

УДК 557.152.192.3

ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ (+)-КАТЕХИНА В ГЛУБОКОМ ЭВТЕКТИЧЕСКОМ РАСТВОРИТЕЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРИБНОЙ ЛАККАЗЫ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ И ИНГИБИРОВАНИЕ α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ

© 2021 г. М. Е. Хлупова¹, О. В. Морозова¹, И. С. Васильева¹, Г. П. Шумакович¹, Е. А. Зайцева², В. А. Чертков², А. К. Шестакова³, А. И. Ярополов¹, *

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, Москва, 105118 Россия

*e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 26.05.2021 г.

После доработки 18.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) являются альтернативой традиционным органическим растворителям для проведения ферментативных реакций между соединениями с плохой растворимостью. Проведена биокаталитическая полимеризация флавоноида (+)-катехина (КХ) с использованием лакказы из культуральной жидкости базидиального гриба *Trametes hirsuta* в ГЭР-буферной смеси (бетаин/глицерин 60 об. % – буфер 40 об. %). Подобраны условия синтеза олигомеров катехина (олигоКХ), растворимых в органических растворителях. По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии олигоКХ имели среднечисленную молекулярную массу 10620 и 2540 г/моль с индексом полидисперсности 1.1 и 1.09, соответственно. Исследованы физико-химические свойства полученных олигомеров методами УФ-видимой, FTIR, ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии. Полученные олигоКХ ингибировали активность α -глюкозидазы ($\text{IC}_{50} \sim 8$ мкг/мл).

Ключевые слова: (+)-катехин, лакказа, глубокие эвтектические растворители, ферментативная полимеризация, олигомеры катехина, ингибирование α -глюкозидазы

DOI: 10.31857/S0555109921060064

Катехины относятся к растительным флавоноидам и обладают антиканцерогенными, антибактериальными, антиоксидантными, кардиопротекторными и хелатирующими свойствами, а также ингибируют активность различных ферментов [1–6]. Биологические свойства катехинов сильно зависят от их химической структуры. В отличие от полифенольных соединений с низкой молекулярной массой, их полимерные и олигомерные производные обладают улучшенными физиологическими характеристиками и более продолжительным временем жизни *in vivo* [7]. В литературе описано получение олигомеров/полимеров КХ ферментативной полимеризацией мономера с использованием лакказы и пероксидазы [8–10], фотополимеризацией [11] и HCl-катализируемой полимеризацией [12]. В связи с плохой растворимостью катехинов в водных растворах, их полимеризацию обычно проводят в водно-органических смесях. Катехины и их олигомеры проявля-

ют ингибиторную активность по отношению к α -амилазе и α -глюкозидазе [8, 13, 14]. Эти ферменты играют значительную роль в гидролизе полисахаридов, способствуя уменьшению уровня глюкозы в крови и, таким образом, влияют на развитие сахарного диабета 2 типа – хронического заболевания для многих людей во всем мире. Одним из направлений лечения этого заболевания является уменьшение скорости разложения полисахаридов путем ингибирования активности α -амилазы и α -глюкозидазы. Таким образом, олиго-/поликатехины, обладающие большей стабильностью по сравнению с мономером КХ, могут являться перспективной субстанцией для лечения диабета 2 типа.

Лакказа (*n*-дифенол:кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) относится к “голубым” оксидазам, катализирует окисление различных органических соединений, включая полифенолы, метокси-замещенные фенолы, полиамины молекулярным

кислородом. При ферментативном окислении фенольных субстратов образуются радикальные продукты, которые вступают в реакции сочетания с образованием олигомерных/полимерных соединений [15, 16]. Этот фермент привлекает большое внимание в качестве катализатора для тонкого органического синтеза [17, 18] и может быть использован для полимеризации различных органических соединений.

В последние годы появился новый класс растворителей, названных глубокими эвтектическими растворителями (ГЭР) [19], которые имеют большое преимущество перед традиционными органическими растворителями, а именно, нетоксичность, невоспламеняемость, биodeградируемость и др. Они рассматриваются как “зеленые” растворители. Как правило, ГЭР получают простым термическим смешиванием как минимум двух компонентов, в результате которого образуется эвтектический раствор с температурой плавления ниже, чем у отдельных компонентов [19–21]. Компоненты ГЭР обычно представляют собой органические соединения, одно из которых является акцептором, а другое донором водородных связей. ГЭР или их смеси с буферным раствором могут использоваться в различных областях, в том числе для проведения биокаталитических реакций [22]. В литературе описано весьма ограниченное количество примеров использования оксидоредуктаз для синтеза соединений в ГЭР-буферных смесях [23, 24].

Цель работы – проведение окислительной полимеризации (+)-катехина с участием грибной лакказы *Trametes hirsuta* в ГЭР-буферной смеси и исследование структуры и свойств полученных продуктов.

МЕТОДИКА

Лимонная кислота, NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , NaOH – производства “Riedel-de Haën” (Германия), 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат (АБТС), α -глюкозидаза из *Saccharomyces cerevisiae*, *N*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид (ПНФГ) – “Sigma-Aldrich” (США), тетрагидрофуран (ТГФ), диметилформамид (ДМФА), ацетонитрил, бетаин моногидрат “Acros Organics”(США), (+)-катехин ($\geq 96\%$) – “Carl Roth GmbH” (Германия), диметилсульфоксид (ДМСО) – “Marbiopharm” (Россия), ДМСО- D_6 (“Aldrich”), глицерин 99% “Panreac” (Испания), уксусная кислота высшей степени очистки производства “Химмед” (Россия) были использованы без дополнительной очистки.

Лакказа была выделена из культуральной жидкости базидиального гриба *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát (штамм *T. hirsuta* 56) согласно методу [25]. Фермент был гомогенен по данным ДДС-электрофореза и имел удельную активность 163 МЕ/мг белка. Активность фермента определяли спектрофотометрически, используя в качестве хромоген-

ного субстрата 1 мМ раствор АБТС ($\lambda = 420$ нм; $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) в 0.1 М Na-цитратно-фосфатном буфере, pH 4.5. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль АБТС за 1 мин при температуре 22°C. Концентрация белка, измеренная согласно методу [26], составляла 7.8 мг/мл.

Все растворы готовили с использованием воды, очищенной на установке Simplicity (“Millipore”, США).

ГЭР бетаин-глицерин получали термическим смешиванием компонентов с молярным соотношением 1 : 2 при 45°C. Смесь ГЭР/буфер с соотношением 60 : 40 об. % готовили добавлением соответствующего объема 0.1 М Na-цитратно-фосфатного буфера, pH 4.5, к ГЭР.

Ферментативную полимеризацию КХ проводили следующим образом: 15 мг КХ растворяли в 1.8 мл ГЭР, добавляли 1.2 мл буферного раствора и интенсивно перемешивали. Концентрация КХ в реакционной среде была 17 мМ. Полимеризацию инициировали добавлением фермента (удельная активность в реакционной смеси 1.05 МЕ/мл). Синтез проводили в аэробных условиях при комнатной температуре (21–22°C) и постоянном перемешивании со скоростью 400 об./мин на магнитной мешалке RT-10 (“IKA®-Werke GmbH & Co”, Германия) в течение 24 ч. Затем прозрачный раствор разбавляли в 5 раз деионизированной водой, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (7000 g, 20 мин) с использованием центрифуги Eppendorf 5804 R (Австрия), многократно промывали 3%-ным раствором этанола, высушивали при 37°C до постоянного веса и использовали в дальнейших экспериментах. Выход продукта рассчитывали, как процентное отношение массы полученного олигоКХ к массе исходного мономера.

Среднечисленную молекулярную массу и индекс полидисперсности олигоКХ определяли методом гель-проникающей хроматографии на хроматографе высокого давления “Waters” (США), оснащенный колонкой Styragel HR 1E, 300 × 7.8 мм (“Waters”, США), УФ- и рефрактометрическим детекторами. В качестве элюента использовали ТГФ, скорость потока 1 мл/мин, объем вводимой пробы 40 мкл. Калибровку системы проводили по полистирольным стандартам.

УФ-видимые спектры регистрировали на спектрофотометре UV1240 mini (“Shimadzu”, Япония), ИК спектры образцов в таблетках KBr на спектрометре Frontier FT-IR/FIR (“PerkinElmer Inc.”, США). Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали в ДМСО- D_6 при температуре 303К на спектрометре AV-600 (“Bruker”, США) с рабочей частотой 600.03 МГц для ядер ^1H . Для отнесения сигналов ядер ^1H и ^{13}C использовали данные двумерных экспериментов COSY, HSQC и HMQC [27]. Полученные параметры спектров мономера КХ

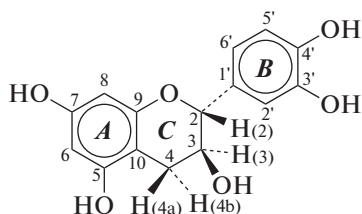


Рис. 1. Структурная формула (+)-катехина и нумерация атомов в молекуле.

ЯМР ^1H : 2.354 (1H, dd, $J = 15.96$; 8.12, H_{4b}); 2.660 (1H, dd, $J = 15.96$; 5.36, H_{4a}); 3.812 (1H, ddt, $J_d = 7.49$; 8.12, $J_t = 5.25$, H_3); 4.482 (1H, d, $J_d = 7.49$, H_2); 4.836 (1H, d, $J_d = 5.17$, 3-OH); 5.691 (1H, d, $J_d = 2.29$, H_8); 5.889 (1H, d, $J_d = 2.29$, H_6); 6.597 (1H, dd, $J_d = 2.05$, 8.02 H_6); 6.686 (1H, d, $J_d = 8.02$ H_5); 6.725 (1H, d, $J_d = 2.05$ H_2); 8.774 (1H, s, 4'-OH); 8.822 (1H, s, 3'-OH); 8.906 (1H, s, 7-OH); 9.139 (1H, s, 5-OH); ЯМР ^{13}C : 27.91 (C_4); 66.39 (C_3); 81.07 (C_2); 93.94 (C_8); 95.21 (C_6); 99.14 (C_{10}); 114.60 (C_2); 115.15 (C_5); 118.48 (C_6); 130.69 (C_1); 144.90 (C_3 & C_4); 155.42 (C_9); 156.23 (C_5); 156.52 (C_7). Химические сдвиги приведены в м.д., константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) – в Гц, s – синглет, d – дублет, dd – дублет дублетов, ddt – дублет дублетов триплетов.

Активность α -глюкозидазы определяли по гидролизу субстрата фермента ПНФГ, продукт гидролиза которого имеет максимум поглощения при 400 нм. Определение ингибирования α -глюкозидазы проводили по методу [28] с минимальными изменениями. В реакционную смесь: 100 мкл α -глюкозидазы (0.5 МЕ/мл) и 600 мкл 0.1 М фосфатного буфера (рН 6.9) вносили 50 мкл раствора исследуемого вещества в ДМСО в концентрации 31.25, 62.5, 125, 250, 500 и 1000 мкг/мл. Затем смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Реакцию инициировали добавлением 100 мкл 5 мМ раствора ПНФГ в 0.1 М фосфатном буфере (рН 6.9) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Затем реакцию останавливали добавлением 400 мкл 0.2 М раствора Na_2CO_3 и измеряли поглощение при 400 нм при комнатной температуре. Ингибирование фермента рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{D_0 - D}{D_0} \times 100,$$

где D_0 – контроль (поглощение раствора без исследуемого вещества); D – поглощение раствора в присутствии КХ или олигоКХ. Влияние ДМСО на фермент учитывали в контроле. Определение ингибирующего действия мономера КХ проводили аналогично в диапазоне концентраций 1–20 мг/мл ДМСО.

Эффективность ингибирования оценивали по значению IC_{50} , которое определяли из графика зависимости ингибирования (%) от concentra-

ции исследуемого вещества. IC_{50} – концентрация вещества, необходимая для ингибирования 50% активности фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена структурная формула (+)-катехина, использованного в данной работе. Согласно литературным данным, ГЭР сохраняют свои свойства в составе водных смесей при содержании ГЭР выше 50 вес. %. При меньшем содержании ГЭР, смесь ГЭР/вода нужно рассматривать как водный раствор отдельных компонентов [29]. Ферментативную полимеризацию КХ проводили в смеси ГЭР/буфер, содержащей 40 об. % (~35 вес. %) буфера. Были подобраны условия полимеризации КХ (активность фермента в реакционной среде, время реакции) для получения продуктов полимеризации, растворимых в ацетонитриле, ДМСО, ТГФ и ДМФА. Обнаружено, что для получения растворимых в органических растворителях олигоКХ, активность лакказы в реакционной среде должна быть 1.05 МЕ/мл, а время синтеза – 24 ч. Выход продуктов в этих условиях составлял 32%. При увеличении активности фермента продукты полимеризации КХ были не растворимы в указанных выше растворителях, что препятствовало их исследованию.

По данным гель-проникающей хроматографии в результате ферментативной полимеризации КХ в смеси ГЭР/буфер образовывалось два продукта со среднечисленной молекулярной массой 10620 и 2540 г/моль и индексом полидисперсности 1.1 и 1.09 соответственно. Таким образом, в результате ферментативной полимеризации КХ в смеси ГЭР/буфер образуется 2 олигомера со степенью полимеризации 24 и 6.

УФ-видимые спектры мономера КХ и олигоКХ в ДМСО представлены на рис. 2. Острый пик при 280 нм на спектре КХ соответствует π - π^* переходам ароматических фрагментов мономера. Продукты ферментативной полимеризации КХ, растворимые в ДМСО, поглощают в широком диапазоне длин волн, вплоть до 600 нм. На спектре олигоКХ помимо максимума при 280 нм видны максимумы при 260, 330 и 370 нм.

На рис. 3 представлены ИК-Фурье спектры КХ и олигоКХ. На спектре мономера (рис. 3, кривая 1) присутствуют полосы, соответствующие валентным колебаниям связи О–Н (широкий максимум в области 3200–3550 cm^{-1}), валентным колебаниям $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}-\text{C}$ связей ароматических колец (1430–1625 cm^{-1}) и $\text{C}-\text{O}$ фенолов и простых эфиров (1100–1310 cm^{-1}), деформационным колебаниям $\text{C}-\text{OH}$ (1330–1390 cm^{-1}) и $\text{C}-\text{H}$ (650–900 cm^{-1}) связей ароматических колец [30]. Характерные области адсорбции для этих групп отмечены на рис. 3 горизонтальными линиями. На спектре олигоКХ также присутствовали

полосы, характерные для валентных колебаний групп О–Н, С=С, С–С и С–О (рис. 3, кривая 2), однако их интенсивность снижена по сравнению со спектром КХ. Наиболее существенные различия наблюдались в низкочастотной области спектров: на спектре олигоКХ отсутствовали полосы, соответствующие колебаниям связи $C_{аром}-H$. Можно предположить, что при ферментативной полимеризации КХ происходило замещение ароматических протонов.

Для структурного анализа олигоКХ была использована спектроскопия ЯМР на ядрах 1H и ^{13}C (рис. 4, 5). Было проведено отнесение всех сигналов в спектрах ЯМР 1H и ^{13}C мономера КХ (нумерация атомов показана на рис. 1). Опорными служили сигналы протонов Н4а и Н4б, имеющие характерную мультиплетность (рис. 4а). Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР 1H и ^{13}C также использовали данные двумерных спектров ЯМР COSY, HSQC и HMBC. В настоящей работе с использованием двумерных спектров HMBC впервые было проведено отнесение сигналов протонов всех гидроксильных групп. Значения параметров спектров ЯМР мономера КХ приведены в экспериментальной части.

Следует отметить характерную особенность структуры КХ: кольцо С этой молекулы является неплоским. Наибольший выход из плоскости наблюдается для атомов углерода С2, С3 и С4. Согласно нашим оценкам, эти отклонения составляют от 0.2 до 0.4 Å. При этом протон Н4б, ароматическое кольцо В и гидроксильная группа 3-ОН занимают псевдоэкваториальное положение, а протоны Н2, Н3 и Н4а – псевдоаксиальное [31].

Сравнительный анализ спектров ЯМР 1H и ^{13}C олигоКХ и мономера КХ показал, что всем сигналам в спектрах мономера соответствуют группы сигналов в спектрах олигоКХ, что свидетельствует о сохранении углеродного скелета КХ в процессе ферментативной олигомеризации. В спектре ЯМР 1H олигоКХ (рис. 4б) видны уширенные сложные мультиплеты в областях 6.3–7.4 и 5.6–6.3 м.д., которые соотносятся с протонами ароматических колец В (Н2', Н5', Н6') и А (Н6 и Н8), соответственно. При этом суммарная интегральная интенсивность протонов кольца А олигоКХ почти в 3 раза ниже, чем интенсивность протонов кольца В, хотя в мономере КХ общий интеграл протонов кольца А меньше общего интеграла протонов кольца В всего в 1.5 раза. В области 4.3–5.5 м.д. находятся сигналы протона Н2 и гидроксильного протона 3-ОН, а в диапазоне 3.6–4.3 м.д. – сигнал протона Н3. Интегральные интенсивности сигналов этих протонов также сильно снижены по сравнению со значениями для мономера КХ. В области 2.2–3.0 м.д. находятся сигналы протонов Н4а и Н4б CH_2 -группы с интегралом, близким к значению для мономера. В слабopольной части спектра ЯМР 1H олигоКХ наблюдались уширен-

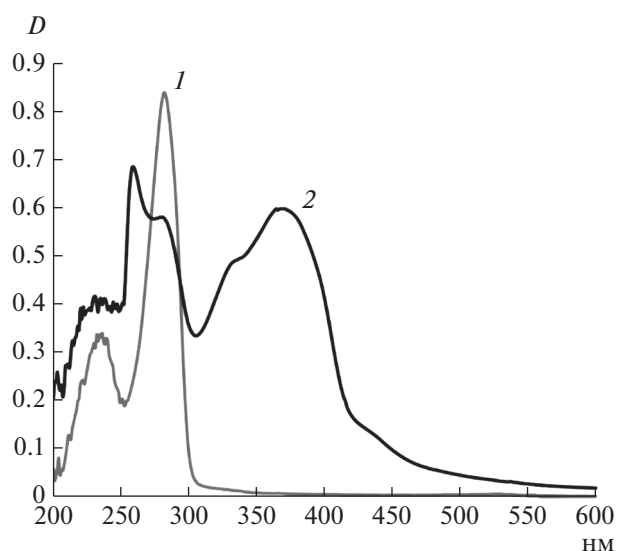


Рис. 2. УФ-видимые спектры мономера КХ (1) и олигоКХ (2) в ДМСО.

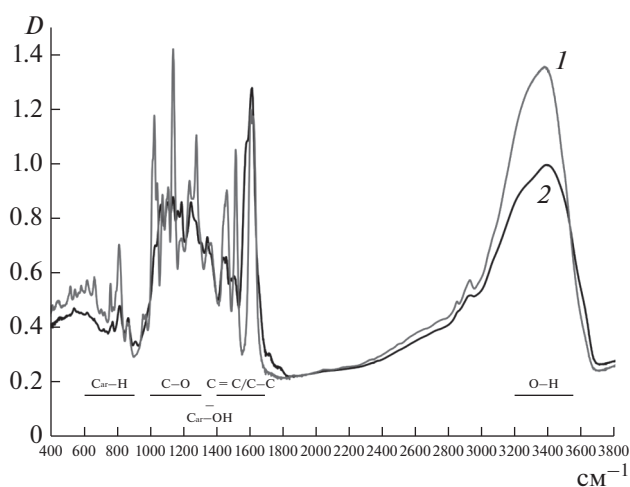


Рис. 3. ИК-Фурье спектры мономера КХ (1) и олигоКХ (2).

ные сигналы в области 8.0–11.3 м.д. с общей интегральной интенсивностью, соответствующей трем протонам, которые соответствуют фенольным гидроксилам. Важно отметить, что интенсивность уширенных сигналов протонов Н4а и Н4б при С4 соответствует интенсивности двух протонов. Это однозначно свидетельствует о том, что в олигоКХ не происходит образование связей в положении С4. Однако в литературе ранее отмечалось, что образование димеров и тримеров КХ природного происхождения может происходить за счет окислительного кросс-сочетания с образованием связей между атомами С4 одной молекулы с атомом углерода С6 или С8 другой молекулы флавоноида [32]. Очевидно, что механизм “сшивания” молекул флавоноидов может существенно различаться в зависимости от условий реакций.

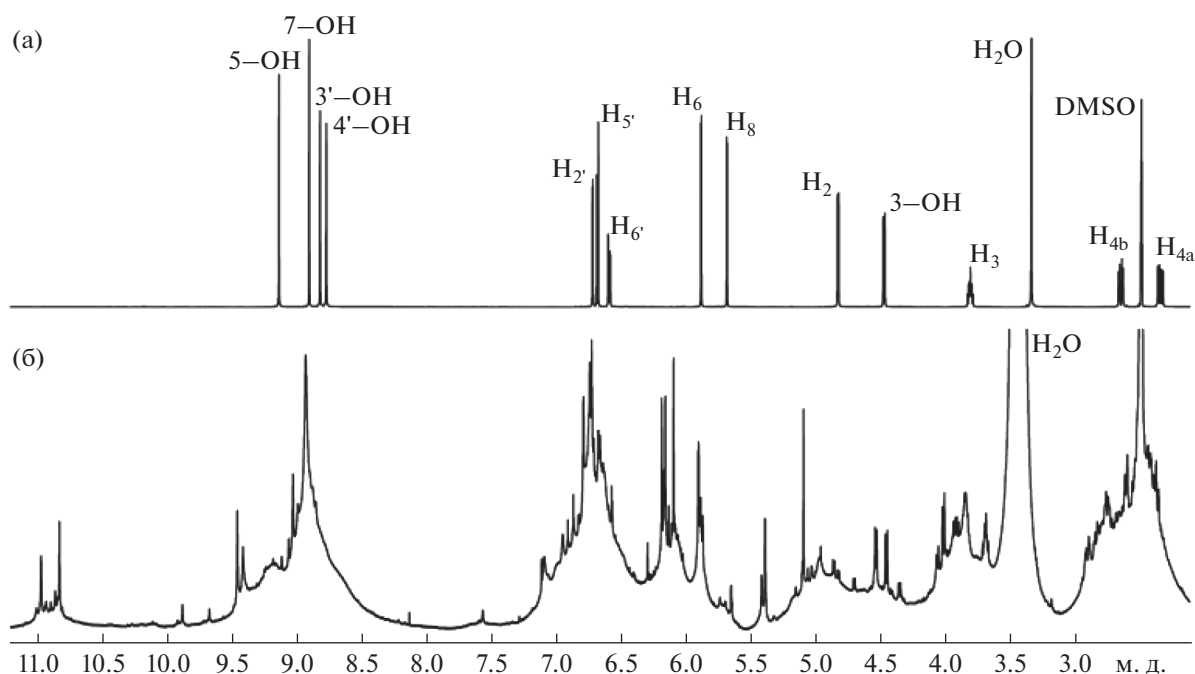


Рис. 4. Спектры ЯМР ^1H мономера КХ (а) и олигоКХ (б).

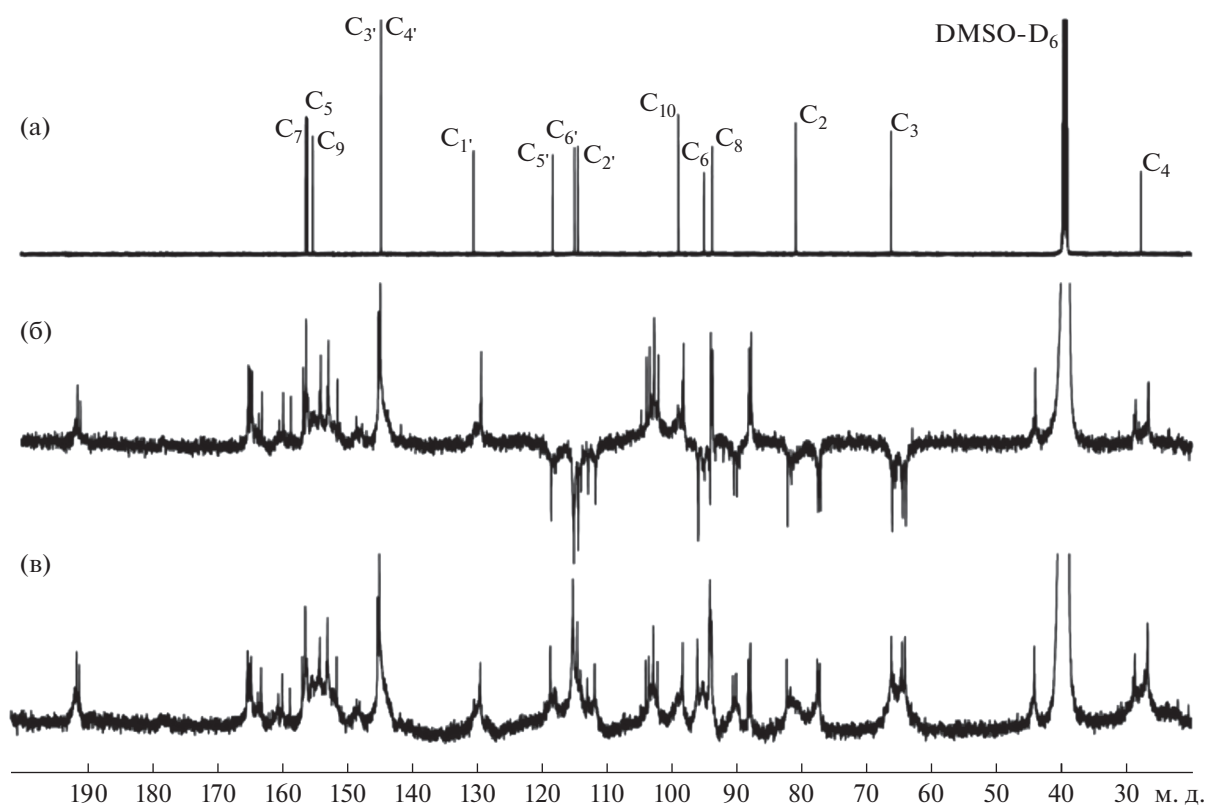


Рис. 5. Спектры ЯМР ^{13}C (а) $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ мономера КХ, (б) ^{13}C -АРТ олигоКХ (сигналы четвертичных атомов водорода и CH_2 -группы направлены вверх, а сигналы CH -групп вниз) и (в) $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ олигоКХ.

Анализ спектров ЯМР ^1H олигоКХ позволяет обоснованно предположить, что при ферментативной полимеризации сохраняется углеродный

скелет молекулы КХ (кольца *A*, *B* и *C*), при этом один из протонов кольца *A* (H_6 и/или H_8) замещается на алкоксильную или арилоксильную

группу, образованную из другой молекулы КХ. Также при отрыве атома водорода от 3-ОН группы кольца **C** под действием лакказы помимо образования алкокси-радикала происходит частичное окисление 3-ОН до карбонильной группы.

Анализ спектров ЯМР ^{13}C (рис. 5) показал, что всем сигналам атомов углерода кольца **B** мономера КХ соответствуют уширенные интенсивные сигналы в спектре олигоКХ. При замещении протона в бензольном кольце арилокси- или алкокси-группой химические сдвиги всех атомов углерода в кольце должны заметно измениться (до 10 м.д.). Однако при ферментативной полимеризации КХ таких изменений в кольце **B** не наблюдается.

Сигналы углерода **C2** и **C3** в спектре олигоКХ (рис. 5б, 5в) представляют собой группы уширенных сигналов, занимающих довольно широкие области спектра 77–82 м.д. и 64–66 м.д. соответственно. Поскольку в процессе ферментативной полимеризации КХ не происходило замещение протонов кольца **B**, т.е. структура кольца **B** сохранялась, на изменение химических сдвигов **C2**, по-видимому, существенное влияние оказывали изменения при атоме **C3**. Сигналы углеродов **C6** и **C8** лежат в области 90.0–96.0 м.д. и имеют сильно пониженную для сигналов СН-групп интенсивность. При этом к четвертичному атому углерода **C10** помимо основного сигнала при 98.3 м.д. относятся еще несколько сигналов при 88.3 м.д., 94.1 м.д. и широкий сигнал при 102.0–104.0 м.д. Такое разнообразие сигналов атома **C10** олигоКХ обусловлено эффектами, связанными с замещением атомов водорода в кольце **A**, и частичным окислением 3-ОН группы до карбонильной группы. Те же эффекты приводят к появлению многочисленных сигналов четвертичных углеродов в области 157.0–165.0 м.д. Эти сигналы относятся как к атомам углерода **C5**, **C7**, **C9** кольца **A**, так и к сигналам четвертичных углеродов **C6** и **C8**, возникающим в процессе замещения атома водорода на арилокси- или алкокси-группы. Подтверждением образования продукта, содержащего карбонильную группу при **C3**, служит характеристичный сигнал четвертичного углерода при 193.6 м.д. и появление сигнала СН₂-группы при 44.0 м.д., который оказывается смещенным в слабое поле относительно основного сигнала при 26.0–29.0 м.д.

Таким образом, анализ спектров ЯМР ^1H и ^{13}C олиго КХ и мономера КХ позволяет заключить, что при ферментативной полимеризации сохраняется углеродный скелет молекулы КХ, а в образовании активных радикальных частиц участвуют все пять гидроксильных групп мономера. Образующиеся радикалы атакуют углерод **C6** и/или **C8** кольца **A** другой молекулы КХ, в результате чего происходит замещение протона на алкокси- или арилокси- группу. Также при отрыве атома водорода от гидроксила в положении **C3** под действи-

ем лакказы параллельно происходит окисление 3-ОН группы до карбонила. Количество звеньев, содержащих карбонильную группу, в олигоКХ составляет 15–20% от общего количества мономерных звеньев.

Важно отметить, что механизм ферментативной полимеризации КХ, описанный в данной работе, подобен механизму лакказы-катализируемой полимеризации дигидрокверцетина в смеси ГЭР/буфер [33]. В обоих случаях это двухстадийный процесс. Первая стадия – это ферментативное окисление гидроксильных групп с образованием радикалов. Вторая стадия – радикальная атака активных частиц на ароматическую систему другой молекулы флавоноида. Однако, структура олигоКХ существенно отличается от структуры олигомера дигидрокверцетина. При полимеризации КХ атака происходит по атомам углерода **C6** и **C8** кольца **A**, в то время как при полимеризации дигидрокверцетина атака идет исключительно по атому углерода **C6'** кольца **B**. Согласно проведенным нами квантовохимическим расчетам, причиной этого являются существенные различия в электронной структуре этих флавоноидов. Наличие в молекуле дигидрокверцетина карбонильной группы в положении **C4** существенно дестабилизирует энергию переходного состояния при радикальной атаке по атомам **C6** и **C8** дигидрокверцетина. В случае КХ этой дестабилизации нет, а согласованный эффект трех кислородсодержащих заместителей кольца **A** оказывается сильнее, чем аналогичный эффект двух заместителей кольца **B**, поэтому радикальная атака в КХ идет по кольцу **A**.

Синтезированные олигоКХ были протестированы на ингибирование активности α -глюкозидазы. Концентрация олигоКХ, необходимая для ингибирования 50% активности фермента (IC_{50}) с использованием в качестве субстрата ПНФГ составляла ~8 мкг/мл, в то время как для мономера КХ IC_{50} – ~980 мкг/мл.

Таким образом, олигомеры катехина, синтезированные с использованием грибной лакказы *T. hirsuta* в ГЭР-буферной смеси, являются эффективными ингибиторами α -глюкозидазы и могут быть перспективной субстанцией для лечения сахарного диабета 2-го типа.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (проект № 20-08-00104а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vinson J.A. // Adv. Exp. Med. Biol. 1998. V. 439. P. 151–164.
2. Jankun J., Selman S.H., Swiercz R., Skrzyteczak-Jankun E. // Nature. 1997. V. 387. № 6633. P. 561.
3. Bordoni A., Hrelia S., Angeloni C., Giordano E., Guarnieri C., Caldarella C.M., Biagi P.L. // J. Nutr. Biochem. 2002. V. 13. № 2. P. 103–111.

4. Nakagawa K., Ninomiya M., Okubo T., Aoi N., Juneja L.R., Kim M., Yamanaka K., Miyazawa T. // *J. Agric. Food Chem.* 1999. V. 47. № 10. P. 3967–3973.
5. Kumar S., Pandey A.K. // *Scientific World J.* 2013. V. 2013. Article № 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
6. Latos-Brozio M., Masek A., Piotrowska M. // *Biomacromolecules.* 2021. V. 11. № 1. P. Article № 50.
7. Hagerman A.E., Riedl K.H., Jones G.A., Sovik K. N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W., Riedel T.L. // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V. 46. № 5. P. 1887–1892.
8. Jeon S.Y., Oh S.J., Kim E., Imm J.Y. // *J. Agric Food Chem.* 2013. V. 61. № 19. P. 4577–4584.
9. Kurisawa M., Chung J.E., Uyama H., Kobayashi Sh. // *Macromol. Biosci.* 2003. V. 3. № 12. P. 758–764.
10. Kurisawa M., Chung J.E., Kim Y.J., Uyama H., Kobayashi Sh. // *Biomacromolecules.* 2003. V. 4. № 3. P. 469–471.
11. Liang J.Y., Yang M.Y., Hu A., Chen L.Y. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2016, V. 165. P. 115–120.
12. Oliver S., Hook J.M., Boyer C. // *Polym. Chem.* 2017. V. 8. № 15. P. 2317–2326.
13. Kim T., Choi H.J., Eom S.H., Lee J., Kim T.H. // *Bioorg. Med. Chem Letters.* 2014. V. 24. № 6. P. 1621–1624.
14. Rasouli H., Hossein-Ghazvini S.M.-B., Adibi H., Khodarahmi R. // *Food and Function.* 2017. V. 8. № 5. P. 1942–1954.
15. Hollmann F., Arends I. // *Polymers.* 2012. V. 4. № 1. P. 759–793.
16. Bassanini I., Ferrandi E.E., Riva S., Monti D. // *Catalysts.* 2021. V. 11. № 1. P. 26.
17. Witayakran S., Ragauskas A.J. // *Adv. Synth. Catal.* 2009. V. 351. № 9. P. 1187–1209.
18. Mogharabi M., Faramarzi M.A. // *Adv. Synth. Catal.* 2014. V. 356. № 5. P. 897–927.
19. Abbott A., Boothby D., Capper G., Davies D., Rasheed R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 29. P. 9142–9147.
20. Smith E., Abbott A., Ryder K. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. № 21. P. 11060–11082.
21. Dai Y., Witkamp G.J., Verpoorte R., Choi Y. // *Food Chem.* 2015. V. 187. P. 14–19.
22. Cicco L., Dilauro G., Perna F., Vitale P., Capriati V. // *Org. Biomol. Chem.* 2021. V. 19. № 12. P. 2558–2577.
23. Ünlü A., Prasad B., Anavekar K., Bubenheim P., Liese A. // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2017. V. 47. № 9. P. 918–924.
24. Altundağ A., Ünlü A.E., Takaç S. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2020. V. 96. № 4. P. 1107–1115.
25. Горюшина Е.С., Русинова Т.В., Бурюков В.В., Морозова О.В., Шлеев С.В., Ярополов А.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2006. Т. 42. № 6. С. 638–644.
26. Ehresmann B., Imbault P., Well J.H. // *Analyt. Biochem.* 1973. V. 54. № 2. P. 454–463.
27. Chertkov V.A., Davydov D.V., Shestakova A.K. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2011. V. 47. № 1. P. 45–54.
28. Nazir N., Zahoor M., Ullah R., Ezzeldin E., Mostafa G.A.E. // *Molecules.* 2021. V. 26. № 1. Article № 137. <https://doi.org/10.3390/molecules26010137>
29. Hammond O.S., Bowron D.T., Elder K.J. // *Angew. Chem. Int.* 2017. V. 56. № 33. P. 9782–9785.
30. Ramos-Tejada M.M., Durán J.D.G., Ontiveros-Ortega A., Espinosa-Jimenez M., Perea-Carpio R., Chibowski E. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2002. V. 24. № 3–4. P. 297–308.
31. Chertkov A.V., Pokrovskiy O.I., Shestakova A.K., Chertkov V.A. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2008. V. 44. № 5. P. 621–623.
32. Tarascou I., Baratheu K., Andre Y., Pianet I., Dufourc E.J., Fouquet E. // *Eur. J. Org. Chem.* 2006. V. 2006. № 23. P. 5367–5377.
33. Khlupova M., Vasil'eva I., Shumakovich G., Zaitseva E., Chertkov V., Shestakova A., Morozova O., Yaropolov A. // *Catalysts.* 2021. V. 11. № 5. Article № 639. <https://doi.org/10.3390/catal11050639>

Polymerization of (+)-Catechin in a Deep Eutectic Solvent Using a Fungal Laccase: Properties of the Products and Inhibition of α -Glucosidase

M. E. Khlupova^a, O.V. Morozova^a, I. S. Vasil'eva^a, G. P. Shumakovich^a, E. A. Zaitseva^b, V. A. Chertkov^b, A. K. Shestakova^c, and A.I. Yaropolov^{a,*}

^a *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b *Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

^c *State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, Moscow, 105118 Russia*

*e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

Deep eutectic solvents (DES) are an alternative to traditional organic solvents for carrying out enzymatic reactions of compounds with poor solubility. Biocatalytic polymerization of the flavonoid (+)-catechin (CC) was carried out using laccase from the fungus *Trametes hirsuta* in DES-buffer mixture (betaine/glycerol 60 vol % – buffer 40 vol %). The conditions for the synthesis of catechin oligomers (oligoCC) soluble in organic solvents, have been selected. OligoCC had a number average molecular weight of 10620 and 2540 g/mol and a polydispersity index of 1.1 and 1.09, respectively, according to the data of high performance liquid chromatography. The physicochemical properties of the oligomers obtained were studied by UV-visible, FTIR and ¹H, ¹³C NMR spectroscopy. The resulting oligoCCs had α -glucosidase inhibitory activity with an IC₅₀ value of 8 μ g/mL.

Keywords: (+) catechin, laccase, deep eutectic solvent, enzymatic polymerization, catechin oligomers, characterization, α -glucosidase inhibition