

Doctoral thesis

Research on the obtaining of enzyme preparations and their application in glycosylation reactions

mgr inż. Przemysław Hahn

Promotor: prof. dr hab. Inż. Wiesław Szeja

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Kasprzycka

Carbohydrates, as the primary constituents of glycoconjugates, are involved in signal transduction between cells, in the body's immune system, and in combination with hydrophobic compounds significantly improve their solubility.

2-Deoxy-sugars, monosaccharides in which hydroxyl group at C-2 is replaced by hydrogen are important classes of carbohydrates, commonly found in biologically active products. The 2-deoxy- β -D-glycosidic moiety is present in structures of biologically active compounds such as: anthracyclic antibiotics, aureole acids, and other antitumor or antimicrobial compounds.

The concept of this work was based on the use of a simple one-step method for the synthesis of glycosidic linkage on enzymatic pathway, using as a biocatalysts hydrolytic enzymes such as glycosidase. Their use in glycosylation reactions is both an interesting chemical application and the possibility of developing alternative stereoselective pathways for the synthesis of 2-deoxy- β -D-glycosides under mild conditions. Based on literature and preliminary studies with commercially available enzymes, it was decided to select appropriate microorganisms and obtain enzymes using low-cost culture media. As glycosyl donors were used 1,2-unsaturated sugars, which gave 2-deoxyglycoside as a result of the enzymatic addition to the double bond.

The implementation of this project included:

- selecting microorganisms producing β -glucose and β -galactosidase;
- optimizing the breeding process;
- enzyme isolation;
- preparation of biocatalysts;
- preparation of 2-deoxyglycosides with the participation of the obtained biocatalysts;
- study of biological activity of 2-deoxyglycosides obtained.

First part of research developed effective methods for the preparation of biocatalysts. That have been used in highly stereoselective reactions for the preparation of 2-deoxy- β -D-glycosylpyranosides from glycols as glycosyl donors and alcohols as glycosyl acceptors.

The biological activity of the obtained 2-deoxy- β -D-glycosylpyranosides was determined by testing against clinical *Candida* yeast strains and bacterial pathogens: *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium avium hominissuis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium paratuberculosis* strain K10. As a result of the dissertation, was made patent application and one publication was published describing the results of the research.



Rozprawa doktorska

Badania nad otrzymaniem preparatów enzymatycznych i zastosowaniem ich w reakcjach glikozylacji

mgr inż. Przemysław Hahn

Promotor: prof. dr hab. Inż. Wiesław Szeja

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Kasprzycka

Węglowodany jako podstawowe składniki glikokoniugatów, biorą udział w przekazywaniu sygnałów między komórkami, w ochronie immunologicznej organizmu, a w połączeniu ze związkami hydrofobowymi znacznie poprawiają ich rozpuszczalność.

2-Deoksy-cukry, monosacharydy, w których grupa hydroksylowa przy C-2 jest zastąpiona atomem wodoru, są ważną klasą węglowodanów, występujących powszechnie w biologicznie aktywnych produktach naturalnych. Ugrupowanie 2-deoksy- β -D-glikozydowe jest obecne w strukturach związków biologicznie aktywnych takich jak: antybiotyki antracyklinowe, kwasy aureolowe, i inne związki przeciwnowotworowe czy przeciwbakteryjne^{19,27}

Koncepcja pracy bazowała na użyciu prostej jednoetapowej metody syntezy wiązania glikozydowego na drodze enzymatycznej, stosując jako biokatalizator hydrolityczne enzymy, jakimi są glikozydazy, . Wykorzystanie ich w reakcjach syntezy wiązania glikozydowego stanowi zarówno ciekawą aplikację pod kątem chemicznym oraz możliwość opracowania alternatywnych, stereoselektywnych dróg syntezy 2-deoksy- β -D-glikozydów w łagodnych warunkach. ^{19,27}

Na podstawie doniesień literaturowych i wstępnych badań z komercyjnie dostępnymi enzymami, postanowiono przeprowadzić selekcję odpowiednich drobnoustrojów i pozyskiwać enzymy na drodze hodowli mikroorganizmów z użyciem tanich podłoży hodowlanych. Jako donory glikozydowe wytypowano cukry 1,2-nienasycone, które w wyniku enzymatycznej addycji do wiązania podwójnego dają 2-deoksyglikozydy.

Realizacja tego projektu obejmowała:

- Wyselekcjonowanie mikroorganizmów produkujących β -gluko- i β -galaktozydazę;
- Optymalizację procesu hodowli;
- Izolację enzymów;
- Preparatykę biokatalizatorów;
- Otrzymywanie 2-deoksyglikozydów z udziałem otrzymanych biokatalizatorów;
- Badania aktywności biologicznej otrzymanych 2-deoksyglikozydów.

Opracowano skuteczne metody otrzymywania biokatalizatorów, które wykorzystano w wysoce stereoselektywnych reakcjach otrzymywania 2-deoksy β -D-glikozylopiranozydów z glikali jako donorów glikozydowych oraz alkoholi jako akceptorów glikozydowych.

Dowodzono, że otrzymane 2-deoksy β -D-glikozylopiranozydy wykazują aktywność biologiczną wobec klinicznych szczepów drożdży z rodzaju *Candida* oraz bakteryjnych patogenów: *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium avium hominissuis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium paratuberculosis* strain K10.

W wyniku realizacji pracy doktorskiej dokonano zgłoszenia patentowego oraz powstała jedna publikacja opisująca wyniki badań.

