การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยกระบวนการทางชีวภาพของไดเทอร์พีนอยด์ด้วยเชื้อรา *Absidia sp.*

นางสาวสมจินตนา ทวีพานิชย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN: 974-14-2354-3

BIOTRANSFORMATION OF DITERPENOIDS BY *Absidia sp.*

Miss Somjintana Taveepanich

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic year 2005

ISBN: 974-14-2354-3

Thesis Title	BIOTRANSFORMATION OF DITERPENOIDS BY *Absidia sp.*
By	Miss Somjintana Taveepanich
Field of study	Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Prakitsin Sihanonth, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Nattaya Ngamrojnavanich, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

..... Member

(Professor Anthony J. S. Whalley, Ph.D.)

สมจินตนา ทวีพานิชย์ : การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารไดเทอร์พีนอยด์โดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยเชื้อรา*Absidia sp.* (BIOTRANSFORMATION OF DITERPENOIDS BY *Absidia sp.*) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร. อมร เพชรสม : 200 หน้า. ISBN: 974-14-2354-3.

การเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของสารคูเรนไดเทอร์พีน (*ent*-kaur-16-en-19-oic acid, 1) โดยอาศัย *Absidia blakesleeana* และ *Rhizopus oligosporus* พบว่า *A. blakesleeana* ให้ผลิตภัณฑ์สี่ชนิด คือ *ent*-(7α,9α)-dihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1a), *ent*-(7α,11β)-dihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1b), *ent*-(1β,7α)-dihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1c) และ *ent*-(7α,13)-dihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1d) ซึ่งเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลสองกลุ่มในโครงสร้างหลักโดยผลิตภัณฑ์ 7α,9α-diOH และ 1β,7α-diOH เป็นสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ชนิดใหม่ ส่วนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยเชื้อ*R. oligosporus* ได้ผลิตภัณฑ์ *ent*-7α-hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1e) และ 1a อีกทั้งผลิตภัณฑ์ใหม่ *ent*-(9α,16β,17)-trihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1f) การเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของสารแลบเดนไดเทอร์พีน (*ent*-1,2-dehydro-3-oxomanoyl oxide, 2) โดยอาศัย *R. oligosporus*, *R. stolonifer* และ *Mucor plumbeus* พบว่า *R. oligosporus* และ *M. plumbeus* ให้ผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่สองชนิด คือ, *ent*-11α-hydroxy-1,2-dehydro-3-oxomanoyl oxide (2a) และ *ent*-(11α,14ξ,15)-trihydroxy-1,2-dehydro-3-oxomanoyl oxide (2b) ขณะที่ *R. stolonifer* ได้ผลิตภัณฑ์ 2a และผลิตภัณฑ์ใหม่คือ *ent*-11α-hydroxy-3-oxomanoyl oxide (2c) โครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้พิสูจน์เอกลักษณ์ได้โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโมเลกุลสามมิติ

ภาควิชา.....เคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2548.....

##4473840323 : MAJOR CHEMISTRY

KEYWORD : BIOTRANSFORMATION / *Absidia* sp. / DITERPENOIDS

SOMJINTANA TAVEEPANICH : BIOTRANSFORMATION OF DITERPENOIDS BY *Absidia sp.* THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D. 200 pp. ISBN: 974-14-2354-3.

Biotransformation of the kaurane diterpene (*ent*-kaur-16-en-19-oic acid, 1) was carried out with *Absidia blakesleeana* and *Rhizopus oligosporus*. It was found that *A. blakesleeana* produced four metabolites, *ent*-(7α,9α)-dihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1a), *ent*-(7α,11β)-dihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1b), *ent*-(1β,7α)-dihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1c) and *ent*-(7α,13)-dihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1d), which were the results of dihydroxylation, among which 7α,9α-diOH and 1β,7α-diOH were characterized as new diterpenoids. The *ent*-7α-hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1e) and 1a, including the new *ent*-(9α,16β,17)-trihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (1f), were obtained with *R. oligosporus*. Biotransformation of the labdane diterpene (*ent*-1,2-dehydro-3-oxomanoyl oxide, 2) was carried out using *R. oligosporus*, *R. stolonifer* and *Mucor plumbeus*. It was found that *R. oligosporus* and *M. plumbeus* yielded two new metabolites, *ent*-11α-hydroxy-1,2-dehydro-3-oxomanoyl oxide (2a), *ent*-(11α,14ξ,15)-trihydroxy-1,2-dehydro-3-oxomanoyl oxide (2b) while *R. stolonifer* gave 2a and the new *ent*-11α-hydroxy-3-oxomanoyl oxide (2c). The structures of these metabolites were established on the basis of spectroscopic techniques and X-ray crystallography.

Department.....Chemistry.... Student's signature.....Somjintana Taveepanich

Field of study.....Chemistry... Advisor's signature.....

Academic Year.....2005.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest appreciation to my advisor, Associate Professor Amorn Petsom, Ph. D. and Professor Robert Azerad for their encouraging guidance, supervision and beneficial suggestions throughout the course of this research. The special thanks are extended to Professor Sophon Roengsumran, Ph. D. for valuable advice, helpful discussion and suggestions throughout my study serving as chairman of my thesis committee.

My appreciation is also expressed to Associate Professor Prakitsin Sihanonth Ph. D., Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph. D., Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph. D. and Professor Anthony J. S. Whalley, Ph.D. for their kindness and helpful suggesting for the complements of this thesis and serving as dissertation committee. I am grateful to gift for starting material and valuable comments from Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, Ph. D. I would like to express my sincere gratitude and thanks to Dr. Jittra Piapukiew and Dr. Ek Sangvichien for their help and advice for my research. Thanks are also extended to Assistant Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D., Assistant Professor Chaveng Pakawatchai, Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, and Dr. Narongsak Chaichit, Department of Physics, Faculty of Science and Technology, Thammasat University for helping the analysis and determined of X-ray diffraction analysis.

My sincere gratitude is also extended to the Department of Chemistry, Faculty of Science, the Graduate School, Chulalongkorn University, University Development Commission (UDC) scholarship and The Royal Golden Jubilee Ph.D. scholarship for financial support.

Finally, I wish to express my deepest gratitude to my parents and my family for all things that they have endured and sacrificed for my success.

CONTENTS

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

Figure Page

LIST OF SCHEME

LIST OF ABBREVIATIONS

$[\alpha]_D^{20}$	= specific rotation at 20° and sodium D line (589 nm)
ATCC	= American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A
br s	= broad singlet (for NMR spectral data)
°C	= degree Celsius
^{13}C-NMR	= carbon-13 nuclear magnetic resonance
$CDCl_3$	= deuterated chloroform
$CHCl_3$	= chloroform
CD_3OD	= deuterated methanol
cm	= centimeter
COSY	= ^{1}H-^{1}H correlation spectroscopy
CFU	= Colony forming unit
δ	= chemical shift
d	= doublet (for NMR spectral data)
dd	= doublet of doublet (for NMR spectral data)
dt	= doublet of triplets (for NMR spectral data)
DBE	= Double Bond Equivalent
ε	= molar absorptivity
EIMS	= electron impact mass spectroscopy
ESI MS	= Electrospray Ionization Mass Spectrum
Eq	= equatorial
EtOAc	= ethylacetate
g	= gram
HMBC	= ^{1}H-^{13}C heteronuclear correlation
HMQC	= ^{1}H- detected heteronuclear multiple quantum coherence
^{1}H-NMR	= proton nuclear magnetic resonance
HRESIMS	= High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrum

Hz = hertz

IR = infrared spectroscopy

l = liter

μl = microliter

$[M+H]^+$ = protonated molecular ion

m = multiplet (for NMR spectral data)

MEA = Malt extract agar

MHB = Mueller- Hinton broth

MeoH = methanol

MIC = Minimum inhibitory concentration

mg = miligram

μg = microgram

MHz = megahertz

ml = mililitre

mm = milimeter

ν_{max} = wave number at maximum absorption

NMR = nuclear magnetic resonance

No. = Number

ppm = part per million

s = singlet (for NMR spectral data)

SEM = scanning electron microscope

t = tripet (for NMR spectral data)

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

TLC = thin layer chromatography

UV = Ultraviolet