

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mori K. The synthesis of optically active chemical compounds using microorganisms and their enzymes //Chemistry. 1987. - V.42, N 8.-P.562-563.
2. Servi S. Microbial redox enzymes for the enzymatic production of chiral synthons //Synthesis. 1990. - P.1-5.
3. Belan A., Bolte J., Fauve A. et al. Baker's yeast reduction of  $\alpha$ -diketones: investigation and control of the enzymatic pathway. //J.Org.Chem. 1987. - V.52.-P.256.
4. Nakamura K., Kawai Y., Kitayama T. et al. Stereochemical control in microbial reduction //Bull.Inst.Chem.Res. 1989. - V.67.-P.157.
5. Ohta H. The reactions of organic synthesis using microorganisms and enzymes //Bio industry. 1988. - V.5, N 8.-P.579-591.
6. Kometani T., Kitatsuji E., Matsuno R. Baker's yeast mediated bioreduction: practical procedure using EtOH as energy source //J.Ferment. and Bio-eng. 1991. - V.71, N 3.-P.197-199.

УДК 573.6.086.83;663.1

В.Н.Леонтьев, доцент;  
 А.В.Ахрамович, студент;  
 Л.В.Пленина, зам.директора;  
 С.В.Хлюстов, директор;  
 Т.Ф.Кизино, инженер

### ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПОЛИСАХАРИДА - ЦИННАБОРИНА

Antitumour polysaccharide - cinnaborine, produced of micromycetes *Picnoporus cinnaborinus* were isolated and purified. Investigation of structure this polysaccharide has been carried out.

В последние годы отмечается возрастание интереса к полисахаридам микробного происхождения как к потенциальным противоопухолевым средствам. Эти соединения, как правило, нетоксичны и обладают высокой терапевтической активностью и избирательностью.

Целью настоящей работы явился анализ структуры полисахарида - циннаборин, секретлируемого несовершенным грибом *Picnoporus cinnaborinus* и обладающего выраженной противоопухолевой активностью в отношении карциномы Са45.

Максимальный выход циннаборина наблюдается на 142 ч глубинного культивирования гриба на неохмеленном пивном сусле при рН 5,6-5,8 и температуре 26-28°С.

Методом гель-хроматографии на колонке 1,2x30 см, заполненной носителем Toyopearl HW-50, уравновешенной 0,1М К,Na-фосфатным буфером (рН 6,86), показано, что в культуральной жидкости содержатся, по крайней мере, четыре биополимера с молекулярными массами около 5, 15, 20 и 37 кДа. Очищенный переосаждением этанолом препарат циннаборина гомогенен по молекулярной массе (15 кДа).

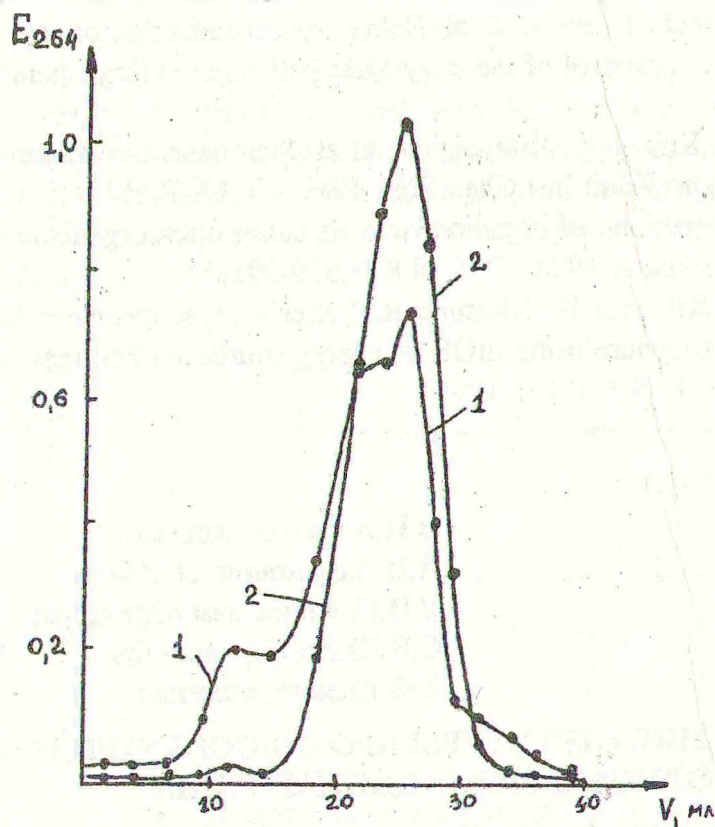


Рис.1. Профили элюции культуральной жидкости (1) и очищенного циннаборина (2) с колонки

Ионообменная хроматография на колонке 1,2x10 см с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 0,1М К,Na-фосфатным буфером (рН 6,86), с использованием градиента концентрации КСl в интервале 0,3-2,0М показала, что циннаборин выходит с колонки широким пиком с максимумом при 0,75 М КСl.

Очевидно, что такой характер свойственен для гетерогенных по заряду систем.

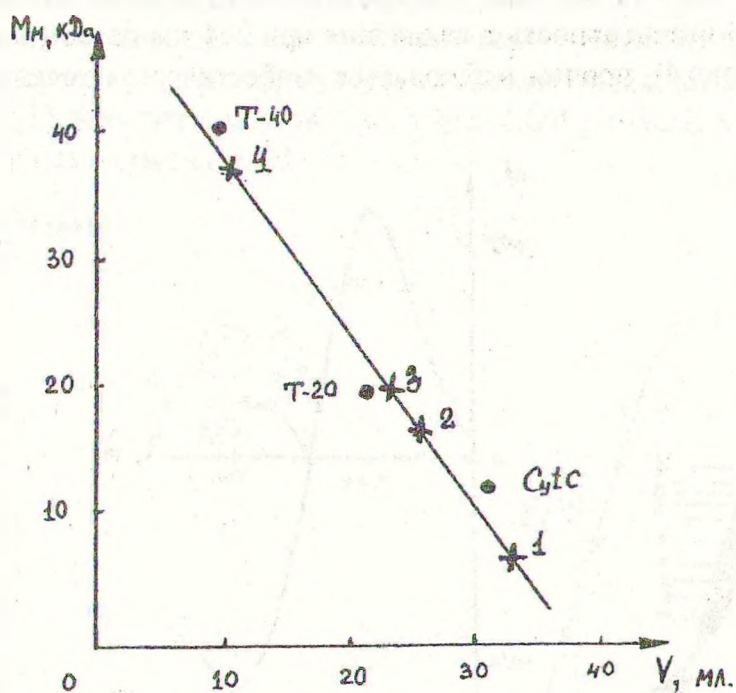


Рис.2. Калибровочный график для колонки и определение по нему молекулярных масс циннаборина (2) и компонентов культуральной жидкости (1,3,4): цит с - цитохром с  $M_n$  11700 Да, Т-20 и Т-40 - декстраны с  $M_n$  20000 Да и  $M_n$  40000 Да соответственно

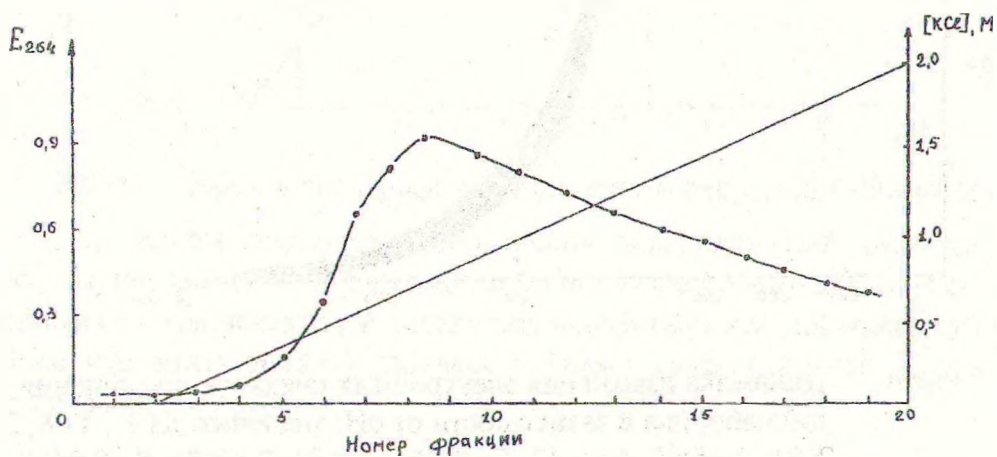


Рис.3. Фракционирование циннаборина на колонке с DEAE-целлюлозой: 1 -  $E_{264}$ , 2 - концентрация KCl

Спектрофотометрические исследования показали, что в электронном спектре поглощения циннаборина наблюдается выраженный максимум

при 264 нм с  $\epsilon=7,12 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  и плечо в области 306 нм. Обнаружено, что с ростом рН интенсивность поглощения при 264 нм падает, а при 306 нм возрастает (рис.4), причем наблюдается изобестическая точка при 283 нм.

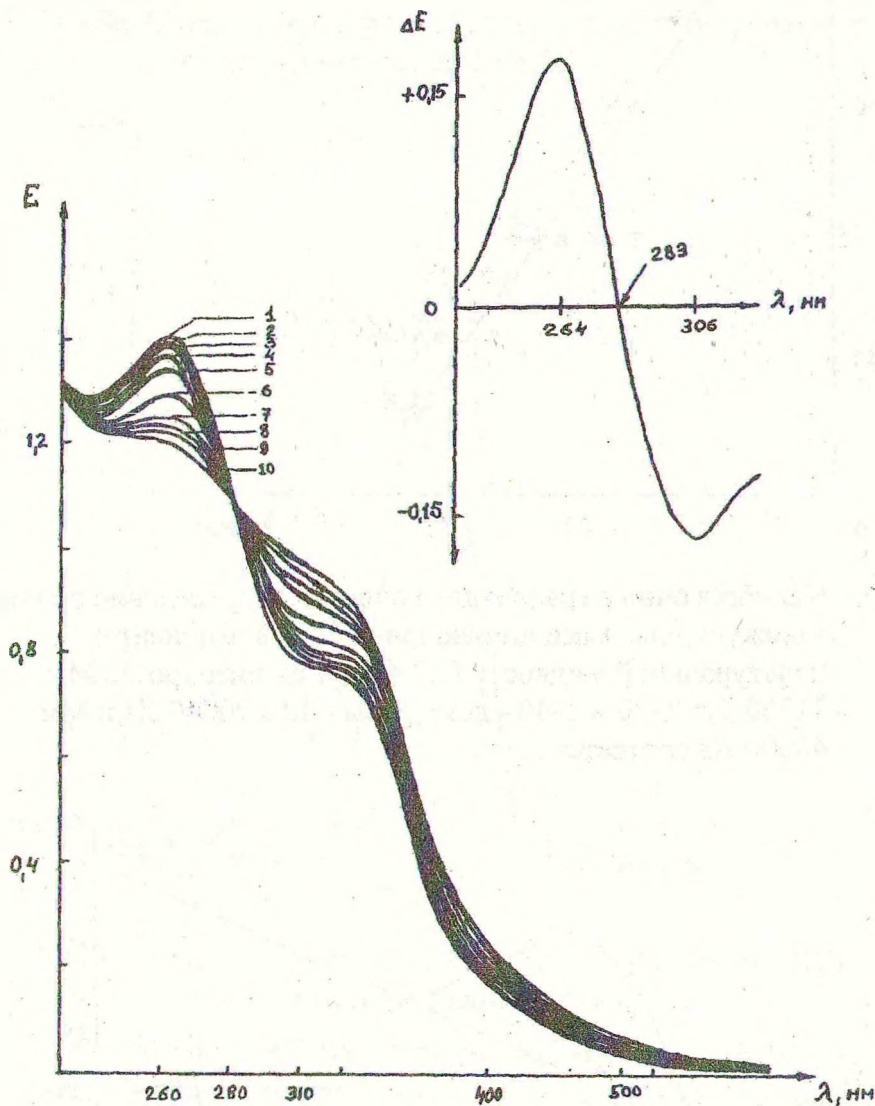


Рис.4. Динамика изменения электронных спектров поглощения циннаборина в зависимости от рН: значения рН 1 - 4,68; 2 - 5,71; 3 - 6,65; 4 - 7,12; 5 - 8,56; 6 - 9,36; 7 - 9,76; 8 - 9,94; 9 - 10,10; 10 - 10,56. На вставке дифференциальный спектр между 1 и 10 растворами

На кривой спектрофотометрического титрования (рис.5) наблюдается два перегиба, соответствующие значениям рК 6,1 и 9,25 двух титруемых

функциональных групп в структуре хромофора. Характер спектров и их изменение в зависимости от рН позволяют предполагать, что в качестве хромофорной группы выступает 4,7-диоксикумариновая структура. Известно [1], что для 4-ОН  $pK=5,9$ , а для 7-ОН  $pK=9,22$ , к которым близки полученные нами значения.

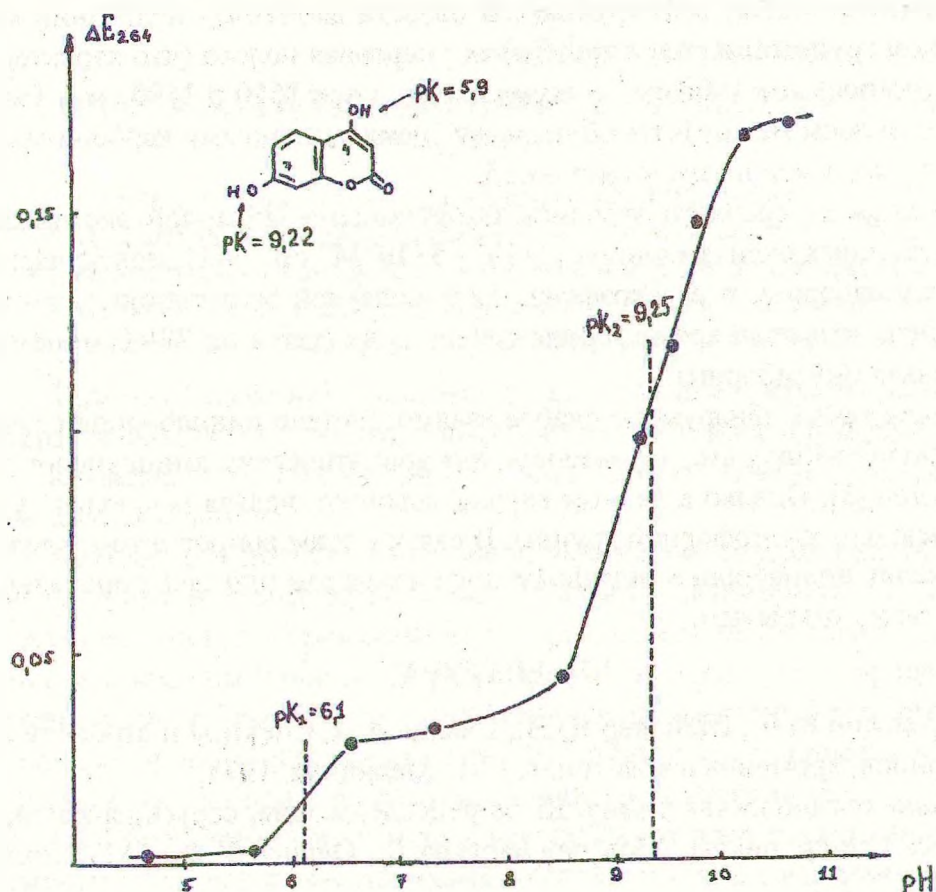
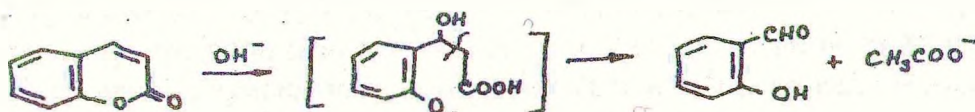


Рис.5. Кривая спектрофотометрического титрования циннаборина

Еще одним подтверждением наших предположений является тот факт, что после щелочного гидролиза циннаборина оба максимума в электронном спектре исчезают и появляется новый выраженный максимум при 280 нм, что может быть обусловлено разрывом лактонного кольца кумаринового фрагмента [2].



Хроматографический анализ (ТСХ на пластинках Silufol) гидролизатов циннаборина показал наличие в структуре полисахарида глюкозы и маннозы, причем глюкоза является основным компонентом.

В ИК-спектре циннаборина наблюдается широкая полоса при  $3400\text{ см}^{-1}$  с плечом при  $3250\text{ см}^{-1}$ , которые можно отнести к связанным водородными связями  $-\text{OH}$  и  $-\text{N}-\text{H}$ -группам. В области валентных колебаний карбонильной группы имеется интенсивная умеренная полоса (что характерно для полимеров) при  $1600\text{ см}^{-1}$  с двумя плечами при  $1650$  и  $1690\text{ см}^{-1}$ . Такой характер полосы может быть обусловлен тремя различными карбонилами - амидным, карбоксильным и лактонным.

Исходя из среднего значения коэффициента молярной экстинкции для замещенных оксикумаринов ( $3 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^4\text{ M}^{-1}\text{ см}^{-1}$ ) [1], молекулярной массы циннаборина и его коэффициента молярной экстинкции нетрудно определить, что одна хромофорная группа приходится на 20-40 мономерных звеньев циннаборина.

Было также обнаружено слабое взаимодействие циннаборина с реактивом Фолина-Чикольте, характерное для ароматических аминокислот полипептидов [3]. Однако в данном случае, вероятно, нельзя исключить участия в реакции хромофорной группы. В связи с этим вопрос о том, является ли скелет циннаборина истинным полисахаридом или гликопротеином, пока остается открытым.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Перельсон М.Е., Шейнкер Ю.Н., Савина А.А. Спектры и строение кумаринов, хромонов и ксантонов. - М.: Медицина, 1975.
2. Общая органическая химия. Кислородсодержащие, серосодержащие и другие гетероциклы /Под ред.Бартона Д., Оллиса У.Ф. - М.: Химия, 1985.- Т.9.
3. Практическая химия белка /Под ред. Дарбре А. - М.: Мир, 1989.