

БІООРГАНІЧНИЙ СИНТЕЗ ГЛІКОЗИЛЬОВАНИХ ГІДРОКСИХІНОНІВ ТА КВАРЦЕТИНУ

Р.Б.Винницька, О.П.Бондарчук, М.С.Курка,
О.Б.Миколів, Н.В.Толкачова,
Н.Г.Марінцова, В.П.Новіков

Національний університет "Львівська політехніка"

Вступ

Живі організми синтезують значну кількість природних сполук, які мають корисні для людини біологічні властивості. До них належать препарати, які знайшли своє широке використання в клініці (антибіотики, протипухлинні і імуносупресорні лікарські засоби), а також у ветеринарії та сільському господарстві (протомори росту, інсектициди, гербіциди та антипаразитарні препарати) [1, 2]. За останні роки кількість інформації про шляхи біосинтезу антибіотиків та інших природних метаболітів значно зростає. Це дало можливість спрямувати дослідження у даній області в напрямку зміни структури сполук маніпулюючи генами біосинтезу і застосовуються для створення нових гібридних антибіотиків із зміненими властивостями [3, 4, 5].

Важливим джерелом структурної різноманітності у молекулах антибіотиків є цукри, приєднані до специфічних позицій аглікону. Їхня роль, зокрема, полягає у впізнаванні клітинної мішені та покращенні проникнення сполуки через клітинну мембрану. Тобто наявність глікозильних залишків є важливою, а у багатьох випадках, вирішальною для біологічної активності [6]. Відповідні цукри переносяться до аглікону глікозилтрансферазами. В результаті маніпуляцій з генами цих ферментів можна отримувати нові глікозильні сполуки із зміненими властивостями. Досконале знання специфічності глікозилтрансфераз стосовно донора (цукру) і акцептора (аглікону) дозволяє змінювати специфічність цих ферментів генно-інженерним шляхом [7].

Раніше ми повідомляли про генетичний контроль біосинтезу глікозильованих антрахінонів [8-13].

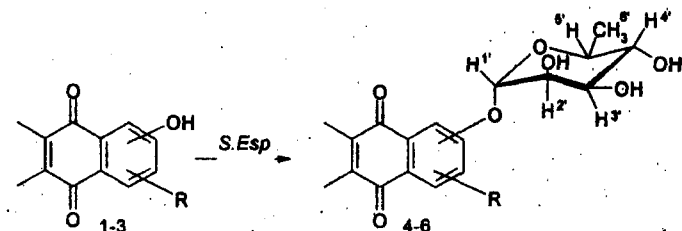
Мета роботи: вивчення процесу біоорганічного синтезу глікозильованих похідних нафтазарину (1), алізарину (2) і кварцетину.

Матеріали та методи дослідження

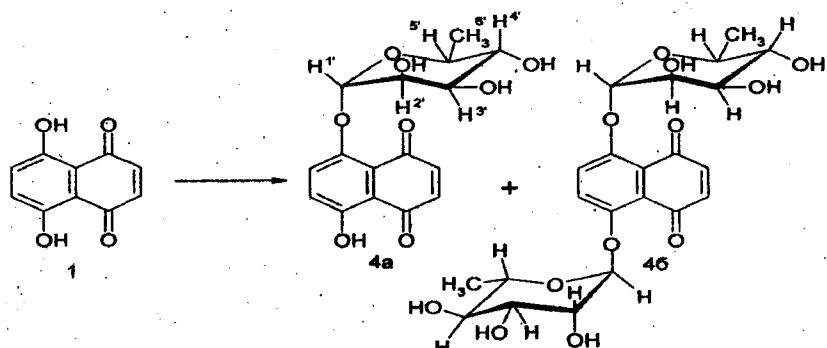
В якості об'єктів дослідження були нафтазарин (1), алізарин (2) і кварцетин (3) компанії "Mazck", штами культури ґрунтової бактерії *Saccharothrix esapaensis* [14]. У ході експерименту готували суспензію 50 мг аглікону (1-3) в 1,0 л водного середовища *S. esapaensis* і культивування відбувалось протягом 6-добового інкубаційного періоду при кімнатній температурі. Після закінчення періоду інкубації реакційна суміш була екстрагована порціями етилацетату (3x100 мл), які були об'єднані, висушені від води безводним $MgSO_4$. Після випарювання у вакуумі розчинника з екстракту трансформаційних продуктів (4-6) до сухого залишку, останній розчиняли в 15 мл абсолютного метанолу і аналізували за допомогою рідинної хромато-мас-спектроскопії, а утворення нових глікозильованих антрахінонів підтверджували за допомогою порівняння УФ-спектрів вихідних та кінцевих продуктів. З метою визначення і доказу будови одержаних глікозильованих похідних (4-6) було застосоване комплексне спектральне дослідження з використанням найсучасніших методів (1H і ^{13}C -ЯМР, COSY, YSQC, HMBC, 2D-ROESY, ID-ROESY і ID-TOCSY).

Отриманий результати та їх обговорення

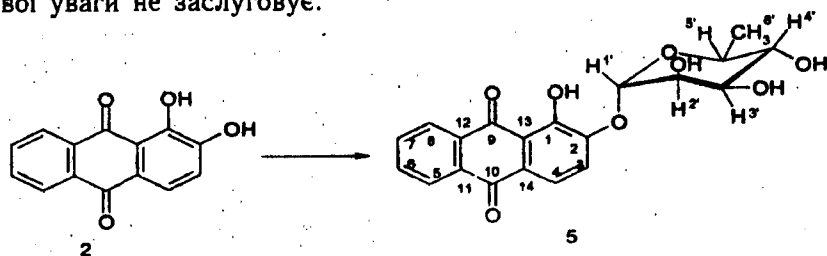
Отримання нових глікозильованих сполук за допомогою штама бактерій *S. esapaensis* можна представити в загальній формі нижче наведеним перетвореннями.



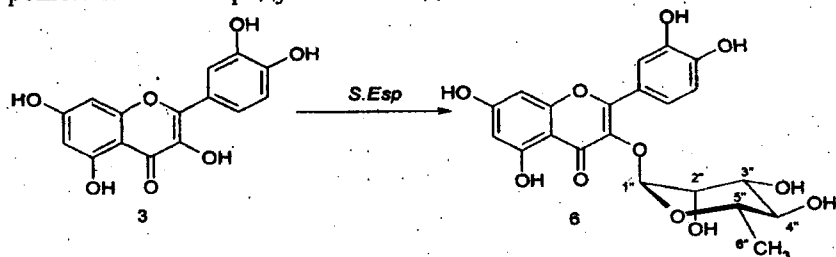
У випадку нафтазарину (1) були отримані два продукти моно- (4a) і дирамнозилнафтазарин (4б) з виходом 60% і 4%, відповідно.



Алізарин (2) біотрансформується з утворенням трьох продуктів, основним з яких є 2-О- α -L-рамнозилалізарин (5) з виходом 65%; решта утворених продуктів була виділена також хроматографічно в дуже незначній кількості (0,5-1,0%) і суттєвої уваги не заслуговує.



Обробка кварцетину *S. Esparnaensis* призводить в основному до 3-О- α -L-рамнозилкварцетину (6) з 56% виходом; вихід решти шістьох продуктів знаходяться в межах 1-2%.



Теоретично, введення глікозидного (в нашому випадку рамноза) залишку - суттєво не впливає як на вигляд УФ-спектру, так і на зсув максимуму поглинання. Поєднання хромато-мас-спектро-

скопії, де заслуговує уваги наявність УФ-спектральних даних рамнолізованих іонів ($m/z=+146$) та гідроксильованих ($m/z=+16$) похідних (табл.1) з існуванням λ_{\max} подібного вигляду кривої поглинання хінонової природи дозволяє зробити висновок про одержання та відбір новоутворених рамнолізованих продуктів.

Таблиця 1

Біотрансформація хінонів в культурі *Saccharathrix esparnaensis*

№ сполуки	Структура	λ_{\max} вихідної сполуки, нм	Вихід, % кількість піків в ХМС*	Склад продуктів, основного %	M/Z Вихідного продукту	λ_{\max} продукту, нм
1		466	61, 2	2, 60	190.58 336,4	640
2		430	67, 3	3, 65	240.46 387,2	517
3		480	62, 7	8, 57	302.38 449,12	620

Примітка: *ХМС - хромато - мас - спектр.

Наявність у всіх продуктах гідроксильовання (4-6) в ^1H ЯМР спектрах сигналів протонів ($\delta, \text{J/Гц}$) при 5.25 (^1H , д, 1.3) 1* , 3.99 (H^2 , м), 3.54 (H^3 , дд, 3.2, 9.3) 3.15 (H^4 , тр, 9.4), 3.26 (H^5 , квд, 6.1, 9.6), 0.82 (CH_3 , д, 6.1), що відносяться до фрагмента рамнози [в даному випадку до рамнозилкварцетину (6)] і, приблизно такі ж самі показники для інших продуктів (4а, б, 5), однозначно підтверджують утворення глікозильованих сполук (4-6). (*д - дублет, м - мультиплет, тр - триплет, кв д - квартет дублет).

Використання інших спектральних методів надає можливість встановити більш тонку просторову будову цих сполук (4-6).

Висновки

1. Використовуючи штамп бактерій *Saccharathrix esparnaensis* вдається селективно ввести в хіноїдну структуру фрагмент рамнози.

2. Селективність глікозилювання протікає по найбільш реакційно здатній гідроксильній групі аглікону і складає 95-97%.
3. Даний досліджений процес біосинтезу можна запропонувати для глікозилювання інших об'єктів з метою одержання нових біологічно-активних сполук.

Література

1. Newman D.J. The influence of natural products upon drug discovery / D.J. Newman, G.M. Gragg, K.M. Snader // *Nat. Prod. Rep.* - 2000. - Vol. 17, № 3. - P.215-234.
2. Newman D.J. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002 / D.J. Newman, G.M. Gragg, K.M. Snader // *J. Nat. Prod.* - 2003. - Vol. 66, № 7. - P.1022-1037.
3. Khosla C. Generation of poliketide libraries via combinatorial biosynthesis / C. Khosla, R.G.X. Zavada // *Trends biotechnol.* - 1996. - Vol. 14, № 9. - P.335-341.
4. Leadlay P.F. Combinatorial approaches to poliketide biosynthesis / P.F. Leadlay // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 1997. - Vol. 1, № 2. - P.162-168.
5. Bechold A. Combinatorial biosynthesis of microbial metabolites / A. Bechold, J.A. Salas // *Combinatorial Organic Chemistr.* - Берлін (Німеччина): Wiley-VCH, 1999. - P.519.
6. Weymouth-Wilson A.C. The role of carbohydrates in biologically active natural products / A.C. Weymouth-Wilson // *Nat. Prod. Rep.* - 1997. - Vol.14, № 2. - P.99-110.
7. Mendes C. Altering the glycosylation power of bioactive compounds / C. Mendes, J.A. Salas // *Trends Biotechnol.* - 2001. - Vol.19, № 11. - P.449-456.
8. Unusual pathway of hexasaccharide biosynthesis in landomycin A molecule / A. Luzheskyu, M. Fedoryshyn, T. Taguchi [e.a.] // *International Symposium in Jena "Biology of Bacteria producing Natural Products"* (26-28 вересня, 2004). - P. 24.
9. Characterisation of genes encoding the reductase LanZ4 and the oxygenase LanZ5 / M. Fedoryshyn, A. Luzheskyu, C. Duerr [e.a.] // *International Symposium in Jena "Biology of Bacteria producing Natural Products"* (ФРН) (26-28 вересня, 2004). - P. 16.
10. Створення мутантних штамів *Streptomyces cyanogenus* S136, які продукують нові глікозильовані сполуки / М. Федоришин, А. Лужецький, А. Бехтольд, В. Новіков // *II Всеукраїнсь-*

- ка науково-практична конференція "Біотехнологія. Освіта. Наука" (Львів, Україна, 6-8 жовтня, 2004) : збірник тез. - С. 287.
11. LanGT2 catalyzes the first glycosylation step during landomycin A biosynthesis / A. Luzheskyu, T. Taguchi, M. Fedoryshyn [e.a.] // *Chmbiochem.* - 2005. - Vol. 6, № 8. - P. 1406-1410.
 12. Iteratively acting of glicosyltransferases involved in the hexasaccharide biosynthesis of landomycin A / M. Fedoryshyn, A. Luzheskyu, C. Duerr [e.a.] // *ChemBiol.* - 2005. - V.12, №11. - P.928-929.
 13. Клонування генів біосинтезу дезоксицирку-оливози / М.Ю. Федоришин, А.М. Лужицький, А.Бехтольд, В.П.Новіков // *Вісн. Нац. Унів. "Львівська політехніка"*. - 2005. - № 529. - С.116-119.
 14. Thomas R.A. Biosynthetic classification of fungal and streptomecete fused-ring aromatic poliketides / R.A. Thomas // *Chem. Bio. Chem.* - 2001. - Vol. 2. - P.612-627.

Резюме

Винницька Р.Б., Бондарчук О.П., Курка М.С., Миколиві О.Б., Толкачова Н.В., Маринцова Н.Г., Новіков В.П. Біоорганічний синтез глікозильованих гідроксихінонів та кварцетину.

Наведено результати дослідження процесу і продуктів біоорганічного синтезу глікозильованих нафта- і алізарину та кварцетину.

Ключові слова: нафтазарин, алізарин, кварцетин, біосинтез, штам *Saccharathrix espanaensis*.

Резюме

Винницькая Р.Б., Бондарчук О.П., Курка М.С., Миколиві О.Б., Толкачова Н.В., Маринцова Н.Г., Новіков В.П. Биоорганический синтез гликозилированных гидроксихинонов и кварцетина.

Приведены результаты исследования процесса и продуктов биоорганического синтеза гликозилированных нафтазарина, алizarина и кварцетина.

Ключевые слова: нафтазарин, алізарин, кварцетин, биосинтез, штам *Saccharathrix espanaensis*.

Summary

Vynnytska R.B., Bonbarchuk O.P., Kurka M.S., Mykoliv O.B., Tolkachova N.V., Marintsova N.G., Novikov V.P. Bioorganic synthesis of glycosylated hydroxyquinones and quarcetin.

The results of the research of process and products of bioorganic synthesis of glycosylated naphtha- and alizarin and quarcetin.

Key words: naphthazarin, alizarin, quarcetin, biosynthesis, strain *Saccharathrix espanaensis*.

Рецензент: д.біол.н., проф. Б.П.Романюк