na reakcji molibdenianu amonu i winianu antymonowo-potasowego w środowisku kwaśnym z jonami ortofosforanowymi pochodzącymi z Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> oraz KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i utworzeniu kompleksu antymon-fosfomolibdenian. Redukcja kompleksu przez kwas askorbinowy powoduje pojawienie się niebieskiego zabarwienia roztworu, którego intensywność jest proporcjonalna do ilości fosforu. Analizę przeprowadzono na płytkach 96-dółkowych, wykonując pomiar absorbancji przy długości fali λ = 650 nm.<sup>135</sup>

### **3.1.2.5. Hodowla okresowa z dozowaniem pulsacyjnym substratu w produkcji P(3H5PV)**

Biosyntezę poli-3-hydroksy-5-fenylwalerianianu prowadzono w kolbach o pojemności 2 L płaskodennych z przegrodami, przy użyciu szczepu *P. putida* CA3. Zastosowanym medium hodowlanym było płynne MSM (0,5 L) (**Tabela 4**) z dodatkiem 0,4 mL roztworu mikroelementów scharakteryzowanych w **Tabeli 5**. Źródło węgla stanowiła sól sodowa kwasu fenylwalerianowego, której stężenie końcowe w pożywce wynosiło 40 mM. Kolby z pożywką zaszczerpiono hodowlą starterową przygotowaną jak opisano w **podrozdziale 3.1.2.2.** oraz



inkubowano przez 48 h w 30°C z wytrząsaniem 250 RPM. Następnie po upływie 48 h, dodano kolejną porcję mikroelementów (0,4 mL) oraz źródła węgla (40 mM) i kontynuowano inkubację przez 48 h.<sup>130</sup> Hodowlę zakończono przez odwirowanie, a mokrą biomasę bakteryjną zamrożono (-80°C) i poddano liofilizacji. Otrzymaną suchą masę bakteryjną zważono i poddano ekstrakcji octanem etylu, co opisano w **podrozdziale 3.1.3**.

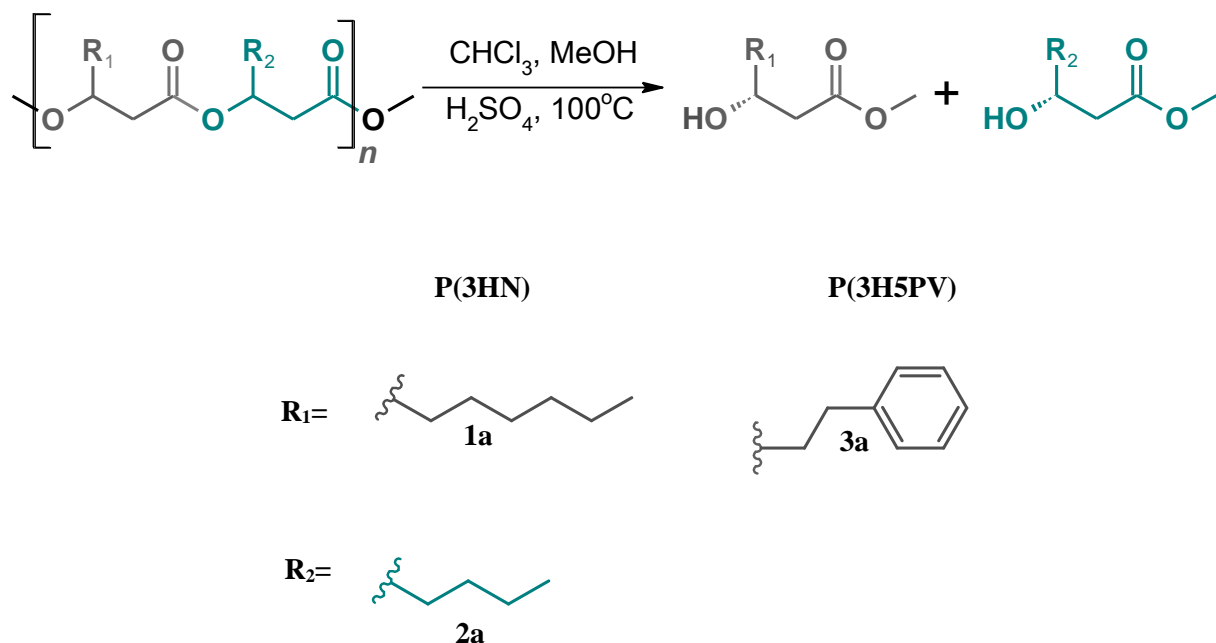
### 3.1.3. Ekstrakcja PHA z masy bakteryjnej

Oba polimery PHA ekstrahowano z suchej masy bakteryjnej przy użyciu octanu etylu przez 24 h. Rozpuszczone w rozpuszczalniku organicznym PHA oddzielano od biomasy przez filtrację na sączku celulozowym Whatman 4 (25 µm). Uzyskaną mieszaninę przefiltrowano przez węgiel aktywny oraz filtr PTFE (0,45 µm). Octan etylu odparowano z mieszaniny przy użyciu wyparki próżniowej. Uzyskany PHA w formie gęstej, żółtej cieczy, poddano precipitacji w schłodzonym do -20°C metanolu (1 L na 10 g PHA). Strącony polimer przeniesiono z metanolu do pojemnika i poddano suszeniu w piecu w temperaturze 40°C przez 24 h, a następnie zważono.

### 3.1.4. Otrzymanie chiralnych estrów metylowych (*R*)-3-hydroksykwasów PHA

Polimery P(3HN) oraz P(3H5PV) poddano alkoholizacji katalizowanej kwasem siarkowym VI, w wyniku której otrzymano estry metylowe (*R*)-3-hydroksykwasów. Reakcja metanolizy PHA przebiega według schematu przedstawionego na **Rysunku 13** oraz następującej procedury: poliestry PHA (5 g) rozpuszczono w 40 mL chloroformu, a następnie dodano metanol (40 mL) z 15% zawartością kwasu siarkowego VI (v/v) i całość ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 70 h. Mieszaninę reakcyjną schłodzono i do otrzymanego klarownego roztworu dodano solankę (40 mL). Fazę wodną ekstrahowano chloroformem (3 × 40 ml). Połączone fazy organiczne osuszono bezwodnym MgSO<sub>4</sub>, przefiltrowano przez sączek bibułowy, a chloroform usunięto pod obniżonym ciśnieniem za pomocą wyparki próżniowej.<sup>119</sup> W przypadku polimeru P(3HN) otrzymano mieszaninę dwóch estrów metylowych, tj. ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego (**1a**) oraz ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksyheptanowego (**2a**).<sup>136</sup> Depolimeryzacja P(3H5PV) będącym w 98% homopolimerem,<sup>137,138,139</sup> doprowadziła do otrzymania estru metylowego kwasu (*R*)-3-hydroksy-5-fenylowalerianowego (**3a**). Otrzymane produkty miały postać żółtych cieczy

o konsystencji miodu oraz kwiatowo-owocowy zapach. Struktura uzyskanych monomerów PHA została potwierdzona za pomocą metod spektroskopowych UHPLC-MS, NMR, RT-IR oraz CD.



**Rysunek 13.** Schemat depolimeryzacji polimeru PHA podczas reakcji kwaśnej metanolizy oraz struktury monomerów PHA otrzymanych w tym procesie. **1a**-ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego, **2a**-ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksyheptanowego, **3a**-ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksy-5-fenylwalerianowego.

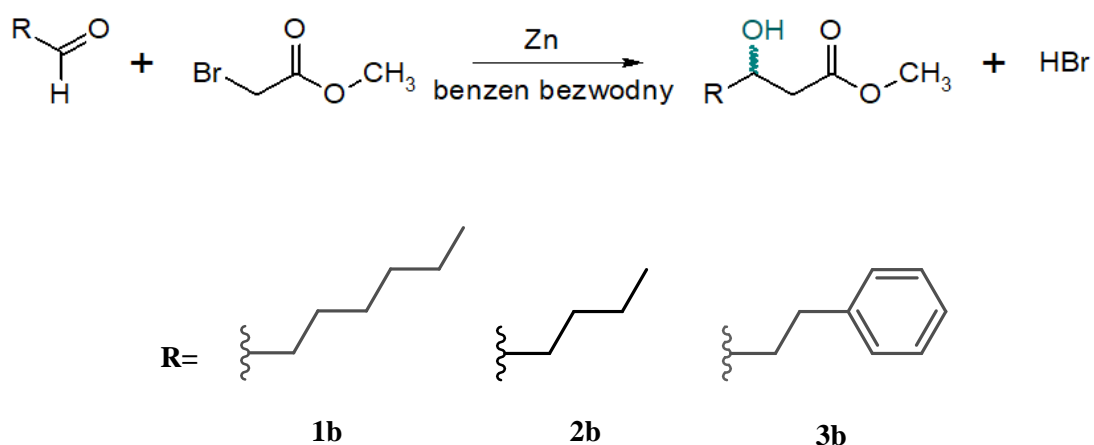
#### 3.1.4.1. Rozdział estrów metylowych (*R*)-3-hydroksykwasów P(3HN)

Otrzymany polimer alifatyczny P(3HN) był zbudowany z dwóch rodzajów monomerów różniących się długością łańcucha alifatycznego.<sup>137,136</sup> Rozdział estru metylowego kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowych (**1a**) od estru metylowego kwasu (*R*)-3-hydroksyheptanowych (**2a**) wykonano przy wykorzystaniu chromatografu BUCHI Pure C-815 Flash. Do separacji użyto kolumny FlashPure C18 RP 12 g (rozmiar cząsteczek: 40  $\mu\text{m}$ ), w fazie odwróconej i gradiencie acetonitrylu (A) oraz ultraczystej wody (B). Kolumna została zrównoważona poprzez płukanie ultraczystą wodą przez 4 min przy przepływie 30 ml min<sup>-1</sup>. Mieszanina estrów metylowych 3-hydroksykwasów (1 g) została dwukrotnie rozcieńczona acetonitrylem oraz nastrzyknięta na kolumnę. Rozdział mieszaniny trwał 20 minut przy szybkości przepływu 30 ml min<sup>-1</sup> w następującym gradiencie: 0,00 min (100% B) do 4,10 min (20% A/80% B), następnie od 4,11 min (20% A/80% B) do 9,50 min (37% A/63% B), od 9,51 min (37% A/63% B) do 16,10 min (59% A/41% B) i od 16,11 min do 20 min (100% A). Rozdział monomerów był monitorowany przy użyciu detektora DAD przy długości fali 210 nm oraz 254 nm.

Rozdzielone monomery ekstrahowano z mieszaniny wodno-organicznej (3×) przy użyciu dichlorometanu (DCM). Fazę organiczną osuszono bezwodnym MgSO<sub>4</sub>, odparowano na wyparce próżniowej, a produkt zważono. Struktury otrzymanych produktów potwierdzono przeprowadzając analizę UHPLC-MS/MS, NMR, IR oraz CD.

### 3.1.5. Synteza chemiczna estrów metylowych *rac*-3-hydroksykwasów PHA

Otrzymywanie mieszanin racemicznych estrów 3-hydroksykwasów przeprowadzono na drodze reakcji Reformatskiego katalizowanej metalicznym cynkiem. Związki α-halokarbonylowe reagując z aldehydami utworzyły β-hydroksyestry kwasów karboksylowych (**1b**, **2b** i **3b**). Reakcja przebiegała według schematu przedstawionego na **Rysunku 14**.



**Rysunek 14.** Schemat reakcji otrzymywania mieszaniny racemicznej estrów metylowych 3-hydroksykwasów; **1b**–ester metylowy kwasu 3-hydroksynonanowego, **2b**–ester metylowy kwasu 3-hydroksyheptanowego, **3b**–ester metylowy kwasu 3-hydroksy-5-fenylowalerianowego.

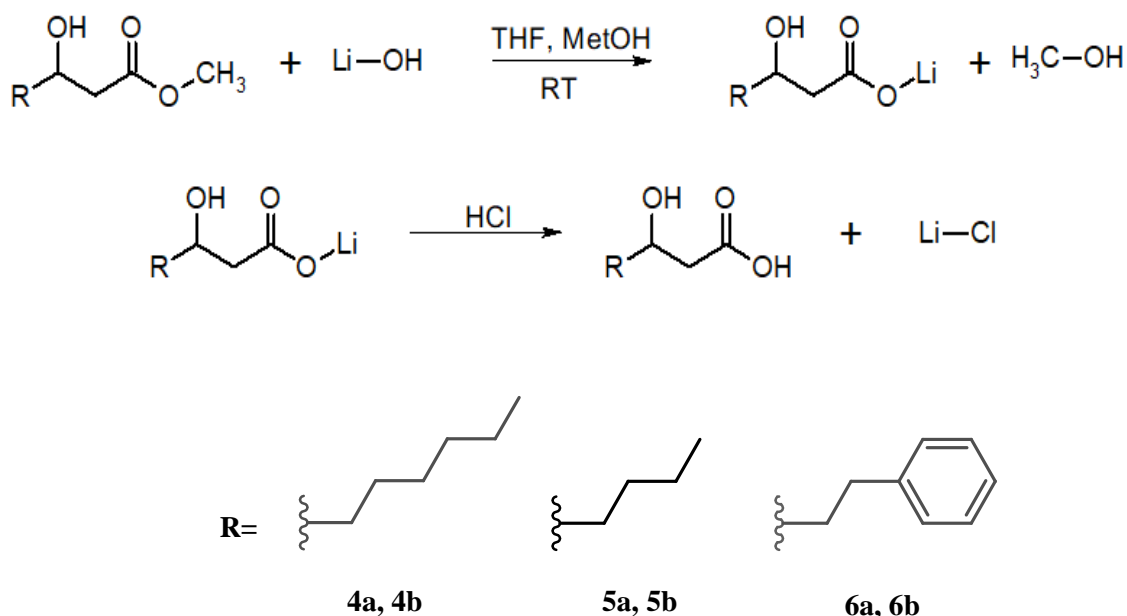
Cynk w postaci pyłu (Sigma-Aldrich, >98%) aktywowano kwasem solnym (1 M) przez kilka minut. Katalizator przefiltrowano, przemyto wodą destylowaną oraz acetonem, a następnie wysuszono w suszarce próżniowej. Otrzymany cynk (35 mmol) dodano do bezwodnego benzenu (10 mL) i ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 10 minut. Następnie, nie przerywając ogrzewania, wkroplono przygotowany wcześniej roztwór odpowiedniego aldehydu (heptanal, pentanal lub 3-fenylopropanal; 33 mmol) i bromoocetanu metylu (35 mmol) w benzenie (60 mL). Po 2h ogrzewania mieszaninę reakcyjną schłodzono na lodzie, zakwaszono kwasem solnym (1 M) i ekstrahowano eterem dietylowym (3 × 40 mL). Połączone fazy organiczne osuszono bezwodnym MgSO<sub>4</sub> i przefiltrowano przez sącdek

bibułowy. Eter usunięto przy użyciu wyparki próżniowej otrzymując mieszaninę estrów metylowych *rac*-3-hydroksykwasów w postaci żółtej gęstej cieczy.<sup>125</sup>

Otrzymane mieszaniny zostały oczyszczone przy użyciu chromatografu BUCHI Pure C-815 Flash na kolumnie VersaPak™ Spherical Silica 96 g (20–45 μm). Kolumna została zrównoważona poprzez płukanie mieszaniną heksanu (90%) i octanu etylu (10%) przez 8 minut przy przepływie 60 mL/min. Rozdział przebiegał gradientowo w fazie heksanu (A) oraz octanu etylu (B) w interwałach: 0–10 min (10% B), od 10,01 min (10% B) do 25 min (20% B), od 25,01 min (20% B) do 33 min (30% B), od 33,01 min (30% B) do 41 min (40% B) oraz 41,01–51 min (40% B). Rozdziały produktów syntez były monitorowane przy pomocy detektora DAD przy długości fali 210 nm oraz 254 nm. Struktury wyizolowanych produktów i ich czystość były weryfikowane metodami spektroskopowymi UHPLC-MS/MS, NMR, FT-IR oraz CD.

### 3.1.6. Otrzymywanie (*R*)-3-hydroksykwasów oraz *rac*-3-hydroksykwasów

Otrzymywanie (*R*)-3-hydroksykwasów z estrów metylowych monomerów PHA (**1a**, **2a**, **3a**) oraz z estrów metylowych *rac*-3-hydroksykwasów (**1b**, **2b**, **3b**) zostało przeprowadzone na drodze hydrolizy zasadowej, przebiegającej według schematu przedstawianego na **Rysunku 15**.



**Rysunek 15.** Schemat otrzymywania 3-hydroksykwasów w reakcji zmydlania oraz wzory strukturalne otrzymanych produktów. **4a**-kwas (*R*)-3-hydroksynonanowy, **4b**-kwas *rac*-3-hydroksynonanowy, **5a**-kwas (*R*)-3-hydroksyheptanowy, **5b**-kwas *rac*-3-hydroksyheptanowy, **6a**-kwas (*R*)-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy, **6b**-kwas *rac*-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy.

Estry metylowe uzyskanych 3-hydroksykwasów (0,9 g) rozpuszczono w tetrahydrofuranie (9 mL), a następnie dodano metanol (6 mL) i ostrożnie wkraplano 2,5 M wodorotlenek litu (3 mL). Roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h. Po zakończonej reakcji mieszaninę zakwaszono 1 M kwasem solnym do pH = 2, a następnie uzyskane kwasy tłuszczowe ekstrahowano octanem etylu (3 × 15 ml). Fazę organiczną zawierającą produkty reakcji osuszono bezwodnym MgSO<sub>4</sub>, przefiltrowano na sączku bibułowym, a następnie usunięto octan etylu przy użyciu wyparki próżniowej.<sup>125</sup> W wyniku reakcji zmydlania otrzymano: kwas (*R*)-3-hydroksynonanowy (**4a**), kwas *rac*-3-hydroksynonanowy (**4b**), kwas (*R*)-3-hydroksyheptanowy (**5a**), kwas *rac*-3-hydroksyheptanowy (**5b**), kwas (*R*)-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy (**6a**) oraz kwas *rac*-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy (**6b**). Z pośród sześciu otrzymanych kwasów, cztery z nich były białymi, krystalicznymi ciałami stałymi (**4a**, **4b**, **6a** oraz **6b**), natomiast dwa (**5a** oraz **5b**) jasnożółtymi cieczami o olejowej konsystencji.

Otrzymane kwasy będące ciałami stałymi oczyszczono poprzez krystalizację z heksanu wg następującej procedury: 1 g związku zawieszono w heksanie (10 mL), a następnie mieszaninę poddano lekkiemu podgrzaniu, aż do całkowitego rozpuszczenia kwasów, po czym schłodzono do -20°C. Wykrystalizowane kwasy przesączono na lejku Büchnera pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie wysuszono w suszarce próżniowej i zważono. Kwasy **5a** oraz **5b** oczyszczono przy wykorzystaniu chromatografii ciekowej typu Flash w fazie odwróconej, analogicznie do metody opisanej w **podrozdziale 3.1.5**. Struktury otrzymanych produktów potwierdzono przeprowadzając analizę UHPLC-MS/MS, NMR oraz FT-IR.

### 3.1.7. Analiza UHPLC-MS/MS otrzymanych modyfikatorów dla kwasu 6-APA

Do potwierdzenia wyizolowania opisanych powyżej związków wykorzystano chromatograf ciekowy UHPLC Agilent 1290 Infinity z detektorem 6460 Triple Quad MS. Rozdział produktów przebiegał na kolumnie Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1,8 μm) w fazach ACN/H<sub>2</sub>O z dodatkiem kwasu mrówkowego (0,1%, v/v) w gradiencie (**Tabela 7**) w temperaturze 30°C. Objętość nastrzyku wynosiła 5 μL, a szybkość przepływu 0,4 mL min<sup>-1</sup>. Tandemowy spektrometr masowy MS Agilent 6460 Triple Quad z jonizacją przez rozpylenie w polu elektrycznym (Agilent Jet Stream ESI) używano w polaryzacji pozytywnej oraz negatywnej w trybie dynamicznego monitorowania wybranych reakcji (dMRM). Zadane parametry źródła jonizacji w ustalonej metodzie przedstawiono w **Tabeli 8**, natomiast

informacje dotyczące poszczególnych, charakterystycznych dla danego produktu widm masowych w Tabeli 9. Jony potomne uzyskane dla metody dMRM oraz wszystkie parametry, przy których dane jony powstają zostały wygenerowane przy użyciu oprogramowania Optimizer, MassHunter (wersja 10.0, Agilent, Santa Clara, CA, USA).

**Tabela 7. Gradient faz mobilnych wykorzystany w metodzie rozdzielu produktów**

Czas [min]	Faza wodna [%]	Faza organiczna [%]
0,5	95	5
3,50	0	100
4,00	0	100
4,50	95	0

**Tabela 8. Parametry źródła jonów**

Parametr	Jonizacja pozytywna	Jonizacja negatywna
Temperatura gazu [°C]	200	200
Przepływ gazu [L min <sup>-1</sup> ]	11	11
Ciśnienie nebulizatora [psi]	25	25
Temperatura gazu osłonowego [°C]	350	350
Przepływ gazu osłonowego [L min <sup>-1</sup> ]	7,5	7,5
Napięcie na kapilarze [V]	3000	3000
Napięcie na dyszy [V]	1000	1000

Dla każdego otrzymanego związku sporządzono krzywe kalibracyjne, które wykorzystano w kolejnym etapie do analizy ilościowej. Dodatkowo wyznaczono granice wykrywalności (LOD) oraz granice oznaczalności (LOQ) związków na podstawie otrzymanego odchylenia standardowego w odpowiedzi detektora (SD) i nachylenia uzyskanych krzywych kalibracyjnych (S), według poniższych wzorów:

$$LOD = 3,3 \times \frac{SD}{S}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{SD}{S}$$

SD – odchylenie standardowe

S – nachylenie krzywej regresji liniowej dla analitu

**Tabela 9. Parametry widm masowych charakteryzowanych produktów syntez**

Związek	Masa izotopowa [Da]	Wzór sumaryczny	Jon prekursorowy [m/z]	Jon potomny [m/z]	Energia kolizji [V]	Czas retencji [min]	LOD [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Typ jonizacji
Ester metylowy kwasu 3-hydroksy nonanowego (1a, 1b)	188,14	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	189,1	139,0/41,0	10/42	3,05	2,0	6,2	pozytywna
Ester metylowy kwasu 3-hydroksy heptanowego (2a, 2b)	160,11	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	161,1	143,0/93,0	2/18	2,52	33,8	102,3	pozytywna
Ester metylowy kwasu 3-hydroksy-5-fenylo-walerianowego (3a, 3b)	208,11	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	209,1	117,0/91,1	14/38	2,74	12,4	37,5	pozytywna
Kwas 3-hydroksy nonanowy (4a, 4b)	174,13	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	173,1	59,0/41,0	10/46	2,64	0,3	1,0	negatywna
Kwas 3-hydroksy heptanowy (5a, 5b)	146,09	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	145,08	88,7/59,0	26/10	2,15	0,3	0,9	negatywna
Kwas 3-hydroksy-5-fenylo-walerianowy (6a, 6b)	194,09	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	193,08	59/40,1	14/50	2,39	1,0	3,1	negatywna

### 3.1.8. Potwierdzenie struktury otrzymanych związków metodami: $^1\text{H-NMR}$ , IR oraz CD

Struktury otrzymanych związków analizowano za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektroskopii w podczerwieni (IR) oraz dichroizmu kołowego (CD). Widma NMR zostały wykonane przy wykorzystaniu aparatu Varian INOVA-500 FT. Dla wszystkich związków wykonano widma  $^1\text{H NMR}$ , natomiast dla pochodnych 6-APA dodatkowo  $^{13}\text{C NMR}$ . Przed analizą próbki związku zostały rozpuszczone w deuterowanym chloroformie ( $\text{CDCl}_3$ ) lub w wodzie ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

Drugą zastosowaną metodą badania struktury otrzymanych związków była spektroskopia w podczerwieni (IR). Widma w zakresie środkowej podczerwieni zostały zarejestrowane z wykorzystaniem spektrometru FT-IR Nicolet 6700 firmy Thermo Scientific. Pomiarów były wykonywane techniką transmisyjną (64 skany, rozdzielczość  $2\text{ cm}^{-1}$ ) z wykorzystaniem pastylek z bromku potasu. Naważki próbek stałych (1,5 mg) mieszano z suchym KBr (300 mg) i pastylkowano. Próbki niebędące proszkami, rozpuszczono w acetonie i po naniesieniu na pastylkę czystego KBr pozostawiano do odparowania rozpuszczalnika.

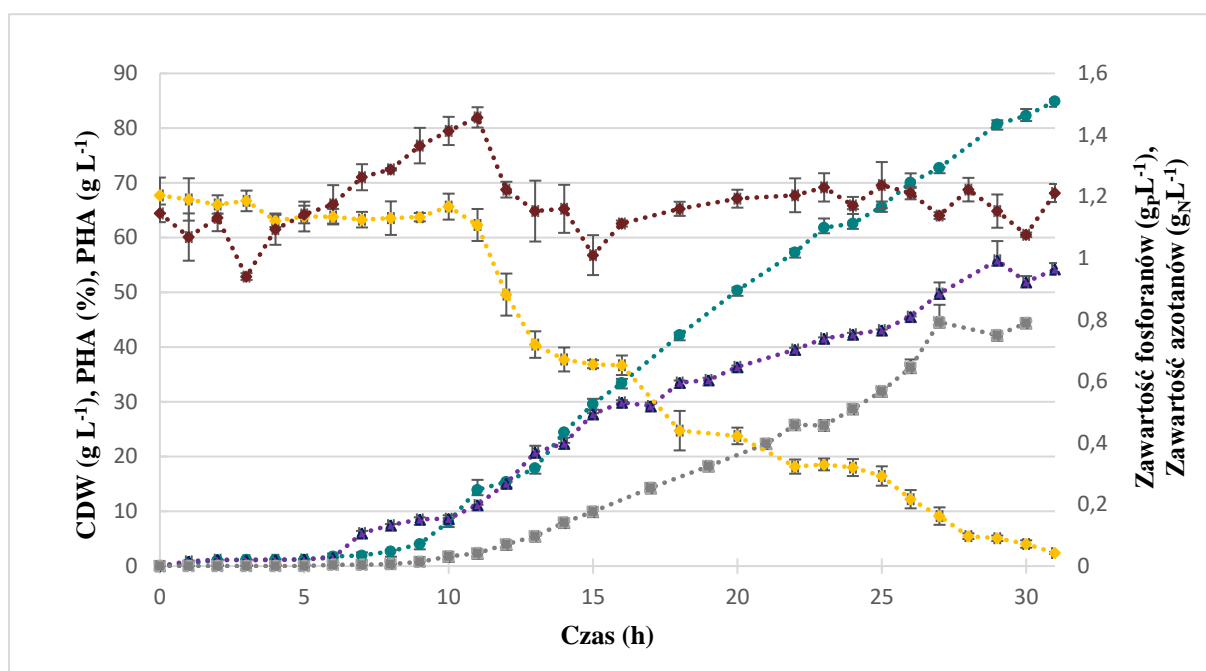
Trzecią metodą oceniającą aktywność optyczną otrzymanych monomerów PHA oraz uzyskanych na drodze syntezy chemicznej *rac*-3-hydroksykwasy i ich estrów był dichroizm kołowy (CD). Widma CD w zakresie dalekiego i bliskiego UV (od 190nm–320nm) dla wszystkich próbek w roztworze wodnym lub metanolu zostały rejestrowane na spektropolarymetrze firmy Jasco (model J-1500) stosując przystawkę termostatującą. Temperatura badanych próbek wyniosła 298K. Do badań wykorzystano kuwety kwarcowe QS (firmy Hellma Analytics) o długości drogi optycznej równej odpowiednio: 0.1 mm (dla pomiarów widm CD w zakresie dalekiego UV) oraz 1 mm (dla pomiarów widm CD w zakresie bliskiego UV). Dla każdej próbki wykonano czterokrotny pomiar widm CD, uśredniono oraz odjęto widmo CD dla czystego rozpuszczalnika (wody lub metanolu).



### 3.1.9. Wyniki

#### 3.1.9.1. Otrzymanie polihydroksyalkanianów: P(3HN) oraz P(3H5PV)

Całkowita objętość hodowli *P. putida* KT2440 po 31 h jej przebiegu wynosiła 3750 mL. Otrzymaną biomasę poddano liofilizacji w wyniku czego uzyskano 303,5 g suchej masy bakteryjnej (CDW). Po procesie ekstrakcji PHA z CDW, jego filtracji przez węgiel aktywny oraz precypitacji w metanolu, ilość otrzymanego polihydroksynonanianu wynosiła 102,14 g.



**Rysunek 16.** Wzrost *P. putida* KT2440 w 5-litrowym bioreaktorze Sartorius Biostat B w medium MSM z limitowaną ilością fosforanów. Oznaczenie suchej masy bakteryjnej (CDW) ( $\text{g L}^{-1}$ , ●), udziału P(3HN) w komórce (% z CDW, ▲), zawartości P(3HN) w hodowli ( $\text{g L}^{-1}$ , ■), stężenia fosforanów w medium ( $\text{g}_P \text{L}^{-1}$ , ◆), stężenia azotanów w medium ( $\text{g}_N \text{L}^{-1}$ , ◆) zmieniających się w jednostce czasu.

Dane z analiz przeprowadzonych na próbkach pobieranych przez cały okres trwania fermentacji przedstawiono na **Rysunku 16**. Ilość suchej masy bakteryjnej przyrastała w czasie do osiągnięcia w 31 h fermentacji  $84,9 \text{ g L}^{-1}$ . Uwzględniając uzyskaną końcową objętość hodowli, otrzymany wynik jest analogiczny do ilości suchej masy otrzymanej po liofilizacji całej mokrej biomasy pochodzącej z uwzględnieniem strat towarzyszących pobieraniu próbek. Zawartość P(3HN) pod koniec fermentacji wynosiła  $44,4 \text{ g L}^{-1}$ , co stanowiło 54,2 % polimeru w suchej masie bakteryjnej. Czynnikiem limitującym w pożywce był niedobór fosforanów, który w początkowym etapie hodowli wynosił  $1,2 \text{ g}_P \text{L}^{-1}$ , a następnie jego zawartość sukcesywnie zmniejszała się i finalnie wynosiła  $0,04 \text{ g}_P \text{L}^{-1}$ . Największy spadek zawartości fosforanów zaobserwowano między 10, a 20 h fermentacji, co pokrywa się ze zwiększonym przyrostem biomasy oraz akumulacją PHA w komórkach bakteryjnych. Poziom azotanów w medium był zmienny, w zależności od jego wykorzystania przez wzrastającą

hodowlę oraz dozowanego (w celu utrzymania stałego pH) roztworu amoniaku i wahał się w granicach 1,45–0,94 g<sub>N</sub> L<sup>-1</sup>. Wolumetryczna produktywność hodowli wynosiła 1,43 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Otrzymana końcowa ilość CDW dla szczepu *P. putida* KT2440 przy wykorzystaniu strategii hodowlanej z niedoborem fosforanów była bardzo zbliżona do wyniku otrzymanego w analogicznych badaniach z zastosowaniem tych samych warunków hodowlanych<sup>132</sup> i wynosiła 94,1 g L<sup>-1</sup>. Autorzy pracy otrzymali również podobną zawartość PHA w CDW, tj. 56%. Ponadto w innej pracy porównano hodowlę *Pseudomonas*, wzrastającą w optymalnych warunkach, do hodowli pod presją niedoboru fosforanów. Z uzyskanych danych wynika, że zastosowanie limitującej zawartości fosforanów w pożywce hodowlanej wpłynęło na znaczące zwiększenie ilości magazynowanego w komórkach PHA (z 18,7% do 51,4%) oraz na zwiększenie produktywności, która osiągnęła poziom 1,91 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.<sup>140</sup> Wybór czynnika limitującego w medium ma znaczący wpływ na wydajność przebiegu całego procesu biosyntezy polihydroksyalkanianów. Według literatury dla omawianego szczepu zastosowano z sukcesem również innego rodzaju strategię polegającą na limitacji azotanów, tlenu, a także źródła węgla.<sup>136,141,142</sup> Zwłaszcza ostatni sposób zwiększenia zawartości magazynowanego P(3HN) w szczepie *P. putida* KT2440 wydaje się być bardzo skuteczny, co wykazali w swojej pracy autorzy Sun Z. et al.,<sup>131</sup> którzy otrzymali 75% polimeru w CDW przez ograniczenie podawanego kwasu nonanowego na etapie wykładniczego etapu wzrostu hodowli. Miało to jednak wpływ na stosunkowo niską ilość otrzymanej biomasy, która wynosiła 56 g L<sup>-1</sup>.

Początkowa i końcowa oznaczona ilość fosforanów w hodowli przeprowadzonej i opisanej w tej pracy jest adekwatna do tych otrzymanych przez innych naukowców, którzy badali wpływ limitacji fosforanów oraz węgla na szczep *P. putida* KT2440.<sup>143</sup> Według innych doniesień literaturowych stężenie fosforanów wpływające na znaczne polepszenie akumulacji PHA u bakterii *P. putida* KT2440 wynosi już 4 g L<sup>-1</sup>.<sup>144</sup> Zastosowana zatem strategia hodowlana oraz wykorzystana zawartość fosforanów ma poparcie w literaturze i pracy innych zespołów badawczych, co świadczy o słuszności jej wyboru i poprawności przeprowadzonych doświadczeń.

Polimer aromatyczny (poli-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy) otrzymano przeprowadzając hodowlę okresową z pulsacyjnym dozowaniem substratu. Całkowita objętość przeprowadzonych hodowli w kolbach wynosiła 5,5 L, z której otrzymano łącznie 13,35 g suchej masy bakteryjnej (2,43 g L<sup>-1</sup> CDW). Zawartość polimeru P(3H5PV) osiągnęła 57%, co po ekstrakcji dało 7,61 g produktu biosyntezy. *P. putida* CA3 wybrany do biosyntezy polimeru aromatycznego posiadał syntazę tłuszczowego acylokoenzymu A (FadD), która efektywniej

i wydajniej aktywowała aromatyczne kwasy tłuszczone względem odpowiedników alifatycznych.<sup>145</sup> Z tego względu wybrany szczep był lepiej dostosowany do używanego podczas hodowli substratu, tj. soli sodowej kwasu 5-fenylwalerianowego, niż *P. putida* KT2440, dzięki czemu możliwe było otrzymanie wysokiej zawartości P(3H5PV) w suchej masie bakteryjnej. Biosynteza P(3H5PV) była przeprowadzana na podstawie metodologii opisanej i opracowanej przez Cerrone F. et al.,<sup>130</sup> a otrzymane wyniki były nieco niższe od uzyskanych przez autorów pracy. CDW, którą otrzymano w wymienionym artykule wynosiła 2,87 g L<sup>-1</sup> i zawierała 68% P(3H5PV), czyli 1,18 razy więcej niż uzyskano w niniejszej pracy badawczej.

Zawartość P(3H5PV) w komórkach bakteryjnych *P. putida* CA3 była o 2,8% wyższa niż ilość polimeru alifatycznego w CDW u bakterii *P. putida* KT2440 w hodowli fermentorowej. Niemniej jednak ilość suchej masy bakteryjnej w hodowli reaktorowej była znacznie wyższa od tej prowadzonej w kolbach, które wynosiły odpowiednio 84,9 g L<sup>-1</sup> oraz 2,43 g L<sup>-1</sup>. Dodatkowo proces prowadzony w kontrolowanych warunkach reaktorowych trwał znacznie krócej (31 h) niż hodowla w kolbach, która zakończyła się dopiero po 96 h. Miało to bezpośrednie przełożenie na wynik produktywności obu procesów, który dla hodowli fermentorowej wynosił 1,43 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a dla kolbowej zaledwie 0,025 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Wysoka zawartość suchej masy bakteryjnej w hodowli fermentorowej połączona z dużą ilością P(3HN) w komórkach oraz stosunkowo wysoką produktywnością wolumetryczną jest możliwa dzięki intensywnemu napowietrzaniu, mieszaniu, precyzyjnemu dozowaniu substratu oraz utrzymywaniu stałego pH. Hodowle wzrastające w kontrolowanych warunkach reaktorowych osiągają znacznie wyższe gęstości, ze względu na brak limitujących warunków takich jak: zmniejszająca się saturacja, nieodpowiednie pH czy brak dostępnego źródła węgla. Biosynteza polimeru aromatycznego w warunkach reaktorowych nie została przeprowadzona głównie z uwagi na wysoki koszt kwasu 5-fenylwalerianowego.

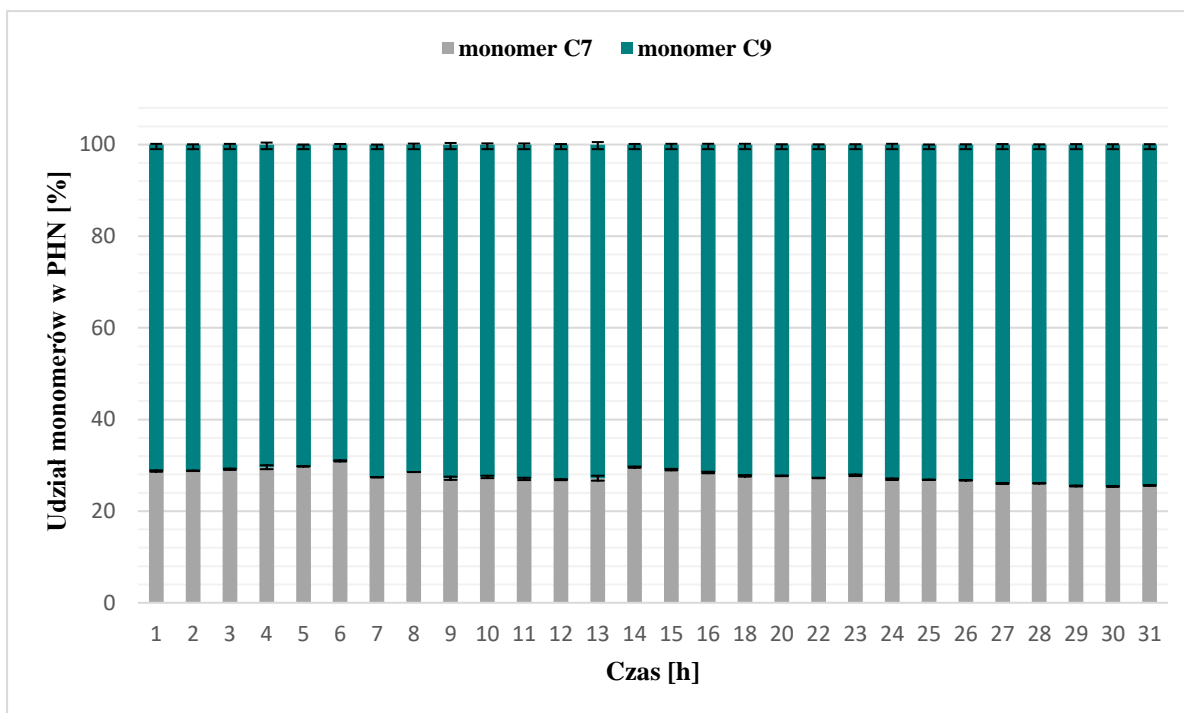
### **3.1.9.2. Kompozycja monomerów P(3HN) oraz P(3H5PV)**

Kompozycja monomerów P(3HN) w otrzymanym polimerze oscylowała przez cały okres trwania hodowli w przedziale 25,38%–30,96% dla krótszego monomeru oraz 69,04%–74,62% dla dłuższego (**Rysunek 17**). W końcowym polimerze procentowy skład monomerów wynosił: 25,60% i 74,40%, odpowiednio dla monomeru (*R*)-3-hydrokseyheptanowego i (*R*)-3-hydroksynonanowego. Wyznaczony skład i udział monomerów w wyprodukowanym P(3HN), przy zastosowaniu szczepu *P. putida* KT2440, jest bardzo zbliżony do wyników opisanych

w pracy M. Guzik et al.<sup>109</sup> Autorzy badań, stosując ten sam szczep oraz źródło węgla, uzyskali skład monomerów znajdujący się w granicach 76% oraz 24%, odpowiednio dla estru metylowego kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego oraz (*R*)-3-hydrokseyheptanowego.

Depolimeryzacja 5 g polimeru P(3HN) doprowadziła do otrzymania 5,02 g mieszaniny estrów metylowych kwasów (*R*)-3-hydrokseyheptanowego (**2a**) oraz (*R*)-3-hydroksynonanowego (**1a**), które poddano rozdzielaniu. Rozdzielano 1 g mieszaniny estrów, z którego otrzymano 0,21 g estru metylowego kwasu (*R*)-3-hydrokseyheptanowego (**2a**) oraz 0,67 g estru metylowego kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego (**1a**). Porównując otrzymane ilości monomerów z rzeczywistą kompozycją wyznaczoną na podstawie chromatografii gazowej, obliczono wydajność procesu rozdzielania, który wyniósł 82% dla monomeru **2a** oraz 90% dla **1a**. Uzyskane wyniki wykazały, że wyprodukowany na drodze fermentacji bakteryjnej P(3HN) jest heteropolimerem złożonym z dwóch wymienionych wyżej monomerów, co ma potwierdzenie w wielu pracach skupiających się na tematyce biosyntezy poli(*3*-hydroksynonanianu) i wynika bezpośrednio z aparatu biochemicznego używanego przez mikroorganizmy przy degradacji kwasów tłuszczowych w procesie  $\beta$ -oksydacji.<sup>109,136,141</sup>

W wyniku depolimeryzacji 5 g polimeru P(3H5PV) otrzymano 4,9 g estrów metylowych kwasu (*R*)-3-hydroksey-5-fenyłowalerianowego. Uzyskany aromatyczny PHA był homopolimerem o czystości 98% i był zbudowany głównie z jednego rodzaju monomerów. Charakterystyka i budowa polimeru P(3H5PV) potwierdzająca jego niemal jednolitą budowę została zbadana również przez innych naukowców.<sup>138,139</sup> Według literatury w zależności od szczepu bakteryjnego produkującego polimer aromatyczny posiada on różną budowę. *P. putida* KT2440 oraz szczepy *P. oleovorans*, wykorzystując kwas fenyłowalerianowy jako źródło węgla, syntetyzują homopolimer składający się jedynie z kwasów (*R*)-3-hydroksey-5-fenyłowalerianowych.<sup>137,139</sup> Szczep *P. putida* CA3 wytwarza PHA, które oprócz monomerów aromatycznych posiadają znikomą ilość (około 2%) monomerów alifatycznych, takich jak: 3-hydrokseyheksanian, 3-hydrokseyoktanian, a także hydrokseydekanian.<sup>138</sup> Pojawienie się monomerów alifatycznych w polimerze P(3H5PV) wynika z utylizacji kwasu 5-fenyłowalerianowego w celu budowy elementów komórkowych, a także aktywacji szlaku metabolicznego syntezy kwasów tłuszczowych *de novo*, który również może dostarczyć liniowe monomery do produktu.



**Rysunek 17.** Rozkład monomerów P(3HN) w polimerze produkowanym przez bakterie *P. putida* KT2440 w czasie trwania hodowli.

### 3.1.9.3. Otrzymanie estrów metylowych *rac*-3-hydroksykwasów

W wyniku przeprowadzonych syntez chemicznych otrzymano trzy estry metylowe kwasów: *rac*-3-hydroksynonanowego (**1b**), *rac*-3-hydroksyheptanowego (**2b**) oraz *rac*-3-hydroksy-5-fenylwalerianowego (**3b**). Wydajność przeprowadzonych reakcji, uwzględniająca etap oczyszczania mieszaniny poreakcyjnej z produktów ubocznych, wynosiła odpowiednio: 59% (**1b**), 55% (**2b**) oraz 77% (**3b**). Niższa wydajność procesu otrzymania estrów alifatycznych, w porównaniu do aromatycznych miała bezpośredni związek z trudnością ich oczyszczania i monitorowania przy użyciu detektora DAD w chromatografii cieczowej typu flash z uwagi na brak chromoforu w ich strukturze.

### 3.1.9.4. Otrzymywanie 3-hydroksykwasów na drodze syntezy chemicznej

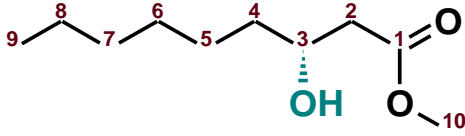
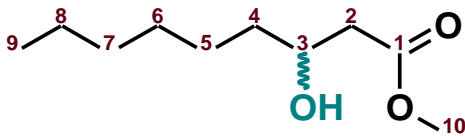
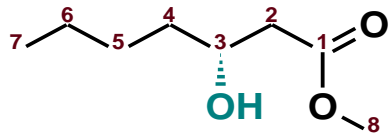
Estry metylowe 3-hydroksykwasów (zarówno mieszaniny racemiczne, jak i czyste enancjomery *R*), poddano reakcji zmydlania w wyniku, której otrzymano sześć kwasów: (*R*)-3-hydroksynonanowy (**4a**), *rac*-3-hydroksynonanowy (**4b**), (*R*)-3-hydroksyhaptanowy (**5a**), *rac*-3-hydroksyhaptanowy (**5b**), (*R*)-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy (**6a**) i *rac*-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy (**6b**). Wydajności reakcji dla otrzymanych związków wynosiły

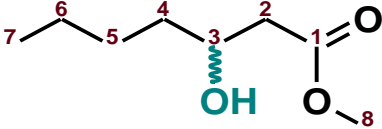
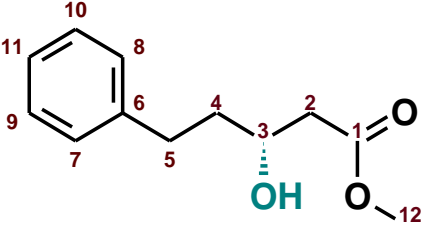
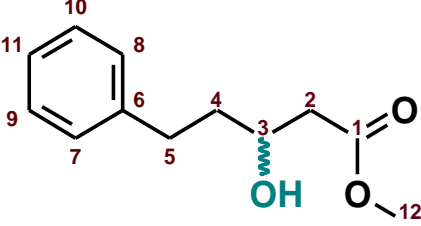
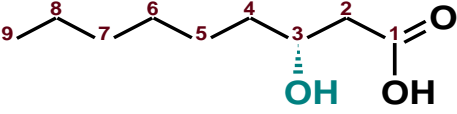
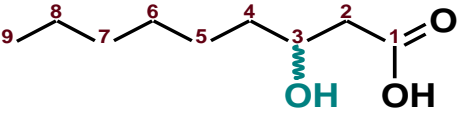
odpowiednio: 89%, 91%, 65%, 67%, 99% i 98%. Najwyższą wydajność uzyskano dla kwasów, będących ciałami stałymi, dla których zastosowano oczyszczanie przez krystalizację w heksanie. Strata produktu, w tym przypadku była znikoma. Dla kwasów 3-hydrokseyheptanowych z uwagi na ich olejową konsystencję konieczne było zastosowanie chromatografii kolumnowej w fazie odwróconej, co spowodowało większe straty produktu.

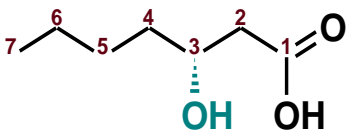
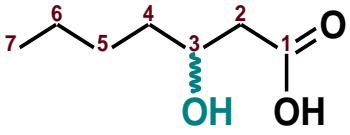
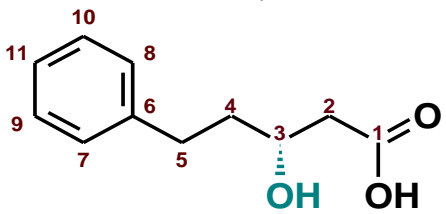
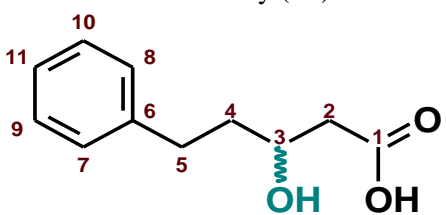
### 3.1.9.5. Biblioteka otrzymanych modyfikatorów kwasu 6-APA oraz ich charakterystyka

Wszystkie opisane powyżej modyfikatory kwasu 6-APA zostały poddane analizom potwierdzającym ich strukturę, a mianowicie: UHPLC-MS/MS,  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR oraz CD. Podsumowanie wyników zebrano w **Tabeli 10**, natomiast wszystkie widma związków zostały umieszczone w dołączonym **Suplemencie**.

**Tabela 10.** Charakterystyka modyfikatorów kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez analizę UHPLC-MS/MS,  $^1\text{H-NMR}$ , IR oraz CD.

Związek	Wyniki
<p>Ester metylowy kwasu (<i>R</i>)-3-hydroksynonanowego (1a)</p> 	<p><math>^1\text{H-NMR}</math> (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) <math>\delta</math> (ppm): 4.05–3.96 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.96 (s, 1H), 2.51 (dd, <math>J</math> = 16.3, 3.2 Hz, 1H), 2.42 (dd, <math>J</math> = 16.4, 9.0 Hz, 1H), 1.58–1.21 (m, 10H), 0.93–0.82 (m, 3H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 41.0, 139.0</p> <p>IR [cm<math>^{-1}</math>]: 3461, 2930, 2858, 1740, 1290, 1084</p> <p>CD: <i>R</i></p> <p><b>Wydajność:</b> 90%</p>
<p>Ester metylowy kwasu <i>rac</i>-3-hydroksynonanowego (1b)</p> 	<p><math>^1\text{H-NMR}</math> (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) <math>\delta</math> (ppm): 4.01 (dddd, <math>J</math> = 9.0, 7.8, 4.7, 3.2 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.52 (dd, <math>J</math> = 16.3, 3.2 Hz, 1H), 2.42 (dd, <math>J</math> = 16.3, 9.0 Hz, 1H), 1.58–1.21 (m, 10H), 0.94–0.83 (m, 3H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 41.0, 139.0</p> <p>IR [cm<math>^{-1}</math>]: 3460, 2930, 2872, 2858, 1740, 1289, 1084</p> <p>CD: <i>R/S</i></p> <p><b>Wydajność:</b> 59%</p>
<p>Ester metylowy kwasu (<i>R</i>)-3-hydrokseyheptanowego (2a)</p> 	<p><math>^1\text{H-NMR}</math> (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) <math>\delta</math> (ppm): 4.01 (dddd, <math>J</math> = 9.0, 7.8, 4.7, 3.2 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.01 (s, 1H), 2.52 (dd, <math>J</math> = 16.3, 3.2 Hz, 1H), 2.42 (dd, <math>J</math> = 16.3, 9.0 Hz, 1H), 1.60–1.26 (m, 6H), 0.97–0.86 (m, 3H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 93.0, 143.0</p> <p>IR [cm<math>^{-1}</math>]: 3454, 2933, 2873, 2861, 1739, 1291, 1081</p> <p>CD: <i>R</i></p> <p><b>Wydajność:</b> 82%</p>

<p>Ester metylowy kwasu (<i>R</i>)-3-hydroksyheptanowego (<b>2b</b>)</p> 	<p><sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 4.05–3.96 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.97 (s, 1H), 2.52 (dd, <i>J</i> = 16.3, 3.2 Hz, 1H), 2.42 (dd, <i>J</i> = 16.3, 9.0 Hz, 1H), 1.60–1.26 (m, 6H), 0.96–0.86 (m, 3H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 93.0, 143.0</p> <p>IR [cm<sup>-1</sup>]: 3459, 2933, 2873, 2861, 1739, 1291, 1081</p> <p>CD: <i>R/S</i></p> <p>Wydajność: 55%</p>
<p>Ester metylowy kwasu (<i>R</i>)-3-hydroksy-5-fenylowalerianowego (<b>3a</b>)</p> 	<p><sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.33–7.22 (m, 2H), 7.24–7.13 (m, 3H), 4.02 (tdd, <i>J</i> = 8.7, 4.2, 3.3 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.04 (s, 1H), 2.82 (ddd, <i>J</i> = 13.9, 9.7, 5.4 Hz, 1H), 2.70 (ddd, <i>J</i> = 13.8, 9.5, 6.8 Hz, 1H), 2.58–2.39 (m, 2H), 1.91–1.67 (m, 2H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 91.0, 117.0</p> <p>IR [cm<sup>-1</sup>]: 3457, 3027, 2928, 2859, 1732, 1303, 1081, 750</p> <p>CD: <i>R</i></p> <p>Wydajność: 98%</p>
<p>Ester metylowy kwasu <i>rac</i>-3-hydroksy-5-fenylowalerianowego (<b>3b</b>)</p> 	<p><sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.33–7.13 (m, 5H), 4.02 (tt, <i>J</i> = 8.5, 3.8 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.05 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 2.82 (ddd, <i>J</i> = 13.7, 9.7, 5.4 Hz, 1H), 2.70 (ddd, <i>J</i> = 13.8, 9.5, 6.9 Hz, 1H), 2.56–2.39 (m, 2H), 1.91–1.68 (m, 2H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 91.0, 117.0</p> <p>IR [cm<sup>-1</sup>]: 3459, 3027, 2929, 2861, 1736, 1303, 1081, 750</p> <p>CD: <i>R/S</i></p> <p>Wydajność: 77%</p>
<p>Kwas (<i>R</i>)-3-hydroksynonanowy (<b>4a</b>)</p> 	<p><sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.30–7.24 (m, 1H), 4.04 (dddd, <i>J</i> = 9.1, 8.0, 4.6, 3.1 Hz, 1H), 2.56 (dd, <i>J</i> = 16.5, 3.2 Hz, 1H), 2.47 (dd, <i>J</i> = 16.5, 9.0 Hz, 1H), 1.61–1.50 (m, 1H), 1.52–1.21 (m, 9H), 0.94–0.83 (m, 3H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 41.0, 59.0</p> <p>IR [cm<sup>-1</sup>]: 2926, 2870, 2855, 1680, 1296, 1083</p> <p>CD: <i>R</i></p> <p>Wydajność: 89%</p>
<p>Kwas <i>rac</i>-3-hydroksynonanowy (<b>4b</b>)</p> 	<p><sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.29 (s, 1H), 4.04 (dddd, <i>J</i> = 9.0, 8.0, 4.6, 3.1 Hz, 1H), 2.57 (dd, <i>J</i> = 16.5, 3.1 Hz, 1H), 2.47 (dd, <i>J</i> = 16.5, 9.0 Hz, 1H), 1.61–1.38 (m, 2H), 1.40–1.21 (m, 8H), 0.93–0.84 (m, 3H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 41.0, 59.0</p> <p>IR [cm<sup>-1</sup>]: 2924, 2870, 2854, 1683, 1085</p> <p>CD: <i>R/S</i></p> <p>Wydajność: 91%</p>

<p>Kwas (<i>R</i>)-3-hydroksoheptanowy (<b>5a</b>)</p> 	<p><sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.29 (s, 1H), 4.11–3.99 (m, 1H), 2.64–2.40 (m, 2H), 1.63–1.19 (m, 6H), 0.98–0.83 (m, 3H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 59.0, 88.7</p> <p>IR [cm<sup>-1</sup>]: 2933, 2873, 2862, 1712, 1290, 1080</p> <p>CD: <i>R</i></p> <p>Wydajność: 65%</p>
<p>Kwas <i>rac</i>-3-hydroksoheptanowy (<b>5b</b>)</p> 	<p><sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.02 (s, 1H), 4.09–3.98 (m, 1H), 2.57 (dd, <i>J</i> = 16.5, 3.1 Hz, 1H), 2.47 (dd, <i>J</i> = 16.5, 9.0 Hz, 1H), 1.62–1.25 (m, 6H), 0.91 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H)</p> <p>MS/MS [m/z]: 59.0, 88.7</p> <p>IR [cm<sup>-1</sup>]: 2926, 2870, 2857, 1683, 1301, 1069</p> <p>CD: <i>R/S</i></p> <p>Wydajność: 67%</p>
<p>Kwas (<i>R</i>)-3-hydrokso-5-fenylowalerianowy (<b>6a</b>)</p> 	<p><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.32 (dd, <i>J</i> = 8.0, 6.9 Hz, 2H), 7.27–7.17 (m, 3H), 4.07 (tt, <i>J</i> = 8.3, 3.9 Hz, 1H), 2.85 (ddd, <i>J</i> = 14.7, 9.4, 5.6 Hz, 1H), 2.81–2.68 (m, 1H), 2.69–2.49 (m, 2H), 1.98–1.67 (m, 2H)</p> <p>MS/MS [m/z]: m/z=41.1, 59.0</p> <p>IR [cm<sup>-1</sup>]: 3027, 2924, 2861, 1694, 1304, 1088, 753</p> <p>CD: <i>R</i></p> <p>Wydajność: 99%</p>
<p>Kwas <i>rac</i>-3-hydrokso-5-fenylowalerianowy (<b>6b</b>)</p> 	<p><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.36–7.27 (m, 2H), 7.23 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 3H), 4.07 (tt, <i>J</i> = 8.3, 3.9 Hz, 1H), 2.85 (ddd, <i>J</i> = 14.7, 9.4, 5.7 Hz, 1H), 2.81–2.68 (m, 1H), 2.67–2.49 (m, 2H), 1.98–1.74 (m, 2H)</p> <p>MS/MS [m/z]: m/z=41.1, 59.0</p> <p>IR [cm<sup>-1</sup>]: 3028, 2923, 2861, 1682, 1304, 1090, 752</p> <p>CD: <i>R/S</i></p> <p>Wydajność: 98%</p>

Analiza UHPLC z detektorem MS/MS polegała na obserwacji jonów potomnych powstałych po rozpadzie jonów prekursorowych produktów wchodzących do źródła jonów ESI. Każdy związek, dla którego wyznaczany był stosunek masy do ładunku (*m/z*), trafił po rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej, do źródła jonów, gdzie uległ jonizacji, a następnie przyspieszaniu w polu elektrycznym. Wszystkie analizowane estry metylowe były jonami dodatnimi uzyskanymi przez dołączenie jednego protonu do cząsteczki, przybierając formę  $[M+H]^+$ . Jony otrzymane przy analizie 3-hydrokso kwasów były jonami ujemnymi, powstającymi po oderwaniu od cząsteczki jednego z protonów, które przybrały formę  $[M-H]^-$ . Obdarzone ładunkiem jony prekursorowe trafiły do komory kolizyjnej, gdzie przy zadanej energii kolizji rozpadły się na charakterystyczne dla danych związków jony potomne. Parametry odpowiednie dla rozpadu jonów prekursorowych do jonów potomnych zostały



dobrane automatycznie w przeznaczonym do tego celu programie Optimizer (v.10). Dla wszystkich wyprodukowanych modyfikatorów 6-APA otrzymano charakterystyczne jony potomne w odpowiednim dla nich czasie retencji (**Tabela 9**). Przeprowadzona analiza potwierdziła, że uzyskano związki o m/z odpowiadającym oczekiwanym produktom.

W widmach  $^1\text{H-NMR}$  estrów metylowych kwasów 3-hydroksynonanowych oraz kwasów 3-hydroksynonanowych (zarówno chiralnych (**1a**, **4a**), jaki i racematów (**1b**, **4b**)) w zakresie 1.63–0.82 ppm zaobserwowano sygnały pochodzące od 13 protonów łańcucha alifatycznego. Multiplet przy około 4.05 ppm (obecny we wszystkich widmach), pochodzi od protonu znajdującego przy trzeciorzędowym atomie węgla C3, w pobliżu grupy hydroksylowej. Singlet w rejonie 3.01 ppm, obecny w niektórych widmach, pochodzi od grupy hydroksylowej. Sygnały wymienialnych protonów, jak w przypadku grupy –OH, nie zawsze są widoczne (wymiana na deuter). W widmach estrów (**1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a** oraz **3b**) sygnał grupy metylowej był widoczny w rejonie 3.71 ppm, natomiast w przypadku kwasów (**4a**, **4b**, **5a**, **5b**, **6a**, **6b**), które otrzymano w wyniku przeprowadzonej reakcji zmydlania estrów, nie stwierdzono w tym zakresie obecności sygnału grupy metylowej. Wszystkie kwasy charakteryzują się obecnością sygnału od protonu grupy karboksylowej przy około 7.02 ppm. Dwa protony przy węglu C2 były widoczne na wszystkich widmach analizowanych związków alifatycznych w rejonie 2.57–2.32 ppm, natomiast w przypadku związków aromatycznych zakres ten był przesunięty do przedziału 2.85–2.68 ppm. Widma estrów metylowych kwasu 3-hydroksyheptanowego (**2a** oraz **2b**), w odróżnieniu od ich odpowiedników z dłuższym łańcuchem alifatycznym (**1a** i **1b**), charakteryzują się niższą intensywnością sygnałów protonów łańcucha alifatycznego (mniej o 4). W przypadku związków **3a**, **3b**, **6a** i **6b** zaobserwowano sygnały od 5 protonów w zakresie 7.36–7.13 ppm, który jest rejonem swoistym dla protonów aromatycznych.

Uzyskane pochodne polihydroksyalkanianów, a także ich odpowiedniki wyprodukowane drogą syntezy chemicznej zostały poddane również ocenie spektroskopii FT-IR, dzięki, której potwierdzono obecność niektórych grup funkcyjnych. Na podstawie uzyskanych wyników oraz danych literaturowych skupiających się na analizie widm PHA oraz ich pochodnych, ustalono, że pasma występujące przy liczbach falowych  $2930\text{ cm}^{-1}$ ,  $2873\text{ cm}^{-1}$  oraz  $2857\text{ cm}^{-1}$  pochodzą od drgań rozciągających grup  $\text{CH}_2\text{--CH}_2$  oraz  $\text{CH}_2\text{--CH}_3$ .<sup>146</sup> Według López-Cuellar et al., którzy w swojej pracy badali (*R*)-3-hydroksykwasy PHA, pasma drgań rozciągających pochodzących od tych grup występują w tym samym zakresie tj.  $2935\text{ cm}^{-1}$  oraz  $2874\text{ cm}^{-1}$ .<sup>147</sup> Podobne rezultaty zostały otrzymane przez Sharma et al. którzy badali widma mcl-PHA. Autorzy pracy jako obszar występowania drgań symetrycznych i asymetrycznych grupy metylowej wskazali zakres  $2961\text{ cm}^{-1}\text{--}2859\text{ cm}^{-1}$ .<sup>148</sup> Wymienione pasma występują we wszystkich analizowanych

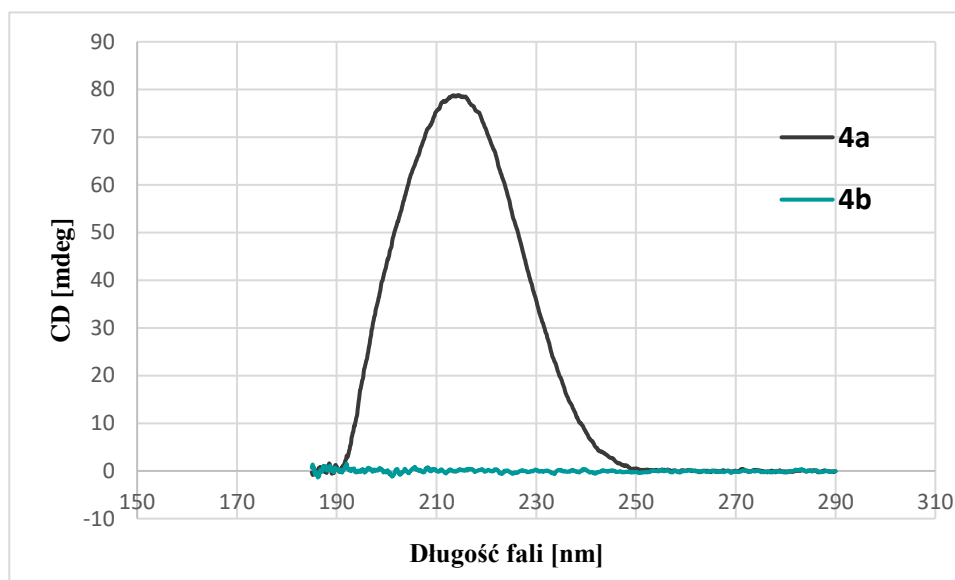
widmach posiadających łańcuch alifatyczny. W przypadku związków posiadających na końcu łańcucha alifatycznego pierścień aromatyczny (**3a**, **3b**, **6a** oraz **6b**), nie zaobserwowano pasma przy  $2874\text{ cm}^{-1}$ , natomiast potwierdzono obecność pasma  $2930\text{ cm}^{-1}$ , które odpowiadają drganiom wiązań C–C atomów C5 oraz C4. Drgania rozciągające pochodzące od grupy –CH<sub>2</sub>– mogą być również obserwowane w  $2850\text{ cm}^{-1}$ .<sup>146</sup>

Grupa hydroksylowa w widmie FT-IR występuje często w przedziale  $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ . Czasami może występować jako szerokie pasmo, co jest spowodowane tworzeniem wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami.<sup>146</sup> W pracy Wróbel-Kwiatkowska et al., w której scharakteryzowano poszczególne sygnały w widmie FT-IR dla (*R*)-3-hydroksymaślanu, autorzy opisali pasmo przy  $3402\text{ cm}^{-1}$  jako drgania rozciągające grupy hydroksylowej tworzącej wiązania wodorowe.<sup>146</sup> W przypadku widm otrzymanych estrów metylowych **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a** oraz **3b** zaobserwowano w tym rejonie szeroki sygnał, który prawdopodobnie odpowiada obecnej w związkach, w pozycji C3, grupie hydroksylowej. Pasma drgań grupy –OH w kwasach 3-hydroksylowych jest przesunięte w stronę niższych liczb falowych i nakłada się na pasmo drgań od grup CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub> oraz CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>. Autorzy Wróbel-Kwiatkowska et al. wymieniają również pasma:  $1295\text{ cm}^{-1}$  pochodzące od drgań zginających grupy –OH oraz  $1089\text{ cm}^{-1}$  od drgań rozciągających C–O.<sup>146</sup> W widmach otrzymanych dla modyfikatorów kwasu 6-APA zaobserwowano pasma w zakresie  $1304\text{--}1290\text{ cm}^{-1}$  oraz pasmo przy  $1089\text{ cm}^{-1}$ , które mogą pochodzić od wymienionych wyżej drgań grupy –OH obecnej w analizowanych związkach.

Najintensywniejsze pasma w widmie zaobserwowano w zakresie  $1740\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$  i są to pasma pochodzące od drgań C=O występujących w analizowanych związkach. Pasma drgań w grupie karboksylowej występującej w 3-hydroksykwasach widoczne są w widmach w okolicach liczby falowej  $1683\text{ cm}^{-1}$ , natomiast drgania w grupie estrowej występowało przy  $1740\text{ cm}^{-1}$ . Podobne informacje dotyczące rozmieszczenia pasm drgań grup karbonylowych w widmie monomerów PHA znalazło potwierdzenie w literaturze.<sup>146</sup>

W celu potwierdzenia chiralności monomerów PHA oraz wykazania, że są one enancjomerami *R*, zastosowano metodę dichroizmu kołowego. Przez badane związki rozpuszczone w metanolu została przepuszczona wiązka światła spolaryzowanego liniowo. Światło spolaryzowane liniowo traktowane jest jako suma promieni spolaryzowanych kołowo w prawo i w lewo. Wiązka światła, która przeszła przez ośrodek optycznie czynny charakteryzuje się różną intensywnością fal składowych, których promień wypadkowy daje w efekcie światło spolaryzowane eliptycznie. Jeżeli badanym ośrodkiem była mieszanina racemiczna, to oddziaływanie obu składowych spolaryzowanych kołowo były takie same,

czego efektem był brak zmiany fali elektromagnetycznej. Widma CD dla związków **1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **5a** oraz **6a** miały przebieg dodatni, co jednoznacznie potwierdziło, że były enancjomerami *R*. Odpowiednikami związków chiralnych estrów (*R*)-3-hydroksykwasów oraz (*R*)-3-hydroksykwasów były tożsame związki otrzymane drogą chemiczną, będące mieszaniną racemiczną enancjomerów *R* oraz *S*. W przypadku gdy światło spolaryzowane liniowo przechodzi przez ośrodek optycznie nieczynny (próbka racemiczna) następuje identyczne oddziaływanie obu składowych spolaryzowanych kołowo w prawo i w lewo, więc w rezultacie nie obserwuje się zmian fali elektromagnetycznej po przejściu przez ośrodek. Dla związków **1b**, **2b**, **3b**, **4b**, **5b** oraz **6b** nie zaobserwowano widma CD, co potwierdza równy udział obu enancjomerów w mieszaninie racemicznej. Przykładowe widma CD dla dwóch 3-hydroksykwasów (enancjomeru *R* i mieszaniny enancjomerów *R/S*) przedstawiono na **Rysunku 18**.



**Rysunek 18.** Widmo CD kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego (**4a**) oraz *rac*-3-hydroksynonanowego (**4b**) w metanolu w 298K.

### 3.1.10. Podsumowanie

Na drodze fermentacji bakteryjnej uzyskano dwa polimery PHA, których depolimeryzacja doprowadziła do otrzymania chiralnych estrów metylowych 3-hydroksykwasów. Poprzez tę ścieżkę biosyntezy otrzymano trzy monomery PHA: ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego (**1a**), ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydrokseyheptanowego (**2a**) oraz ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksey-5-fenylwalerianowego (**3a**). Za pomocą metod UHPLC-MS/MS, <sup>1</sup>H-NMR oraz IR potwierdzono właściwą strukturę związków, natomiast przeprowadzona analiza CD wykazała, że otrzymane związki są enancjomerami *R*.

Za pomocą przeprowadzonych syntez chemicznych uzyskano tożsame do wyprodukowanych monomerów (**1a**, **2a**, **3a**) estry metylowe 3-hydroksykwasów, będące mieszaninami racemicznymi. Na drodze ścieżki chemicznej otrzymano zatem: ester metylowy kwasu *rac*-3-hydroksynonanowego (**1b**), ester metylowy kwasu *rac*-3-hydroksyheptanowego (**2b**) oraz ester metylowy kwasu *rac*-3-hydroksy-5-fenylwalerianowego (**3b**). Uzyskane estry poddano analizom analogicznym do tych charakteryzujących monomery PHA. Potwierdzono poprawną syntezę związków oraz wykazano poprzez analizę CD związków równy udział enancjomerów *R* oraz *S* w mieszaninie racemicznej.

Wszystkie otrzymane i oczyszczone estry metylowe 3-hydroksykwasów poddano reakcjom hydrolizy zasadowej, w wyniku których otrzymano następujące kwasy tłuszczowe: (*R*)-3-hydroksynonanowy (**4a**), (*R*)-3-hydroksyheptanowy (**5a**), (*R*)-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy (**6a**), a także ich odpowiedniki będące mieszaninami racemicznymi (**4b**, **5b**, **6b**). Związki poddano analizom UHPLC-MS/MS, NMR, IR oraz CD, które jednoznacznie potwierdziły ich struktury, aktywności optyczne charakterystyczne dla enancjomerów *R* oraz brak tej aktywności w mieszaninach racemicznych 3-hydroksykwasów.

## 3.2. Otrzymywanie zmodyfikowanych penicylin na drodze syntezy chemicznej oraz biosyntezy enzymatycznej

### 3.2.1. Wstęp

Penicyliny są najstarszą grupą antybiotyków stosowaną w leczeniu ludzi i zwierząt przy infekcjach bakteryjnych. Ich szerokie spektrum działania oraz niska toksyczność względem eukariontów sprawiają, że są najczęściej używanymi lekami przeciwbakteryjnymi. Kwas 6-aminopenicylanowy jest otrzymywanym na drodze hydrolizy penicyliny G i stanowi cząsteczkę wyjściową do syntez chemicznych przy wytwarzaniu antybiotyków półsyntetycznych<sup>1</sup>. Cząsteczki wykorzystywane do modyfikacji kwasu 6-APA, w celu wytworzenia związków o aktywnościach przeciwbakteryjnych, przyłączone są do rdzenia  $\beta$ -laktamowego poprzez wytworzenie pomiędzy nimi wiązania amidowego.

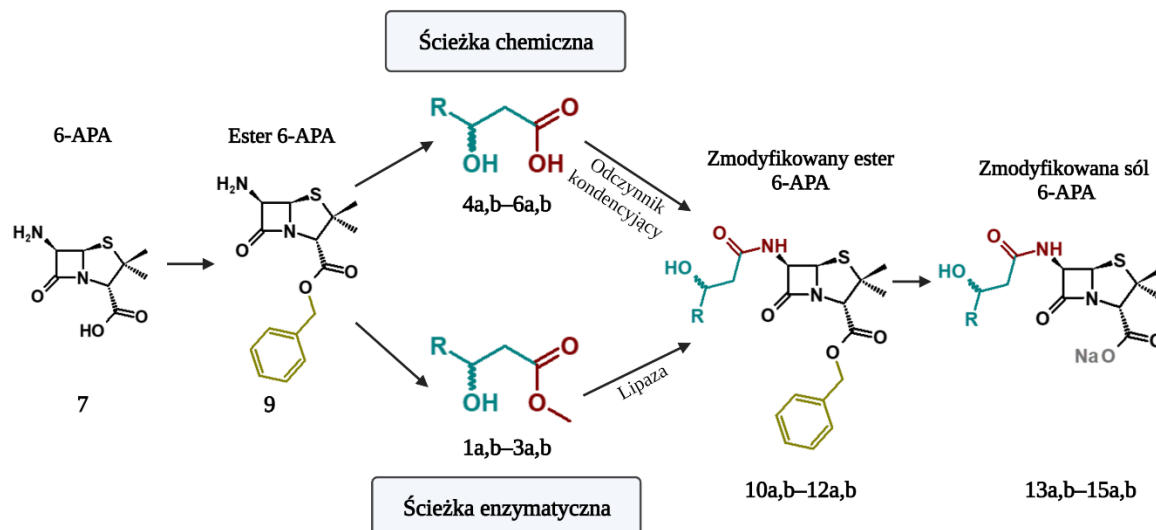
Ta część pracy skupia się na opracowaniu nowych ścieżek otrzymywania penicylin na drodze syntezy chemicznej oraz biosyntezy enzymatycznej, w których jako cząsteczki przyłączane do 6-APA wykorzystano pochodne PHA (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **5a**, **6a**) oraz ich odpowiedniki w formie mieszaniny racemicznej (**1b**, **2b**, **3b**, **4b**, **5b**, **6b**). Obie ścieżki zostały opracowane w sposób umożliwiający wydajną reakcję otrzymywania nowych pochodnych 6-APA przy jednoczesnym zachowaniu jak największego spektrum substratów, które można zastosować do modyfikacji penicylin.

Obie reakcje, zarówno enzymatyczne jak i chemiczne przebiegały w warunkach bezwodnych, ze względu na możliwość wystąpienia reakcji konkurencyjnych do aminolizy. Aby zwiększyć rozpuszczalność kwasu 6-APA w rozpuszczalnikach organicznych, przeprowadzono reakcję, w której grupa karboksylowa kwasu została zastąpiona estrową, w wyniku czego otrzymano ester benzyłowy kwasu 6-APA (**9**).

Otrzymanie nowych pochodnych 6-APA, w postaci estrów benzyłowych, zostało przeprowadzone przy wykorzystaniu tzw. odczynników kondensujących, szeroko stosowanych w chemii białek do wytwarzania wiązania peptydowego pomiędzy aminokwasami. W badaniach przeprowadzonych w tej pracy, odczynniki kondensujące zostały użyte do syntezy wiązania amidowego pomiędzy rdzeniem  $\beta$ -laktamowym **9**, a (*R*)-3-hydroksykwasami pochodzącymi z PHA (**4a**, **5a**, **6a**) oraz *rac*-3-hydroksykwasami otrzymanymi na drodze syntezy chemicznej (**4b**, **5b**, **6b**). Tworzenie wiązania amidowego przy użyciu odczynników kondensujących polega na reakcji substytucji nukleofilowej grupy aminowej z aktywną pochodną kwasu karboksylowego występującą w środowisku zasadowym. W celu wyłonienia najlepszego związku sprzęgającego, umożliwiającego otrzymanie pochodnych 6-APA

z największą wydajnością, wybrano cztery różne odczynniki, a mianowicie: *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC), heksafluorofosforan *O*-(7-azabenzotriazol-1-ilo)-*N,N,N',N'*-tetra-metylouroniowy (HATU), bezwodnik kwasu propanofosfonowego (T3P) oraz jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (odczynnik Mucayama). W wyniku przeprowadzonych syntez chemicznych otrzymano sześć nowych związków  $\beta$ -laktamowych, w postaci estrów benzylowych (**10a**, **10b**, **11a**, **11b**, **12a**, **12b**), które następnie zostały poddane reakcji hydrolizy wiązania estrowego. Otrzymanie nowych penicylin w postaci soli (**13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a**, **15b**) zwiększyło ich rozpuszczalność w wodzie, upodabiając je do komercyjnie stosowanych antybiotyków. Umożliwiło to również przeprowadzanie oceny ich potencjału przeciwbakteryjnego oraz zestawienie uzyskanych rezultatów ze spektrum działania antybiotyków stosowanych w medycynie. Wszystkie otrzymane w tej części związki zostały poddane analizom: UHPLC-MS/MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FT-IR oraz CD.

Drugą opracowaną ścieżką otrzymywania nowych pochodnych 6-APA była ich biosynteza na drodze aminolizy przeprowadzana przez lipazy. Enzymy te charakteryzują się szeroką specyficznością, rozpoznając bardzo zróżnicowane substraty, a dodatkowo potrafią przeprowadzać różnego rodzaju reakcje takie jak: hydroliza, estryfikacja, transestryfikacja, aminoliza, amonoliza, a także epoksydacja<sup>149</sup>. Co więcej, lipazy są niezwykle wytrzymałe na działanie różnych rozpuszczalników organicznych i są w stanie przetrwać w środowiskach o niskiej zawartości wody<sup>150</sup>. Z tego względu enzymy znalazły zastosowanie również w produkcji farmaceutyków i leków. Reakcja aminolizy, czyli syntezy wiązania amidowego pomiędzy grupą estrową lub karboksylową, a grupą aminową jest przeprowadzana przez lipazy w środowisku bezwodnym. Przedstawicielami enzymów wykorzystanych do opracowania oraz optymalizacji biosyntezy pochodnych 6-APA były dwie lipazy: CalB pochodząca z *Candida antarctica* oraz TL-IM występująca u *Thermomyces lanuginosus*. Przebieg reakcji enzymatycznych był monitorowany przy wykorzystaniu chromatografii cieczowej UHPLC-MS/MS.

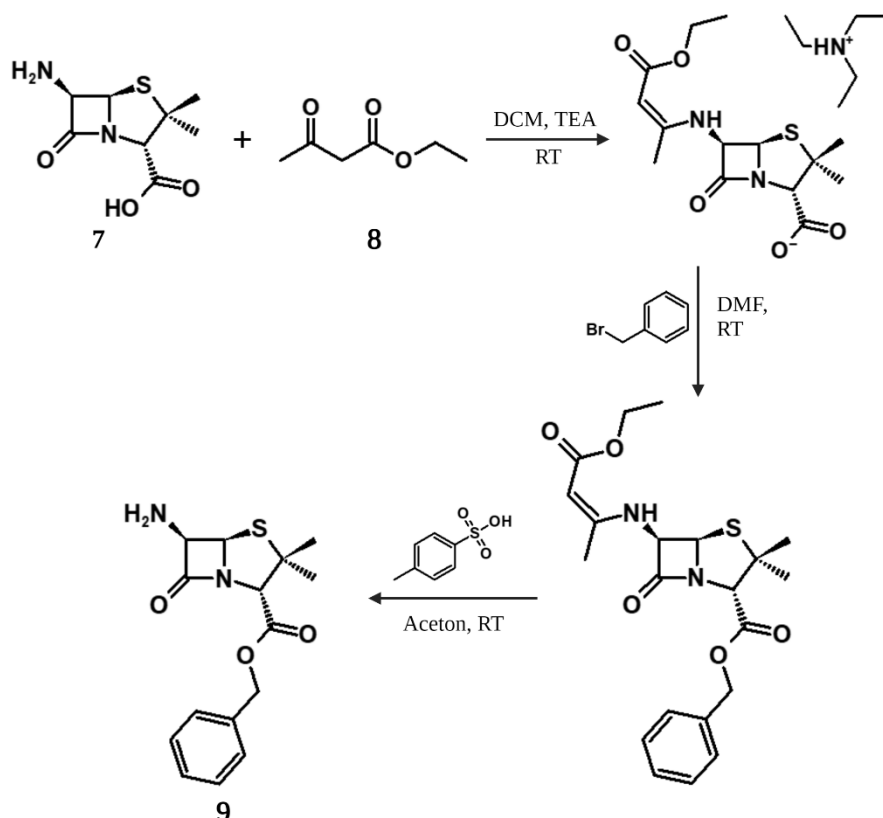


**Rysunek 19.** Schemat przebiegu otrzymywania nowych penicylin drogą syntezy chemicznej oraz biosyntezy enzymatycznej

### 3.2.2. Synteza estru benzylowego kwasu 6-aminopenicylanowego

Z uwagi na słabą rozpuszczalność kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA) w rozpuszczalnikach organicznych, które stanowią środowisko reakcji przy otrzymywaniu zmodyfikowanych pochodnych 6-APA, przeprowadzono reakcję estryfikacji. Schemat przebiegu reakcji przedstawiono na **Rysunku 20**. Procedura syntezy estru benzylowego kwasu 6-APA została sporządzona na podstawie pracy De Rosa et al.<sup>151</sup> i przebiegała w następujący sposób: kwas 6-APA (4,6 mmol, 1 g) (**7**) zmieszano z bezwodnym dichlorometanem (10 mL) oraz trietyloaminą (9,2 mmol, 1,3 mL) i mieszano w temperaturze pokojowej do rozpuszczenia. Następnie do mieszaniny dodano acetylooctan etylu (4,6 mmol, 0,575 mL) (**8**) i dalej mieszano przez 3 h. W kolejnym etapie DCM został odparowany przy użyciu wyparki próżniowej, a mieszanina została rozpuszczona w dimetyloformamidzie (10 mL) oraz połączona z bromkiem benzylu (4,6 mmol, 0,54 mL) i pozostawiona w temperaturze pokojowej przy ciągłym mieszananiu na całą noc. Otrzymana mieszanina reakcyjna została rozcieńczona octanem etylu oraz płukana solanką (3 × 20 mL). Fazę organiczną zebrano, osuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przefiltrowano, a następnie zatężono przy użyciu wyparki próżniowej, uzyskując gęsty, brązowy produkt. Otrzymaną mieszaninę rozpuszczono w acetonie (10 mL) i dodano monohydrat kwasu *p*-toluenosulfonowego. Wytrącony z roztworu produkt (**9**) przefiltrowano próżniowo oraz przepłukano eterem dietylowym (10 mL) i acetonem (10 mL), a następnie rozpuszczono w bezwodnym DCM (50 mL) oraz trietyloaminie (1,3 mL). Po 2 h mieszania, do roztworu dodano wodorotlenek sodu (1 M, 10 mL). Następnie faza organiczna

została oddzielona od wodnej, którą ekstrahowano trzykrotnie dichlorometanem. Zebraną fazę organiczną ekstrahowano solanką, po czym osuszono bezwodnym siarczanem magnezu, przefiltrowano i zatężono na wyparce próżniowej. Produkt potwierdzono analizami: UHPLC-MS/MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , FT-IR oraz CD.



Rysunek 20. Schemat przebiegu reakcji otrzymywania estru benzyłowego kwasu 6-aminopenicylanowego (9).

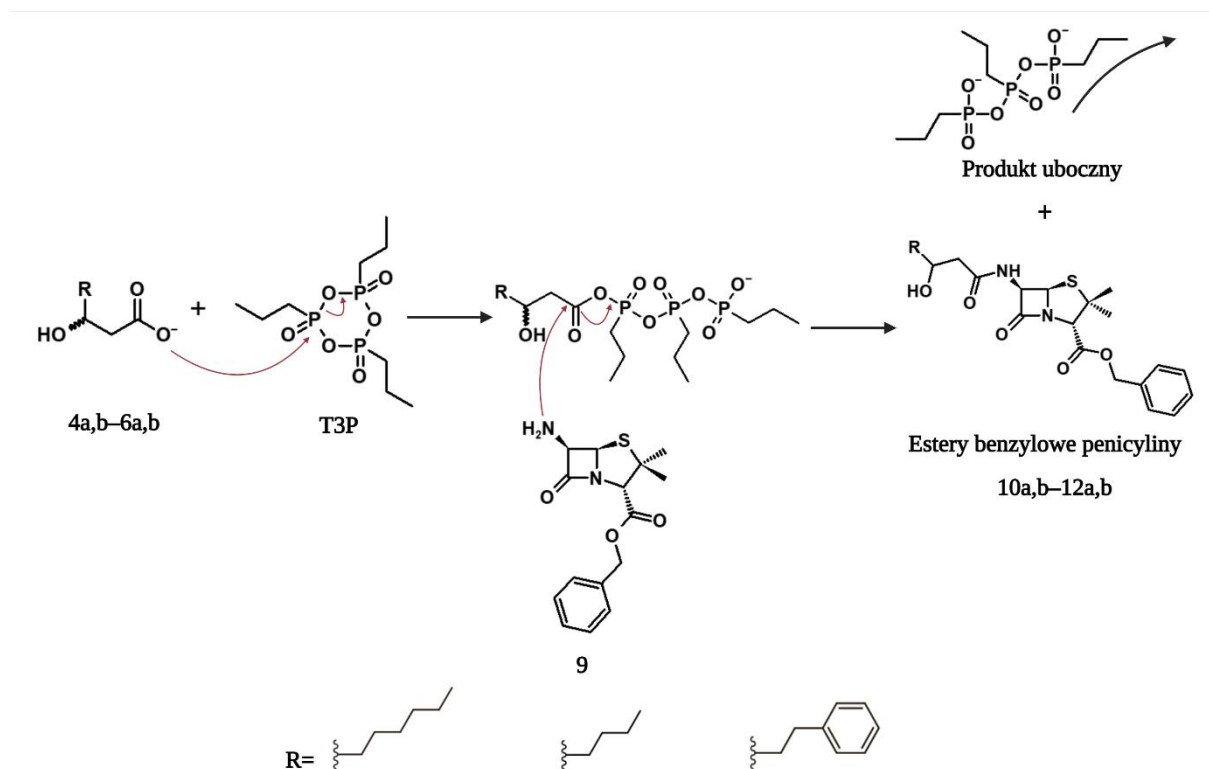
### 3.2.3. Odczynniki kondensujące w syntezie chemicznej wiązania amidowego pomiędzy estrem benzyłowym kwasu 6-APA, a 3-hydroksykwasami

#### 3.2.3.1. Bezwodnik kwasu propanofosfonowego (T3P)

Bezwodnik kwasu propanofosfonowego jest powszechnie używany w reakcjach sprzęgania amidów oraz peptydów, ale także stosuje się go do przemian różnych grup funkcyjnych np. w redukcji kwasów karboksylowych do alkoholi albo amidów i kwasów karboksylowych do nitryli i izonitryli<sup>152</sup>. W tym przypadku bezwodnik kwasu propanofosforanowego został wykorzystany do łączenia aminy I rzędowej (zabezpieczonego kwasu 6-APA, 9) z kwasami karboksylowymi (pochodnymi PHA). Środowisko zasadowe reakcji powoduje deprotonację 3-hydroksykwasów i utworzenie anionu karboksylowego. W wyniku ataku nukleofilowego powstałego anionu na cząsteczkę T3P, następuje otwarcie jej pierścienia oraz powstanie



produktu przejściowego – bezwodnika acylowo-fosfonowego. Następnie, acylowany atom węgla aktywowanego kwasu jest atakowany przez aminę, co skutkuje utworzeniem wiązania amidowego.<sup>153</sup> Reakcja przebiegała według schematu przedstawionego na **Rysunku 21**.



**Rysunek 21.** Schemat przebiegu reakcji syntezy estrów benzytowych penicylin zmodyfikowanych 3-hydroksykwasami przy wykorzystaniu odczynnika kondensującego T3P.

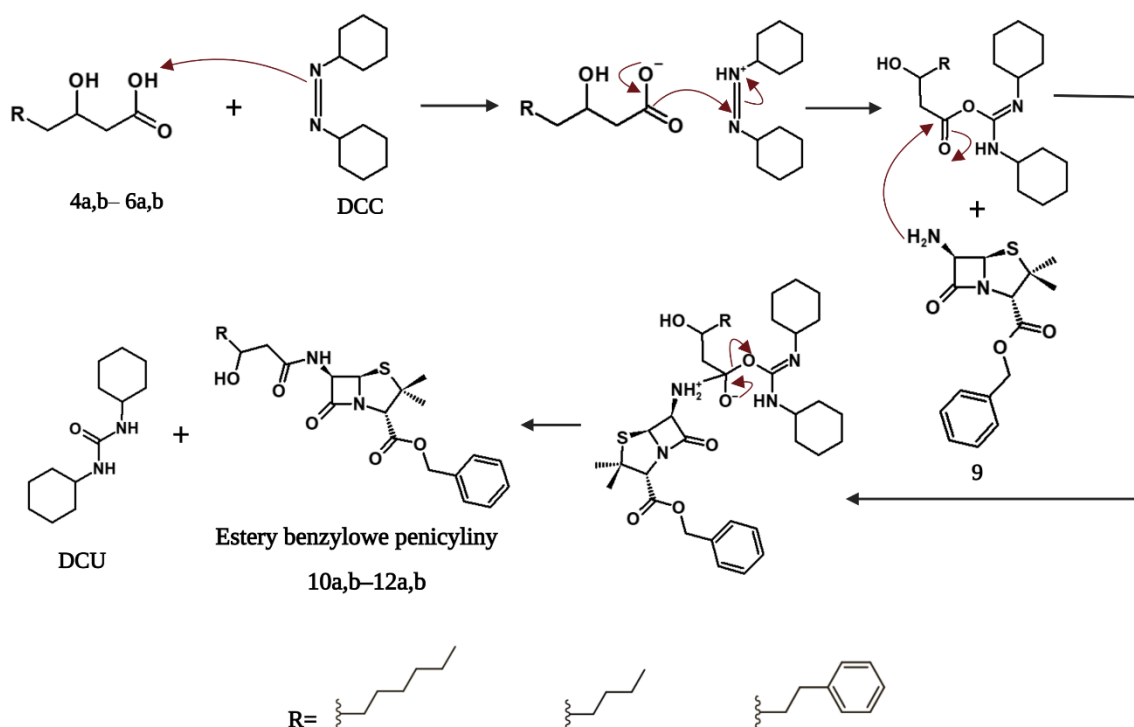
Procedurę reakcji opracowano na podstawie pracy Dunetz et al.<sup>154</sup> i przeprowadzono w następujący sposób: kwas 3-hydroksyowy (**4a**, **4b**, **5a**, **5b**, **6a**, **6b**) (1 eq) rozpuszczono w octanie etylu (2 vol) oraz pirydynie (1 vol). Mieszaninę schłodzono do temperatury 0°C, a następnie dodano reagent sprzęgający T3P (2 eq) oraz ester benzytowy kwasu 6-APA (1,1 eq) (**9**). Reakcję prowadzono na lodzie i zakończono po całkowitym przereagowaniu 3-hydroksykwasu obecnego w mieszaninie. Postęp reakcji był monitorowany przy użyciu UHPLC-MS/MS.

Po zakończeniu reakcji odparowano rozpuszczalniki organiczne, a produkty syntezy oczyszczano przy wykorzystaniu aparatu Biotage Selekt System do chromatografii typu Flash na kolumnie Biotage® Sfär C18 30 g w fazie odwróconej, gdzie fazę mobilną stanowiły woda ultraczysta oraz metanol. Kolumna została zrównoważona poprzez płukanie ultraczystą wodą przez 3 minuty przy przepływie 25 mL min<sup>-1</sup>. Rozdział przebiegał gradientowo w fazie wody

(A) oraz metanolu (B) w interwałach: 0–24 min (0%–100% B), od 24–44 min (100% B). Rozdziały produktów syntez były monitorowane przy pomocy detektora DAD przy długości fali 210 nm oraz 254 nm, a ich struktury potwierdzono przez analizę UHPLC-MS/MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR oraz CD.

### 3.2.3.2. *N,N'*-Dicykloheksylokarbodiimid (DCC)

Należący do rodziny karbodiimidów DCC, jest jednym najstarszych i najczęściej stosowanych odczynników kondensujących wykorzystywanym do syntezy wiązania amidowego. Reakcję tworzenia wiązania amidowego, w którym pośredniczy DCC, rozpoczyna deprotonacja kwasu karboksylowego przez słabo zasadowy azot w cząsteczce DCC, co prowadzi do utworzenia pary jonowej (**Rysunek 22**), a następnie O-acylomocznika, który w środowisku zasadowym ulega aminolizie do docelowego amidu. Produktem ubocznym reakcji jest dicykloheksylomocznik (DCU) bardzo słabo rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych<sup>153,155</sup>.



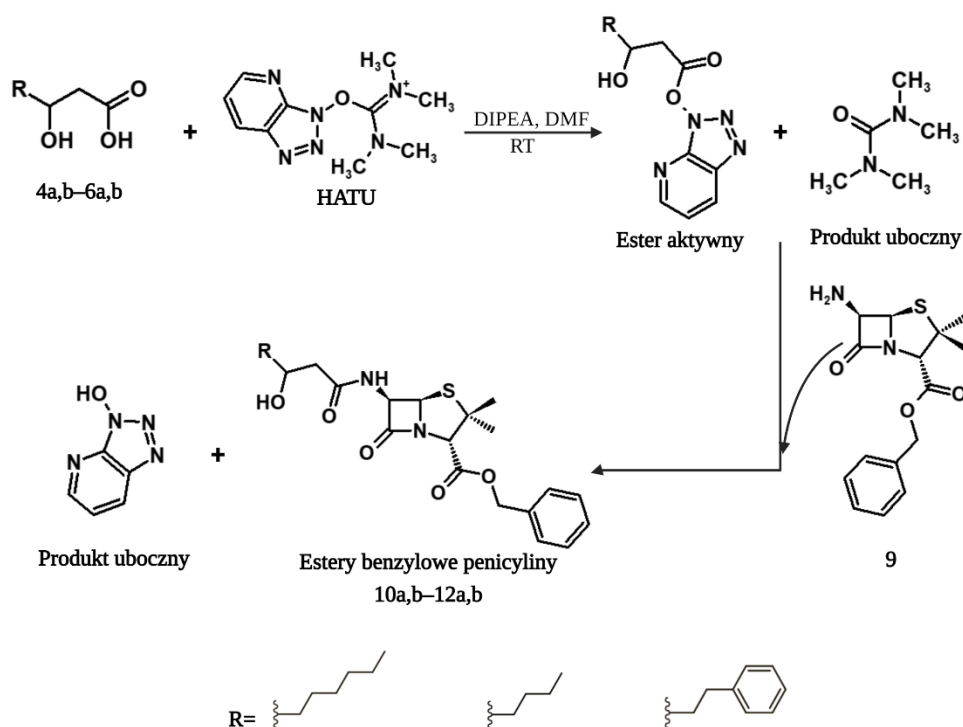
**Rysunek 22.** Schemat przebiegu reakcji syntezy estrów benzylowych penicylin zmodyfikowanych 3-hydroksykwasami przy wykorzystaniu odczynnika kondensującego DCC.

Reakcja została przeprowadzona w oparciu o pracę De Rosa et al.<sup>151</sup> przebiegała w następujący sposób: otrzymane 3-hydroksykwasy (0,3 mmol, **4a**, **4b**, **5a**, **5b**, **6a** lub **6b**) oraz DCC (0,33 mmol) zostały rozpuszczone w bezwodnym dichlorometanie (5 mL) i mieszane

w temperaturze pokojowej przez 40 minut w kolbie wypełnionej argonem. Następnie całą mieszaninę przefiltrowano przez teflonowy filtr strzykawkowy o porach wielkości 0,22  $\mu\text{m}$  i dodano ester benzyloyl kwasu 6-APA (0,3 mmol, **9**). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowano przy wykorzystaniu chromatografii UHPLC-MS/MS. Produkt uboczny reakcji (DCU) został usunięty z mieszaniny, przeprowadzając filtrację zimnej mieszaniny przez filtr teflonowy 0,22  $\mu\text{m}$  oraz chromatografię preparatywną w fazie odwróconej na aparacie CombiFlash® EZ Prep.

### 3.2.3.3. Heksafluorofosforan O-(7-azabenzotriazol-1-ilo)-N,N,N',N'-tetrametylourowiowy (HATU)

HATU jest powszechnie używany do sprzęgania peptydów. Generowanie estrów aktywnych z kwasów karboksylowych przebiega zazwyczaj w obecności zasad Hüniga jak np.: DIPEA. Docelowy amid (estry benzyloyl penicyliny) otrzymano w reakcji estru benzyloyl kwasu 6-APA (**9**) z wygenerowanym uprzednio estrem aktywnym.<sup>153</sup> Schemat reakcji przedstawiono na **Rysunku 23**.

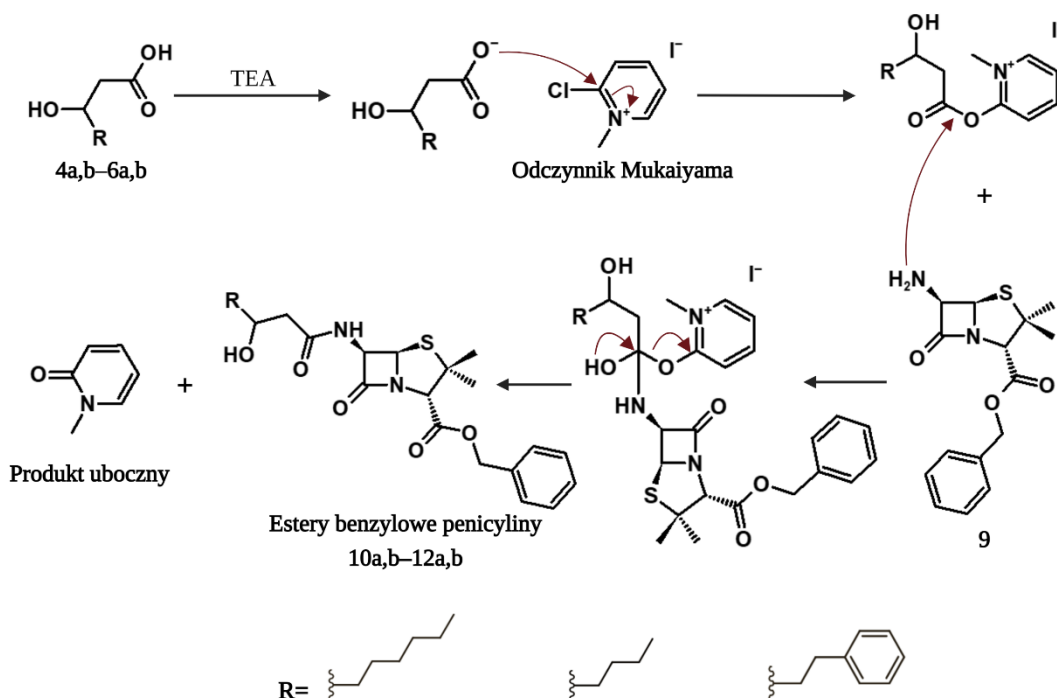


**Rysunek 23.** Schemat przebiegu reakcji syntezy estrów benzyloyl penicylin zmodyfikowanych 3-hydroksykwasami przy wykorzystaniu odczynnika kondensującego HATU.

Reakcję przeprowadzono w następujący sposób: do kolby okrągłodennej o pojemności 50 mL wprowadzono 3-hydroksykwas (0,29 mmol, **4a**, **4b**, **5a**, **5b**, **6a** lub **6b**), który rozpuszczono w 10 mL DMF. Następnie wprowadzono 110  $\mu$ L bezwodnej N,N-diizopropylaminy (DIPEA) oraz 0,35 mmol HATU. Całość mieszano przez 30 min w temperaturze pokojowej pod argonem, a następnie dodano ester benzylový kwasu 6-APA (**9**). Postęp reakcji monitorowano przy użyciu chromatografii cieczowej UHPLC-MS/MS.

### 3.2.3.4. Odczynnik Mukaiyama

Jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy to odczynnik kondensujący, szeroko stosowany do syntezy estrów, amidów, laktamów, ketenów, a także laktonów<sup>156,157</sup>. Reagent ten do aktywacji grupy karboksylowej zastosowanych 3-hydroksykwasów wymaga obecności trzeciorzędowej zasady aminowej, którą jest w tym przypadku TEA<sup>158,159</sup>. Schemat reakcji przedstawiono na **Rysunku 24**.



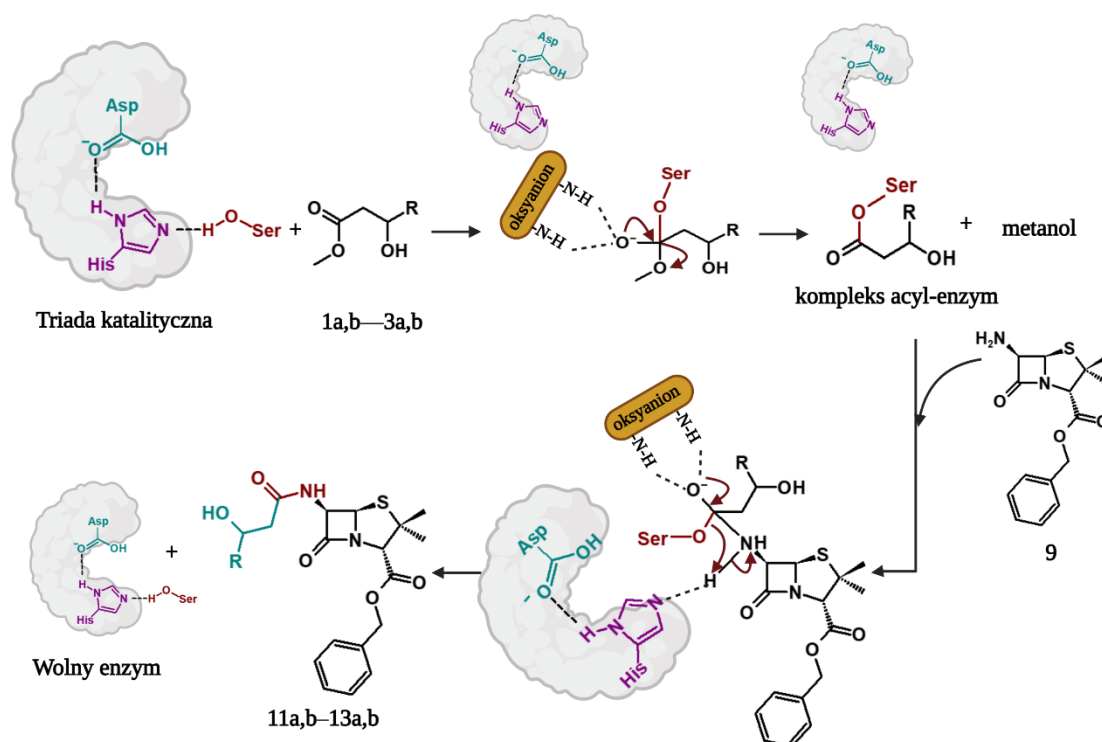
**Rysunek 24.** Schemat przebiegu reakcji syntezy estrów benzylových penicylin zmodyfikowanych 3-hydroksykwasami przy wykorzystaniu odczynnika kondensującego Mukaiyama.

Reakcję wykonano w następujący sposób: 3-hydroksykwas (0,29 mmol) rozpuszczono w roztworze trietyloaminy (TEA, 152  $\mu$ L) w bezwodnym DCM, a następnie dodano odczynnik kondensujący Mukaiyama (0,35 mmol) oraz katalityczną ilość 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP). W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono ester benzylový kwasu

6-APA (0,35 mmol, **9**)<sup>159</sup>. Reakcję prowadzono pod argonem w temperaturze pokojowej, a jej postęp monitorowano przy użyciu UHPLC-MS/MS

### 3.2.4. Biosynteza wiązania amidowego pomiędzy estrem benzylovym kwasu 6-APA, a estrami metylowymi 3-hydroksykwasów przy wykorzystaniu lipaz

Reakcja aminolizy katalizowana lipazami rozpoczyna się od aktywacji reszty serynowej znajdującej się w centrum aktywnym enzymu, przez dwie inne reszty: histydynę oraz kwas asparaginowy. Następnie seryna łączy się z estrem metylowym 3-hydroksykwasu, tworząc produkt pośredni reakcji tzw. acylo-enzym. Produktem ubocznym tego etapu jest metanol. Następnie grupa karbonylowa aktywowana przez serynę oraz wiązania wodorowe sąsiadujących reszt aminokwasowych, staje się podatna na atak nukleofilowy aminy obecnej w mieszaninie reakcyjnej (w tym przypadku estru benzylovego kwasu 6-APA). W wyniku połączenia aminy z aktywowaną grupą karbonylową, powstaje amid (zmodyfikowana pochodna 6-APA: **11a**, **11b**, **12a**, **12b**, **13a** oraz **13b**). Etapem kończącym proces tworzenia wiązania amidowego jest odtworzenie katalizatora, który może następnie przeprowadzać katalizę następnej biosyntezy (**Rysunek 25**).



**Rysunek 25.** Schemat przebiegu reakcji aminolizy katalizowanej przez lipazę. Rysunek sporządzono na podstawie pracy Lima et al.<sup>149</sup> w programie BioRender.

Otrzymywanie nowych  $\beta$ -laktamów poprzez połączenie estru benzyłowego 6-APA (**9**) z estrami metylowymi 3-hydroksykwasów (enancjomerami *R* oraz ich mieszaniną racemiczną) zostało przeprowadzone na drodze aminolizy katalizowanej przez lipazy. Optymalizacja biosyntezy przebiegała kilkietapowo. Zastosowanymi enzymami modelowymi były dwie lipazy: CalB pochodząca z *Candida antarctica* (Novozymes, Denmark) oraz TL-IM z *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes, Denmark). Wybrane enzymy przeprowadzają syntezę wiązania amidowego podczas reakcji aminolizy, a dodatkowo charakteryzują się wyjątkowo szerokim spektrum substratowym oraz dużym przedziałem tolerancji temperaturowej.

Optymalizacja ścieżki biosyntezy pochodnych 6-APA obejmowała: wybór najlepszego rozpuszczalnika organicznego stanowiącego środowisko reakcji dla wybranych enzymów; optymalizację temperatury, w której proces biosyntezy przebiegał najwydajniej, a produkty reakcji nie ulegały degradacji; wybór typu modyfikatora (kwasu lub estru) cząsteczki 6-APA oraz preferowanej przez enzym formy chiralnej cząsteczki dołączonej do pierścienia  $\beta$ -laktamowego.

Wszystkie omawiane w tym rozdziale reakcje były przeprowadzane w probówkach z gwintem wewnętrznym i uszczelką oraz dodatkowo zabezpieczone przed parowaniem taśmą teflonową. Aby zminimalizować błędy wynikające z zateżnienia próbki przez odparowywanie rozpuszczalników w czasie biosyntezy, do każdej serii testów prowadzono dodatkowo próby ślepe bez dodatku enzymów, w której na podstawie zmiany stężenia substratu stabilnego w temperaturze, monitorowano ubytek rozpuszczalnika. Uzyskaną zmianę stężenia uwzględniano przy obliczaniu wydajności reakcji enzymatycznych. Dodatkowo, każda próbówka zawierała 200 mg sit molekularnych (0,4 nm, 4 Å, VWR International, USA), które wiązały powstającą podczas reakcji wodę (w przypadku, gdy substratem były 3-hydroksykwasy) lub metanol (gdy substratem były estry metylowe)<sup>160</sup> oraz ewentualne pozostałości wody, które mogły znajdować się we wszystkich składowych reakcji enzymatycznej. W początkowych etapach optymalizacji warunków biosyntezy, jako cząsteczki przyłączane do związku **9**, wykorzystywane były estry metylowe *rac*-3-hydroksykwasów (**1b**, **2b** lub **3b**), a w przypadku etapu wybierania lepszego typu modyfikatora, również ich kwasy (**4b**, **5b**, **6b**). Substraty przyłączane do pierścienia  $\beta$ -laktamowego w formie mieszanin racemicznych, zostały wybrane ze względu enancjospicyficzności reakcji katalizowanych przez enzymy. Obecność w mieszaninie reakcyjnej obu enancjomerów (*R* oraz *S*) pozwoliła na zmniejszenie ilości przeprowadzonych reakcji, przy jednoczesnym uwzględnieniu preferencji substratowej enzymów. W ostatnim etapie optymalizacji porównano wydajność reakcji

otrzymywania penicylin zmodyfikowanych czystymi enancjomerami (*R*)-3-hydroksykwasów oraz tych z dołączonymi cząsteczkami w formie mieszaniny racemicznej. Przebieg wszystkich reakcji enzymatycznych był monitorowany przy wykorzystaniu chromatografii cieczowej UHPLC-MS/MS. Warunki rozdziału oraz parametry zastosowane do detekcji analizowanych związków opisano dokładnie w **podrozdziale 3.2.6** oraz zestawiono w **Tabeli 11**.

W etapie pierwszym optymalizacji skupiono się na wyborze najlepszego rozpuszczalnika organicznego, który pełnił rolę środowiska reakcji. Pulę testowanych rozpuszczalników wybrano na podstawie zebranych danych literaturowych, w których były najczęściej przeprowadzane reakcje enzymatyczne z udziałem lipaz CalB i TL-IM<sup>149,161–164</sup> oraz ze względu na rozpuszczalność w nich badanych substratów. Testowe reakcje zostały przeprowadzone w: toluenie, acetonitrylu, tetrahydrofuranie oraz dioksanie (ester benzyłowy 6-APA był słabo rozpuszczalny w *n*-heksanie, 2-metylo2-butanie, *tert*-butanolu oraz w eterze *tert*-butylowo-metylowym). Wszystkie rozpuszczalniki organiczne zostały wcześniej poddane suszeniu poprzez dodanie sit molekularnych 4A. Obecność wody w reakcji katalizowanej przez lipazy, prowadzi do powstania reakcji konkurencyjnej do aminolizy, a mianowicie reakcję hydrolizy wiązania estrowego lub amidowego. Reakcje enzymatyczne wykonano w następujący sposób: do próbki zawierającej 200 mg wysuszonych sit molekularnych dodano bezwodny rozpuszczalnik organiczny (1,5 mL) z rozpuszczonym w nim uprzednio estrem benzyłowym kwasu 6-APA (**9**) (0,03 mmol). Następnie dodano odpowiedni ester metylowy *rac*-3-hydroksykwasu (**1b**, **2b**, **3b**, 0,045 mmol), a po dokładnym wymieszaniu składników reakcji dosypano 20 mg lipazy (CalB lub TL-IM). Reakcję prowadzono przez 24 h w temperaturze 30°C i mieszaniu 1000 RPM. Produkty reakcji było oceniane jakościowo przez obserwację obecności właściwych dla danego związku jonów rozpadu, scharakteryzowanych w **Tabeli 11**.

Lipazy przeprowadzają reakcję aminolizy aktywowanych związków karboksylowych, takich jak estry czy bezwodniki kwasowe, ale także nieaktywowanych kwasów karboksylowych.<sup>163</sup> Z tego względu, drugim etapem optymalizacji była ocena preferowanej przez wybrane lipazy grupy funkcyjnej występującej w związkach dołączanych do pierścienia β-laktamowego, które wykorzystywane są przez enzymy podczas tworzenia wiązania amidowego pomiędzy substratami.<sup>163</sup> Reakcje przeprowadzono w analogiczny sposób, jak opisano powyżej, z tą różnicą, że substratami oprócz mieszaniny racemicznej estrów metylowych (**1b**, **2b**, **3b**) były także *rac*-3-hydroksykwasy (**4b**, **5b** i **6b**). Rozpuszczalnikami organicznymi biorącymi udział w tej części optymalizacji były toluen oraz acetonitryl, które zostały wybrane na podstawie wyników pierwszego etapu optymalizacji biosyntezy. Produkty

powstające podczas biosyntezy monitorowano przez przeprowadzenie analizy jakościowej UHPLC-MS/MS (**Tabela 11**).

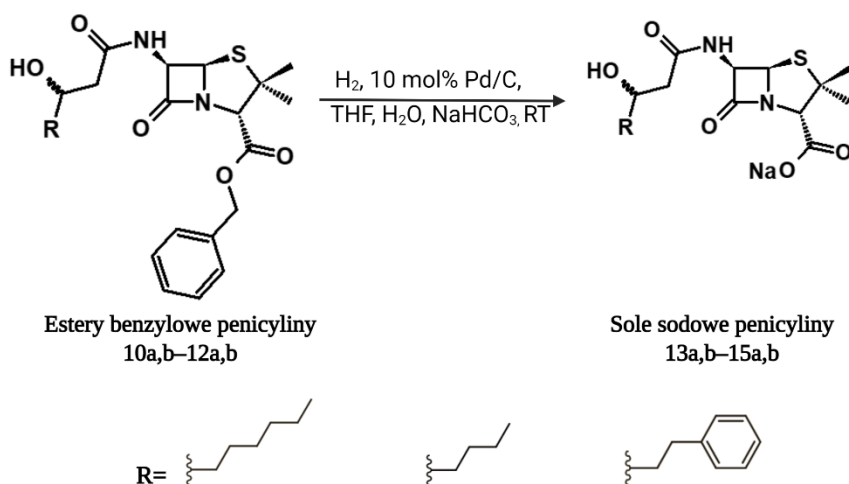
W trzeciej części optymalizacji skupiono się na temperaturze odpowiedniej dla biosyntezy estrów nowych penicylin. Temperatura stanowiła ważny czynnik w reakcji ze względu na optimum temperaturowe, w których działają lipazy, ale także przez wzgląd na produkty i substraty (ester benzyłowy 6-APA) reakcji, które ulegają degradacji pod wpływem wysokiej temperatury. Sposób przeprowadzenia reakcji był taki sam jak opisano powyżej. Reakcje prowadzono w temperaturach: 25°C, 15°C oraz 5°C. Środowiskiem przeprowadzonych reakcji był bezwodny toluen oraz acetonitryl. Ze względu na stosunkowo niskie temperatury wybrane do testów, czas eksperymentu wydłużono do 72 h. Przebieg biosyntezy monitorowano przez przeprowadzenie ilościowej analizy UHPLC-MS/MS. Stężenie otrzymanych produktów biosyntezy wyznaczono na podstawie krzywych kalibracyjnych utworzonych dla każdego kluczowego substratu oraz produktu reakcji. Wszystkie krzywe kalibracyjne zestawiono w **Suplemencie** na końcu pracy. Dla poszczególnych wariantów reakcji obliczono średnią wydajność biosyntezy z jaką powstawały produkty z uwzględnieniem błędu standardowego otrzymanych wyników.

Na podstawie danych uzyskanych w etapach optymalizacji opisanych powyżej, wybrano lipazę najwydajniej przeprowadzającą reakcje biosyntezy wiązania amidowego pomiędzy estrami metylowymi *rac*-3-hydroksykwasów (**1b**, **2b**, **3b**), a estrem benzyłowym 6-APA (**9**). Wybrano również optymalny dla procesu rozpuszczalnik organiczny, a także temperaturę reakcji, w której lipaza efektywnie przeprowadzała biosyntezę, a otrzymywane produkty nie ulegały degradacji. W ostatnim etapie optymalizacji sprawdzono zależność wydajności biosyntezy pochodnych 6-APA (**10a**, **10b**, **11a**, **11b**, **12a** oraz **12b**) w zależności od czystości optycznej wykorzystanych estrów metylowych 3-hydroksykwasów. Poszczególne reakcje przeprowadzono analogicznie do opisanych wyżej. Środowiskiem reakcji był bezwodny toluen (1,5 mM), w którym rozpuszczono ester 6-APA oraz wybrany ester metylowy 3-hydroksykwasu (**1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a** lub **3b**). Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 20 mg lipazy TL-IL. Reakcję prowadzono w 15°C przez 72 h przy mieszaniu 1000 RPM. Rezultaty reakcji oceniono przez przeprowadzoną ilościową analizę UHPLC-MS/MS, a wyniki przedstawiono jako średnią wydajność przebiegu reakcji.



### 3.2.5. Otrzymywanie soli sodowych zmodyfikowanych penicylin

Otrzymane estry benzytowe pochodnych 6-APA (**10a**, **10b**, **11a**, **11b**, **12a** oraz **12b**) poddano reakcji hydrolizy wiązania estrowego, w wyniku której otrzymano zmodyfikowane penicyliny w postaci soli sodowych. Etap ten miał na celu otrzymanie związków bardziej hydrofilowych i rozpuszczalnych w wodzie, co jest znaczące przy późniejszych analizach porównujących otrzymane produkty do antybiotyków stosowanych w medycynie. Reakcja miała następujący przebieg: ester benzytowy pochodnej 6-APA (0,691 mmol, **10a**, **10b**, **11a**, **11b**, **12a** lub **12b**) a następnie dodano roztwór wodorowęglanu sodu (1,417 mmol) w 70 mL wody. W kolejnym etapie do mieszaniny wsypano w atmosferze argonu pallad na węglu (10 mol% Pd/C), po czym zredukowano wodorem pod ciśnieniem 1 bar intensywnie mieszając przez całą noc w temperaturze pokojowej.<sup>151</sup> Reakcja przebiegała według schematu przedstawionego na **Rysunku 26**.



**Rysunek 26.** Schemat przebiegu reakcji otrzymywania soli sodowej penicylin z wykorzystaniem katalizatora palladowego.

Mieszaninę poreakcyjną przefiltrowano przez celit, a następnie ekstrahowano eterem dietylowym. Fazę wodną zebrano, zamrożono i poddano liofilizacji. Produkty reakcji – sole sodowe penicylin (**13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a** oraz **15b**) – zostały poddane analizom UHPLC-MS/MS, FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR oraz CD.

### **3.2.6. Analiza UHPLC-MS/MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FT-IR oraz CD otrzymanych penicylin i ich estrów benzytowych.**

Analizę UHPLC-MS/MS dla otrzymanych związków przeprowadzono w celu weryfikacji mas produktów, a także w przypadku niektórych etapów biosyntezy, do wyznaczenia ich stężenia w mieszaninie poreakcyjnej. Sprzęt wykorzystany do charakterystyki produktów oraz metoda i warunki rozdziału były takie same jak opisano w **podrozdziale 3.1.7**. Zastosowaną metodą jonizacji było również ESI w polaryzacji wyłącznie pozytywnej w trybie dynamicznego monitorowania wybranych reakcji (dMRM) oraz w przypadku końcowych produktów syntez – w tryb skanowania. Do każdego związku przeprowadzono optymalizację przy wykorzystaniu oprogramowania Optimizer, MassHunter (wersja 10.0, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Jony prekursorowe uzyskane w metodzie dMRM oraz wszystkie parametry niezbędne do ich rozpadu zebrano w **Tabeli 11**. Dla poszczególnych związków oznaczanych ilościowo wyznaczono LOD, LOQ oraz krzywe kalibracyjne.

Związki stanowiące półprodukty i produkty końcowe reakcji syntez zostały poddane dodatkowo analizom potwierdzającym ich strukturę, a mianowicie: <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FT-IR oraz CD. Procedura pomiarowa, wykorzystany sprzęt pomiarowy oraz programy potrzebne do analizy uzyskanych danych były takie same jak opisano w **podrozdziale 3.1.8**.

**Tabela 11. Parametry widm masowych charakteryzowanych produktów syntez**

Związek	Masa izotopowa [Da]	Wzór sumaryczny	Jon prekursorowy [m/z]	Jon potomny [m/z]	Energia kolizji [V]	Czas retencji [min]	LOD [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Typ jonizacji
Ester benzylowy kwasu 6-APA ( <b>9</b> )	306,10	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	307,1	279,1/91,1	2/26	2,36	1,0	3,0	pozytywna
Ester benzylowy penicyliny z grupą 4a lub 4b ( <b>10a, 10b</b> )	462,22	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	463,2	250,1/91,0	10/38	3,52	1,0	3,1	pozytywna
Ester benzylowy penicyliny z grupą 5a lub 5b ( <b>11a, 11b</b> )	434,19	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	435,2	250,0/91,1	10/30	3,23	0,4	1,3	pozytywna
Ester benzylowy penicyliny z grupą 6a lub 6b ( <b>12a, 12b</b> )	482,19	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	483,2	250,0/91,0	10/54	3,32	0,7	2,0	pozytywna
Penicylina z grupą 4a lub 4b ( <b>13a, 13b</b> )	394,15	$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}$	373,2	214,1/ 114,0/ 43,0/ 160	10/ 46/ 82/ 18	2,78	-	-	pozytywna
Penicylina z grupą 5a lub 5b ( <b>14a, 14b</b> )	366,12	$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}$	345,2	114,0/ 186,1/ 41,0/ 160,0	42/ 10/ 94/ 18	2,40	-	-	pozytywna
Penicylina z grupą 6a lub 6b ( <b>15a, 15b</b> )	414,12	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}$	393,2	91,0/ 114,0/ 234,1/ 117,0	82/ 50/ 10/ 50	2,57	-	-	pozytywna

### 3.2.7. Wyniki i dyskusja

#### 3.2.7.1. Synteza chemiczna estrów benzytowych penicylin z wykorzystaniem odczynników kondensujących

Wszystkie reakcje testowe z wybranymi odczynnikami kondensującymi doprowadziły do powstania właściwego produktu, tj. nowych pochodnych 6-APA (**10a**, **10b**, **11a**, **11b**, **12a**, **12b**) z dołączonymi 3-hydroksykwasami (**4a**, **4b**, **5a**, **5b**, **6a**, **6b**). Produkty zostały potwierdzone w analizie UHPLC-MS/MS przez obserwację jonu  $[M+H]^+$  w widmie masowym. W przypadku reakcji aktywowanych DCC, HATU i odczynnikiem Mukaiyama zaobserwowano tylko niewielkie sygnały właściwe dla docelowych produktów, przy jednoczesnej obecności intensywnych sygnałów substratów. Jedynie w przypadku odczynnika T3P reakcja biegła do całkowitego wyczerpania jednego z substratów. Otrzymane rezultaty przedstawiono w Tabeli 12.

**Tabela 12. Rezultaty optymalizacji warunków reakcji pomiędzy estrem 6-APA (9), a 3-hydroksykwasami wymienionymi w tabeli, przy zastosowaniu wybranych odczynników kondensujących.**

Odczynnik sprzęgający	Obecność $[M+H]^+$ produktu			Całkowita konwersja substrat-produkt		
	10a, 10b	11a, 11b	12a, 12b	10a, 10b	11a, 11b	12a, 12b
<b>T3P</b>	+	+	+	+	+	+
<b>DCC</b>	+	+	+	–	–	–
<b>HATU</b>	+	+	+	–	–	–
<b>Mukaiyama</b>	+	+	+	–	–	–

Na podstawie wyników reakcji testowych wybrano reagent T3P jako najlepszy aktywator wszystkich testowanych kwasów karboksylowych. Zoptymalizowane warunki reakcji pozwoliły na uzyskanie wszystkich oczekiwanych estrów benzytowych nowych penicylin (**10a**, **10b**, **11a**, **11b**, **12a**, **12b**). Etapem limitującym otrzymanie czystych związków z wysoką wydajnością był etap separacji produktów z mieszaniny poreakcyjnej. Otrzymane penicyliny okazały się wrażliwe na wysoką temperaturę (obserwowano rozkład już w temperaturze 40°C), niskie pH oraz wysokie natężenie światła UV. Końcowe wydajności uwzględniające proces oczyszczania związków zestawiono w Tabeli 17 razem z całą charakterystyką strukturalną nowych związków. Wyprodukowana ilość produktów, pozwoliła na przeprowadzenie kolejnej reakcji, tj. reakcji hydrolizy wiązania estrowego oraz została wykorzystana do wszystkich

analiz charakteryzujących ich strukturę, a także do testów mikrobiologicznych oraz komórkowych opisanych w kolejnym rozdziale.

### 3.2.7.2. Biosynteza wiązania amidowego katalizowana lipazami w produkcji nowych penicylin

Pierwszym etapem optymalizacji biosyntezy nowych pochodnych 6-APA w postaci estrów benzylowych był dobór odpowiedniego dla zastosowanych lipaz rozpuszczalnika organicznego. Przebieg reakcji był oceniany przez obserwacje charakterystycznych dla danych związków jonów potomnych we właściwym dla nich czasie retencji. Wyznaczone przy użyciu programu Optimizer (Mass Hunter, Agilent) jony potomne dla związków **10b**, **11b** oraz **12b**, były takie same, a mianowicie:  $m/z = 250$  oraz  $m/z = 91.1$ . Wynika to bezpośrednio z podobieństwa strukturalnego tych związków i sposobu rozpadu ich jonu prekursorowego w komorze kolizyjnej detektora mas. Poszczególne pochodne 6-APA odróżniał natomiast ich czas elucji z kolumny chromatograficznej (**Tabela 11**). Jako wynik pozytywny przeprowadzonych reakcji biosyntezy w różnych rozpuszczalnikach organicznych uznawano obecność obu jonów potomnych w odpowiednim czasie retencji dla danego produktu. Otrzymane wyniki przedstawiono w **Tabeli 13**.

Analiza UHPLC-MS/MS wykazała obecność jonów potomnych dla wszystkich pochodnych 6-APA (**10b**, **11b**, **12b**) w reakcjach katalizowanych przez obie lipazy przebiegających w toluenie oraz acetonitrylu. Tetrahydrofuran nie stanowił odpowiedniego środowiska reakcji dla żadnego z testowanych enzymów. Dla reakcji przebiegających w tym rozpuszczalniku organicznym nie stwierdzono obecności żadnego z obserwowanych jonów potomnych pochodzących od produktów. Detekcję produktów reakcji przebiegających w dioksanie potwierdzono jedynie w przypadku pochodnych **10b** oraz **11b**, które były katalizowane przez lipazę TL-IM. Nie zaobserwowano jonów charakterystycznych dla pochodnej z dołączonym *rac*-3-hydroksykwaskiem aromatycznym (**12b**). Tetrahydrofuran oraz dioksan zostały wykluczone z dalszych etapów optymalizacji procesu biosyntezy.

**Tabela 13. Ocena zależności biosyntezy pochodnych 6-APA (10b, 11b, 12b) od zastosowanego rozpuszczalnika organicznego, katalizowanej przez lipazę CalB lub TL-IM w temperaturze 30°C.**

Rozpuszczalnik	Lipaza	Obecność jonów potomnych produktów		
		10b	11b	12b
Toluen	CalB	+	+	+
	TL-IM	+	+	+
THF	CalB	–	–	–
	TL-IM	–	–	–
Dioksan	CalB	–	–	–
	TL-IM	+	+	–
ACN	CalB	+	+	+
	TL-IM	+	+	+

W drugim etapie optymalizacji sprawdzano z którą formą chemiczną modyfikatora 6-APA (kwasem karboksylowym czy estrem metylovym) lipazy wydajniej przeprowadzą reakcję aminolizy. Przebieg reakcji, podobnie jak wcześniej, monitorowano poprzez obserwację jonów potomnych przy wykorzystaniu chromatografii cieczowej z detektorem MS/MS. Otrzymane rezultaty analiz przedstawiono w **Tabeli 14**. Zarówno lipaza CalB, jak i TL-IM, niezależnie od środowiska reakcji, przeprowadziły biosyntezy wiązania amidowego pomiędzy estrem metylovym *rac*-3-hydroksykwasów (**1b**, **2b**, **3b**), a estrem benzylovym 6-APA (**9**), w wyniku czego otrzymano nowe pochodne 6-APA (**10b**, **11b**, **12b**). W reakcjach, w którym substratem były kwasy karboksylowe (**4b**, **5b**, **6b**) nie zaobserwowano jonów pochodzących od oczekiwanych produktów. Wyjątek stanowiła jedna reakcja katalizowana przez lipazę TL-IM przebiegająca w toluenie, w której potwierdzono obecność produktu **10b**. Niemniej jednak, estry metylove *rac*-3-hydroksykwasów stanowiły znacznie lepszy substrat w reakcji aminolizy w porównaniu z kwasami *rac*-3-hydroksylowymi i to właśnie one zostały wybrane do dalszych części optymalizacji ścieżki biosyntezy pochodnych penicylin.

**Tabela 14. Ocena zależności biosyntezy pochodnych 6-APA (10b, 11b, 12b) od zastosowanego typu związku chemicznego (ester metylovym lub kwas karboksylowy), katalizowanej przez lipazę CalB lub TL-IM w temperaturze 30°C.**

Rozpuszczalnik	Modyfikator	Lipaza	Obecność jonów potomnych produktów		
			10b	11b	12b
Toluen	1b/2b/3b	CalB	+	+	+
		TL-IM	+	+	+
	4b/5b/6b	CalB	–	–	–
		TL-IM	+	–	–
ACN	1b/2b/3b	CalB	+	+	+
		TL-IM	+	+	+
	4b/5b/6b	CalB	–	–	–
		TL-IM	–	–	–

W następnym etapie optymalizacji sprawdzano, czy w temperaturach dostosowanych do stabilności produktów biosyntezy (nie więcej niż 30°C) wybrane lipazy CalB oraz TL-IM, będą wydajnie katalizować reakcję otrzymywania nowych pochodnych 6-APA. Reakcje prowadzono przez 72h, a wybranymi rozpuszczalnikami były toluen oraz acetonitryl. Przebieg reakcji był monitorowany przy wykorzystaniu UHPLC-MS/MS. Stężenie końcowe otrzymanych produktów było wyznaczone z przygotowanych krzywych kalibracyjnych. Dla każdej przeprowadzonej reakcji obliczono jej wydajność oraz błąd standardowy. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 15**. Na podstawie uzyskanych danych wykazano, że testowane temperatury nie są optymalne dla lipazy CalB, a wydajności reakcji uzyskane w tych warunkach są niskie. Ponadto w reakcjach, gdzie CalB katalizowało reakcję biosyntezy, a środowisko reakcji stanowił bezwodny acetonitryl, nie stwierdzono obecności jonów potomnych pochodzących od produktów reakcji. Wyjątkiem była reakcja biosyntezy związku **10b** w temperaturze 5°C, gdzie średnia wydajność reakcji wynosiła 7%.

**Tabela 15. Średnia wydajność reakcji biosyntezy wiązania amidowego pomiędzy estrem benzylovym kwasu 6-APA, a estrami metylowymi *rac*-3-hydroksykwasów (1b, 2b, 3b) katalizowana lipazą CalB lub TL-IM w toluenie oraz acetonitrylu przy zastosowaniu różnych temperatur.**

Rozpuszczalnik	Temperatura	Lipaza	Wydajność		
			10b	11b	12b
Toluen	25°C	CalB	3% ± 1	4% ± 1	4% ± 1
		TL-IM	42% ± 3	57% ± 3	4 ± 1
	15°C	CalB	3% ± 1	3% ± 1	1% ± 1
		TL-IM	55% ± 3	54% ± 2	17% ± 2
	5°C	CalB	7% ± 1	13% ± 1	5% ± 1
		TL-IM	46% ± 2	50% ± 2	11% ± 1
ACN	25°C	CalB	–	–	–
		TL-IM	51% ± 1	37% ± 3	5% ± 1
	15°C	CalB	–	–	–
		TL-IM	48% ± 1	37% ± 2	5% ± 1
	5°C	CalB	7% ± 1	–	–
		TL-IM	52% ± 2	34% ± 1	3% ± 1

Zastosowane temperatury okazały się być dużo lepsze dla reakcji katalizowanych przez lipazę TL-IM. W obu testowanych rozpuszczalnikach uzyskano stosunkowo wysokie wydajności reakcji. Gdy zastosowanym rozpuszczalnikiem organicznym był acetonitryl,

zaobserwowano preferencje substratowe enzymu. Najwyższe wydajności reakcji otrzymano w przypadku modyfikacji 6-APA przez dłuższy ester alifatyczny **1b**, niezależnie od temperatury. Otrzymana wydajność reakcji mieściła się w przedziale 47–53% dla wszystkich testowanych temperatur. W przypadku modyfikacji związku **9**, przez krótszy ester alifatyczny **2b**, wydajność otrzymywania penicyliny **11b** mieściła się w przedziale 33–40%. Biosynteza związku **12b** była najslabiej przebiegającym procesem w tych warunkach przy wykorzystaniu lipazy TL-IM, a wydajność tej reakcji wynosiła od 2–6%. Znacznie lepszym środowiskiem reakcji dla biosyntezy wiązania amidowego pomiędzy zastosowanymi substratami w niskich temperaturach był toluen. Dla produktów zawierających w swojej strukturze alifatyczne łańcuchy boczne (**10b** oraz **11b**) uzyskano ponad 50% wydajność reakcji ich biosyntezy. Najwyższe stężenie związku **12b**, udało się uzyskać w reakcji przeprowadzanej przez lipazę TL-IM w toluenie przy temperaturze 15°C, gdzie średnia wydajność biosyntezy wynosiła 17%. Z uwagi na wysoką wydajność biosyntezy otrzymaną dla dwóch pozostałych produktów w tych warunkach, temperatura ta została wytypowana za najbardziej optymalną do otrzymania wszystkich trzech penicylin oraz wybrana do ostatniego etapu optymalizacji ścieżki biosyntezy.

Końcowy etap optymalizacji został przeprowadzony w celu sprawdzenia enancjoselektywności wybranego enzymu. Wszystkie reakcje były katalizowane przez lipazę TL-IM i biegły w toluenie w 15°C. Substratami wybranymi do modyfikacji 6-APA (**9**) były estry metylowe (*R*)-3-hydroksykwasów (**1a**, **2a**, **3a**) oraz ich odpowiedniki w formie mieszaniny racemicznej (**1b**, **2b**, **3b**). Przebieg reakcji był monitorowany analogicznie do poprzedniego etapu optymalizacji. Oznaczono stężenia produktów końcowych oraz obliczono wydajność każdej z reakcji. Rezultaty przedstawiono w **Tabeli 16**. Wyższe wydajności biosyntezy otrzymano w reakcjach, gdzie substrat był czysty optycznie. Wydajność żadnej z reakcji, w której substratem była mieszanina racemiczna, nie przekroczyła 50%. Na podstawie otrzymanych rezultatów oraz danych literaturowych, można przypuszczać, że aminoliza katalizowana przez lipazę TL-IM jest enancjoselektywna względem enancjomeru *R*. Yildirim i Tükel w swojej pracy wykazali, że lipaza pochodząca z *Thermomyces lanuginosus* przeprowadza asymetryczną amonolizę, w wyniku której otrzymano (*R*)-amidy.<sup>163</sup> W innej pracy (Naik et al.) autorzy, badali enancjoselektywność różnych lipaz (w tym CalB oraz TL-IM). Według przedstawionych przez nich danych, lipaza CalB wykazywała preferencje substratowe względem enancjomerów *R* i była wysokoselektywna, natomiast lipaza TL-IM zostało oceniona jako nieselektywna. Autorzy dodają jednak, że przeprowadzona analiza teoretyczna oraz dokowanie substratów do centrum aktywnego lipazy TL-IM, wskazywały na odmienny wynik, a mianowicie na preferowanie przez enzym enancjomeru *R*.<sup>164</sup>



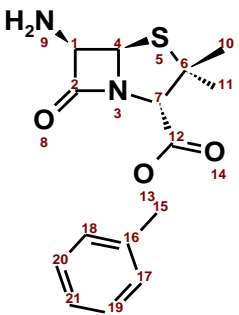
**Tabela 16. Średnia wydajność reakcji biosyntezy wiązania amidowego pomiędzy estrem benzylovym kwasu 6-APA, a estrami metylowymi *R*-3-hydroksykwasów (1a, 2a, 3a) lub *rac*-3-hydroksykwasów (1b, 2b, 3b) katalizowana lipazą TL-IM w toluenie przy 15°C.**

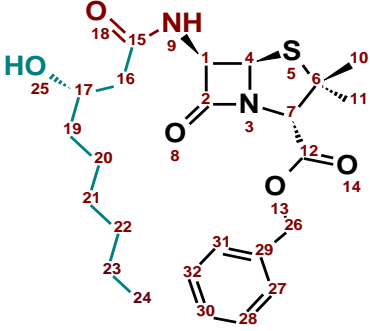
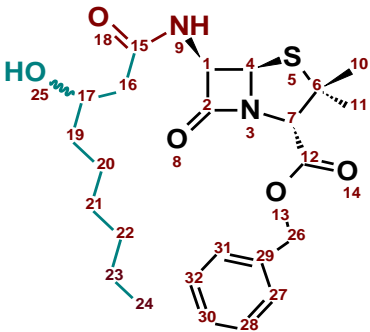
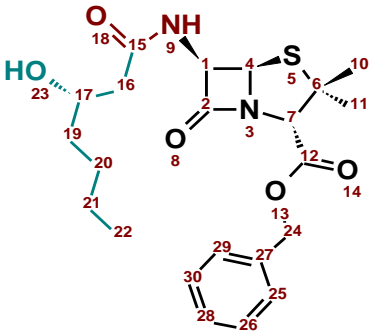
Ester metylowy kwasu 3-hydroksylovogo	Ester benzylovyy kwasu 6-APA	Wydajność biosyntezy
1a	10a	73% ± 2
1b	10b	46% ± 2
2a	11a	60% ± 2
2b	11b	50% ± 1
3a	12a	43% ± 1
3b	12b	24% ± 2

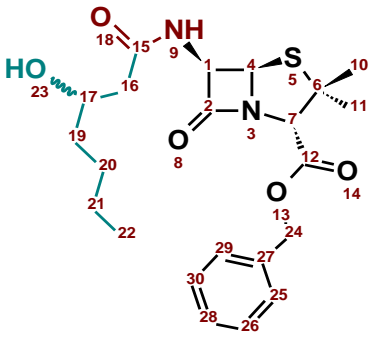
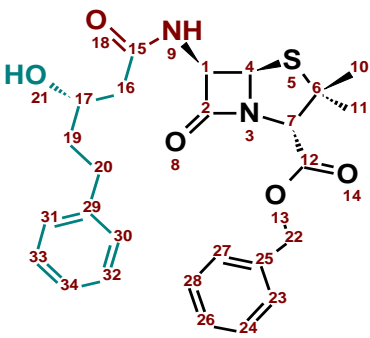
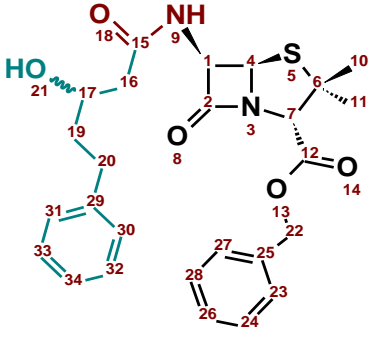
### 3.2.8. Potwierdzenie struktury otrzymanych związków metodami: UHPLC MS/MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FT-IR oraz CD

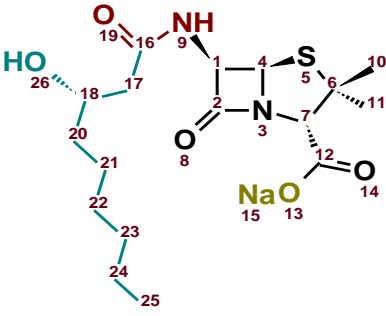
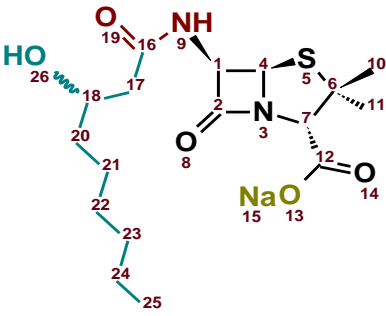
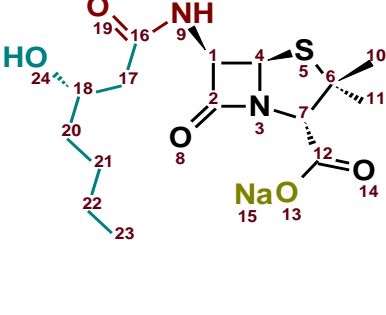
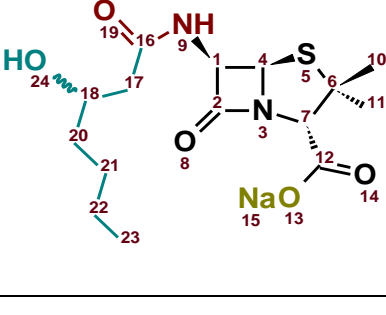
W celu potwierdzenia struktur otrzymanych produktów reakcji chemicznych oraz enzymatycznych przeprowadzono analizy UHPLC MS/MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FT-IR oraz CD, których wyniki zestawiono w **Tabeli 17**. Poszczególne widma analiz oraz wyznaczone dla związków krzywe kalibracyjne zostały umieszczone w **Suplemencie** na końcu pracy.

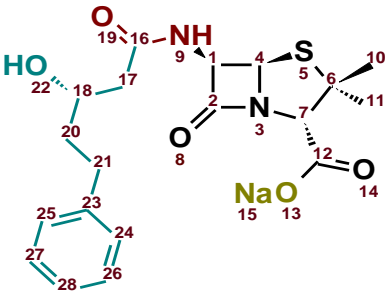
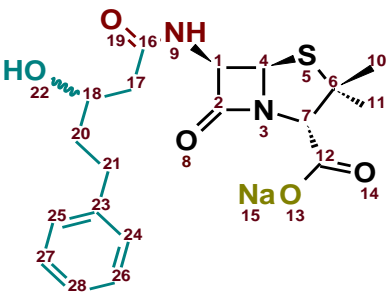
**Tabela 17. Charakterystyka otrzymanych penicylin jako estry benzylove oraz sole sodowe poprzez analizę UHPLC-MS/MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FT-IR oraz CD. W tabeli zamieszczono też najwyższą uzyskaną wydajność syntezy tych związków.**

Związek	Wyniki
<p>Ester benzylovyy kwasu 6-APA (9)</p> 	<sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, chloroform- <i>d</i> ) δ (ppm): 7.42–7.29 (m, 5H), 5.51 (d, <i>J</i> = 4.3 Hz, 1H), 5.25–5.12 (m, 2H), 4.56 (d, <i>J</i> = 4.3 Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 1.90–1.74 (m, 2H), 1.62 (s, 3H), 1.56–1.35 (m, 3H)
	<sup>13</sup> C NMR (101 MHz, Chloroform- <i>d</i> ) δ (ppm): 177.77, 167.98, 134.82, 128.69, 128.66, 69.99, 69.97, 67.38, 63.99, 62.82, 31.75, 27.02
	MS/MS: <i>m/z</i> = 91,1 <i>m/z</i> = 279,1
	FT-IR [cm <sup>-1</sup> ]: 3329, 3033, 2967, 2931, 1780, 1743, 1665, 1456, 1266, 1202, 1184, 1132, 967, 754
	CD: widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]
	Wydajność: 52%

<p>Ester benzyloowy penicyliny <b>10a</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H-NMR</b> (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.43–7.31 (m, 5H), 6.78 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 5.69 (dd, <i>J</i> = 8.8, 4.2 Hz, 1H), 5.55 (d, <i>J</i> = 4.3 Hz, 1H), 5.19 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 2H), 4.47 (s, 1H), 4.00 (dddd, <i>J</i> = 9.0, 7.6, 4.9, 2.7 Hz, 1H), 2.97 (s, 1H), 2.45 (dd, <i>J</i> = 15.4, 2.6 Hz, 1H), 2.34 (dd, <i>J</i> = 15.5, 9.1 Hz, 1H), 1.64–1.37 (m, 9H), 1.38–1.18 (m, 7H), 0.92–0.84 (m, 3H)</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (126 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 173.63, 171.68, 167.44, 134.63, 128.76, 128.71, 128.67, 70.44, 68.54, 68.02, 67.53, 64.90, 58.62, 42.63, 36.91, 31.82, 31.72, 29.12, 26.90, 25.40, 22.55, 14.05</p> <p><b>MS/MS:</b> <i>m/z</i> = 250,1</p> <p><b>FT-IR</b> [cm<sup>-1</sup>]: 3352, 3307, 2956, 2929, 2857, 1786, 1748, 1660, 1457, 1267, 1203, 1185, 1130, 967, 754</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 40%</p>
<p>Ester benzyloowy penicyliny <b>10b</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H-NMR</b> (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.43–7.31 (m, 5H), 6.77 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 5.69 (ddd, <i>J</i> = 8.8, 6.1, 4.2 Hz, 1H), 5.55 (dd, <i>J</i> = 4.2, 2.1 Hz, 1H), 5.19 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, 2H), 4.46 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H), 4.04–3.95 (m, 1H), 2.99 (s, 1H), 2.44 (dt, <i>J</i> = 15.5, 3.0 Hz, 1H), 2.35 (ddd, <i>J</i> = 15.4, 11.2, 8.9 Hz, 1H), 1.62 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 3H), 1.59–1.35 (m, 6H), 1.38–1.21 (m, 7H), 0.91–0.84 (m, 3H)</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (126 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 173.63, 171.66, 167.45, 134.64, 128.76, 128.71, 128.68, 70.44, 68.55, 68.02, 67.53, 64.91, 58.62, 42.64, 36.91, 31.82, 31.72, 29.12, 26.90, 25.38, 22.56, 14.05</p> <p><b>MS/MS:</b> <i>m/z</i> = 250,1</p> <p><b>FT-IR</b> [cm<sup>-1</sup>]: 3351, 3035, 2965, 2929, 2857, 1786, 1748, 1659, 1457, 1267, 1203, 1184, 1130, 965, 753</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 49%</p>
<p>Ester benzyloowy penicyliny <b>11a</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz, Chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 7.42–7.31 (m, 5H), 6.73 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 5.69 (dd, <i>J</i> = 8.8, 4.2 Hz, 1H), 5.55 (d, <i>J</i> = 4.2 Hz, 1H), 5.19 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 2H), 4.47 (s, 1H), 4.00 (dddd, <i>J</i> = 9.0, 7.7, 5.0, 2.6 Hz, 1H), 2.69 (s, 1H), 2.45 (dd, <i>J</i> = 15.4, 2.6 Hz, 1H), 2.34 (dd, <i>J</i> = 15.5, 9.1 Hz, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.58–1.38 (m, 6H), 1.38–1.28 (m, 3H), 0.94–0.86 (m, 3H).</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (126 MHz, chloroform-<i>d</i>) δ (ppm): 173.64, 171.66, 167.45, 134.64, 128.78, 128.73, 128.69, 70.46, 68.55, 68.03, 67.55, 64.93, 58.62, 42.65, 36.60, 31.84, 27.60, 26.92, 22.55, 14.00</p> <p><b>MS/MS:</b> <i>m/z</i> = 91,1 <i>m/z</i> = 250,0</p> <p><b>FT-IR</b> [cm<sup>-1</sup>]: 3351, 3034, 2958, 2931, 2861, 1786, 1747, 1660, 1456, 1267, 1203, 1185, 1027, 965, 754</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 23%</p>

<p>Ester benzylový penicyliny <b>11b</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) <math>\delta</math> (ppm): 7.42–7.32 (m, 5H), 6.77 (dd, <math>J = 40.3, 8.9</math> Hz, 1H), 5.70 (ddd, <math>J = 8.8, 5.8, 4.2</math> Hz, 1H), 5.55 (dd, <math>J = 4.2, 2.1</math> Hz, 1H), 5.19 (d, <math>J = 1.4</math> Hz, 2H), 4.47 (d, <math>J = 2.3</math> Hz, 1H), 4.00 (dddd, <math>J = 8.9, 7.8, 4.9, 2.7</math> Hz, 1H), 3.22–2.50 (s, 1H), 2.45 (dt, <math>J = 15.5, 3.0</math> Hz, 1H), 2.35 (ddd, <math>J = 15.4, 11.8, 8.9</math> Hz, 1H), 1.62 (d, <math>J = 0.9</math> Hz, 3H), 1.58–1.43 (m, 2H), 1.42 (s, 3H), 1.38–1.22 (m, 4H), 0.95–0.87 (m, 3H)</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (126 MHz, chloroform-<i>d</i>) <math>\delta</math> (ppm): 173.75, 171.65, 167.47, 134.64, 128.77, 128.72, 128.68, 70.46, 68.54, 68.02, 67.54, 64.93, 58.50, 42.64, 36.59, 31.73, 27.59, 26.94, 22.54, 13.99</p> <p><b>MS/MS:</b> <math>m/z = 91,1</math> <math>m/z = 250,0</math></p> <p><b>FT-IR</b> [<math>\text{cm}^{-1}</math>]: 3299, 3034, 2958, 2930, 2860, 1786, 1747, 1660, 1457, 1267, 1203, 1185, 1028, 965, 754</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 25%</p>
<p>Ester benzylový penicyliny <b>12a</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H-NMR</b> (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) <math>\delta</math> (ppm): 7.41–7.33 (m, 5H), 7.30–7.24 (m, 2H), 7.21–7.14 (m, 3H), 6.68 (d, <math>J = 8.7</math> Hz, 1H), 5.66 (dd, <math>J = 8.8, 4.2</math> Hz, 1H), 5.54 (d, <math>J = 4.2</math> Hz, 1H), 5.19 (d, <math>J = 1.3</math> Hz, 2H), 4.46 (s, 1H), 4.03 (tdd, <math>J = 8.6, 4.4, 2.8</math> Hz, 1H), 2.95 (s, 2H), 2.79 (ddd, <math>J = 13.9, 9.6, 5.6</math> Hz, 1H), 2.69 (ddd, <math>J = 13.8, 9.4, 6.7</math> Hz, 1H), 2.48–2.31 (m, 2H), 1.85 (dddd, <math>J = 13.9, 9.5, 8.3, 5.6</math> Hz, 1H), 1.76 (dddd, <math>J = 13.9, 9.7, 6.8, 4.4</math> Hz, 1H), 1.60 (s, 3H), 1.41 (s, 3H)</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (126 MHz, chloroform-<i>d</i>) <math>\delta</math> (ppm): 173.49, 171.54, 167.41, 141.46, 134.61, 128.77, 128.71, 128.67, 128.45, 128.40, 125.96, 70.42, 67.97, 67.79, 67.54, 64.94, 58.61, 42.60, 38.37, 31.85, 31.75, 26.89</p> <p><b>MS/MS:</b> <math>m/z = 91,0</math> <math>m/z = 250,0</math></p> <p><b>FT-IR</b> [<math>\text{cm}^{-1}</math>]: 3305, 3029, 2966, 2931, 1785, 1746, 1660, 1455, 1267, 1203, 1185, 1028, 966, 752</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 59%</p>
<p>Ester benzylový penicyliny <b>12b</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H-NMR</b> (500 MHz, chloroform-<i>d</i>) <math>\delta</math> (ppm): 7.39 (t, <math>J = 1.9</math> Hz, 5H), 7.34–7.16 (m, 5H), 6.65 (d, <math>J = 8.8</math> Hz, 1H), 5.70 (dd, <math>J = 8.8, 4.2</math> Hz, 1H), 5.57 (d, <math>J = 4.2</math> Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 4.49 (s, 1H), 4.06 (tdd, <math>J = 8.2, 4.4, 2.9</math> Hz, 1H), 2.88–2.66 (m, 2H), 2.48 (dd, <math>J = 15.5, 2.9</math> Hz, 1H), 2.39 (dd, <math>J = 15.5, 8.7</math> Hz, 1H), 1.96–1.72 (m, 2H), 1.63 (s, 3H), 1.44 (s, 3H).</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (126 MHz, chloroform-<i>d</i>) <math>\delta</math> (ppm): 173.49, 171.53, 167.43, 141.48, 134.65, 128.80, 128.74, 128.70, 128.49, 128.43, 126.00, 70.46, 68.00, 67.83, 67.57, 64.99, 58.64, 42.65, 38.38, 31.90, 31.78, 26.92.</p> <p><b>MS/MS:</b> <math>m/z = 91,0</math> <math>m/z = 250,0</math></p> <p><b>FT-IR</b> [<math>\text{cm}^{-1}</math>]: 3327, 3029, 2964, 2930, 1785, 1748, 1661, 1455, 1267, 1203, 1185, 1029, 964, 752</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 61%</p>

<p>Sól sodowa penicyliny <b>13a</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H-NMR</b> (500 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 5.57 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 5.51 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 4.25 (s, 1H), 4.02 (tt, <i>J</i> = 7.3, 5.5 Hz, 1H), 2.58–2.41 (m, 2H), 1.64 (s, 3H), 1.59–1.45 (m, 5H), 1.44–1.22 (m, 8H), 0.91–0.83 (m, 3H)</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (126 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 174.57, 174.12, 173.79, 72.76, 68.27, 66.14, 63.97, 57.48, 42.42, 35.52, 30.57, 30.09, 27.89, 26.02, 24.27, 21.57, 13.01</p> <p><b>MS/MS:</b> <i>m/z</i> = 373.2</p> <p><b>FT-IR</b> [cm<sup>-1</sup>]: 3351, 2958, 2930, 2858, 1771, 1657, 1462, 1127</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 82%</p>
<p>Sól sodowa penicyliny <b>13b</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 5.49 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 5.40 (dt, <i>J</i> = 11.7, 3.8 Hz, 1H), 4.16 (s, 1H), 3.94 (h, <i>J</i> = 6.5 Hz, 1H), 2.48–2.34 (m, 2H), 1.56 (dd, <i>J</i> = 6.2, 1.3 Hz, 3H), 1.44 (s, 4H), 1.29–1.15 (m, 8H), 0.90 (dt, <i>J</i> = 12.1, 4.2 Hz, 1H), 0.82–0.74 (m, 3H)</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (126 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 174.75, 174.52, 174.13, 73.15, 68.66, 66.62, 64.35, 57.97, 42.80, 35.87, 30.45, 30.42, 28.25, 26.40, 24.43, 21.94, 13.38</p> <p><b>MS/MS:</b> <i>m/z</i> = 373.2</p> <p><b>FT-IR</b> [cm<sup>-1</sup>]: 3372, 2959, 2930, 2858, 1769, 1655, 1461, 1198, 1127</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 87%</p>
<p>Sól sodowa penicyliny <b>14a</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H-NMR</b> (500 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 5.57 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 5.51 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 4.25 (s, 1H), 4.02 (tt, <i>J</i> = 7.7, 5.2 Hz, 1H), 2.56–2.44 (m, 2H), 1.64 (s, 3H), 1.59–1.45 (m, 5H), 1.45–1.21 (m, 5H), 0.92–0.84 (m, 3H)</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (126 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 174.63, 174.14, 173.86, 72.75, 68.23, 66.12, 63.95, 57.45, 42.41, 35.25, 30.04, 26.57, 26.01, 21.47, 12.86</p> <p><b>MS/MS:</b> <i>m/z</i> = 345.2</p> <p><b>FT-IR</b> [cm<sup>-1</sup>]: 3413, 2960, 2932, 2872, 1769, 1655, 1460, 1196, 1127</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 85%</p>
<p>Sól sodowa penicyliny <b>14b</b></p> 	<p><b><sup>1</sup>H-NMR</b> (400 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 5.48 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 5.41 (dd, <i>J</i> = 11.3, 4.0 Hz, 1H), 4.16 (s, 1H), 3.94 (ddt, <i>J</i> = 13.0, 7.4, 5.6 Hz, 1H), 2.51–2.31 (m, 2H), 1.54 (s, 3H), 1.43 (s, 5H), 1.27–1.19 (m, 5H), 0.84–0.74 (m, 3H)</p> <p><b><sup>13</sup>C-NMR</b> (101 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 174.81, 174.52, 174.17, 73.15, 68.63, 66.60, 64.41, 57.85, 42.78, 35.64, 30.41, 26.82, 26.40, 21.86, 13.25</p> <p><b>MS/MS:</b> <i>m/z</i> = 345.2</p> <p><b>FT-IR</b> [cm<sup>-1</sup>]: 3418, 2959, 2932, 2872, 1769, 1652, 1460, 1127</p> <p><b>CD:</b> widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p><b>Wydajność:</b> 79%</p>

<p>Sól sodowa penicyliny <b>15a</b></p> 	<p><sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 7.41–7.23 (m, 5H), 5.55 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 5.47 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.01 (dtd, <i>J</i> = 7.9, 6.5, 4.8 Hz, 1H), 2.79 (ddd, <i>J</i> = 14.8, 9.4, 5.9 Hz, 1H), 2.68 (ddd, <i>J</i> = 13.8, 9.5, 6.9 Hz, 1H), 2.58–2.47 (m, 2H), 1.90–1.74 (m, 2H), 1.64–1.48 (m, 6H)</p> <p><sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 174.48, 174.11, 173.51, 141.69, 128.29, 128.15, 125.70, 72.74, 67.54, 66.13, 63.96, 57.52, 42.43, 37.42, 30.70, 30.08, 26.00</p> <p>MS/MS: <i>m/z</i> = 393.2</p> <p>FT-IR [cm<sup>-1</sup>]: 3406, 3026, 2965, 2930, 2868, 1768, 1654, 1455, 1127, 748</p> <p>CD: widmo w wartościach dodatnich CD [mdeg]</p> <p>Wydajność: 66%</p>
<p>Sól sodowa penicyliny <b>15b</b></p> 	<p><sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 7.34–7.14 (m, 6H), 5.47 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 5.39 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 4.15 (s, 1H), 3.99–3.88 (m, 1H), 2.77–2.54 (m, 3H), 2.45 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 1.83–1.67 (m, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.42 (s, 3H)</p> <p><sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm): 174.87, 174.50, 173.93, 142.11, 128.68, 128.53, 126.08, 73.13, 67.93, 66.51, 64.34, 57.91, 42.84, 37.80, 31.07, 30.44, 26.38.</p> <p>MS/MS: <i>m/z</i> = 393.2</p> <p>FT-IR [cm<sup>-1</sup>]: 3398, 3026, 2965, 2930, 2867, 1769, 1654, 1454, 1127, 749</p> <p>CD [mdeg]: widmo w wartościach dodatnich CD</p> <p>Wydajność: 72%</p>

W widmie <sup>1</sup>H-NMR estru benzyłowego kwasu 6-APA (**9**) stwierdzono obecność sygnałów pochodzących od pięciu protonów pierścienia aromatycznego w zakresie 7.29–7.42 ppm. Dublety przy 5.51 ppm oraz 4.56 ppm o stałej sprzężenia *J* = 4.3 Hz pochodzą od protonów przy atomie węgla C1 i C4 w pierścieniu β-laktamowym. Sygnał dwóch protonów grupy metylenowej (–CH<sub>2</sub>–) widoczny jest w zakresie 5.12–5.25 ppm, natomiast proton węgla C7 widoczny jest jako singlet przy 4.43 ppm. W zakresie alifatycznym widma widoczne są dwa trójprotonowe sygnały przy 1.62 ppm oraz 1.35–1.56 ppm odpowiadające sąsiadującym grupom metylowym. Sygnał w zakresie 1.90–1.74 ppm prawdopodobnie pochodzi od wody resztkowej występującej w analizowanej próbce. Podobnie jak w publikacji De Rosa et al<sup>151</sup> grupa aminowa związku **9** nie jest widoczna na widmie (wymiana na deuter).

Pochodna kwasu 6-APA (**9**) była substratem wyjściowym w syntezie estrów benzyłowych penicylin połączonych z 3-hydroksykwasami (**4a**, **4b**, **5a**, **5b**, **6a**, **6b**). W widmach <sup>1</sup>H-NMR pochodnych zmodyfikowanych alifatycznymi 3-hydroksykwasami (**10a**, **10b**, **11a**, **11b**) zaobserwowano sygnały pięciu protonów aromatycznych w zakresie 7.32–7.41 ppm, natomiast dla estrów modyfikowanych aromatycznymi 3-hydroksykwasami (**12a** i **12b**) zidentyfikowano sygnały aromatyczne w zakresie 7.13–7.42 ppm, dla których suma integracji wynosi 10H.

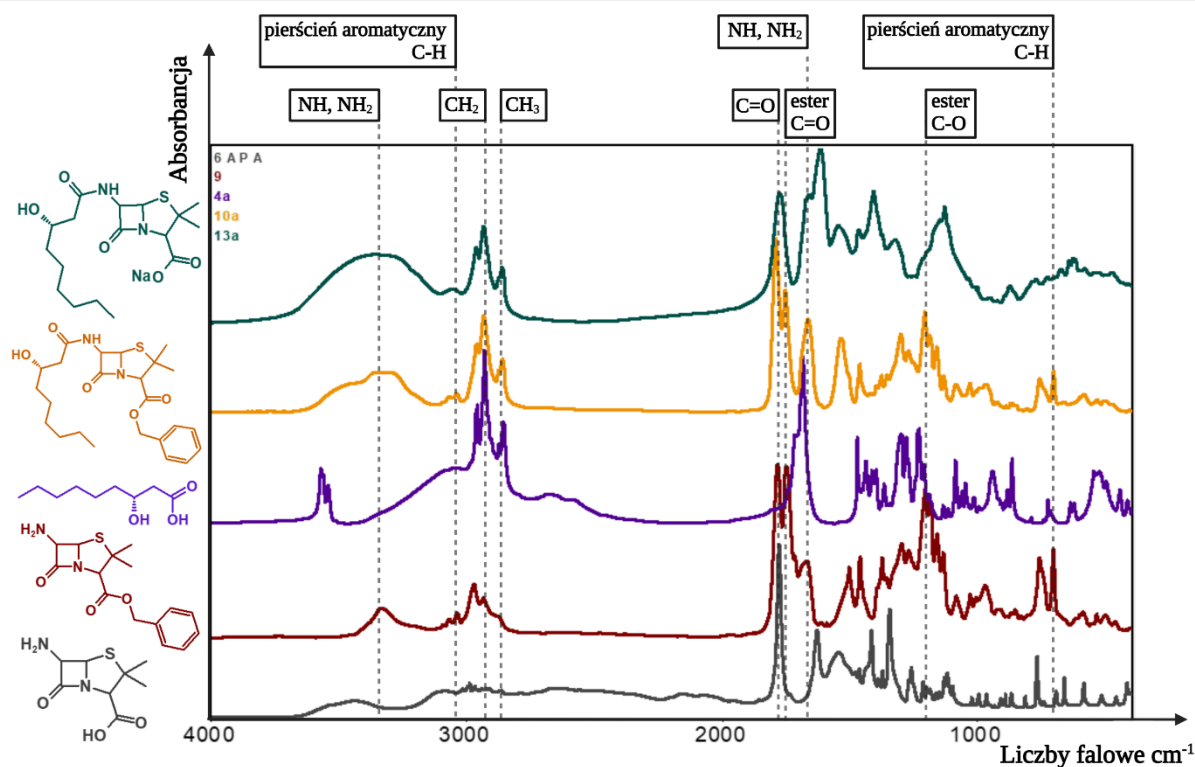
Ponadto, zidentyfikowano w nich sygnały analogiczne do tych występujących w widmie związku **9**, takie jak: dwa dublety w zakresie 5.54–5.57 ppm oraz 5.66–5.70 ppm odpowiadające atomom węgla C1 i C4, sygnał grupy metylenowej przy pierścieniu benzenu (5.19–5.22 ppm), singlet protonu przy węglu C7 (4.46–4.49 ppm) oraz dwa singlety grup metylowych (ok. 1.42 i 1.62 ppm). Obecność fragmentu 3-hydroksyalkilamidowego w strukturach związków **10a,b–12a,b** potwierdza sygnał odpowiadający protonowi grupy amidowej (6.65–6.78 ppm), multiplet od protonu przy trzeciorzędowym atomie węgla C17 (3.95–4.00 ppm) oraz sygnały protonów przy węglu C16 (2.34–2.79 ppm). Ponadto, integracja sygnałów widm w zakresie alifatycznym związków z fragmentem 3-hydroksyamidowym (**10a** i **10b**), zgodnie z oczekiwaniem, jest odpowiednio wyższa (o 4 protony) od ich odpowiedników z krótszym łańcuchem alkilowym (**11a** i **11b**).

Szerokie singlety zlokalizowane w rejonie 2.99 ppm pochodzą prawdopodobnie od grupy hydroksylowej. Niektóre z widm  $^1\text{H-NMR}$  wskazały również na obecność reszkowej ilości rozpuszczalników organicznych takich jak: aceton (2.17 ppm), octan etylu (4.12 ppm, 2.04 ppm oraz 1.26 ppm) lub DCM (5.30 ppm), które stanowiły środowisko reakcji dla związków lub były używane do ekstrakcji, oczyszczania produktów syntez lub ilościowego przenoszenia związków. Przesunięcia chemiczne sygnałów rozpuszczalników organicznych są tożsame z podanymi w publikacji Fulmer et al.<sup>165</sup> Sygnały pochodzące od rozpuszczalników nie zostały uwzględnione w **Tabeli 17**.

Dla wszystkich otrzymanych pochodnych 6-APA zmierzono również widma  $^{13}\text{C-NMR}$ . W widmach związków **9**, **10a**, **10b**, **11a**, **11b** zaobserwowano cztery sygnały w zakresie aromatycznym (128.67, 128.71, 128.76, 134.64 ppm), natomiast dla **12a** i **12b**, które posiadają dwa pierścienie benzenowe, cztery dodatkowe sygnały (125.96, 128.40, 128.45, 141.46 ppm). Ponadto, wykazano obecność sygnałów atomów węgla karbonylowych (167.44, 171.68, 173.63 ppm).

W finalnym etapie syntez, w wyniku odbezpieczenia grup karboksylowych estrów benzylowych zmodyfikowanych penicylin, otrzymano serię nowych pochodnych  $\beta$ -laktamowych **13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a** i **15b** w postaci soli sodowych. Widma  $^1\text{H-NMR}$  i  $^{13}\text{C-NMR}$  końcowych związków potwierdzają utratę aromatycznych sygnałów grupy benzylowej, tj., pięciu protonów w zakresie 7.51–7.25 ppm oraz sześciu węgli (cztery sygnały w zakresie aromatycznym). Ponadto, nie zaobserwowano również dwuprotonowego sygnału grupy metylenowej (ok. 5.2 ppm). Pomiar widm soli sodowych penicylin były wykonywane w ciężkiej wodzie ( $\text{D}_2\text{O}$ ), dlatego nie zaobserwowano sygnałów od labilnych protonów grup hydroksylowych oraz amidowych. Zastąpienie wodoru w grupach –OH oraz –NH deuterem

eliminuje jego rezonans z protonowego widma NMR.<sup>166</sup> Związek **15b** posiadał w widmie dodatkowy sygnał od protonu w pierścieniu aromatycznym i dodatkowy sygnał od protonów na węglu C17 i C20 (lub C21). Wynika to najprawdopodobniej z obecności w próbce zanieczyszczeń lub pozostałości rozpuszczalników organicznych. <sup>13</sup>C-NMR potwierdziło jednak, że w strukturze znajduje się właściwa ilość węgla, w tym pierścień aromatyczny oraz trzy grupy karbonylowe.



**Rysunek 27.** Widma FT-IR związków występujących w ścieżce syntezy penicyliny **13a**. Przerywaną linią zaznaczono pasma charakterystyczne dla grup funkcyjnych substratów oraz produktów, które pojawiają się/znikają na kolejnych etapach syntezy.

Wszystkie widma FT-IR zostały dołączone do suplementu na końcu pracy. W **Tabeli 17** zebrano główne pasma występujące w widmach poszczególnych związków. **Rysunek 27** przedstawia widma FT-IR związków występujących w ścieżce syntezy penicyliny **13a**, która rozpoczyna się od zabezpieczenia grupy karboksylowej kwasu 6-APA, poprzez wprowadzenie do cząsteczki grupy benzylowej. Pasma najbardziej charakterystyczne dla grupy karboksylowej występuje w zakresie  $1800\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  i pochodzi od drgań rozciągających  $\text{C}=\text{O}$ .<sup>167</sup> Swaminathan et al. którzy w swojej pracy skupili się na dokładnym opisie większości drgań obserwowanych w kwasie 6-APA, wskazują, że przy  $1774\text{ cm}^{-1}$ , znajduje się pasmo od drgań rozciągających grupy karbonylowej w pierścieniu  $\beta$ -laktamowym ( $\text{C}2=\text{O}8$ ).<sup>167</sup> Kwas 6-APA



posiada w swojej strukturze zarówno wolną grupę karboksylową, jak i karbonylową znajdującą się w pierścieniu  $\beta$ -laktamowym,. Widoczne na rysunku intensywne pasmo przy  $1785\text{ cm}^{-1}$ , pochodzi od drgań rozciągających  $\text{C}=\text{O}$  obu tych grup. Otrzymany w kolejnym etapie syntezy ester benzylový kwasu 6-APA (**9**) ma w tym obszarze dwa charakterystyczne pasma przy  $1780\text{ cm}^{-1}$  oraz  $1743\text{ cm}^{-1}$ : jedno pochodzące od drgań  $\text{C}=\text{O}$  grupy karbonylowej w pierścieniu oraz drugie charakterystyczne dla wiązania estrowego. Pasma charakterystyczne dla estrów występują bowiem w obszarze  $1750\text{--}1735\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające drganiom rozciągającym pomiędzy  $\text{C}=\text{O}$ . Dodatkowo w rejonie  $1200\text{ cm}^{-1}$  obserwuje się również drgania rozciągające wiązania estrowego  $\text{C}-\text{O}$ .<sup>167</sup> Wszystkie estry benzylové, które zostały poddane analizie, posiadają w swoich widmach pasma od omawianych drgań ( $1743\text{ cm}^{-1}$  oraz  $1202\text{ cm}^{-1}$ ). Dodatkowo zaobserwowano, że sygnały te zanikają w widmach pochodzących od soli sodowych penicylin, co widoczne jest również na rysunku powyżej w przypadku pasm dla związku **13a**.

Według Swaminathan et al. pasmo w zakresie  $1460\text{ cm}^{-1}$  odpowiada drganiom deformacyjnym (nożycowym)  $\text{C}-\text{H}$  w grupach metylowych w pierścieniu tiazolidynowym,<sup>167</sup> a drgania rozciągające widoczne są przy  $2932\text{ cm}^{-1}$ . We wszystkich analizowanych widmach FT-IR w tym rozdziale zidentyfikowano pasma ( $1455\text{ cm}^{-1}$  oraz  $2931\text{ cm}^{-1}$ ), które mogą odpowiadać wymienionym drganiom. Ponadto autorzy wskazują również inne charakterystyczne drgania występujące w cząsteczce kwasu 6-APA przy:  $2962\text{ cm}^{-1}$  (drgania rozciągające wiązania  $\text{C}-\text{H}$ ),  $1256\text{ cm}^{-1}$  (drgania zginające  $\text{N}-\text{C}-\text{H}$ ),  $1184\text{ cm}^{-1}$  (drgania rozciągające  $\text{C}-\text{C}$  oraz zginające  $\text{C}-\text{H}$ ),  $1127\text{ cm}^{-1}$  (drgania rozciągające  $\text{C}-\text{C}-\text{C}$ ) oraz  $962\text{ cm}^{-1}$  (asymetryczne, rozciągające  $\text{C}-\text{C}-\text{N}$ )<sup>167</sup>. Takie same lub zbliżone liczby falowe zostały również zaobserwowane w analizowanych widmach, a mianowicie:  $2967\text{ cm}^{-1}$ ,  $1266\text{ cm}^{-1}$ ,  $1184\text{ cm}^{-1}$ ,  $1132\text{ cm}^{-1}$  oraz  $967\text{ cm}^{-1}$ .

Pasma, które odpowiadają drganiom rozciągającym w pierścieniach aromatycznych ( $\text{C}-\text{H}$ ) są zlokalizowane zazwyczaj poniżej  $3000\text{ cm}^{-1}$ , ale niekiedy mogą być zasłonięte przez intensywniejsze pasma innych grup funkcyjnych. W przypadku analizowanych widm dla związków zawierających pierścień aromatyczny, czyli wszystkich z wyjątkiem penicylin **13a**, **13b**, **14a** oraz **14b**, zaobserwowano pasmo występujące przy  $3030\text{ cm}^{-1}$ , które odpowiadało drganiom rozciągającym  $\text{C}-\text{H}$  w pierścieniu. W przypadku widm soli sodowych penicylin z alifatyczną grupą boczną, nie stwierdzono obecności podobnego sygnału. Dodatkowo widmo kwasu 6-aminopenicylanowego, również nie posiadało w tym zakresie żadnego pasma. Egbele et al.<sup>168</sup> analizując w swojej pracy widmo pochodzące od penicyliny G opisali pasma występujące przy  $3030\text{ cm}^{-1}$  oraz  $775\text{ cm}^{-1}$ , jako pochodzące od pierścienia aromatycznego.

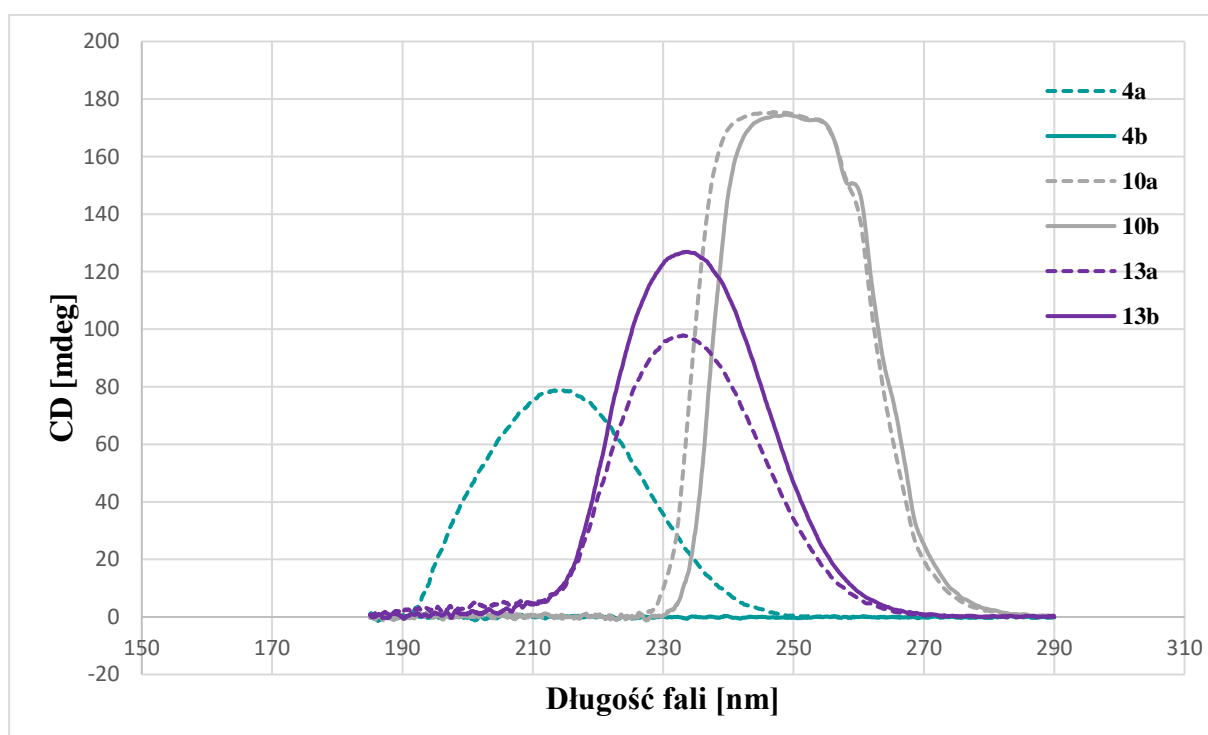


W widmach otrzymanych w tej pracy produktów pasmo przy liczbie falowej  $750\text{ cm}^{-1}$  jest obecne we wszystkich związkach posiadających pierścień aromatyczny, natomiast nie stwierdzono jego obecności w widmach penicylin **13a**, **13b**, **14a** oraz **14b**.

Szerokie pasma występujące w zakresie  $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  pochodzą często od drgań rozciągających amin drugorzędowych N-H<sup>169</sup>, co jest również widoczne na przedstawionym **Rysunku 27**. Wiązanie amidowe powstałe pomiędzy 3-hydroksykwasami, a estrem benzylovym kwasu 6-APA spowodowało pojawienie się szerokiego pasma przy  $3398\text{ cm}^{-1}$ . Związek **9** również posiada w tym obszarze pasmo odpowiadające drganiom aminy pierwszorzędowej przy węglu C1. Drgania deformacyjne charakterystyczne dla amin występują w obszarze  $1500\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ . Swaminathan et al. wskazują na występowanie przy  $1624\text{ cm}^{-1}$  pasma drgań deformacyjnych (nożycowych) grupy N9-H na węglu C1.<sup>167</sup> W analizowanych próbkach przy  $1654\text{ cm}^{-1}$  widoczne jest pasmo, które może odpowiadać tym drganiom, lecz jest ono przesłaniane przez intensywniejszy sygnał od drgań grupy karbonylowej.

Wszystkie otrzymane penicyliny oraz ich estry benzylove zostały poddane analizie dichroizmu kołowego, w celu określenia ich konfiguracji absolutnej. Poszczególne widma dla każdego ze związków zostały umieszczone w **Suplemencie** na końcu pracy. Wszystkie otrzymane widma CD posiadały silniejszą absorbcję składowej lewoskrętnej, co przejawiało się dodatnim efektem Cottona, niezależnie od rodzaju 3-hydroksykwasu (enancjomer *R* czy mieszanina racemiczna) wprowadzonego do cząsteczki 6-APA. Określanie konfiguracji absolutnej z użyciem spektroskopii dichroizmu kołowego można przeprowadzić poprzez porównanie krzywych analogicznych związków lub też poprzez zastosowanie odpowiedniej reguły empirycznej korelującej znak efektu Cottona z konfiguracją absolutną cząsteczki. Na podstawie danych literaturowych, oceniono, że widma CD dla penicyliny G oraz penicyliny V mają tożsame właściwości,<sup>170,171</sup> tzn. identycznie jak otrzymane w tej pracy nowe penicyliny wykazują dodatni efekt Cottona w widmie CD. Za przebieg widma odpowiada konfiguracja absolutna pierścienia  $\beta$ -laktamowego, a dokładnie obecność dwóch centrów asymetrii: jedno przy węglu C1, który łączy wiązaniem amidowym monomer PHA z cząsteczką 6-APA oraz drugie przy węglu C4, będącym wspólnym węglem dla obu pierścieni w penicylinie. Oba atomy węgla występują w konfiguracji absolutnej *R*, a wodory położone przy tych węglach są ułożone w pozycji *cis*.<sup>172</sup> Ponadto według danych literaturowych widma homologów penicylin są takie same i ich rozróżnienie nie jest możliwe,<sup>171,173</sup> co zostało również potwierdzenie w otrzymanych w tej pracy wynikach. Widma wszystkich sześciu otrzymanych penicylin (**13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a** oraz **15b**) charakteryzują się występowaniem maksimum widma CD dla

długości fali 233 nm (**Rysunek 28**), podobnie jak inne antybiotyki tej grupy.<sup>170,171</sup> Na **Rysunku 28** przedstawiono widma CD: dwóch modyfikatorów (**4a**, **4b**) zabezpieczonej cząsteczki 6-APA (**9**), a także estrów benzylowych kwasów 6-APA (**10a**, **10b**) oraz penicylin (**13a**, **13b**) z dołączonymi 3-hydroksykwasami **4a** oraz **4b**. Widma CD kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego oraz jego odpowiednika będącego mieszaniną racemiczną, zostały opisane w **podrozdziale 3.1.9.5**. Położenie maksimum widma dla estrów benzylowych penicylin (**10a** oraz **10b**) przesunięte jest w stronę zakresu promieniowania bliskiego UV, charakterystycznego dla związków, które posiadają w swojej strukturze grupę aromatyczną. Dodatkowo zaobserwowano dla związków tej grupy, lekkie przesunięcie widma CD w prawo dla estrów benzylowych kwasu 6-APA z dołączoną cząsteczką będącą mieszaniną *R/S*-3-hydroksykwasów (**10b**, **11b**, **12b**), w stosunku do estrów zmodyfikowanych kwasami czystymi chiralnie. Różnice w poziomie eliptyczności widm CD dla poszczególnych próbek mogą wynikać m.in. z różnego stężenia badanych próbek, które było wynikiem ograniczonej ilości posiadanych produktów syntez oraz w przypadku estrów benzylowych, dużymi trudnościami odważania lepkich i gęstych substancji. Z tego powodu nie porównywano otrzymanych widm CD pod względem intensywności.



**Rysunek 28.** Porównanie widm CD kwasów (*R*)-3-hydroksynonanowego i *rac*-3-hydroksynonanowego oraz estrów penicylin oraz penicylin zmodyfikowanych przez te kwasy. Linią przerywaną zaznaczono enancjomer *R* monomeru PHA (**4a**), ester benzylowy penicyliny zmodyfikowanej kwasem 4a (**10a**) oraz sól sodową powstałą przez odbezpieczenie estru 10a (**13a**). Linią ciągłą oznaczono mieszaninę racemiczną *rac*-3-hydroksynonanianu (**4b**), ester benzylowy penicyliny zmodyfikowanej przez 4b oraz produkt końcowy **13b**.

### 3.2.9. Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych reakcji chemicznych z odczynnikiem kondensującym T3P otrzymano z sukcesem wszystkie przewidziane w badaniach nowe pochodne 6-APA w postaci estrów benzytowych (**10a**, **10b**, **11a**, **11b**, **12a** oraz **12b**). Estry zmodyfikowanych pochodnych 6-APA zostały również poprawnie odbezpieczone, a ich sole sodowe (**13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a**, **15b**) zostały wykorzystane do oceny potencjału przeciwbakteryjnego nowych związków  $\beta$ -laktamowych. Wszystkie produkty zostały zweryfikowane przez szereg analiz, które jednoznacznie potwierdziły ich struktury.

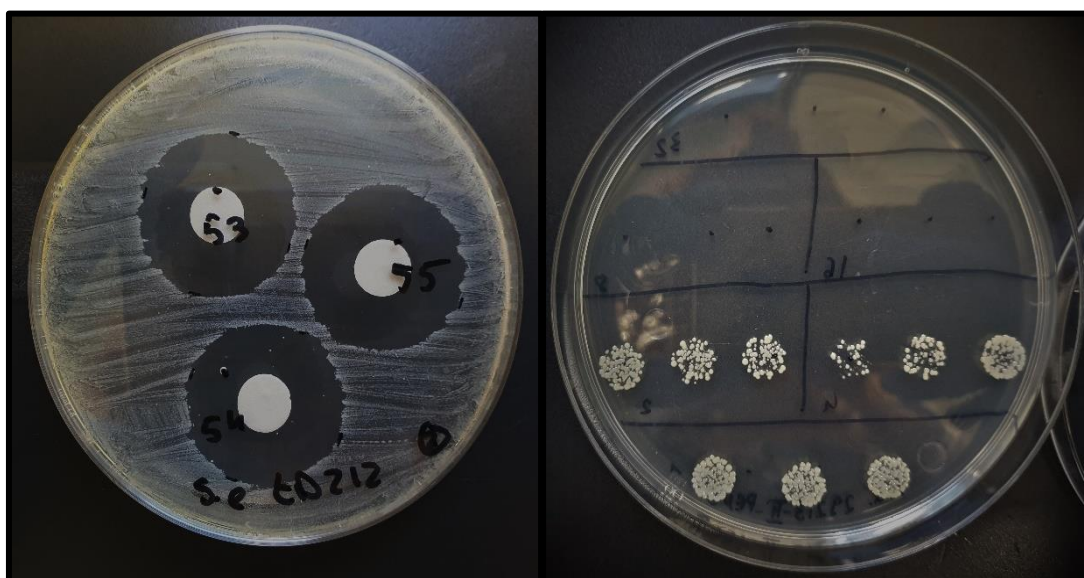
Dodatkowo opracowano oraz zoptymalizowano otrzymywanie nowych pochodnych 6-APA na drodze biosyntezy enzymatycznej. Lipazą, która najwydajniej przeprowadzała aminolizę względem wybranych estrów metylowych 3-hydroksykwasów (**1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**), była lipaza TL-IM pochodząca z *Thermomyces lanuginosus*. Najlepszymi warunkami ustalonymi dla biosyntezy produktów z udziałem tego enzymu było zastosowanie jako środowiska reakcji bezwodnego toluenu oraz prowadzenie aminolizy w temperaturze 15°C. Drogą aminolizy katalizowanej przez lipazę TL-IM otrzymano wszystkie przewidziane pochodne 6-APA w formie estrów benzytowych (**10a**, **10b**, **11a**, **11b**, **12a**, **12b**).

### 3.3. Ocena aktywności biologicznych otrzymanych penicylin

#### 3.3.1. Wstęp

Otrzymane nowe pochodne 6-APA (**13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a**, **15b**) poddano testom oceniającym ich aktywność przeciwbakteryjną, wyznaczającym spektrum ich działania względem różnego rodzaju bakterii (zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych), a także sprawdzającym ich bezpieczeństwo stosowania w przyszłości jako potencjalnych antybiotyków. W pierwszym etapie badań wyznaczono spektrum działania antybiotyków przeprowadzając test dyfuzyjno-krażkowy określający działanie nowych związków  $\beta$ -laktamowych względem dwudziestu różnych szczepów bakteryjnych. Wybrane bakterie obejmowały kontrolne szczepy wzorcowe z kolekcji kultur typu ACCT (ang. American Type Culture Collection, USA) oraz NCTC (ang. National Collection of Type Cultures, UK), a także szczepy kliniczne wyizolowane z różnego rodzaju preparatów szpitalnych (kolekcja Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Polska). Szczepy względem, których określana była aktywność przeciwbakteryjna charakteryzował różny stopień wrażliwości na testowane związki. Minimalne stężenie hamujące (MIC) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) było wyznaczane tylko w przypadku, gdy badany związek wykazał w badaniach przesiewowych aktywność inhibicyjną.

Otrzymane pochodne 6-APA zostały poddane również badaniom, które oceniały ich potencjał aplikacyjny. W tym celu sprawdzono wpływ nowych związków na materiał



**Rysunek 29.** Przykładowy wynik testu dyfuzyjno – krażkowego dla *Staphylococcus epidermidis* ŁDZ12 i trzech pochodnych 6-APA (zdjęcie po prawej) oraz rezultat badanie minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) dla jednego ze związków.

genetyczny komórek bakteryjnych w teście „rec”, a dodatkowo ich cytotoksyczność względem komórek eukariotycznych przeprowadzając badanie żywotności linii fibroblastów MEF 3T3 po ekspozycji na badane związki. Oznaczanie żywotności komórek jest często stosowaną metodą w przemyśle farmaceutycznym, ponieważ jej wynik obejmuje wiele różnych czynników stresowych wywołanych przez badany związek, którego działanie jest toksyczne dla komórek.

### **3.3.2. Ocena potencjału przeciwbakteryjnego nowych pochodnych 6-APA**

#### **3.3.2.1. Wyznaczenie spektrum działania związków na podstawie testu dyfuzyjno-krażkowego.**

Krażki bibułowe o średnicy 9 mm wysycono 10  $\mu\text{L}$  badanych związków rozpuszczonych w DMSO o stężeniu 30  $\text{mg mL}^{-1}$ , uzyskując 300  $\mu\text{g}$  związku na każdym krażku. Jako kontrole negatywne wybrano wszystkie substraty wykorzystane do reakcji chemicznych oraz enzymatycznych, nie mających potencjału przeciwbakteryjnego (**Tabela 10**), a także DMSO i wodę. Kontrolą pozytywną były dwa komercyjnie dostępne antybiotyki: ampicylina (300  $\mu\text{g}$ ) oraz penicylina G (300  $\mu\text{g}$ ) przygotowane w analogiczny sposób.

Do wyznaczenia spektrum działania antybiotyków wybrano szczepy wzorcowe Gram-ujemne i Gram-dodatnie oraz szczepy kliniczne o różnych cechach wrażliwości na antybiotyki (**Tabela 18**). Wybrane szczepy zawieszono w jałowej soli fizjologicznej do gęstości 0,5 w skali McFarlanda, a następnie wysiano murawkowo na szalce z pożywką Mueller-Hinton (BD Muller Hinton II Agar). Na przygotowane szalki nałożone krażki bibułowe nasączone testowanymi związkami, które inkubowano w 35°C przez 18 h, zgodnie z wytycznymi Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST).<sup>174</sup> Strefy zahamowania wzrostu stanowiły obszar niewykazujący wzrostu bakterii, odczytywane na ciemnym tle, podawane jako średnica w mm. Każdy badany związek był testowany w dwóch powtórzeniach.

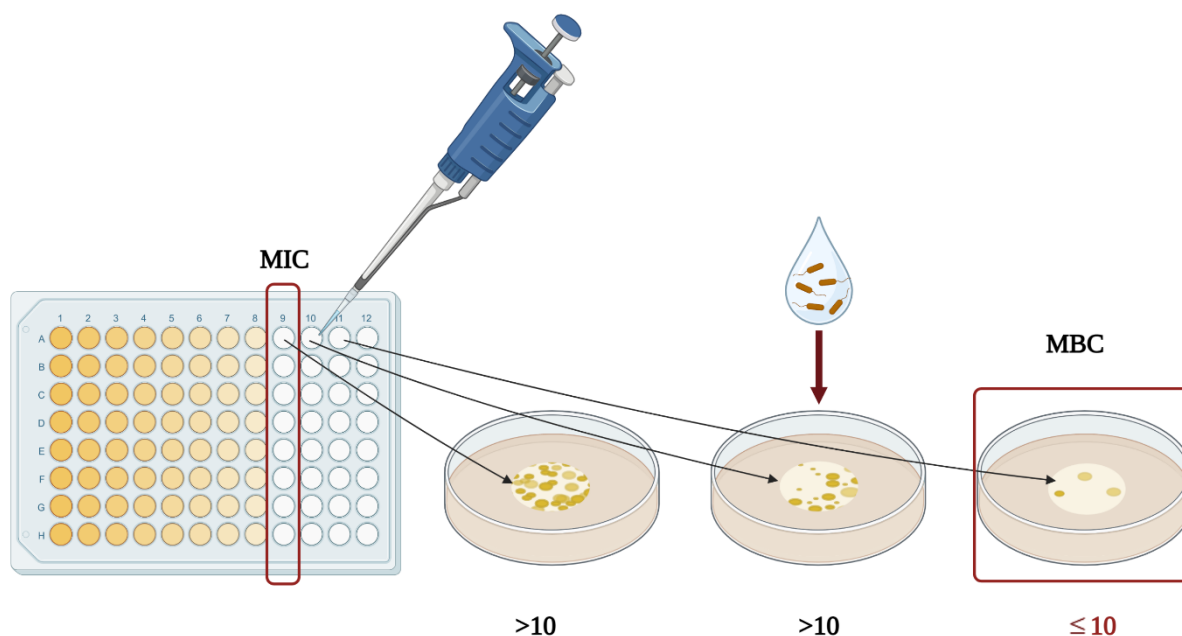
**Tabela 18. Szczepy bakteryjne wykorzystane do wyznaczenia potencjału przeciwbakteryjnego nowych pochodnych 6-APA**

<b>Szczep</b>	<b>Typ bakterii</b>	<b>Informacje</b>	<b>Rodzaj oporności</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Gram-dodatnia	Kontrolny szczep wzorcowy EUCAST	Wrażliwy
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 4163	Gram-dodatnia	Kontrolny szczep wzorcowy	Enzymatyczna
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Gram-dodatnia	Kontrolny szczep wzorcowy EUCAST	Enzymatyczna
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 35984	Gram-dodatnia	Kontrolny szczep wzorcowy	Enzymatyczna i receptorowa
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ŁDZ 9	Gram-dodatnia	Szczep kliniczny, izolat z rany	Enzymatyczna i receptorowa
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ŁDZ 12	Gram-dodatnia	Szczep kliniczny, izolat z rany	Enzymatyczna
<i>Staphylococcus epidermidis</i> HEM KS	Gram-dodatnia	Szczep kliniczny, izolat z krwi	Receptorowa
<i>Staphylococcus aureus</i> 9611	Gram-dodatnia	Szczep kliniczny, izolat z krwi	Enzymatyczna
<i>Staphylococcus aureus</i> 203	Gram-dodatnia	Szczep kliniczny, izolat z krwi	Receptorowa
<i>Staphylococcus aureus</i> 155	Gram-dodatnia	Szczep kliniczny, aspirat z ropnia	Enzymatyczna, receptorowa
<i>Staphylococcus aureus</i> 176	Gram-dodatnia	Szczep kliniczny, aspirat z ropnia	Wrażliwy
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram-ujemna	Kontrolny szczep wzorcowy	wrażliwy
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram-ujemna	Kontrolny szczep wzorcowy	Chromosomalna cefalosporynaza AmpC
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Gram-ujemna	Kontrolny szczep wzorcowy	wrażliwy
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	Gram-ujemna	Kontrolny szczep wzorcowy	wrażliwy
<i>Proteus vulgaris</i> NCTC 4635	Gram-ujemna	Kontrolny szczep wzorcowy	wrażliwy
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	Gram-ujemna	Kontrolny szczep wzorcowy	wrażliwy
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Gram-ujemna	Kontrolny szczep wzorcowy	wrażliwy
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Gram-ujemna	Kontrolny szczep wzorcowy	SHV-18
<i>Salmonella enterica</i> CIP 108119	Gram-ujemna	Kontrolny szczep wzorcowy	wrażliwy

### 3.3.2.2. Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) dla pochodnych 6-APA

Minimalne stężenie hamujące testowanych antybiotyków zostało wyznaczone poprzez seryjne rozcieńczenia związków na płytce 96-dołkowej zgodnie z zaleceniami EUCAST.<sup>174</sup> Każda studzienka płytki zawierała 90  $\mu\text{L}$  płynnego bulionu Mueller Hinton (BBL Mueller Hinton II Broth) z określonym malejącym stężeniem antybiotyku oraz 10  $\mu\text{L}$  zawiesiny bakteryjnej (0,5 McFarland) (objętość końcowa 100  $\mu\text{L}$ ). Najwyższym testowanym stężeniem testowanych związków było 256  $\text{mg L}^{-1}$  seryjnie rozcieńczane o połowę do stężenia 0,125  $\text{mg L}^{-1}$ . W przypadku, gdy wynik testu nie wskazał najniższego stężenia hamującego, ponieważ wybrane stężenie było dla danego szczepu zbyt wysokie, przeprowadzano kolejną serię testów ze stężeniami z zakresu 32  $\text{mg L}^{-1}$  do 0,016  $\text{mg L}^{-1}$ . Każdy związek na płytce był testowany w podwójnym powtórzeniu. Analizy MIC były dodatkowo powtarzane co najmniej dwukrotnie.

Minimalne stężenie hamujące wszystkich badanych środków przeciwbakteryjnych zostało wyznaczone dla szczepów, które wykazały wrażliwość w teście dyfuzyjno-krążkowym. Płytki inkubowano w 35°C przez 18 h zgodnie z wytycznymi EUCAST.<sup>174</sup> MIC wyznaczono jako najniższe stężenie związku, przy którym nie zaobserwowano wzrostu bakterii.



**Rysunek 30.** Schemat metody minimalnego stężenia hamującego oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego przeprowadzanego przy ocenie potencjału przeciwbakteryjnego dla nowych  $\beta$ -laktamów.

Dla każdej zmodyfikowanej pochodnej 6-APA zostało również wyznaczone minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC), czyli takie, które zabija komórki testowanych bakterii. MBC

wyznaczane jest poprzez posiew kropli każdego rozcieńczenia zastosowanego w teście MIC, które wykazało działanie bakteriostatyczne względem bakterii. Na podłoże stałe Mueller Hinton wysiano 10  $\mu\text{L}$  hodowli z każdego dołka płytki (w 3-krotnym powtórzeniu), w której nie zaobserwowano wzrostu bakterii. Pobraną ze studzienki objętość hodowli pozostawiono na szalce Petriego z pożywką w formie nierozmytej kropli, którą inkubowano w 37°C przez 24 h. Minimalnym stężeniem bakteriobójczym dla badanych związków, było to w którym ilość kolonii bakteryjnych w kropli nie przekraczała 10 (**Rysunek 30**).

### 3.3.3. Ocena genotoksyczności przy wykorzystaniu analizy „rec” z *Bacillus subtilis*

Otrzymane pochodne 6-APA (**13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a**, **15b**) poddano analizie oceniającej ich działanie mutagenne i kancerogenne. W wybranej metodzie wykorzystano dwa genetycznie zmodyfikowane szczepy bakteryjne *B. subtilis*. Jeden z nich - *B. subtilis* M45 ( $\text{rec}^-$ ) - został pozbawiony mechanizmu naprawy DNA, w związku z czym wykazywał znacznie mniejszą tolerancję na działanie substancji genotoksycznych. Drugim zastosowanym szczepem był *B. subtilis* H17 ( $\text{rec}^+$ ), którego aparat naprawczy DNA działał prawidłowo.<sup>175,176</sup> Badane pochodne 6-APA rozpuszczono w DMSO otrzymując roztwór o stężeniu wyjściowym 25,6  $\text{mg mL}^{-1}$ , które odpowiada najwyższemu stężeniu zastosowanemu w teście MIC (wyższe stężenia antybiotyków, nie są zazwyczaj testowane z uwagi na ich małą użyteczność jako potencjalne leki). Następnie 10  $\mu\text{L}$  każdego z badanych roztworów przeniesiono na sterylne krążki bibułowe o średnicy 9 mm (Whatman No 3MM). Analogicznie przygotowano krążki wysycone komercyjnymi antybiotykami: ampicyliną oraz penicyliną G. Kontrolą negatywną w teście był krążek wysycony metanolem (10  $\mu\text{L}$ ), natomiast kontrolę pozytywną stanowił krążek z 2  $\mu\text{g}$  *N*-tleneku 4-nitrochinoliny (NOQ) o działaniu genotoksycznym. Przygotowane krążki przeniesiono na szalki Petriego z agarem odżywczym, na których uprzednio wysiano 100  $\mu\text{L}$  nocnej kultury szczepów *B. subtilis*. Szalki inkubowano w temperaturze 35°C przez 18 h, a następnie zmierzono średnicę powstałych stref zahamowania wzrostu dla obu szczepów.<sup>177</sup> Genotoksyczność została wyrażona jako różnica pomiędzy strefami hamowania wzrostu obu szczepów. Substancje, dla których strefa hamująca wzrost bakterii była większa dla szczepu M45 ( $\text{rec}^-$ ) niż dla H17 ( $\text{rec}^+$ ) uznano za potencjalnie mutagenne.<sup>177</sup>



### 3.3.4. Ocena cytotoksyczności zmodyfikowanych penicylin przy wykorzystaniu testu FDA/PI

W celu oceny nowych związków  $\beta$ -laktamowych pod kątem ich zastosowań aplikacyjnych w medycynie oceniono ich wpływ na żywe komórki. Wybraną modelową linią komórkową były mysie embrionalne fibroblasty MEF 3T3.<sup>178</sup> Zastosowaną metodą określającą cytotoksyczność związków względem komórek było oznaczenie ich żywotności poprzez podwójne barwienie diocetanem fluoresceiny oraz jodkiem propidyny (FDA/PI), różnicujące komórki żywe i martwe.

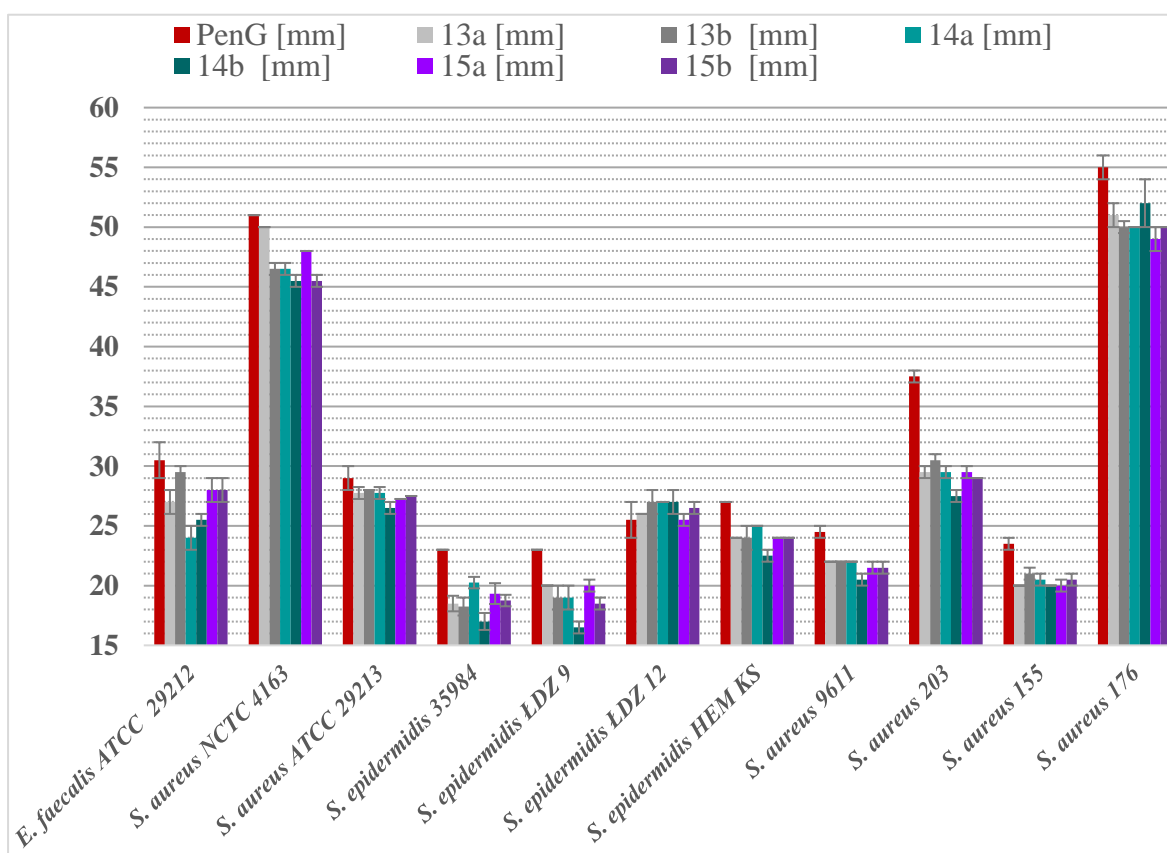
Komórki rozmrożono oraz kilkakrotnie pasażowano w pożywce DMEM (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium, Merck, Darmstadt, Germany) z dodatkiem 10% FBS (ang. Fetal Bovine Serum) oraz 1% antybiotyku (penicyliny oraz streptomycyny; Merck, Darmstadt, Germany) w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, przez 24 h. Do badań użyto komórki między 3, a 10 pasażem. Następnie przeprowadzono inkubację MEF 3T3 w analogicznych warunkach z dodatkiem związków: **13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a** oraz **15b** obecnych w pożywce w stężeniu 256  $\mu\text{g mL}^{-1}$  oraz 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Ampicylina oraz penicylina G zostały użyte jako związki referencyjne i porównane do nowych pochodnych 6-APA. Po okresie inkubacji płyn hodowlany usunięto, a komórki przepłukano buforem PBS. Komórki zalano 0,25% roztworem trypsyny (Merck, Darmstadt, Germany) w celu ich odklejenia od naczynia hodowlanego, zawieszono w pożywce DMEM i zwirowano przy obrotach 1000 RPM. Płyn hodowlany usunięto, a MEF 3T3 zawieszono w buforze PBS. Następnie do 1 mL zawiesiny komórkowej dodano FDA (10  $\mu\text{g}$ ) oraz PI (5  $\mu\text{g}$ ) i inkubowano 3 minutach w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Wybarwione komórki obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Zeiss Axio Observer Z1 z oprogramowaniem Zeiss ZEN Black version 8.1.0.484. Do wzbudzenia barwników fluorescencyjnych użyto laserów o długości fali 488 i 561 nm.<sup>179</sup> Otrzymane obrazy składały się ze 121 ujęć pochodzących z różnych miejsc wybarwionego preparatu. Wyniki analizowano w programie ImageJ. Żywe komórki zdolne do hydrolizy enzymatycznej diocetanu fluoresceiny oraz gromadzenia fluoresceiny w cytoplazmie charakteryzowały się intensywnie zieloną fluorescencją. Czerwoną fluorescencję obserwowano u komórek martwych, których błony komórkowe stały się przepuszczalne dla jodku propidyny, co doprowadziło do jego związania z jądrem komórkowym. Żywotność komórek wyznaczono poprzez zliczenie komórek żywych i martwych z 12 losowo wybranych ujęć oraz określenie udziału komórek żywych w stosunku do wszystkich zaobserwowanych w tych ujęciach.

### 3.3.5. Wyniki

#### 3.3.5.1. Testy dyfuzyjno-krażkowego

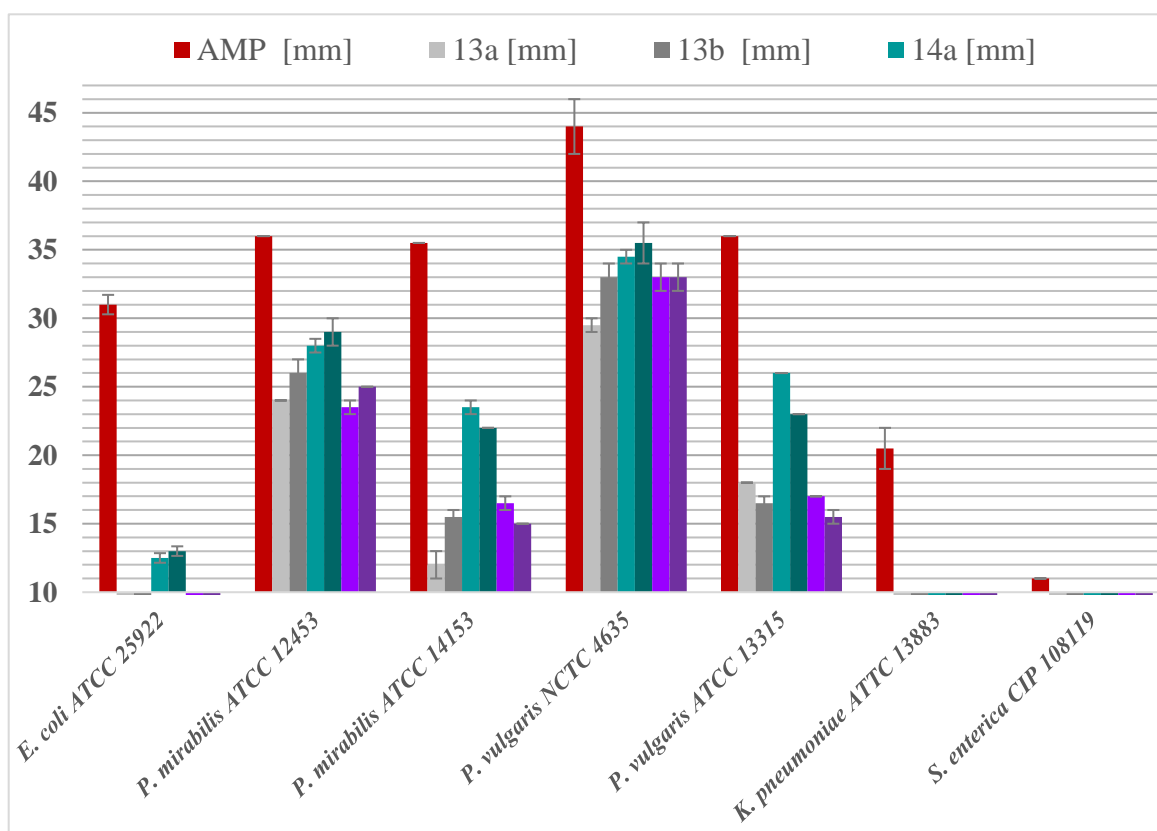
Test dyfuzyjno-krażkowy był pierwszym etapem wyznaczania aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanych produktów  $\beta$ -laktamowych. W zależności od typu bakterii, (Gram-dodatnia lub Gram-ujemna) antybiotykiem wzorcowym była odpowiednio: penicylina G lub ampicylina. Taki podział był podyktowany zalecaniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST).<sup>174</sup> Bakterie, które były wrażliwe na działanie pochodnych 6-APA (**13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a**, **15b**), czyli zahamowały wzrost bakterii wokół krążka wysyconego badanym związkiem, zostały poddane dalszym analizom, takim jak: wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC).

Wszystkie wybrane kontrole negatywne nie zahamowały w żadnym stopniu wzrostu wybranych szczepów. Wynik ten wskazuje na to, że poszczególne komponenty reakcji nie wykazywały aktywności przeciwbakteryjnych. Wyniki testu dyfuzyjno-krażkowego dla nowo otrzymanych penicylin przedstawiono na **Rysunku 31** (dla bakterii Gram-dodatnich) oraz **Rysunku 32** (dla bakterii Gram-ujemnych). Wszystkie badane związki wykazały działanie



**Rysunek 31.** Strefy zahamowania wzrostu wyznaczone dla bakterii Gram-dodatnich w teście dyfuzyjno-krażkowym. Średnica krążka – 9 mm.

bakteriobójcze względem testowanych bakterii Gram-dodatnim. Najbardziej wrażliwe na działanie nowych penicylin były dwa szczepy gronkowca złocistego: kontrolny szczep wzorcowy *S. aureus* NCTC 4163 oraz wrażliwy szczep kliniczny *S. aureus* 176. Dla pozostałych *S. aureus* strefy zahamowania wzrostu były mniejsze. Zastosowane stężenie związków, było najmniej skuteczne względem *S. epidermidis* 35984 oraz *S. epidermidis* ŁDZ9, u których stwierdzono oporność enzymatyczną oraz receptorową. Nowo otrzymane związki hamowały wzrost bakterii w podobny sposób co penicylina G, jednak w każdym przypadku ich działanie było nieco słabsze. Wyjątek stanowił kliniczny szczep *S. epidermidis* ŁDZ12, dla którego dwie pochodne 6-APA (**13b** oraz **14b**) miały większe strefy zahamowania wzrostu niż penicylina G.



**Rysunek 32.** Strefy zahamowania wzrostu wyznaczone dla bakterii Gram-ujemnych w teście dyfuzyjno-krążkowym. Średnica krążka – 9 mm

Nowe pochodne 6-APA wykazały znacznie gorsze działanie względem bakterii Gram-ujemnych w porównaniu z Gram-dodatnimi. Żaden z testowanych związków (łącznie z ampicyliną) nie zahamował wzrostu bakterii *P. aeruginosa* ATCC 27853 oraz *K. pneumoniae* ATCC 700603, u których stwierdzono oporność na większość antybiotyków  $\beta$ -laktamowych. Dodatkowo szczepy *K. pneumoniae* ATCC 700603 oraz *S. enterica* CIP 108119 nie wykazały wrażliwości względem żadnej z badanych pochodnej 6-APA. Szczepy te zostały uznane za

niewrażliwe wobec nowych penicylin i nie zostały uwzględniane przy wyznaczaniu MIC oraz MBC. Jediną grupą związków, które wykazały działanie hamujące wobec szczepu *E. coli* ATCC 25922 były penicyliny zmodyfikowane przez kwas 3-hydroksoheptanowy (**14a** oraz **14b**). Związki te hamowały w największym stopniu wszystkie bakterie z rodzaju *Proteus* spp. Najbardziej wrażliwe na badane związki były dwa szczepy: *P. mirabilis* ATCC 12453 oraz *P. vulgaris* NCTC 4635.

### 3.3.5.2. Minimalne stężenie hamujące oraz minimalne stężenie bakteriobójcze nowych pochodnych 6-APA

Dla bakterii wrażliwych na działanie nowych penicylin w teście dyfuzyjno-krażkowym wyznaczono minimalne stężenie hamujące ich wzrost, a także stężenie względem nich bakteriobójcze. W **Tabeli 19** przedstawiono rezultaty analizy MIC oraz MBC dla bakterii Gram-dodatnich. Ustalono MIC oraz MBC względem badanych bakterii dla wszystkich nowych pochodnych 6-APA. Wyjątek stanowiły MIC oraz MBC dla dwóch szczepów lekoopornych (*S.epidermidis* 36984 oraz *S.epidermidis* ŁDZ 9) w przypadku, których najwyższe testowane stężenie związków tj 256  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nie było hamujące ani bakteriobójcze.

Otrzymane związki **13a**, **13b** oraz **15a** miały takie samo MIC jak antybiotyk referencyjny w przypadku bakterii *E. faecalis* ATCC 29212, natomiast wyznaczone dla nich MBC było 4-krotnie wyższe. Podobną zależność zaobserwowano wobec szczepu *S.aureus* 9611, gdzie MIC penicyliny G było takie samo jak penicylin **13a**, **14a** oraz **15a**, natomiast ich efekt bakteriobójczy zaobserwowano w stężeniu 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Minimalne stężenie bakteriobójcze w przypadku szczepów *S.aureus* ATCC 4163, *S.aureus* 176, *S.epidermidis* ŁDZ 12 było takie samo, albo niższe dla związków **13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a**.

W przypadku szczepu *S.aureus* 9611 zaobserwowano lepsze działanie antybiotyków zmodyfikowanych optycznie czystymi 3-hydrokso kwasami (**13a**, **14a** oraz **15a**), dla których MIC był co najmniej 2-krotnie niższy niż dla związków z wprowadzoną modyfikacją niechiralną. Podobną zależność wystąpiła w przypadku związków **14a** oraz **15a**, których stężenie hamujące względem bakterii *S.aureus* 203, *S.aureus* 176, *S.epidermidis* ŁDZ 12 było niższe niż **14b** i **15b**. Jedyne w dwóch przypadkach penicylina zmodyfikowana *rac*-3-hydrokso kwasami miała lepsze działanie niż  $\beta$ -laktamy czyste optycznie. W pozostałych przykładach obie wersje antybiotyków (zmodyfikowane enancjomerami *R* oraz mieszaniną *R/S*-3-hydrokso kwasów) wykazywały podobne działania bakteriostatyczne oraz bakteriobójcze. Związkami wykazującymi najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne względem bakterii Gram-

dotadnich były penicyliny **13a** oraz **13b**, dla których MIC oraz MBC były w większości przypadków niższe niż dla pozostałych penicylin. Związkami o najniższym potencjale przeciwbakteryjnym były penicyliny zmodyfikowane *rac*-3-hydroksykwasami **5b** oraz **6b**, a mianowicie penicylina **14b** oraz **15b**.

**Tabela 19. Minimalne stężenie hamujące oraz minimalne stężenie bakteriobójcze nowych pochodnych 6-APA względem bakterii Gram-dodatnich. Antybiotykiem referencyjnym była Penicylina G (PenG).**

		PenG [µg mL]	13a [µg/mL]	13b [µg/mL]	14a [µg/mL]	14b [µg/mL]	15a [µg/mL]	15b [µg/mL]
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	MIC	2,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00
	MBC	4,00	16,00	16,00	32,00	32,00	16,00	32,00
<i>S. aureus</i> NCTC 29213	MIC	1,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00
	MBC	8,00	16,00	16,00	32,00	32,00	16,00	32,00
<i>S. aureus</i> ATCC 4163	MIC	0,25	0,50	0,50	0,50	2,00	1,00	0,50
	MBC	0,50	0,50	0,50	1,00	16,00	16,00	2,00
<i>S. aureus</i> 9611	MIC	8,00	8,00	16,00	8,00	16,00	8,00	32,00
	MBC	32,00	64,00	64,00	64,00	64,00	64,00	128,00
<i>S. aureus</i> 203	MIC	0,50	4,00	4,00	8,00	16,00	8,00	16,00
	MBC	2,00	16,00	8,00	8,00	32,00	16,00	32,00
<i>S. aureus</i> 155	MIC	4,00	8,00	8,00	16,00	16,00	16,00	16,00
	MBC	8,00	32,00	32,00	32,00	64,00	16,00	64,00
<i>S. aureus</i> 176	MIC	0,06	0,25	0,25	0,50	1,00	0,25	0,50
	MBC	2,00	16,00	4,00	1,00	1,00	0,50	8,00
<i>S. epidermidis</i> 36984	MIC	16,00	>256	256,00	>256	>256	256	>256
	MBC	32,00	>256	256,00	>256	>256	256	>256
<i>S. epidermidis</i> ŁDZ 9	MIC	32,00	256,00	128,00	256,00	256,00	256,00	>256
	MBC	32,00	>256	256,00	>256	>256	256	>256
<i>S. epidermidis</i> ŁDZ 12	MIC	1,00	2,00	2,00	2,00	4,00	2,00	4,00
	MBC	4,00	8,00	4,00	4,00	8,00	4,00	16,00
<i>S. epidermidis</i> HEM 9KS	MIC	4,00	32,00	16,00	32,00	32,00	32,00	32,00
	MBC	8,00	64,00	32,00	64,00	64,00	64,00	64,00

Bakterie Gram-ujemne były mniej wrażliwe na działanie badanych związków niż bakterie Gram-dodatnie, a ich MIC oraz MBC był znacznie wyższy od stężenia hamującego i bakteriobójczego ampicyliny (Tabela 20). W przypadku szczepu *E. coli* ATCC 25922 jedynymi związkami, dla których ustalono MIC są penicyliny **14a** oraz **14b**. Wynik ten jest analogiczny do rezultatów otrzymanych w teście dyfuzyjno-krażkowym, który również wskazywał te dwa antybiotyki jako związki wykazujące działanie hamujące wzrost tej bakterii. Związkiem najlepiej hamującym wzrost bakterii z rodzaju *Proteus* był związek **14a**, a jego MIC

oraz MBC było wyższe od jego odpowiednika – penicyliny **14b**. Jedynie w przypadku szczepu *P. vulgaris* ATCC 13885 związek **14b** miał niższe MIC oraz MBC niż **14a**. Co ciekawe, pochodną 6-APA o najsłabszym działaniu względem testowanych bakterii Gram-ujemnych był związek **13a**, czyli penicylina o bardzo dobrych właściwościach przeciwbakteryjnych wobec bakterii Gram-dodatnich.

**Tabela 20. Minimalne stężenie hamujące oraz minimalne stężenie bakteriobójcze nowych pochodnych 6-APA względem bakterii Gram-ujemnych. Antybiotykiem referencyjnym była ampicylina (AMP).**

		AMP [µg/mL]	13a [µg/mL]	13b [µg/mL]	14a [µg/mL]	14b [µg/mL]	15a [µg/mL]	15b [µg/mL]
<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC	4,0	>256	>256	256,0	256,0	>256	>256
	MBC	8,0	>256	>256	>256	>256	>256	>256
<i>P. mirabilis</i> ATCC 14153	MIC	2,0	>256	256,0	64,0	128,0	>256	>256
	MBC	2,0	>256	>256	256,0	>256	>256	>256
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	MIC	0,5	128,0	32,0	8,0	64,0	32,0	32,0
	MBC	2,0	256,0	64,0	16,0	64,0	32,0	64,0
<i>P. vulgaris</i> NCTC 4635	MIC	0,5	16,0	16,0	8,0	16,0	16,0	16,0
	MBC	1,0	64,0	32,0	32,0	32,0	16,0	16,0
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13885	MIC	0,5	256,0	256,0	256,0	64,0	>256	256,0
	MBC	1,0	>256	>256	>256	256,0	>256	>256

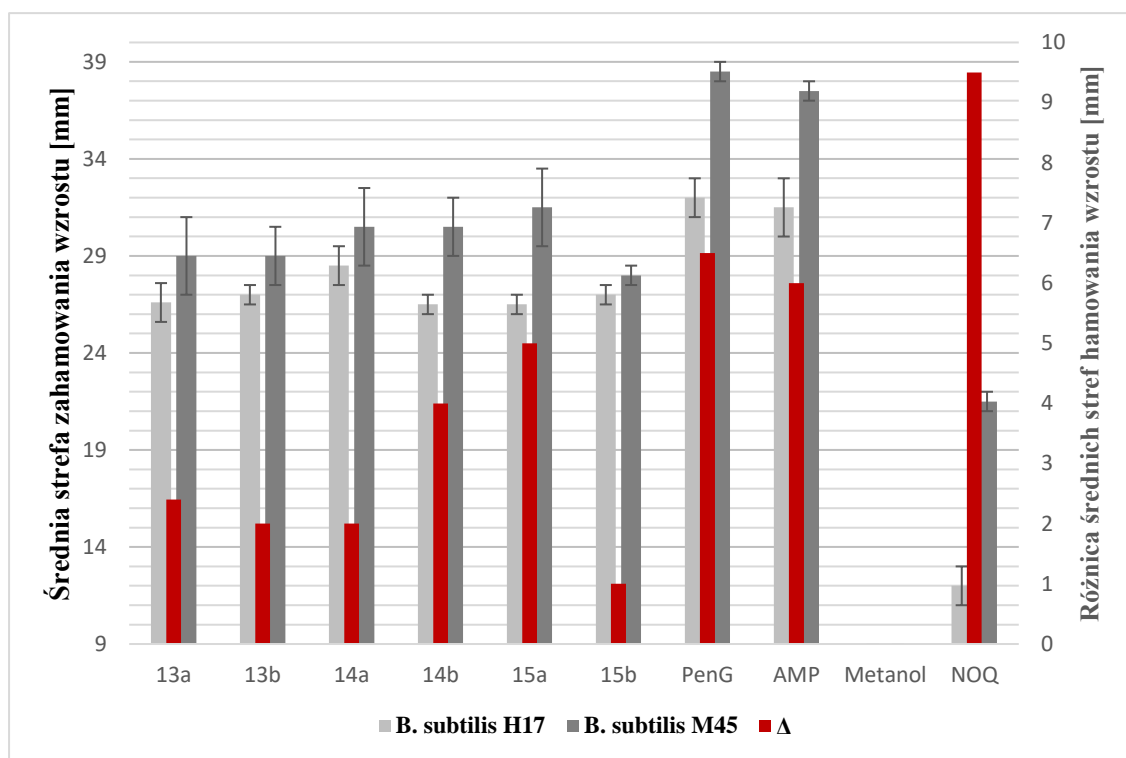
Na podstawie uzyskanych danych potwierdzono, że wyprodukowane nowe penicyliny mają działanie bakteriostatyczne oraz bakteriobójcze, względem wszystkich testowanych bakterii Gram-dodatnich oraz niektórych bakterii Gram-ujemnych, szczególnie dla szczepów z rodzaju *Proteus*. Minimalne stężenie hamujące nowych pochodnych 6-APA jest w niektórych przypadkach takie samo jak komercyjnie używanych antybiotyków, jednak dla większości szczepów niezbędne było zastosowanie wyższego stężenia by osiągnąć efekt inhibicyjny. W przypadku MBC dla bakterii Gram-dodatnich stężenie badanych związków oznaczone jako bakteriobójcze jest w paru przypadkach takie samo jak dla penicyliny G, a dla szczepu *S.aureus* 176 nawet 4-krotnie niższe. Podsumowując, nowe penicyliny otrzymane w ramach niniejszej pracy badawczej, odznaczają się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną, zwłaszcza dla bakterii Gram-dodatnich, a ich działanie jest porównywalne do komercyjnie stosowanej penicyliny G. Otrzymane antybiotyki nie były skuteczne względem Gram-ujemnej bakterii wyposażonej w β-laktamazę typu SHV-18 występującą w szczepie *K. pneumoniae* ATCC 700603, a także wobec szczepu wzorcowego *P. aeruginosa* ATCC 27853 wyposażonego w chromosomalną cefalosporynazę AmpC.

### 3.3.5.3. Działanie genotoksyczne oraz cytotoksyczne związków

Ocena bezpieczeństwa stosowania potencjalnych leków stanowi jeden z najważniejszych aspektów ich charakterystyki. Z tego względu otrzymane penicyliny zostały poddane testom określającym stopień ich działań niepożądanych takich jak: toksyczny wpływ badanych związków DNA komórki oraz cytotoksyczność.

Toksyczny efekt nowych penicylin powodujący uszkodzenia DNA komórki, oceniono przeprowadzając specjalny test z wykorzystaniem dwóch zmodyfikowanych genetycznie bakterii *B. subtilis*. Jeden ze szczepów (M45) posiadał niesprawny aparat naprawy DNA w związku z czym był potencjalnie wrażliwszy na działanie związków o charakterze toksycznym względem materiału genetycznego. Otrzymane rezultaty testu „rec” dla nowych pochodnych 6-APA przedstawiono na **Rysunku 33**, gdzie zestawiono je z wynikami otrzymanymi dla antybiotyków stosowanych w medycynie, a także z kontrolą pozytywną, którą był *N*-tlenek 4-nitrochinoliny (toksyczny względem DNA). Strefy zahamowania wszystkich testowanych związków były większe dla szczepu *B. subtilis* M45 w porównaniu do stref inhibicji występujących dla *B. subtilis* H17. Według pracy Grabińskiej-Sota et al. różnica między wielkościami stref szczepów wynosząca 2 mm lub mniej charakteryzuje związki, które nie mają działania toksycznego względem komórkowego DNA. Różnica w przedziale 2 mm–4 mm określa związki o potencjale genotoksycznym, natomiast większa od 4 mm wskazuje, że związki mają właściwości genotoksyczne.<sup>176</sup> Zestawiając otrzymane dane z podziałem zastosowanym w wymienionej pracy, można stwierdzić, że związki **13b**, **14a** oraz **15b** nie były w żadnym stopniu toksyczne względem DNA, pochodne **13a** oraz **14b** wykazały potencjał genotoksyczny, natomiast **15a**, penicylina G oraz ampicylina posiadały właściwości genotoksyczne. Oznaczona duża toksyczność komercyjnych antybiotyków może być spowodowana stosunkowo wysokim stężeniem związków, użytych w badaniu (odpowiadającym najwyższemu stężeniu w teście MIC), niemniej jednak różnica w strefach zahamowania wzrostu dla szczepów rec<sup>+</sup> i rec<sup>-</sup> jest w ich przypadku znacznie większa niż dla otrzymanych nowych penicylin. Na podstawie zebranych danych, potwierdzono niską genotoksyczność nowych penicylin, nawet w stosunkowo wysokim stężeniu (256 µg) zastosowanym podczas testu. Wszystkie otrzymane pochodne 6-APA miały mniejszą różnicę

wielkości stref zahamowania wzrostu u testowanych szczepów, w porównaniu z penicyliną G oraz ampicyliną.

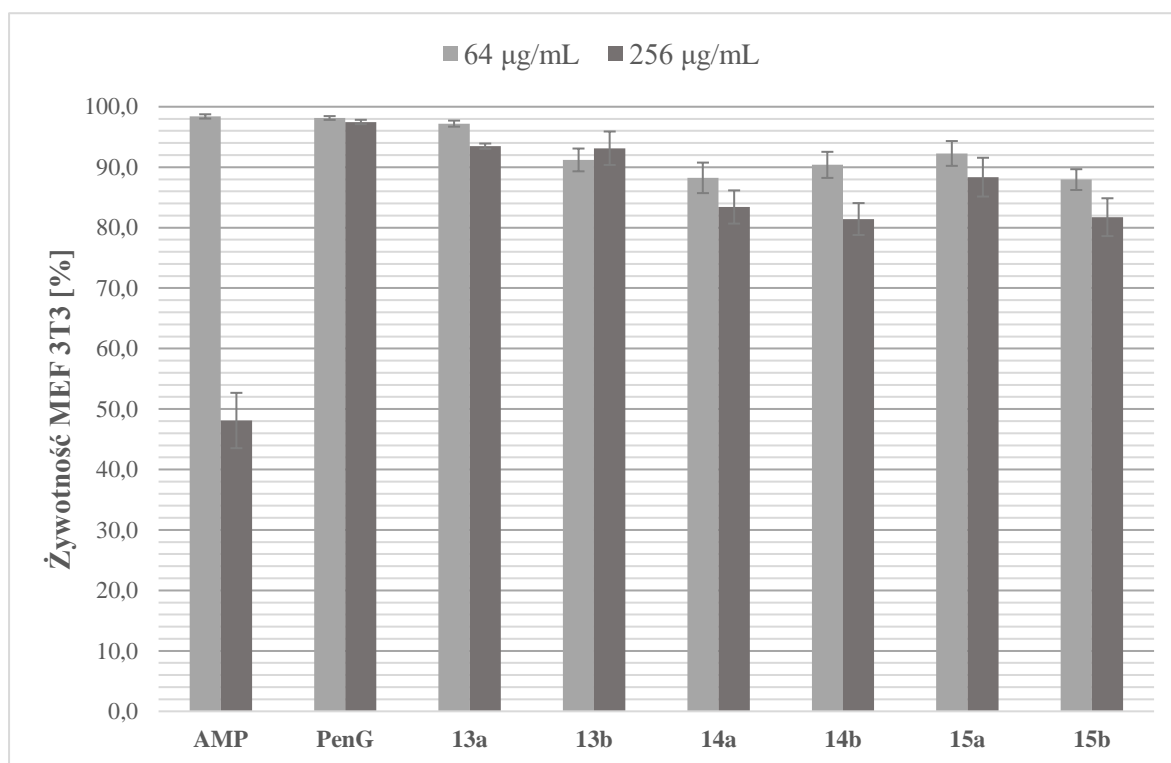


**Rysunek 33.** Strefy zahamowania wzrostu szczepów *Bacillus subtilis* H17 (rec<sup>+</sup>) oraz *Bacillus subtilis* (rac<sup>-</sup>) przez otrzymane pochodne 6-APA z wyznaczoną różnicą średnic stref występującą między nimi.

W celu oznaczenia efektów cytotoksycznych wyprodukowanych nowych penicylin przeprowadzono inkubację komórek MEF 3T3 w pożywce z ich dodatkiem o stężeniu 256  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (najwyższym stężeniu używanym w oznaczeniach MIC i MBC) oraz 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , które stanowiło kolejne istotne stężenie w teście MIC. Żywotność komórek po okresie inkubacji oznaczono barwieniem FDA/PI, różnicującym komórki żywe od martwych. Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci wykresu znajdującego się na **Rysunku 34**. Żadna z nowych penicylin nie wykazała cytotoksyczności względem badanej linii mysich embrionalnych fibroblastów MEF T3T w zastosowanych stężeniach (oznaczona żywotność nie była niższa niż 80%). Najbardziej cytotoksyczne działanie względem komórek wykazała ampicylina w stężeniu 256  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , gdzie udział martwych komórek stanowił więcej niż 50%. Najwyższą żywotność oznaczono dla penicyliny G, ampicyliny oraz penicyliny **13a** przy stężeniu 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . W wyższym stężeniu badanych związków oraz antybiotyków referencyjnych najwyższy udział komórek z zieloną fluorescencją oznaczono w próbie z penicyliną G (97%). Podobnie niską toksycznością względem komórek w wysokim stężeniu związków odznaczały się penicyliny **13a** (żywotność 94%), **13b** (żywotność 93%) oraz **15a** (żywotność 88%). Najniższą żywotność



komórek MEF 3T3 dla badanych związków oznaczono dla penicyliny **14b** oraz **15b**, która wynosiła odpowiednio 81% i 82%. Uzyskane wyniki świadczą o niskiej toksyczności nowych penicylin względem komórek eukariotycznych, nawet przy ekspozycji na wysokie stężenie związków. Ich cytotoksyczność względem linii komórkowej MEF 3T3 jest porównywalna z poziomem uzyskanym dla penicyliny G, a w przypadku wyższych stężeń odznaczają się znacznie niższą toksycznością niż komercyjnie stosowana ampicylina.



**Rysunek 34.** Żywotność komórek MEF 3T3 po 24 h inkubacji w pożywce zawierającej badane pochodne 6-APA w stężeniu  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  oraz  $256 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 3.3.6. Podsumowanie wyników

Otrzymane sole sodowe nowych związków  $\beta$ -laktamowych (**13a**, **13b**, **14a**, **14b**, **15a** oraz **15b**) charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną. Minimalne stężenia hamujące (MIC) oraz bakteriobójcze (MBC) wyznaczone dla badanych pochodnych 6-APA były zazwyczaj wyższe niż dla penicyliny G oraz ampicyliny. Spektrum działania nowych antybiotyków było zbliżone do tego, które wykazuje penicylina G, a mianowicie obejmowało różne gatunki bakterii Gram-dodatnich i tylko niektóre bakterie Gram-ujemne. Co więcej, wyprodukowane penicyliny nie były cytotoksyczne względem badanej linii komórkowej, a dodatkowo ich genotoksyczność była niższa w testowanym stężeniu od komercyjnie używanych antybiotyków. Można zatem stwierdzić, że nowe pochodne 6-APA otrzymane

w tej pracy badawczej mają potencjał antybiotyków oraz mogą być stosowane w wyższych stężeniach niż ampicylina czy penicylina G, ze względu na ich niską cytotoksyczność oraz genotoksyczność.

### 3.4. Podsumowanie globalne wyników pracy eksperymentalnej

Pomimo upływu lat penicyliny nadal stanowią leki przeciwbakteryjne pierwszego wyboru w leczeniu zakażeń na całym świecie. Niezwykle szerokie spektrum działania penicylin oraz antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, a także ich nietoksyczność względem komórek eukariotycznych są powodem ich popularności i ciągłych prac badawczych prowadzących do ich ulepszania. Wiele antybiotyków z grupy penicylin utraciło swoje działanie z uwagi na szerzącą się wśród mikroorganizmów lekooporność. Projektowanie nowych antybiotyków, w tym penicylin, a także opracowanie nowych sposobów ich otrzymywania oraz modyfikacji, stanowi obecnie bardzo ważne zagadnienie naukowe.

Przedstawione badania eksperymentalne opisują dwa sposoby otrzymywania penicylin, do cząsteczek w których wprowadzono modyfikację łańcucha bocznego w pozycji C6. Jako cząsteczki przyłączane do struktury kwasu 6-APA, stanowiącego rdzeń nowych antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, wykorzystano pochodne polihydroksyalkanianów (PHA). Polimery bakteryjne PHA, stanowiące źródło chiralnych cząsteczek do modyfikowania penicylin, otrzymano na drodze fermentacji bakteryjnej szczepów *P. putida*. Wyprodukowano dwa różne strukturalnie polimery PHA: poli-3-hydroksynonanian [P(3HN)] – heteropolimer zbudowany z kwasów (*R*)-3-hydroksynonanowego oraz (*R*)-3-hydrokseyheptanowego oraz poli-5-fenyl-3-hydroksypentanian [P(3H5PV)] złożony głównie z kwasów (*R*)-3-hydroksey-5-fenylwalerianowego. P(3HN) stanowił 54,2% suchej masy bakteryjnej uzyskanej w fermentacji reaktorowej typu fed-batch, natomiast P(3H5PV) otrzymany podczas hodowli kolbowej stanowił 57% suchej masy. Produktywność wolumetryczna obu procesów wynosiła odpowiednio 1,43 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a dla kolbowej 0,025 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Polimery poddano depolimeryzacji w procesie kwaśnej metanolizy otrzymując z wysoką wydajnością, czyste chiralnie enancjomery *R* w postaci trzech estrów metylowych.

Monomery PHA, a także ich odpowiedniki w formie mieszaniny racemicznej otrzymane na drodze syntezy chemicznej połączono z kwasem 6-aminopenicylanowym poprzez wytworzenie pomiędzy nimi wiązania amidowego. Wprowadzenie pochodnej PHA do cząsteczki 6-APA przeprowadzono poprzez syntezę chemiczną z wykorzystaniem odczynników kondensujących oraz przez biosyntezę katalizowaną lipazami. Reagent T3P był

najlepszym odczynnikiem kondensującym biorącym udział w wytwarzaniu wiązania amidowego pomiędzy 3-hydroksykwasami, a estrem benzylovym kwasu 6-APA. Zmodyfikowane penicyliny otrzymano również w reakcji aminolizy katalizowanej enzymatycznie, najwydajniej przeprowadzanej przez lipazę TL-IM pochodzącą z *Thermomyces lanuginosus* w bezwodnym toleunie w temperaturze 15°C. Na drodze obu opracowanych ścieżek otrzymano sześć pochodnych 6-APA z wprowadzonymi modyfikacjami w ich łańcuchu bocznym.

Nowe pochodne 6-APA wykazały wysoką skuteczność inhibicyjną oraz bakteriobójczą względem bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnym z rodzaju *Proteus*. Spektrum działania nowych pochodnych 6-APA jest podobne do zakresu działania naturalnej penicyliny G, co jest wynikiem hydrofobowego charakteru łańcucha bocznego wprowadzonego do cząsteczki nowych penicylin. Penicyliny o mniejszej hydrofilowości wykazują lepsze działanie względem bakterii Gram-dodatnich. Dodatkowo nowe penicyliny nie wykazały działania cytotoksycznego względem komórek eukariotycznych, a wyznaczona dla nich genotoksyczność była niższa niż ta otrzymana dla penicyliny G oraz ampicyliny. Wykazano, że otrzymane nowe penicyliny zmodyfikowane pochodnymi PHA są związkami o wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej oraz niskiej toksyczności, co może plasować związki w grupie antybiotyków o potencjale aplikacyjnym.

Opracowane ścieżki otrzymywania nowych penicylin mają charakter uniwersalny, ze względu na spektrum substratowe, co jest niezwykle ważne przy wprowadzaniu do cząsteczki 6-APA modyfikacji innych niż opisano. Zarówno wybrany odczynnik kondensujący T3P, jak również lipaza TL-IM umożliwiły syntezę wiązania amidowego dla wszystkich wybranych 3-hydroksykwasów, które charakteryzowała różna budowa chemiczna (zwłaszcza w przypadku monomerów alifatycznych i aromatycznych). Daje to możliwość potencjalnego wykorzystania także innych chiralnych związków pochodzących z rodziny polihydroksyalkaninów, które mogą być wykorzystane w projektowaniu, a następnie otrzymywaniu nowych antybiotyków  $\beta$ -laktamowych przy zastosowaniu opracowanych w tej pracy procedur.

#### 4. Literatura

- (1) Markiewicz, Z.; Kwiatkowski, Z. A. *Bakterie, Antybiotyki, Lekooporność*, I.; Warszawa, 2012.
- (2) Khadim, M. M.; Marjani, M. F. Pyocyanin and Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Burn Infections in Baghdad, Iraq. *Jordan J. Biol. Sci.* **2019**, *12* (1995–6673), 31–35.
- (3) Baron, S. S.; Rowe, J. J. Antibiotic Action of Pyocyanin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *20* (6), 814–820. <https://doi.org/10.1128/AAC.20.6.814>.
- (4) FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. Influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, No. 10, 226–236.
- (5) Lima, L. M.; Silva, B. N. M. da; Barbosa, G.; Barreiro, E. J.  $\beta$ -Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *208*, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>.
- (6) Kong, K. F.; Schneper, L.; Mathee, K. Beta-Lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *Apmis* **2010**, *118* (1), 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>.
- (7) Alcaide, B.; Aragoncillo, C.; Almendros, P. Cephalosporins. *Compr. Heterocycl. Chem. III* **2008**, *2*, 111–171. <https://doi.org/10.1016/b978-008044992-0.00202-9>.
- (8) Nagarajan, R.; Boeck, L. D.; Gorman, M.; Hamill, R. L.; Higgins, C. E.; Hoehn, M. M.; Stark, W. M.; Whitney, J. G.  $\beta$ -Lactam Antibiotics from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (9), 2308–2310. <https://doi.org/10.1021/ja00738a035>.
- (9) Imada, A.; Kitano, K.; Kintaka, K.; Muroi, M.; Asai, M. Sulfazecin and Isosulfazecin, Novel  $\beta$ -Lactam Antibiotics of Bacterial Origin. *Nature*. 1981, pp 590–591. <https://doi.org/10.1038/289590a0>.
- (10) Fernandes, R.; Amador, P.; Prudêncio, C.  $\beta$ -Lactams: Chemical Structure, Mode of Action and Mechanisms of Resistance. *Rev. Med. Microbiol.* **2013**, *24* (1), 7–17. <https://doi.org/10.1097/MRM.0b013e3283587727>.
- (11) Valegard, K.; Terwisscha van Scheltinga, A. C.; Lloyd, M. D.; Hara, T.; Ramaswamy, S.; Perrakisk, A.; Thompsonk, A.; Lee, H.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J.; Hajdu, J.; Andersson, I. Structure of a Cephalosporin Synthase. *Nature* **1998**, *394* (1994), 805.
- (12) FLYNN, E. H. *Cephalosporins and Penicillins: Chemistry and Biology*; 1972; Vol. 2. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5164.1464-a>.
- (13) Sonawane, V. Enzymatic Modifications of Cephalosporins by Cephalosporin Acylase and Other Enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2006**, *26* (2), 95–120. <https://doi.org/10.1080/07388550600718630>.
- (14) Marshall, W. F.; Blair, J. E. The Cephalosporins. *Mayo Clin. Proc.* **1999**, *74* (2), 187–195. <https://doi.org/10.4065/74.2.187>.
- (15) Harrison, C. J.; Bratcher Denise. Cephalosporins: A Review. *Pediatr. Rev.* **2008**, *29* (8), 262–295. <https://doi.org/10.1542/pir.29-8-294>.
- (16) Okamoto, M. P.; Nakahiro, R. K.; Chin, A.; Bedikian, A.; Gill, M. A. Cefepime: A New Fourth-Generation Cephalosporin. *Am. J. Hosp. Pharm.* **1994**, *51* (4), 463–477. <https://doi.org/10.1093/ajhp/51.4.463>.
- (17) Chaudhry, S. B.; Veve, M. P. Cephalosporins: A Focus on Side Chains and  $\beta$ -Lactam Cross-Reactivity. *Pharmacy* **2019**, *7* (103), 1–16.

- (18) Zhanel, G. G.; Sniezek, G.; Schweizer, F.; Zelenitsky, S.; Lagacé-Wiens, P. R. S.; Rubinstein, E.; Gin, A. S.; Hoban, D. J.; Karlowsky, J. A. Ceftaroline: A Novel Broad-Spectrum Cephalosporin with Activity against Meticillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Drugs* **2009**, *69* (7), 809–831. <https://doi.org/10.2165/00003495-200969070-00003>.
- (19) Murthy, B.; Schmitt-Hoffmann, A. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ceftobiprole, an Anti-MRSA Cephalosporin with Broad-Spectrum Activity. *Clin. Pharmacokinet.* **2008**, *47* (1), 21–33. <https://doi.org/10.2165/00003088-200847010-00003>.
- (20) SYKES, R. B.; BONNER, D. P.; BUSH, K.; GEORGOPAPADAKOU, N. H. Azthreonam (SQ 26,776), a Synthetic Monobactam Specifically Active Against Aerobic Gram-Negative Bacteria. *Chemioterapia* **1982**, *1* (4 Suppl.), 73–75.
- (21) Han, S.; Zaniewski, R. P.; Marr, E. S.; Lacey, B. M.; Tomaras, A. P.; Evdokimov, A.; Miller, J. R.; Shanmugasundaram, V. Structural Basis for Effectiveness of Siderophore- Conjugated Monocarbams against Clinically Relevant Strains of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (51), 22002–22007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013092107>.
- (22) Dalhoff, A.; Janjic, N.; Echols, R. Redefining Penems. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71* (7), 1085–1095. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.003>.
- (23) Schurek, K. N.; Wiebe, R.; Karlowsky, J. A.; Rubinstein, E.; Hoban, D. J.; Zhanel, G. G. Faropenem: Review of a New Oral Penem. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2007**, *5* (2), 185–198. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.2.185>.
- (24) Ednie, L. M.; Appelbaum, P. C. Antianaerobic Activity of Sulopenem Compared to Six Other Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (5), 2163–2170. <https://doi.org/10.1128/AAC.01557-08>.
- (25) Tanaka, R.; Oyama, Y.; Imajo, S.; Matsuki, S.; Ishiguro, M. Structure-Activity Relationships of Penem Antibiotics: Crystallographic Structures and Implications for Their Antimicrobial Activities. *Bioorganic Med. Chem.* **1997**, *5* (7), 1389–1399. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(97\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(97)00073-4).
- (26) Coulthurst, S. J.; Barnard, A. M. L.; Salmond, G. P. C. Regulation and Biosynthesis of Carbapenem Antibiotics in Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (4), 295–306. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1128>.
- (27) Hawkey, P. M.; Livermore, D. M. Carbapenem Antibiotics for Serious Infections. *BMJ* **2012**, *344* (7863), 1–7. <https://doi.org/10.1136/bmj.e3236>.
- (28) El-Gamal, M. I.; Oh, C.-H. Current Status of Carbapenem Antibiotics. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *999* (999), 1–16. <https://doi.org/10.2174/1568210206151910266>.
- (29) Tipper, D. J. Mode of Action of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* **1979**, *1* (1), 39–53. <https://doi.org/10.1093/clinids/1.1.39>.
- (30) Ibrahim, M.; Zango, U.; Shawai, S. A.; Shamsuddin, I. A Review on Beta-Lactam Antibiotic Drug Resistance. *Drug Des. Devel. Ther.* **2019**, *3* (April), 52–58. <https://doi.org/10.15406/mojddt.2019.03.00080>.
- (31) Worthington, R. J.; Melander, C. Overcoming Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (9), 4207–4213. <https://doi.org/10.1021/jo400236f>.
- (32) Essack, S. Y. The Development of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of  $\beta$ -Lactamases. *Pharm. Res.* **2001**, *18* (10), 1391–1399. <https://doi.org/10.1023/A:1012272403776>.
- (33) Avery, C.; Baker, L.; Jacobs, D. J. Functional Dynamics of Substrate Recognition in TEM Beta-Lactamase. *Entropy* **2022**, *24* (5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/e24050729>.
- (34) Brem, J.; Cain, R.; Cahill, S.; McDonough, M. A.; Clifton, I. J.; Jiménez-Castellanos, J. C.;

- Avison, M. B.; Spencer, J.; Fishwick, C. W. G.; Schofield, C. J. Structural Basis of Metallo- $\beta$ -Lactamase, Serine- $\beta$ -Lactamase and Penicillin-Binding Protein Inhibition by Cyclic Boronates. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms12406>.
- (35) Morán-Díaz, J. R.; Jiménez-Vázquez, H. A.; Gómez-Pliego, R.; Arellano-Mendoza, M. G.; Quintana-Zavala, D.; Guevara-Salazar, J. A. Correlation Study of Antibacterial Activity and Spectrum of Penicillins through a Structure-Activity Relationship Analysis. *Med. Chem. Res.* **2019**, *28* (9), 1529–1546. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02391-9>.
- (36) Miller, E. L. The Penicillins: A Review and Update. *J. Midwifery Women's Heal.* **2002**, *47* (6), 426–434. [https://doi.org/10.1016/S1526-9523\(02\)00330-6](https://doi.org/10.1016/S1526-9523(02)00330-6).
- (37) Eliopoulos, George MAzlocillin, Mezlocillin, and P. N. B.-S. P. Azlocillin, Mezlocillin, and Piperacillin: New Broad-Spectrum Penicillins. *Ann. Intern. Med.* **1982**, *97* (5), 755–760.
- (38) Skarp, K. P.; Shams, A.; Montelin, H.; Lagerbäck, P.; Tängdén, T. Synergistic and Bactericidal Activities of Mecillinam, Amoxicillin and Clavulanic Acid Combinations against Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing Escherichia Coli in 24-h Time-kill Experiments. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2019**, *53* (1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.011>.
- (39) Carcione, D.; Siracusa, C.; Sulejmani, A.; Leoni, V.; Intra, J. Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action and Clinical Use. *Antibiotics* **2021**, *10* (8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080995>.
- (40) Bush, K.; Bradford, P. A.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. **2016**, No. Table 1.
- (41) Drawz, S. M.; Bonomo, R. A. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (1), 160–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>.
- (42) Nichols, W. W.; Lahiri, S. D.; Bradford, P. A.; Stone, G. G. The Primary Pharmacology of Ceftazidime/Avibactam: Resistance in Vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **2023**, *78* (3), 569–585. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac449>.
- (43) Anderson, A. J.; Dawes, E. A. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54* (4), 450–472. <https://doi.org/10.1128/membr.54.4.450-472.1990>.
- (44) Lemoigne, M. Products of Dehydration and of Polymerization of  $\beta$ -Hydroxybutyric Acid. *Bull Soc Chem Biol* **1926**, *8*, 770–782. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.005>.
- (45) Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1503–1555.
- (46) Obruca, S.; Sedlacek, P.; Slaninova, E.; Fritz, I.; Daffert, C.; Meixner, K.; Sedrlova, Z.; Koller, M. Novel Unexpected Functions of PHA Granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104* (11), 4795–4810. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1>.
- (47) Bresan, S.; Sznajder, A.; Hauf, W.; Forchhammer, K.; Pfeiffer, D.; Jendrossek, D. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have No Phospholipids. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep26612>.
- (48) Sznajder, A.; Pfeiffer, D.; Jendrossek, D. Comparative Proteome Analysis Reveals Four Novel Polyhydroxybutyrate (PHB) Granule-Associated Proteins in Ralstonia Eutropha H16. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (5), 1847–1858. <https://doi.org/10.1128/AEM.03791-14>.
- (49) Jendrossek, D.; Pfeiffer, D. New Insights in the Formation of Polyhydroxyalkanoate Granules (Carbonosomes) and Novel Functions of Poly(3-Hydroxybutyrate). *Environ. Microbiol.* **2014**, *16* (8), 2357–2373. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>.
- (50) Griebel, R.; Smith, Z.; Merrick, J. M. Metabolism of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate. I. Purification,

- Composition, and Properties of Native Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Granules from *Bacillus Megaterium*. *Biochemistry* **1968**, 7 (10), 3676–3681. <https://doi.org/10.1021/bi00850a047>.
- (51) BOATMAN, E. S. OBSERVATIONS ON THE FINE STRUCTURE OF SPHEROPLASTS OF RHODOSPIRILLUM RUBRUM. *J. CELL Biol.* **1964**, 20 (1), 297–311.
- (52) Mayer, F.; Hoppert, M. Determination of the Thickness of the Boundary Layer Surrounding Bacterial PHA Inclusion Bodies, and Implications for Models Describing the Molecular Architecture of This Layer. *J. Basic Microbiol.* **1997**, 37 (1), 45–52. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620370108>.
- (53) Agnew, D. E.; Pflieger, B. F. Synthetic Biology Strategies for Synthesizing Polyhydroxyalkanoates from Unrelated Carbon Sources. *Chem. Eng. Sci.* **2013**. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.12.023>.
- (54) Tribelli, P. M.; López, N. I. Poly(3-Hydroxybutyrate) Influences Biofilm Formation and Motility in the Novel Antarctic Species *Pseudomonas Extremaustralis* under Cold Conditions. *Extremophiles* **2011**, 15 (5), 541–547. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0384-1>.
- (55) Obruca, S.; Sedlacek, P.; Krzyzanek, V.; Mravec, F.; Hrubanova, K.; Samek, O.; Kucera, D.; Benesova, P.; Marova, I. Accumulation of Poly(3-Hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. *PLoS One* **2016**, 11 (6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>.
- (56) Wu, D.; He, J.; Gong, Y.; Chen, D.; Zhu, X.; Qiu, N.; Sun, M.; Li, M.; Yu, Z. Proteomic Analysis Reveals the Strategies of *Bacillus Thuringiensis* YBT-1520 for Survival under Long-Term Heat Stress. *Proteomics* **2011**, 11 (13), 2580–2591. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000392>.
- (57) Zhao, Y. H.; Li, H. M.; Qin, L. F.; Wang, H. H.; Chen, G. Q. Disruption of the Polyhydroxyalkanoate Synthase Gene in *Aeromonas Hydrophila* Reduces Its Survival Ability under Stress Conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, 276 (1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>.
- (58) Chien, C. C.; Wang, L. J.; Lin, W. R. Polyhydroxybutyrate Accumulation by a Cadmium-Resistant Strain of *Cupriavidus Taiwanensis*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2014**, 45 (4), 1164–1169. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2014.02.004>.
- (59) Slaninova, E.; Sedlacek, P.; Mravec, F.; Mullerova, L.; Samek, O.; Koller, M.; Hesko, O.; Kucera, D.; Marova, I.; Obruca, S. Light Scattering on PHA Granules Protects Bacterial Cells against the Harmful Effects of UV Radiation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, 102 (4), 1923–1931. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8760-8>.
- (60) Peplinski, K.; Ehrenreich, A.; Döring, C.; Bömeke, M.; Reinecke, F.; Hutmacher, C.; Steinbüchel, A. Genome-Wide Transcriptome Analyses of the “Knallgas” Bacterium *Ralstonia Eutropha* H16 with Regard to Polyhydroxyalkanoate Metabolism. *Microbiology* **2010**, 156 (7), 2136–2152. <https://doi.org/10.1099/mic.0.038380-0>.
- (61) Shimizu, R.; Chou, K.; Orita, I.; Suzuki, Y.; Nakamura, S.; Fukui, T. Detection of Phase-Dependent Transcriptomic Changes and Rubisco-Mediated CO<sub>2</sub> Fixation into Poly (3-Hydroxybutyrate) under Heterotrophic Condition in *Ralstonia Eutropha* H16 Based on RNA-Seq and Gene Deletion Analyses. *BMC Microbiol.* **2013**, 13 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-169>.
- (62) Tan, G. Y. A.; Chen, C. L.; Li, L.; Ge, L.; Wang, L.; Razaad, I. M. N.; Li, Y.; Zhao, L.; Mo, Y.; Wang, J. Y. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers (Basel)*. **2014**, 6 (3), 706–754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>.
- (63) Roohi; Zaheer, M. R.; Kuddus, M. PHB (Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate) and Its Enzymatic Degradation. *Polym. Adv. Technol.* **2018**, 29 (1), 30–40. <https://doi.org/10.1002/pat.4126>.
- (64) Chanprateep, S. Current Trends in Biodegradable Polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.*

- 2010**, *110* (6), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>.
- (65) Vu, D. H.; Åkesson, D.; Taherzadeh, M. J.; Ferreira, J. A. Recycling Strategies for Polyhydroxyalkanoate-Based Waste Materials: An Overview. *Bioresour. Technol.* **2020**, 298 (November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122393>.
- (66) Reddy, C. S. K.; Ghai, R.; Rashmi; Kalia, V. C. Polyhydroxyalkanoates: An Overview. *Bioresour. Technol.* **2003**, *87*, 137–146.
- (67) Agnew, D. E.; Pflieger, B. F. Synthetic Biology Strategies for Synthesizing Polyhydroxyalkanoates from Unrelated Carbon Sources. *Chem. Eng. Sci.* **2013**, *103*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.12.023>.
- (68) Raza, Banat I. M., Riaz, S., Z. . Polyhydroxyalkanoates: Properties and Chemical Modification Approaches for Their Functionalization. *Biotechnol. Prog.* **2017**, *34* (1), 29–41. <https://doi.org/10.1002/btpr>.
- (69) Koller, M.; Rodríguez-Contreras, A. Techniques for Tracing PHA-Producing Organisms and for Qualitative and Quantitative Analysis of Intra- and Extracellular PHA. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15* (6), 558–581. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400228>.
- (70) Mitra, R.; Xu, T.; Chen, G. Q.; Xiang, H.; Han, J. An Updated Overview on the Regulatory Circuits of Polyhydroxyalkanoates Synthesis. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15* (5), 1446–1470. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13915>.
- (71) Zuhainis, S. W.; Hassan, A. A.; Singh, M.; Mohamad, R. *Microbial Surfactant for Preservation of Natural Rubber Latex*; 2015. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23183-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23183-9_6).
- (72) Muhr, A.; Rechberger, E. M.; Salerno, A.; Reiterer, A.; Schiller, M.; Kwiecień, M.; Adamus, G.; Kowalczyk, M.; Strohmeier, K.; Schober, S.; Mittelbach, M.; Koller, M. Biodegradable Latexes from Animal-Derived Waste: Biosynthesis and Characterization of Mcl-PHA Accumulated by *Ps. Citronellolis*. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73* (10), 1391–1398. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.12.009>.
- (73) Skibiński, S.; Cichoń, E.; Harażna, K.; Marcello, E.; Roy, I.; Witko, M.; Ślósarczyk, A.; Czechowska, J.; Guzik, M.; Zima, A. Functionalized Tricalcium Phosphate and Poly(3-Hydroxyoctanoate) Derived Composite Scaffolds as Platforms for the Controlled Release of Diclofenac. *Ceram. Int.* **2021**, *47* (3), 3876–3883. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.09.248>.
- (74) Cichoń, E.; Harażna, K.; Skibiński, S.; Witko, T.; Zima, A.; Ślósarczyk, A.; Zimowska, M.; Witko, M.; Leszczyński, B.; Wróbel, A.; Guzik, M. Novel Bioresorbable Tricalcium Phosphate/Polyhydroxyoctanoate (TCP/PHO) Composites as Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *98* (June 2019), 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.06.028>.
- (75) Chen, G. Q. A Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHA) Based Bio- and Materials Industry. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (8), 2434–2446. <https://doi.org/10.1039/b812677c>.
- (76) Hazer, B.; Steinbüchel, A. Increased Diversification of Polyhydroxyalkanoates by Modification Reactions for Industrial and Medical Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0732-8>.
- (77) Wampfler, B.; Ramsauer, T.; Rezzonico, S.; Hischer, R.; Köhling, R.; Thöny-Meyer, L.; Zinn, M. Isolation and Purification of Medium Chain Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) (Mcl-PHA) for Medical Applications Using Nonchlorinated Solvents. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (10), 2716–2723. <https://doi.org/10.1021/bm1007663>.
- (78) Reddy, V. U. N.; S. V. Ramanaiah; Reddy, M. V.; Youg-Cheol Chang. Review of the Developments of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates (Mcl-PHAs).



- Bioengineering* **2022**, *9* (255), 1–23. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9050225>.
- (79) Koller, M. *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates, Microbial Biosynthesis and Feedstocks*. *CRC Press* **2021**, *1*.
- (80) Singh, A. K.; Mallick, N. SCL-LCL-PHA Copolymer Production by a Local Isolate, *Pseudomonas Aeruginosa* MTCC 7925. *Biotechnol. J.* **2009**, *4* (5), 703–711. <https://doi.org/10.1002/biot.200800307>.
- (81) Rakkan, T.; Chana, N.; Chirapongsatunkul, N.; U-taynapun, K.; Sangkharak, K. Screening and Identification of Newly Isolated Basic Red 9-Degrading Bacteria from Textile Wastewater and Their Ability to Produce Medium-Co-Long-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. *J. Polym. Environ.* **2021**, *30* (1), 415–423. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02206-2>.
- (82) Lu, J.; Tappel, R. C.; Nomura, C. T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(Hydroxyalkanoates). *Polym. Rev.* **2009**, *49* (3), 226–248. <https://doi.org/10.1080/15583720903048243>.
- (83) Meng, D. C.; Shen, R.; Yao, H.; Chen, J. C.; Wu, Q.; Chen, G. Q. Engineering the Diversity of Polyesters. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *29* (1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.02.013>.
- (84) REHM, B. H. A. Polyester Synthases: Natural Catalysts for Plastics. *Biochem. J.* **2003**, *376* (1), 15–33. <https://doi.org/10.1042/bj20031254>.
- (85) Pötter, M.; Steinbüchel, A. Poly(3-Hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-Hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 552–560. <https://doi.org/10.1021/bm049401n>.
- (86) Możejko-Ciesielska, J.; Kiewisz, R. Bacterial Polyhydroxyalkanoates: Still Fabulous? *Microbiol. Res.* **2016**, *192* (2016), 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>.
- (87) Solaiman, D. K. Y.; Ashby, R. D. Rapid Genetic Characterization of Poly(Hydroxyalkanoate) Synthase and Its Applications. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 532–537. <https://doi.org/10.1021/bm0493640>.
- (88) Anjum, A.; Zuber, M.; Zia, K. M.; Noreen, A.; Anjum, M. N.; Tabasum, S. Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and Its Copolymers: A Review of Recent Advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *89*, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>.
- (89) Akaraonye, E.; Keshavarz, T.; Roy, I. Production of Polyhydroxyalkanoates: The Future Green Materials of Choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, *85* (6), 732–743. <https://doi.org/10.1002/jctb.2392>.
- (90) Ojumu, T. .; Solomon, B. . Production of Polyhydroxyalkanoates , a Bacterial Biodegradable Polymer. *African J. Biotechnol.* **2004**, *3* (1), 18–24.
- (91) Volova, T. G.; Kalacheva, G. S.; Altukhova, O. V. Autotrophic Synthesis of Polyhydroxyalkanoates by the Bacteria *Ralstonia Eutropha* in the Presence of Carbon Monoxide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58* (5), 675–678. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0941-8>.
- (92) Volova, T. G.; Kiselev, E. G.; Shishatskaya, E. I.; Zhila, N. O.; Boyandin, A. N.; Syrvacheva, D. A.; Vinogradova, O. N.; Kalacheva, G. S.; Vasiliev, A. D.; Peterson, I. V. Cell Growth and Accumulation of Polyhydroxyalkanoates from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> of a Hydrogen-Oxidizing Bacterium, *Cupriavidus Eutrophus* B-10646. *Bioresour. Technol.* **2013**, *146*, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.070>.
- (93) Myung, J.; Flanagan, J. C. A.; Waymouth, R. M.; Criddle, C. S. Methane or Methanol-Oxidation Dependent Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) by Obligate Type II Methanotrophs. *Process Biochem.* **2016**, *51* (5), 561–567.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.005>.

- (94) Orita, I.; Nishikawa, K.; Nakamura, S.; Fukui, T. Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate Copolymers from Methanol by *Methylobacterium Extorquens* AM1 and the Engineered Strains under Cobalt-Deficient Conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98* (8), 3715–3725. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5490-9>.
- (95) Orita, I.; Unno, G.; Kato, R.; Fukui, T. Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate Terpolymer from Methanol via the Reverse  $\beta$ -Oxidation Pathway in the Presence of Lanthanide. *Microorganisms* **2022**, *10* (3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030529>.
- (96) Tan, D.; Wu, Q.; Chen, J. C.; Chen, G. Q. Engineering *Halomonas* TD01 for the Low-Cost Production of Polyhydroxyalkanoates. *Metab. Eng.* **2014**, *26*, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.09.001>.
- (97) Aldor, I. S.; Kim, S. W.; Jones Prather, K. L.; Keasling, J. D. Metabolic Engineering of a Novel Propionate-Independent Pathway for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in Recombinant *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68* (8), 3848–3854. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3848-3854.2002>.
- (98) Utsunomia, C.; Ren, Q.; Zinn, M. Poly(4-Hydroxybutyrate): Current State and Perspectives. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8* (April), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00257>.
- (99) Li, Z. J.; Shi, Z. Y.; Jian, J.; Guo, Y. Y.; Wu, Q.; Chen, G. Q. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-4-Hydroxybutyrate) from Unrelated Carbon Sources by Metabolically Engineered *Escherichia Coli*. *Metab. Eng.* **2010**, *12* (4), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.03.003>.
- (100) Lu, J.; Tappel, R. C.; Nomura, C. T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(Hydroxyalkanoates). *Polym. Rev.* **2009**, *49* (3), 226–248. <https://doi.org/10.1080/15583720903048243>.
- (101) Valentin, H. E.; Dennis, D. Metabolic Pathway for Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) Formation in *Nocardia Corallina*: Inactivation of MutB by Chromosomal Integration of a Kanamycin Resistance Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62* (2), 372–379. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.372-379.1996>.
- (102) Lee, S.; Jeon, E.; Yun, H. S.; Lee, J. Improvement of Fatty Acid Biosynthesis by Engineered Recombinant *Escherichia Coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2011**, *16* (4), 706–713. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0034-6>.
- (103) Best, E. A.; Knauf, V. C. Organization and Nucleotide Sequences of the Genes Encoding the Biotin Carboxyl Carrier Protein and Biotin Carboxylase Protein of *Pseudomonas Aeruginosa* Acetyl Coenzyme A Carboxylase. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (21), 6881–6889. <https://doi.org/10.1128/jb.175.21.6881-6889.1993>.
- (104) Misson, L. E.; Mindrebo, J. T.; Davis, T. D.; Patel, A.; Andrew McCammon, J.; Noel, J. P.; Burkart, M. D. Interfacial Plasticity Facilitates High Reaction Rate of *E. Coli* FAS Malonyl-CoA:ACP Transacylase, FabD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117* (39), 24224–24233. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009805117>.
- (105) Ren, Q.; Sierro, N.; Witholt, B.; Kessler, B. FabG, an NADPH-Dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonas Aeruginosa*, Provides Precursors for Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoate Biosynthesis in *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* **2000**, *182* (10), 2978–2981. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2978-2981.2000>.
- (106) Cruz, M. V; Freitas, F.; Paiva, A.; Mano, F.; Ramos, A. M.; Reis, M. A. M.; Dioni, M. Valorization of Fatty Acids-Containing Wastes and Byproducts into Short- and Medium-Chain Length Polyhydroxyalkanoates. *N. Biotechnol.* **2015**, *00* (00), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.05.005>.

- (107) Zhao, H.; Zeng, A.-P. *Synthetic Biology and Metabolic Engineering*; 2018; Vol. 162. <https://doi.org/10.1021/sb300094q>.
- (108) Nomura, C. T.; Taguchi, K.; Gan, Z.; Kuwabara, K.; Tanaka, T.; Takase, K.; Doi, Y. Expression of 3-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Reductase (FabG) Genes Enhances Production of Polyhydroxyalkanoate Copolymer from Glucose in Recombinant Escherichia Coli JM109. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (8), 4297–4306. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4297-4306.2005>.
- (109) Guzik, M. W.; Narancic, T.; Ilic-Tomic, T.; Vojnovic, S.; Kenny, S. T.; Casey, W. T.; Duane, G. F.; Casey, E.; Woods, T.; Babu, R. P.; Nikodinovic-Runic, J.; O'Connor, K. E. Identification and Characterization of an Acyl-CoA Dehydrogenase from Pseudomonas Putida KT2440 That Shows Preference towards Medium to Long Chain Length Fatty Acids. *Microbiol. (United Kingdom)* **2014**, *160* (PART 8), 1760–1771. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078758-0>.
- (110) Rehm, B. H. A.; Krüger, N.; Steinbüchel, A. A New Metabolic Link between Fatty Acid de Novo Synthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis. The PhaG Gene from Pseudomonas Putida KT2440 Encodes a 3-Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein-Coenzyme a Transferase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (37), 24044–24051. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.24044>.
- (111) Heath, R. J.; Rock, C. O. Roles of the FabA and FabZ  $\beta$ -Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Dehydratases in Escherichia Coli Fatty Acid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (44), 27795–27801. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27795>.
- (112) Campbell, J. W.; Cronan, J. E. Bacterial Fatty Acid Biosynthesis: Targets for Antibacterial Drug Discovery. *Rev. Lit. Arts Am.* **2001**, *1* (1), 791–831.
- (113) Smits, T. H. M.; Balada, S. B.; Witholt, B.; Van Beilen, J. B. Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (6), 1733–1742. <https://doi.org/10.1128/JB.184.6.1733-1742.2002>.
- (114) Brzostowicz, P. C.; Blasko, M. S.; Rouvière, P. E. Identification of Two Gene Clusters Involved in Cyclohexanone Oxidation in Brevibacterium Epidermidis Strain HCU. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58* (6), 781–789. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0968-x>.
- (115) Chen, G.-Q. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*; 2010; Vol. 14. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5>.
- (116) Wang, B.; Pugh, S.; Nielsen, D. R.; Zhang, W.; Meldrum, D. R. Engineering Cyanobacteria for Photosynthetic Production of 3-Hydroxybutyrate Directly from CO<sub>2</sub>. *Metab. Eng.* **2013**, *16* (1), 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.01.001>.
- (117) Liu, Q.; Luo, G.; Zhou, X. R.; Chen, G. Q. Biosynthesis of Poly(3-Hydroxydecanoate) and 3-Hydroxydodecanoate Dominating Polyhydroxyalkanoates by  $\beta$ -Oxidation Pathway Inhibited Pseudomonas Putida. *Metab. Eng.* **2011**, *13* (1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.004>.
- (118) Valentin, H. E.; Steinbüchel, A. Accumulation of Poly(3-Hydroxybutyric Acid-Co-3-Hydroxyvaleric Acid-Co-4-Hydroxyvaleric Acid) by Mutants and Recombinant Strains of Alcaligenes Eutrophus. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1995**, *3* (3), 169–175. <https://doi.org/10.1007/BF02068468>.
- (119) Roo, G.; Kellerhals, M. B.; Ren, Q.; Witholt, B.; Kessler, B. Production of Chiral R-3-Hydroxyalkanoic Acids and R-3-Hydroxyalkanoic Acid Methyl esters via Hydrolytic Degradation of Polyhydroxyalkanoate Synthesized by Pseudomonads. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *77*. <https://doi.org/10.1002/bit.10134>.
- (120) Sandoval, Á.; Arias-Barrau, E.; Bermejo, F.; Cañedo, L.; Naharro, G.; Olivera, E. R.; Luengo, J. M. Production of 3-Hydroxy-n-Phenylalkanoic Acids by a Genetically Engineered Strain of Pseudomonas Putida. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67* (1), 97–105.

<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1752-x>.

- (121) Zou, X. H.; Li, H. M.; Wang, S.; Leski, M.; Yao, Y. C.; Yang, X. Di; Huang, Q. J.; Chen, G. Q. The Effect of 3-Hydroxybutyrate Methyl Ester on Learning and Memory in Mice. *Biomaterials* **2009**, *30* (8), 1532–1541. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.012>.
- (122) Tieu, K.; Ramasamy, R.; Przedborski, S.; Tieu, K.; Perier, C.; Caspersen, C.; Teismann, P.; Wu, D.; Yan, S.; Naini, A.; Vila, M.; Jackson-lewis, V.; Ramasamy, R.; Przedborski, S. D-β-Hydroxybutyrate Rescues Mitochondrial Respiration and Mitigates Features of Parkinson Disease Find the Latest Version : D-β-Hydroxybutyrate Rescues Mitochondrial Respiration and Mitigates Features of Parkinson Disease. **2003**, *112* (6), 892–901. <https://doi.org/10.1172/JCI200318797.Introduction>.
- (123) Zou, Z.; Sasaguri, S.; Rajesh, K. G.; Suzuki, R. D1-3-Hydroxybutyrate Administration Prevents Myocardial Damage after Coronary Occlusion in Rat Hearts. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2002**, *283* (5), H1968–H1974. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00250.2002>.
- (124) Harażna, K.; Walas, K.; Urbańska, P.; Witko, T.; Snoch, W.; Siemek, A.; Jachimska, B.; Krzan, M.; Napruszewska, B. D.; Witko, M.; Bednarz, S.; Guzik, M. Polyhydroxyalkanoate-Derived Hydrogen-Bond Donors for the Synthesis of New Deep Eutectic Solvents. *Green Chem.* **2019**. <https://doi.org/10.1039/C9GC00387H>.
- (125) Radivojevic, J.; Skaro, S.; Senerovic, L.; Vasiljevic, B.; Guzik, M.; Kenny, S. T.; Maslak, V.; Nikodinovic-Runic, J.; O'Connor, K. E. Polyhydroxyalkanoate-Based 3-Hydroxyoctanoic Acid and Its Derivatives as a Platform of Bioactive Compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100* (1), 161–172. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6984-4>.
- (126) Zhang, X.; Luo, R.; Wang, Z.; Deng, Y.; Chen, G. Q. Application of (R)-3-Hydroxyalkanoate Methyl Esters Derived from Microbial Polyhydroxyalkanoates as Novel Biofuels. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (4), 707–711. <https://doi.org/10.1021/bm801424e>.
- (127) Snoch, W.; Stępień, K.; Prajsnar, J.; Staroń, J.; Szaleniec, M.; Guzik, M. Influence of Chemical Modifications of Polyhydroxyalkanoate-Derived Fatty Acids on Their Antimicrobial Properties. *Catalysts* **2019**, *9* (6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/catal9060510>.
- (128) O'Connor, S.; Szwej, E.; Nikodinovic-Runic, J.; O'Connor, A.; Byrne, A. T.; Devocelle, M.; O'Donovan, N.; Gallagher, W. M.; Babu, R.; Kenny, S. T.; Zinn, M.; Zulian, Q. R.; O'Connor, K. E. The Anti-Cancer Activity of a Cationic Anti-Microbial Peptide Derived from Monomers of Polyhydroxyalkanoate. *Biomaterials* **2013**, *34* (11), 2710–2718. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.032>.
- (129) Szwej, E.; Devocelle, M.; Kenny, S.; Guzik, M.; Connor, S. O.; Nikodinovic-runic, J.; Radivojevic, J.; Maslak, V.; Byrne, A. T.; Gallagher, W. M.; Ren, Q.; Zinn, M.; Connor, K. E. O. The Chain Length of Biologically Produced (R)-3-Hydroxyalkanoic Acid Affects Biological Activity and Structure of Anti-Cancer Peptides. *J. Biotechnol.* **2015**, *204*, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.036>.
- (130) Cerrone, F.; Pozner, T.; Siddiqui, A.; Ceppi, P.; Winner, B.; Rajendiran, M.; Babu, R.; Ibrahim, H. S.; Rodriguez, B. J.; Winkler, J.; Murphy, K. J.; O'Connor, K. E. Polyhydroxyphenylvalerate/Polycaprolactone Nanofibers Improve the Life-Span and Mechanoresponse of Human iPSC-Derived Cortical Neuronal Cells. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *111* (May 2019), 110832. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110832>.
- (131) Sun, Z.; Ramsay, J. A.; Guay, M.; Ramsay, B. A. Carbon-Limited Fed-Batch Production of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates from Nonanoic Acid by *Pseudomonas Putida* KT2440. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74* (1), 69–77. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0655-4>.
- (132) Guzik, M. W.; Duane, G. F.; Kenny, S. T.; Casey, E.; Mielcarek, P.; Wojnarowska, M.;

- O'Connor, K. E. A Polyhydroxyalkanoates Bioprocess Improvement Case Study Based on Four Fed-Batch Feeding Strategies. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15* (3), 996–1006. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13879>.
- (133) Lageveen, R. G.; Huisman, G. W.; Preusting, H.; Ketelaar, P.; Eggink, G.; Witholt, B. Formation of Polyesters by *Pseudomonas Oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54* (12), 2924–2932. <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.2924-2932.1988>.
- (134) Scheiner, D. Determination of Ammonia and Kjeldahl Nitrogen by Indophenol Method. *Water Res.* **1976**, *10* (1), 31–36. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(76\)90154-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(76)90154-8).
- (135) US EPA. Method 365.1, Revision 2.0: Determination of Phosphorus by Semi-Automated Colorimetry. *Environ. Monit. Syst. Lab.* **1993**, No. August, 1–15.
- (136) Sun, Z.; Ramsay, J.; Guay, M.; Ramsay, B. Enhanced Yield of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates from Nonanoic Acid by Co-Feeding Glucose in Carbon-Limited, Fed-Batch Culture. *J. Biotechnol.* **2009**, *143* (4), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.07.014>.
- (137) Curley, J. M.; Lenz, R. W.; Fuller, R. C. Sequential Production of Two Different Polyesters in the Inclusion Bodies of *Pseudomonas Oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *19* (1), 29–34. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(96\)01096-3](https://doi.org/10.1016/0141-8130(96)01096-3).
- (138) Ward, P. G.; O'Connor, K. E. Bacterial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates Containing Aromatic and Aliphatic Monomers by *Pseudomonas Putida* CA-3. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *35* (3–4), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.01.001>.
- (139) Ishii-Hyakutake, M.; Mizuno, S.; Tsuge, T. Biosynthesis and Characteristics of Aromatic Polyhydroxyalkanoates. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10* (11), 1–24. <https://doi.org/10.3390/polym10111267>.
- (140) Lee, S. Y.; Wong, H. H.; Choi, J. Il; Lee, S. H.; Lee, S. C.; Han, C. S. Production of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates by High-Cell-Density Cultivation *Pseudomonas Putida* under Phosphorus Limitation. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68* (4), 466–470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000520\)68:4<466::AID-BIT12>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000520)68:4<466::AID-BIT12>3.0.CO;2-T).
- (141) Sun, Z.; Ramsay, J. A.; Guay, M.; Ramsay, B. Increasing the Yield of MCL-PHA from Nonanoic Acid by Co-Feeding Glucose during the PHA Accumulation Stage in Two-Stage Fed-Batch Fermentations of *Pseudomonas Putida* KT2440. *J. Biotechnol.* **2007**, *132* (3), 280–282. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.023>.
- (142) Davis, R.; Duane, G.; Kenny, S. T.; Cerrone, F.; Guzik, M. W.; Babu, R. P.; Casey, E.; O'Connor, K. E. High Cell Density Cultivation of *Pseudomonas Putida* KT2440 Using Glucose without the Need for Oxygen Enriched Air Supply. *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112* (4), 725–733. <https://doi.org/10.1002/bit.25474>.
- (143) Możejko-Ciesielska, J.; Serafim, L. S. Proteomic Response of *Pseudomonas Putida* KT2440 to Dual Carbon-Phosphorus Limitation during Mcl-PHAs Synthesis. *Biomolecules* **2019**, *9* (12). <https://doi.org/10.3390/biom9120796>.
- (144) Pappalardo, F.; Fragalà, M.; Mineo, P. G.; Damigella, A.; Catara, A. F.; Palmeri, R.; Rescifina, A. Production of Filmable Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates Produced from Glycerol by *Pseudomonas Mediterranea*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *65*, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.014>.
- (145) Hume, A. R.; Nikodinovic-Runic, J.; O'Connor, K. E. FadD from *Pseudomonas Putida* CA-3 Is a True Long-Chain Fatty Acyl Coenzyme A Synthetase That Activates Phenylalkanoic and Alkanoic Acids. *J. Bacteriol.* **2009**, *191* (24), 7554–7565. <https://doi.org/10.1128/JB.01016-09>.

- (146) Wróbel-Kwiatkowska, M.; Żuk, M.; Szopa, J.; Dymińska, L.; Maczka, M.; Hanuza, J. Poly-3-Hydroxy Butyric Acid Interaction with the Transgenic Flax Fibers: FT-IR and Raman Spectra of the Composite Extracted from a GM Flax. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, *73* (2), 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.02.034>.
- (147) López-Cuellar, M. R.; Alba-Flores, J.; Rodríguez, J. N. G.; Pérez-Guevara, F. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) with Canola Oil as Carbon Source. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48* (1), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016>.
- (148) Sharma, P. K.; Munir, R. I.; Blunt, W.; Dartiailh, C.; Cheng, J.; Charles, T. C.; Levin, D. B. Synthesis and Physical Properties of Polyhydroxyalkanoate Polymers with Different Monomer Compositions by Recombinant *Pseudomonas Putida* LS46 Expressing a Novel PHA SYNTHASE (PhaC116) Enzyme. *Appl. Sci.* **2017**, *7* (3). <https://doi.org/10.3390/app7030242>.
- (149) Lima, R. N.; dos Anjos, C. S.; Orozco, E. V. M.; Porto, A. L. M. Versatility of *Candida Antarctica* Lipase in the Amide Bond Formation Applied in Organic Synthesis and Biotechnological Processes. *Mol. Catal.* **2019**, *466* (July 2018), 75–105. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.01.007>.
- (150) Skjold-Jørgensen, J.; Vind, J.; Svendsen, A.; Bjerrum, M. J. Understanding the Activation Mechanism of *Thermomyces Lanuginosus* Lipase Using Rational Design and Tryptophan-Induced Fluorescence Quenching. *October* **2013**, 1–44.
- (151) De Rosa, M.; Vigliotta, G.; Palma, G.; Saturnino, C.; Soriente, A. Novel Penicillin-Type Analogues Bearing a Variable Substituted 2-Azetidinone Ring at Position 6: Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* **2015**, *20* (12), 22044–22057. <https://doi.org/10.3390/molecules201219828>.
- (152) Waghmare, A. A.; Hindupur, R. M.; Pati, H. N. Propylphosphonic Anhydride ( T3P ® ): An Expedient Reagent for Organic Synthesis 1. **2014**, *4* (2), 53–131. <https://doi.org/10.1134/S2079978014020034>.
- (153) Dunetz, J. R.; Magano, J.; Weisenburger, G. A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20* (2), 140–177. <https://doi.org/10.1021/op500305s>.
- (154) Dunetz, J. R.; Xiang, Y.; Baldwin, A.; Ringling, J. General and Scalable Amide Bond Formation with Epimerization-Prone Substrates Using T3P and Pyridine. *Org. Lett.* **2011**, *13* (19), 5048–5051. <https://doi.org/10.1021/ol201875q>.
- (155) Hermanson, G. T. Zero-Length Crosslinkers. *Bioconjugate Tech.* **2013**, 259–273. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382239-0.00004-2>.
- (156) Novosjolova, I. The Mukaiyama Reagent: An Efficient Condensation Agent Compiled. *SPOTLIGHT* **2013**, *24*, 135–136. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1317530>.
- (157) Crosignani, S.; Gonzalez, J.; Swinnen, D. Polymer-Supported Mukaiyama Reagent : A Useful Coupling Reagent for the Synthesis of Esters and Amides. **2004**, No. c, 3401–3404.
- (158) Lam, J. C. *Name Reactions, A Collection of Detailed Mechanisms and Synthetic Applications*.
- (159) Jordan, A.; Whymark, K. D.; Sydenham, J.; Sneddon, H. F. A Solvent-Reagent Selection Guide for Steglich- Type Esterification of Carboxylic Acids. **2021**, 6405–6413. <https://doi.org/10.1039/d1gc02251b>.
- (160) Casas, A.; Ramos, M. J.; Pérez, ángel. Adsorption Equilibrium and Kinetics of Methyl Acetate/Methanol and Methyl Acetate/Water Mixtures on Zeolite 5A. *Chem. Eng. J.* **2013**, *220*, 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.01.042>.
- (161) Torre, O.; Gotor-Fernández, V.; Alfonso, I.; García-Alles, L. F.; Gotor, V. Study of the

- Chemoselectivity in the Aminolysis Reaction of Methyl Acrylate Catalysed by Lipase B from *Candida Antarctica*. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347 (7–8), 1007–1014. <https://doi.org/10.1002/adsc.200505025>.
- (162) García Liñares, G.; Arroyo Mañez, P.; Baldessari, A. Lipase-Catalyzed Synthesis of Substituted Phenylacetamides: Hammett Analysis and Computational Study of the Enzymatic Aminolysis. *European J. Org. Chem.* **2014**, 2014 (29), 6439–6450. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201402749>.
- (163) Yildirim, D.; Tükel, S. S. Asymmetric Ammonolysis of (R/S)-Mandelic Acid by Immobilized Lipases via Direct Amidation of Mandelic Acid in Biphasic Media. *Biocatal. Biotransformation* **2014**, 32 (5–6), 251–258. <https://doi.org/10.3109/10242422.2014.971120>.
- (164) Paál, T. A.; Forró, E.; Liljeblad, A.; Kanerva, L. T.; Fülöp, F. Lipase-Catalyzed Kinetic and Dynamic Kinetic Resolution of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-1-Carboxylic Acid. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, 18 (12), 1428–1433. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2007.05.016>.
- (165) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, 29 (9), 2176–2179. <https://doi.org/10.1021/om100106e>.
- (166) Takeda, M.; Miyanoiri, Y.; Terauchi, T.; Yang, C. J.; Kainosho, M. Use of H/D Isotope Effects to Gather Information about Hydrogen Bonding and Hydrogen Exchange Rates. *J. Magn. Reson.* **2014**, 241 (1), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2013.10.001>.
- (167) Swaminathan, J.; Ramalingam, M.; Sethuraman, V.; Sundaraganesan, N.; Sebastian, S.; Kurt, M. FT-IR, FT-Raman, Ab Initio and DFT Structural and Vibrational Frequency Analysis of 6-Aminopenicillanic Acid. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2010**, 75 (1), 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.10.010>.
- (168) Egbele, R. O.; Ohwofosirai, A.; Ugbune, U.; Kpomah, B.; Yerima, I. .; Osakwe, S. A.; Nwajei, G. E. Synthesis and Characterization of Mixed 1 , 10- Phenanthroline and Penicillin G Procaine Metal ( II ) Complexes. **2020**, 5 (6), 266–272.
- (169) Karpagam, J.; Sundaraganesan, N.; Sebastian, S.; Manoharan, S.; Kurt, M. Molecular Structure, Vibrational Spectroscopic, First-Order Hyperpolarizability and HOMO, LUMO Studies of 3-Hydroxy-2-Naphthoic Acid Hydrazide. *J. Raman Spectrosc.* **2010**, 41 (1), 53–62. <https://doi.org/10.1002/jrs.2408>.
- (170) Magdalena, W.; Kowalska, P.; Masnyk, M.; Górecki, M.; Kwit, M.; Furche, F.; Frelek, J. Stereochemical Assingment of B-Lactam Antibiotics and Their Analogues by Electronic Circular Dichroism Spectroscopy. **2010**, 1976, 1022–1036.
- (171) Purdie, N.; Swallows, K. A. Direct Determination of B-Lactam Antibiotics by Circular Dichroism. **1987**, 1349–1351.
- (172) A. L. Demain and N. A. Solomon. *Handbook of Experimental Pharmacology*; 1983.
- (173) Rahman, N.; Khan, S. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Circular Dichroism Spectroscopy : An Ef Fi Cient Approach for the Quantitation of Ampicillin in Presence of Cloxacillin. **2016**, 160, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.02.009>.
- (174) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. *Version 12.0*, 2022. <http://www.eucast.org>.
- (175) Tsuneo Kada; Sadaie, Y.; Sakamoto, Y.; Koichi, H. *Use of the Bacillus Subtilis Rec-Assay in Environmental Mutagen Studies*; 1984; Vol. 31.
- (176) Grabińska-Sota, E.; Winiowska, E.; Kalka, J.; Cieranka, B. Genotoxicological Effects of Some Phenoxyherbicides and Their Metabolites on Bacillus Subtilis M45 Rec- and H17 Rec+ Strains.

*Chemosphere* **2002**, *47* (1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00211-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00211-9).

- (177) Stefańska, J.; Stepień, K.; Bielenica, A.; Wrzosek, M.; Struga, M. Antistaphylococcal Activity of Selected Thiourea Derivatives. *Polish J. Microbiol.* **2016**, *65* (4), 451–460. <https://doi.org/10.5604/17331331.1227671>.
- (178) Tamm, C.; Galitó, S. P.; Annerén, C. A Comparative Study of Protocols for Mouse Embryonic Stem Cell Culturing. *PLoS One* **2013**, *8* (12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081156>.
- (179) Kwolek-Mirek, M.; Zadrag-Tecza, R. Comparison of Methods Used for Assessing the Viability and Vitality of Yeast Cells. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14* (7), 1068–1079. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>.



## Spis tabel

<b>Tabela 1.</b> Enzymy zaangażowane w biosyntezę PHA.....	27
<b>Tabela 2.</b> Enzymy biorące udział w biosyntezie mcl-PHA.....	30
<b>Tabela 3.</b> Porównanie strategii biosyntezy P(3HN) oraz P(3H5PV).....	35
<b>Tabela 4.</b> Skład podłoża mineralnego MSM.....	36
<b>Tabela 5.</b> Skład roztworu wzbogacającego w mikroelementy (sporządzone na podstawie pracy Sun Z. i współautorów <sup>131</sup> ).....	36
<b>Tabela 6.</b> Początkowe parametry hodowli reaktorowej szczepu <i>P. putida</i> KT2440.....	38
<b>Tabela 7.</b> Gradient faz mobilnych wykorzystany w metodzie rozdziału produktów.....	45
<b>Tabela 8.</b> Parametry źródła jonów.....	45
<b>Tabela 9.</b> Parametry widm masowych charakteryzowanych produktów syntez.....	46
<b>Tabela 10.</b> Charakterystyka modyfikatorów kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez analizę UHPLC-MS/MS, <sup>1</sup> H-NMR, IR oraz CD.....	53
<b>Tabela 11.</b> Parametry widm masowych charakteryzowanych produktów syntez.....	74
<b>Tabela 12.</b> Rezultaty optymalizacji warunków reakcji pomiędzy estrem 6-APA (9), a 3-hydroksykwasami wymienionymi w tabeli, przy zastosowaniu wybranych odczynników kondensujących.....	75
<b>Tabela 13.</b> Ocena zależności biosyntezy pochodnych 6-APA (10b, 11b, 12b) od zastosowanego rozpuszczalnika organicznego, katalizowanej przez lipazę CalB lub TL-IM w temperaturze 30°C.....	77
<b>Tabela 14.</b> Ocena zależności biosyntezy pochodnych 6-APA (10b, 11b, 12b) od zastosowanego typu związku chemicznego (ester metylowy lub kwas karboksylowy), katalizowanej przez lipazę CalB lub TL-IM w temperaturze 30°C.....	77
<b>Tabela 15.</b> Średnia wydajność reakcji biosyntezy wiązania amidowego pomiędzy estrem benzylovym kwasu 6-APA, a estrami metylowymi rac-3-hydroksykwasów (1b, 2b, 3b) katalizowana lipazą CalB lub TL-IM w toluenie oraz acetonitrylu przy zastosowaniu różnych temperatur.....	78
<b>Tabela 16.</b> Średnia wydajność reakcji biosyntezy wiązania amidowego pomiędzy estrem benzylovym kwasu 6-APA, a estrami metylowymi R-3-hydroksykwasów (1a, 2a, 3a) lub rac-3-hydroksykwasów (1b, 2b, 3b) katalizowana lipazą TL-IM w toluenie przy 15°C.....	80
<b>Tabela 17.</b> Charakterystyka otrzymanych penicylin jako estry benzylove oraz sole sodowe poprzez analizę UHPLC-MS/MS, <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR, FT-IR oraz CD. W tabeli zamieszczono też najwyższą uzyskaną wydajność syntezy tych związków.....	80
<b>Tabela 18.</b> Szczepy bakteryjne wykorzystane do wyznaczenia potencjału przeciwbakteryjnego nowych pochodnych 6-APA.....	93
<b>Tabela 19.</b> Minimalne stężenie hamujące oraz minimalne stężenie bakteriobójcze nowych pochodnych 6-APA względem bakterii Gram-dodatnich. Antybiotykiem referencyjnym była Penicylina G (PenG).....	100
<b>Tabela 20.</b> Minimalne stężenie hamujące oraz minimalne stężenie bakteriobójcze nowych pochodnych 6-APA względem bakterii Gram-ujemnych. Antybiotykiem referencyjnym była ampicylina (AMP).....	101

## Spis ilustracji

<b>Rysunek 1.</b> Podstawowa struktura chemiczna antybiotyków $\beta$ -laktamowych .....	8
<b>Rysunek 2.</b> Różnice w budowie ściany komórkowej u bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Rysunek sporządzony przy wykorzystaniu programu Biorender.....	12
<b>Rysunek 3.</b> Strukturalne podobieństwo penicylin oraz D-alanylo-D-alaniny. Rysunek sporządzono na podstawie pracy Lima et al. <sup>5</sup> .....	13
<b>Rysunek 4.</b> Mechanizm hydrolizy penicylin przez $\beta$ -laktamazy serynowe (klasa A, C oraz D). Rysunek sporządzony na podstawie pracy Brem et al. <sup>34</sup> .....	15
<b>Rysunek 5.</b> Penicyliny z różnymi grupami bocznymi ze wskazaniem ich głównego spektrum działania .....	17
<b>Rysunek 6.</b> Struktury chemiczne głównych inhibitorów $\beta$ -laktamaz.....	18
<b>Rysunek 7.</b> Schemat budowy granulki PHA zlokalizowanej w cytoplazmie bakterii.....	20
<b>Rysunek 8.</b> Schemat budowy chemicznej PHA, będącego homopolimerem, gdzie: R-grupa boczna zawierająca od 1–13 atomów węgla, n = 1, 2 lub 3, m = 600–35000. <sup>180</sup> .....	22
<b>Rysunek 9.</b> Główni przedstawiciele monomerów wchodzących w skład polihydroksyalcanianów krótkołańcuchowych (scl-PHA), średniołańcuchowych (mcl-PHA) oraz długołańcuchowych (lcl-PHA), 3HB-kwas 3-hydroksymasłowy, 3HV-kwas 3-hydroksywalerianowy, 3HHp-kwas 3-hydroksyseptanowy, 3HN-kwas 3-hydroksynonanowy, 3HDD-kwas 3-hydroksydodekanowy, 3HTD-kwas 3-hydroksytetradekanowy, 3HPD-kwas 3-hydrokspentadekanowy, 3HHxD-kwas 3-hydrokshexadekanowy. ....	23
<b>Rysunek 10.</b> Główne szlaki biosyntezy scl-PHA w komórce bakteryjnej z uwzględnieniem różnych źródeł węgla występujących w środowisku. Literami oznaczono wybrane ścieżki biosyntezy, a liczbami od 1 do 19 enzymy biorące udział w poszczególnych przemianach. Pełne nazwy enzymów oraz ich skróty umieszczono w Tabeli 1. Schemat przygotowano w oparciu o prace Tan et al. 2014 <sup>62</sup> , Meng et al. 2014 <sup>83</sup> oraz Lu et al. 2009 <sup>100</sup> i wykonano w programie BioRender. ....	26
<b>Rysunek 11.</b> Główne szlaki biosyntezy mcl-PHA w komórce bakteryjnej z uwzględnieniem różnych źródeł węgla występującego w środowisku. Literami oznaczono wybrane ścieżki biosyntezy, a liczbami enzymy biorące udział w poszczególnych przemianach. Pełne nazwy enzymów oraz ich skróty umieszczono w Tabeli 2. Schemat przygotowano w oparciu o prace Tan et al., <sup>62</sup> Meng et al., <sup>83</sup> Możejko-Ciesielska i Kiewisz. <sup>86</sup> Ilustracja wykonana w programie BioRender. ....	29
<b>Rysunek 12.</b> Schemat otrzymywania modyfikatorów kwasu 6-aminopenicylanowego na drodze biosyntezy oraz syntezy chemicznej. ....	35
<b>Rysunek 13.</b> Schemat depolimeryzacji polimeru PHA podczas reakcji kwaśnej metanolizy oraz struktury monomerów PHA otrzymanych w tym procesie. 1a-ester metylowy kwasu (R)-3-hydroksynonanowego, 2a-ester metylowy kwasu (R)-3-hydroksyseptanowego, 3a-ester metylowy kwasu (R)-3-hydroksy-5-fenyłowalerianowego. ....	41
<b>Rysunek 14.</b> Schemat reakcji otrzymywania mieszaniny racemicznej estrów metylowych 3-hydroksykwasów; 1b-ester metylowy kwasu 3-hydroksynonanowego, 2b-ester metylowy kwasu 3-hydroksyseptanowego, 3b-ester metylowy kwasu 3-hydroksy-5-fenyłowalerianowego. ....	42
<b>Rysunek 15.</b> Schemat otrzymywania 3-hydroksykwasów w reakcji zmydlania oraz wzory strukturalne otrzymanych produktów. 4a-kwas (R)-3-hydroksynonanowy, 4b-kwas rac-3-hydroksynonanowy, 5a-kwas (R)-3-	

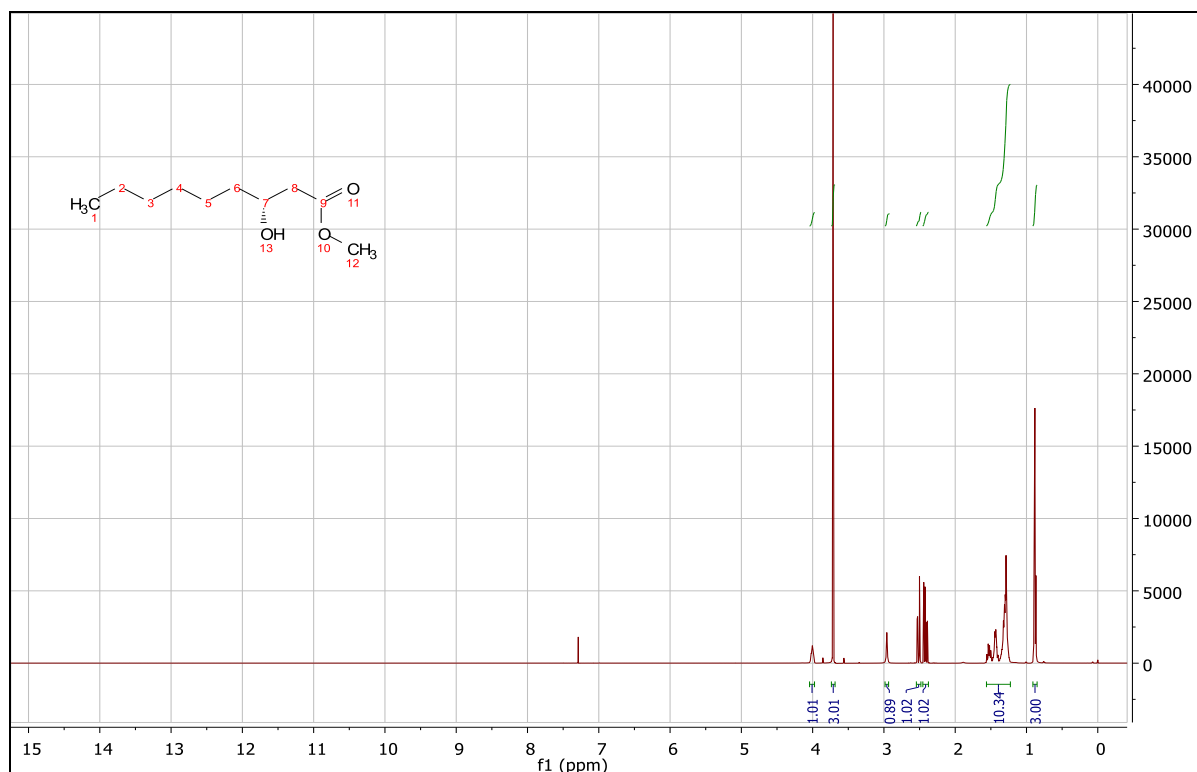
hydroksyheptanowy, 5b-kwas rac-3-hydroksyheptanowy, 6a-kwas (R)-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy, 6b-kwas rac-3-hydroksy-5-fenylwalerianowy.....	43
<b>Rysunek 16.</b> Wzrost <i>P. putida</i> KT2440 w 5-litrowym bioreaktorze Sartorius Biostat B w medium MSM z limitowaną ilością fosforanów. Oznaczenie suchej masy bakteryjnej (CDW) ( $\text{g L}^{-1}$ , ●), udziału P(3HN) w komórce (% z CDW, ▲), zawartości P(3HN) w hodowli ( $\text{g L}^{-1}$ , ■), stężenia fosforanów w medium ( $\text{g}_\text{P} \text{L}^{-1}$ , ◆), stężenia azotanów w medium ( $\text{g}_\text{N} \text{L}^{-1}$ , ♦) zmieniających się w jednostce czasu.....	48
<b>Rysunek 17.</b> Rozkład monomerów P(3HN) w polimerze produkowanym przez bakterie <i>P. putida</i> KT2440 w czasie trwania hodowli.....	52
<b>Rysunek 18.</b> Widmo CD kwasu (R)-3-hydroksynonanowego (4a) oraz rac-3-hydroksynonanowego (4b) w metanolu w 298K.....	58
<b>Rysunek 19.</b> Schemat przebiegu otrzymywania nowych penicylin drogą syntezy chemicznej oraz biosyntezy enzymatycznej.....	62
<b>Rysunek 20.</b> Schemat przebiegu reakcji otrzymywania estru benzyłowego kwasu 6-aminopenicylanowego.....	63
<b>Rysunek 21.</b> Schemat przebiegu reakcji syntezy estrów benzyłowych penicylin zmodyfikowanych 3-hydroksykwasami przy wykorzystaniu odczynnika kondensującego T3P.....	64
<b>Rysunek 22.</b> Schemat przebiegu reakcji syntezy estrów benzyłowych penicylin zmodyfikowanych 3-hydroksykwasami przy wykorzystaniu odczynnika kondensującego DCC.....	65
<b>Rysunek 23.</b> Schemat przebiegu reakcji syntezy estrów benzyłowych penicylin zmodyfikowanych 3-hydroksykwasami przy wykorzystaniu odczynnika kondensującego HATU.....	66
<b>Rysunek 24.</b> Schemat przebiegu reakcji syntezy estrów benzyłowych penicylin zmodyfikowanych 3-hydroksykwasami przy wykorzystaniu odczynnika kondensującego Mukaiyama.....	67
<b>Rysunek 25.</b> Schemat przebiegu reakcji aminolizy katalizowanej przez lipazę. Rysunek sporządzono na podstawie pracy Lima et al. <sup>149</sup> w programie BioRender.....	68
<b>Rysunek 26.</b> Schemat przebiegu reakcji otrzymywania soli sodowej penicylin z wykorzystaniem katalizatora palladowego.....	72
<b>Rysunek 27.</b> Widma FT-IR związków występujących w ścieżce syntezy penicyliny 13a. Przerywaną linią zaznaczono pasma charakterystyczne dla grup funkcyjnych substratów oraz produktów, które pojawiają się/znikają na kolejnych etapach syntezy.....	86
<b>Rysunek 28.</b> Porównanie widm CD kwasów (R)-3-hydroksynonanowego i rac-3-hydroksynonanowego oraz estrów penicylin oraz penicylin zmodyfikowanych przez te kwasy. Linią przerywaną zaznaczono enancjomer R monomeru PHA (4a), ester benzyłowy penicyliny zmodyfikowanej kwasem 4a (10a) oraz sól sodową powstałą przez odbezpieczenie estru 10a (13a). Linią ciągłą oznaczono mieszaninę racemiczną rac-3-hydroksynonanianu (4b), ester benzyłowy penicyliny zmodyfikowanej przez 4b oraz produkt końcowy 13b.....	89
<b>Rysunek 29.</b> Przykładowy wynik testu dyfuzyjno – krążkowego dla <i>Staphylococcus epidermidis</i> ŁDZ12 i trzech pochodnych 6-APA (zdjęcie po prawej) oraz rezultat badanie minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) dla jednego ze związków.....	91
<b>Rysunek 30.</b> Schemat metody minimalnego stężenia hamującego oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego przeprowadzanego przy ocenie potencjału przeciwbakteryjnego dla nowych β-laktamów.....	94
<b>Rysunek 31.</b> Strefy zahamowania wzrostu wyznaczone dla bakterii Gram-dodatnich w teście dyfuzyjno-krążkowym. Średnica krążka – 9 mm.....	97

<b>Rysunek 32.</b> Strefy zahamowania wzrostu wyznaczone dla bakterii Gram-ujemnych w teście dyfuzyjno-krażkowym. Średnica krążka – 9 mm .....	98
<b>Rysunek 33.</b> Strefy zahamowania wzrostu szczepów <i>Bacillus subtilis</i> H17 (rec+) oraz <i>Bacillus subtilis</i> (rac-) przez otrzymane pochodne 6-APA z wyznaczoną różnicą średnic stref występującą między nimi. ....	103
<b>Rysunek 34.</b> Żywotność komórek MEF 3T3 po 24 h inkubacji w pożywce zawierającej badane pochodne 6-APA w stężeniu $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ oraz $256 \mu\text{g mL}^{-1}$ .....	104
<b>Rysunek 35.</b> Wyniki testu kolorymetrycznego określającego zawartość fosforanów w próbkach z hodowli reaktorowej <i>Pseudomonas putida</i> KT2440. ....	148

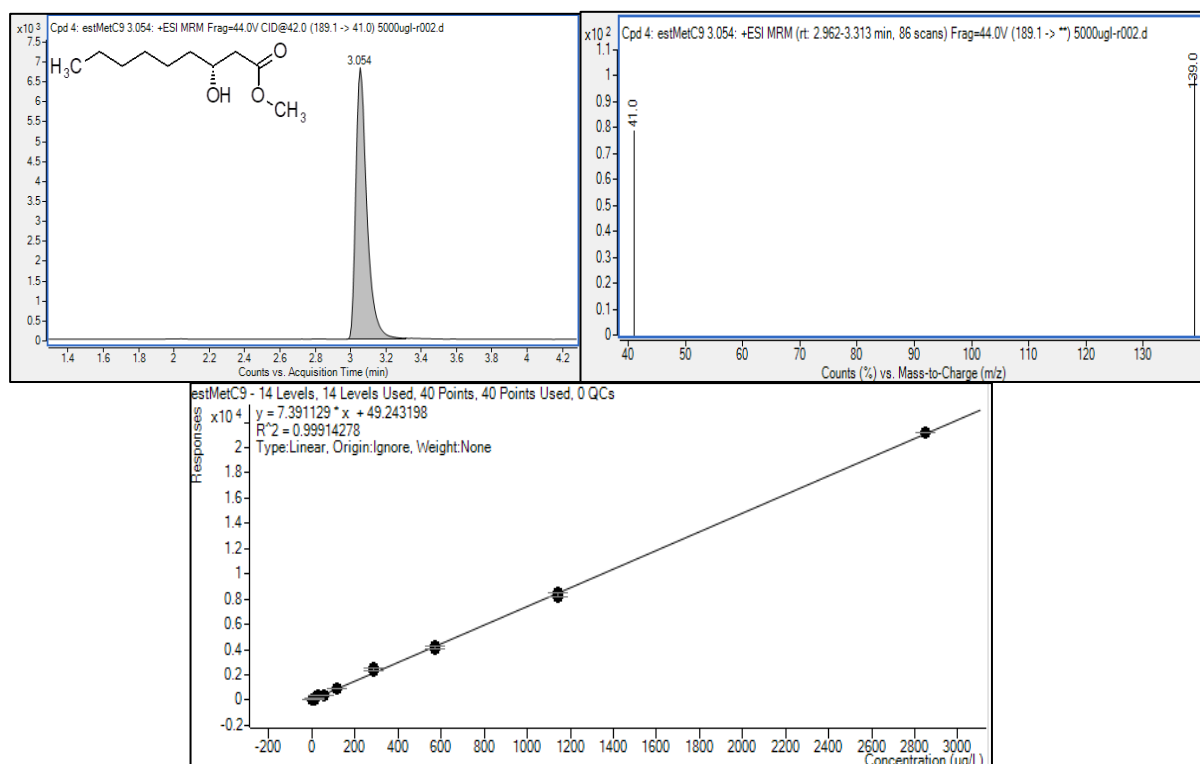
## Supplement

### Ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksynonanowego (1a):

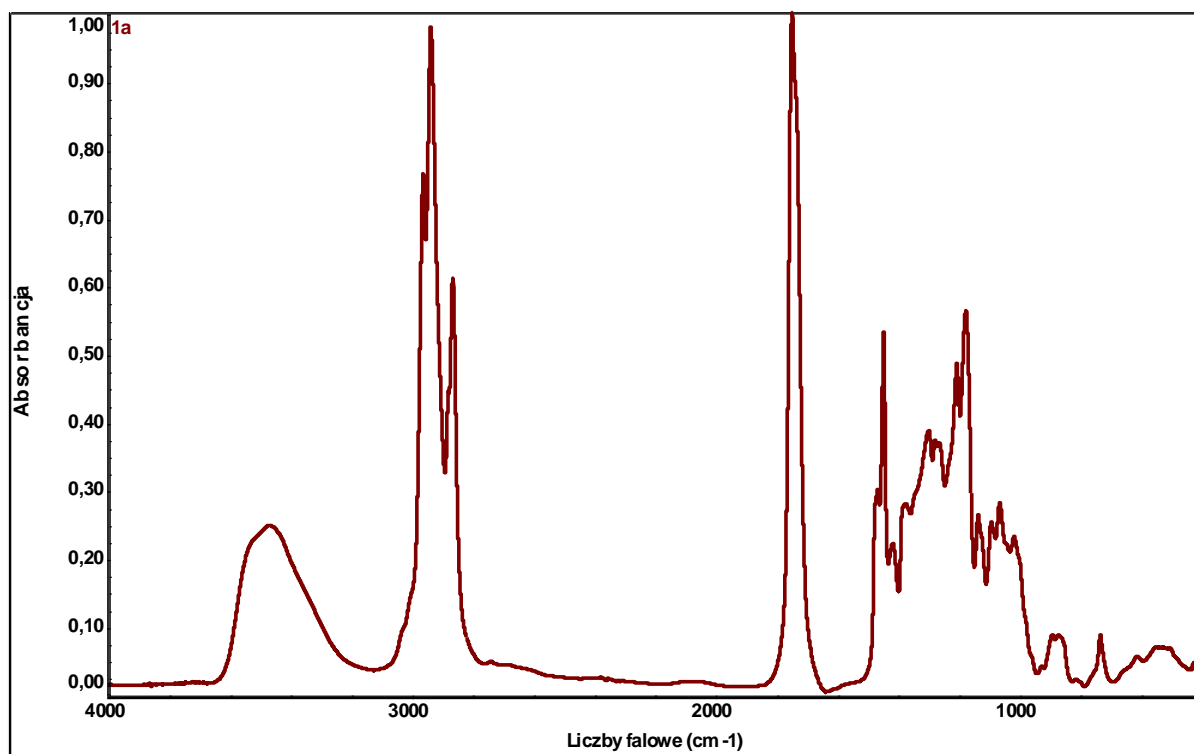
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



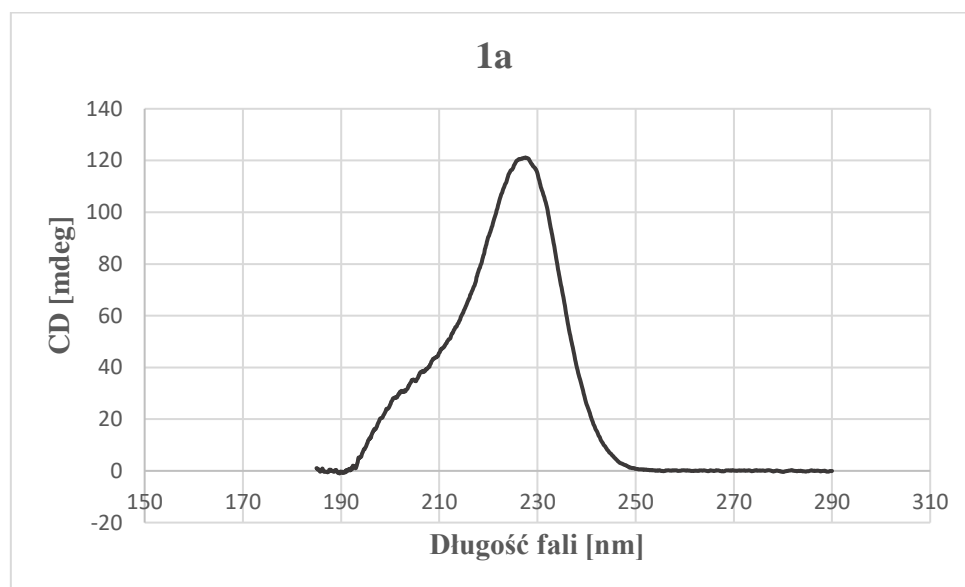
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

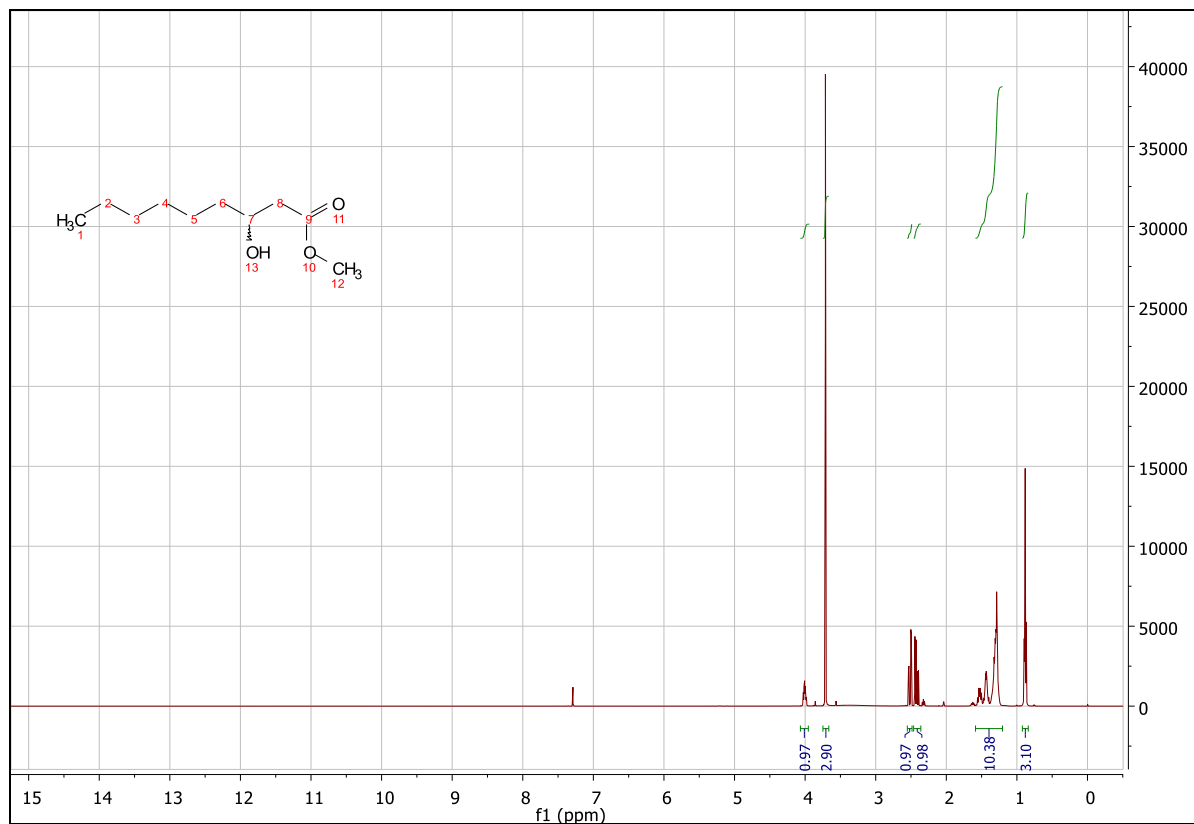


Widmo CD:

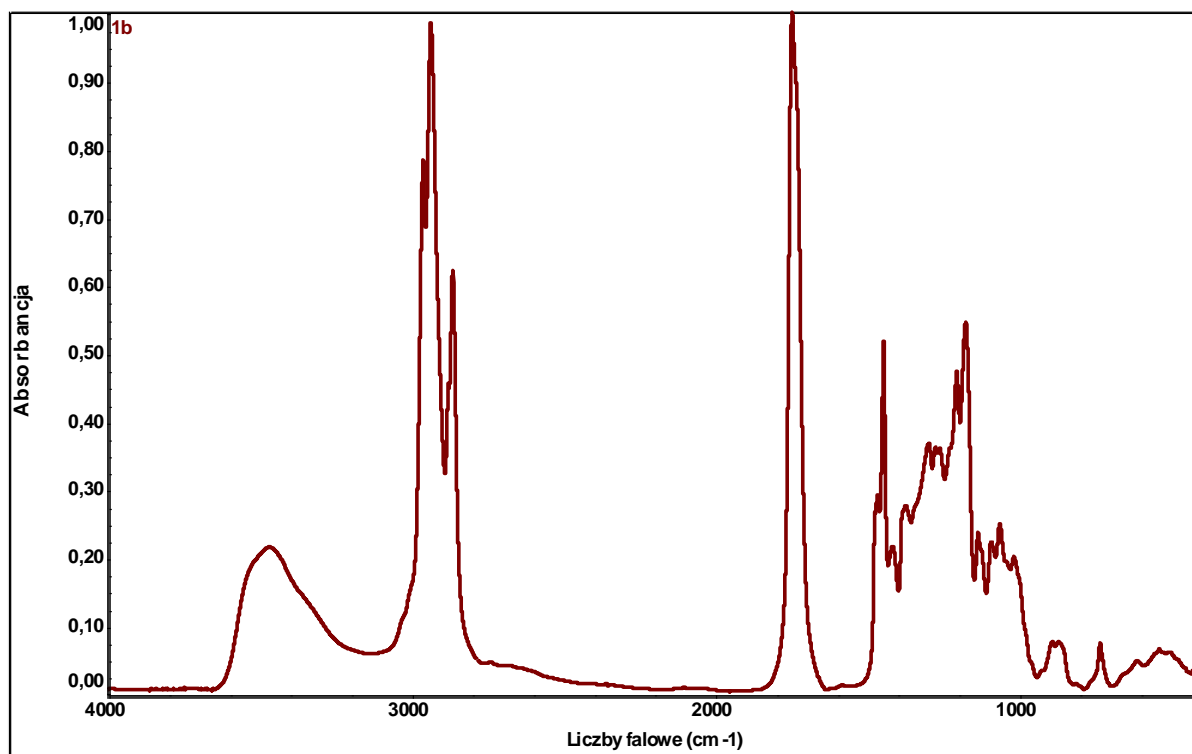


## Ester metylowy kwasu 3-*rac*-hydroknonanowego (1b)

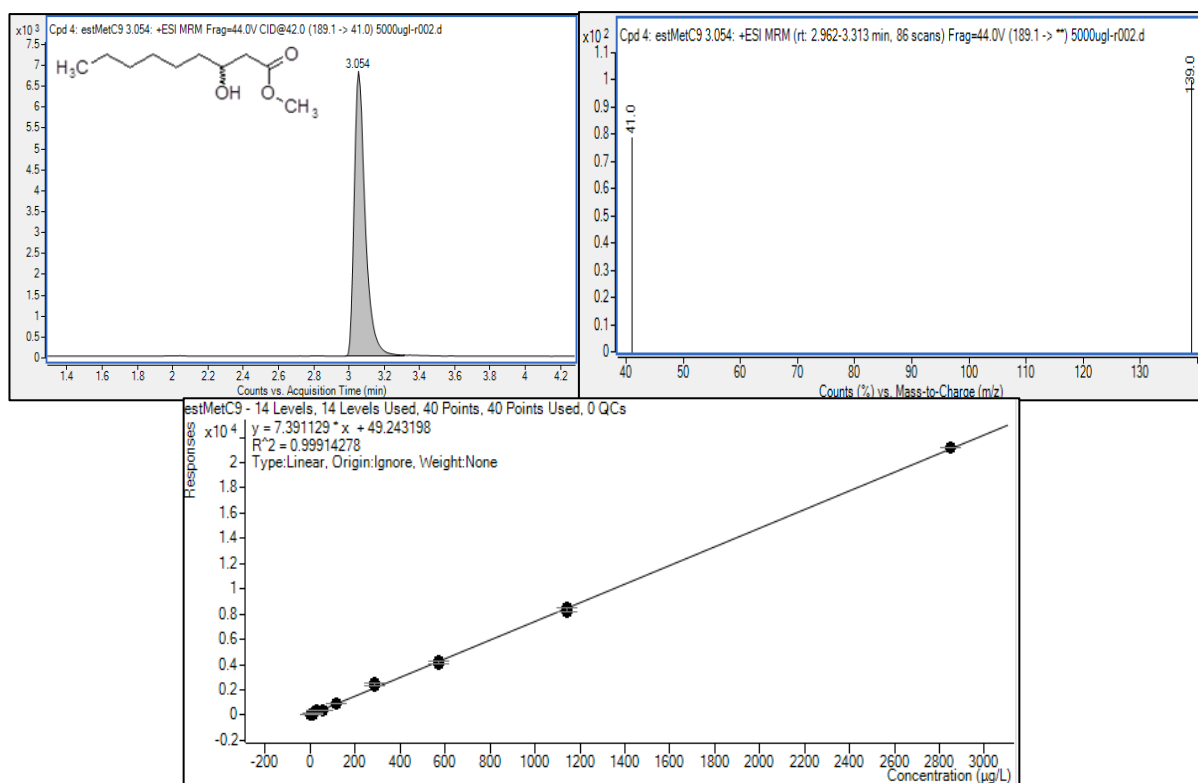
Widmo  $^1\text{H-NMR}$ :



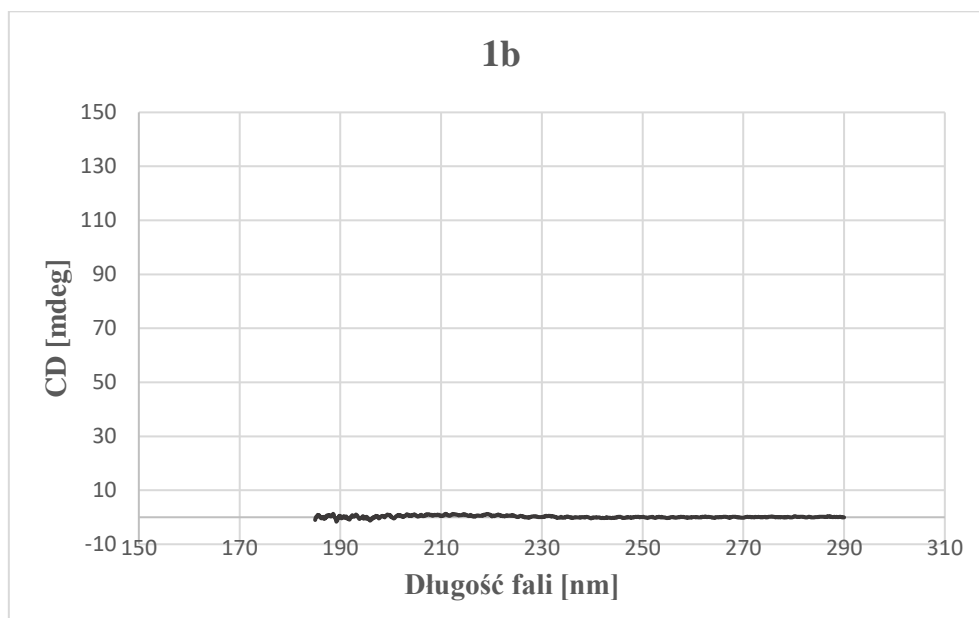
Widmo IR:



## Widmo MS/MS



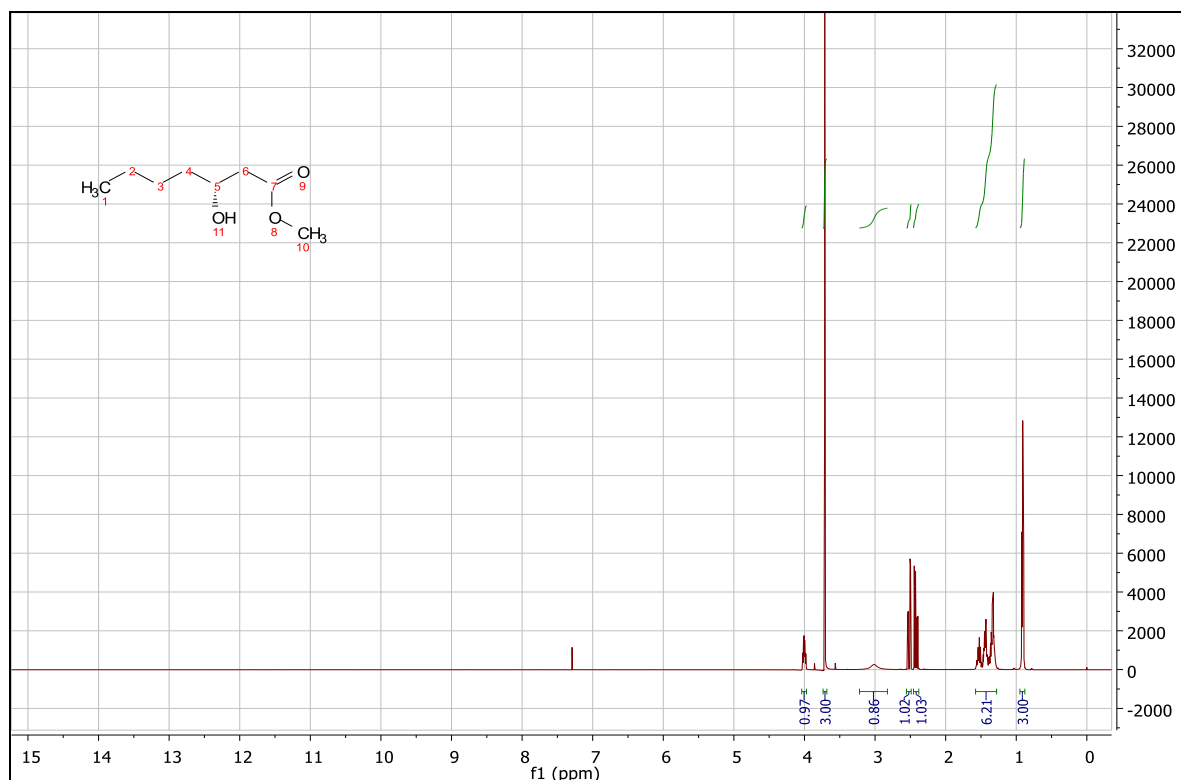
## Widmo CD:



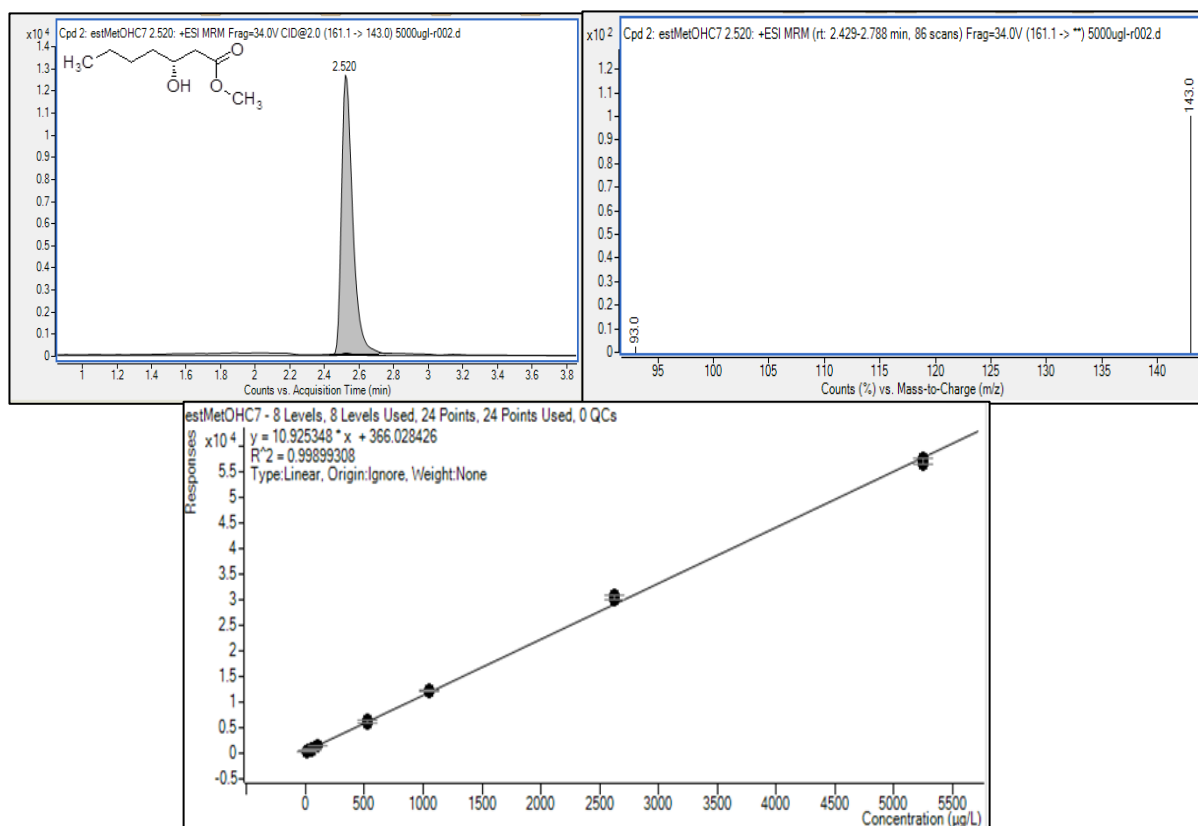


## Ester metylowy kwasy (R)-3-hydroksyhaptanowego (2a)

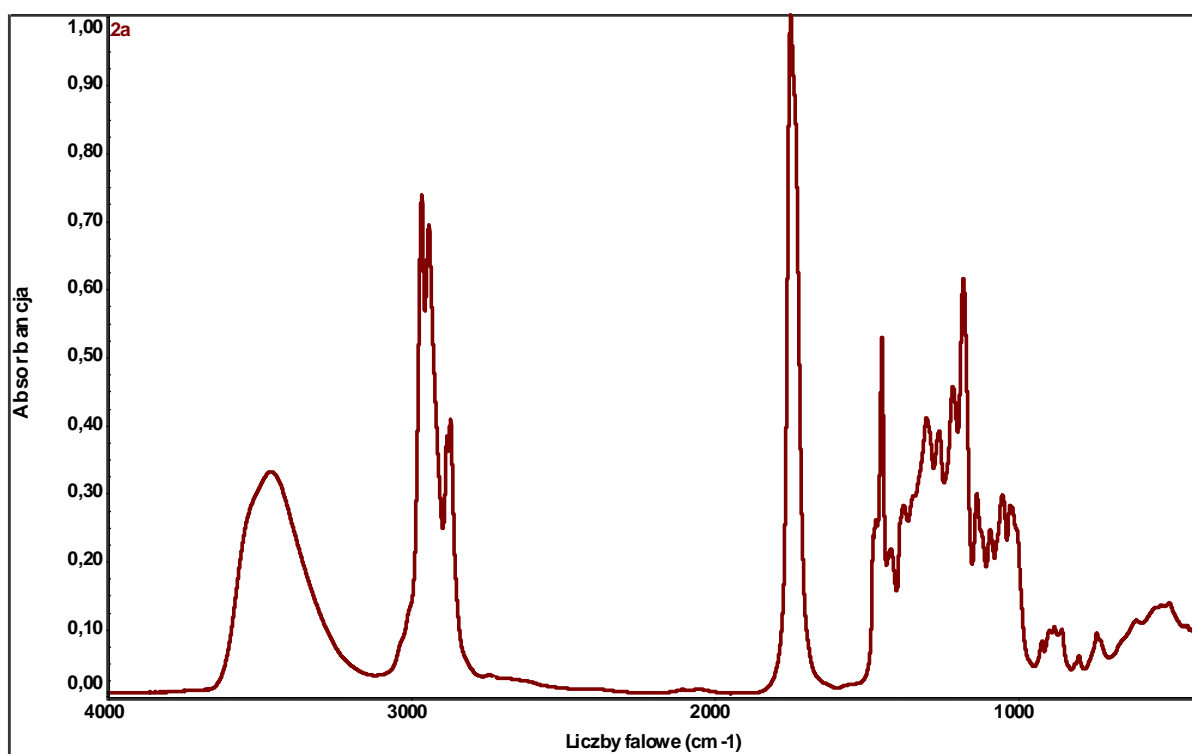
Widmo  $^1\text{H-NMR}$ :



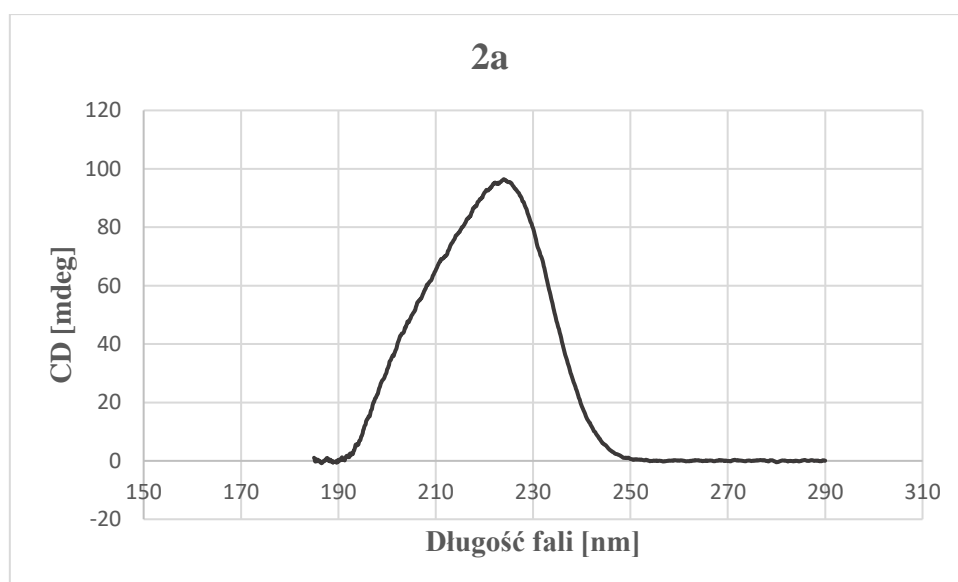
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

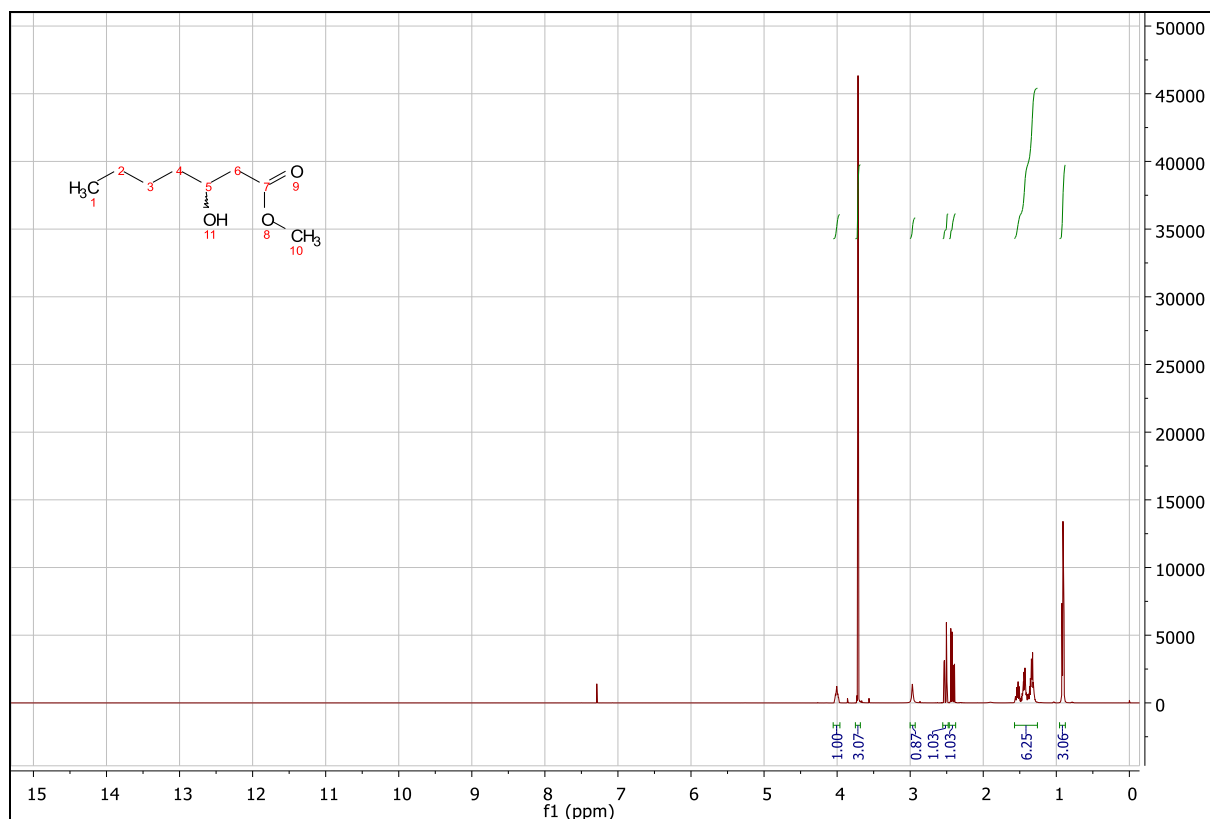


Widmo CD:

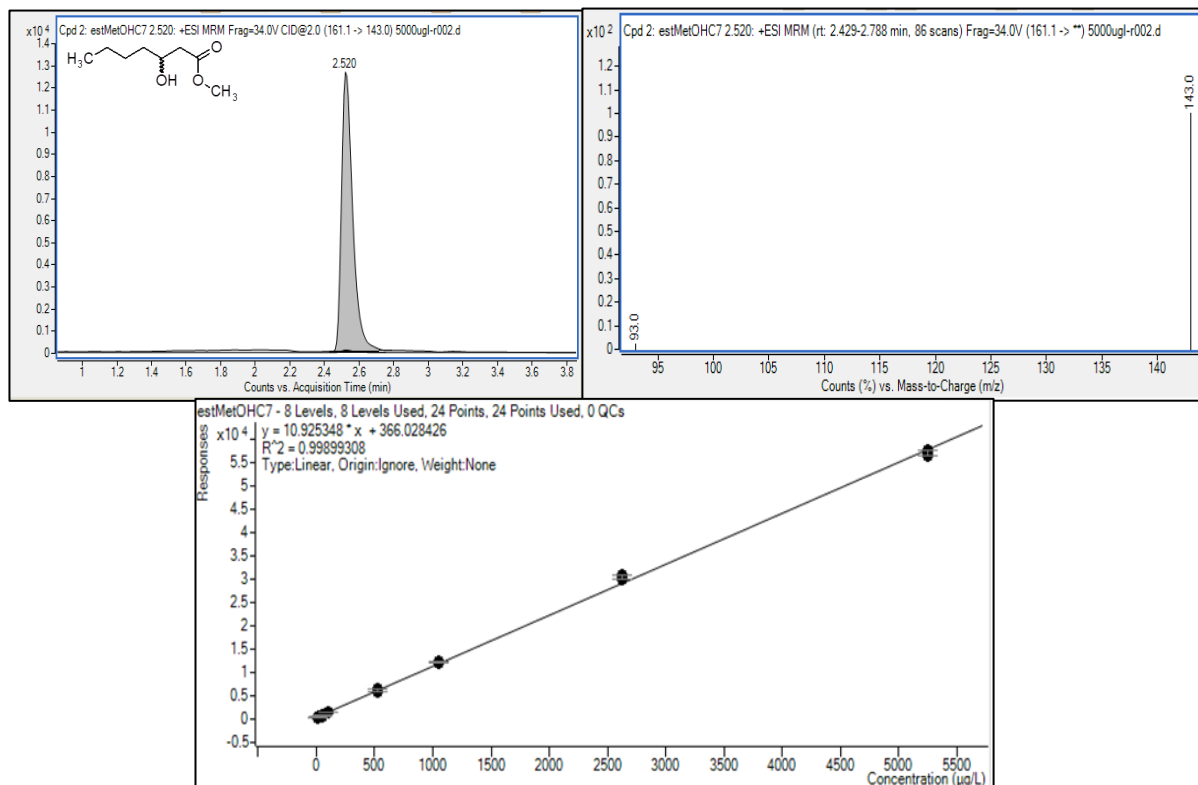


## Ester metylowy kwasy 3-*rac*-hydroksyhaptanowego (2b):

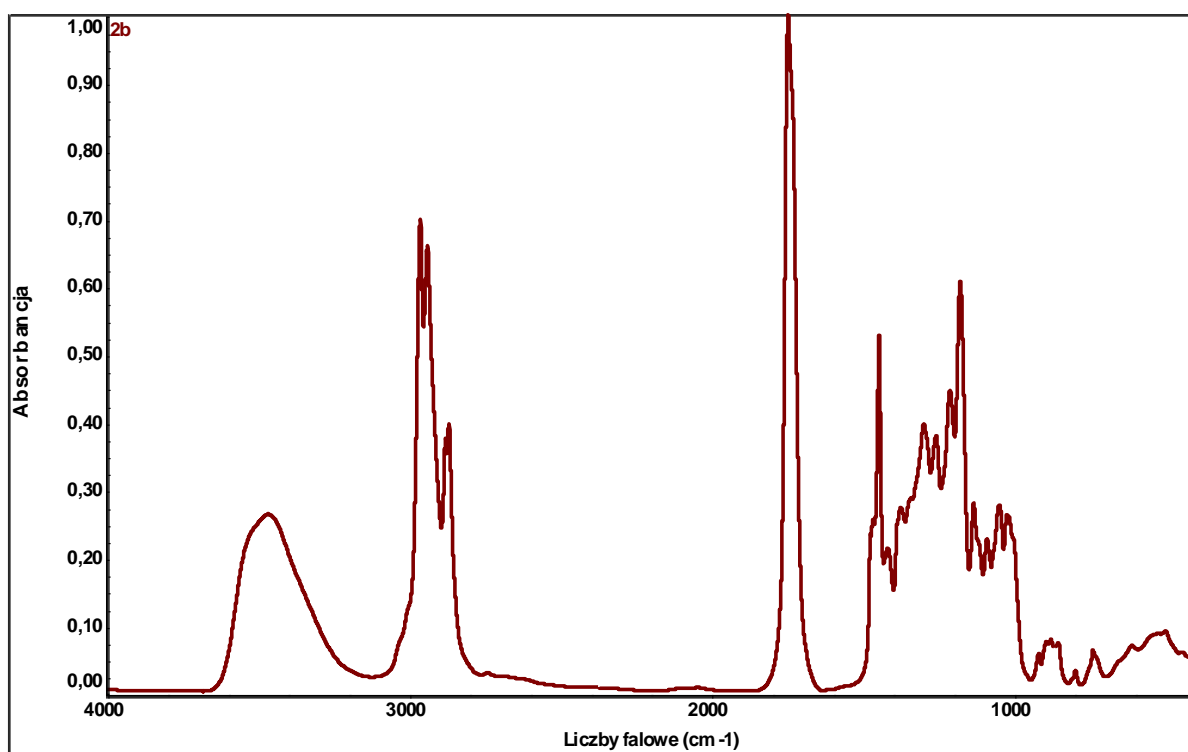
Widmo  $^1\text{H-NMR}$ :



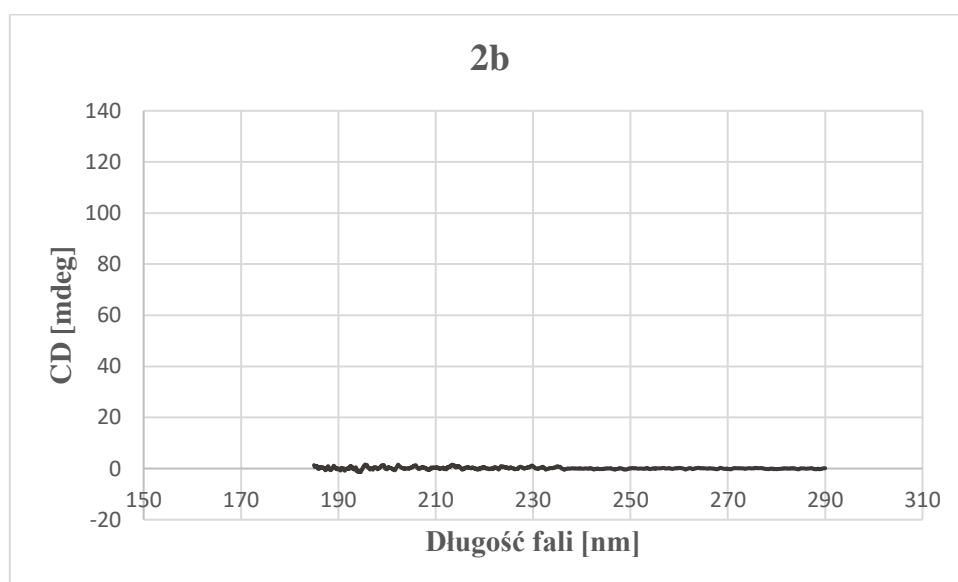
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

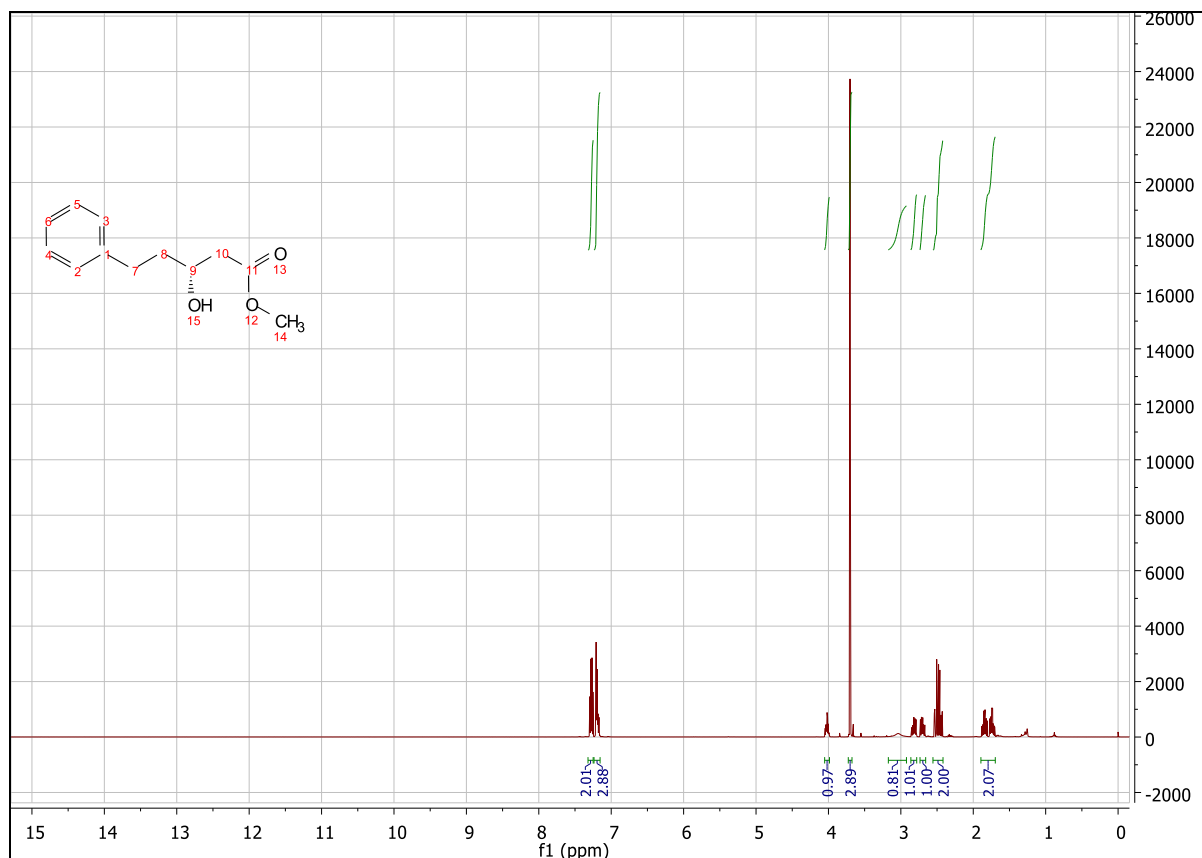


Widmo CD:

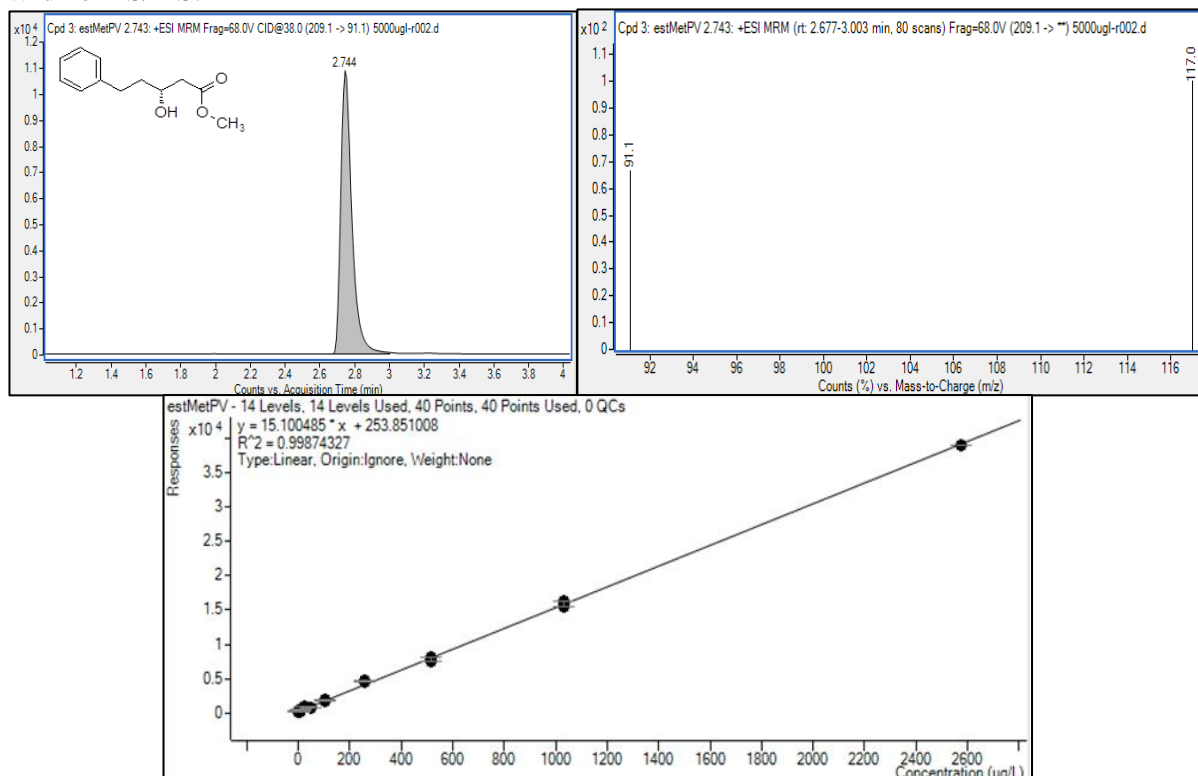


## Ester metylowy kwasu (*R*)-3-hydroksywalerianowego (3a):

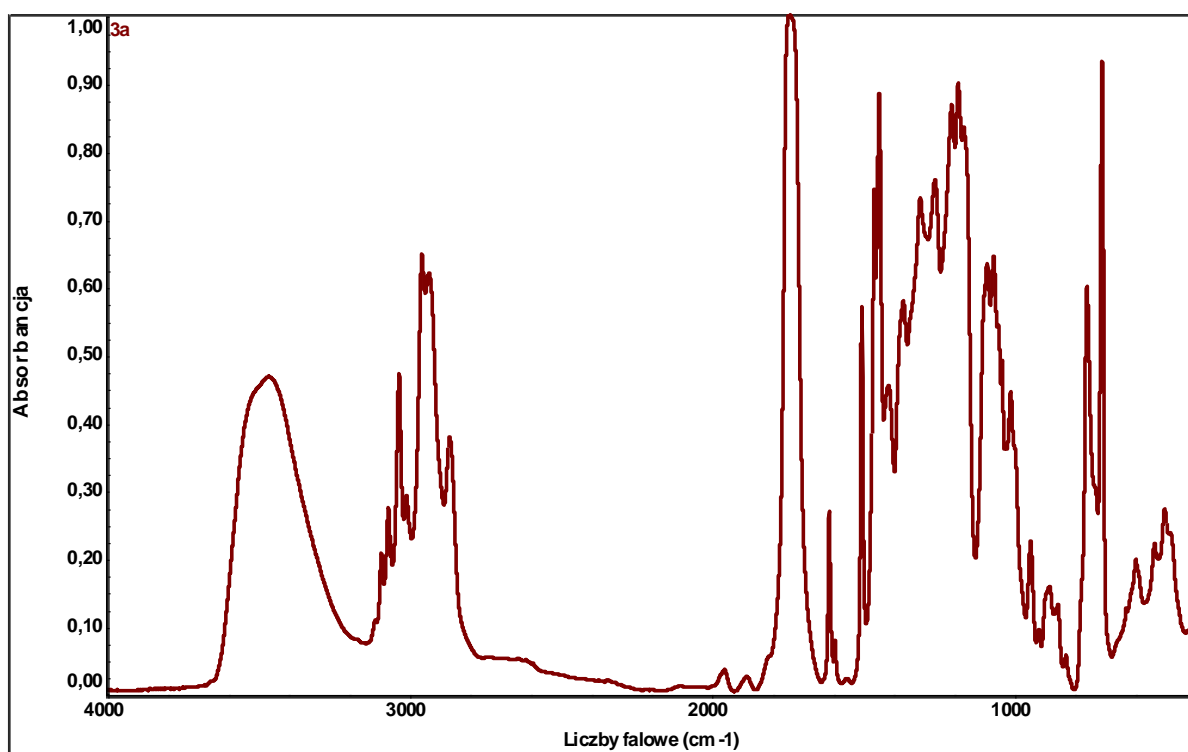
Widmo  $^1\text{H-NMR}$ :



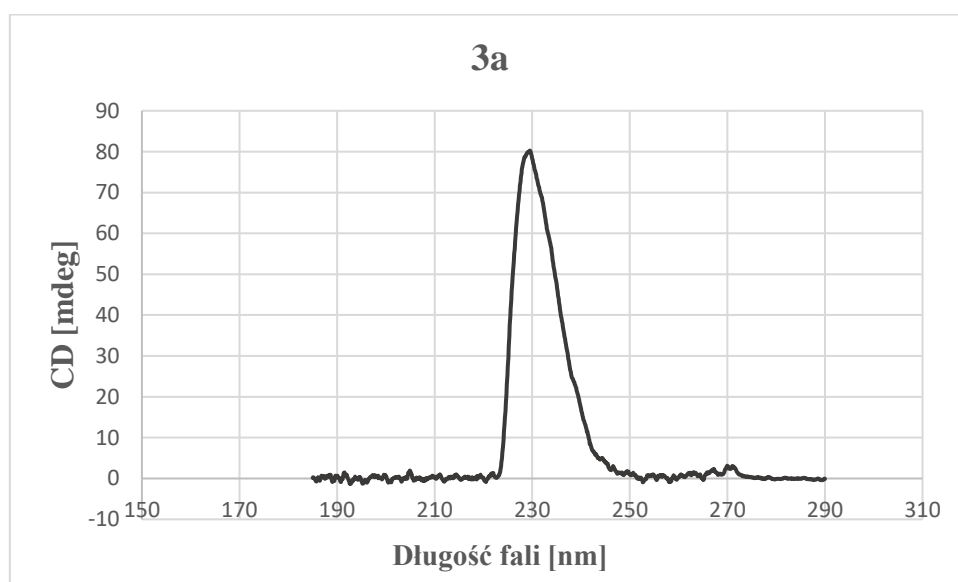
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

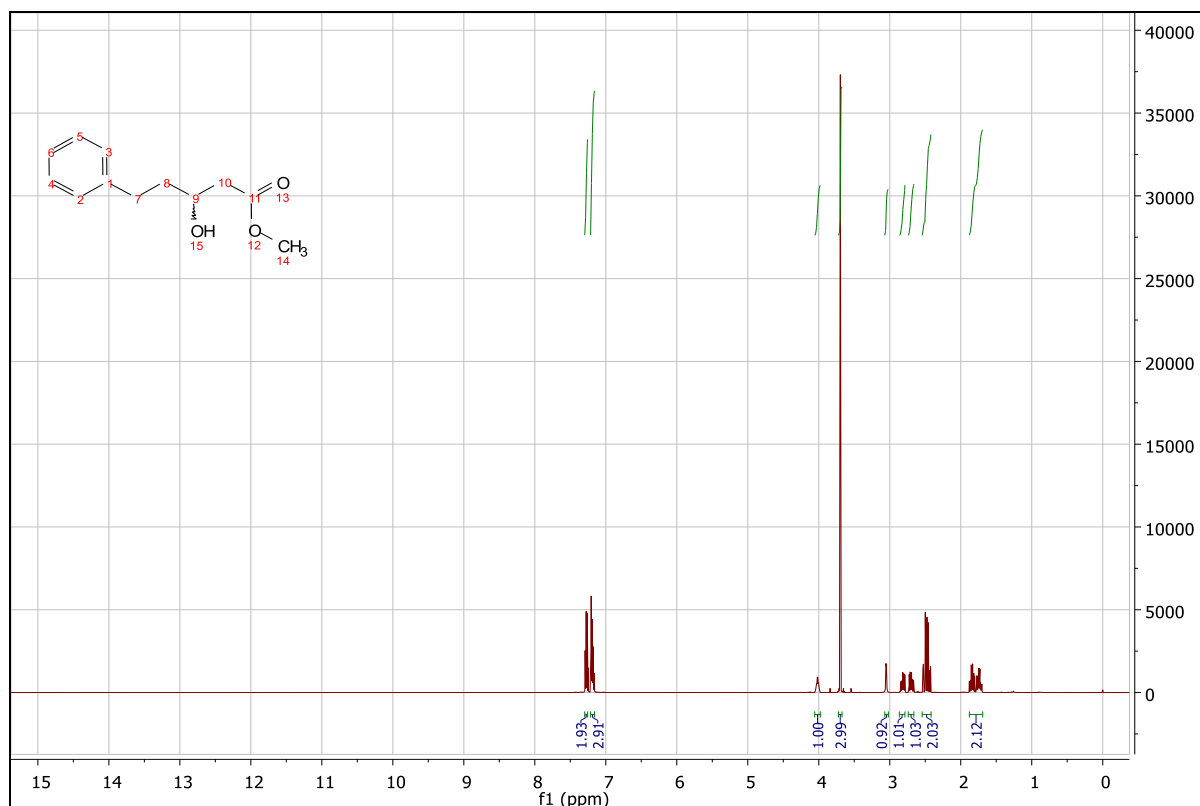


Widmo CD:

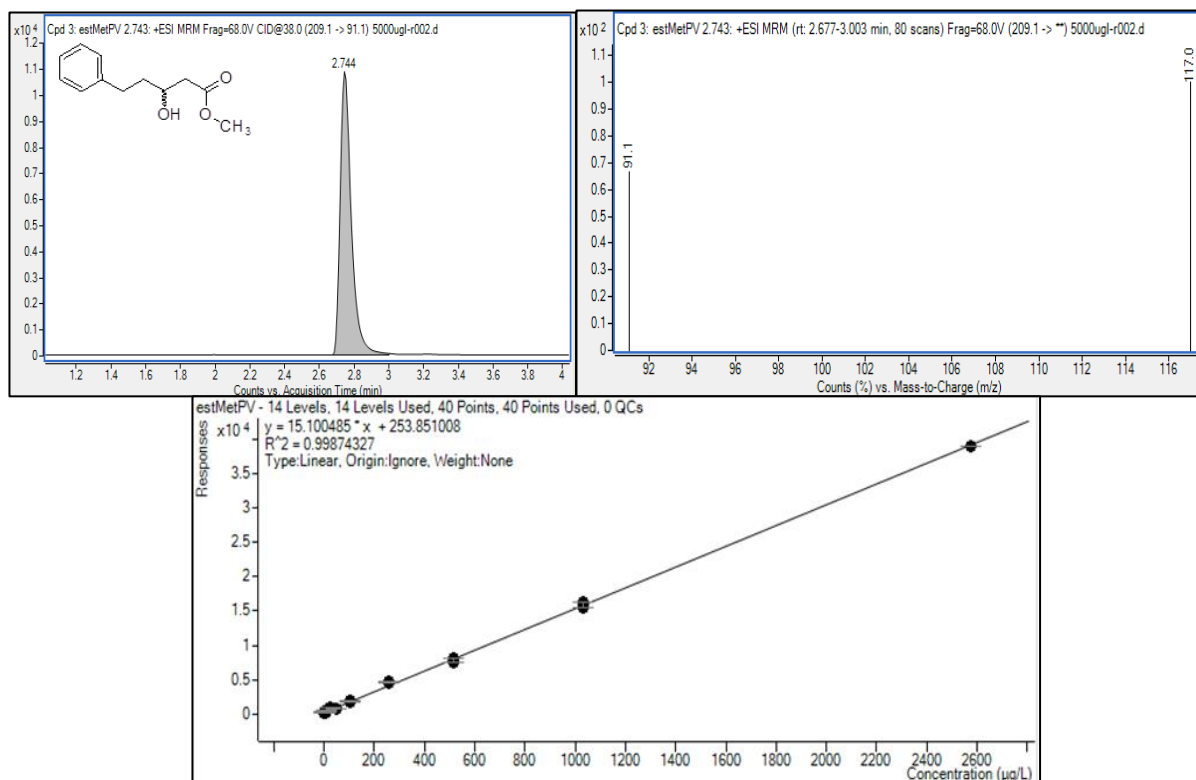


## Ester metylowy kwasu 3-*rac*-hydroksywalerianowego (3b):

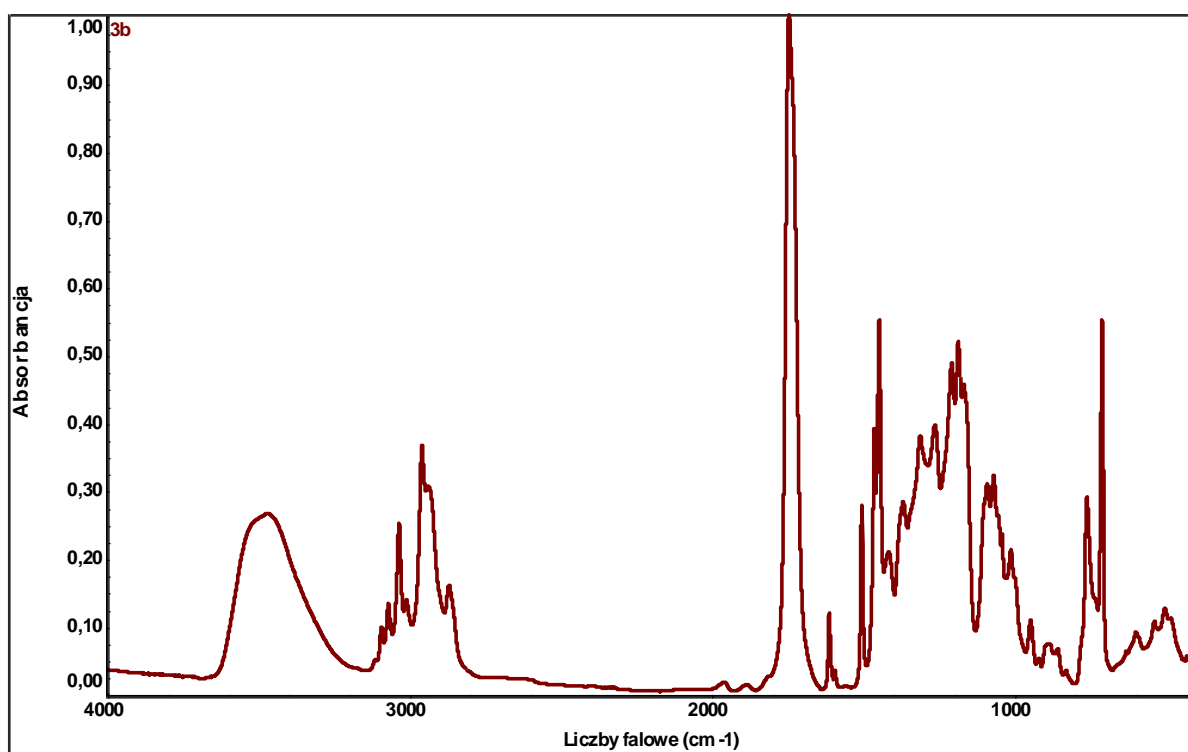
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



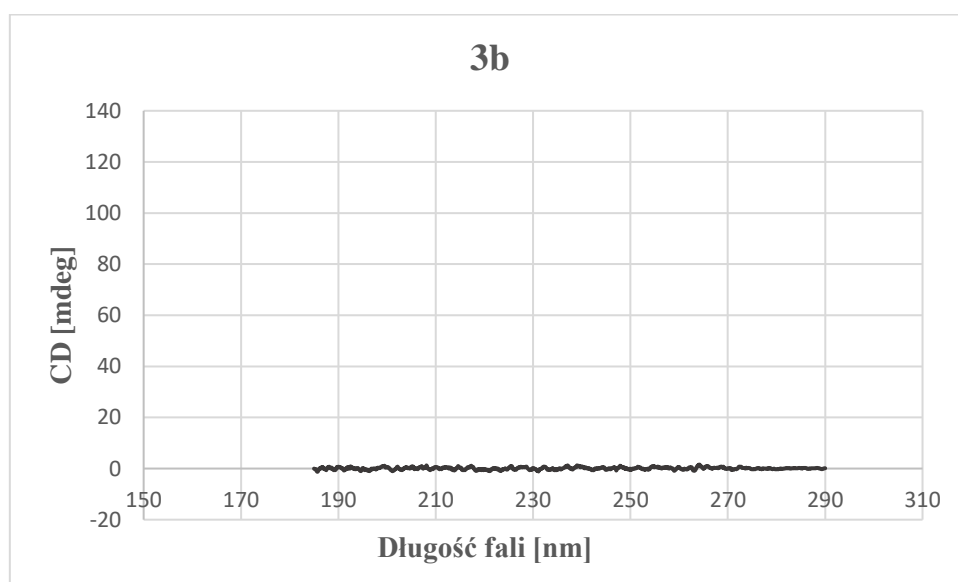
Widmo MS/MS:



Widmo IR:



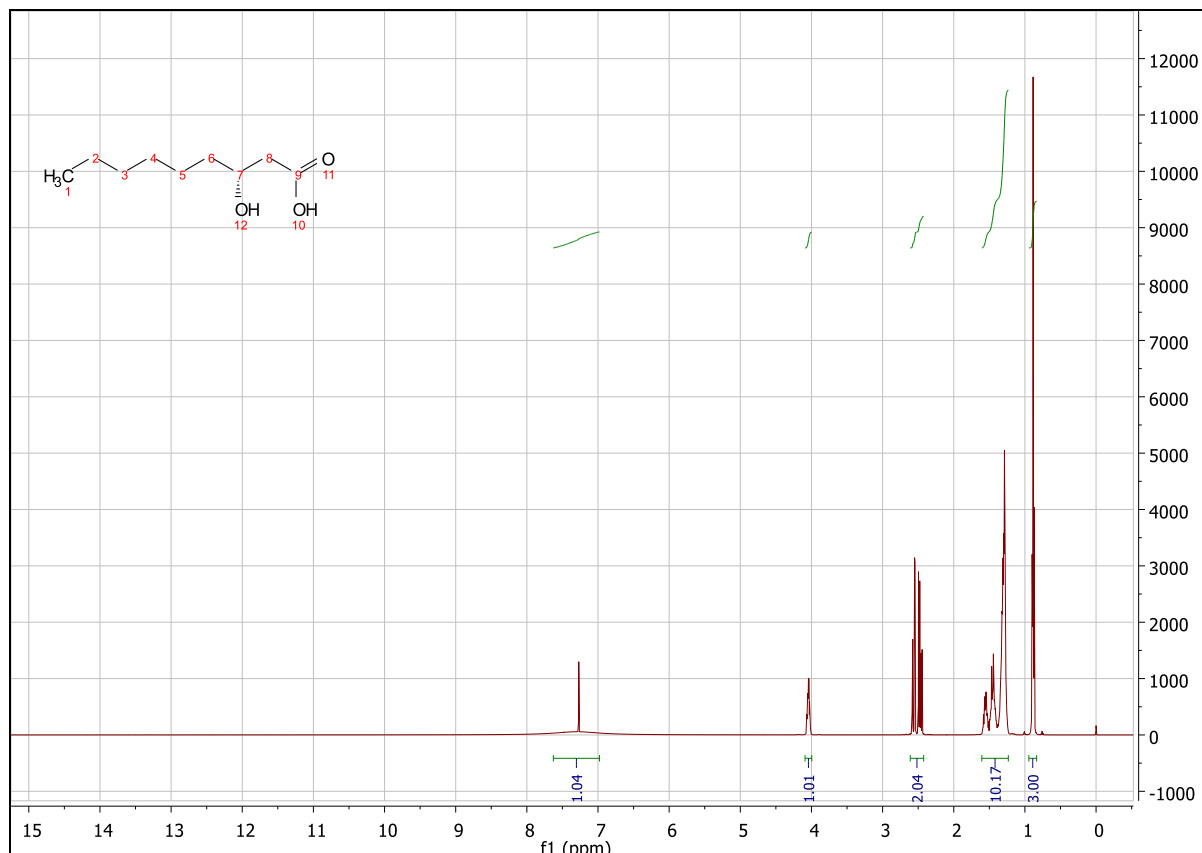
Widmo CD:



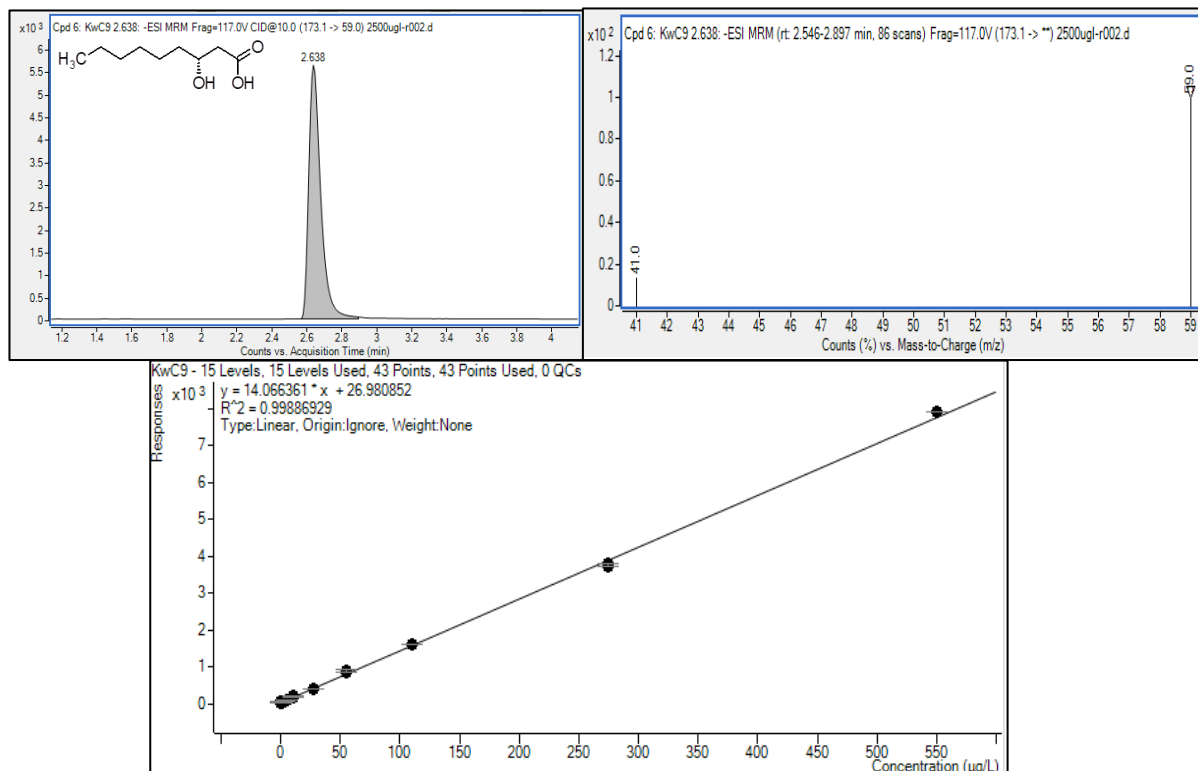


## Kwas (*R*)-3-hydroksynonanowy (4a)

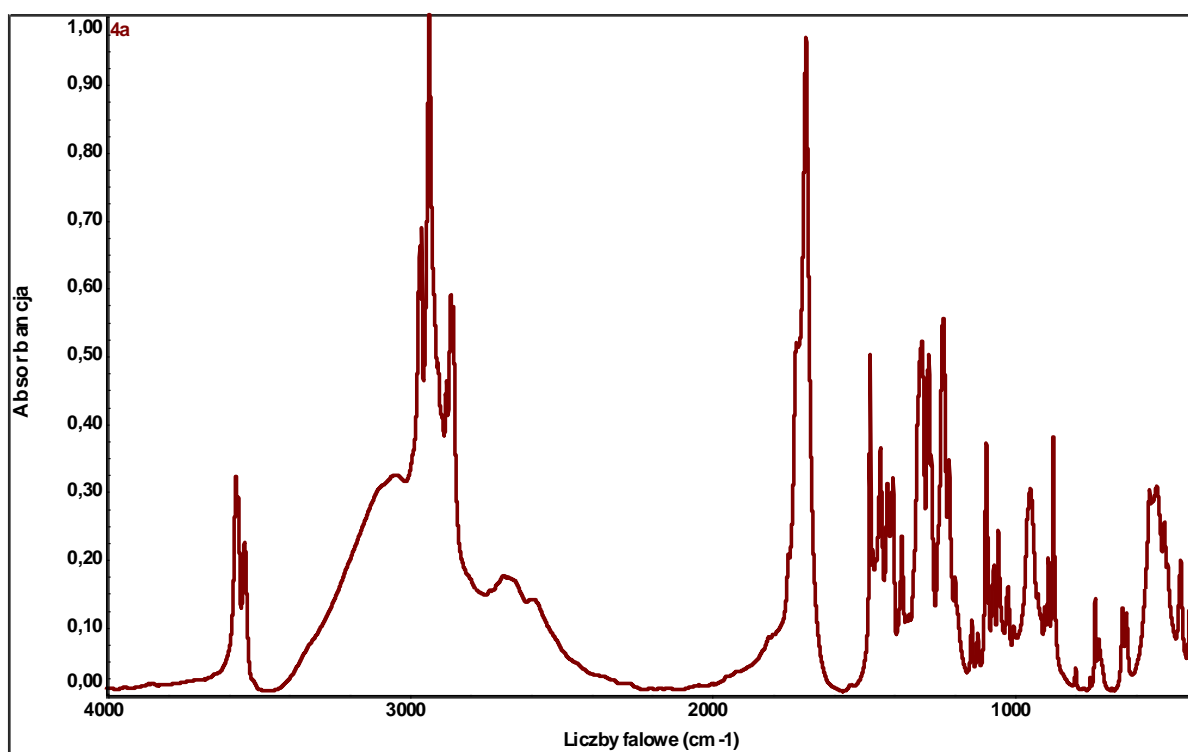
Widmo  $^1\text{H-NMR}$ :



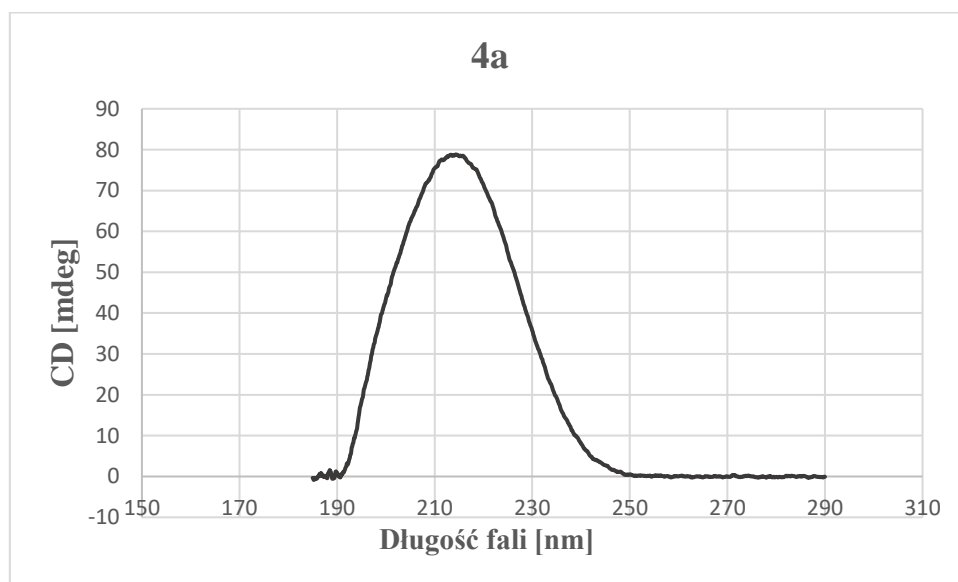
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

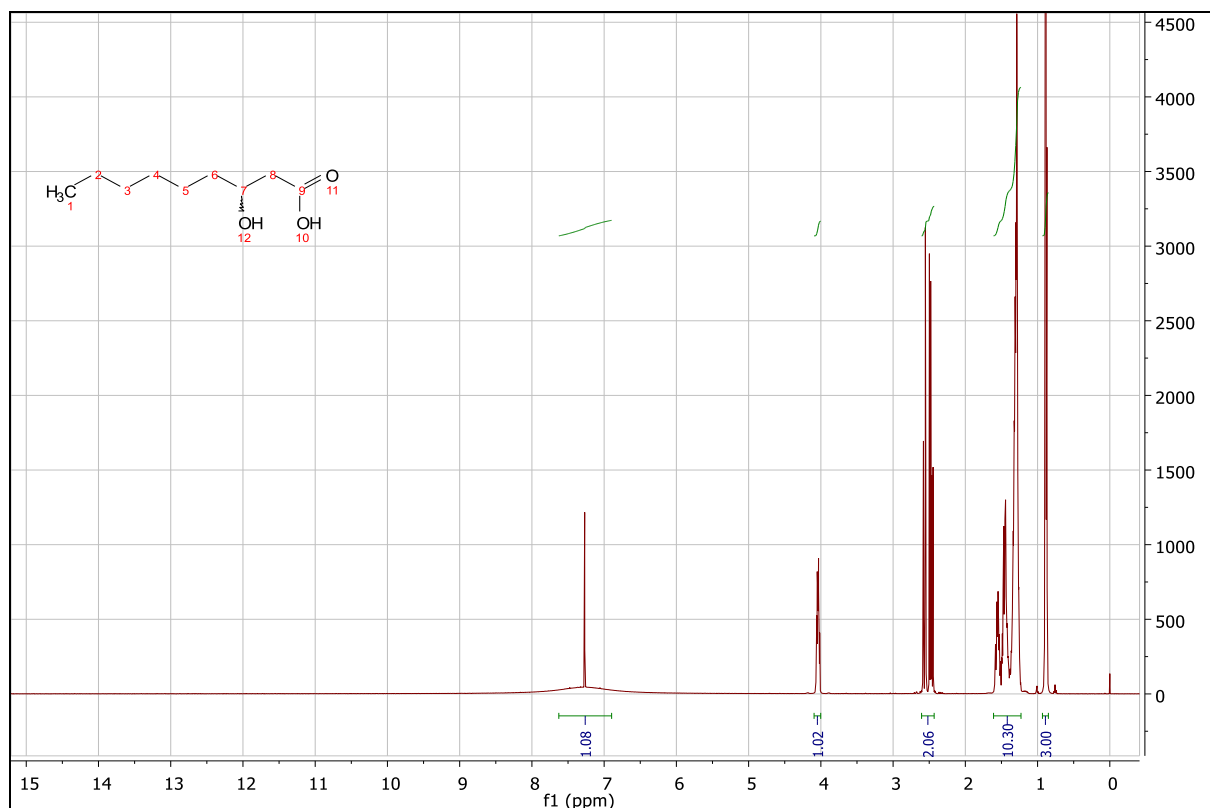


Widmo CD:

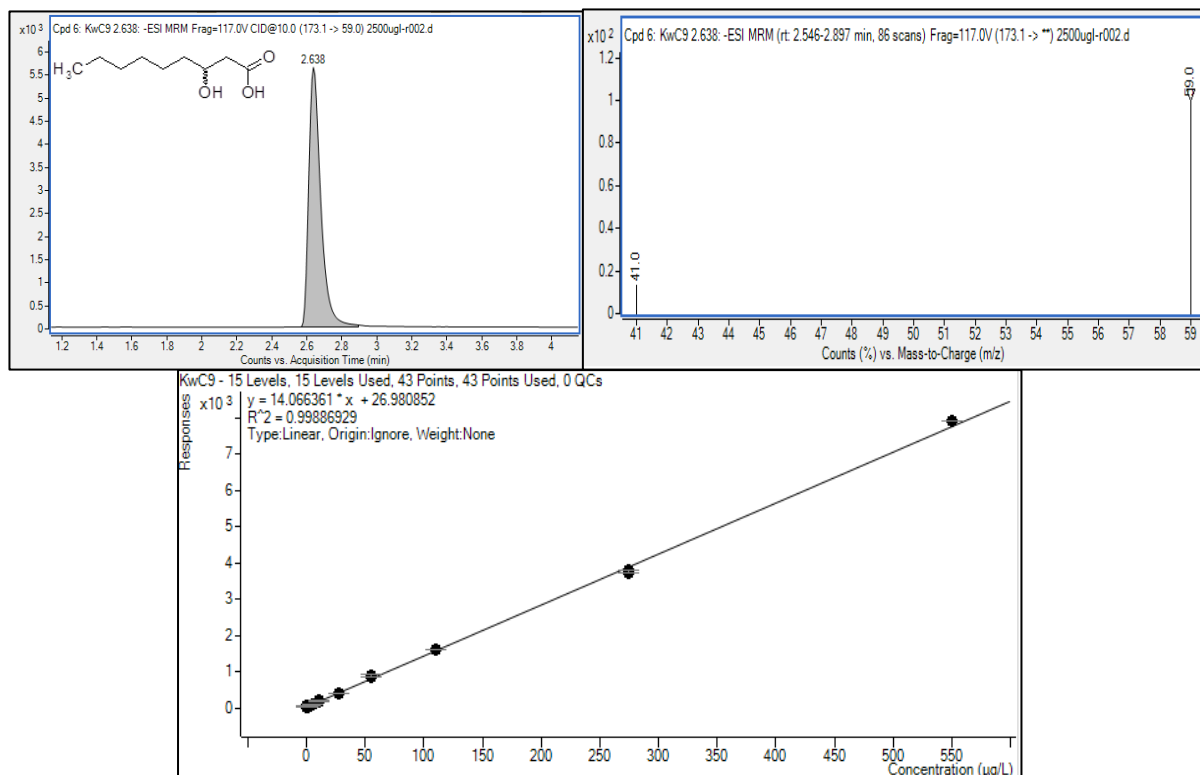


## Kwas 3-*rac*-hydroksynonanowy (4b)

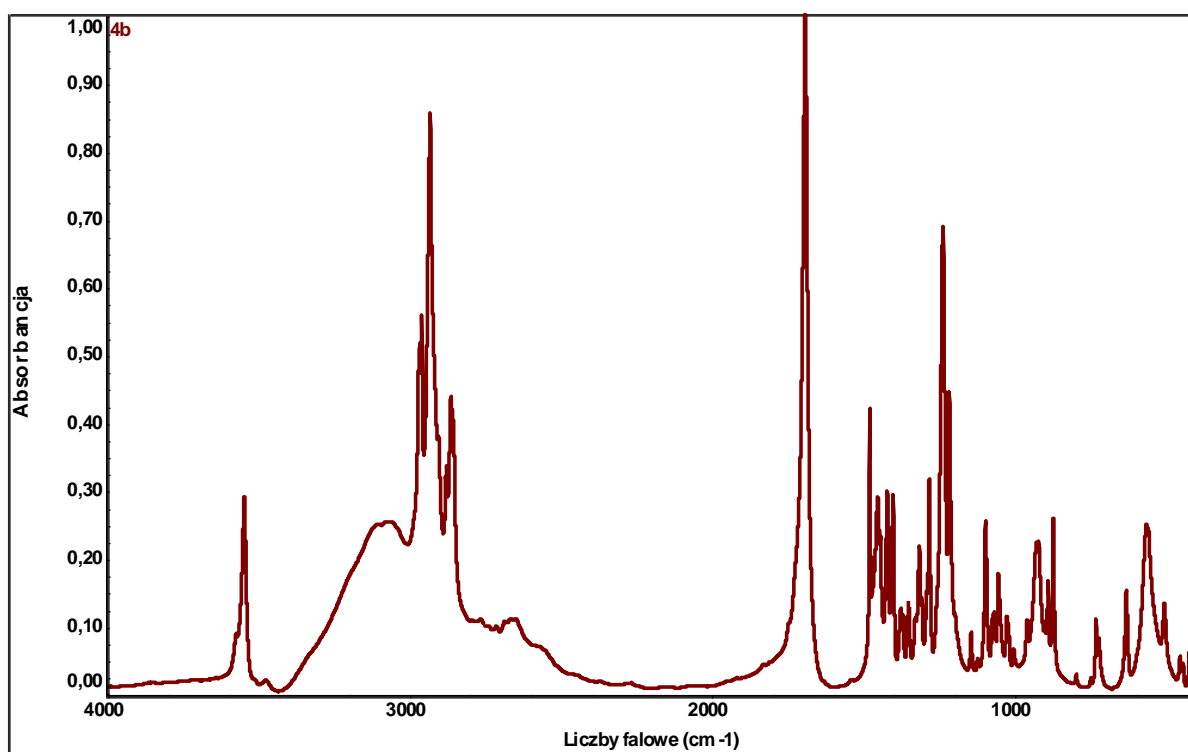
Widmo  $^1\text{H-NMR}$



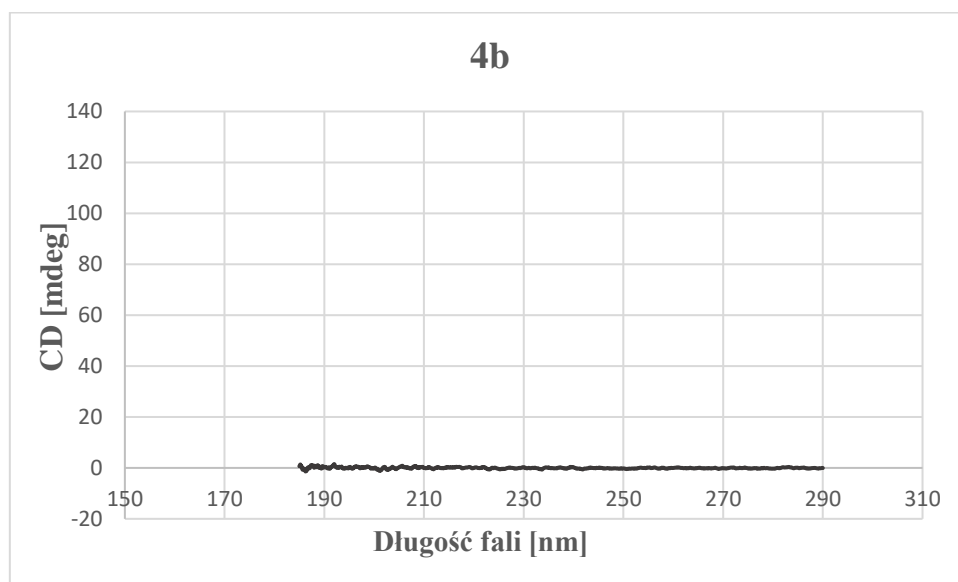
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

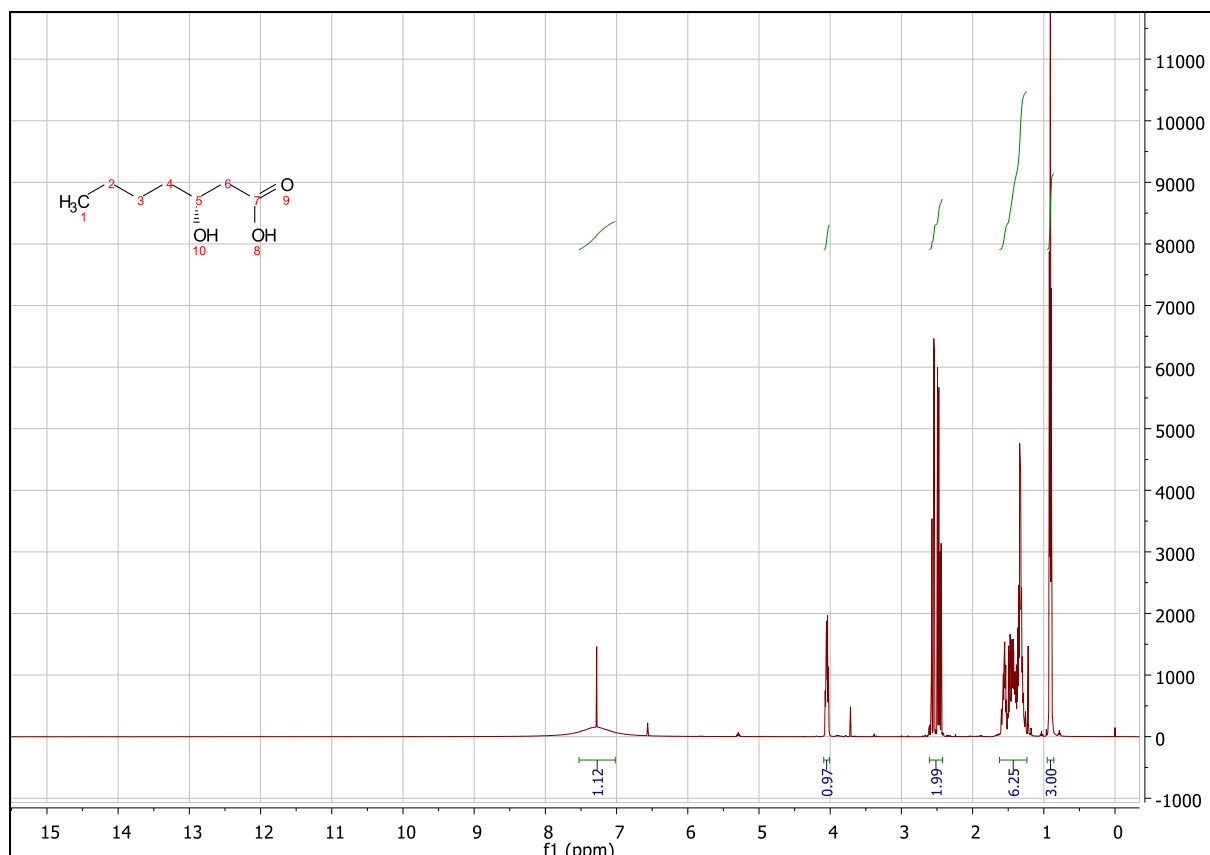


Widmo CD:

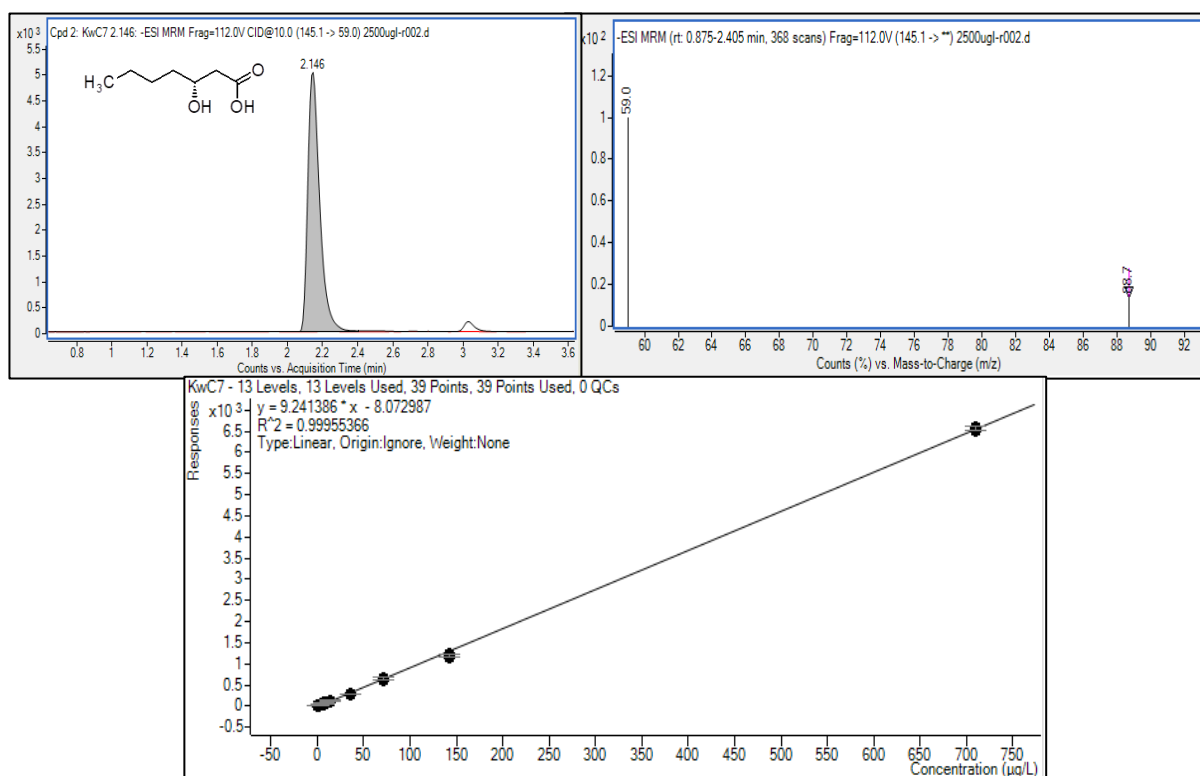


## Kwas (*R*)-3-hydrokseyheptanowy (5a):

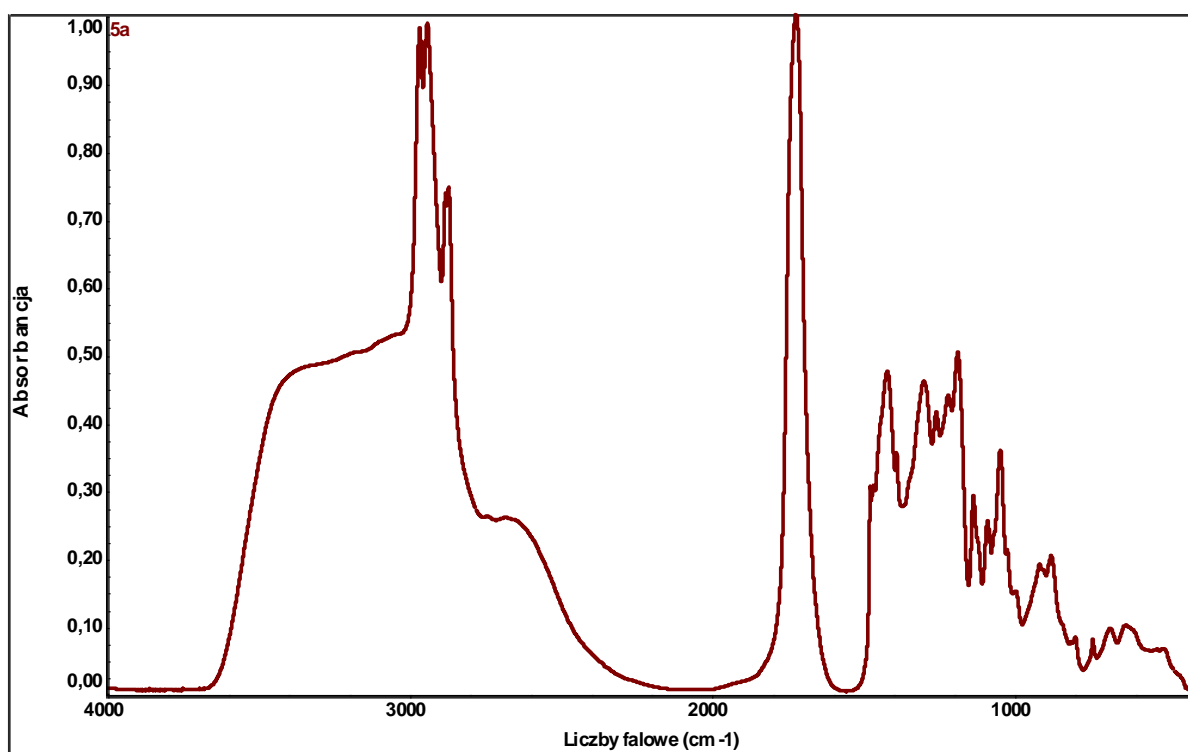
Widmo  $^1\text{H-NMR}$



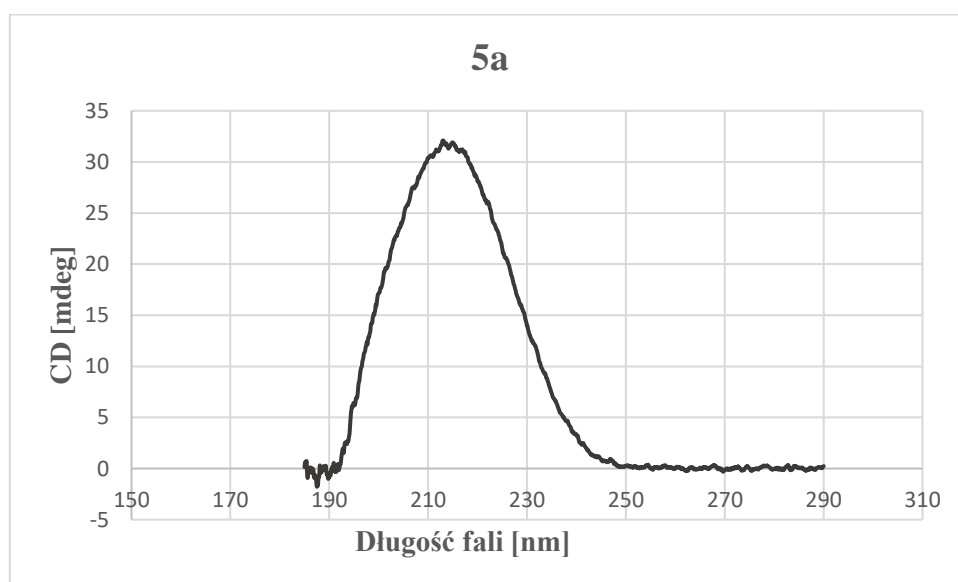
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

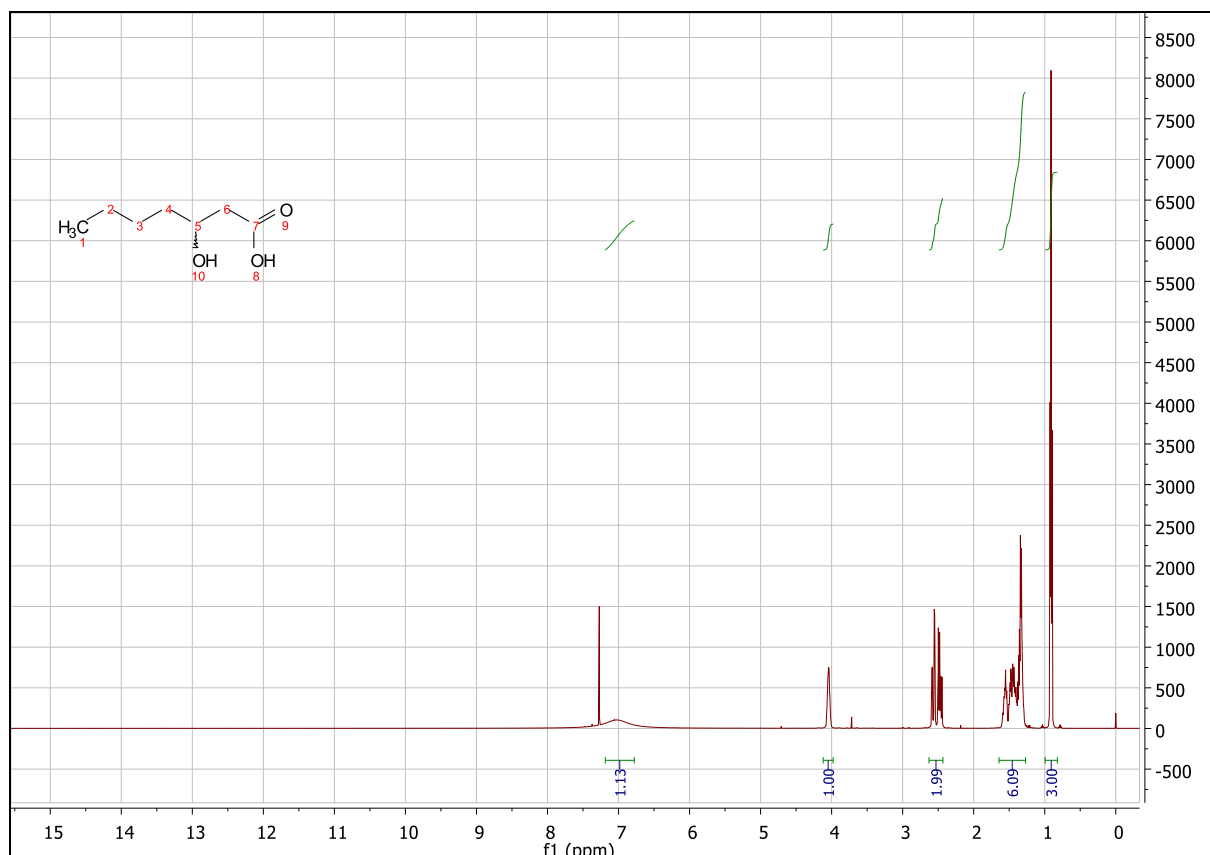


Widmo CD:

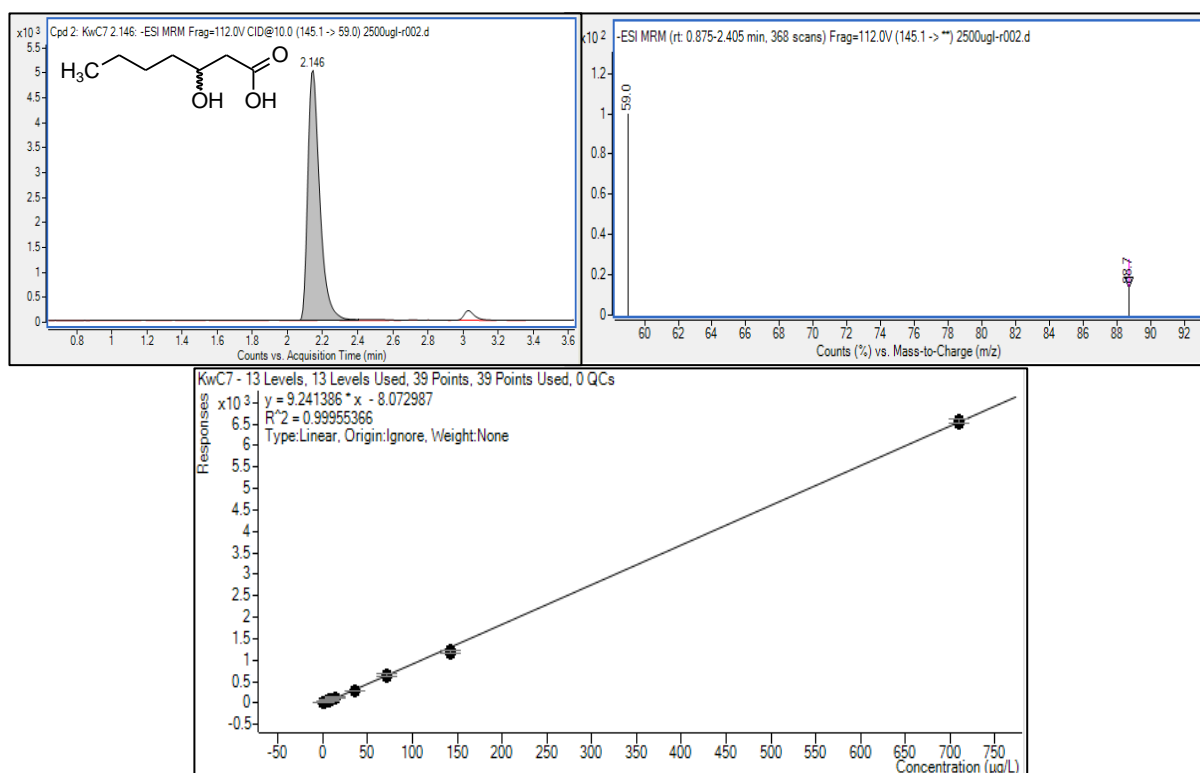


### Kwas 3-*rac*-hydrokseyheptanowy (5b):

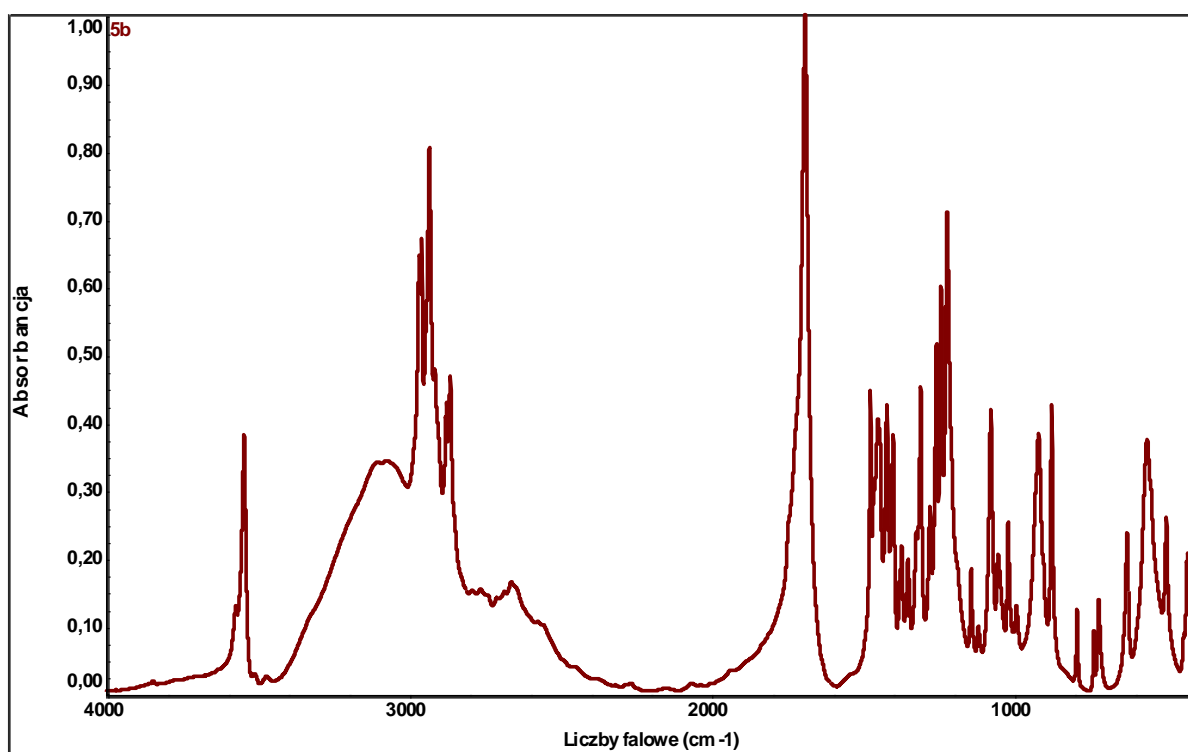
Widmo  $^1\text{H-NMR}$ :



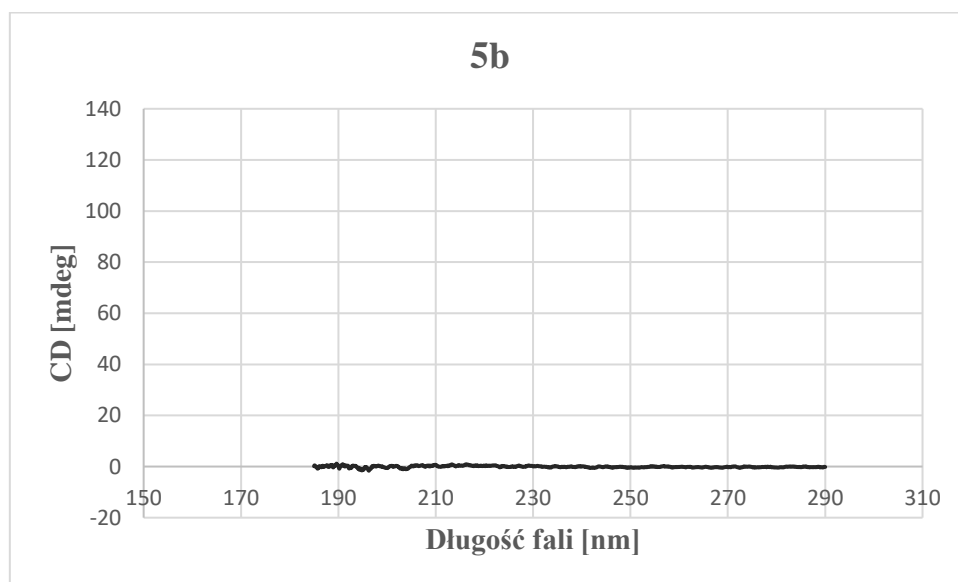
Widmo MS/MS:



Widmo IR:



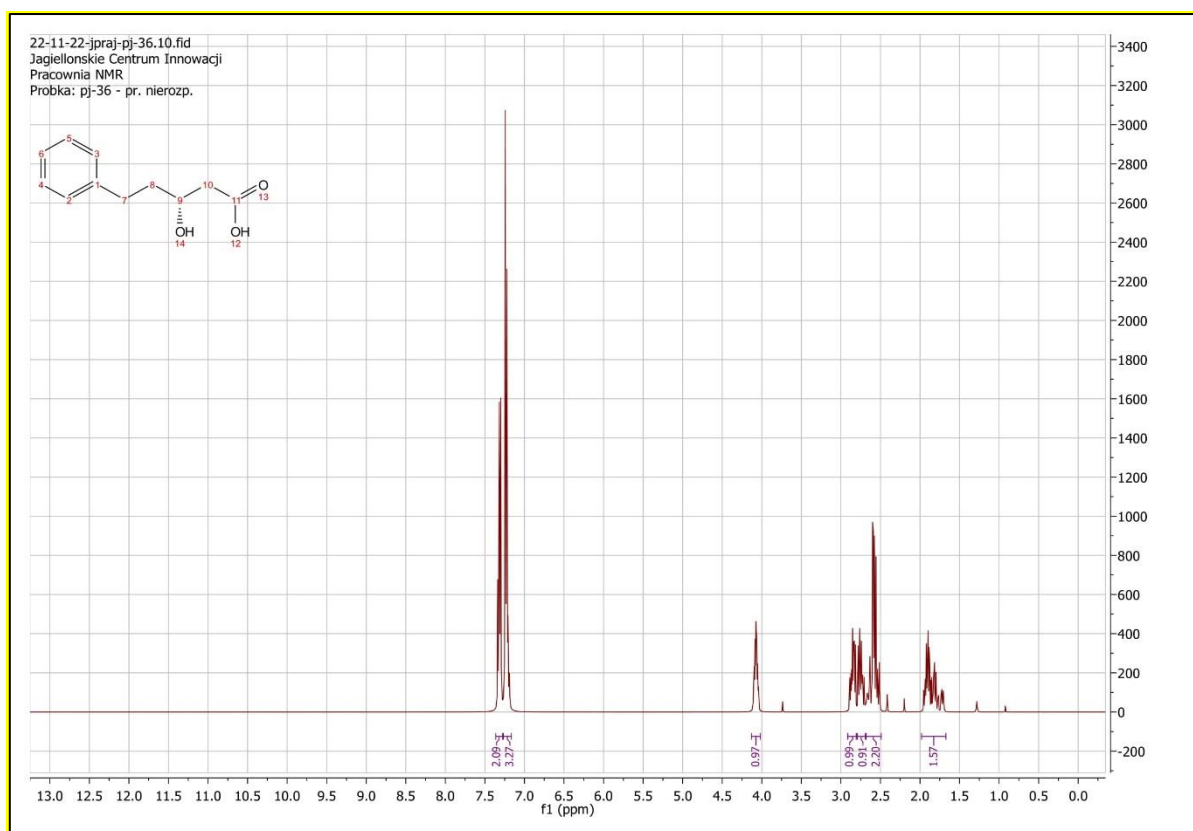
Widmo CD:



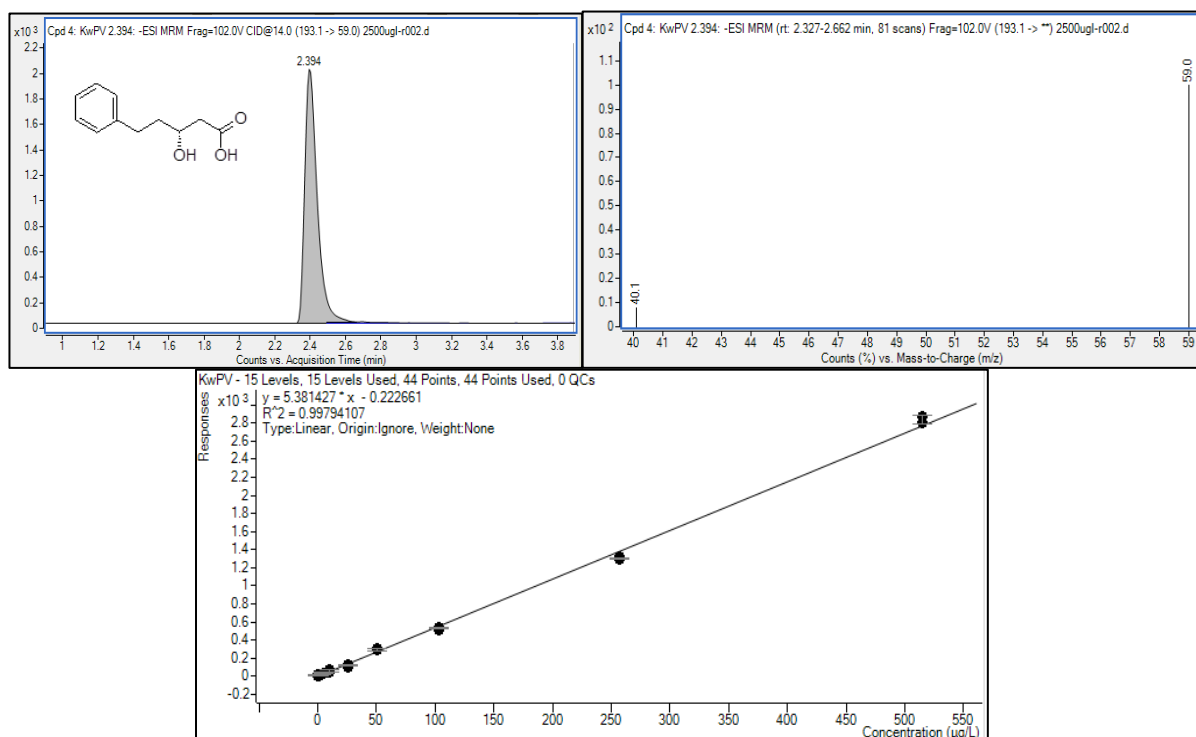


## Kwas (*R*)-3-hydroksywalerianowy (6a):

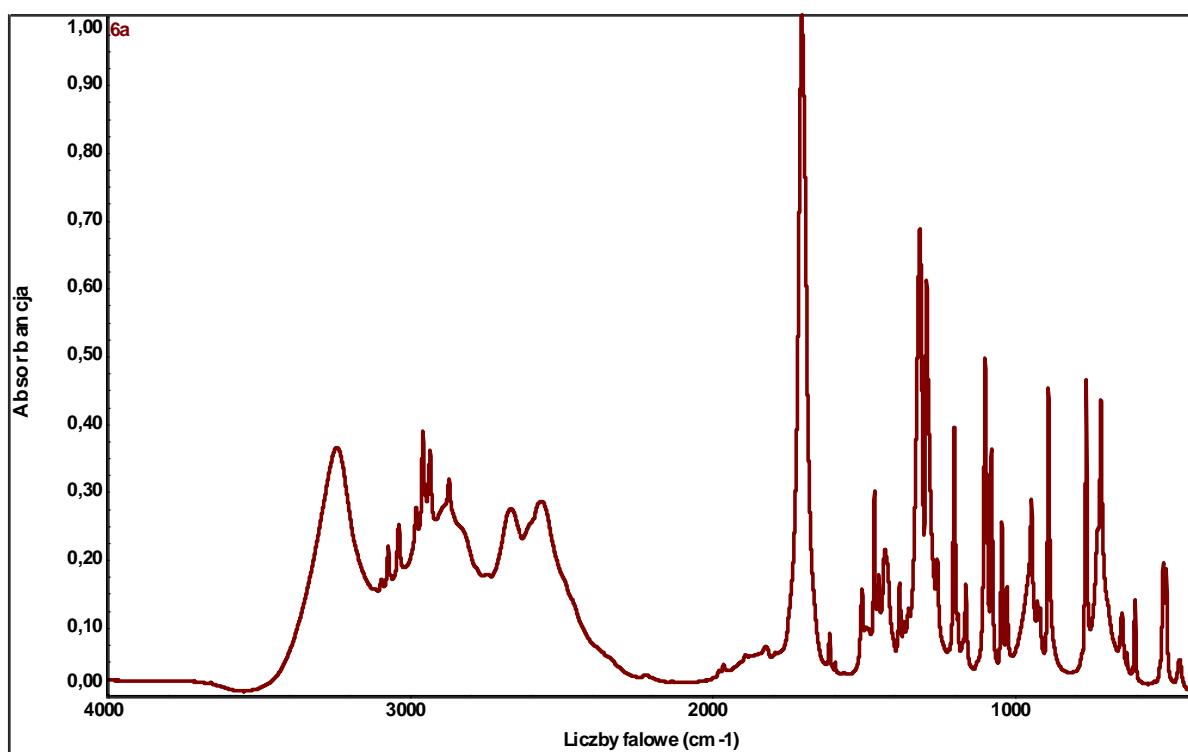
Widmo  $^1\text{H-NMR}$ :



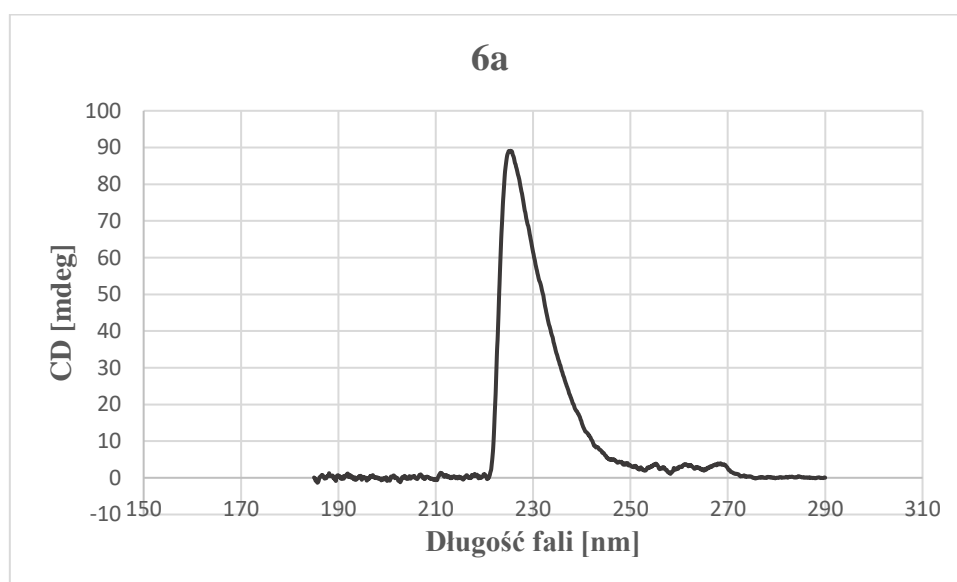
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

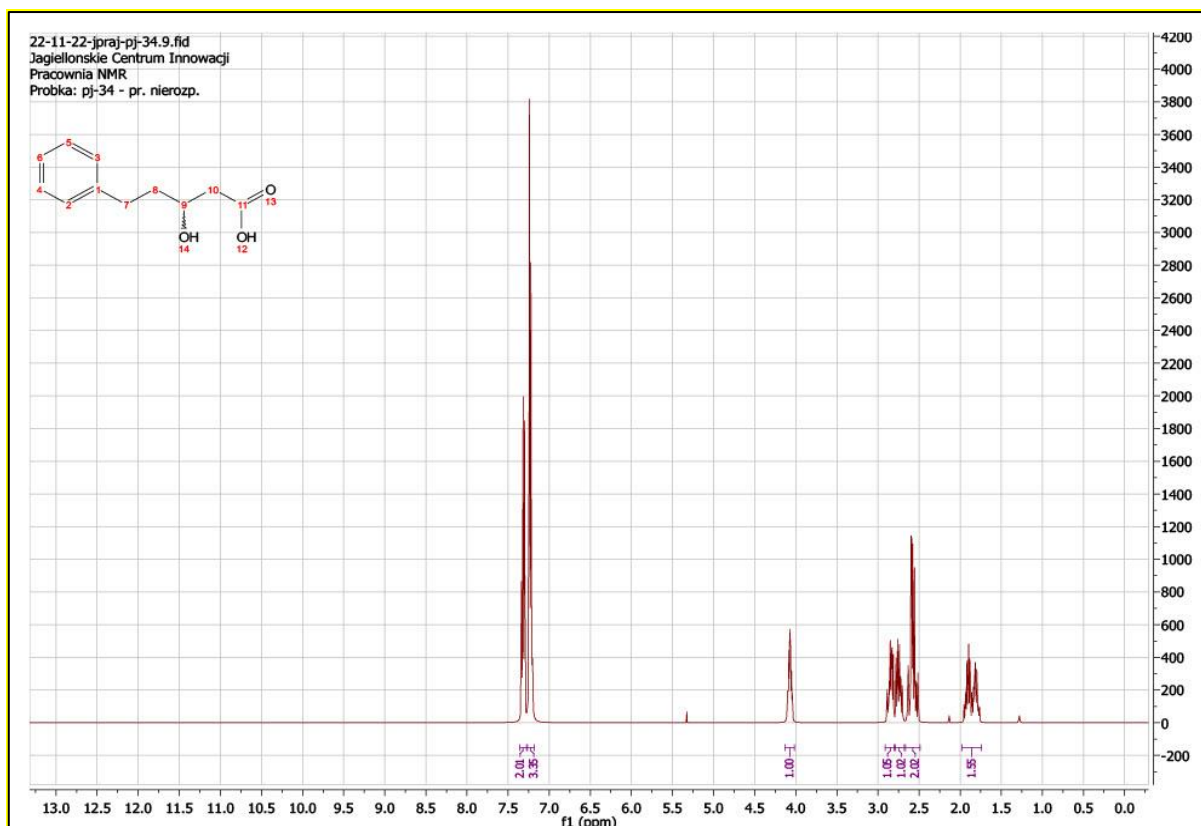


Widmo CD:

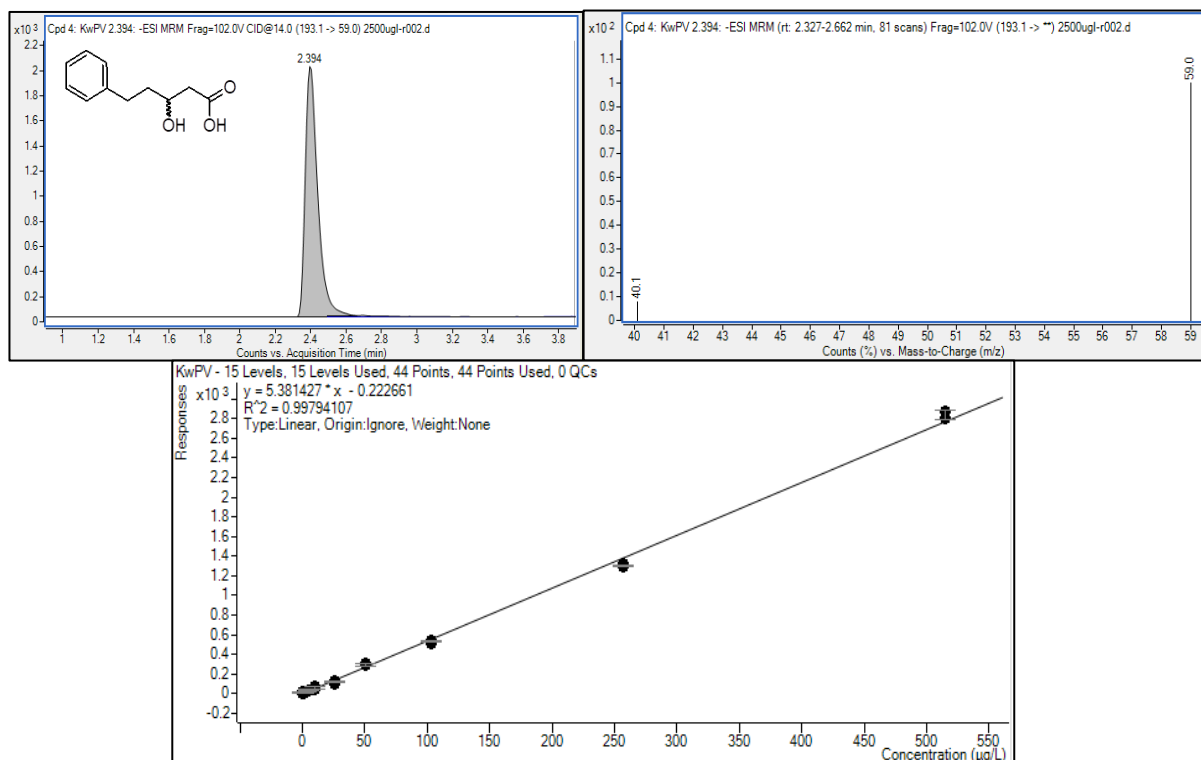


## Kwas 3-hydroksywalerianowy (6b)

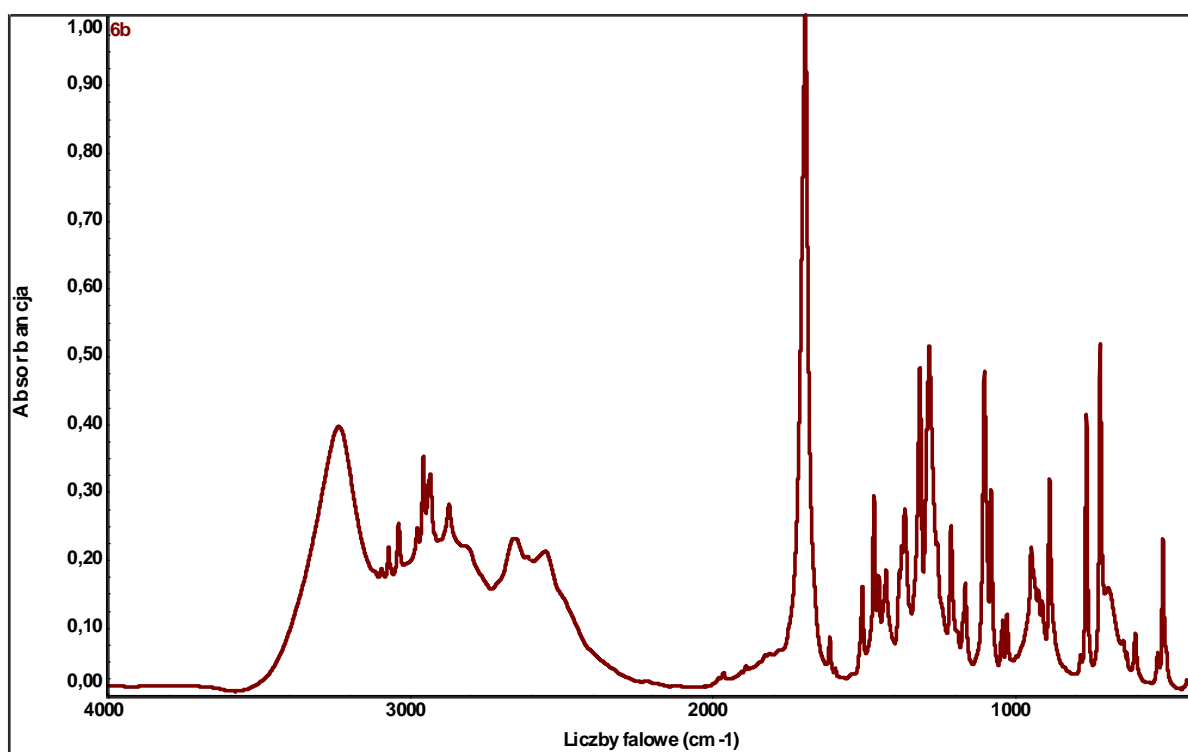
Widmo  $^1\text{H-NMR}$ :



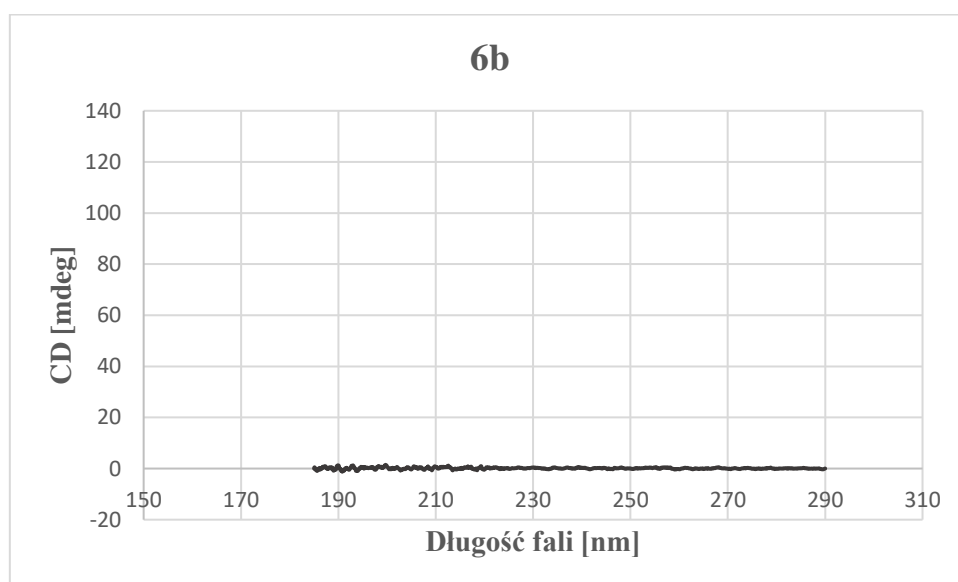
Widmo MS/MS:

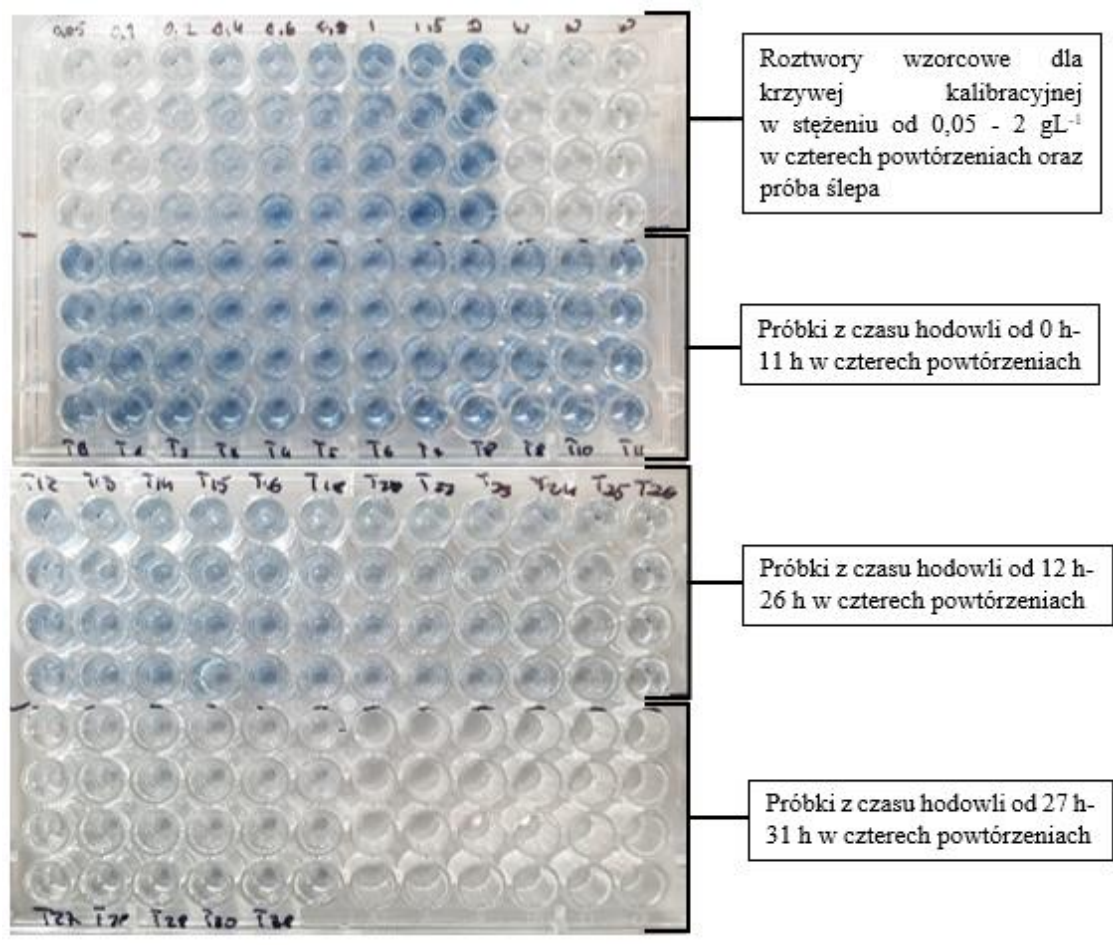


Widmo IR:



Widmo CD:

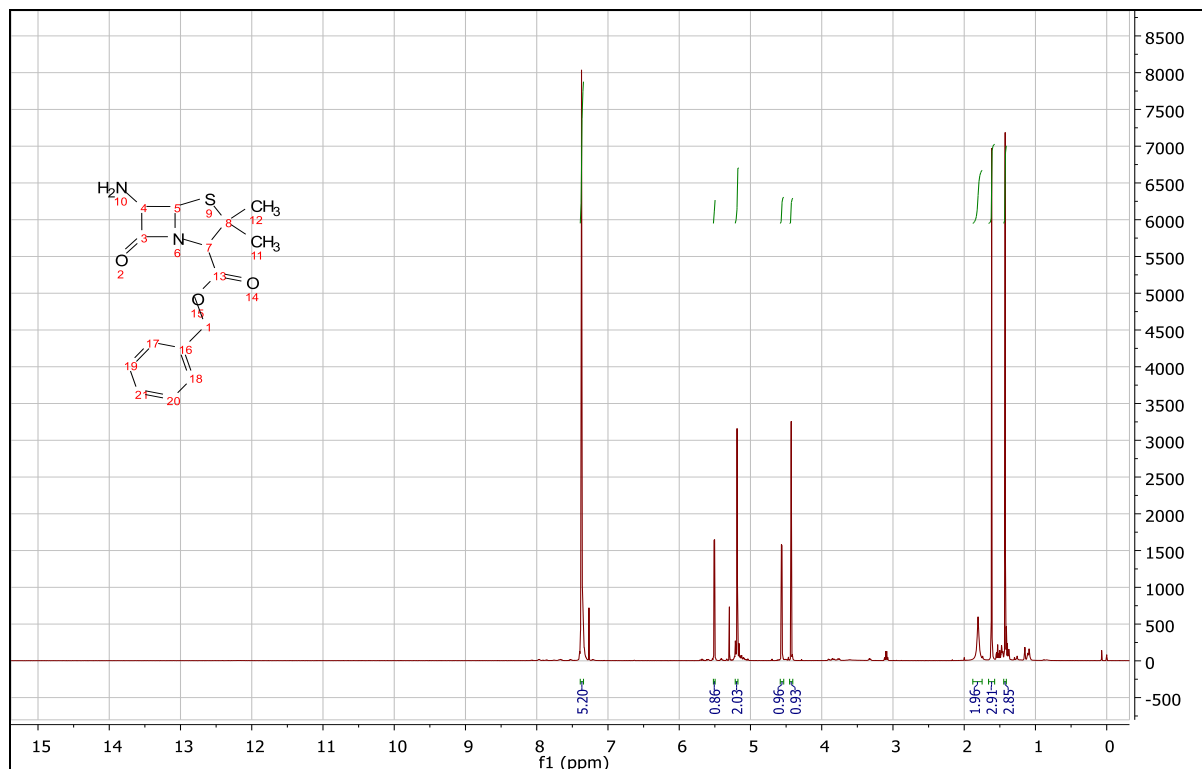




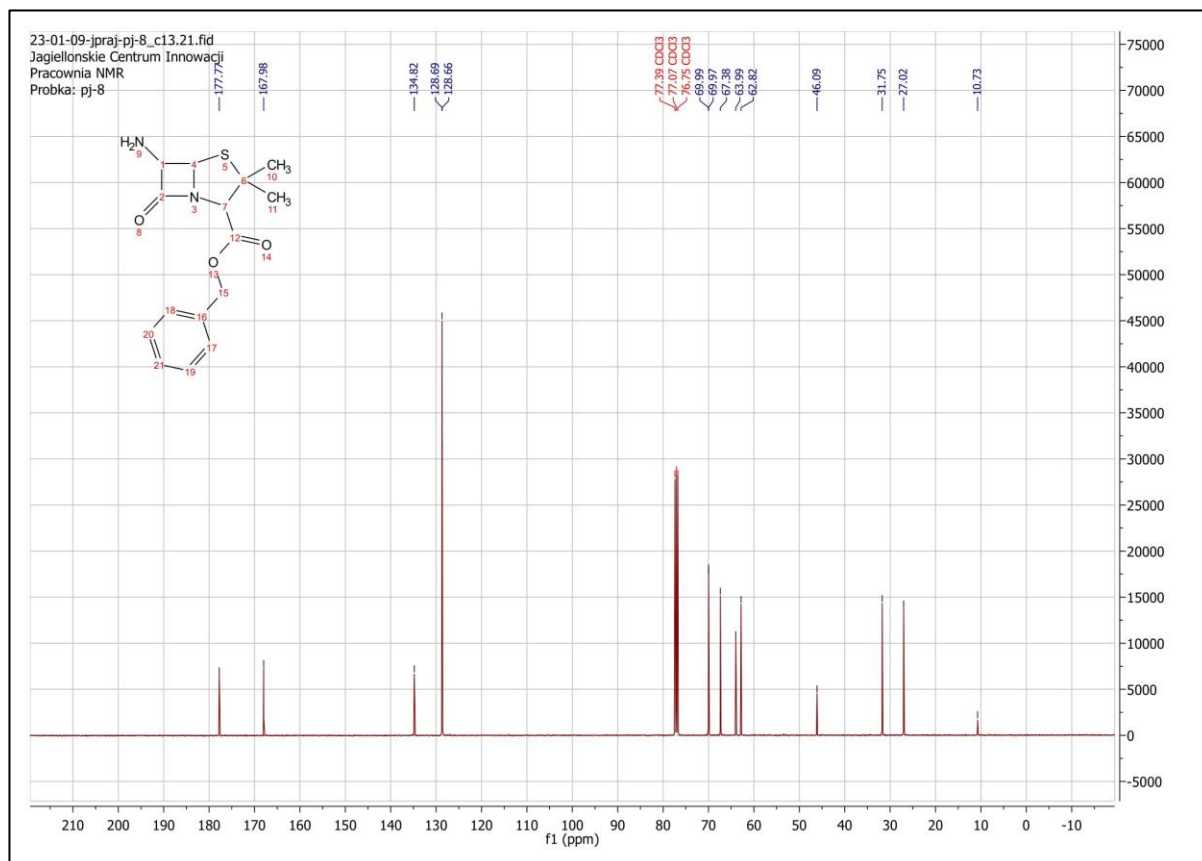
**Rysunek 35.** Wyniki testu kolorymetrycznego określającego zawartość fosforanów w próbkach z hodowli reaktorowej *Pseudomonas putida* KT2440.

# Ester benzyloowy kwasu 6-APA (9):

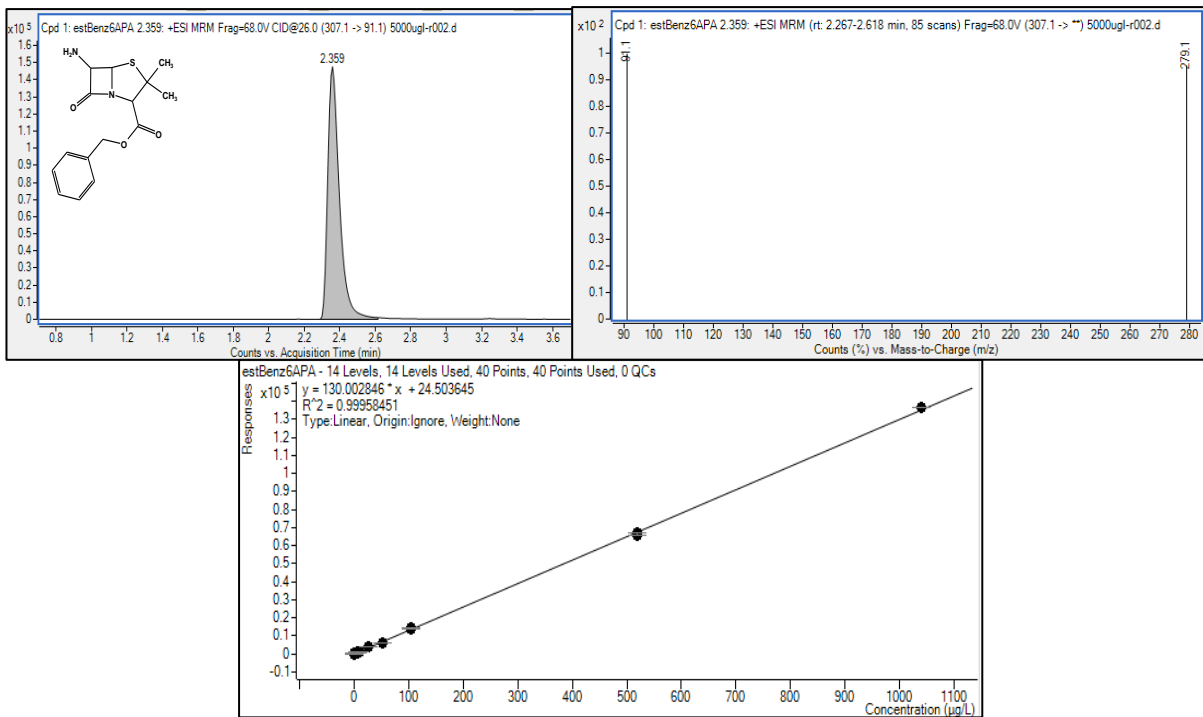
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



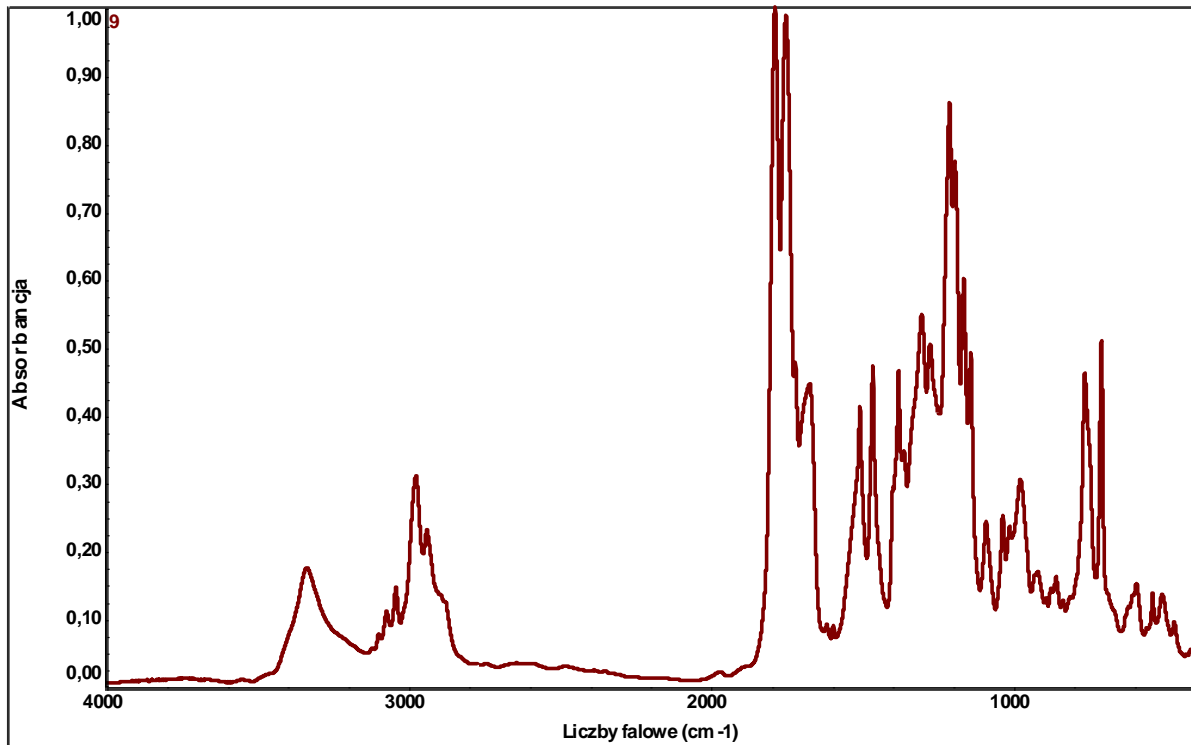
Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR:



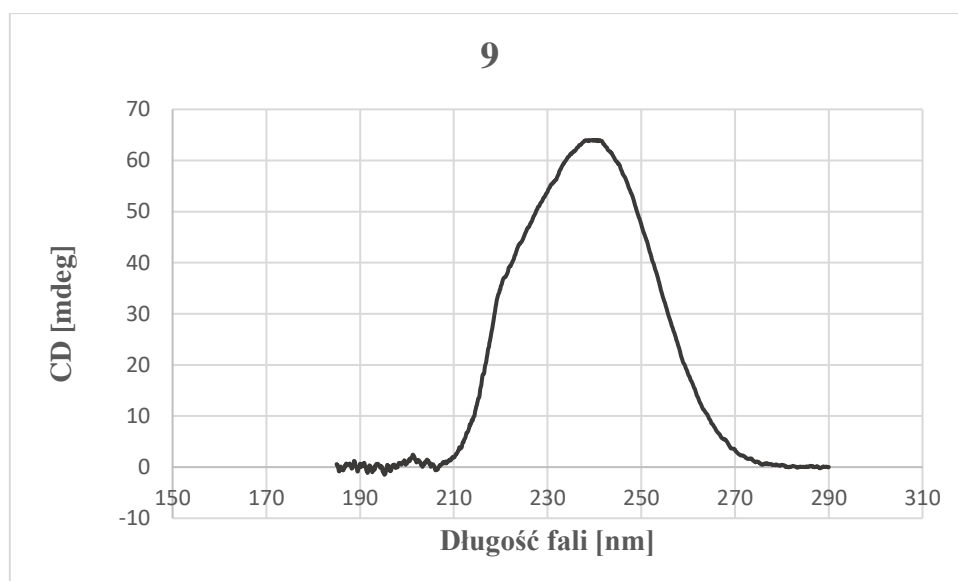
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

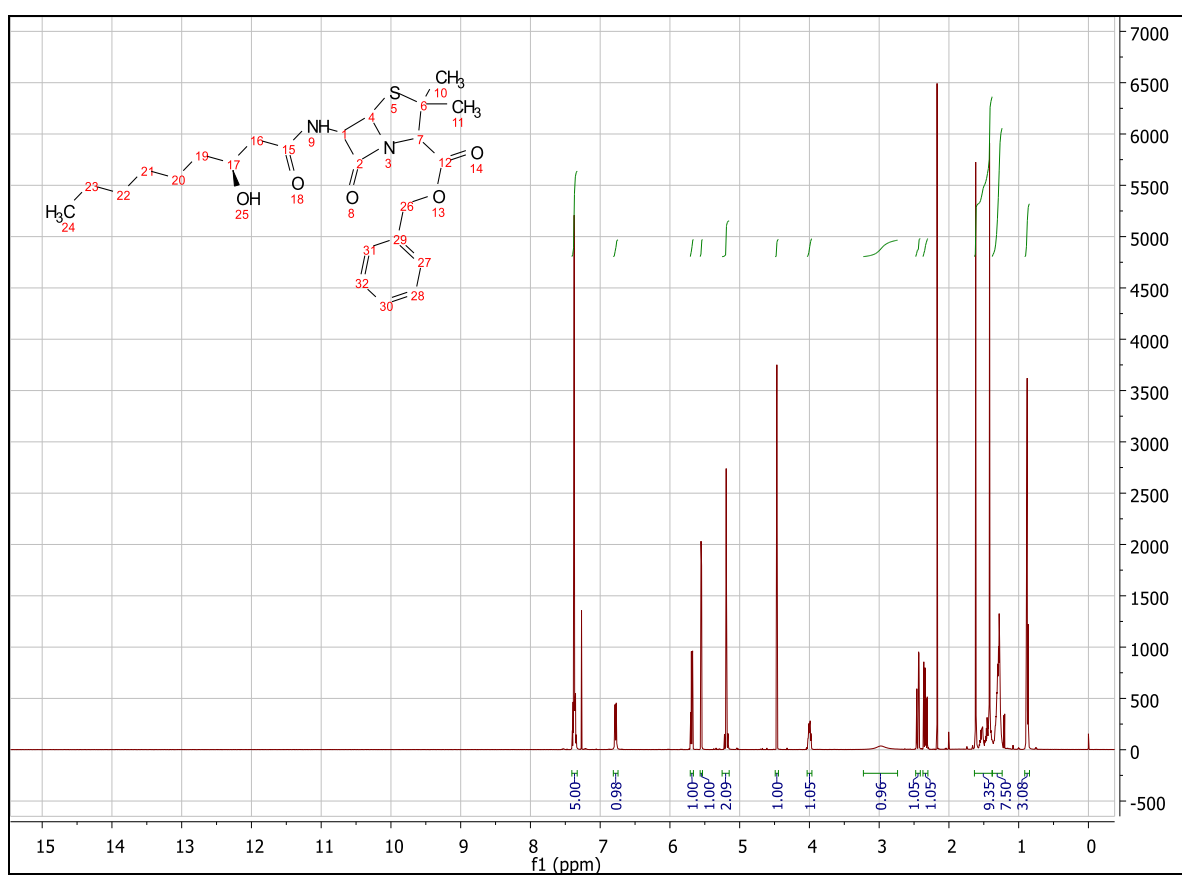


Widmo CD:



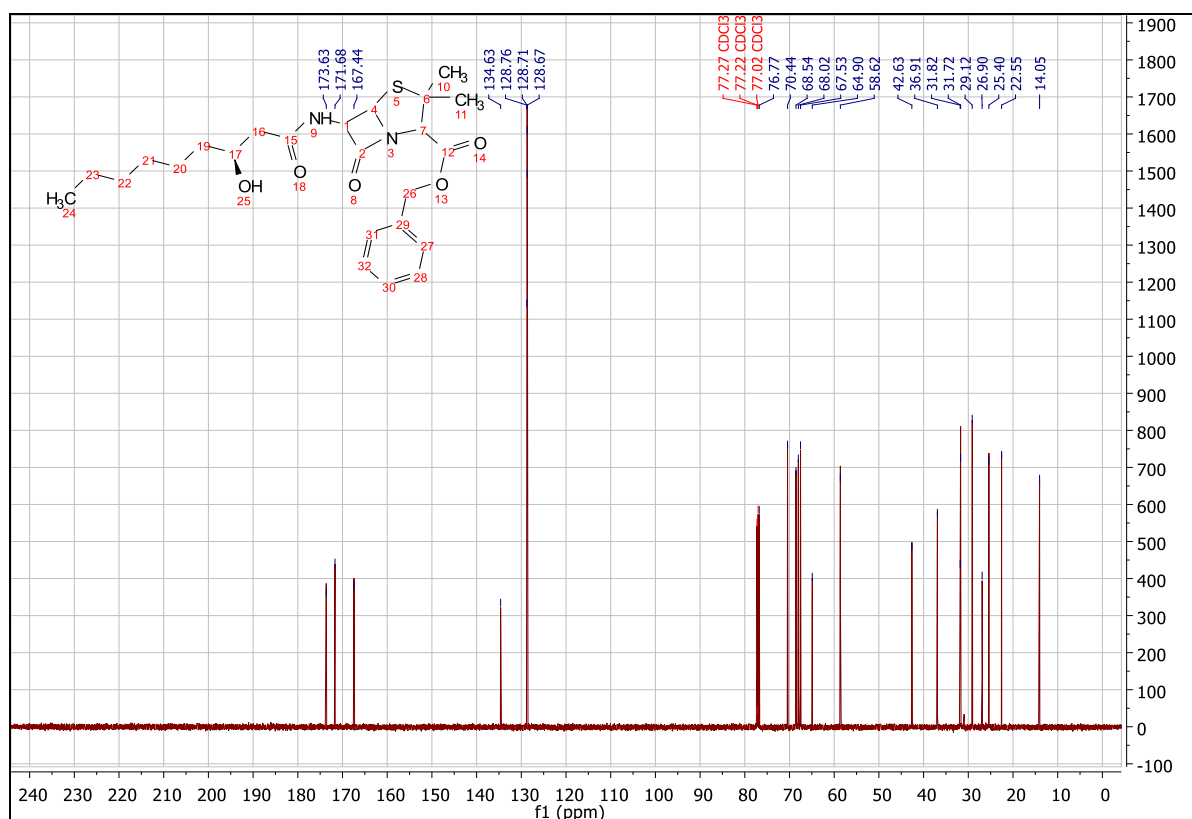
**Ester benzyloowy penicyliny z grupą 4a (10a):**

Widmo  $^1\text{H}$  NMR:

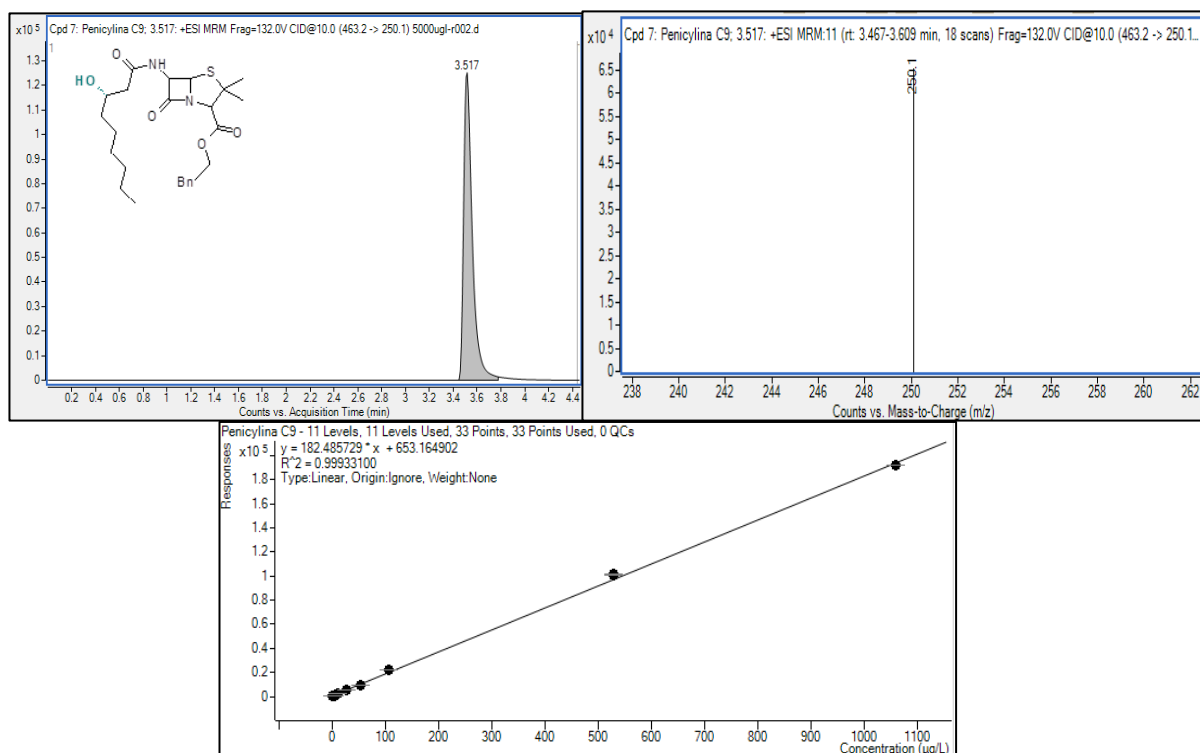




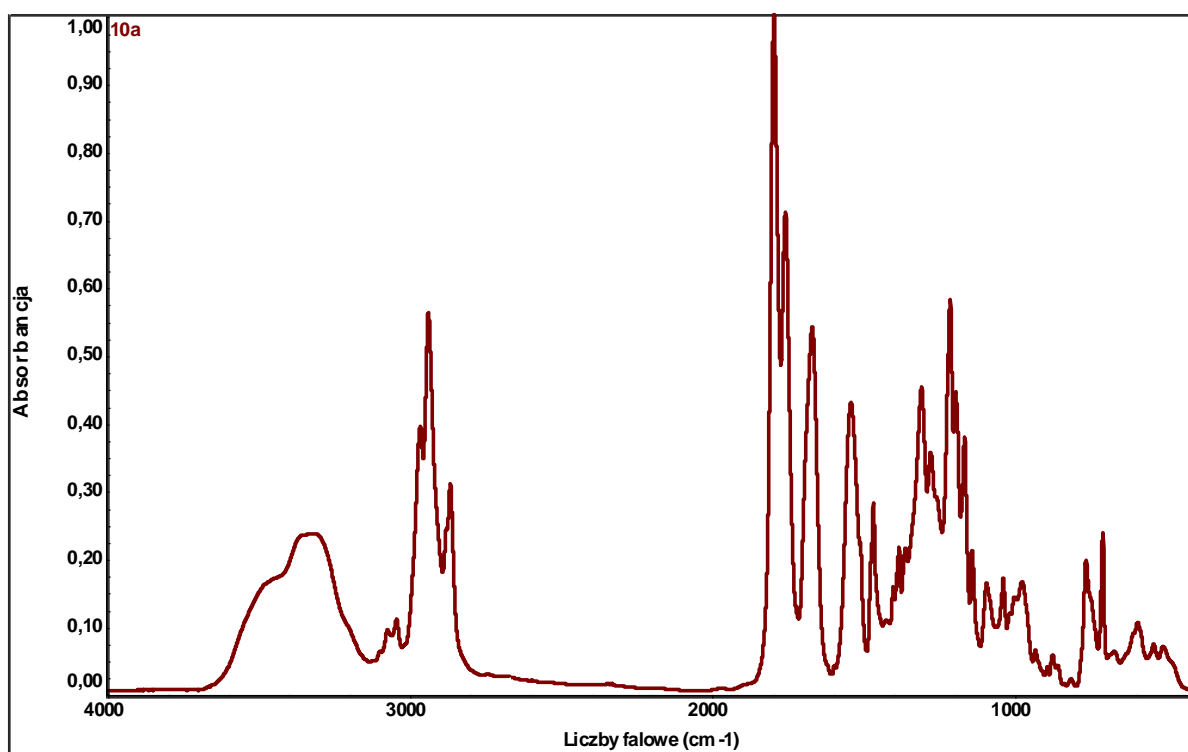
Widmo <sup>13</sup>C NMR:



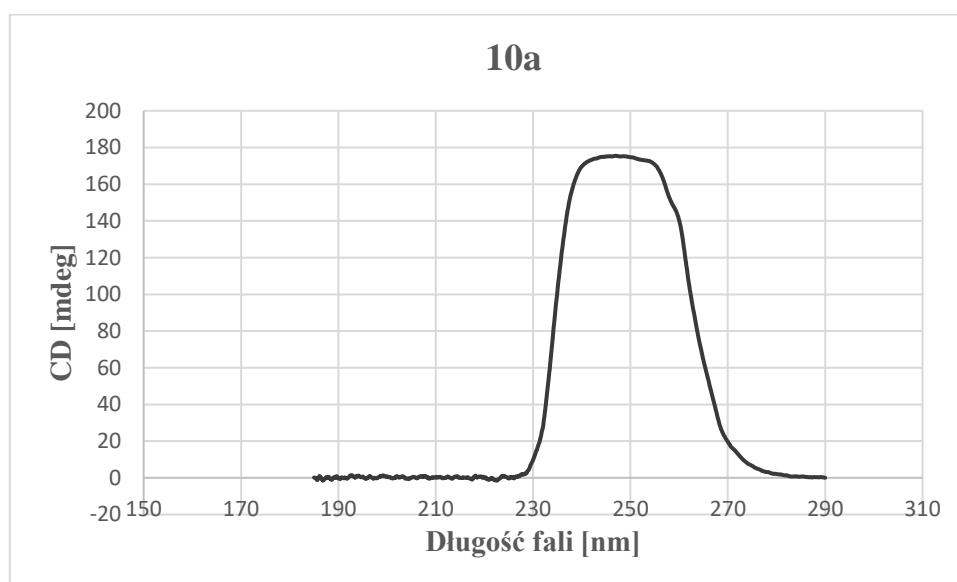
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

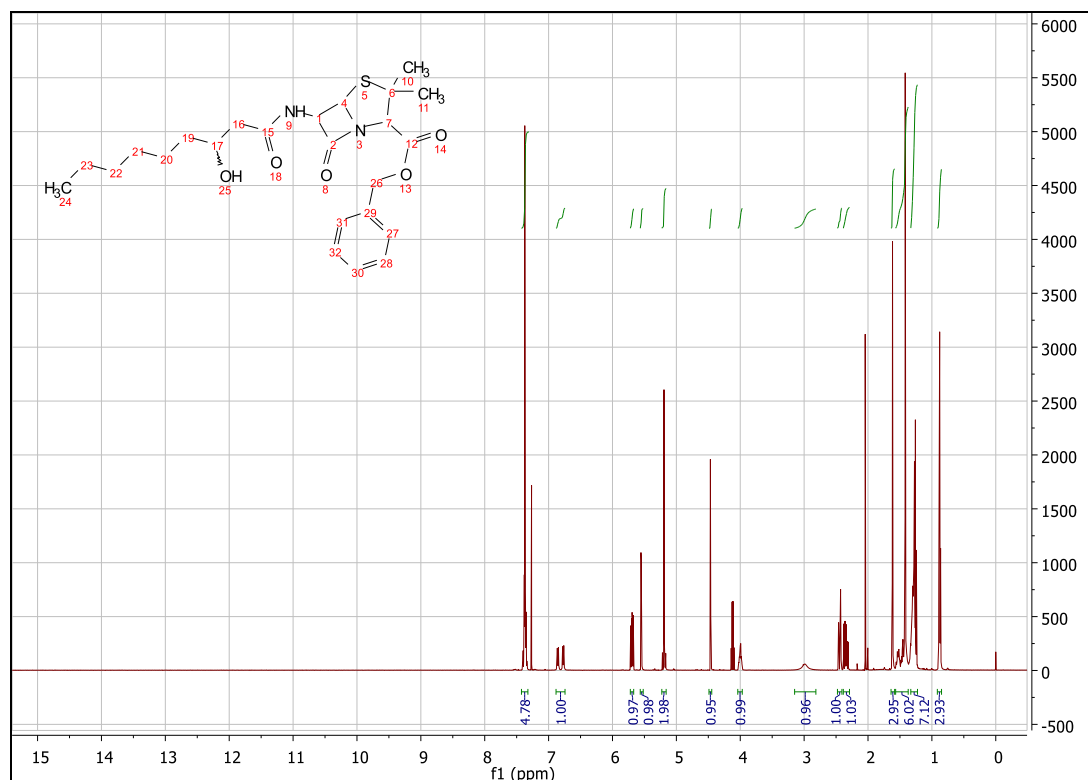


Widmo CD:

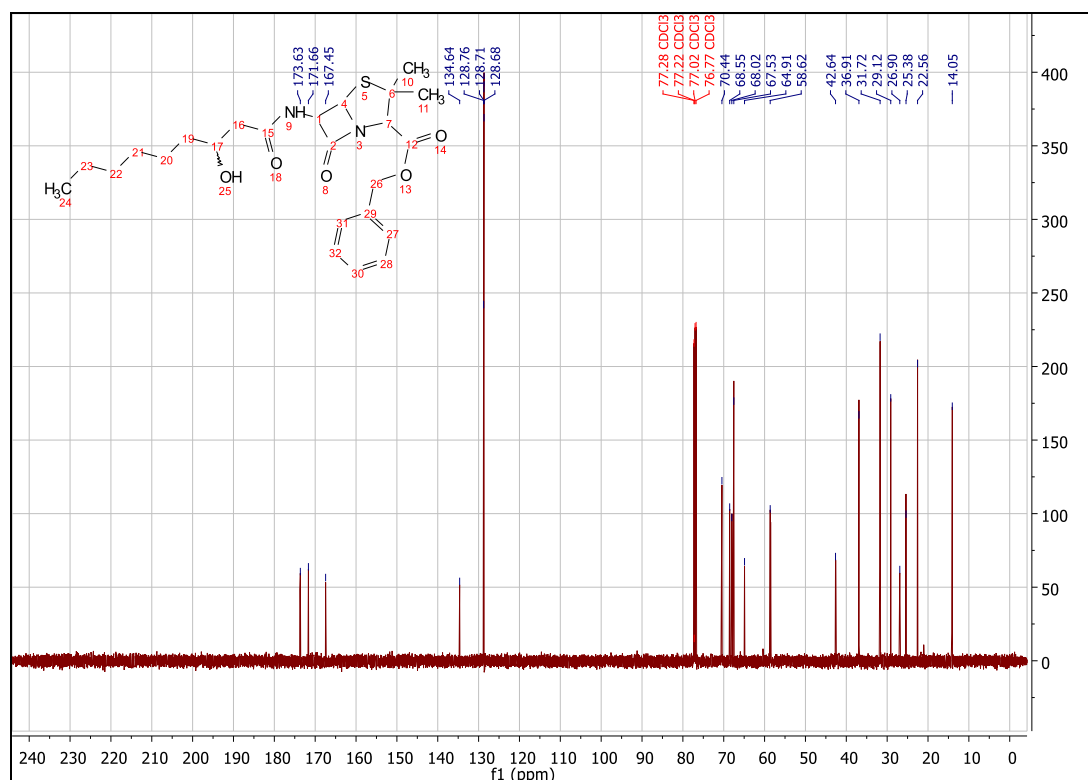


## Ester benzyloowy penicyliny z grupą 4b (10b):

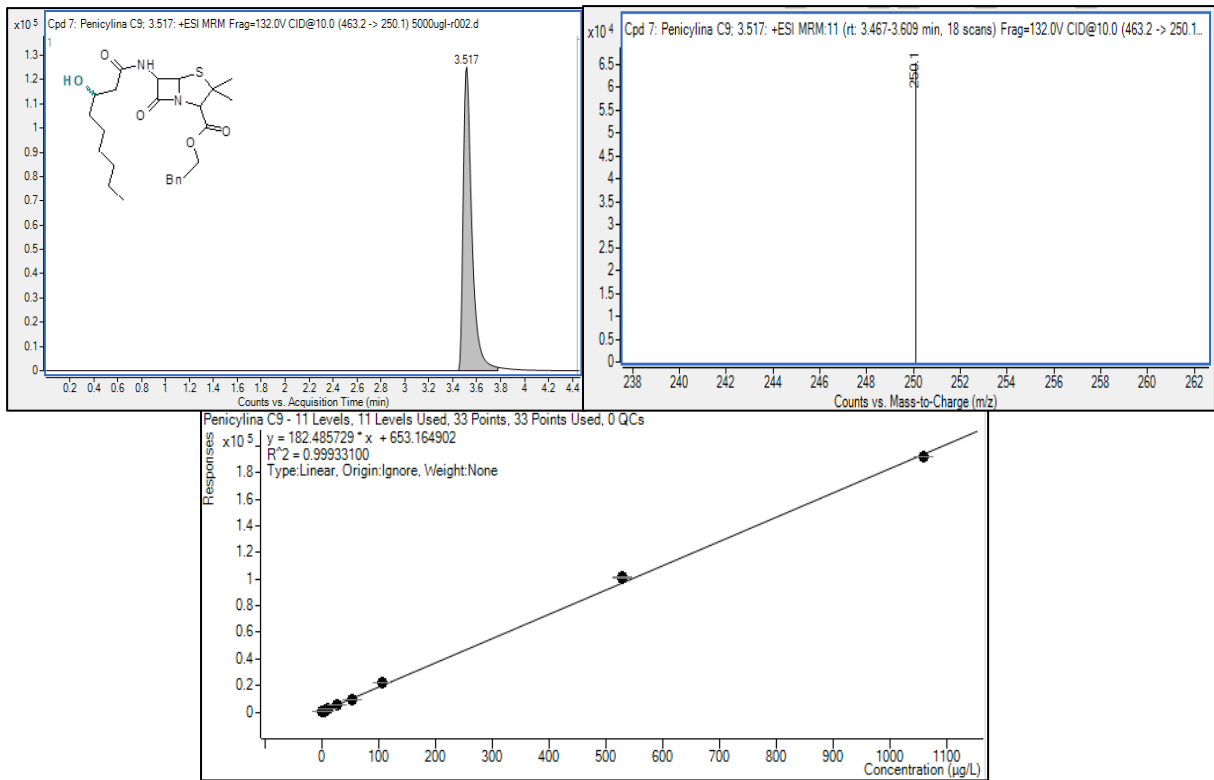
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



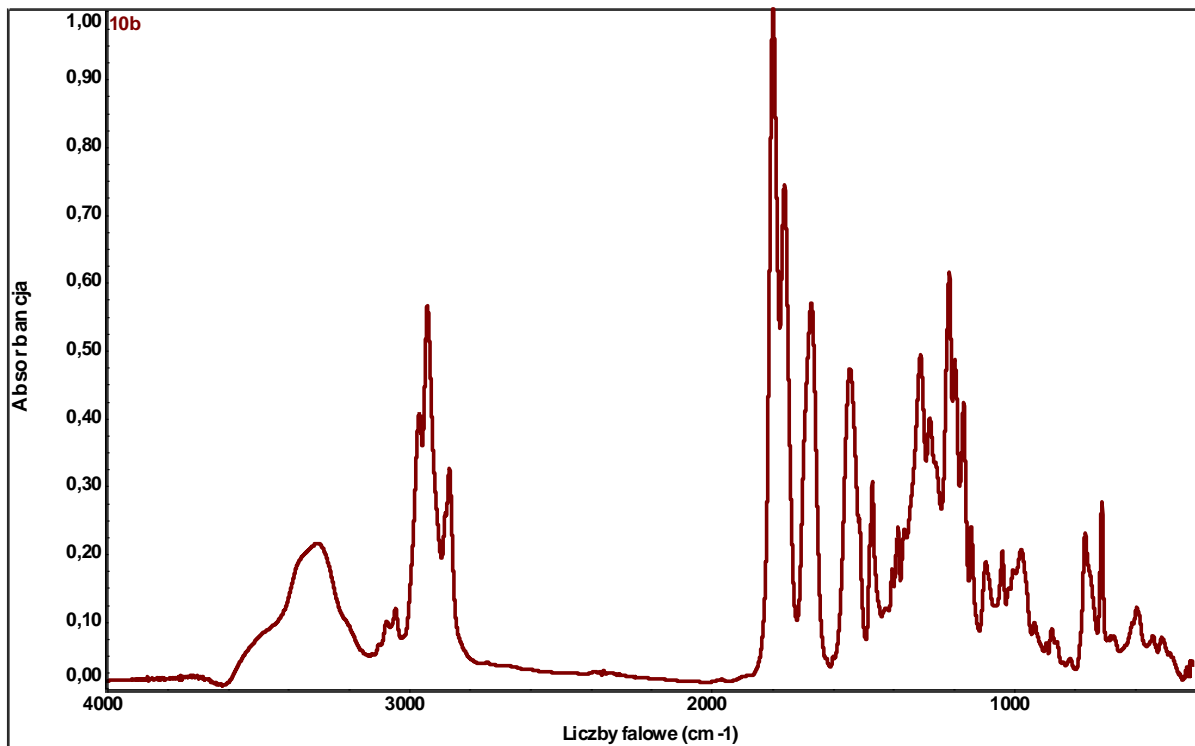
Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR:



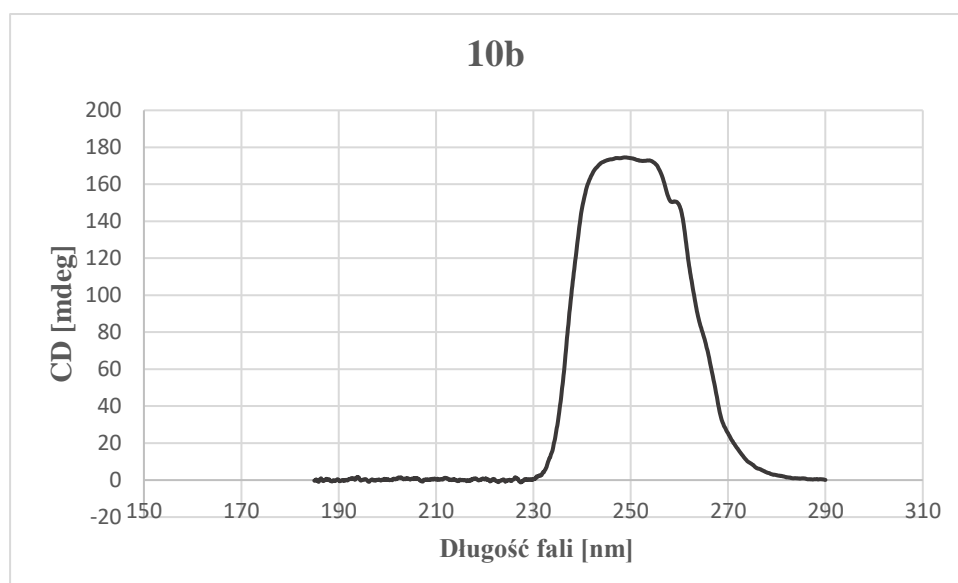
## Widmo MS/MS:



## Widmo IR:

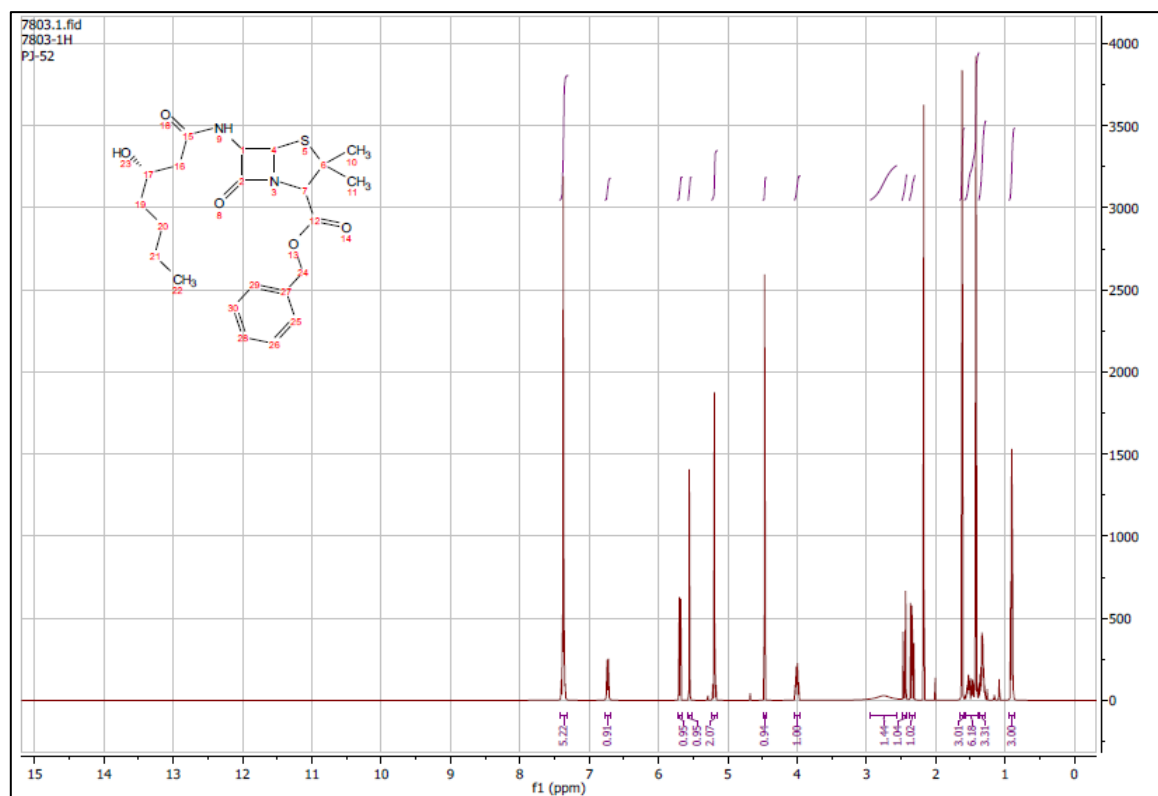


Widmo CD:

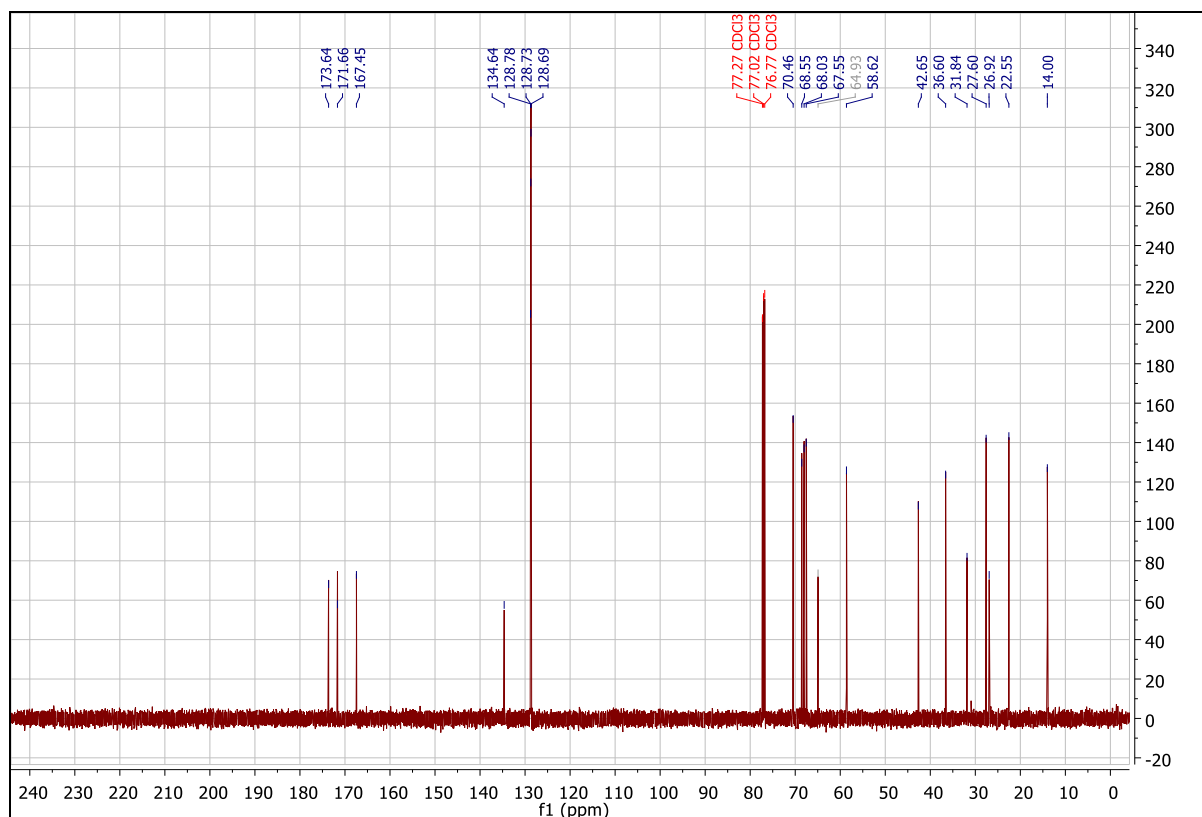


**Ester benzyloowy penicyliny z grupą 5a (11a)**

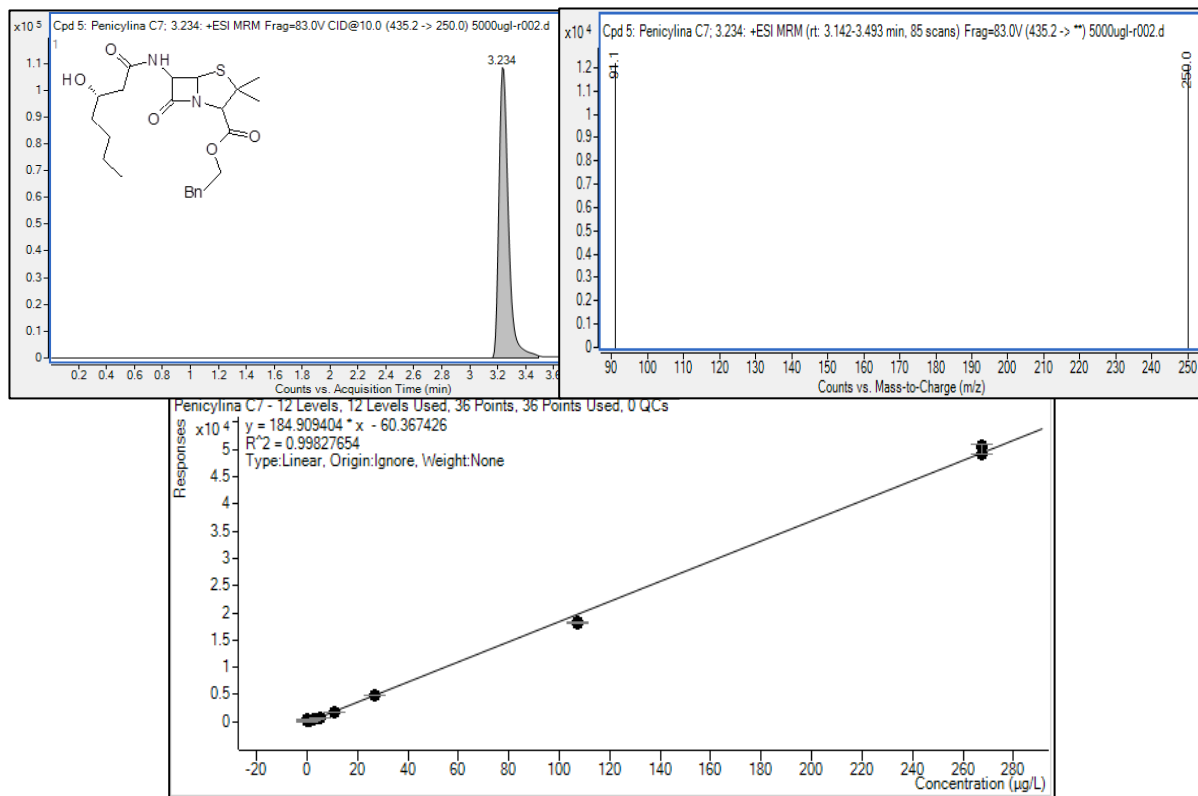
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



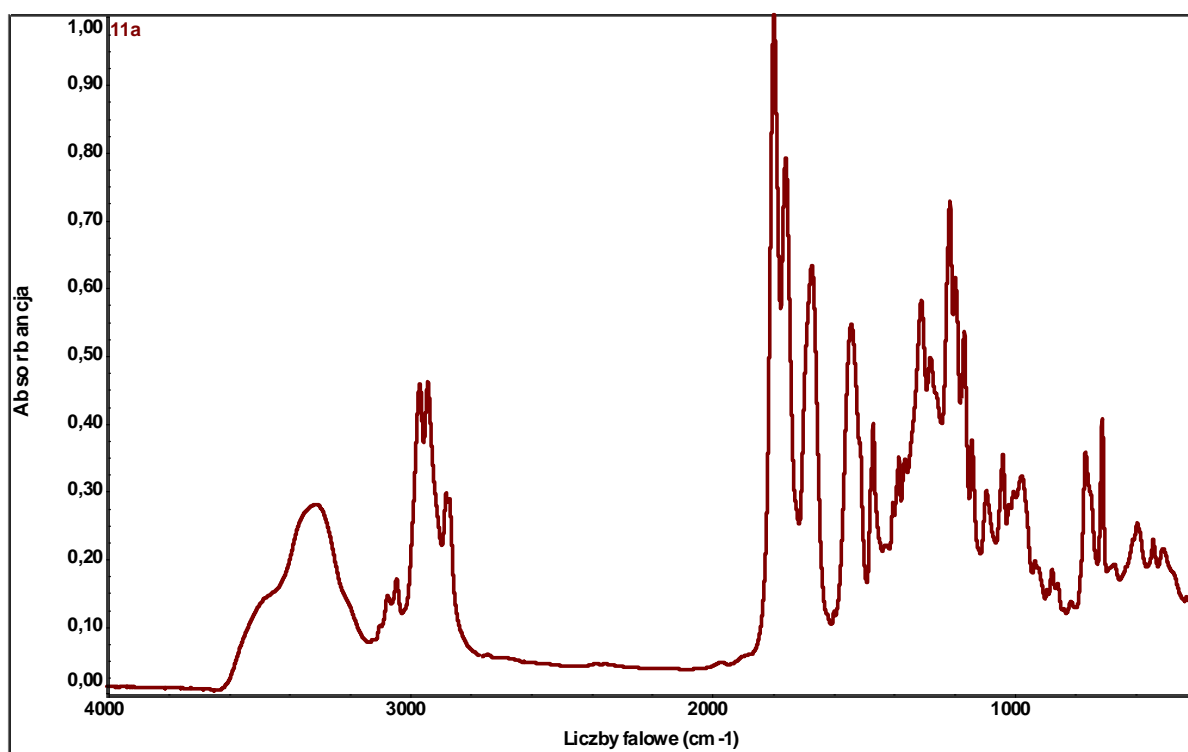
### Widmo <sup>13</sup>C NMR:



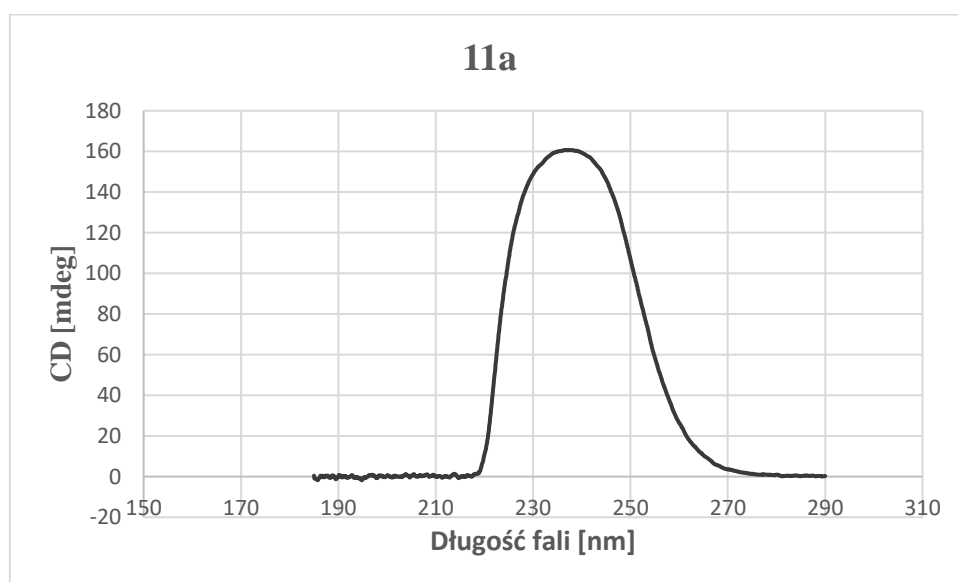
### Widmo MS/MS:



Widmo IR:

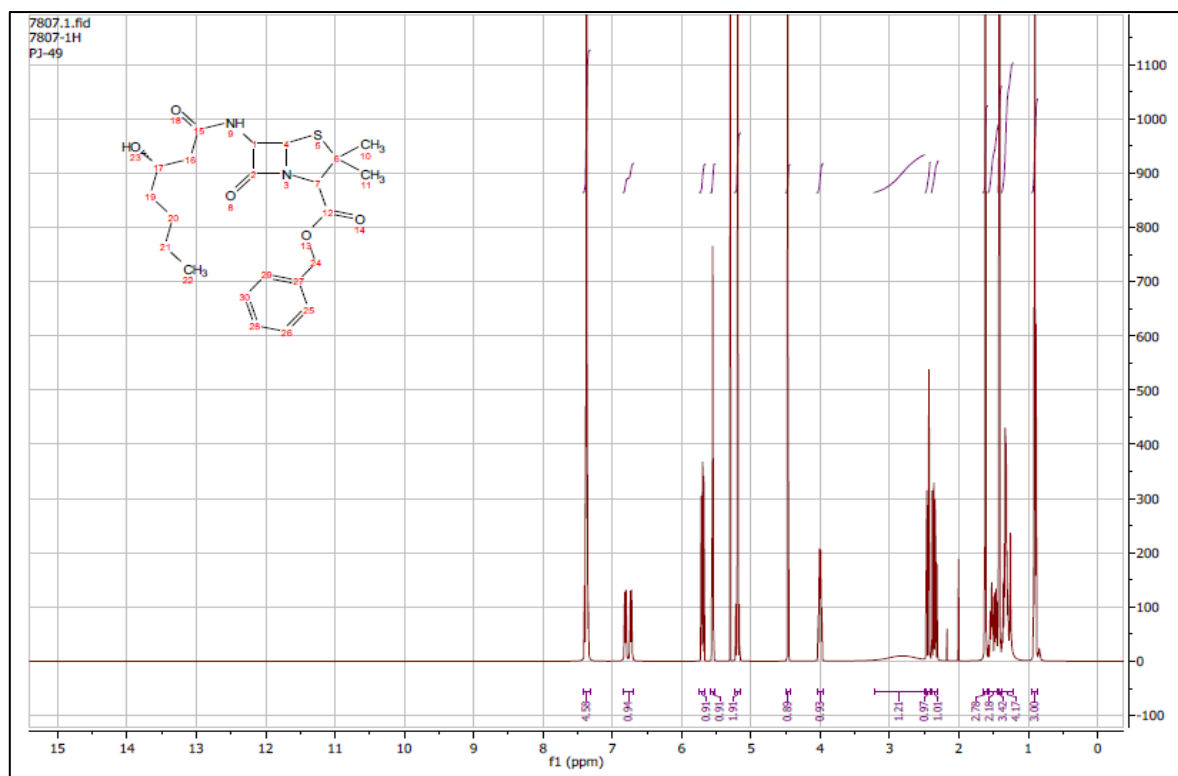


Widmo CD:

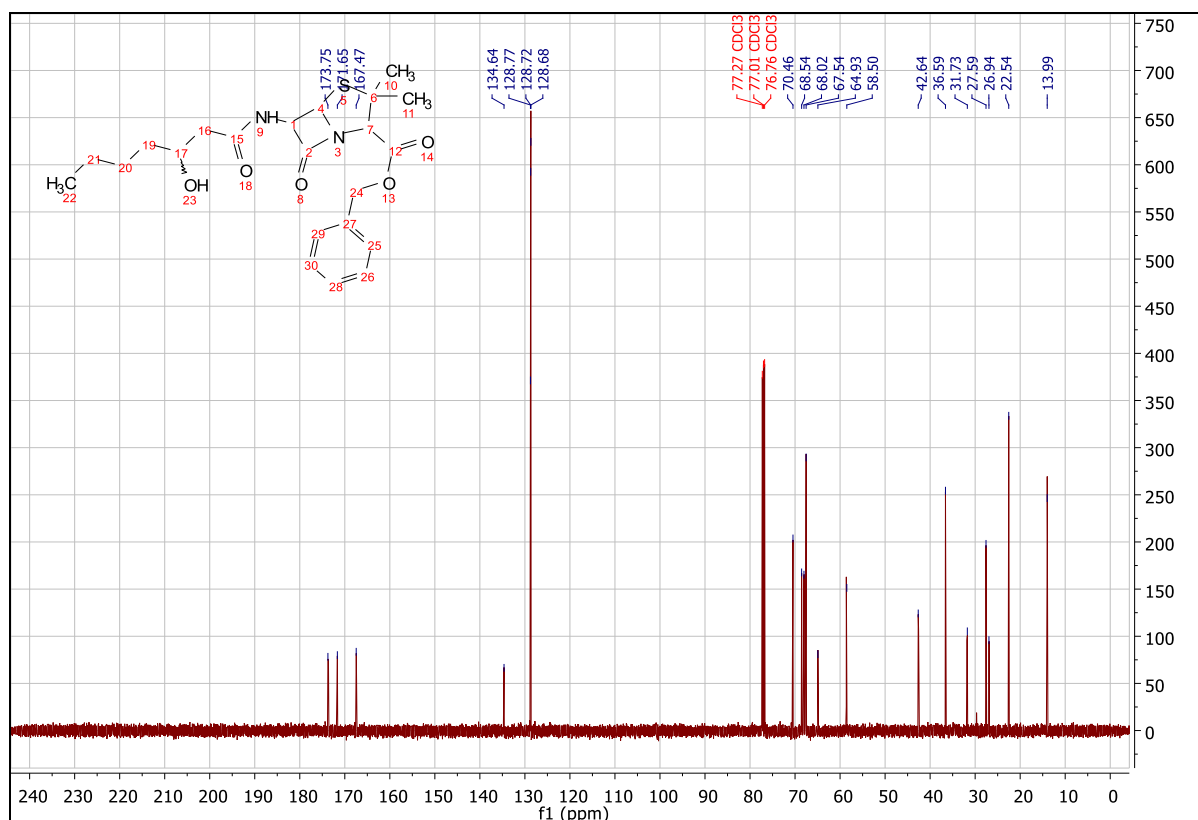


## Ester benzylowy penicyliny z grupą 5b (11b)

Widmo  $^1\text{H}$  NMR:

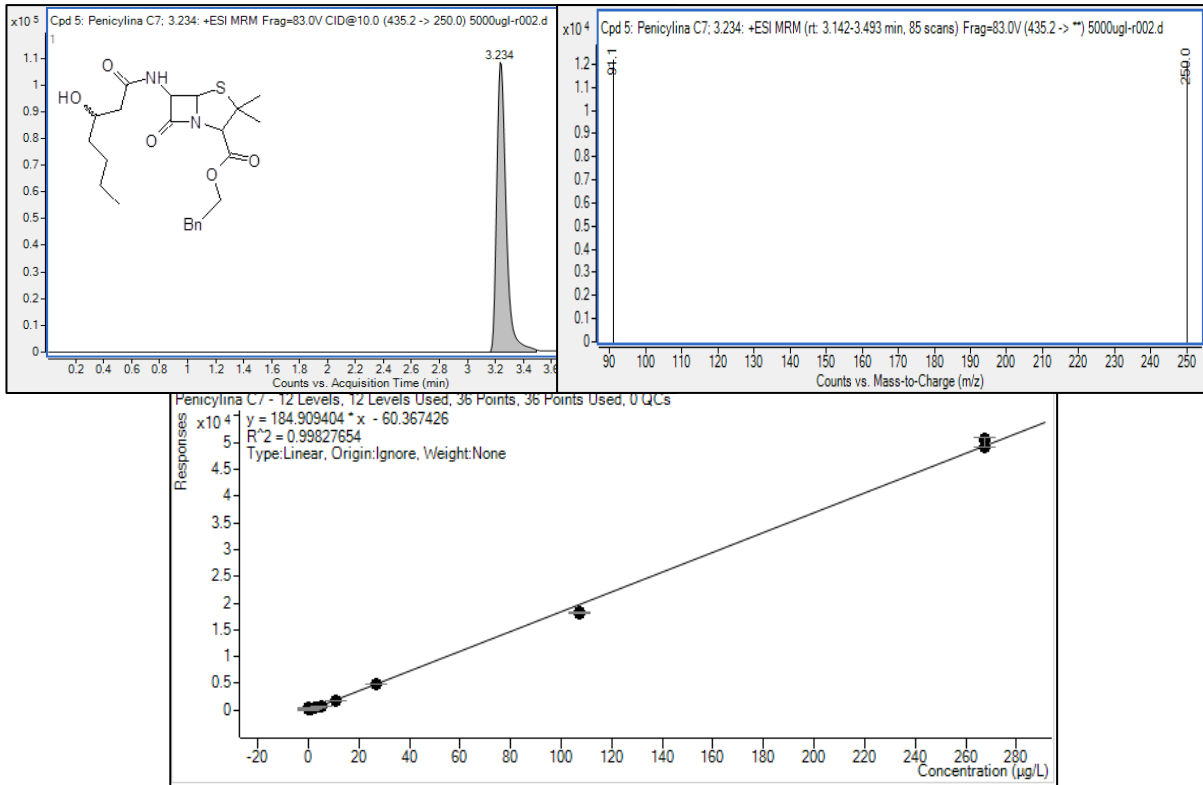


Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR:

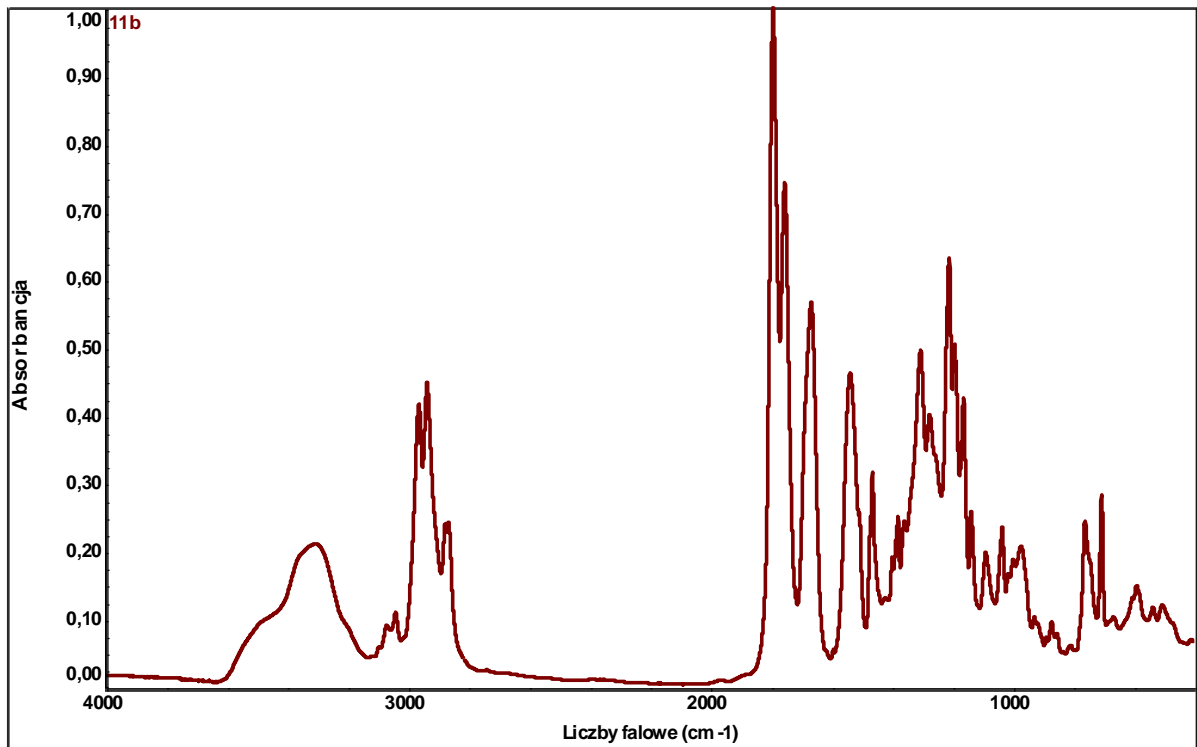




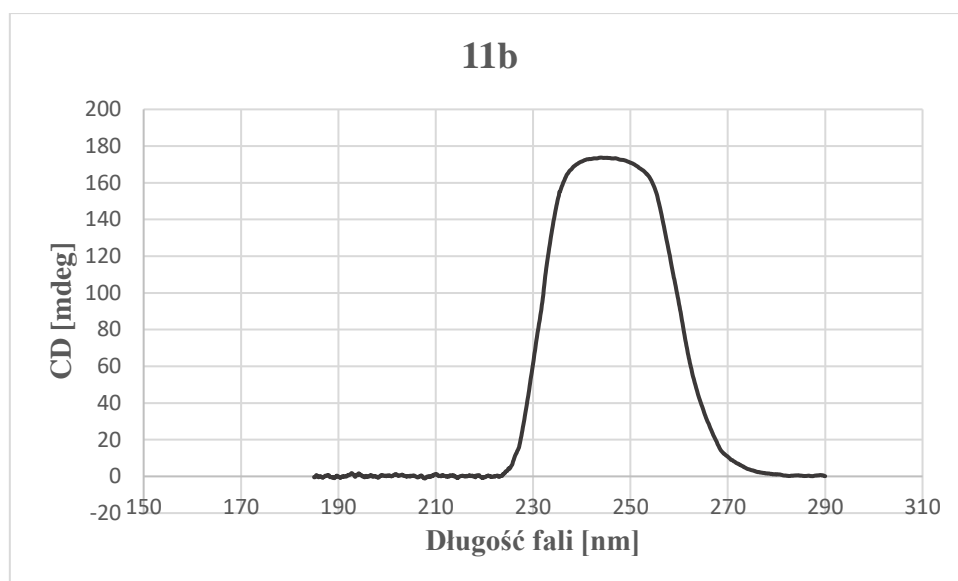
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

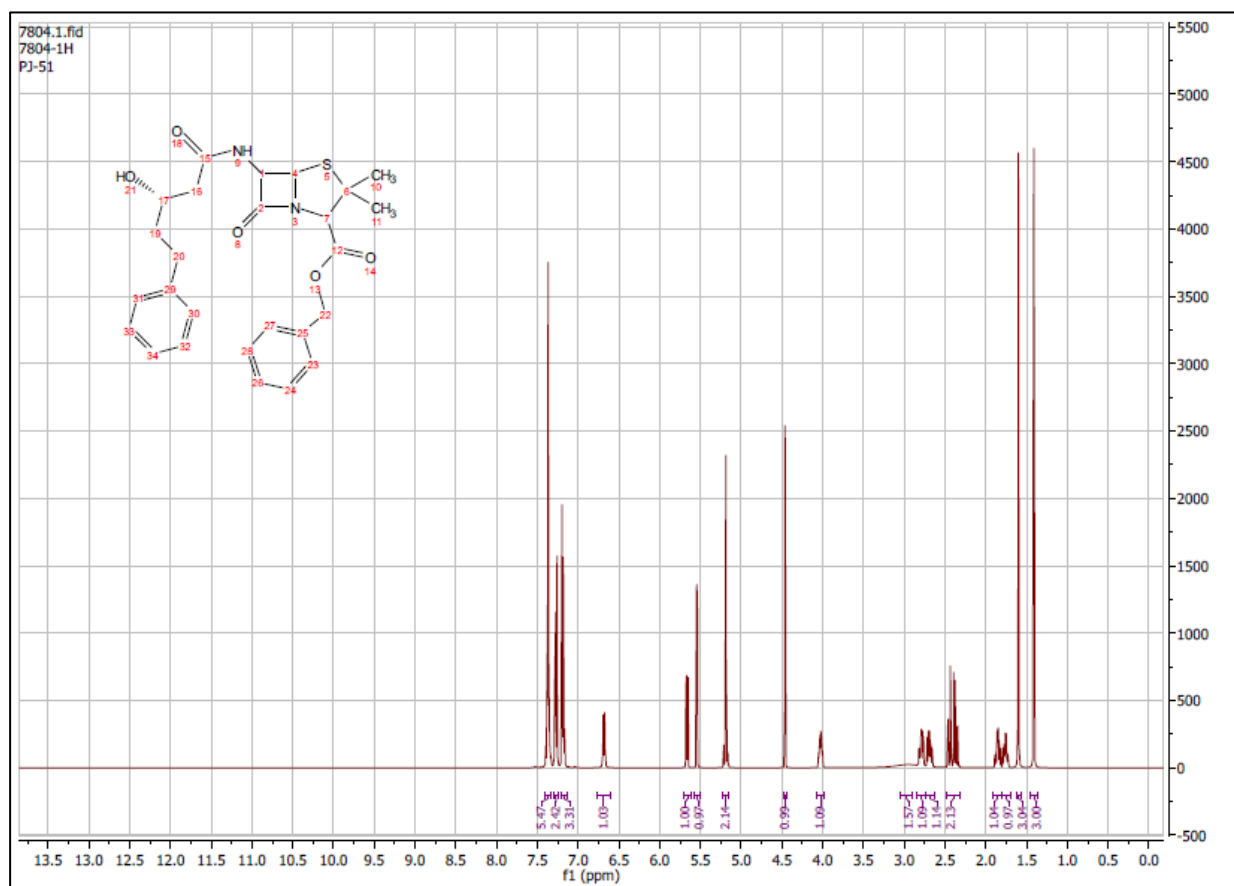


Widmo CD:

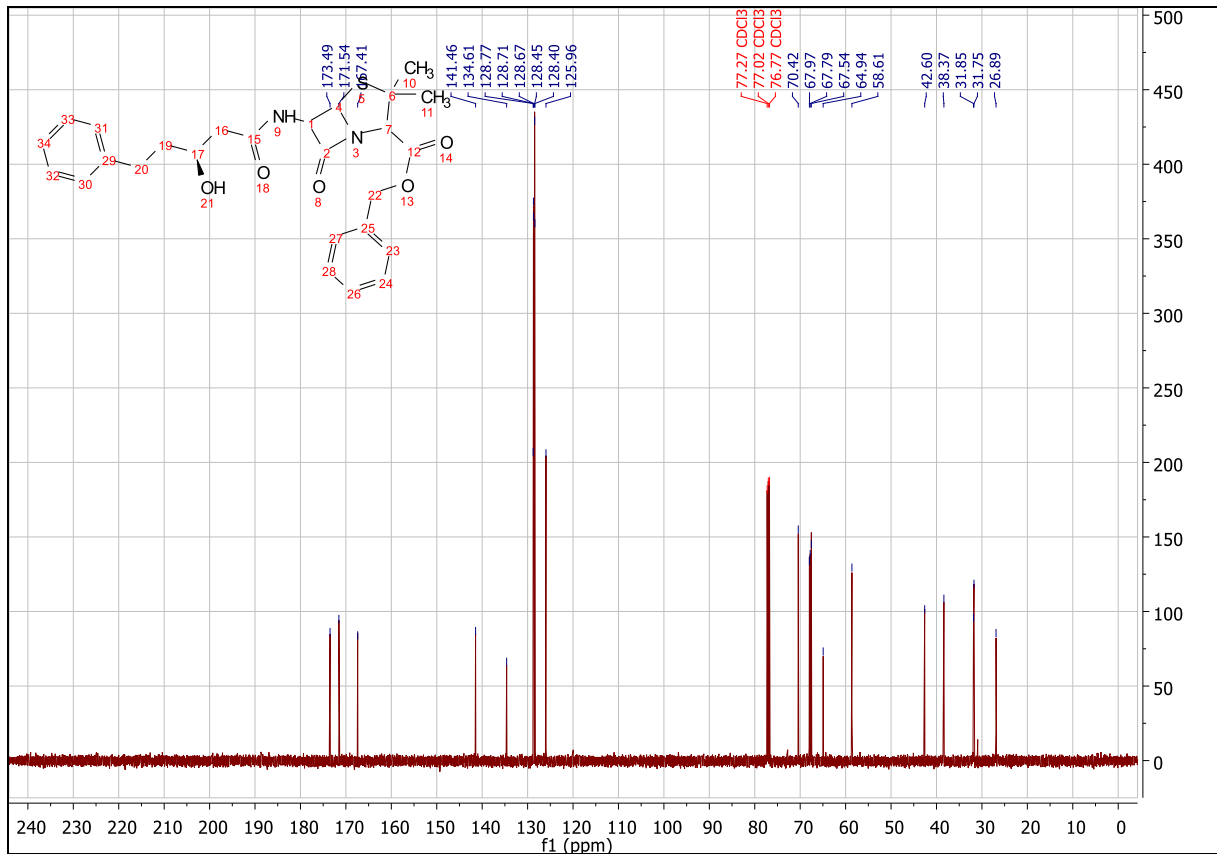


**Ester benzyłowy penicyliny z grupą 6a (12a)**

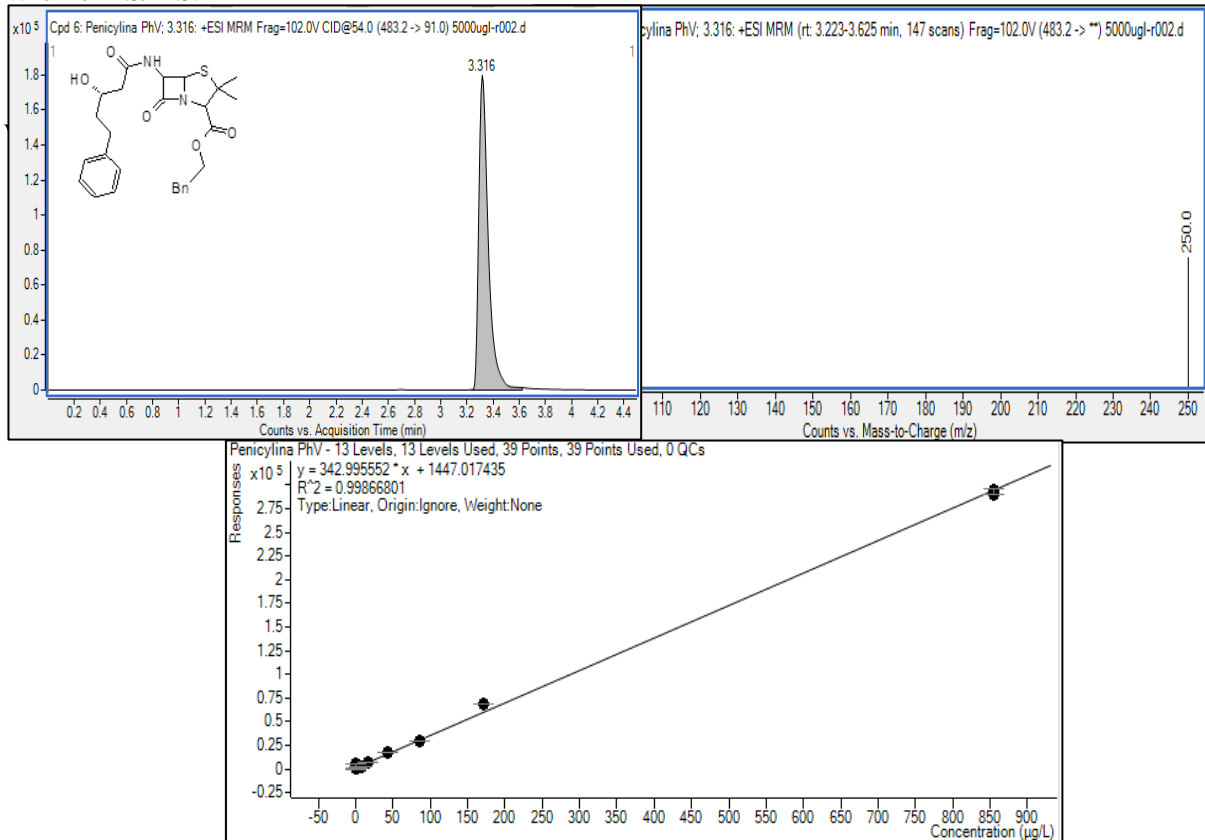
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



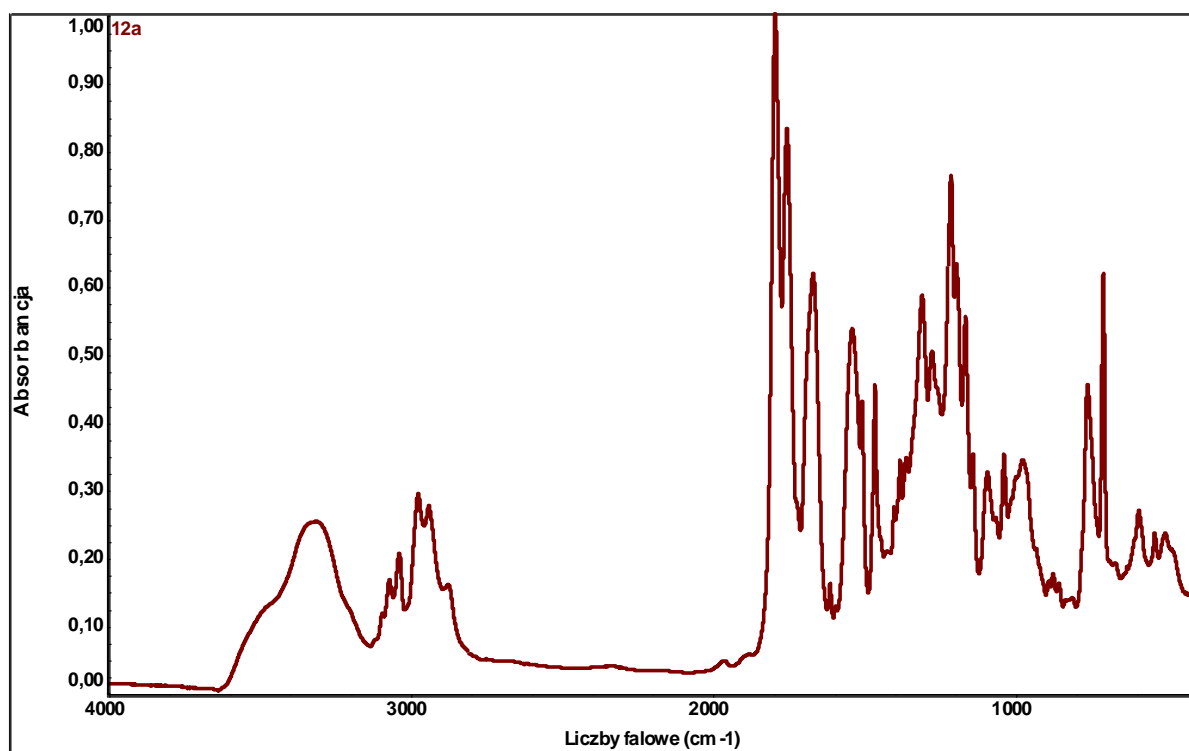
### Widmo <sup>13</sup>C NMR:



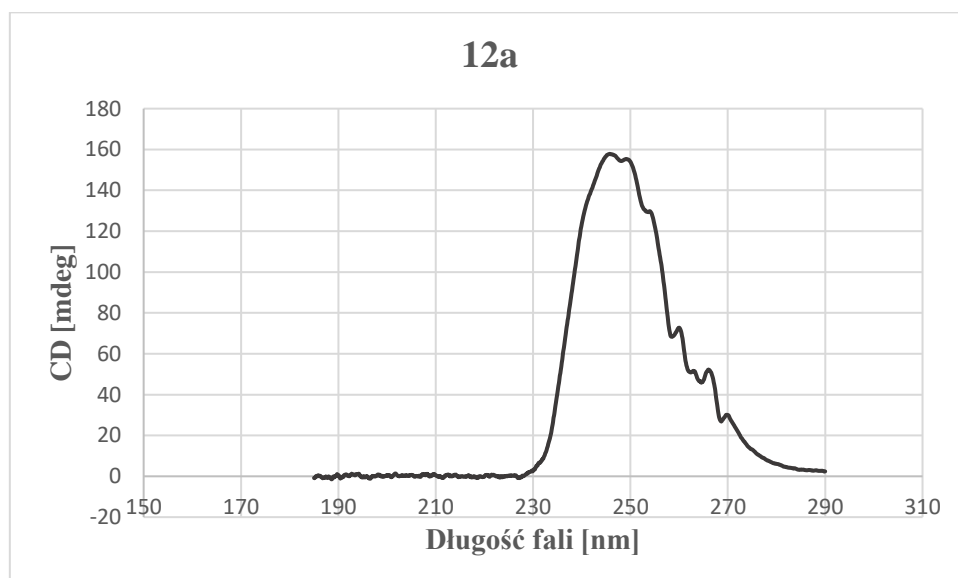
### Widmo MS/MS:



Widmo IR:

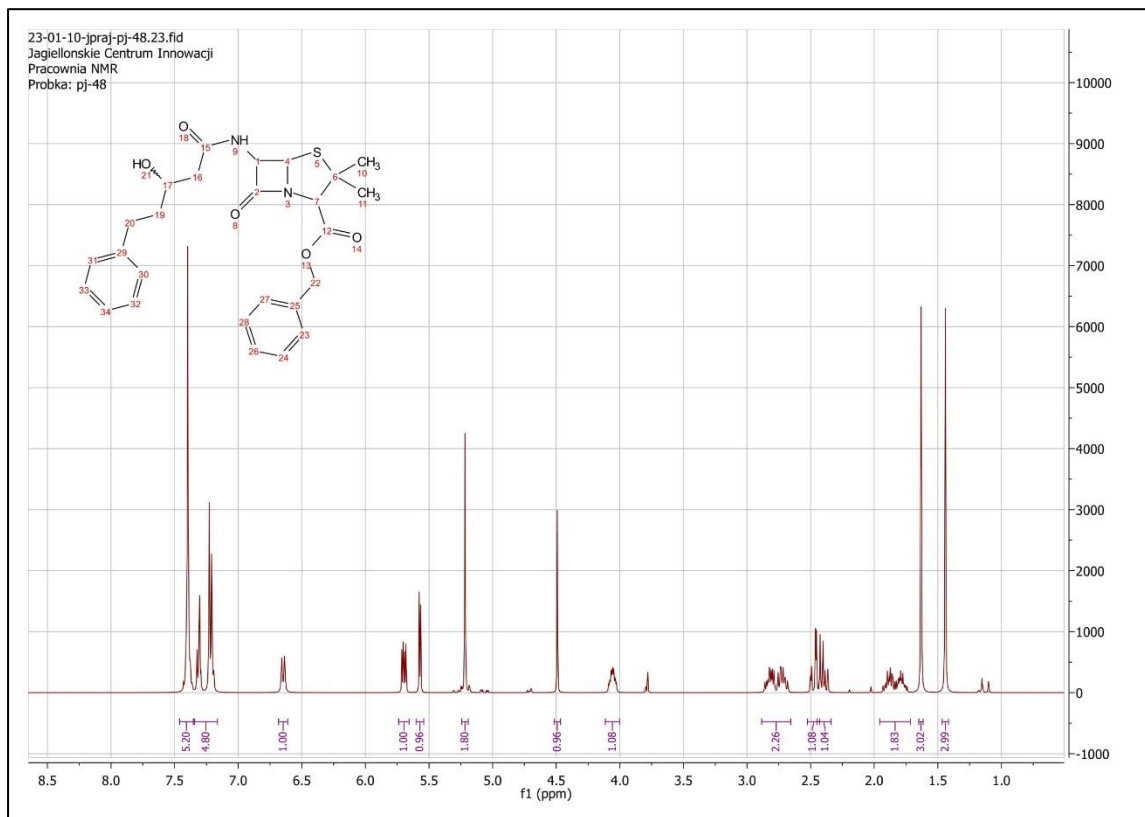


Widmo CD:

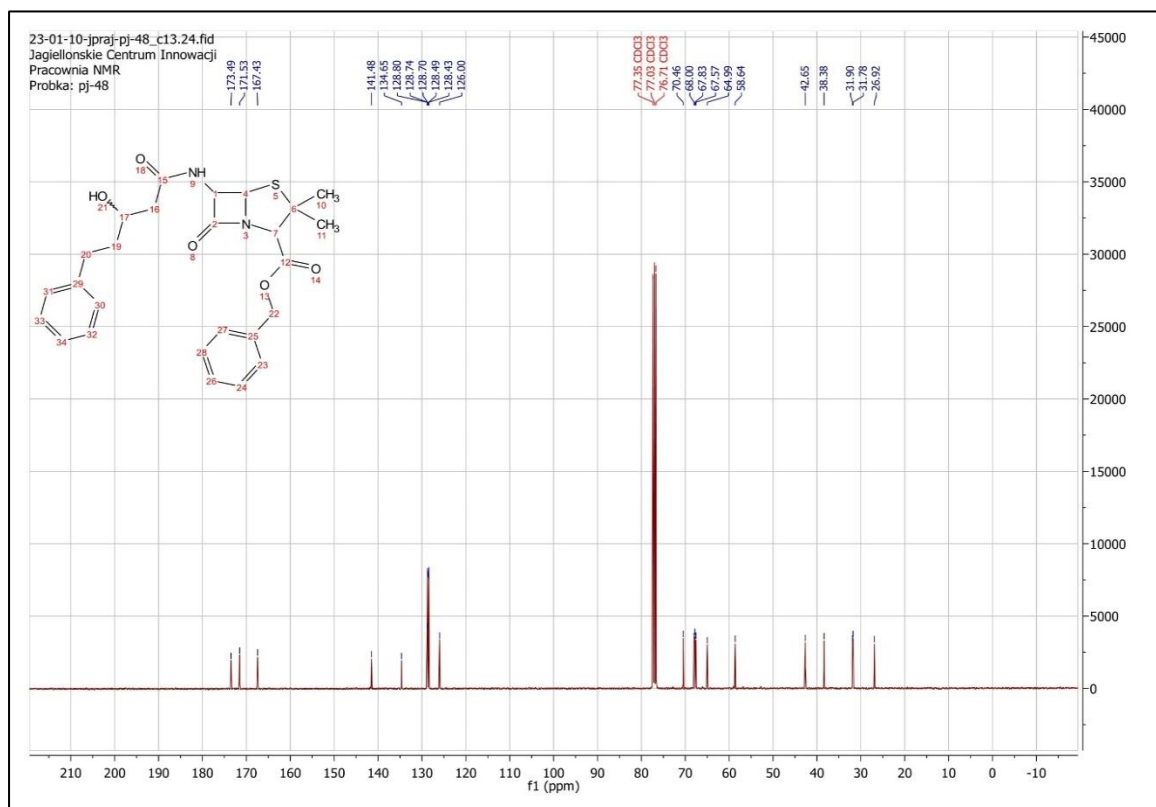


## Ester benzyloowy penicyliny z grupą 6b (12b)

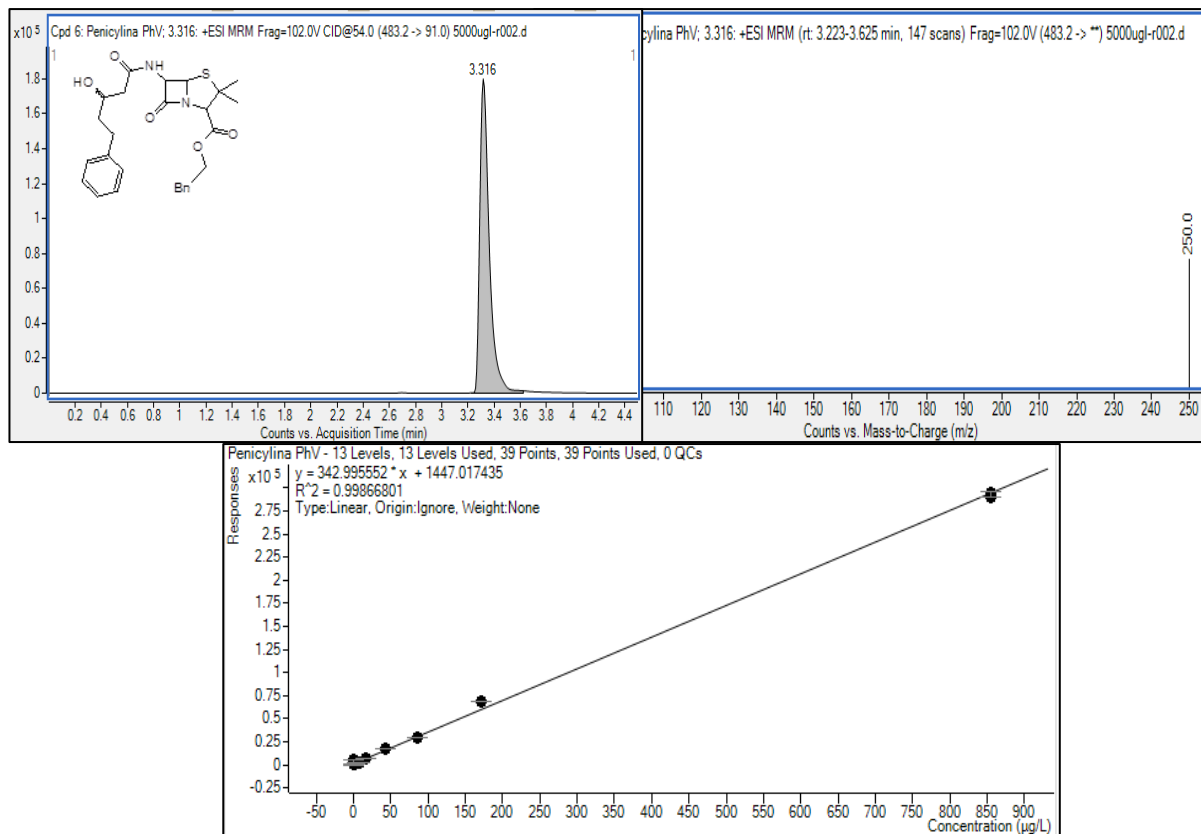
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



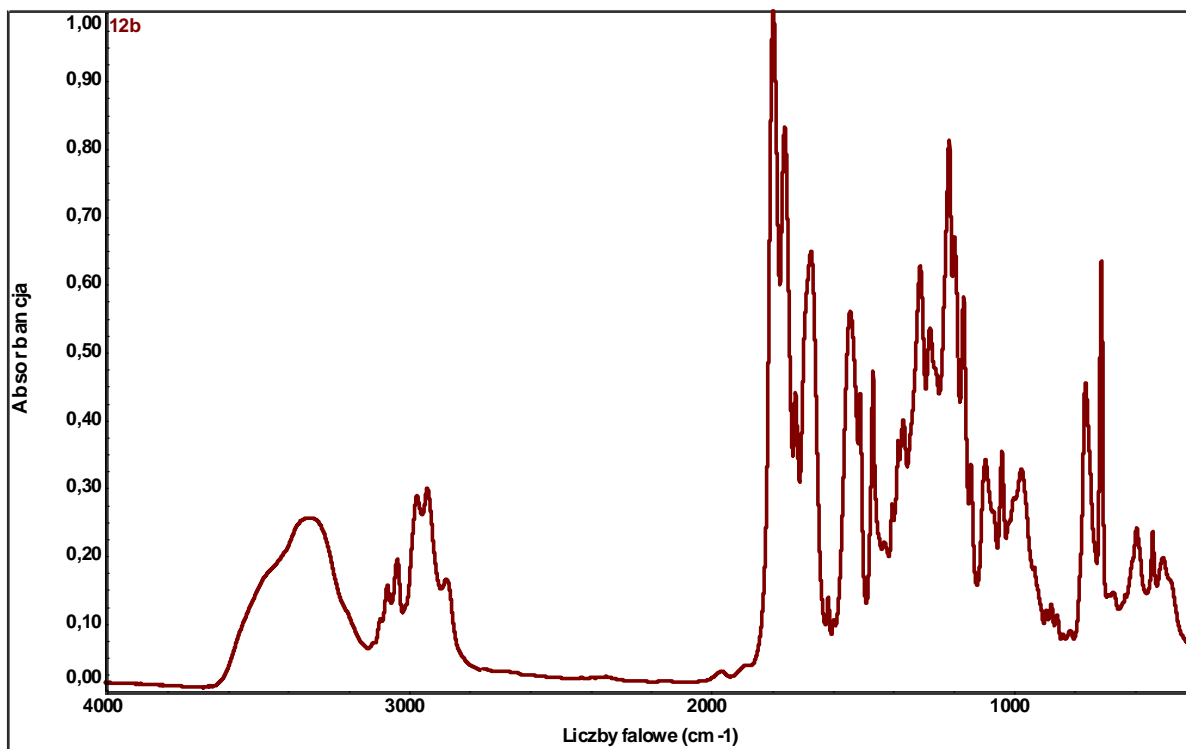
Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR:



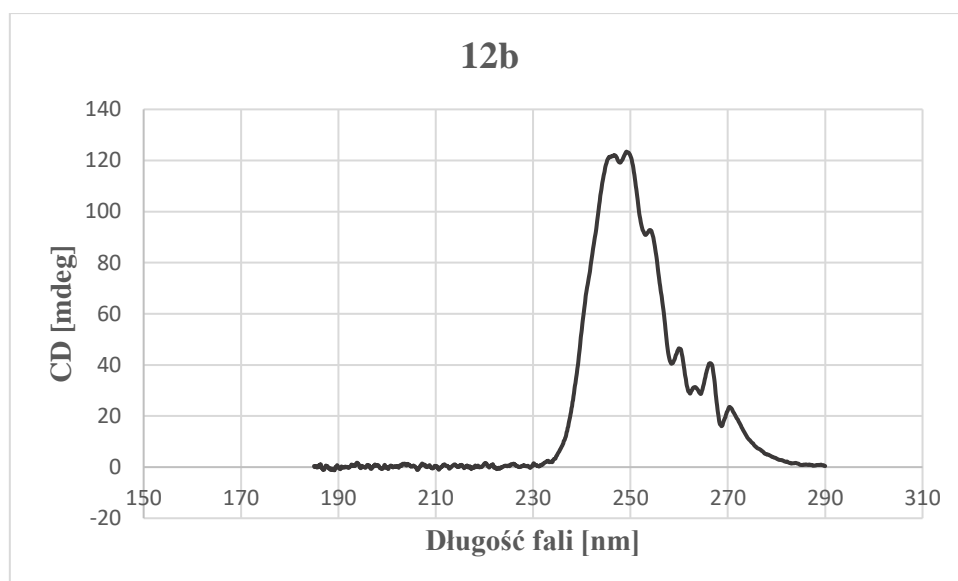
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

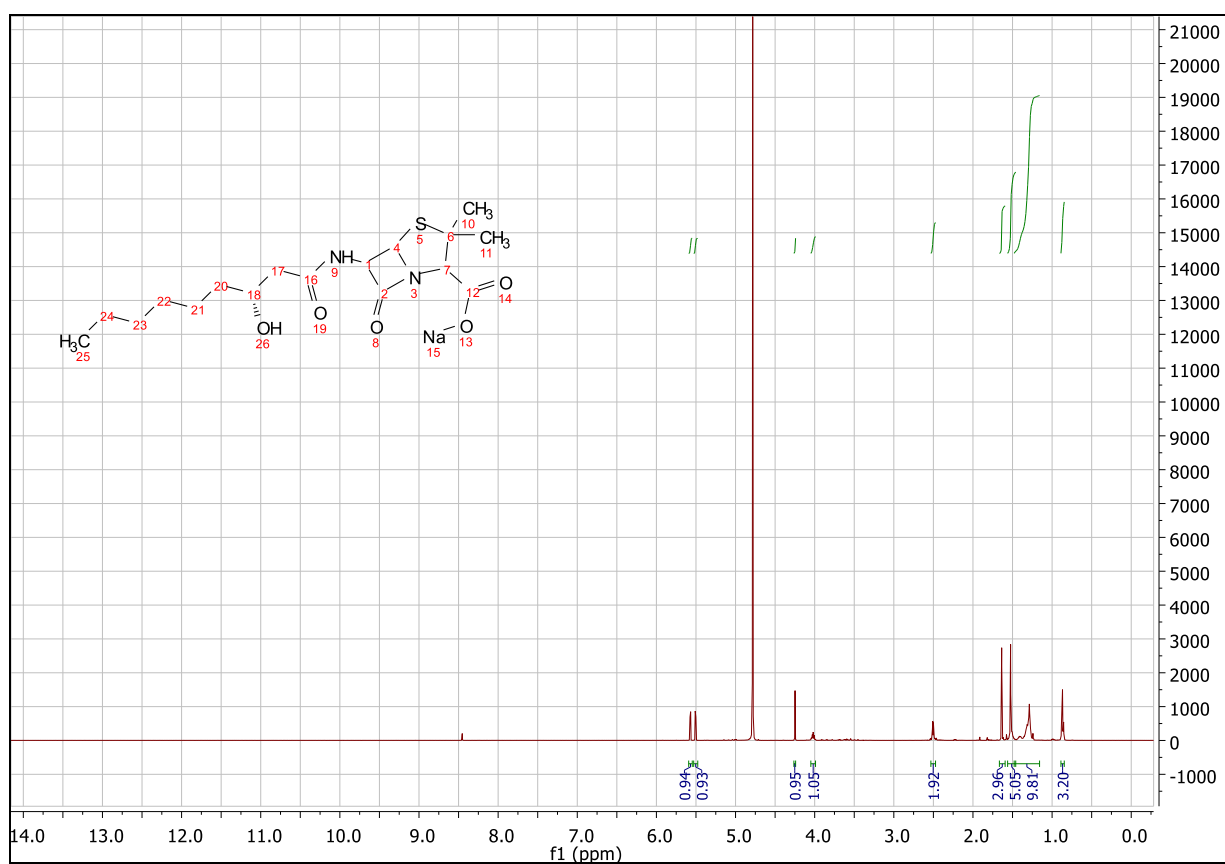


Widmo CD:

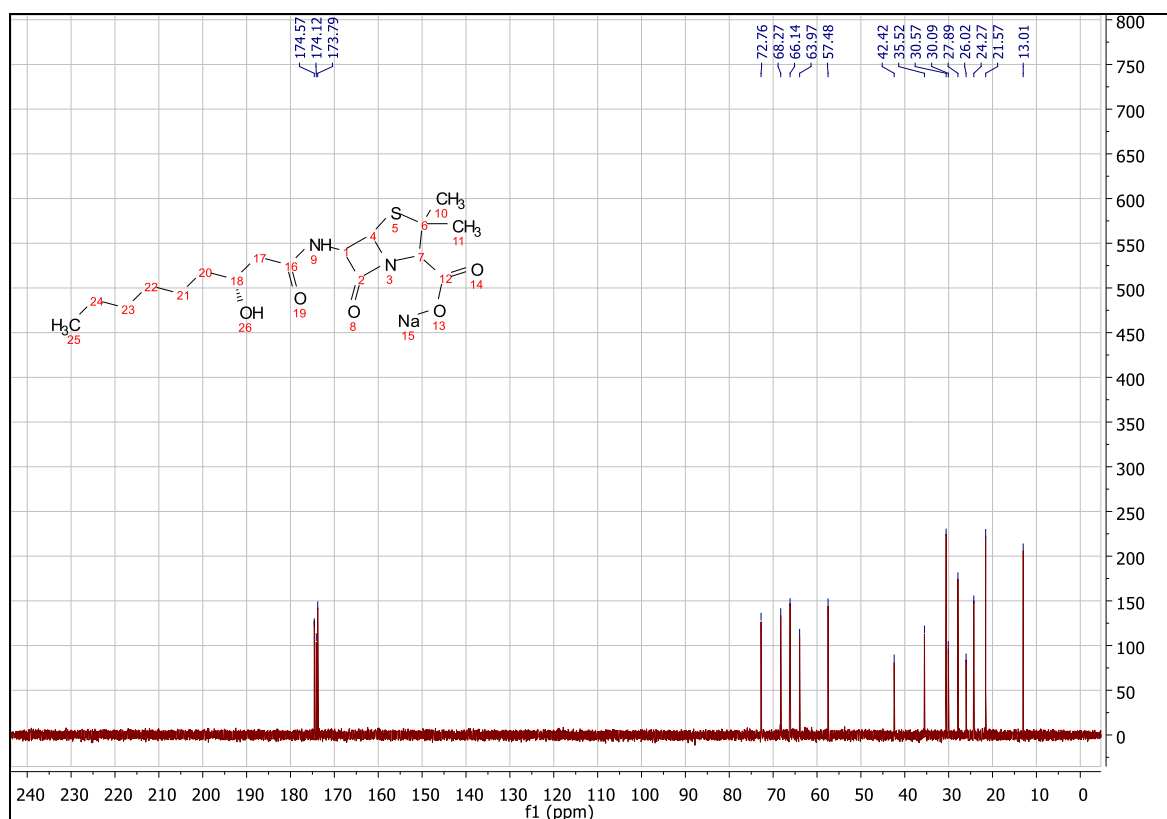


**Penicylina z grupą 4a (13a)**

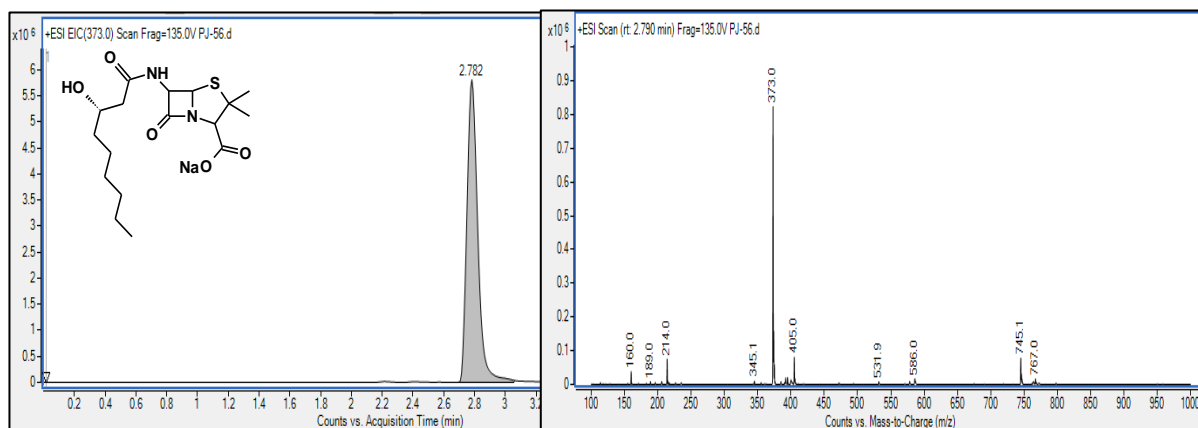
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR:

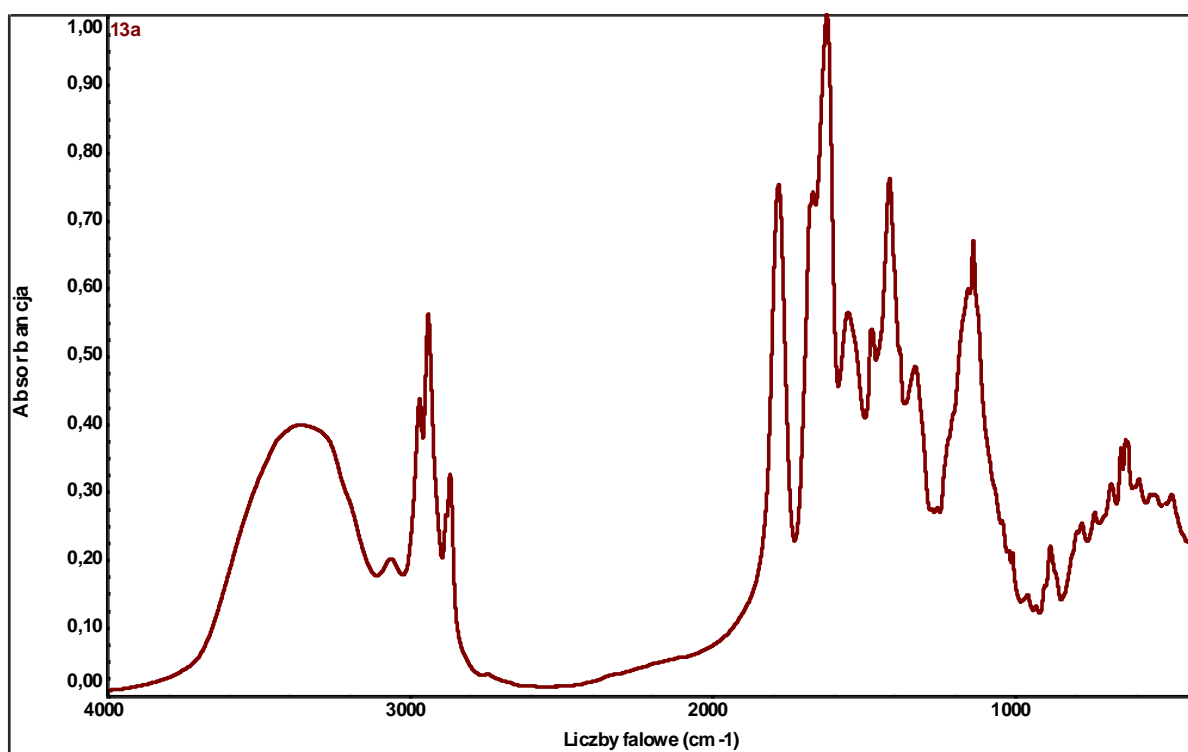


Widmo MS/MS:

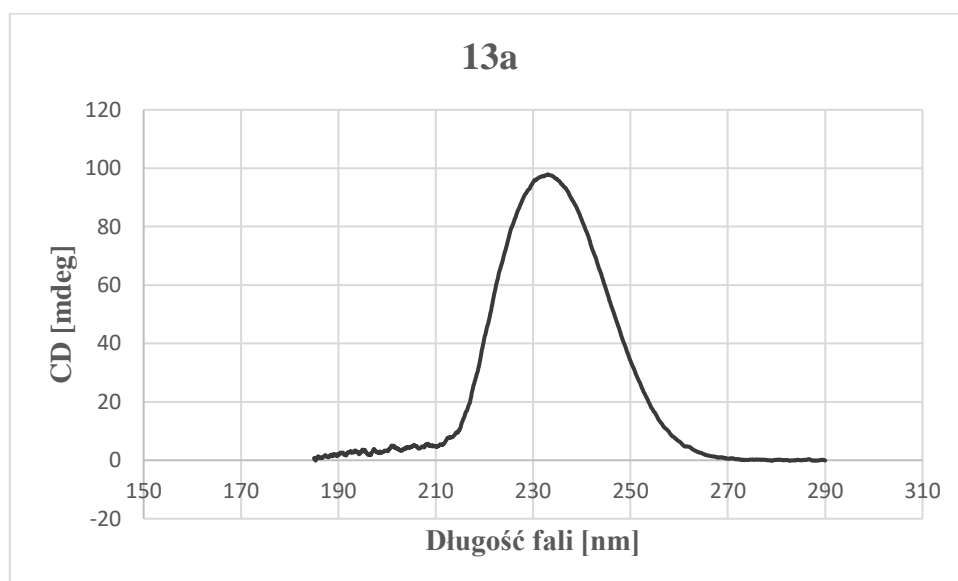




Widmo IR:

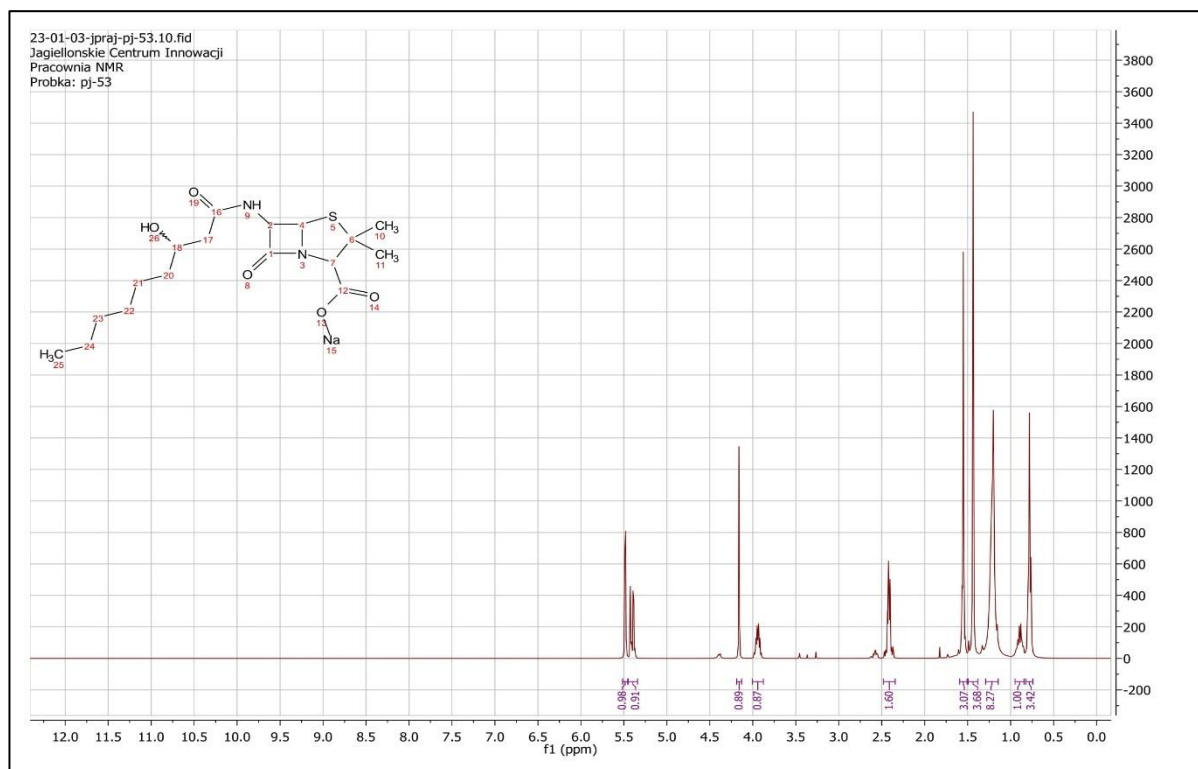


Widmo CD:

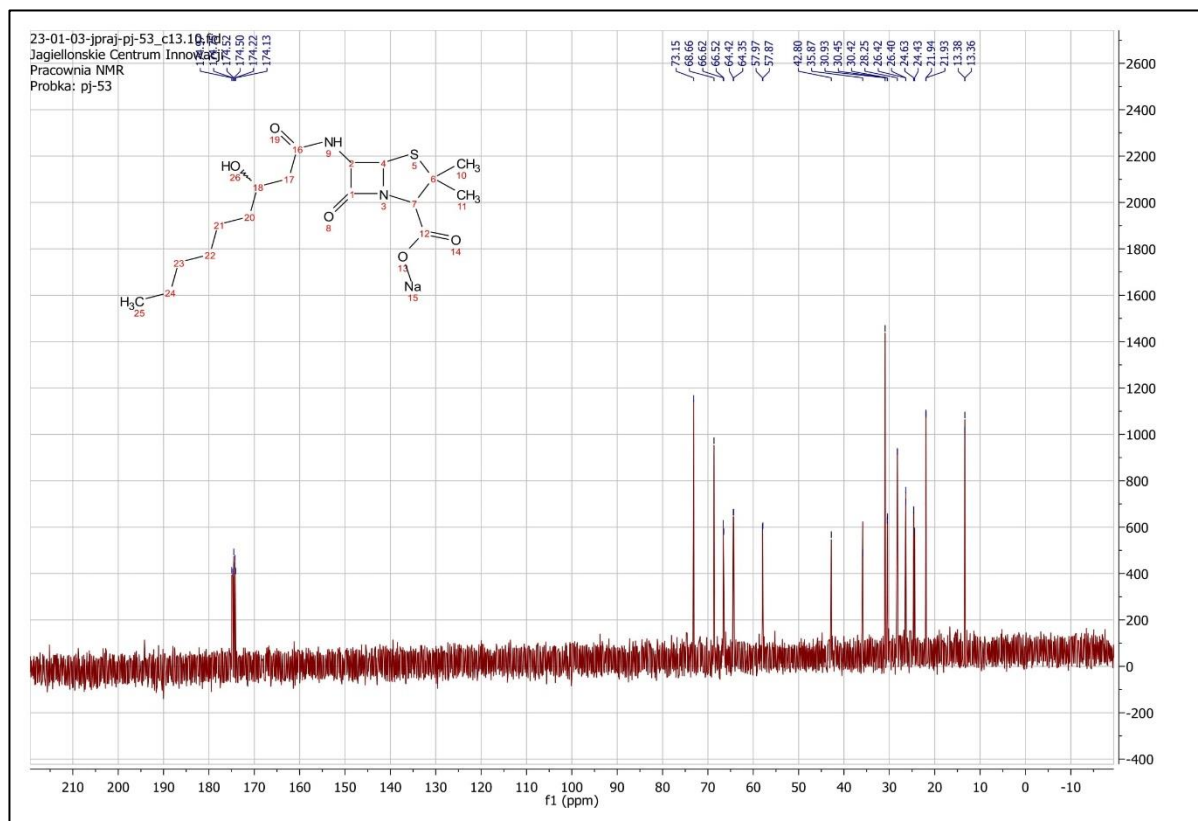


## Penicylina z grupą 4b (13b):

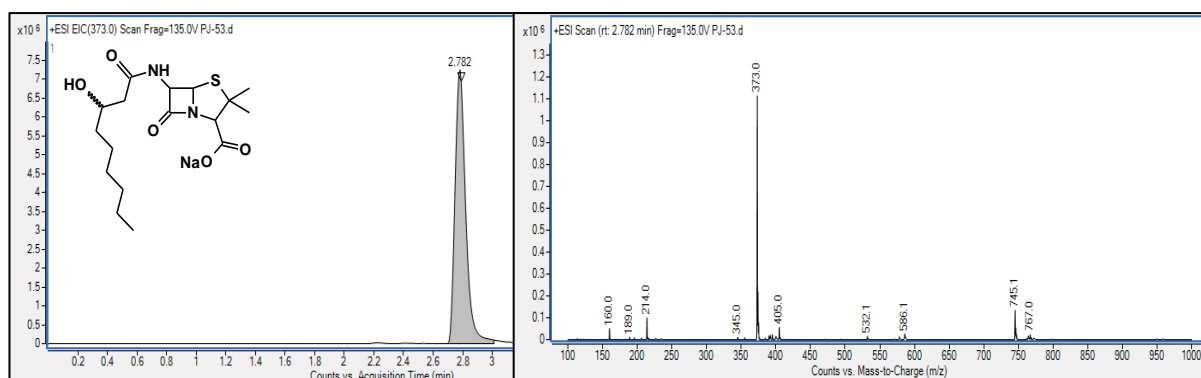
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



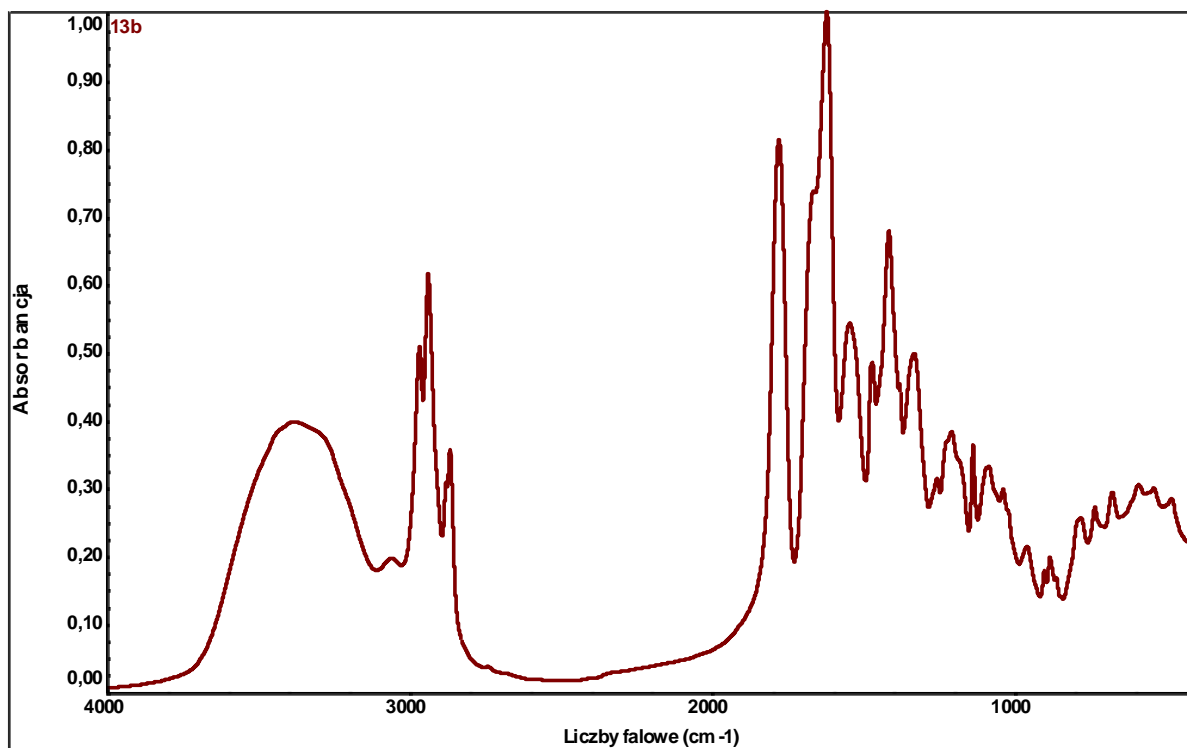
Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR:



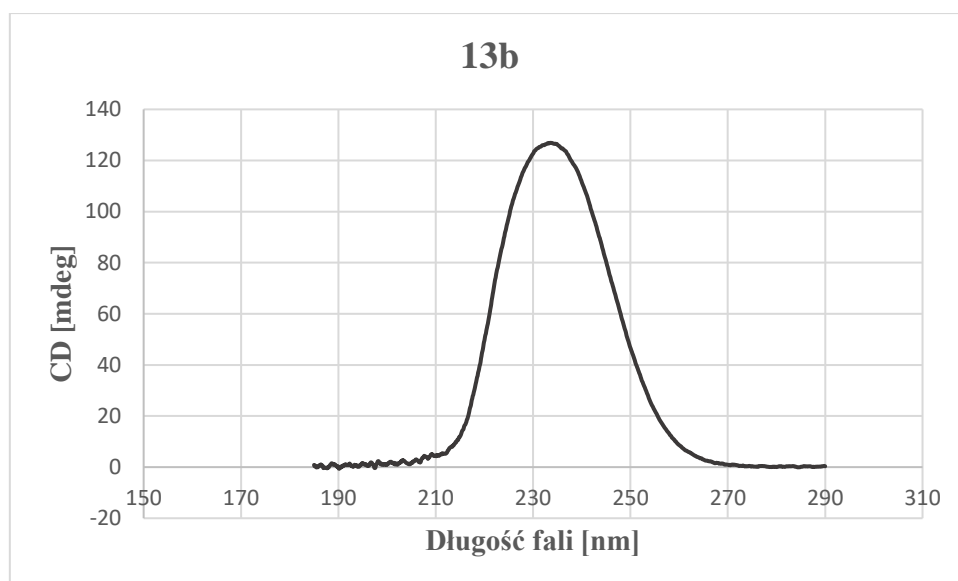
### Widmo MS/MS:



### Widmo IR:

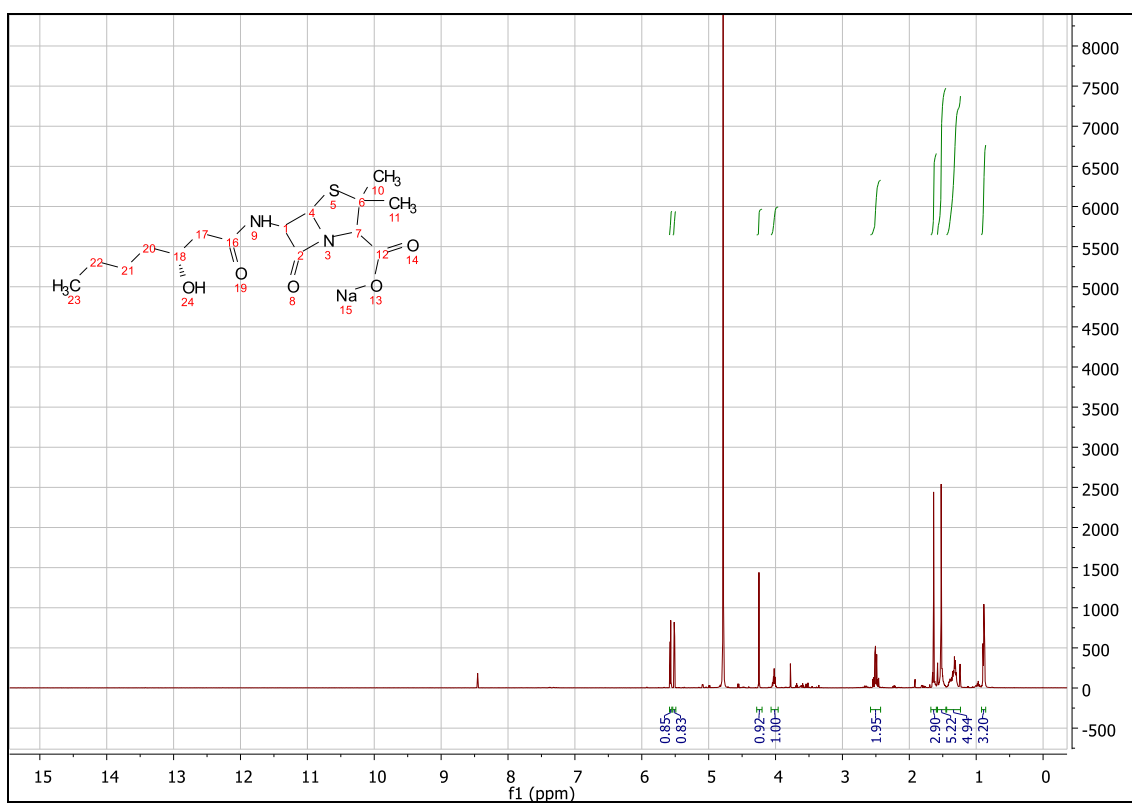


Widmo CD:

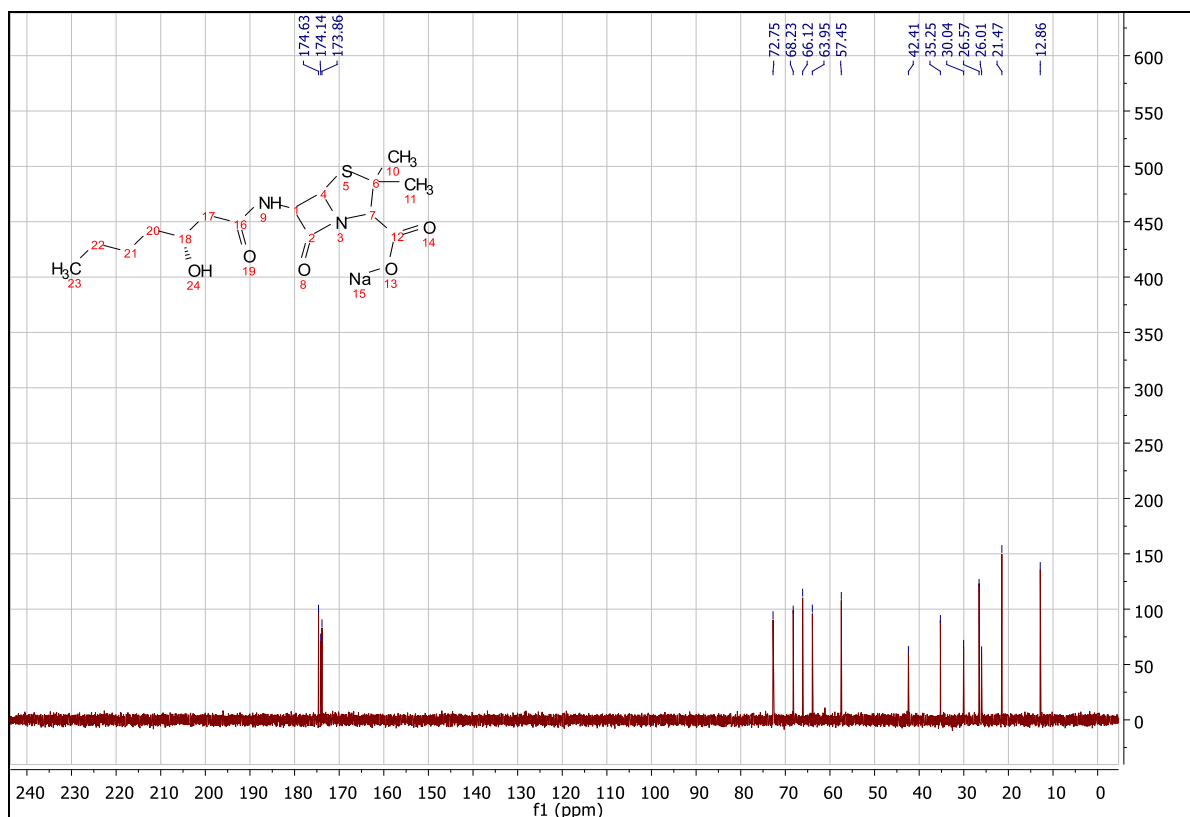


Penicylina z grupą 5a (14a)

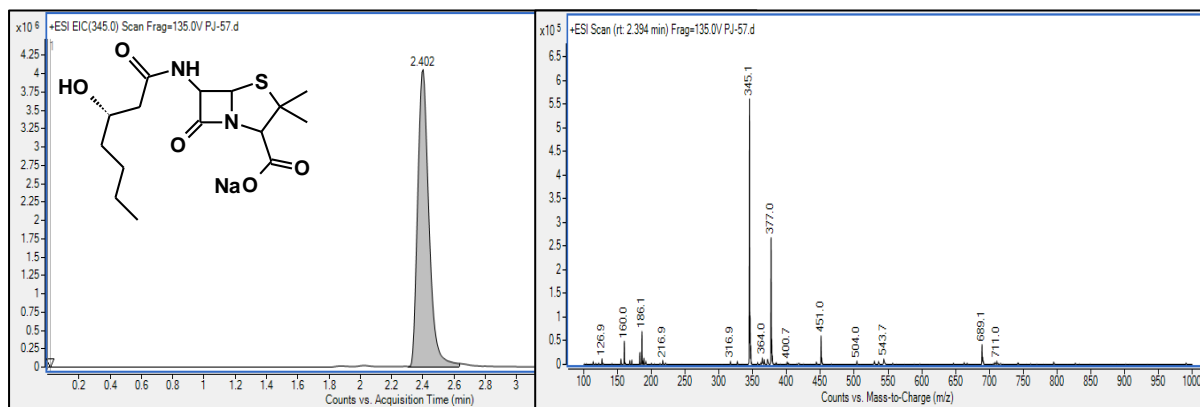
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



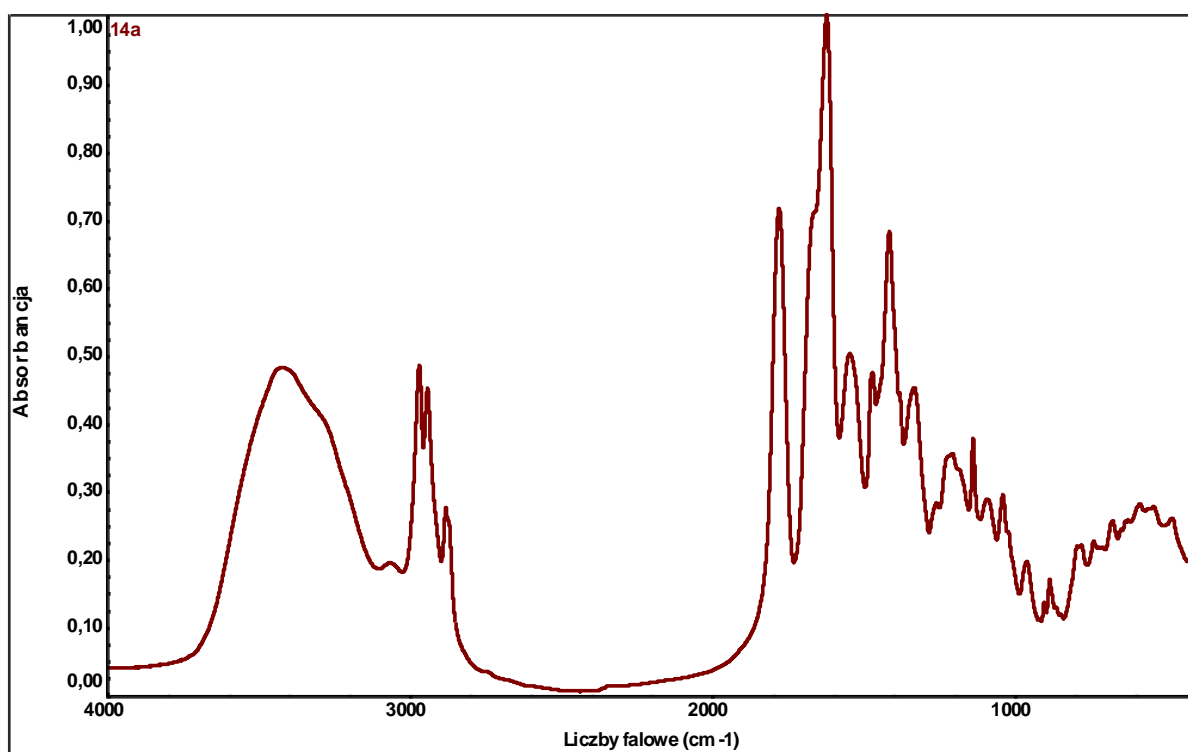
Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR:



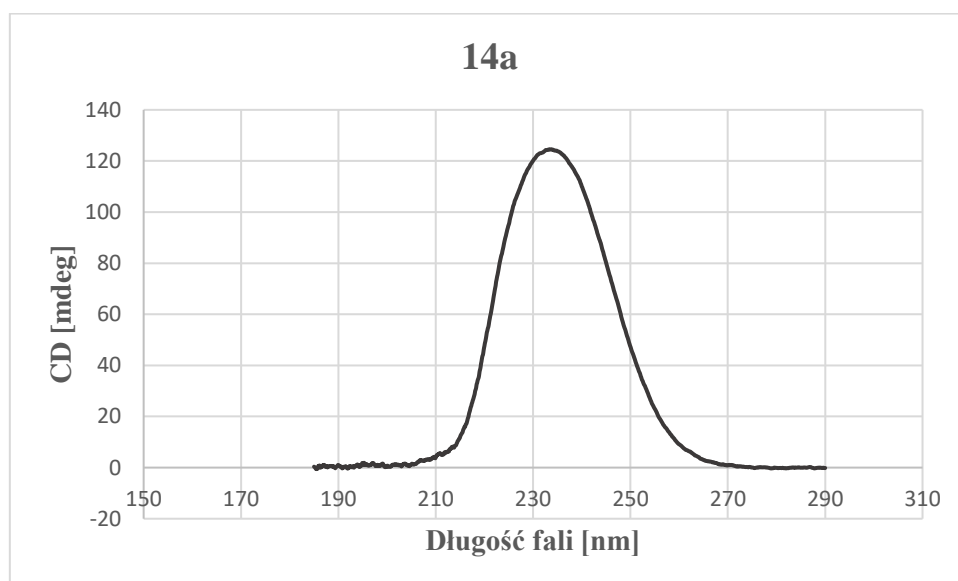
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

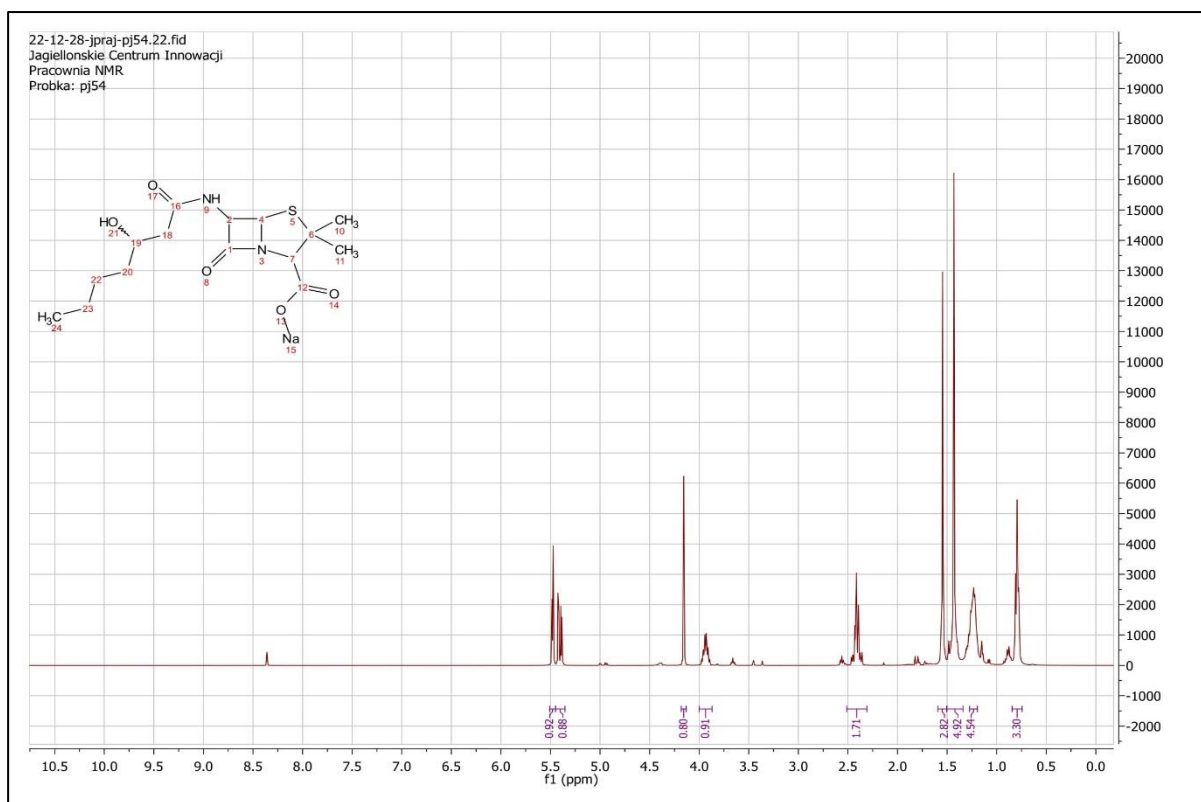


Widmo CD:

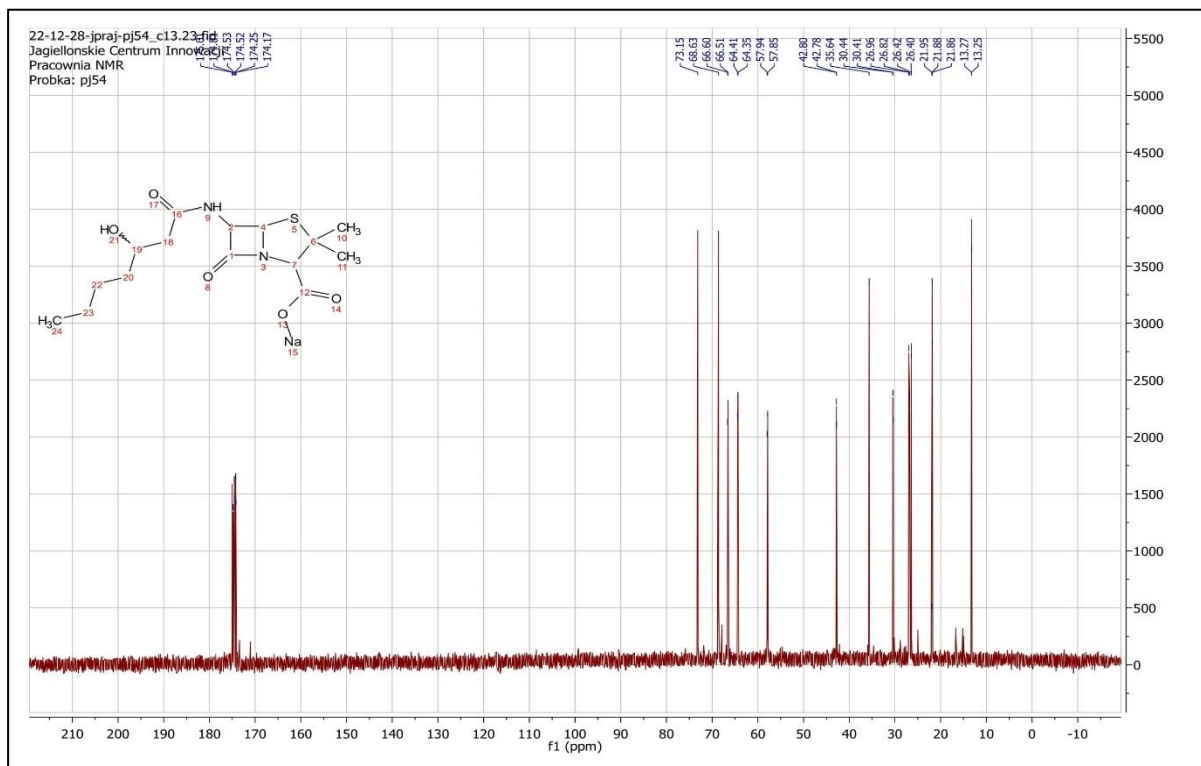


## Penicylina z grupą 5b (14b)

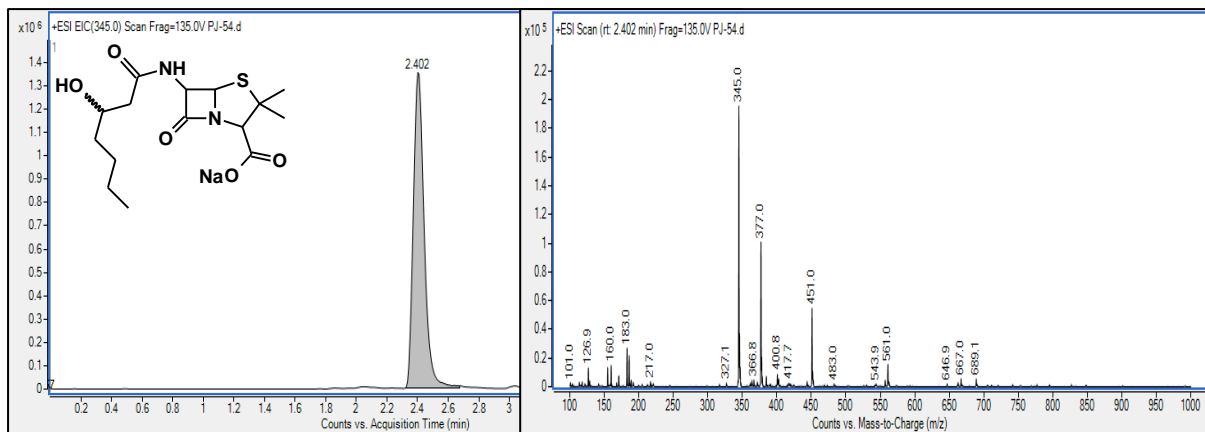
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



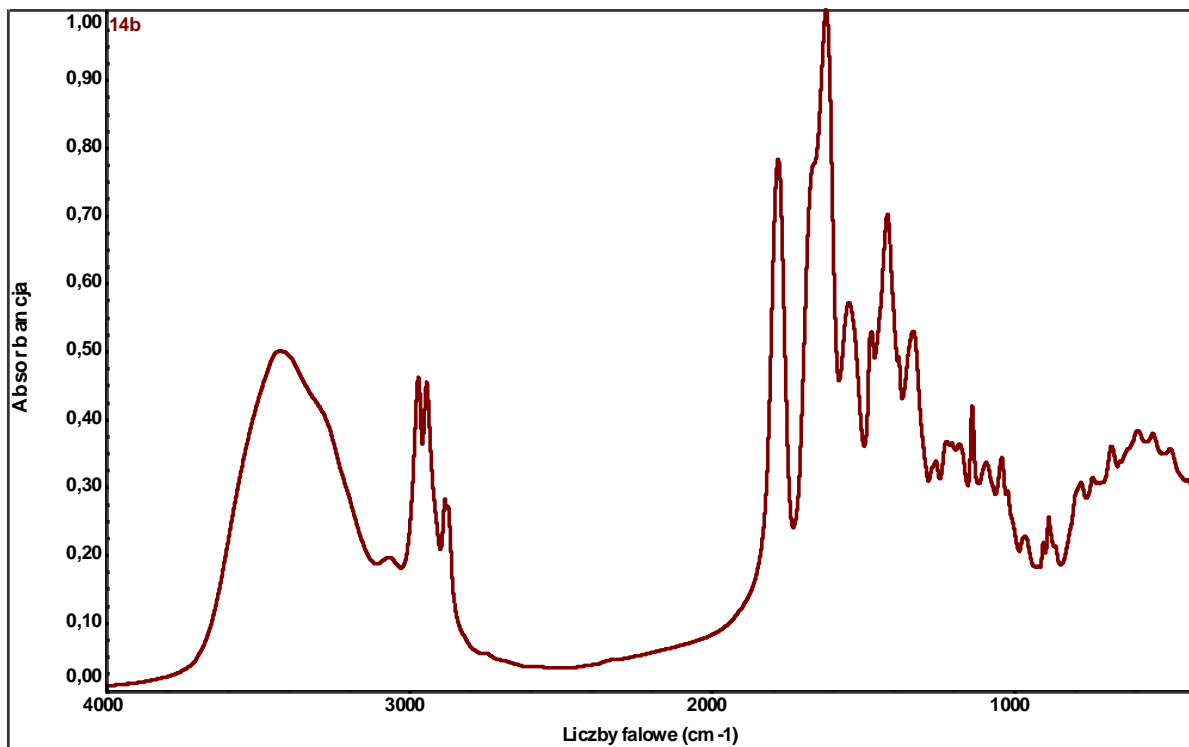
Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR:



### Widmo MS/MS:

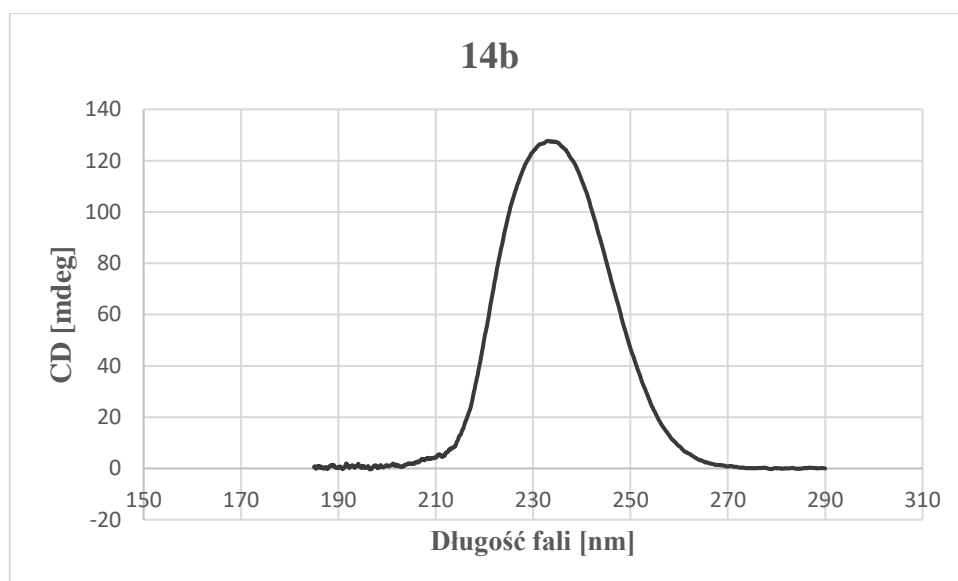


### Widmo IR:



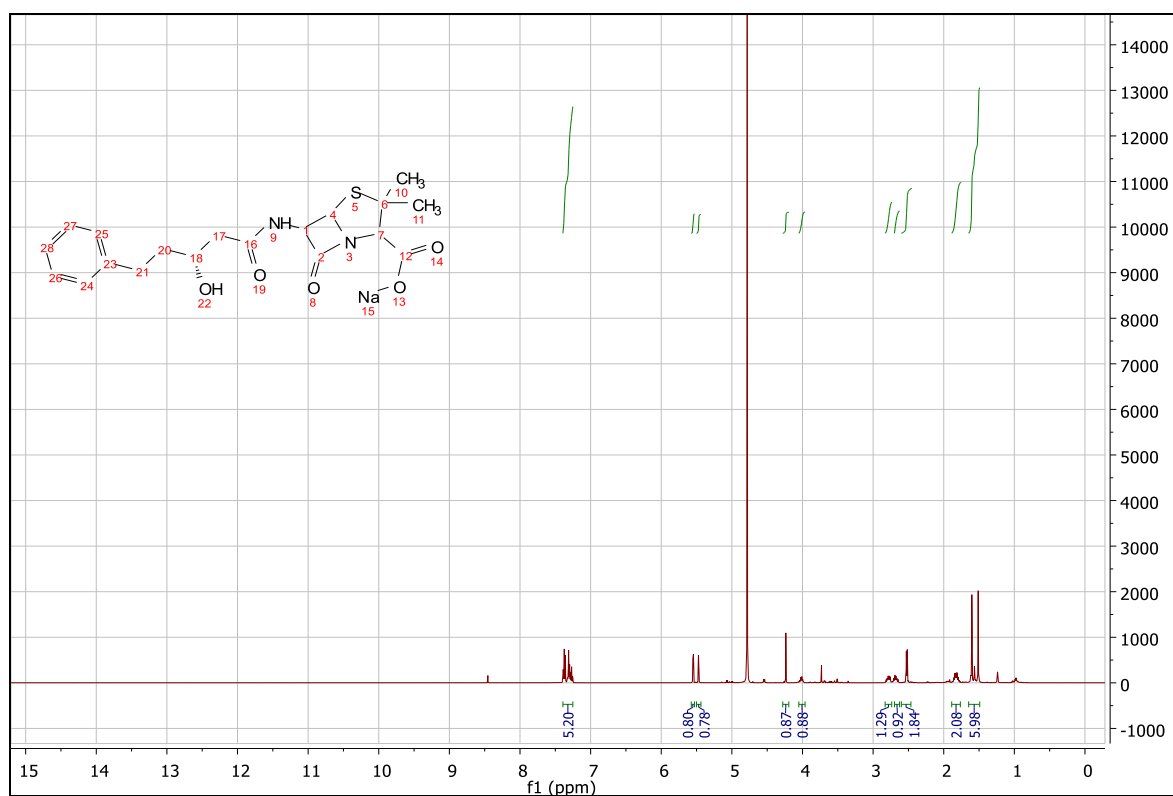


Widmo CD:

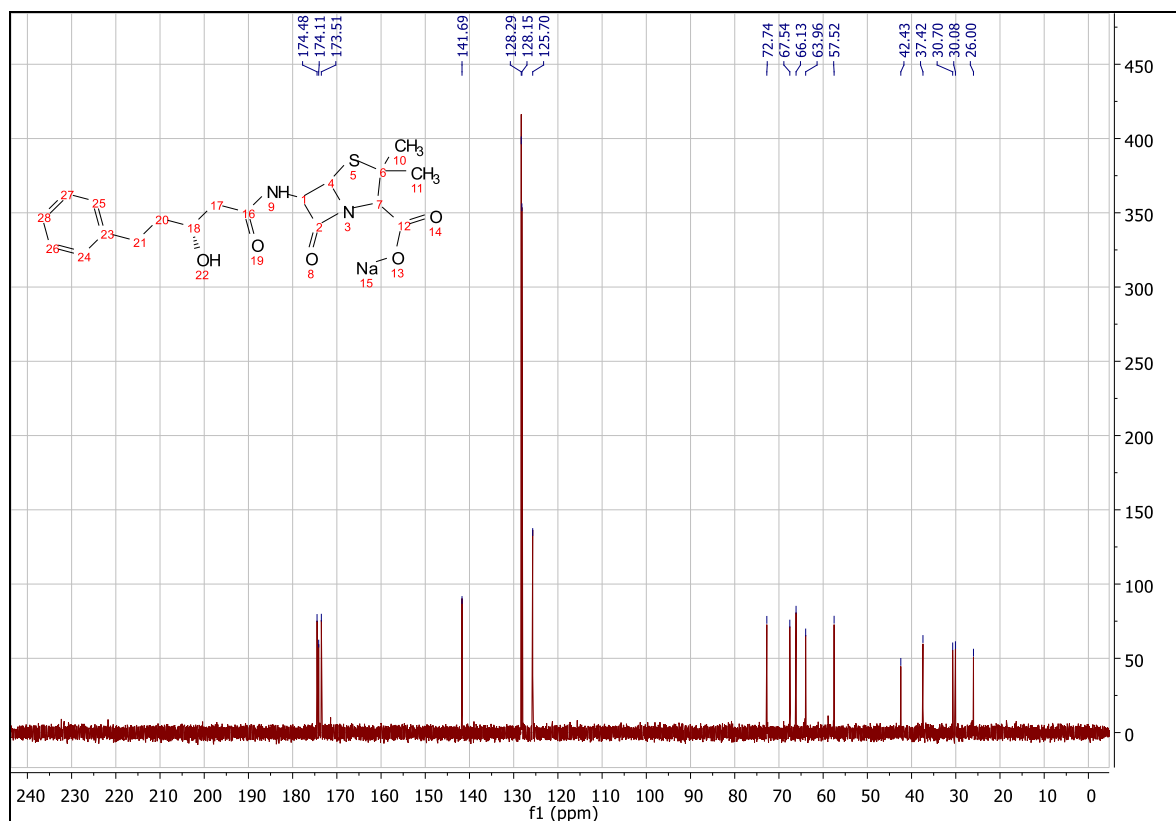


Penicylina z grupą 6a (15a)

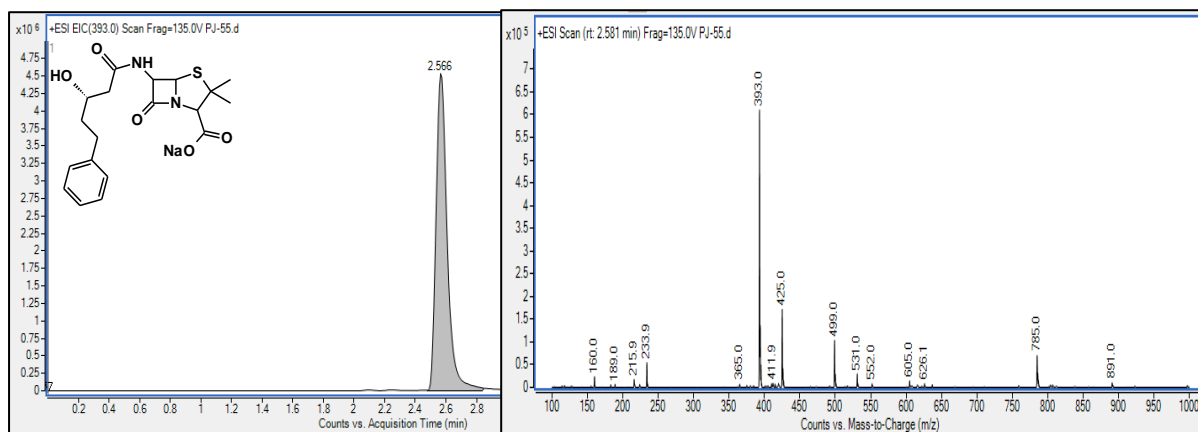
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



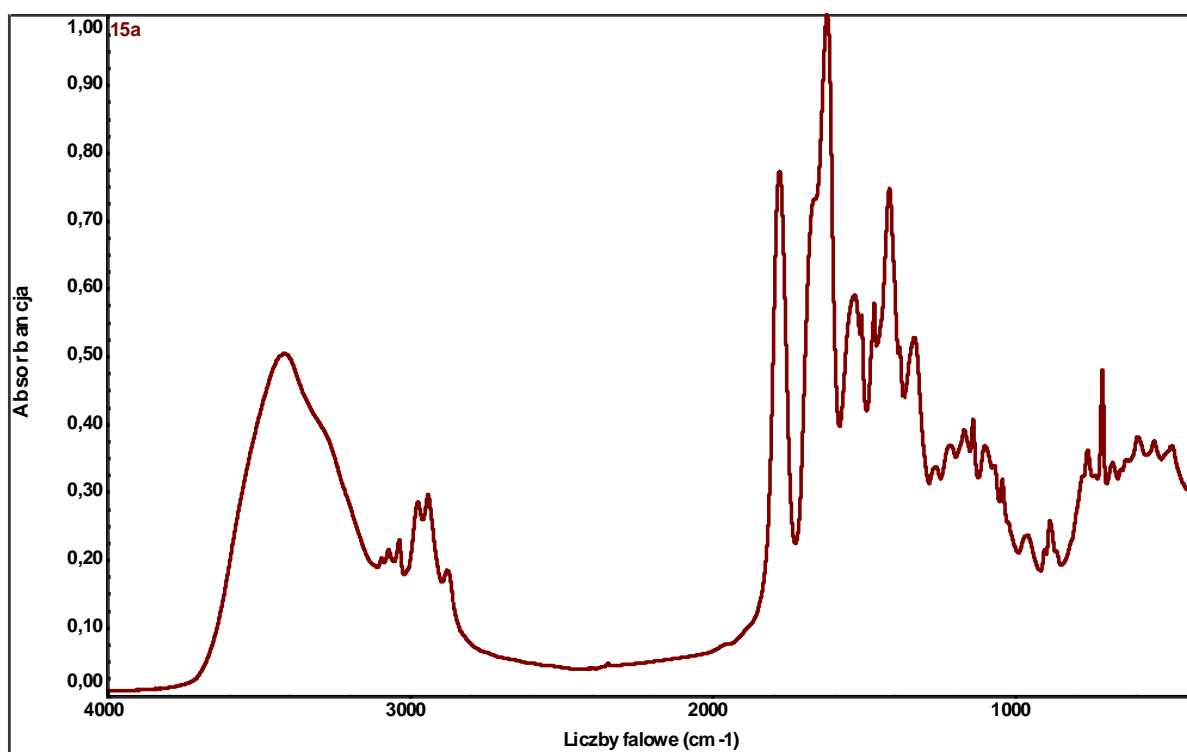
Widmo <sup>13</sup>C NMR:



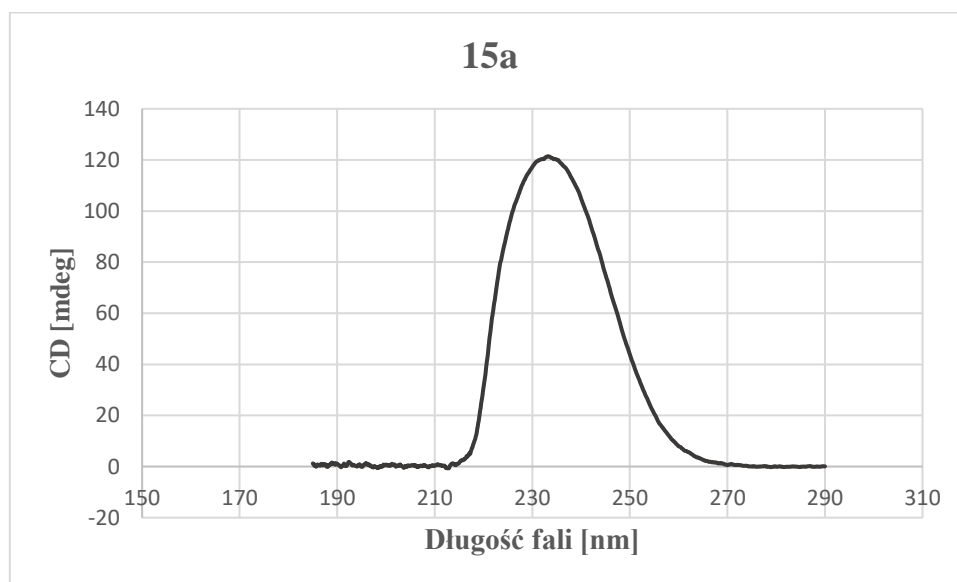
Widmo MS/MS:



Widmo IR:

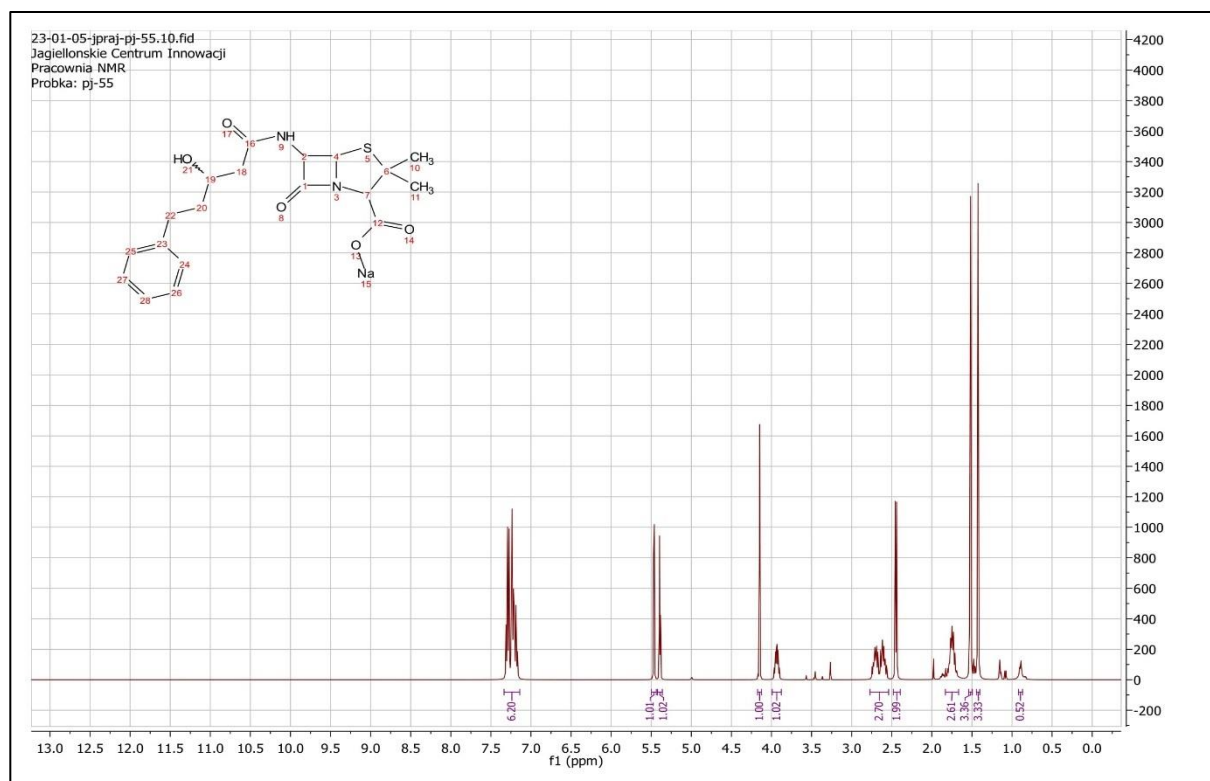


Widmo CD:

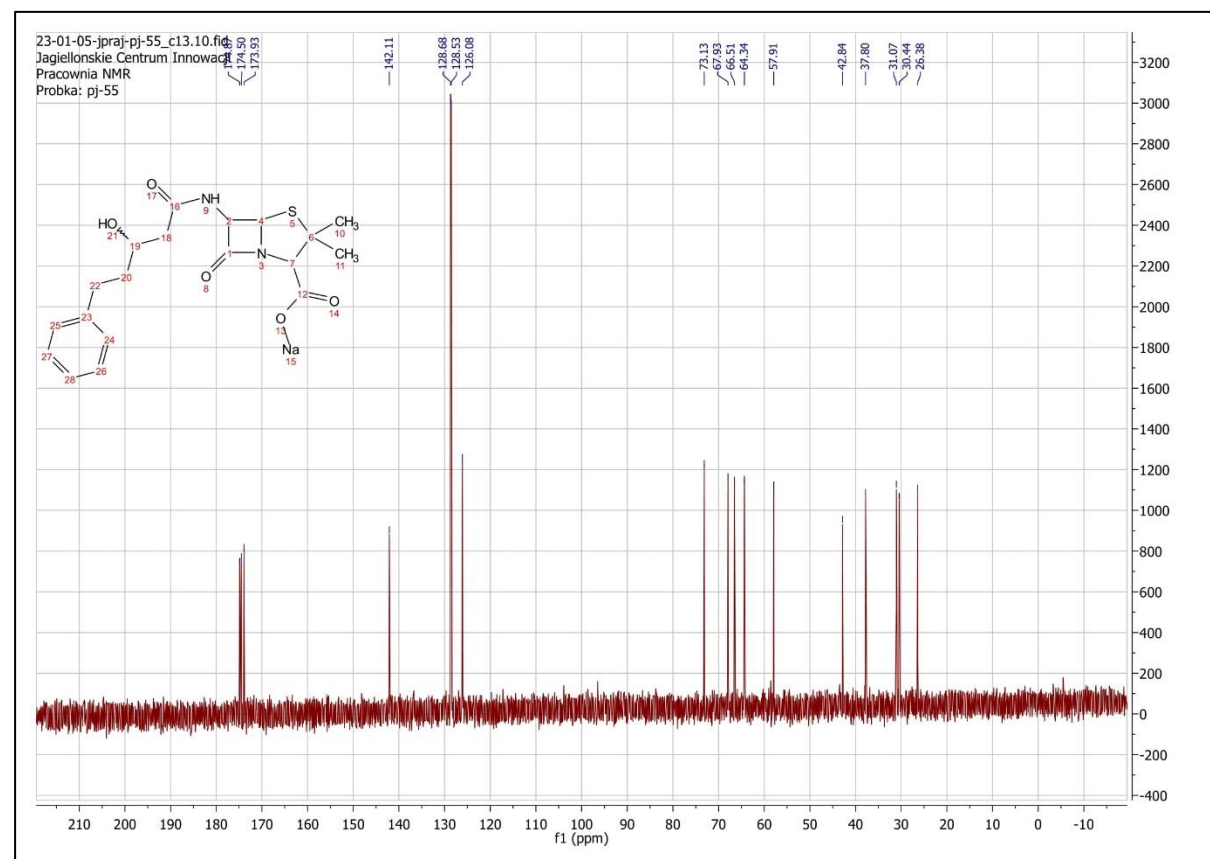


# Penicylina z grupą 6b (15b)

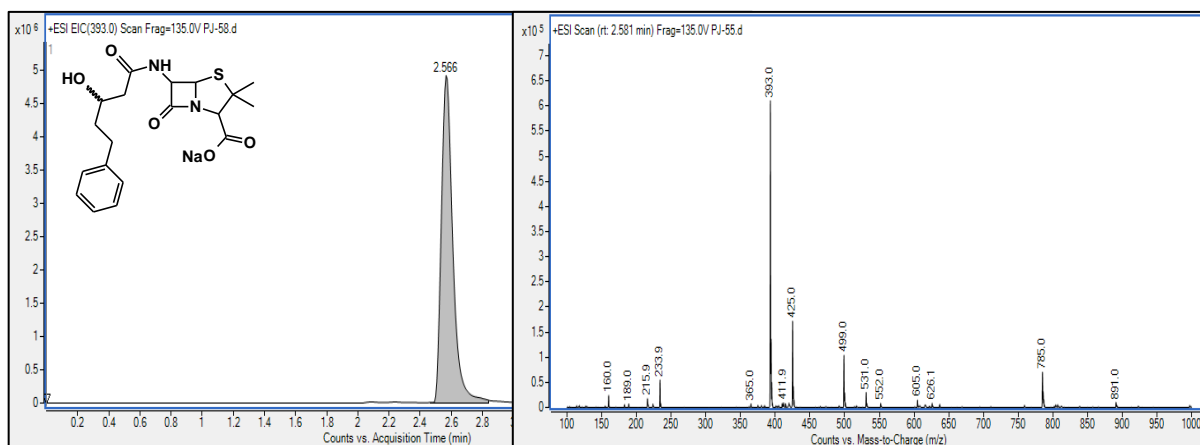
Widmo  $^1\text{H}$  NMR:



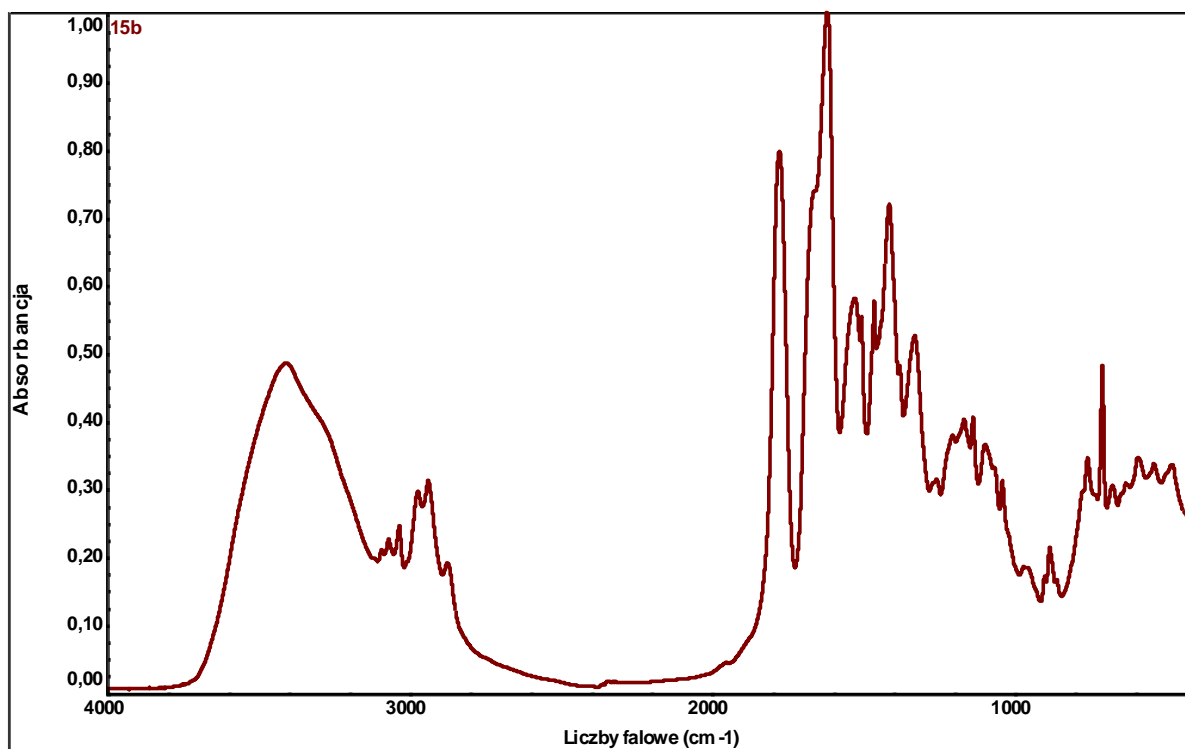
Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR:



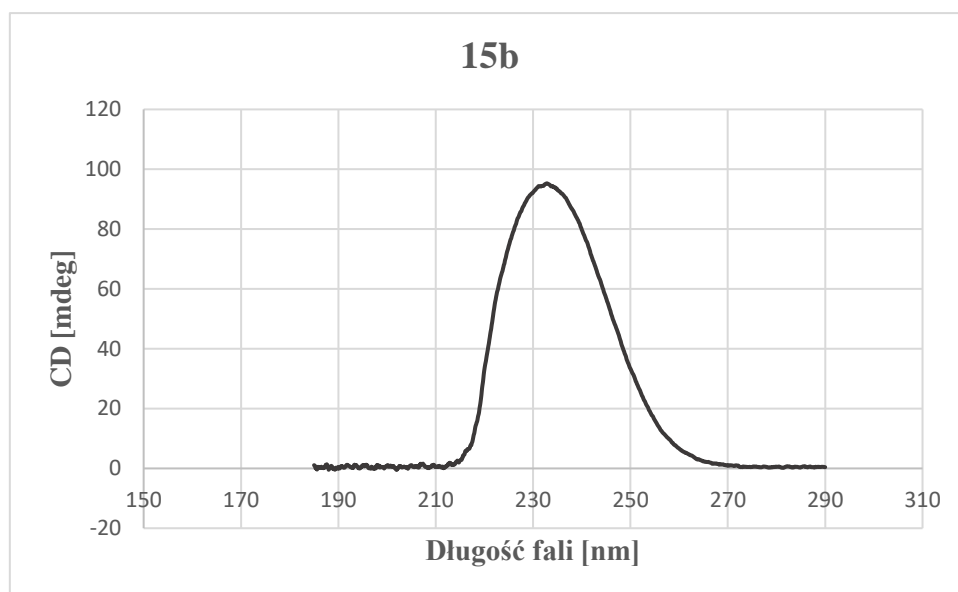
### Widmo MS/MS:



### Widmo IR:

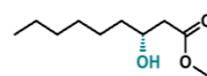


Widmo CD:

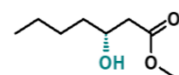


## Karta wzorów

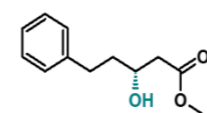
Estery metylowe (*R*)-3-hydroksykwasów:



1a

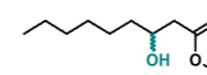


2a

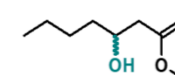


3a

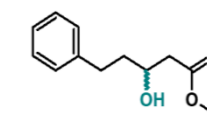
Estery metylowe *rac*-3-hydroksykwasów:



1b

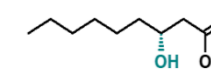


2b

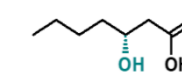


3b

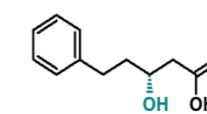
(*R*)-3-hydroksykwaszy:



4a

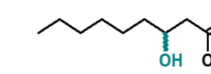


5a

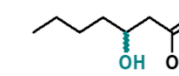


6a

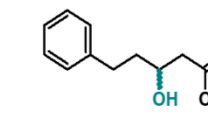
*rac*-3-hydroksykwaszy:



4b

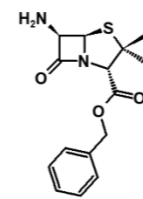


5b

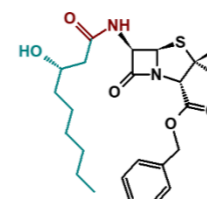


6b

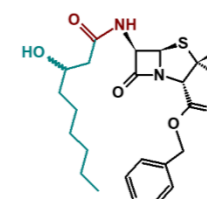
Estery benzylowe:



9

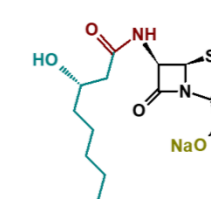


10a

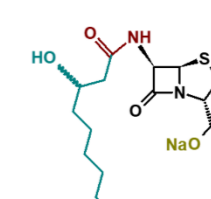


10b

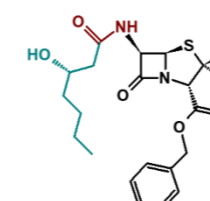
Sole sodowe:



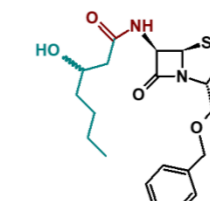
13a



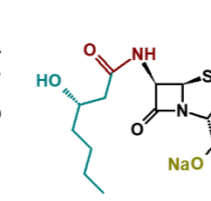
13b



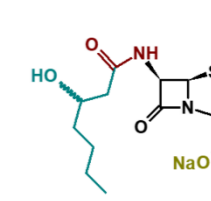
11a



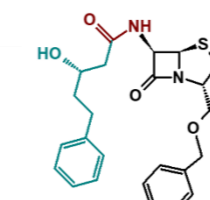
11b



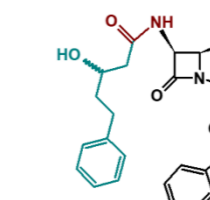
14a



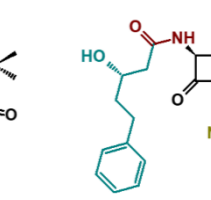
14b



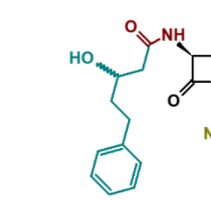
12a



12b



15a



15b