

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

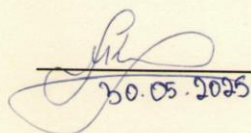
НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИСПИРОНОВЫХ СТРУКТУР

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
Направления подготовки 06.03.01
Биология Биологического факультета
Резниковой Софии Сергеевны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

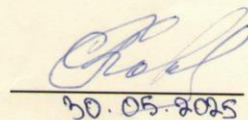


30.05.2025

М. В. Каневский

Зав. кафедрой:

д.б.н., проф.



30.05.2025

С. А. Коннова

Саратов 2025

Актуальность: в современном мире биотехнология играет всё более важную роль для науки и промышленности, предоставляя уникальные возможности для разработки новых методов синтеза биологически активных соединений. Эти разработки не могут существовать, не используя природных ресурсов, не влияя на их количество и качество, и как следствие из этого, не могут не вносить изменений в окружающую среду. Для сокращения пагубного воздействия на окружающий мир были разработаны подходы «зелёной химии», направленные на минимизацию негативного воздействия на окружающую среду, путём сокращения использования и производства токсичных химических соединений. Это направление предполагает использование биоразлагаемых и безопасных для окружающей среды материалов, а также создание экологически чистого и технологически устойчивого процесса, который бы оказывал меньшее воздействие как на человека, так и на окружающую его среду.

В современной биотехнологической промышленности использование дрожжей в синтезе играет ключевую роль, так как имеет множество преимуществ. Главными из которых является высокая скорость роста, относительная лёгкость культивирования, способность адаптации к различным условиям и экологичность. Большинство органических реакций, производимых с использованием дрожжей, проводятся в водной среде.

Использование токсичных веществ оказывает губительное воздействие, поэтому всё чаще промышленность обращается к использованию природных, а точнее растительных источников. Высокий интерес среди растительных источников вызывают кумарины, в связи с широким спектром применения. Они находят применение в парфюмерии, косметике и медицине. Также обладают разнообразными биологическими свойствами, такими как антикоагулянтные, противовоспалительные и антибактериальные.

Исходя из вышесказанного, **целью** данной работы является оценка эффективности использования пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве биокатализатора для синтеза биспиранов и оценка биологической

активности полученных соединений.

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

1. Проведение синтеза биспироновых структур с использованием пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) в качестве биокатализатора.
2. Синтез биспироновых структур стандартными методами и сравнение полученных результатов с таковыми, полученными для биотехнологического подхода.
3. Выявление антибактериальной активности продуктов синтеза.
4. Оценка антиоксидантных свойств полученных соединений.

Материалы и методы. В работе использовались пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (Dr.Oetker, дрожжи сухие фасованные). Культивирование проводили в PBS pH 7.0 с добавлением глюкозы (60 г/л) при температуре 31-33°C.

Субстратами для синтезов являлись следующие соединения:

Метиленактивный субстрат: П 4-гидрокси-6-метил-2-пирон ($C_6H_6O_3$), $M_r=126$ г/моль (BLDpharm, Индия).

Альдегиды:

1. А_Ф Формальдегид ($HCOH$), $M_r=30$ г/моль (BLDpharm, Индия).
2. А_В Ванилин (3-метокси-4-гидроксибензальдегид, $C_8H_8O_3$), $M_r=152$ г/моль (BLDpharm, Индия).
3. А_С Салициловый альдегид (2-ОН-бензальдегид, $C_7H_6O_2$), $M_r=122$ г/моль (BLDpharm, Индия).
4. А_А Анисовый альдегид (4-метоксибензальдегид $C_8H_8O_2$), $M_r=136$ г/моль (BLDpharm, Индия).

Для сравнения был проведён синтез в стандартных условиях (кипячение в этиловом спирте, содержащем 1% HCl)

В ходе работы нами были получены следующие соединения:

1. П_А – Метиленбис-4-гидрокси-6-метил-2Н пиран-2-он,

2. П_В – 4-гидрокси-3 метоксифенилметиленис-4 гидрокс-6-метил-2Н-пиран-2-он,
3. П_{С1} – 3-ацетоацетил-2Н-хромен-2-он,
4. П_{С2} – оксопиранилпиранохроменон,
5. П_Ф – метилениспирон.

Для оценки антибактериальных свойств были использованы бактериальные культуры: *Staphylococcus aureus* 209P, *Bacillus subtilis* 216D, *E.Coli* 113-13, любезно предоставленные сотрудниками кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Антиоксидантную активность полученных веществ оценивали методами CUPRAC, DPPH и по способности обесцвечивать раствор марганцевокислого калия в кислой среде.

Результаты и обсуждения

Синтез соединений проходил по стандартному механизму. Предполагаемый механизм синтеза представлен на рисунке 1.

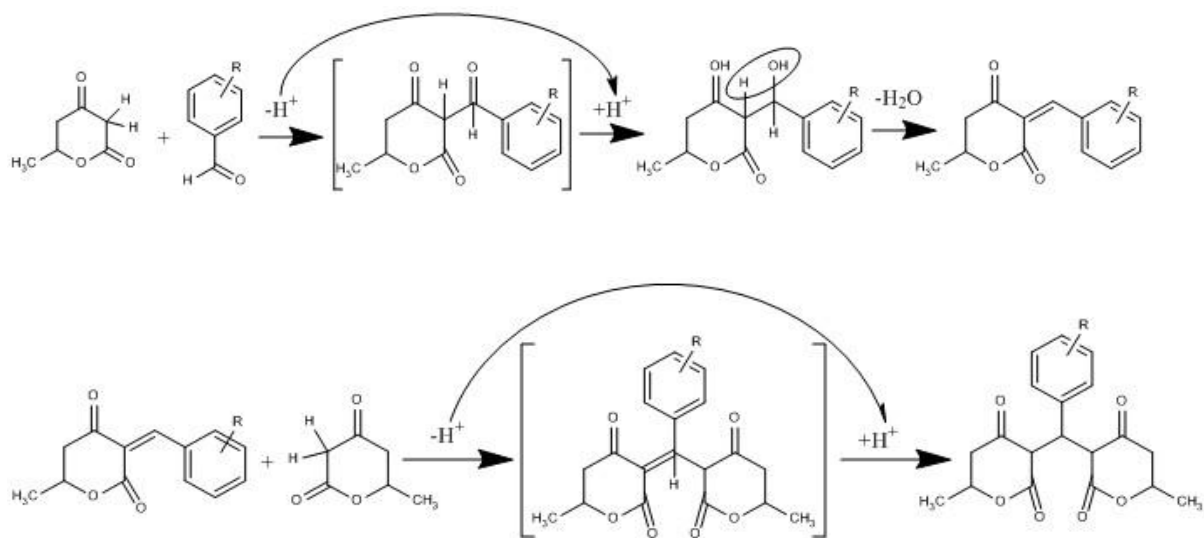


Рисунок 1 – Схема синтеза арилметилбиспионовых структур

Вышеописанный синтез осуществляется по домино-каскадному механизму и не отличается для разных производных бензальдегида.

По результатам проведённых экспериментов нами получен широкий спектр соединений. Данные о времени синтеза, выходе продуктов и температуре плавления представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты длительности синтеза, выхода продуктов и температуры плавления

Параметры Предполагаемые в-ва	Выход, %		Время, ч		t плавления, °C	
	Дрожжи	t=100°C	Дрожжи	t=100°C	Дрожжи	t=100°C
П _Ф	51	41	6	2	182-184	183-184
П _В	79,8	81	48	4	184-186	185-186
П _{С1}	81	92	48	3	150-151	150-152
П _{С2}	-	48	-	3,5	-	248-250
П _А	88	88	24	3	205-206	205-206

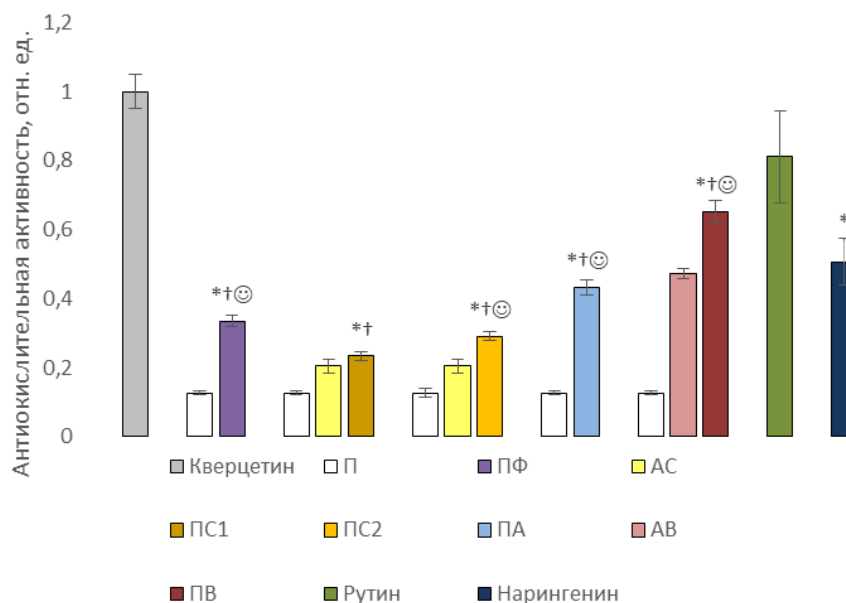
Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что биотехнологический синтез вышеуказанных структур характеризуется в основном хорошим (50-75%) и отличным (>75%), однако для некоторых соединений показан малый выход. Также в ходе биотехнологического подхода не был получен оксопиранилпиранохроменон. Применение стандартных методов синтеза показало большую скорость конверсии и для 3-ацетоацетил-2Н-хромен-2-она большой выход.

Полученные нами продукты синтезов были исследованы на наличие антибактериальной активности методом дисков, с понижением концентрации действующего вещества. Данные об активности веществ представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты антибактериальной активности

Вещества	Минимальная ингибирующая концентрация, мкМ		
	<i>St. aureus</i> 209P	<i>Bacillus subtilis</i> 26D	<i>E.coli</i> 113-13
П _В	0,125	0,125	-
П _А	0,25	0,125	-
П _Ф	0,25	1	-
П _{С1}	1	1	-
П _{С2}	-	-	-
Рутин	2	2	2
Нарингенин	2	2	-
Кверцетин	2	2	-

Определение антиоксидантной активности полученных соединений проводили путём оценки антиокислительных свойств, включающий взаимодействие анализируемой пробы с перманганатом калия до обесцвечивания последнего в сернокислой среде. Полученные данные были визуализированы на рисунке 2.



* – отличия от исходного метиленактивного соединения достоверны для $p \leq 0,05$; † – отличия от кверцетина достоверны для $p \leq 0,05$; ☺ – отличия от исходного альдегида достоверны для $p \leq 0,05$;

Рисунок 8 – Результаты антиокислительной активности полученных соединений и исходных субстратов

Итоговые вещества, полученные нами, достоверно отличаются от исходного метиленактивного соединения, некоторые из них отличаются от альдегидов, а именно: П_Ф, П_{С2}, П_А, П_В.

Особое внимание следует уделить тому, что все полученные нами вещества имеют антиокислительную активность ниже, чем у эталонного кверцетина. Это говорит о том, что в целом данные вещества проявляют меньшую антиокислительную активность.

Антиоксидантную активность определяли методом CUPRAC. Находили полуэффективную концентрацию (EC₅₀). Для этого находили линейную часть диапазона зависимости АО активности от концентрации и рассматривали концентрации, наиболее близкие к 50% АО активности. В результате были установлены EC₅₀ для исследуемых веществ (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты исследования веществ методом CUPRAC.

Вещества	EC ₅₀ , мМ
П _А	115,6±1,2
П _В	5,9±0,2
П _Ф	-
П _{С1}	43,7±1,1
П _{С2}	10,3±0,1
4-гидрокси-6-метил-2Н-пиран-2-ОН	-

Для оценки антиоксидантных свойств, исследуемых веществ, использовали метод DPPH. Антирадикальная активность оценивается полуэффективной концентрацией, которая определялась с использованием линейной интерполяции между точками наиболее приближенным к 50% антирадикальной активности. Полученные данные представлены в таблице 5.

Из полученных результатов следует, что более активными, чем исходное метиленактивное соединение являлись: П_А, П_{С2}, П_Ф, П_В.

Несмотря на незначительные различия в химическом строении анисового биспирона и ванильного биспирона, у них наблюдается отличия активности на два порядка.

Таблица 5 – Результаты антирадикальной активности полученных веществ методом DPPH

Вещество	EC ₅₀ , мМ
П _в	0,36±0,24
П _а	89,94±7,89
П _ф	33,21±12,56
П _{с1}	69,11±6,35
П _{с2}	361,4±127,5
4-гидрокси-6-метил-2Н-пиран-2-ОН	146,1±12,39

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы было проведено изучение особенностей синтеза биспироновых структур разными подходами, а именно: биотехнологический метод с использованием пекарских дрожжей и стандартный метод с кипячением. Полученные данные свидетельствуют о том, что биотехнологический синтез вышеуказанных структур характеризуется в основном хорошим (50-75%) и отличным (>75%) выходом, однако для некоторых соединений показан малый выход. Также в ходе биотехнологического подхода не был получен оксопиранилпиранохроменон. Применение стандартных методов синтеза показало большую скорость конверсии и для 3-ацетоацетил-2Н-хромен-2-она большой выход.

Использование дрожжевых клеток для синтеза биспироновых и халконовых структур возможно, однако время синтеза значительно выше, чем в стандартных химических условиях. В результате нами было установлено, что биокатализ использовать для прикладных аспектов синтеза биспироновых

структур нерентабельно ввиду траты большого количества реактивов и увеличения стадий очистки полученных веществ.

Тем не менее полученные результаты представляют интерес как с точки зрения синтеза на основе биокатализа, так и для последующих исследований в области фармакологии. В частности, целесообразным является дальнейшее изучение фармакофорных групп синтезированных соединений для возможного развития направленного синтеза биологически активных веществ.

ВЫВОДЫ

1. С использованием дрожжей получены вещества с выходом от 21% до 88% выхода, с временем синтеза от 6 до 72 часов. Скорость конверсии при применении стандартных методов была выше и не превышала 4 часов. Величины выходов полученных соединений сопоставимы.

2. Наибольшей антибактериальной активностью в отношении *B. subtilis* 26D и *St. aureus* 209P проявлял биспирон на основе ванильного альдегида. Антибактериальную активность в отношении *E.coli* 113-13 полученные вещества не проявляли.

3. На основе антиокислительной активности был получен следующий ряд веществ (по убыванию активности): $P_B > P_A > P_F > P_{C2} > P_{C1}$.

4. При исследовании антиоксидантной активности с помощью метода, был получен следующий ряд веществ (по убыванию активности): $P_B > P_{C2} > P_{C1} > P_A$.

5. В результате проведения экспериментов по методу DPPH, можно построить следующий ряд веществ по убыванию антирадикальной активности: $P_B > P_F > P_{C2} > P_A > P > P_{C1}$.

