

Tytuł w języku polskim: Mikrobiologiczna synteza związków zapachowych i ich pochodnych o aktywnościach biologicznych

Tytuł w języku angielskim: Microbiological synthesis of fragrance compounds and their derivatives with biological activities

Dziedzina nauk: Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Dyscyplina: Biotechnologia

Słowa kluczowe: związki zapachowe, laktony, arylopropeny, biotransformacje, utlenienie, bakterie, grzyby, aktywność fungistatyczna, aktywność przeciwutleniająca, aktywność hemolityczna, aktywność antyproliferacyjna

Key words: fragrance compounds, lactones, arylopropenes, biotransformations, oxidation, bacteria, fungi, fungistatic activity, antioxidant activity, haemolytic activity, antiproliferative activity

## STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Związki zapachowe stanowią liczną grupę, do której należą między innymi laktony oraz związki arylopropenowe i ich pochodne. Laktony przede wszystkim nadają smak i zapach wielu produktów spożywczych, a także posiadają bardzo szerokie spektrum aktywności biologicznej potwierdzone licznymi doniesieniami literaturowymi. Z kolei związki z pierścieniem aromatycznym są powszechnie spotykane w olejkach eterycznych wielu gatunków roślin. Z uwagi na ich szeroką aktywność biologiczną, związki z tej grupy są często stosowane w przemyśle spożywczym, perfumeryjnym, farmaceutycznym i kosmetycznym.

W ostatnich latach biotechnologiczne metody otrzymywania związków chemicznych, do których zaliczają się biotransformacje, rozwijają się bardzo intensywnie, stając się coraz bardziej konkurencyjną alternatywą dla metod chemicznych. Zastosowanie biokatalizatorów w hodowlach na podłożach stałych (SSF) i wglębnych (SmF) pozwala na równoczesne prowadzenie wielu reakcji enzymatycznych i jest ekonomicznie uzasadnionym rozwiązaniem charakteryzującym procesy wysokimi wydajnościami. Z uwagi na ogromną różnorodność mikroorganizmów oraz złożoność ich aparatu enzymatycznego użycie ich w formie całych komórek umożliwia otrzymanie produktów nieosiągalnych innymi metodami.

Celem pracy była mikrobiologiczna synteza związków z ugrupowaniem laktonowym oraz arylopropenów i ich pochodnych, określenie zdolności katalitycznych wyselekcjonowanych szczepów bakterii i grzybów przy zastosowaniu różnych technik biotechnologicznych, a także ocena określonych aktywności biologicznych wybranych związków.

W pracy doktorskiej wykorzystywałem bakterie do otrzymania poszczególnych enancjomerów whisky laktonu. Badania te prowadziłem zarówno w hodowlach na podłożu stałym, jak i w hodowlach wglębnych w celu porównania i doboru optymalnej techniki umożliwiającej otrzymanie chiralnych laktonów. Jako podłoże do SSF wykorzystałem różne makuchy: lniany, rzepakowy oraz z wiesiołka. Produkty uboczne przemysłu olejarskiego stanowią bowiem tanią alternatywę dla podłoży dedykowanych mikroorganizmom. W wyniku utlenienia dioli **1a** i **1b** prowadzonych w zwiększonej skali na makuchu lnianym otrzymałem nieznacznie enancjomerycznie wzbogacone izomery *trans*-(+)-(4*S*,5*R*) (**2a**), *cis*-(-)-(4*S*,5*S*) (**2c**) i *cis*-(+)-(4*R*,5*R*) (**2d**) whisky laktonu z udziałem bakterii *R. erythropolis* DSM44534, *R. erythropolis* PCM2150 i *G. rubripertincta* PCM2144. Natomiast w bioutlenieniu prowadzonym techniką SmF z *R. erythropolis* DSM44534 i *R. erythropolis* PCM2150 otrzymałem poszczególne enancjomery *trans*-(-)-(4*R*,5*S*) (**2b**) i *cis*-(+)-(4*R*,5*R*) (**2d**) oraz wysoce wzbogacony izomer *trans*-(+)-(4*S*,5*R*) (**2a**) whisky laktonu. Dodatkowo, w wyniku zastosowania biokatalizatora w postaci proszków acetonowych z *R. erythropolis* DSM44534 powstawał enancjomerycznie wzbogacony *cis*-(-)-(4*S*,5*S*) (**2c**) whisky lakton. Przeprowadziłem również utlenienie z udziałem *R. erythropolis* DSM44534

dioli **3a** i **3b**, w wyniku czego powstawał wysoce wzbogacony izomer *trans*-(+)-(5*S*,6*R*) (**4a**) oraz enancjomer *cis*-(-)-(5*S*,6*S*) (**4c**) aerangis laktonu. Potwierdziło to możliwość wykorzystania tej bakterii w stereoselektywnej syntezie  $\gamma$ - oraz  $\delta$ -laktonów.

Dalsza część badań dotyczyła zastosowania wybranych bakterii i grzybów do otrzymywania szeregu związków z pierścieniem aromatycznym, w tym piperonalu (**5**) oraz tlenowych pochodnych arylopropenu – hydroksyketonów **6c-9c**. W wyniku transformacji izosafrolu (**6a**) z wyselekcjonowanymi szczepami grzybów *Trametes hirsuta* d28 i *T. hirsuta* Th2\_2 otrzymałem piperonal (**5**) z wysoką wydajnością. Opracowałem również dwuetapową biokatalityczną metodę otrzymywania tlenowych pochodnych wybranych arylopropenów. Stosując diole **6b-10b**, otrzymane na drodze chemo-enzymatycznej syntezy, uzyskałem z udziałem bakterii *Dietzia* sp. DSM44016, *Rhodococcus erythropolis*, *R. erythropolis* PCM2150 i *R. ruber* PCM2166 odpowiednie hydroksyketony **6c-9c** z wysokimi wydajnościami. Ostatnim etapem badań była ocena aktywności biologicznej arylopropenów **6a-10a** oraz ich pochodnych, dioli **6b-10b** i hydroksyketonów **6c-9c**. Analizowałem właściwości fungistatyczne, przeciwutleniające, hemolityczne, przeciwproliferacyjne oraz wpływ na sztywność błony biologicznej otrzymanych związków. Wyniki tych badań sugerują, że otrzymane przeze mnie związki **6a-9c** wpływają w zróżnicowany sposób na badane aktywności, m. in. w zależności od stężenia, obecności dodatkowych grup funkcyjnych i typu wiązań występujących w danym związku.

## STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Fragrance compounds are a large group, which includes, among others, lactones and arylpropenes, and their derivatives. Lactones primarily are responsible for taste and smell of many food products, and also have a wide spectrum of biological activities confirmed by numerous literature reports. Compounds with the aromatic ring are commonly found in the essential oils of many plant species. Due to their wide biological activity, compounds from this group are often used in the food, perfumery, pharmaceutical and cosmetic industries.

In recent years, biotechnological methods of obtaining chemical compounds, which include biotransformations, have been developed very intensively, becoming an increasingly competitive alternative to chemical methods. The use of biocatalysts in Solid-State Fermentation (SSF) and Submerged Fermentation (SmF) allows for simultaneous conducting of many enzymatic reactions. It is also an economically viable solution characterized processes by high efficiency. Due to the large variety of microorganisms and the complexity of their enzymatic systems, using them in the form of whole cells allows to obtain products unattainable by other methods.

The aim of the study was the microbiological synthesis of compounds with lactone moiety and arylpropenes, and their derivatives, determination of catalytic properties of selected strains of bacteria and fungi using various biotechnological techniques, as well as assessment of specific biological activities of selected compounds.

In my doctoral dissertation, to obtain individual enantiomers of whisky lactone selected bacteria were used. The studies were conducted both in solid-state fermentation and submerged fermentation, in order to compare and select the optimal technique to obtain chiral lactones. As a substrate for SSF I used various oilcakes: linseed, rapeseed and evening primrose. By-products of the oil industry are a cheap alternative comparing to medium components dedicated to microorganisms. As a result of oxidation of diols **1a** and **1b** carried out on preparative scale on linseed oilcake slightly enantiomerically enriched *trans*-(+)-(4*S*,5*R*) (**2a**), *cis*-(-)-(4*S*,5*S*) (**2c**) and *cis*-(+)-(4*R*,5*R*) (**2d**) whisky lactones with bacteria *R. erythropolis* DSM44534, *R. erythropolis* PCM2150 and *G. rubripertincta* PCM2144 were obtained. However, in the SmF bio-oxidation with *R. erythropolis* DSM44534 and *R. erythropolis* PCM2150 individual enantiomers of *trans*-(-)-(4*R*,5*S*) (**2b**) and *cis*-(+)-(4*R*,5*R*) (**2d**), and a highly enriched *trans*-(+)-(4*S*,5*R*) (**2a**) isomer of whisky lactones were obtained. In addition, as a result of the use of a biocatalyst *R. erythropolis* DSM44534 in the form of acetone powders, enantiomeric enriched *cis*-(-)-(4*S*,5*S*) (**2c**) whisky lactone was formed. Moreover, oxidation of diols **3a** and **3b** with *R. erythropolis* DSM44534, resulting in the formation of a highly enriched *trans*-(+)-(5*S*,6*R*) (**4a**) isomer and a *cis*-(-)-(5*S*,6*S*) enantiomer (**4c**) of aerangis lactone was carried out. This confirmed the possibility of using this bacterium in stereoselective synthesis of  $\gamma$ - and  $\delta$ -lactones.

The next part of the research concerned the use of selected bacteria and fungi to obtain a number of compounds with the aromatic ring, including piperonal (**5**) and derivatives of arylpropene – hydroxyketones **6c-9c**. As a result of the transformation of isosafrole (**6a**) with selected fungal strains, *Trametes hirsuta* d28 and *T. hirsuta* Th2\_2, piperonal (**5**) with high yield was obtained. Moreover, a two-step biocatalytic method for obtaining oxygenated derivatives of selected arylpropenes was developed. Diols **6b-10b**, obtained by chemo-enzymatic synthesis, were applied for transformations with *Dietzia* sp. DSM44016, *Rhodococcus erythropolis*, *R. erythropolis* PCM2150 and *R. ruber* PCM2166 affording corresponding hydroxyketones **6c-9c** with high yield. The final stage of the study assumes the assessment of the biological activity of arylpropenes **6a-10a** and their derivatives, diols **6b-10b** and hydroxyketones **6c-9c**. I analyzed fungistatic, antioxidant, hemolytic, antiproliferative properties, and the effect on the stiffness of the biological membrane of the obtained compounds. The results of these studies suggest that the compounds **6a-9c** affect the examined activities in a different way, depending on the concentration, the presence of additional functional groups and the type of bonds occurring in a given compound.