

МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ  
БИСКУМАРИНОВ И ОЦЕНКА ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ  
АКТИВНОСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки

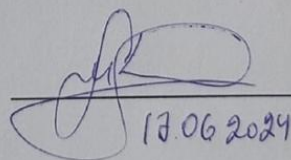
06.03.01 «Биология»

Биологического факультета

Щербаковой Дарьи Евгеньевны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

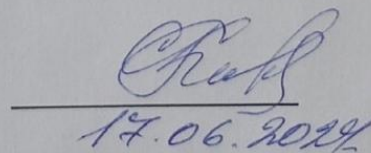


17.06.2024

М. В. Каневский

Зав. кафедрой:

д.б.н., профессор



17.06.2024

С. А. Коннова

Саратов 2024

**Введение.** Взаимодействие человека с природой всегда волновала общество, особенно сейчас, когда одной из самых важных его задач – сохранить все живое на нашей планете. Человечество не может существовать не используя природных ресурсов, не влияя на их количество и качество, а как следствие из этого, не может не вносить изменений в окружающую его природную среду. Для сокращения воздействия на окружающий нас мир была создана «зелёная химия», направленная на разработку продуктов, которые сокращают использование и производство токсичных химических соединений.

Среди огромного разнообразия вторичных метаболитов выделяется группа фенольных соединений. Фенольные соединения представляют собой растительные вторичные метаболиты, составляющие одну из наиболее распространенных групп веществ в растениях. Наибольший интерес научного мира занимают кумарины, которые обладают противовирусным действием, оказывают противовоспалительное и сосудосуживающее действие. Биокатализаторы, одними из которых являются пекарские дрожжи, можно использовать для проведения реакций синтеза в мягких условиях, используя токсические для живого организма соединения в качестве субстратов.

Исходя из вышесказанного, **целью** данной работы является синтез бискумариновых структур с использованием пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве биокатализатора.

Для реализации поставленной **цели** в ходе исследования были сформулированы и решались следующие **задачи**:

1. Проведение синтеза бискумариновых структур с использованием биокатализаторов в виде пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) в среде, содержащей глюкозу.
2. Оценка влияния наличия в среде культивирования пекарских дрожжей глюкозы на скорость синтеза и выход целевого продукта.
3. Оценка антибактериальной активности полученных бискумариновых структур в отношении *Staphylococcus aureus* 209P.

**Структура бакалаврской работы.** Работа состоит из введения, основной

части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 40 источников и включает в себя следующие вопросы: общие сведения о дрожжах (общая характеристика, систематика, особенности культивирования, биотехнологический потенциал), кумариновых соединениях (общие сведения, классификация, номенклатура, природные источники, применение).

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Объектом исследования являлись универсальные быстродействующие пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) фирмы Dr. Bakers. Для изучения антибактериальной активности был использован золотистый стафилококк штамма 209P (*Staphylococcus aureus* 209P), который был нам любезно предоставлен кафедрой микробиологии и физиологии растений биологического факультета СГУ им. Н.Г. Чернышевского.

Для получения целевых бискумаринов были проведены синтезы между 4-гидроксикумарином и замещёнными бензальдегидами. Бискумариновые структуры были синтезированы с предварительной инкубацией дрожжей и без предварительной инкубации. Во время проведения синтеза без предварительной инкубации 200 мг дрожжей помещали в 5 мл PBS с глюкозой (300 мг), добавляли 500 мкМ кумарина и 250 мкМ альдегида. Полученный раствор помещался на термостатируемый шейкер и инкубировался в течении 24 часов. Спустя отведенное время был проведен анализ протекания реакции методом ТСХ. В случае если субстратов в среде не оставалось, синтез прекращался. При проведении синтеза с предварительной инкубацией дрожжей 200 мг дрожжей выдерживали в 5 мл среды с глюкозой в течение 1,5 часов в аэробных условиях при постоянном перемешивании. Дрожжевые клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием, а осадок клеток ресуспендировали в 5 мл PBS, не содержащего глюкозы, добавляли 500 мкМ кумарина и 250 мкМ альдегида. Синтез оставляли на 24 часа. Спустя отведенное время был проведен анализ протекания реакции методом ТСХ. В случае если субстратов в среде не оставалось, синтез прекращался. Реакции протекали по схеме, представленной

на рисунке 1.

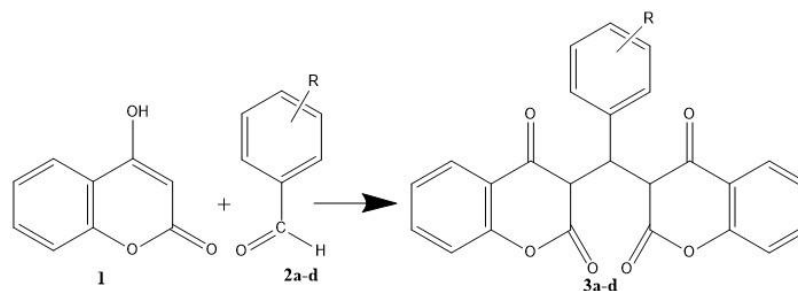


Рисунок 1 – Схема протекания реакции конденсации Кневенагеля-Михаэля

**Оценка параметров синтеза бискумариновых структур при культивировании дрожжей в среде с добавлением и без добавления глюкозы.** В результате проведённых реакций были получены соответствующие бискумариновые производные. На примере четырех полученных веществ были показано, что проведение синтеза в условиях отсутствия глюкозы в среде, но с предварительной инкубацией дрожжевых клеток не оказывало влияние на скорость конверсии. Результаты были проанализированы и представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная таблица затраченного времени получения продуктов в среде с добавлением и без добавления глюкозы

Условия	Субстраты	4-гидроксикумарин			
		4-NO <sub>2</sub> -бен зальдегид	4-Br-бен зальдегид	2-ОН-бен зальдегид	Формальде гид
Среда с глюкозой	Время, ч	48 часов	72 часа	72 часа	6 часов
Среда без глюкозы	Время, ч	48 часов	72 часа	72 часа	6 часов

**Структурный анализ полученных соединений.** Для того, чтобы анализировать тонкую структуру вещества необходимо убедиться в том, что оно химически чистое. В синтетической практике используется метод

плавления кристаллических веществ. В том случае, если диапазон температуры полного плавления вещества не превышает 2°C, то такое вещество считается химически чистым и может быть отдано на анализ.

Результаты анализа температуры плавления представлены в таблице 2:

Таблица 2 – Температура плавления полученных веществ

<b>Предполагаемое вещество</b>	<b>Температура плавления, °С</b>
Метиленбискумарин (1)	266-268
4-хлорфенилметиленбискумарин (2)	207-210
4-нитрофенилметиленбискумарин (3)	180-200
3-нитрофенилметиленбискумарин (4)	110-112
4- бромфенилметиленбискумарин (5)	145-148
4-метоксифенилметиленбискумарин (6)	240-241
4-гидрокси-3-метоксифенилметиленбискумарин (7)	190-192
Хроменохроменилхромандиона (8а)	-*
2-гидроксибензоилкумарин (8б)	164-166

\* – не проводился анализ, поскольку не удалось получить вещество 8а без примеси 8б.

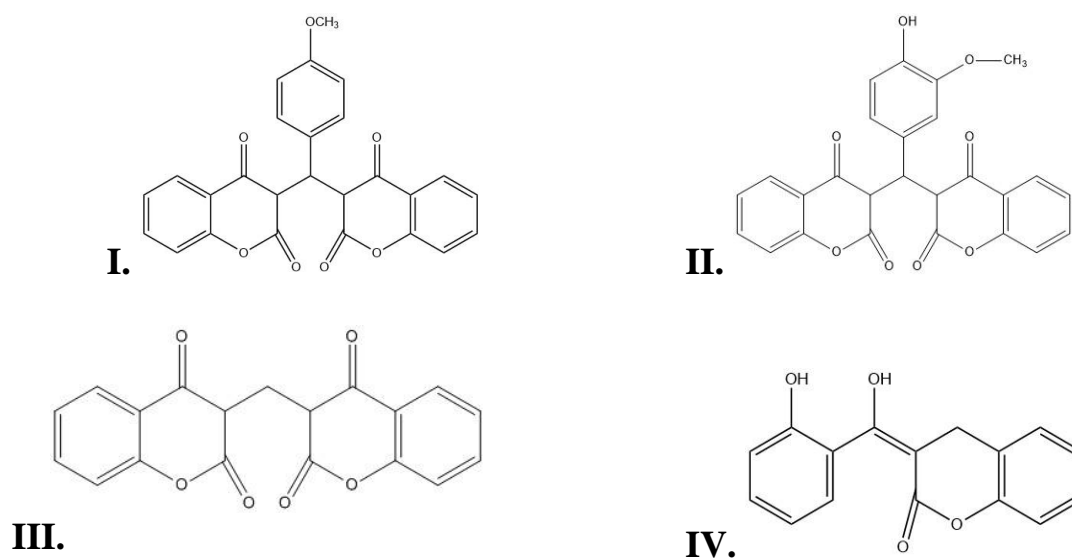
Как видно из таблицы условиям чистоты соответствуют образцы веществ под номерами **1, 4, 6, 7, 8б**.

Исходя из этого, для вышеперечисленных соединений можно рассчитать выход продуктов (Таблица 3).

Таблица 3 – Выходы полученных веществ (% от теоретического)

<b>Предполагаемое вещество</b>	<b>Выход, %</b>
Метиленбискумарин (1)	28±2
3-нитрофенилметиленбискумарин (4)	84±4
4-метоксифенилметиленбискумарин (6)	79±3
4-гидрокси-3-метоксифенилметиленбискумарин (7)	75±3
2-гидроксибензоилкумарин (8б)	38±2

С целью расшифровки структуры был предпринят ИК-анализ соединений представленных на рисунке 2. Для данных веществ температура плавления удовлетворяла условиям дальнейшего проведения структурных методов анализа



I – 4-метоксифенилметиленибискумарин, II – 4-гидрокси-3-метоксифенилметиленибискумарин, III – метиленибискумарин, IV - 2-гидроксибензоилкумарин

Рисунок 2 – Предполагаемые структуры веществ, для которых был проведён ИК-анализ

Анализ данных ИК спектров позволяет установить особенности структуры по характеристичным сигналам поглощения фрагментов молекул в определённых областях. Данные ИК спектров соединений 1-4 (рисунок 2) представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Данные ИК-спектрального анализа полученных образцов

№ соединения	ИК спектр, см <sup>-1</sup>
I (4-метоксифенилметиленибискумарин (6))	$\nu_{OH}$ 3517-3428 (уширенная полоса) $\nu_{C-Наром}$ 3070-3045 $\nu_{C-H}$ 2932 $\nu_{O-CH_3}$ 2836 $\nu_{C=Oлакт}$ 1726 $\nu_{C=Oсопр}$ 1672 $\nu_{C=Саром}$ 1655-1620

№ соединения	ИК спектр, см <sup>-1</sup>
II (4-гидрокси-3-метоксифенилметиленилбискумарин (7))	$\nu_{\text{ОНфенол}}$ 3498 $\nu_{\text{C-Наром}}$ 3080-3065 $\nu_{\text{C-H}}$ 2930 $\nu_{\text{O-CH}_3}$ 2851 $\nu_{\text{C=Олакт}}$ 1731 $\nu_{\text{C=Осопр}}$ 1669 $\nu_{\text{C=Саром}}$ 1615-1610
III (метиленилбискумарин (1))	$\nu_{\text{ОНсопр}}$ 3520-3445 $\nu_{\text{C-Наром}}$ 3075-3050 $\nu_{\text{CH}_2}$ 2858 $\nu_{\text{C=Олакт}}$ 1727 $\nu_{\text{C=Осопр}}$ 1652 $\nu_{\text{C=Саром}}$ 1620-1615
IV (гидроксibenзоилкумарин (8б))	$\nu_{\text{ОНсопр, ОНфенол}}$ 3510-3420 (широкая полоса) $\nu_{\text{C-Наром}}$ 3063-3032 $\nu_{\text{CH}_2}$ 2926 $\nu_{\text{C=Олакт}}$ 1718 $\nu_{\text{C=Саром}}$ 1630-1610

Как видно из результатов ИК-спектроскопии, для каждого вещества определено наличие валентных колебаний в характеристичных областях для всех специфических группировок, входящих в их состав, из чего следует, что полученные вещества соответствуют теоретически предполагаемым структурам.

**Оценка антибактериальной активности.** Далее нами был проведён ряд экспериментов с использованием различных концентраций веществ. Нам необходимо было сравнить бактериостатическую активность синтезированных нами ранее веществ и исходных веществ. Сначала была использована самая высокая концентрация (2мкМ). Она была подобрана нами исходя из того, что это самая большая концентрация антибиотиков, применяемая в лабораторных исследованиях чувствительности и устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Если вещество не проявляет антибактериальную активность в данной концентрации, то рассматривать его как антибиотический препарат нельзя. В случае если вещество не проявляло

активность при данной концентрации, то в дальнейших экспериментах его не использовали. В случае наличия антибактериальной активности, проводили разведение вещества в 2 раза и исследовали антибактериальную активность ещё раз. Так повторяли до тех пор, пока исследуемый образец не переставал демонстрировать антибактериальную активность. Эксперименты продолжались до тех пор, пока для каждого вещества не была выявлена минимальная концентрация, при которой сохранялся бактериостатический эффект. Полученные данные представлены в таблице 5.

Нами было установлено, что среди веществ, которые мы использовали в качестве субстратов для синтеза, антибактериальную активность проявлял только формальдегид. Ни 4-гидроксикумарин, ни ароматические альдегиды подобной активностью не обладали.

Полученные результаты мы сравнивали с результатами антибактериальной активности нарингенина – вещества из класса флавоноидов, для которого показана антимикробная активность. Нарингенин проявлял большую бактериостатическую активность нежели чем продукты синтеза кумарина и формальдегида, 4-Br-бензальдегида, 4-NO<sub>2</sub>-бензальдегида, 4-OCH<sub>3</sub>-бензальдегида. Проявляли одинаковую активность по сравнению с нарингенином продукты синтеза кумарина и 4-Cl-бензальдегида 3-NO<sub>2</sub>-бензальдегида. Большую активность проявили такие вещества как продукты синтеза кумарина и ванилина.

Таблица 5 – Результаты бактериостатической активности при различных концентрациях веществ

Наименование веществ	Наличие/отсутствие активности при концентрации:					
	2 мкМ	1 мкМ	0,5 мкМ	0,25 мкМ	0,125 мкМ	0,0625 мкМ
4- бромфенилметилтен-Бискумарин (5)	+	-	-	-	-	-
4-хлорфенилметилтен-Бискумарин (2)	+	+	+	-	-	-
3-нитрофенилметилтен-бискумарин (4)	+	+	+	-	-	-



Наименование веществ	Наличие/отсутствие активности при концентрации:					
	2 мкМ	1 мкМ	0,5 мкМ	0,25 мкМ	0,125 мкМ	0,0625 мкМ
2-гидроксибензоил-кумарин (8б)	+	-	-	-	-	-
4-гидрокси-3-метоксифенил-метиленибискумарин (7)	+	+	+	+	+	-
4-метоксифенил-метиленибискумарин (6)	+	+	-	-	-	-
Метиленибискумарин(1)	+	+	+	-	-	-
Нарингенин	+	+	+	-	-	-

Относительно полученных результатов и их первичного анализа был составлен ряд радикалов-заместителей, в котором радикалы расположены по мере увеличения проявляемой ими бактериостатической активности:



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе изучения особенностей синтеза бискумариновых структур с использованием пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) в качестве биокатализатора, мы основывались на его положительных качествах, таких как проведения реакций синтеза в мягких условиях.

Для получения целевых бискумариновых структур были проведены синтезы между 4-гидроксикумарином и замещёнными бензальдегидами.

Поскольку в литературе присутствуют разные методы синтеза, нам также был апробирован метод синтеза в среде с глюкозой и без неё. В ходе проведения работы был сделан вывод, что при подобном синтезе выход верхних трёх соединений на 15-25% выше, чем при стандартных методах химического синтеза однако, время затраченное на синтез было выше.

При проведении синтезов без присутствия глюкозы в среде было показано, что время на синтез затрачивается одинаковое.

Была проведена оценка бактериостатической активности синтезируемых веществ. Полученные результаты мы сравнивали с результатами антибактериальной активности нарингенина. Нарингенин проявлял большую

бактериостатическую активность нежеле, чем продукты синтеза кумарина и формальдегида, 4-Br-бензальдегид, 4-OCH<sub>3</sub>-бензальдегид. Проявляли одинаковую активность по сравнению с нарингенином продукты синтеза кумарина и 4-Cl-бензальдегид, 3-NO<sub>2</sub>-бензальдегид. Большую активность проявили такие вещества как продукты синтеза кумарина и ванилина. Основываясь на этом, мы выдвинули предположение, что активность зависит от типа, расположения и количества радикалов в гетероцикле веществ.

### ВЫВОДЫ

1. Время полной конверсии субстратов в продукты составило 4-гидроксикумарин + 4-NO<sub>2</sub>-бензальдегид – 48 часов; 4-гидроксикумарин + 4-Br-бензальдегид – 72 часа; 4-гидроксикумарин + 2-OH-бензальдегид – 72 часа; 4-гидроксикумарин + формальдегид – 6 часов, 4-гидроксикумарин + ванилин – 72 часа; 4-гидроксикумарин + 3-NO<sub>2</sub>-бензальдегид – 48 часов; 4-гидроксикумарин + 4-Cl-бензальдегид – 48 часов; 4-гидроксикумарин + 4-метоксибензальдегид – 48 часов. При использовании среды, не содержащей глюкозу, не было отличий во время синтеза.

2. Выходы целевых продуктов составили: метиленбискумарин - 28±2%; 3-нитрофенилметиленбискумарин-84±4%; 4-метоксифенилметиленбискумарин-79±3%; 4-гидрокси-3-метоксифенилметиленбискумарин-75±3%; 2-гидроксибензоилкумарин-38±2%.

3. В ходе проведения оценки антибактериальной активности бискумариновых структур на исследуемом объекте *Staphylococcus aureus* 209P было показано, что меньшую из всех активность проявляют вещества содержащие радикалы 4-Br, 4-OCH<sub>3</sub>, 2-OH (халкон). Самая высокая активность (минимальная ингибирующая концентрация = 0,125 мкМ) – 4-OH-3-OCH<sub>3</sub>.

