

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

**Branko Borovička**

**IZOLACIJA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA  
NOVIH POLIKETIDA, DERIVATA ANTRONA  
DOBIVENIH BIOSINTEZOM**

**DISERTACIJA**

Zagreb, listopad 2012.

---

**Bibliografski podaci:**

UDK: 615.014.2:543.544.5.068.7:[543.429.23+543.51]:577.182.54:579.873.7(043.3)=163.42

Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Kemija  
Znanstvena grana: Primijenjena kemija  
Institucija: Hospira Zagreb d.o.o.  
Voditelji rada: Dr. sc. Daslav Hranueli, red. prof.  
Dr. sc. Silvana Raić-Malić, red. prof.

Broj stranica: 143  
Broj slika: 59  
Broj tablica: 8  
Broj priloga: 36  
Broj literaturnih citata: 90  
Datum obrane: 29. listopad 2012.

Sastav povjerenstva za obranu:  
Dr. sc. Irena Škorić, izv. prof.  
Dr. sc. Zorana Grabarić, red. prof.  
Dr. sc. Tomislav Bolanča, izv. prof.

Rad je pohranjen u: knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, Marulićev trg 20; Nacionalnoj i sveučilišnoj biblioteci u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice b.b; Biblioteci Sveučilišta u Rijeci, Dolac 1; Biblioteci Sveučilišta u Splitu, Livanjska 5 i Biblioteci Sveučilišta u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3.

---

Tema disertacije je prihvaćena na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu održanoj dana 19. prosinca 2011.

---

Ovaj je rad izrađen u Istraživačkom institutu PLIVA d.o.o., Zagreb i u "University of Strathclyde, Department of Pharmaceutical Sciences, Glasgow, U. K."

---

Iskreno se zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Daslavu Hranueliju i prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić na njihovoj podršci, savjetima i komentarima tijekom pisanja ovog rada. Pomoć, savjeti, razumijevanje i količina pozitivne energije koju su mi pružili tijekom izrade disertacije u najboljem smislu opisuju ulogu mentora. Posebno se zahvaljujem Daslavu pod čijim je vodstvom ovdje „ispričana priča“ osmišljena i započeta, a njegova spremnost i volja da mi pomogne uvelike su zaslužni i za njenu objavu.

Veliko hvala članovima povjerenstva za obranu rada prof. dr. sc. Zorani Grabarić, prof. dr. sc. Ireni Škorić, i prof. dr. sc. Tomislavu Bolanči na svim sugestijama i korisnim komentarima koji su ovaj rad učinili boljim.

Zahvaljujem se kolegicama i kolegama iz odjela Biološke raznolikosti nekadašnjeg Plivinog Istraživačkog instituta, a posebno Aniti i Ivi na podršci, razmjeni iskustva i pruženoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se prof. Peteru Watermanu sa sveučilišta Strathclyde na korisnim raspravama tijekom određivanja strukture spojevima reda antrona.

Zahvaljujem se i kolegama iz Hospire Zagreb na susretljivosti i razumijevanju koje su iskazali tijekom izrade disertacije.

Hvala mojoj obitelji na ljubavi, podršci i beskrajnom strpljenju. Posebno sam zahvalan mojoj Mirti i mom Matiji što nisu prečesto inzistirali na pružanju pomoći u pisanju disertacije.

*Mojoj majci i ocu*

---

## SAŽETAK

Oksitetraciklin (OTC) je poliketidni antibiotik, čija je okosnica izgrađena od 19 C-atoma, a sintetizira ga bakterijska vrsta *Streptomyces rimosus* soj R6. Genska nakupina, čiji su produkti odgovorni za biosintezu oksitetraciklina, sastoji se od 23 gena koji su klonirani i djelomično sekvencirani. Jedan od njezinih gena, gen *otcC*, sadržava genetičku uputu za anhidrotetraciklin oksigenazu, enzim koji katalizira hidroksilaciju antraciklinske strukture na položaju C-6 nakon što je sintetizirana poliketidna okosnica. Rekombinantni soj bakterije *S. rimosus* ZGL1, u kojem je kopija gena *otcC* inaktivirana insercijom genetičkog biljega, sintetizira tri nove poliketidne strukture od 17 C-atoma.

Izolacija novih poliketidnih derivata provedena je pomoću ekstrakcije organskim otapalima i kromatografijom na koloni. Pročišćavanje novih spojeva obavljeno je tankoslojnom kromatografijom (TLC) i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Određivanje struktura novih spojeva provedeno je primjenom jedno- i dvodimenzijske (1D i 2D) spektroskopije pomoću nuklearne magnetne rezonancije (NMR) i spektrometrije masa (MS). Izolacija, pročišćavanje i strukturna karakterizacija pokazale su da su dobivena tri nova poliketida, derivata antrona.

Ovaj rezultat upućuje da odsutnost proizvoda gena *otcC* znatno utječe na sintezu poliketidnog produkta odgovarajuće dužine lanca pomoću enzimskog kompleksa poliketid sintaze (PKS). Inaktivacija gena *otcC* obavljena je mjesno specifičnom mutagenezom triju ključnih aminokiselina koji se nalaze unutar pretpostavljene NADPH-vezujuće domene. Inaktivirani je gen ekspresiran u stanicama bakterije *Escherichia coli*, a biokemijska analiza je pokazala da je proizvod gena katalitički neaktivan. Kada je u kromosomu soja *S. rimosus* ZGL1 inaktivirani *otcC* gen zamijenjen funkcionalnim *otcC* genom, obnovljena je sposobnost za sintezu poliketidne okosnice od 19 C-atoma. To upućuje na činjenicu da je protein OtcC bitan partner u kvarternoj strukturi enzimskog kompleksa poliketid sintaze.

Ključne riječi: derivati antrona, genska nakupina *otc*, izolacija, oksitetraciklin, *otcC* gen, poliketidi, pročišćavanje i strukturna karakterizacija, *Streptomyces rimosus*

---

---

## ABSTRACT

### **Isolation and structural characterisation of novel polyketides, anthrone derivatives, obtained *via* biosynthesis**

Oxytetracycline (OTC) is a 19 carbon polyketide antibiotic made by *Streptomyces rimosus* R6. Gene cluster whose products are involved in oxytetracycline biosynthesis is cloned and partially sequenced. The *otcC* gene encodes an anhydrotetracycline oxygenase that catalyses a hydroxylation of the anthracycline structure at position C6 after biosynthesis of the polyketide backbone is completed. A recombinant strain *S. rimosus* ZGL1 that was disrupted in the genomic copy of *otcC* synthesized a novel C-17 polyketide.

Isolation of novel polyketide derivatives was done by the extraction using organic solvents and column chromatography. Purification of novel compounds has been performed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The structure of novel polyketide derivatives was determined by the application of single and two dimensional (1D and 2D) spectroscopy *via* nuclear magnetic resonance (NMR) and by mass spectrometry (MS). Isolation, purification and structural determination revealed three novel polyketides anthrone derivatives.

This result indicates that the absence of the *otcC* gene product significantly influences the ability of the OTC 'minimal polyketide synthase complex (PKS)' to make a polyketide product of the correct chain length. An inactivated copy of the *otcC* was made by site-directed mutagenesis of three essential glycine codons located within the putative NADPH-binding domain. Expression of the inactivated gene in *E. coli* confirmed that this gene product was catalytically-inactive. When the inactivated gene replaced the ablated gene in the chromosome of *S. rimosus*, the ability to make a 19-carbon backbone was restored, indicating that *OtcC* is an essential partner in the quaternary structure of the synthase complex.

Keywords: anthrone derivatives, isolation, *otcC* gene, *otc* gene cluster, oxytetracycline, purification and structural determination, polyketides, *Streptomyces rimosus*

---

# SADRŽAJ

<b>POPIS KRATICA</b>	<b>x</b>
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Mikroorganizmi proizvođači prirodnih spojeva</b>	<b>4</b>
2.1.1. Biologija bakterija roda <i>Streptomyces</i>	5
2.1.2. Molekularna genetika bakterija roda <i>Streptomyces</i>	7
2.1.3. Genomika bakterija roda <i>Streptomyces</i>	8
2.1.3.1. Genske nakupine za biosintezu prirodnih spojeva	9
2.1.4. Molekularna genetika i genomika vrste <i>Streptomyces rimosus</i>	10
2.1.4.1. Genska nakupina za biosintezu oksitetraciklina	11
<b>2.2. Prirodni spojevi mikroorganizama</b>	<b>16</b>
2.2.1. Poliketidi	17
2.2.1.1. Složeni poliketidi	18
2.2.1.2. Aromatski poliketidi	20
2.2.1.3. Kombinatorna biosinteza poliketida	21
2.2.2. Tetraciklini	23
2.2.2.1. Oksitetraciklin	24
2.2.2.2. Doksiciklin	29
<b>2.3. Izolacija prirodnih spojeva</b>	<b>31</b>
2.3.1. Ekstrakcija	32
2.3.1.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće	33
2.3.1.2. Adsorpcija	36
2.3.2. Kromatografija	36
2.3.2.1. Separacijski procesi	37
2.3.2.2. Tipovi stacionarnih faza	37
2.3.2.3. Tekućinska kromatografija normalne faze	38
2.3.2.4. Tekućinska kromatografija obrnutih faza	38
2.3.2.5. Kromatografija isključenjem prema veličini	39
2.3.2.6. Tankoslojna kromatografija	40
<b>2.4. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije</b>	<b>44</b>



---

2.4.1. Dvodimenzijaska nuklearna magnetska rezonancija	46
2.4.1.1. Spektar COSY	47
2.4.1.2. Spektar NOESY	47
2.4.1.3. Spektar $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ COSY	48
2.4.1.4. Spektar $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ COSY kroz više veza	48
<b>2.5. Spektrometrija masa</b>	<b>50</b>
<b>2.6. Ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija</b>	<b>53</b>
<b>2.7. Infracrvena spektroskopija</b>	<b>54</b>
<b>2.8. Antimikrobna testiranja</b>	<b>55</b>
2.8.1. Minimalna inhibitorna koncentracija	55
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>57</b>
<b>3.1. Materijali</b>	<b>57</b>
3.1.1. Mikroorganizmi	57
3.1.2. Mikroorganizmi za antimikrobna testiranja	57
3.1.3. Hranjive podloge	58
3.1.4. Materijali korišteni za filtraciju	59
3.1.5. Materijali korišteni za ekstrakciju	59
3.1.6. Materijali korišteni za kromatografiju	59
3.1.7. TLC i HPLC sustavi mobilnih i stacionarnih faza	60
<b>3.2. Oprema</b>	<b>61</b>
3.2.1. Instrumenti	61
3.2.2. Računalni program	63
<b>3.3. Metode</b>	<b>63</b>
3.3.1. Biosinteza	63
3.3.1.1. Uzgoj cjepiva bakterija <i>S. rimosus</i>	63
3.3.1.2. Dubinski uzgoj bakterije <i>S. rimosus</i> i biosinteza	63
3.3.2. Izolacija i pročišćavanje sekundarnih metabolita	64
3.3.2.1. Izolacija i pročišćavanje spojeva C1, C2 i C3	65
3.3.2.2. Izolacija i pročišćavanje spoja C1	66
3.3.2.3. Izolacija i pročišćavanje spoja C4	68
3.3.2.4. Izolacija i pročišćavanje spojeva C5 i C6	69
3.3.2.5. Izolacija i pročišćavanje spoja C7	71
3.3.3. Određivanje strukture pročišćenim spojevima	73
3.3.4. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	73
<b>4. REZULTATI</b>	<b>74</b>

---

---

<b>4.1. Izolacija i pročišćavanje poliketidnih spojeva</b>	<b>74</b>
<b>4.2. Određivanje struktura poliketidnih spojeva</b>	<b>82</b>
4.2.1. Strukturna karakterizacija spojeva C1, C2 i C3	82
4.2.2. Strukturna karakterizacija spoja C4	87
4.2.3. Strukturna karakterizacija spoja C5	89
4.2.4. Strukturna karakterizacija spoja C6	92
<b>4.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti</b>	<b>94</b>
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>96</b>
<b>5.1. Biosinteza i pročišćavanje spojeva</b>	<b>97</b>
5.1.1. Biosinteza spojeva C1, C2 i C3	101
5.1.2. Antroni iz drugih PKS sustava	105
5.1.3. Farmakološka svojstva antrona	106
5.1.4. Biosinteza spojeva C4, C5 i C6	107
<b>5.2. Antimikrobna testiranja</b>	<b>112</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>115</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>117</b>
<b>8. PRILOZI</b>	<b>124</b>
<b>8.1. Prilozi određivanju strukture spoja C1</b>	<b>124</b>
<b>8.2. Prilozi određivanju strukture spoja C2</b>	<b>129</b>
<b>8.3. Prilozi određivanju strukture spoja C3</b>	<b>131</b>
<b>8.4. Prilozi određivanju strukture spoja C4</b>	<b>134</b>
<b>8.5. Prilozi određivanju strukture spoja C5</b>	<b>138</b>
<b>8.6. Prilozi određivanju strukture spoja C6</b>	<b>142</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>144</b>

---

## POPIS KRATICA

ACP	protein nosač acilne skupine (engl. Acyl Carrier Protein)
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku
ARO	aromataza
AT	aciltransferaza
ATCC	američka zbirka mikroorganizama (engl. American Type Culture Collection)
C8	oktilsilicijev dioksid
C18	oktadecilsilicijev dioksid
CDA	antibiotik ovisan o kalciju (engl. calcium dependent antibiotic)
CFU	broj jedinki koje formiraju mikrobnu koloniju (engl. Colony Forming Unit)
CI	kemijska ionizacija (engl. Chemical Ionization)
CLF	faktor koji određuje duljinu ugljikovog lanca (engl. Chain Length Factor)
CoA	koenzim A
COSY	spektroskopija korelacija kemijskih pomaka (engl. COrelated SpectroscopY)
CSL	kukuruzna mlaćenica (engl. Corn Steep Liquor)
CTC	klortetraciklin
CYC	ciklaza
CW	metoda kontinuiranog vala (engl. Continuous Wave)
DBE	ekvivalent dvostruke veze (engl. Double-Bond Equivalents)
DEBS	sintaza deoksieritronolida B
DH	dehidrataza
DMCTC	6-demetilklortetraciklin
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DOTC	doksiciklin
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EI	ionizacija elektronima (engl. Electron Ionization ili Electron Impact)
ER	enoil reduktaza
<i>ery</i>	geni za biosintezu eritromicina
ESI	ionizacija elektroraspršenjem (engl. Electrospray Ionization)
FAS	sintetaza masnih kiselina
GC-MS	plinska kromatografija - spektrometrija masa
GPC	gel permeacijska kromatografija (engl. Gel-Permeation Chromatography)

---

HMBC	engl. Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMQC	engl. Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IHD	indeks manjka vodika (engl. Index of Hydrogen Deficiency)
ISP	međunarodni projekt taksonomije streptomicata (engl. International Streptomyces Project)
IR	infracrvena spektroskopija
IUPAC	međunarodna unija za čistu i primjenjenu kemiju (eng. The International Union of Pure and Applied Chemistry)
KR	ketoreduktaza
KS	ketosintaza
LC-MS	tekućinska kromatografija - spektrometrija masa
LPLC	tekućinska kromatografija pri niskom tlaku (engl. Low Pressure Liquid column Chromatography)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MPLC	tekućinska kromatografija pri srednjem tlaku (engl. Medium Pressure Liquid column Chromatography)
MS	spektrometrija masa
MSA	metilsalicilna kiselina
NCBI	američki Nacionalni Centar za Biotehnološke Informacije
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
NOE	nuklearni Overhauserov efekt
NPLC	tekućinska kromatografija normalne faze (engl. Normal Phase Liquid Chromatography)
NRPS	sintetaza neribosomski sintetiziranih peptida
ORF	otvoreni okvir čitanja (engl. Open Reading Frame)
OTC	oksitetraciklin
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction)
PKS	sintaza poliketida
ppm	dijelovi na milijun (engl. parts per million)
RP-HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sustavu obrnutih faza
RPLC	tekućinska kromatografija u sustavu obrnutih faza (engl. Reversed Phase Liquid Chromatography)
rRNA	ribosomska RNA

---

---

SEC	kromatografija isključenjem prema veličini (engl. Size-Exclusion Chromatography)
TC	tetraciklin
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. Thin Layer Chromatography)
UV	ultraljubičasto; UV detekcija
UV/VIS	ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija

## 1. UVOD

Mikroorganizmi koji sintetiziraju najveći broj prirodnih spojeva, od kojih su mnogi biološki aktivni, pripadaju bakterijskim vrstama roda *Streptomyces* i vrstama srodnih rodova (Demain, 1999.). Ilustracije radi, od 25.000 - 30.000 opisanih antibiotički aktivnih supstancija, streptomicete sintetiziraju gotovo 9.000. Štoviše, vrste roda *Streptomyces* proizvode 75 % od svih klinički važnih antibiotika (Bérdy, 2005.). Pored otkrića biološki aktivnih prirodnih spojeva u mikroorganizama prisutnih u različitim staništima, dobivanje boljih antibiotički aktivnih kemijskih supstancija može se postići i kemijskom modifikacijom prirodnih spojeva (Drawz i Bonomo, 2010.). Sada se postavlja temeljno pitanje da li je barem neke od polu-sintetskih antibiotika moguće proizvesti biosintezom uz pomoć sojeva mikroorganizama u kojih su genetičkim inženjerstvom modificirane genske nakupine koje sadržavaju genetičku uputu za njihovu biosintezu. Zbog toga je temeljni cilj ovoga rada bio genetička modifikacija *otc* genske nakupine, čiji produkti sudjeluju u biosintezi poliketidnog antibiotika oksitetraciklina, te konstrukcija soja bakterijske vrste *S. rimosus* koji bi, biosintetskim putem, mogao sintetizirati polusintetski antibiotik doksiciklin.

Streptomicete imaju mnoga neobična svojstva zanimljiva za temeljna i primijenjena istraživanja. Posebno je zanimljivo svojstvo streptomiceta njihova sposobnost sinteze velikog broja prirodnih spojeva. Od sredine osamdesetih godina pa do danas provode se genetička istraživanja u uvjetima *in silico*. Ta su istraživanja dovela do sekvenciranja DNA cjelovitog genoma soja *S. coelicolor* A3(2), modelnog organizma među streptomicetama (Hopwood, 2006.). Razvoj funkcionalne genomike potaknuo je velika očekivanja na području otkrića novih antibiotički aktivnih supstancija. Jedan od ključnih aspekata genomike jest iskorištavanje biosintetskog potencijala skrivenog u mikrobnim genomima uz pomoć pretraživanja DNA sekvenciranih mikrobnih genoma (Wecke i Mascher, 2011.). Do sredine 2012. godine u bazama podataka pohranjeno je na stotine sekvenciranih DNA genoma bakterijskih vrsta roda *Streptomyces* i vrsta srodnih rodova. Već je i prije sekvenciranja genoma streptomiceta bilo jasno da svaka pojedina vrsta streptomiceta može sintetizirati više od jednog prirodnog spoja (Hopwood, 2006.). Sekvenciranje DNA genoma streptomiceta, međutim, pokazalo je da svaka vrsta roda *Streptomyces* sintetizira 20 - 30 genskih nakupina čiji produkti sudjeluju u biosintezi prirodnih spojeva. Te su genske nakupine klonirane, sekvencirane i detaljno analizirane pomoću bioinformatičkih alata (Nett *i sur.*, 2009.). Ta je

---

karakterizacija omogućila da se s tim genskim nakupinama manipulira pomoću tehnologije genetičkog inženjerstva.

Bakterijska se vrsta *S. rimosus* po svojoj biologiji ni po čemu ne razlikuje od ostalih streptomiceta. Molekularno genetička i genomna istraživanja bakterijske vrste *S. rimosus* dovela su do konstrukcije genetičke i fizičke mape njezina kromosoma. Sekvenciranje je DNA cjelovitog kromosoma ove bakterijske vrste u završnoj fazi istraživanja. Na genetičkoj je i fizičkoj mapi kromosoma bakterijske vrste *S. rimosus* određen broj *otc* gena i položaj *otc* genske nakupine čiji produkti sudjeluju u biosintezi poliketidnog antibiotika oksitetraciklina. Zbog toga su genetička i fizička mapa kromosoma te bakterijske vrste pripomogle tijekom kloniranja, sekvenciranja i detaljne karakterizacije *otc* genske nakupine (Petković *i sur.*, 2006.). Rezultati tih istraživanja nedvojbeno su pokazali da *otc* genska nakupina sadržava 23 pojedinačnih *otc* gena čiji produkti sudjeluju u sintezi poliketidne okosnice i poslije-poliketidnim modifikacijama antibiotika. Godine 1999. objavljena je klonirana i restrikcijски mapirana cjelovita *otc* genska nakupina soja R6 vrste *S. rimosus*, proizvođača antibiotika oksitetraciklina tvrtke PLIVA d.d. (Hranueli *i sur.*, 1999.). Ti su podaci omogućili inaktivaciju pojedinačnih *otc* gena insercijom selektivnih genetičkih biljega unutar njihovih kromosomskih struktura, ili preciznom delecijom gena iz kromosoma pomoću tehnologije genetičkog inženjerstva. U laboratoriju Istraživačkog instituta PLIVA d.d. inaktivirana su četiri *otc* biosintetska gena, od kojih jedan sadržava genetičku uputu za C-6 hidroksilazu (gen *otcC*). To je dovelo do konstrukcije četiriju sojeva od kojih je soj ZGL1 (s inaktiviranim genom *otcC*) detaljno okarakteriziran. Enzim OtcC katalizira hidroksilaciju antraciklinske strukture na položaju C-6 nakon što je sintetizirana poliketidna okosnica. Njegova bi inaktivacija trebala dovesti do sinteze polu-sintetskog antibiotika doksiciklina (Perić-Concha *i sur.*, 2005.).

Svrha ovoga rada bila je određivanje kemijske strukture aromatskog poliketidnog prirodnoga spoja, ili spojeva, što ih sintetizira soj ZGL1 bakterijske vrste *S. rimosus*. Izolacija novog(ih) poliketida će biti provedena pomoću ekstrakcije organskim otapalima i kromatografijom na koloni. Pročišćavanje novog(ih) poliketida će biti obavljeno tankoslojnom kromatografijom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, dok će određivanje strukture(a) novog(ih) poliketida biti izvršeno primjenom jedno- i dvodimenzijske spektroskopije pomoću nuklearne magnetne rezonancije i spektrometrije masa. Naime, potrebo je imati na umu da se aromatski poliketidi sintetiziraju pomoću multienzimskih kompleksa poliketid sintaza tipa II. Izdvajanjem jednog enzima iz kompleksa,

inaktivacijom ili delecijom njegovoga gena, može dovesti do sinteze aromatskog poliketida željenih svojstava (npr. doksiciklina). Moguće je, međutim, da izdvajanje jednog enzima iz multienzimskog kompleksa destabilizira cijeli kompleks pri čemu će se sintetizirati potpuno novi nepoznati derivati poliketida (Castaldo *i sur.*, 2008.).



## 2. OPĆI DIO

Mikroorganizmi i biljke sintetiziraju veliki broj metabolita koji se proizvoljno mogu podijeliti na takozvane primarne i sekundarne metabolite. Primarni su metaboliti prijeko potrebni za rast i razmnožavanje stanica, dok su sekundarni metaboliti značajni za njihovo preživljavanje u prirodnim staništima. Ti su sekundarni metaboliti, u stvari, prirodni spojevi njihovih stanica (Demain, 1999.; Kutchan, 2001.).

Obzirom na strukturalni potencijal biološke raznolikosti, mikroorganizmi koji sintetiziraju najveći broj prirodnih spojeva, od kojih su mnogi biološki aktivni, pripadaju bakterijskim vrstama roda *Streptomyces* i vrstama srodnih rodova. Ilustracije radi, od otprilike 25.000 do 30.000 antibiotski aktivnih supstancija, izoliranih od bakterija do sisavaca, streptomicete sintetiziraju gotovo 9.000. Štoviše, vrste roda *Streptomyces* proizvode 75% od svih klinički važnih antibiotika (Bérdy, 2005.). Nedavno su Watve i suradnici (Watve i sur., 2001.) pokušali matematički procijeniti broj antibiotika koje ove bakterije mogu sintetizirati. Njihov je model pokazao da se taj broj kreće oko 100.000, od kojih je manje od 10% do sada otkriveno. Pored otkrića biološki aktivnih prirodnih spojeva u mikroorganizama prisutnih u različitim staništima, dobivanje boljih antibiotski aktivnih kemijskih supstancija može se postići i kemijskom modifikacijom prirodnih spojeva. Najpoznatiji su primjer takozvanih polu-sintetskih antibiotika polu-sintetski penicilini i cefalosporini prve, druge, pa čak i treće generacije povezani s inhibitorima enzima  $\beta$ -laktamaza (Drawz i Bonomo, 2010.).

Sada se postavlja temeljno pitanje da li je barem neke od polu-sintetskih antibiotika moguće proizvesti biosintezom uz pomoć sojeva mikroorganizama u kojih su genetičkim inženjersvom modificirane genske nakupine koje sadržavaju genetičku uputu za njihovu biosintezu.

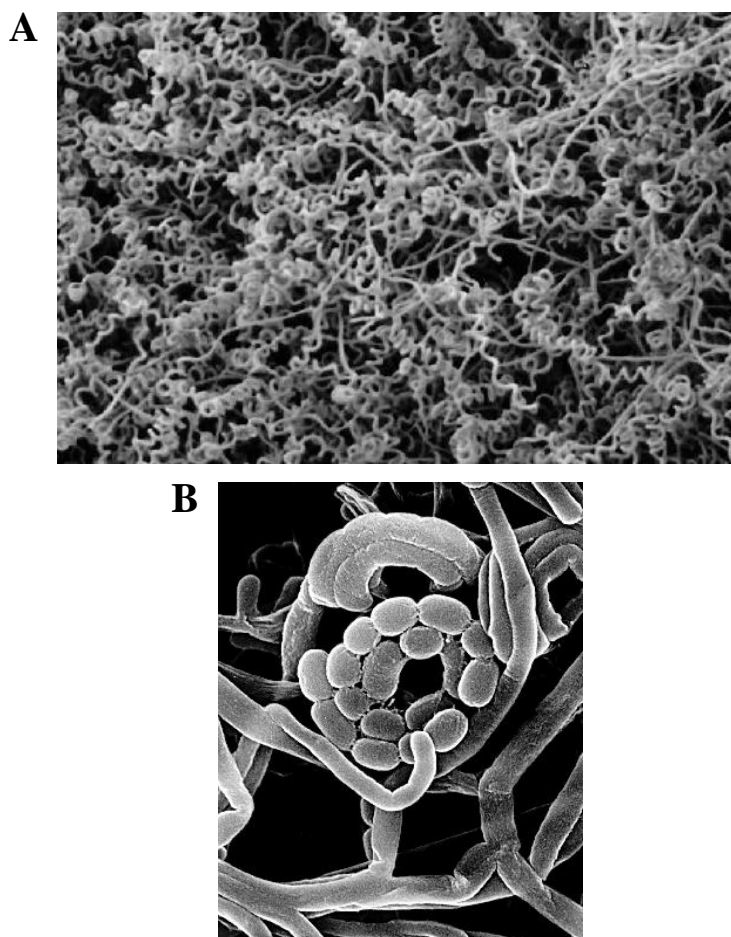
### 2.1. Mikroorganizmi proizvođači prirodnih spojeva

Među mikroorganizmima najznačajniji proizvođači prirodnih spojeva su prokariotski i eukariotski mikroorganizmi, to jest jednostanične bakterije (poput npr. vrste roda *Bacillus*, koje sintetiziraju peptidne antibiotike kao što je to antibiotik bacitracin), bakterije koje rastu u obliku micelija (poput npr. vrste roda *Streptomyces*, koje sintetiziraju poliketidne antibiotike kao što je to antibiotik eritromicin) i nitaste plijesni (poput npr. vrste roda *Penicillium*, koje

sintetiziraju peptidne antibiotike kao što je to antibiotik penicilin). Kao što je već rečeno, bakterijske vrste roda *Streptomyces* i vrste srodnih rodova sintetiziraju daleko najveći broj klinički važnih prirodnih spojeva (Bérdy, 2005.).

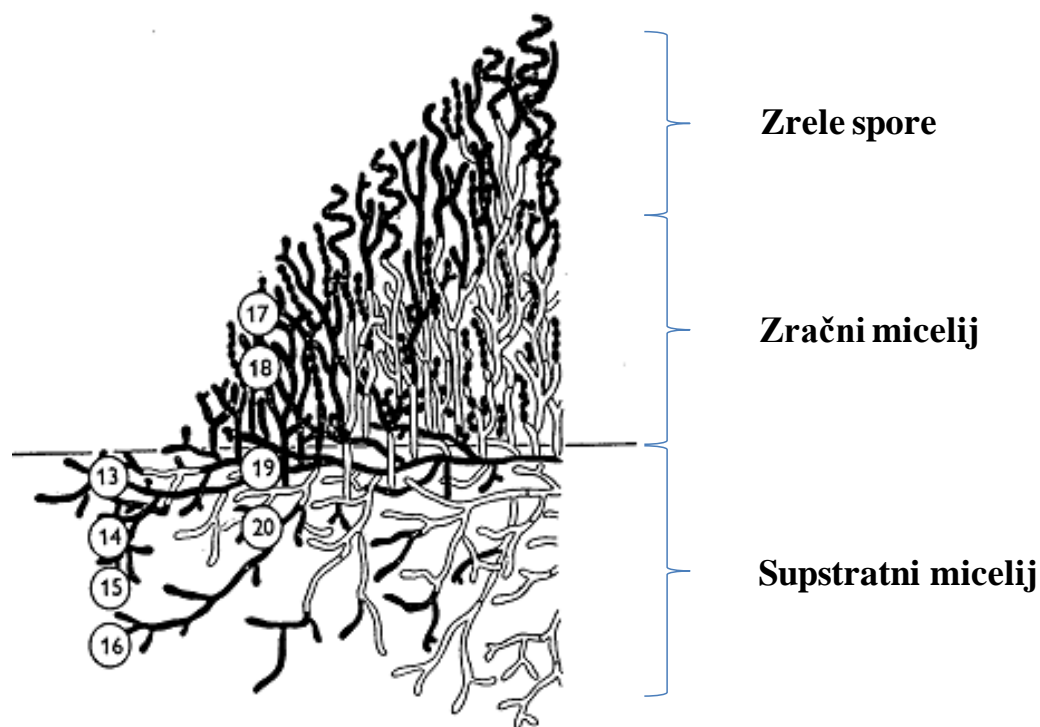
### 2.1.1. Biologija bakterija roda *Streptomyces*

Vrste roda *Streptomyces* i vrste srodnih rodova imaju mnoga neobična svojstva zanimljiva za temeljna i primijenjena istraživanja. Streptomicete su Gram-pozitivne bakterije, micelijskog oblika rasta (slika 1A) koji - nakon složenog procesa diferencijacije - kulminira stvaranjem spora (slika 1B). Posebno su zanimljiva dva svojstva streptomiceta: jedno je neobična topologija njihovih linearnih replikona, a drugo njihova sposobnost sinteze velikog broja prirodnih spojeva.



Slika 1. Elektronske mikrografije koje prikazuju dva stadija u razvoju mikrobne kolonije bakterijske vrste *Streptomyces lividans*. (A) mladi vegetativni micelij s ruba mikrobne kolonije, i (B) lanac zrelih spora (preinačeno prema Hopwood, 2006.).

Životni ciklus streptomiceta na krutom hranjivom mediju započinje germinacijom spora u razgranati, septirani supstratni micelij. Iz postranih ogranaka supstratnih hifa izrasta zračni micelij, koji sadržava uspravne, zavojite ili razgranate hife sa zrelim sporama (slika 2). Nekoliko desetaka do sada opisanih gena usklađeno sudjeluje u ovim morfološkim promjenama. Streptomicete igraju važnu ulogu u razgradnji organskih tvari tla jer u okolinu izlučuju brojne hidrolitičke enzime. Ti im enzimi pružaju mogućnost da, kao izvore ugljika, za rast iskoriste polisaharide (npr. celulozu ili hemicelulozu), proteine i masti, dok neki sojevi mogu koristiti lignin, tanin pa čak i gumu. Streptomicete zemlji daju karakterističan miris po geosminu. Bakterijske vrste roda *Streptomyces* i vrste srodnih rodova sintetiziraju i brojne pigmente što daje karakterističan izgled zrelih kolonijama (vidi citate u: Chater, 1993.).



Slika 2. Grafički prikaz rasta mikrobne kolonije vrsta roda *Streptomyces* na krutom hranjivom mediju.

Taksonomski položaj streptomiceta dugo vremena nije bio jednoznačno određen. Mikolozi su ih zbog micelijskog oblika rasta smatrali nitastim plijesnima a bakteriolozi bakterijama. Danas su zbog svoje tipične prokariotske strukture prihvaćene kao bakterije. Za klasifikaciju streptomiceta najčešće se upotrebljava Bergeyev sustav koji u obzir uzima kriterije Međunarodnog projekta za klasifikaciju streptomiceta, ISP (engl. International

*Streptomyces* Project). Kriteriji za klasifikaciju su: morfologija (boja i oblik micelija i spora), fiziologija (sposobnost korištenja različitih izvora dušika i ugljika, proizvodnja primarnih i sekundarnih metabolita), i genetika (sekvencije rRNA) (vidi citate u: Chater, 1993.).

Kao što je već rečeno, streptomicete imaju neobičnu topologiju linearnih replikona, to jest kromosoma i plazmida. Naime, sve se do nedavno vjerovalo da je struktura kromosoma i plazmida u svih bakterija kružna, kovalentno povezana molekula DNA. Istraživanja su u *in vitro* i *in silico* uvjetima, međutim, pokazala da su kromosomi, i većina plazmida, streptomiceta linearne strukture. Pored toga, bakterijske vrste roda *Streptomyces* i vrste srodnih rodova sposobne su za sintezu velikog broja prirodnih spojeva od kojih su mnogi biološki aktivni (vidi citate u: Hopwood, 2006.). Ta su dva svojstva streptomiceta detaljnije opisana u slijedećim poglavljima.

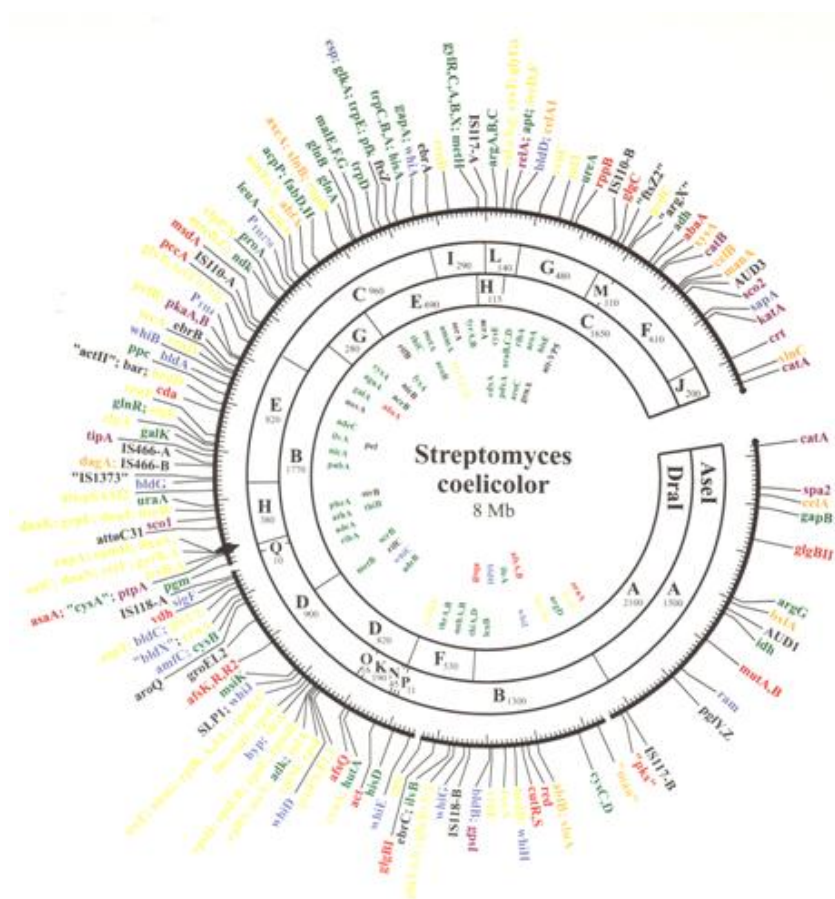
Bakterijska se vrsta *S. rimosus* po svojoj biologiji ni po čemu ne razlikuje od ostalih vrsta roda *Streptomyces* i vrste srodnih rodova. Jedina je značajna razlika u prirodi prirodnih spojeva koje ta vrsta može sintetizirati (vidi citate u: Petković *i sur.*, 2006.).

### **2.1.2. Molekularna genetika bakterija roda *Streptomyces***

Istraživanja na području genetike streptomiceta mogu se proizvoljno podijeliti na tri razdoblja. U razdoblju od 1955. do 1980. godine provodila su se istraživanja u *in vivo* uvjetima na području rekombinacije procesima konjugacije, fuzije protoplasta i transformacije, to jest transfekcije, protoplasta streptomiceta plazmidnom, to jest virusnom, DNA. Ta su istraživanja dovela do konstrukcija genetičkih mapa kromosoma streptomiceta (slika 3 - vanjski krug). Posljednja skupina ovih istraživanja označila je početak primjene tehnologije genetičkog inženjerstva u vrsta roda *Streptomyces*.

Razdoblje od 1975. do 1995. godine obilježeno je istraživanjima u *in vitro* uvjetima, to jest kloniranjem prvih gena streptomiceta, kloniranjem prve cjelovite genske nakupine za biosintezu antibiotika, razvojem procesa konjugacije između stanica bakterije *Escherichia coli* - koja pruža mogućnost razmjerno lake manipulacije kloniranom DNA - i stanica vrsta roda *Streptomyces*. Ta su istraživanja dovela do konstrukcija fizičkih mapa kromosoma (Slika 3 - unutarnji krug), kao i do utvrđivanjem linearne strukture genoma streptomiceta. Kombinirana genetička i fizička mapa kromosoma modelnog organizma među streptomicetama, vrste *S. coelicolor* - to jest njezina soja A3(2), prikazana je na slici 3.

U razdoblju od 1985. do 2000. godine pa do danas provode se istraživanja u uvjetima *in silico*, sekvenciranjem DNA malog plazmida kružne strukture, sekvenciranjem DNA genskih nakupina i kombinatornom biosintezom poliketida i neribosomalnih peptida, te sekvenciranjem DNA cjelovitog genoma soja *S. coelicolor* A3(2). Mapa sekvencije DNA kromosoma soja *S. coelicolor* A3(2), prikazana je na slici 4 (vidi citate u: Hopwood, 2006.).

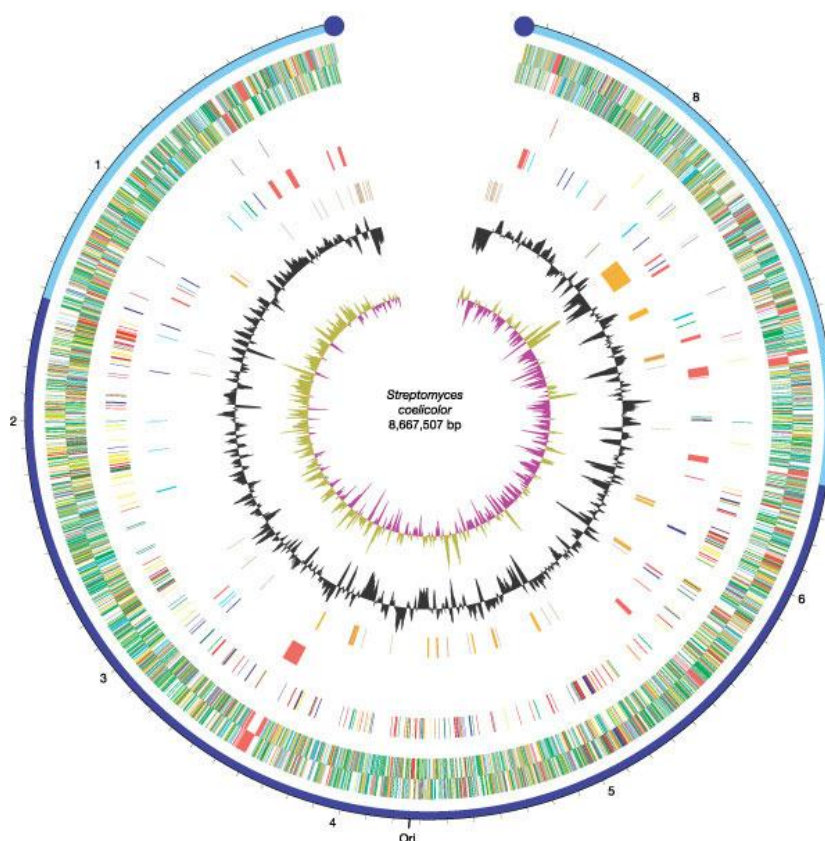


Slika 3. Grafički prikaz kombinirane genetičke i fizičke mape kromosoma bakterije *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Redenbach *i sur.*, 1996.).

### 2.1.3. Genomika bakterija roda *Streptomyces*

Prvi su počeci razvoja funkcionalne genomike potaknuli velika očekivanja na području otkrića novih antibiotički aktivnih supstancija. Tri su ključna aspekta genomike uvijek povezana s mogućim razvojem novih antibiotika: (i) prepoznavanje novih bioloških meta na koje bi antibiotici mogli djelovati uz pomoć komparativne genomike, (ii) iskorištavanje biosintetskog potencijala skrivenog u mikrobnim genomima uz pomoć pretraživanja DNA

sekvenciranih mikrobnih genoma, te (iii) istraživanja djelotvornosti antibiotika temeljenih na profilima ekspresije djelotvornosti antibiotika na cjelovite mikrobnje genome (Wecke i Mascher, 2011.). U ovoj će disertaciji pažnja biti posvećena isključivo iskorištavanju biosintetskog potencijala skrivenog u mikrobnim genomima uz pomoć pretraživanja DNA sekvenciranih mikrobnih genoma.



Slika 4. Grafički prikaz mape sekvencije DNA kromosoma bakterijske vrste *Streptomyces coelicolor* soj A3(2) (detalji su navedeni u opisu Slike 1 u radu Bentley *i sur.*, 2002.).

### 2.1.3.1. Genske nakupine za biosintezu prirodnih spojeva

Do sredine 2012. godine u bazi je podataka Genomi (engl. Genomes), Američkog Nacionalnog Centra za Biotehnoške Informacije (NCBI), pohranjeno dvadesetak sekvenciranih DNA genoma bakterijskih vrsta roda *Streptomyces* i vrsta srodnih rodova (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>; prosinac 2011.). Određeni je broj sekvenciranih genoma streptomiceta pohranjen i u drugim bazama podataka kao što je to, na primjer, baza podataka Genomi instituta Broad iz Cambridgea, Sjedinjene Američke Države ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/streptomyces\\_group/GenomesIndex.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/streptomyces_group/GenomesIndex.html)).

Već je i prije sekvenciranja DNA genoma streptomiceta bilo jasno da svaka pojedina vrsta streptomiceta može sintetizirati više od jednog prirodnog spoja. Tako se, na primjer, znalo da bakterijski soj *S. coelicolor* A3(2) sintetizira najmanje 4 antibiotski aktivne supstancije: aktinorodin, undecilprodigosin, metilenomicin i lipopeptidni antibiotik CDA (vidi citate u: Hopwood, 2006.).

Štoviše, sekvenciranje DNA genoma bakterijske vrste *S. avermitilis* (proizvođača antiparazitika avermektina) pokazalo je da svaka vrsta roda *Streptomyces* sintetizira 20 do 30 genskih nakupina čiji produkti sudjeluju u biosintezi prirodnih sojeva. Sekvenciranje DNA bakterijske vrste *S. avermitilis* pokazalo je da, pored avermektina, oleandomicina i još 2 poznata poliketida (genske nakupine *ave*, *olm*, *pte* i *rpp*), ta vrsta sintetizira još 16 poliketidnih i peptidnih genskih nakupina čiji produkti biosinteze nisu poznati (slika 5) (Ikeda *i sur.*, 2003.). Identični su rezultati potvrđeni i u drugih bakterijskih vrsta roda *Streptomyces* i vrsta srodnih rodova (Nett *i sur.*, 2009.). Sve su te genske nakupine klonirane, sekvencirane i detaljno analizirane pomoću bioinformatičkih alata. Tako je klonirana, sekvencirana i detaljno okarakterizirana i *otc* genska nakupina čiji produkti sudjeluju u biosintezi poliketidnog antibiotika oksitetraciklina, kojeg sintetizira bakterijska vrsta *S. rimosus* (vidi poglavlje 2.1.4.1. i citate u: Petković *i sur.*, 2006.). Ta je karakterizacija omogućila da se s tim genskim nakupinama manipulira pomoću tehnologije genetičkog inženjerstva.

#### **2.1.4. Molekularna genetika i genomika vrste *Streptomyces rimosus***

Većina rezultata istraživanja na području molekularne genetike i genomike vrste *S. rimosus* potječe iz laboratorija: Instituta za genetiku i selekciju industrijskih mikroorganizama i Instituta za antibiotike, Moskva, Rusija; Pfizerova Istraživačkog instituta i Sveučilišta u Glasgou, Sandwich i Glasgow, Velika Britanija; te iz Istraživačkog instituta PLIVA, Sveučilišta u Zagrebu i Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska. Rezultati su postignuti upotrebom triju sojeva vrste *S. rimosus*: LS-T118 (u Rusiji), M4018 i ATCC10970 (u Velikoj Britaniji) i R6 i R7 (u Hrvatskoj) (vidi citate u: Petković *i sur.*, 2006.).

Ta su molekularno genetička istraživanja dovela do konstrukcije genetičke (slika 6) (Friend i Hopwood, 1971.; Pigac i Alačević, 1979.) i fizičke mape (slika 7); (Pandza *i sur.*, 1997.) kromosoma bakterijskih sojeva *S. rimosus* R6, R7 i M4018. Nasuprot tome,



sekvenciranje DNA cjelovitog kromosoma bakterijskog soja *S. rimosus* M4018 je u završnoj fazi istraživanja (Iain S. Hunter, usmeno priopćenje).

Gene	Product	Start	End	Size (bp)	Count	
13	polyketide	<a href="#">pkx11</a>	113361	118594	2	5234
14	polyketide	<a href="#">pte</a>	487415	567017	13	79603
15	polyketide	<a href="#">ave</a>	1132045	1212960	18	80916
16	polyketide	<a href="#">pkx2</a>	1895794	1913284	4	17491
17	polyketide	<a href="#">pkx3</a>	2773878	2784841	7	10964
18	polyketide	<a href="#">pkx5</a>	2877941	2894413	4	16473
19	polyketide	<a href="#">pkx9</a>	2897395	2913535	15	16141
20	polyketide	<a href="#">olm</a>	3534525	3634592	12	100068
21	polyketide	<a href="#">pkx8</a>	4527901	4540450	14	12550
22	polyketide	<a href="#">rpp</a>	8490207	8492484	2	2278
23	polyketide	<a href="#">pkx4</a>	8553602	8561604	3	8003
24	polyketide	<a href="#">pkx1</a>	8776963	8789766	4	12804
Subtotal					98	362525
25	peptide	<a href="#">nrps6</a>	754376	763274	7	8899
26	peptide	<a href="#">nrps7</a>	991484	1042269	32	50786
27	peptide	<a href="#">nrps8</a>	1549424	1554224	3	4801
28	peptide	<a href="#">nrps3</a>	3930088	3938730	6	8643
29	peptide	<a href="#">nrps1</a>	3974805	3996189	7	21385
30	peptide	<a href="#">nrps2</a>	4494250	4526990	16	32741
31	peptide	<a href="#">nrps5</a>	7930737	7937201	4	6465
32	peptide	<a href="#">nrps4</a>	8522760	8530697	5	7938
Subtotal					80	141658

Slika 5. Broj poliketidnih (PKS) i peptidnih (NRPS) genskih nakupina bakterijske vrste *Streptomyces avermitilis* čija je DNA sekvencirana (Ikeda *i sur.*, 2003.).

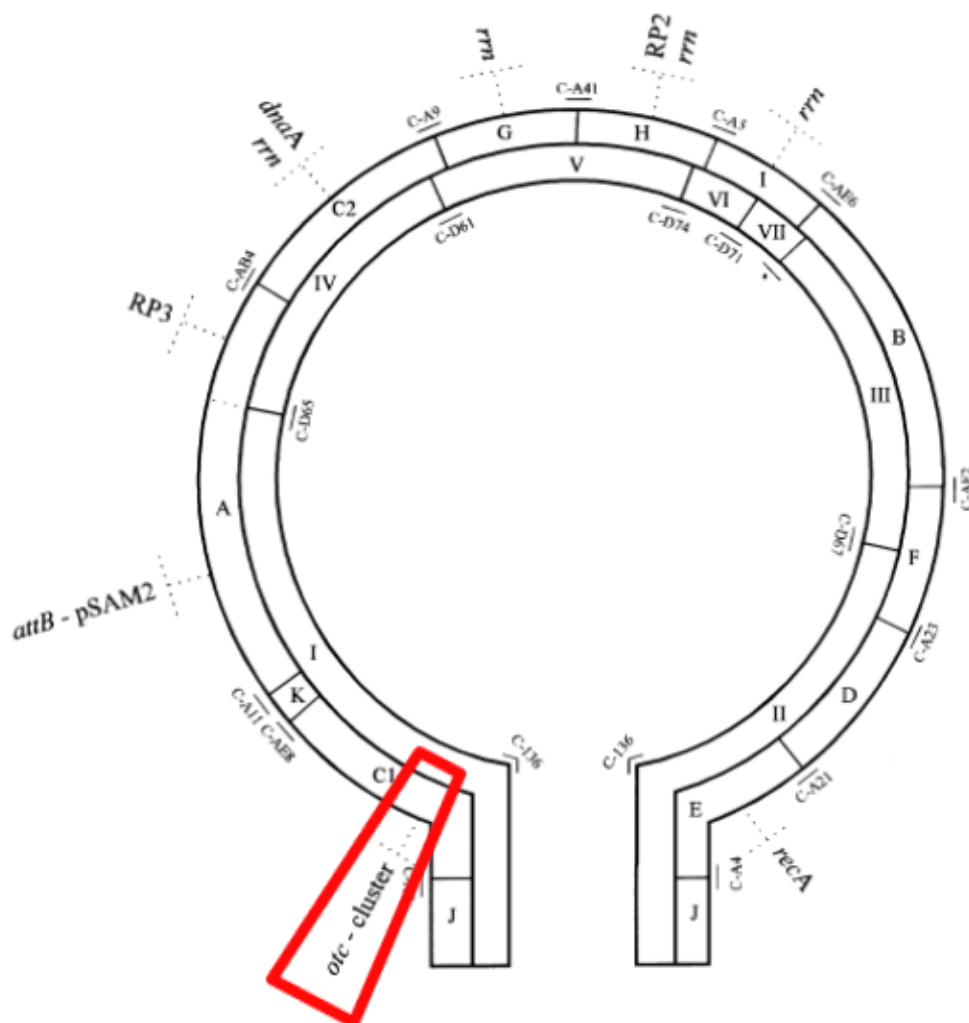
Važno je napomenuti da je u genetičkoj i fizičkoj mapi kromosoma bakterijske vrste *S. rimosus* određen broj *otc* gena i položaj *otc* genske nakupine čiji produkti sudjeluju u biosintezi poliketidnog antibiotika oksitetraciklina. Zbog toga su genetička i fizička mapa kromosoma bakterijske vrste *S. rimosus* i pripomogle tijekom kloniranja, sekvenciranja i detaljne karakterizacije *otc* genske nakupine (vidi citate u: Petković *i sur.*, 2006.).

#### 2.1.4.1. Genska nakupina za biosintezu oksitetraciklina

Genske nakupine, čiji produkti sudjeluju u biosintezi poliketidnog antibiotika oksitetraciklina, klonirane su i mapirane pomoću restrikcijskih endonukleaza, te detaljno analizirane neovisno u laboratorijima istraživačkih instituta tvrtke Pfizer Ltd. (slika 8) (Binnie *i sur.*, 1989.) i tvrtke PLIVA d.d. (slika 9A i B) (Hranueli *i sur.*, 1999.). Rezultati tih



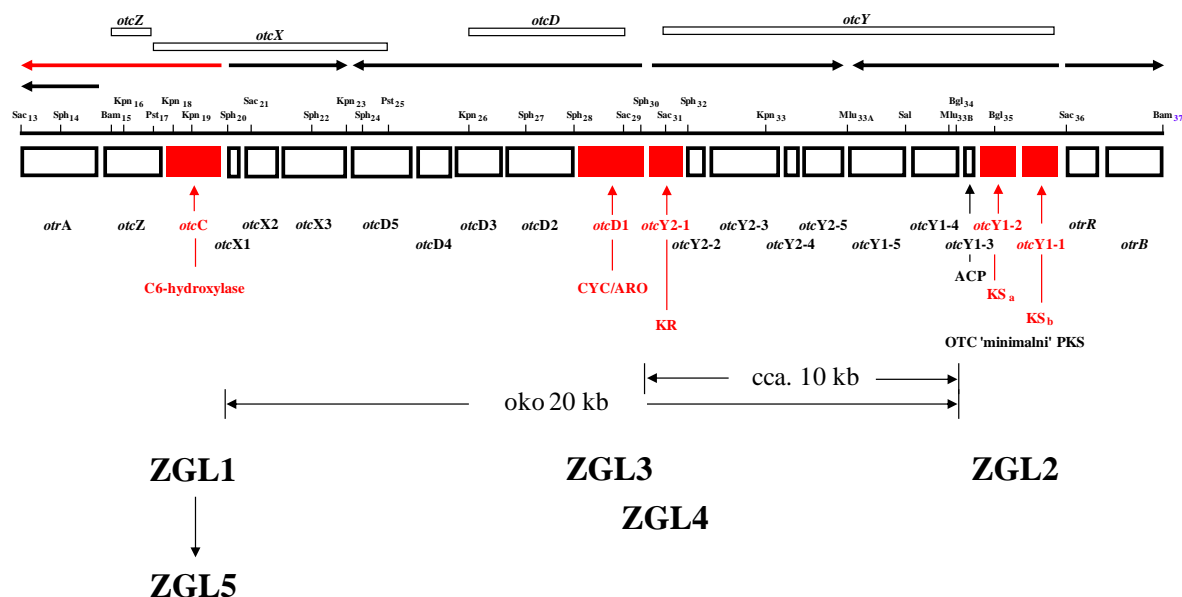




Slika 7. Fizička mapa kromosoma bakterijskog soja *Streptomyces rimosus* R6 dobivena analizom s restrikcijom endonukleazama *AseI* (vanjski krug) i *DraI* (unutarnji krug). Položaj *otc* genske nakupine obilježen je romбом crvene boje (detalji su navedeni u opisu Slike 4 u radu Pandza *i sur.*, 1997.).

Godine 1999. objavljena je klonirana i restrikcijom mapirana cjelovita *otc* genska nakupina soja R6 vrste *S. rimosus*, proizvođača antibiotika oksitetraciklin tvrtke PLIVA d.d. (slika 9A i B) (Hranueli *i sur.*, 1999.). Ta se restrikcijom mapa pokazala identičnom restrikcijom mapi *otc* genske nakupine soja M4018 vrste *S. rimosus*, koja je, također, klonirana i restrikcijom mapirana, ali i sekvencirana (Hunter i Hill, 1997.). Ti su podaci omogućili inaktivaciju pojedinačnih *otc* gena insercijom selektivnih genetičkih biljega unutar njihovih kromosomskih struktura, ili preciznom delecijom gena, iz kromosoma pomoću tehnologije genetičkog inženjerstva. U laboratoriju Istraživačkog instituta PLIVA d.d. inaktivirana su četiri *otc* biosintetska gena što sadržavaju genetičku uputu za C-6 hidroksilazu

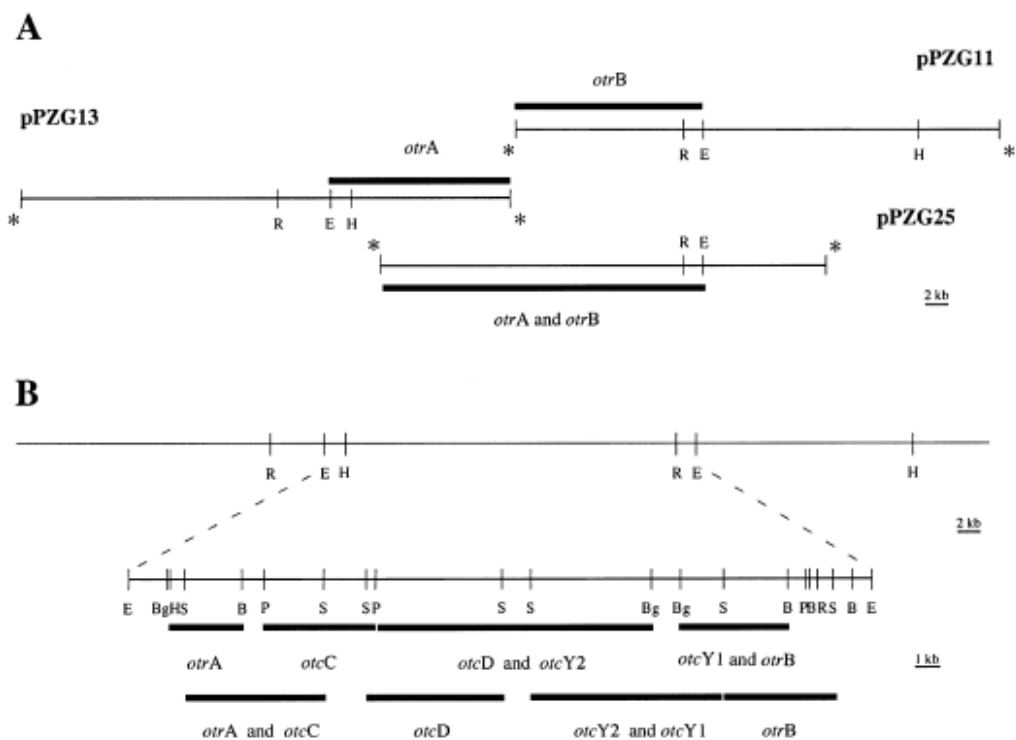
(gen *otcC*), ketosintazu  $\alpha$  i  $\beta$  (geni *otcY1-1* i *otcY1-2*), ciklazu/aromatazu (gen *otcD1*) i ketoreduktazu (gen *otcY2-1*). To je dovelo do konstrukcije četiriju sojeva ZGL1, ZGL2, ZGL3 i ZGL4 (slika 8). Genetički modificirani soj ZGL1 je detaljno okarakteriziran (Perić-Concha *i sur.*, 2005.).



Slika 8. Fizička i restrikcijska mapa *otc* genske nakupine čiji produkti sudjeluju u biosintezi poliketidnog antibiotika oksitetraciklina. Na mapama su, crvenom bojom, istaknuti geni *otcY1-1*, *otcY1-2*, *otcY2-1*, *otcD1* i *otcC*, koji sadržavaju genetičku uputu za enzime ketosintaza  $\alpha$  i  $\beta$  (dio *otc* 'minimalne' poliketid sintaze), ketoreduktaza, ciklaza/aromataza i C-6 specifična hidroksilaza (anhidrotetraciklin oksigenaza). Ti su geni inaktivirani insercijama genetičkih biljega ili delecijama pomoću tehnologije genetičkog inženjerstva (preinačeno prema Perić-Concha *i sur.*, 2005. i Petković *i sur.*, 2006.).

Gen *otcC* nalazi se na početku takozvane višestruke glasničke molekule RNA (engl. poly-messenger) ispred gena *otcZ* i gena *otrA* (slika 8). Gen *otcC* inaktiviran je ugradnjom genetičkog biljega, to jest gena *gmr* koji sadržava genetičku uputu za otpornost prema antibiotiku gentamicinu, unutar njegove strukture. Prema tome, njegovom se inaktivacijom transkripcija tih dvaju gena može izbaciti izvan ispravnog okvira čitanja. Da bi se to izbjeglo, te da bi se biološki neaktivan produkt gena *otcC* vratio na isto mjesto u multienzimskom kompleksu PKS, klonirani gen *otcC* inaktiviran je takozvanom mjesno-specifičnom mutagenozom (engl. site-directed mutagenesis). Nakon toga, zamijenjen je gen *otcC*,

inaktiviran ugradnjom genetičkog biljega, s genom *otcC* inaktiviranim mjesno-specifičnom mutagenezom. Mjesno-specifična mutageneza obavljena je pripremom dvaju produkata lančane reakcije polimerazom – takozvanih produkata PCR (engl Polymerase Chain Reaction), i njihovim spajanjem u jednu molekulu DNA. Pri tome su tri gvanina zamijenjeni s tri citozina, da bi se u enzimskom aktivnom mjestu zamijenila tri glicina s tri alanina (slika 10). Na taj je način konstruiran genetički modificiran soj ZGL5 bakterijske vrste *S. rimosus* (slika 8) (Perić-Concha *i sur.*, 2005.).



Slika 9. Restrikcijske mape plazmidnih vektora pPZG11, pPZG13 i pPZG25 (A), te cjelovite *otc* genske nakupine (B) čiji produkti sudjeluju u biosintezi poliketidnog antibiotika oksitetraciklina (detalji su navedeni u opisu slike 1 u radu Hranueli *i sur.*, 1999.).

Vjerovalo se da će, na taj način, izmijenjeni produkt gena *otcC* biti biološki neaktivan ali ispravnog broja aminokiselina. I zaista, enzimski su testovi pokazali da produkt gena *otcC*, izmijenjen mjesno-specifičnom mutagenezom, nije sposoban katalizirati hidroksilaciju svog supstrata anhidro-tetraciklina u tetraciklin, dok to biološki aktivan produkt gena *otcC* može (Perić-Concha *i sur.*, 2005.). Slijedeći bi korak bila strukturna karakterizacija poliketidnog produkta, ili produkata, koje bi - na taj način - konstruirani sojevi ZGL1 i ZGL5 bakterijske vrste *S. rimosus* mogli sintetizirati.



### 2.2.1. Poliketidi

Među prirodnim spojevima mikroorganizama poliketidi su najveća skupina. Svoje su ime dobili po keto skupinama koje nakon sinteze zaostaju u molekuli. S gledišta kemije poliketidi su strukturno vrlo heterogena skupina prirodnih spojeva. Može ih se proizvoljno podijeliti u dvije skupine. Prva su skupina aromatski ili jednostavni poliketidi, koji mogu sadržavati od jednog do četiri aromatska prstena. Njihova se struktura, međutim, ne može predvidjeti iz sekvencije DNA gena što sadržavaju genetičku uputu za njihovu biosintezu. Druga su skupina složeni poliketidi, koji se dalje dijele na makrolide i ansamicine, s laktonskim i laktamskim prstenovima, te na poliene i polietere. Za razliku od aromatskih poliketida, struktura složenih poliketida može se – zbog modularne organizacije proteina koji sudjeluju u njihovoj biosintezi - predvidjeti iz sekvencije DNA gena što sadržavaju genetičku uputu za njihovu biosintezu (Hranueli *i sur.*, 2005.).

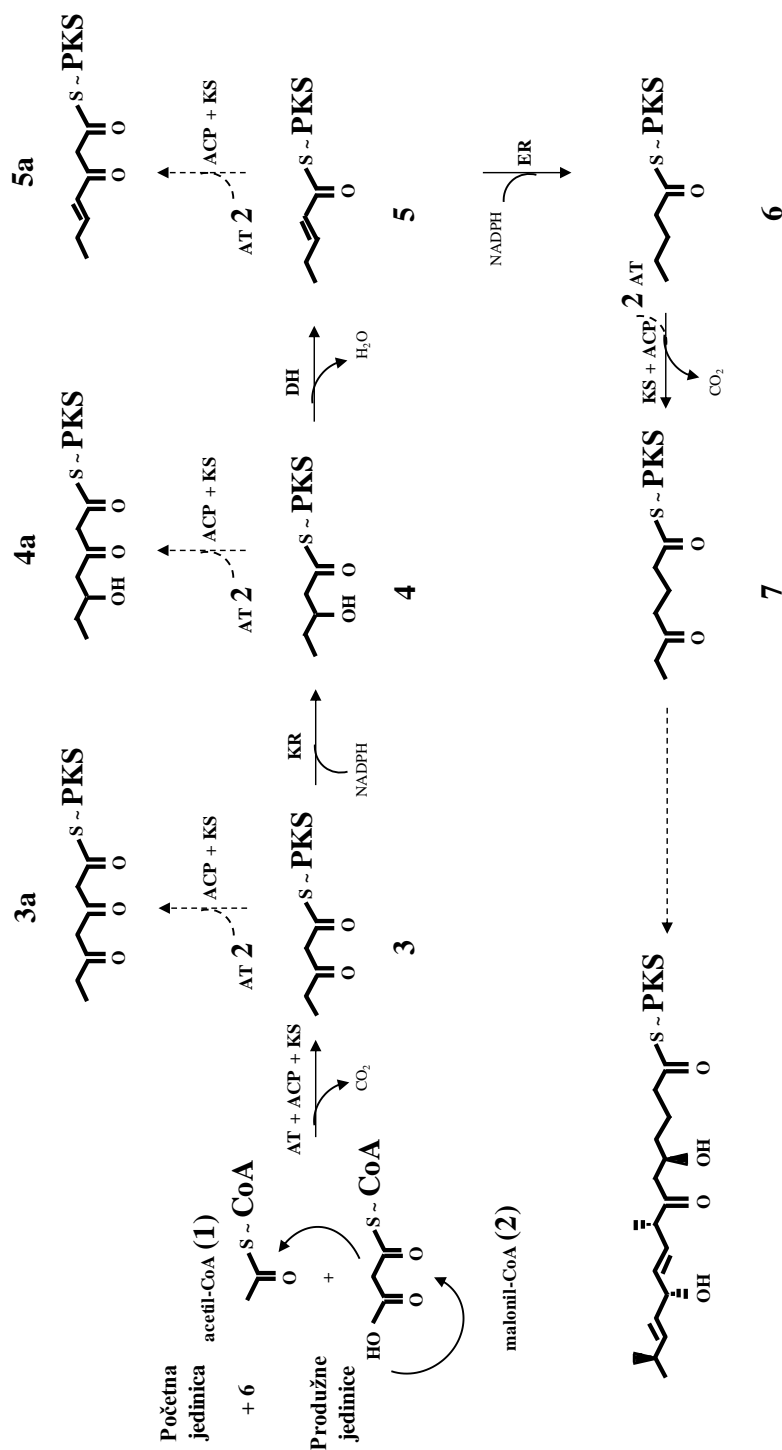
Mikroorganizmi sintetiziraju poliketidne supstancije pomoću različitih tipova enzimskih kompleksa nazvanih poliketid sintaze (PKS). U bakterija su to multimodularni enzimi PKS tipa I, ponavljajući multienzimski kompleksi PKS tipa II i monomodularni ponavljajući enzimi PKS tipa III (Weissman, 2004.; Hranueli *i sur.*, 2005.; Bode i Muller, 2003.). Plijesni poliketide sintetiziraju pomoću monomodularnih ponavljajućih enzima PKS tipa I i monomodularnih ponavljajućih enzima PKS tipa III (Hutchinson *i sur.*, 2000.; Seshime *i sur.*, 2005.). Sekvenciranje genskih nakupina što sadrže genetičku uputu za te multimodularne enzime i enzimске komplekse ukazalo je na njihovu specifičnu genetičku arhitekturu. Unatoč raznolikosti genetičkih arhitektura, poliketidi se sintetiziraju biosintetskim putem sličnim biosintezi masnih kiselina (slika 11) (Hranueli *i sur.*, 2001.).

Rast poliketidnog ugljikova lanca započinje kondenzacijom početne građevne jedinice s prvom produžnom građevnom jedinicom, koje se u domaćinu nalaze u obliku koenzim A tioestera pomoću enzima aciltransferaza (AT), malog proteina nosača acila (ACP; engl. AcyCarrier Protein) i ketosintaze (KS). Na slici 11 su kao početna i produžne građevne jedinice prikazani acetil-CoA i malonil-CoA, ali se u tu svrhu mogu upotrijebiti i ostaci drugih organskih kiselina. Kondenzaciju između acetil-CoA i malonil-CoA pokreće dekarboksilacija malonila i pucanje tioesterske veze u acetil-CoA. Dobiveni diketid (supstancija 3) sada može proći kroz ciklus  $\beta$ -ketoredukcije, dehidratacije i enoilredukcije pomoću enzima ketoreduktaza (KR), dehidrataza (DH) i enoil reduktaza (ER), pri čemu nastaju supstancije 4, 5 i 6 koje sadržavaju  $\beta$ -hidroksilnu skupinu, nezasićenu dvostruku vezu ili potpuno reducirani

$\beta$ -ugljik. Ako, međutim, funkcionalne KR, DH ili ER nisu prisutne, supstancije 3, 4 ili 5 će započeti novi ciklus kondenzacije upotrebom nove produžne građevne jedinice. Nakon što je sintetizirana, supstanca 6 jedino može ući u novi ciklus sinteze. Supstancije dobivene drugom kondenzacijom, triketidi 3a, 4a ili 5a, prolaze zatim kroz novi ciklus redukcija, ovisno o prisustvu redukcijskih enzima koji kataliziraju redukcije triketida. Redukcije triketida ne ovise o redukcijskoj sudbini diketida sintetiziranog u prvoj kondenzaciji, niti o tome što će se dogoditi s redukcijom tetra-, penta- i heksaketida koji će biti sintetizirani tijekom slijedećih kondenzacija. Upotreba određene produžne jedinice za određenu kondenzaciju ovisi o specifičnosti aciltransferaza za svaki određeni ciklus. Prema tome, poliketid sintetaze moraju moći razlikovati jedan kondenzacijsko-redukcijski ciklus od drugog, te odrediti ispravan broj ciklusa djelujući vjerno, ali različito u svakom ciklusu biosinteze. Izbor početne i produžnih građevnih jedinica, stupanj redukcije  $\beta$ -ugljika, stereokemija na centrima koji sadržavaju hidroksilne ili alkilne ostatke i dužina poliketidnog ugljikova lanca su stupnjevi slobode koji moraju biti genetički programirani u enzimskim kompleksima PKS (slika 11) (Hranueli *i sur.*, 2001.).

### 2.2.1.1. Složeni poliketidi

Sekvenciranje genskih nakupina PKS tipa I, kao što je to PKS složenog poliketidnog antibiotika eritromicina, pokazalo je da su to multifunkcionalni enzimi multimodularne organizacije (slika 12). Svaki je modul odgovoran za "rast" poliketidnog lanca za 2 ugljikova atoma i može sadržavati "domene" (katalitički aktivne podjedinice enzimskog kompleksa) neophodne za redukcijske aktivnosti. Postoji dakle neposredna veza između aktivnih mjesta modularnih PKS i strukture njihova produkta. Zadnji šesti modul završava s domenom tioesteraza (TE) koja je odgovorna za odvajanje poliketidnog ugljikova lanca od enzimskog kompleksa i ciklizaciju, pri čemu nastaje poliketidna okosnica 6-deoksieritronolid B. Nakon toga, poslije-poliketidne hidroksilaze i glikozilaze sudjeluju u sintezi makrolidnog antibiotika eritromicina A (slika 12). Modularni proteini DEBS1, DEBS2 i DEBS3, od oko 300 kD svaki, izolirani su i pročišćeni kao multi-enzimski kompleks. Biokemijske analize su pokazale da ti proteini imaju dimernu strukturu u obliku uzvojnice. Prema tome, struktura i funkcija enzimskih kompleksa PKS složenih poliketida je u potpunosti poznata (Hranueli *i sur.*, 2001.).



Slika 11. Shematski prikaz biosinteze poliketida (Hranueli i sur., 2001.).

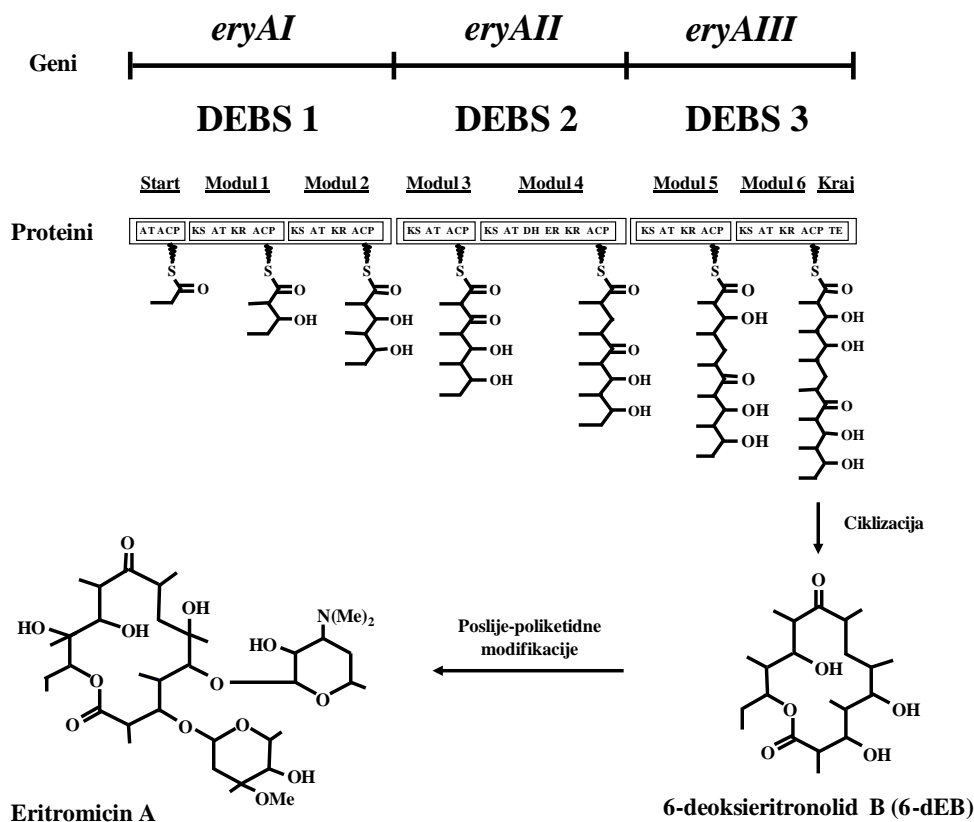


### 2.2.1.2. Aromatski poliketidi

Nasuprot tome, sekvenciranje genskih nakupina multienzimskih kompleksa PKS tipa II, kao što je to PKS aromatskog poliketidnog antibiotika aktinorodina (slika 13A), ukazalo je na prisustvo tri do šest mono- ili bifunkcionalnih proteina čija se aktivna mjesta ponovljeno upotrebljavaju tijekom prije-poliketidne sinteze poliketidne okosnice. Za razliku od neposredne veze između aktivnih mjesta i strukture produkta u modularnih PKS tipa I, sve su PKS tipa II vrlo slične pa se kemijska struktura poliketida ne može predvidjeti iz strukturne organizacije gena u enzimskom kompleksu PKS. Zbog toga je konstruiran poseban vektor/domaćin sustav prikladan za ekspresiju kloniranih genskih nakupina aromatskih poliketida. Taj se sustav sastoji od soja CH999 bakterijske vrste *S. coelicolor* u kojeg su svi geni za biosintezu aktinorodina uklonjeni delecijom, i bifunkcionalnog ekspresijskog plazmidnog vektora (pRM5) koji sadržava aktivator biosinteze aktinorodina i njegova dva promotora. Sustav je upotrijebljen za određivanje uloge različitih gena PKS tipa II tijekom biosinteze. Najvažniji je rezultat tih pokusa da se, kada se takozvani 'minimalni' PKS bilo koje genske nakupine aromatskih poliketida klonira u plazmidni vektor pRM5 i ekspresira u soju CH999 bakterijske vrste *S. coelicolor*, sintetizira poliketidni lanac ispravnog broja ugljikovih atoma, koji može spontano ciklizirati i formirati aromatske prstene. Ako se, međutim, u taj plazmidni vektor kloniraju geni čiji su produkti enzimi KR, CYC/ARO i CYC, dolazi do ispravne redukcije, ciklizacije i aromatizacije. Od tada se vjeruje da je katalitički neaktivan enzim KS $\beta$  odgovoran za određivanje dužine poliketidnog lanca, te je nazvan faktorom odgovornim za dužinu poliketidnog ugljikova lanca, CLF (engl. Chain Length determining Factor) (slika 13A) (Hranueli *i sur.*, 2001.).

Do sada se nije uspjelo izolirati i pročistiti cjelovit multienzimski kompleks PKS tipa II. Neki su njegovi dijelovi, i neki pojedinačni enzimi, međutim, izolirani i pročišćeni, te upotrijebljeni u pokusima rekonstitucije u uvjetima *in vitro*. Pokazalo se da je enzime KS $\alpha$  i KS $\beta$  aromatskog poliketida aktinorodina, od 40 - 45 kDa svaki, moguće pročišćiti u obliku hetero-tetramera od oko 170 kDa. Taj se heterotetramer, zajedno s pročišćenim enzimom ACP, može upotrijebiti za sintezu poliketidnog lanca aktinorodina ispravne dužine u uvjetima *in vitro*. Rekonstitucija minimalnog PKS aktinorodina s pročišćenom enzimima KR, CYC/ARO i CYC potvrdila je rezultate genetičkih pokusa (slika 13B) (Hranueli *i sur.*, 2001.). Očito je da struktura i funkcija multienzimskih kompleksa PKS aromatskih poliketida još nije u potpunosti poznata. Vjeruje se da se, u slučaju aktinorodina, ona sastoji upravo od šest

mono- ili bifunkcionalnih proteina upotrijebljenih u pokusima rekonstitucije u uvjetima *in vivo* i *in vitro* (Castaldo *i sur.*, 2008.).

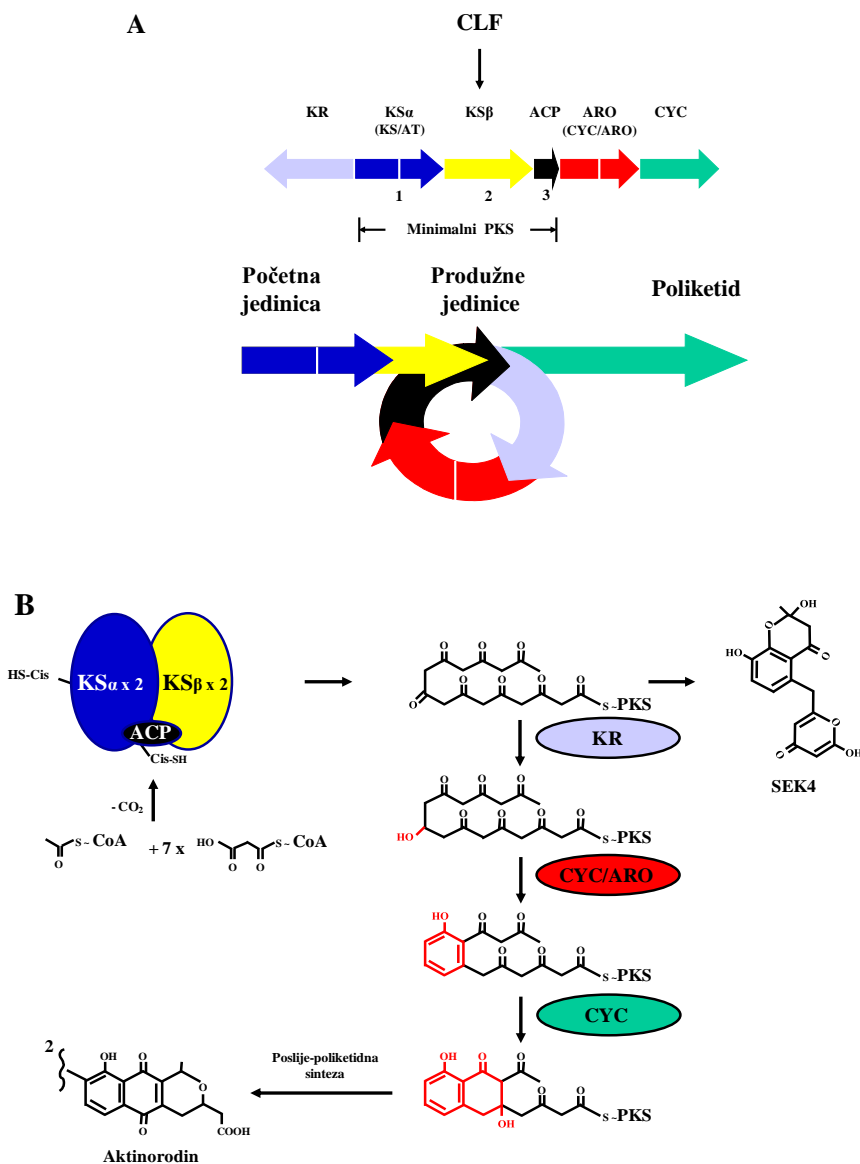


Slika 12. Shematski prikaz genske nakupine koja sadrži genetičku uputu za enzimski kompleks PKS tipa I koji sudjeluje u biosintezi makrolidnog antibiotika eritromicina. Linearnu arhitekturu enzima (*eryAI*, *eryAII* i *eryAIII*), proteina (DEBS1, DEBS2 i DEBS3) i njihovih produkata slijedi poliketidna okosnica 6-deoksieritronolid B i makrolidni antibiotik eritromicin A (Hranueli *i sur.*, 2001.).

### 2.2.1.3. Kombinatorna biosinteza poliketida

Kao što je već rečeno, tijekom posljednjih je dvadesetak godina kloniran i sekvenciran veliki broj poliketidnih genskih nakupina. Sekvenciranje genskih nakupina pokazalo je da među njima postoji značajna sličnost (tzv. homologija) na razini DNA te da, prema tome, vjerojatno imaju zajedničko porijeklo. Ti su rezultati omogućili upotrebu kombinatorne biosinteze u proizvodnji novih poliketidnih struktura. Kombinatorna biosinteza teži povećanju biološke raznolikosti upotrebom genetičkog inženjerstva poliketidnih biosintetskih putova na

takav način da se sintetiziraju "neprirodni prirodni" spojevi (vidi citate u: Hranueli *i sur.*, 2001.).



Slika 13. (A) shematski prikaz genske nakupine koja sadrži genetičku uputu za multienzimski kompleks PKS tipa II koji sudjeluje u biosintezi aromatskog poliketidnog antibiotika aktinorodina. Linearna arhitektura triju susjednih gena  $KS\alpha$  i  $KS\beta$ , te ACP (takozvani 'minimalni' PKS) su sačuvani u svih multienzimskih kompleksa PKS koji su do sada opisani. Prikazana je i shema njihova ponovljenog upotrebljavanja tijekom prije-poliketidne sinteze poliketidne okosnice. (B) shematski prikaz do sada izoliranih i pročišćenih dijelova multienzimskih kompleksa PKS koji su upotrijebljeni u pokusima rekonstitucije u *in vitro* uvjetima (Hranueli *i sur.*, 2001.).

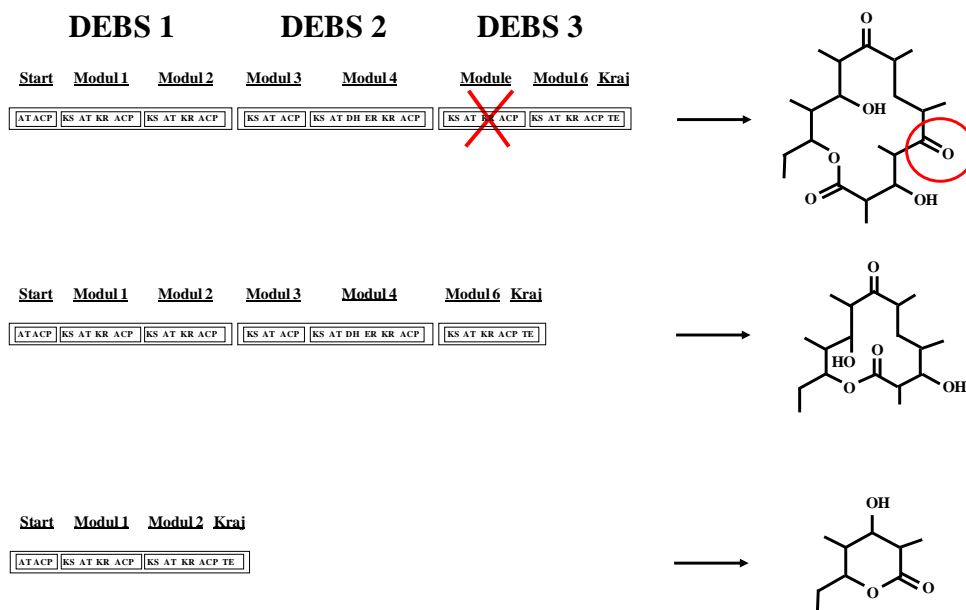
Broj mogućih novih kemijskih spojeva može se teoretski opisati izrazom:  $R^N$  u kojoj R predstavlja broj različitih poliketidnih gena koji se mogu upotrijebiti u svakom konstrukt, dok N predstavlja broj različitih alelnih oblika tih gena koje je moguće pronaći. Prema tome, ako se dva poliketidna biosintetska puta od koji svaki sadržava četiri homologna biosintetska gena koji prepoznaju različite supstrate, kombiniraju na sve moguće načine, moguće je očekivati sintezu 16 različitih poliketidnih struktura. Međutim, četiri bi se biosintetska puta s ista četiri homologna gena svaki, mogli kombinirati da sintetiziraju 256 različitih poliketida. Odatle i pojam kombinatorna biosinteza.

Kombinatornom sintezom kod složenih poliketida poput makrolida, inaktiviraju se katalitički aktivna mjesta u multimodularnim enzimima PKS tipa I, ili se dodaju katalitički aktivna mjesta iz drugih multimodularnih enzima, radi sinteze novih makrolida s različito reduciranim  $\beta$ -ugljicima i različitom stereokemijom (slika 14A; prvi red). Provode se i delecije cijelih modula multimodularnih enzima PKS tipa I (slika 14A; drugi i treći red). Za razliku od složenih poliketida, kod aromatskih se poliketida upotrebljava već opisani vektor/domaćin ekspresijski sustav za proizvodnju novih aromatskih poliketida kombiniranjem specifičnih PKS gena iz različitih genskih nakupina - poput frenolicina, aktinorodina i tetracenomicina u ovim primjerima (slika 14B) (vidi citate u: Hranueli *i sur.*, 2001.).

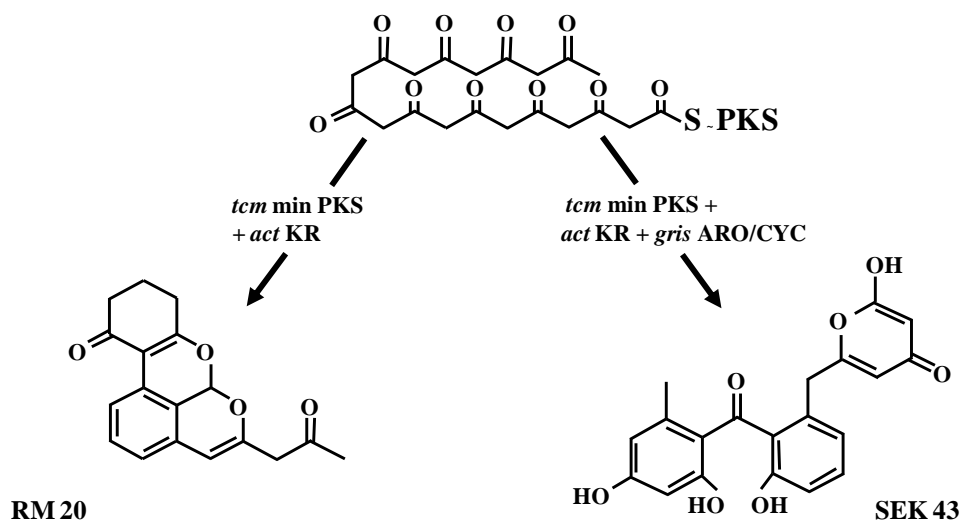
### 2.2.2. Tetraciklini

Bakterijske vrste *S. rimosus* i *S. aureofaciens* sintetiziraju četiri prirodna poliketidna tetraciklinska antibiotika. To su: tetraciklin (TC), oksitetraciklin (OTC), klortetraciklin (CTC) i 6-demetilklortetraciklin (DMCTC). Većina prirodnih tetraciklina ima zajedničku strukturu (slika 15) s  $\beta$ -diketonskim sustavom u prstenovima B i C koji je presudan za njihovu antibiotsku aktivnost. Tetraciklini su bili prva veća skupina antimikrobnih spojeva za koje se koristio termin *široki spektar*. Naime, tetraciklini posjeduju aktivnost prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, posebno rikecijama, mikobakterijama i protozoama (O'Hagan, 1991.).

A



B

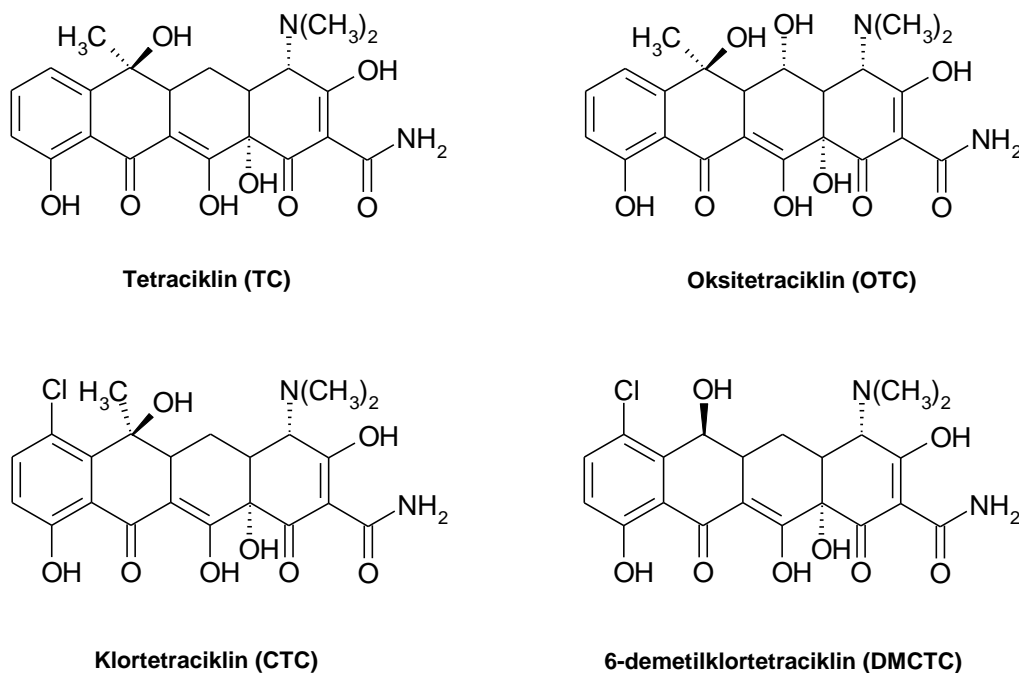


Slika 14. Kombinatorna biosinteza multimodularnih enzima poliketid sintaza tipa I (A) i multienzimskih kompleksa poliketid sintaza tipa II (B) u svrhu priprave novih poliketidnih struktura (Hranueli *i sur.*, 2001.).

### 2.2.2.1. Oksitetraciklin

Oksitetraciklin je izoliran iz bakterije *Streptomyces rimosus* još davne 1950. godine (Finlay *i sur.*, 1950.). Osim oksitetraciklina utvrđeno je da spomenuti soj u vrlo maloj mjeri

(< 5%) proizvodi i tetraciklin. Proslavljeni američki kemičar Robert B. Woodward odredio je kemijsku strukturu oksitetraciklina (Hochstein *i sur.*, 1953.). Prema IUPAC nomenklaturi naziv oksitetraciklina je 4-(dimetilamino)-3,5,6,10,12,12a-heksahidroksi-6-metil-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-okta-hidro-2-naftacenkarboksamid. Otkriće strukture oksitetraciklina bilo je najveći napredak u istraživanju tetraciklina, te je omogućilo sintezu derivata oksitetraciklina, doksiciklina koji je postao jedan od najčešće upotrebljivanih antibiotika današnjice. Oksitetraciklin inhibira sintezu proteina u bakterija tako što se veže na 30 S ribosomsku podjedinicu (Chopra i Roberts, 2001.; Brodersen *i sur.*, 2000.). Komercijalno je dostupan kao amfoterna baza, hidrokloridna sol ili kao kompleks kvaterne amonijeve soli (slika 16). Pored toga, na slici 16 prikazana je podjela molekule prema dosadašnjim spoznajama, na dio koji je moguće kemijski transformirati, a da se pri tome ne izgubi antimikrobna aktivnost i dio koji je odgovoran za antibiotsku aktivnost.

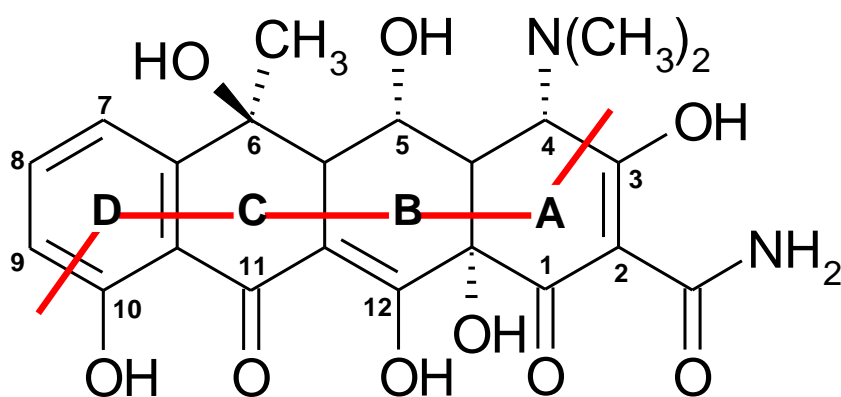


Slika 15. Kemijske strukture prirodnih tetraciklina: tetraciklin (TC), oksitetraciklin (OTC), klortetraciklin (CTC) i 6-demetilklortetraciklin (DMCTC) (O'Hagan, 1991.).

Oksitetraciklin je vrlo dobro istražen poliketidni prirodni produkt i važan je primjer biosinteze PKS tipa II (bakterijski aromatski PKS), što znači da je proizveden iz poli- $\beta$ -ketonskog intermedijara, kao policikličkog spoja s najmanje jednim aromatskim prstenom. Pretpostavlja se da sinteza tetraciklina započinje početnom jedinicom (tzv. starterom) malonamil-CoA na koju se iterativnim kondenzacijama veže osam produžnih jedinica acetil-

CoA. Iako postoje i tetraciklinski analozi kojima je 2-karboksamido skupina zamijenjena s 2-acetilnom skupinom (McCormick, 1967.; Hochstein *i sur.*, 1960.), vjerojatno zbog nemogućnosti da se sintetizira neophodna malonamil-CoA polazna jedinica. Ipak, u eksperimentima gdje su kao polazne jedinice za biosintezu oksitetraciklina upotrijebljeni izotopima obilježeni spojevi [1, 2, 3-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>] malonat i [1, 2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] acetat (Thomas i Williams, 1983a.) dobiven je [1, 2, 3-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>] malonat produkt koji je jedini pokazivao značajno sprezanje ugljika C-2 s ugljikom C-1 i ugljikom amidne skupine u položaju C-2 (nuklearna magnetska rezonancija u spektru <sup>13</sup>C), što je potvrdilo ugradnju molekule malonata kao polazne jedinice. Bez obzira na polaznu jedinicu, sekvencijalna kondenzacija osam molekula acetil-CoA čini strukturu ugljikovog skeleta (Thomas i Williams, 1983b.) (slika 17).

### položaji dozvoljeni za modifikacije

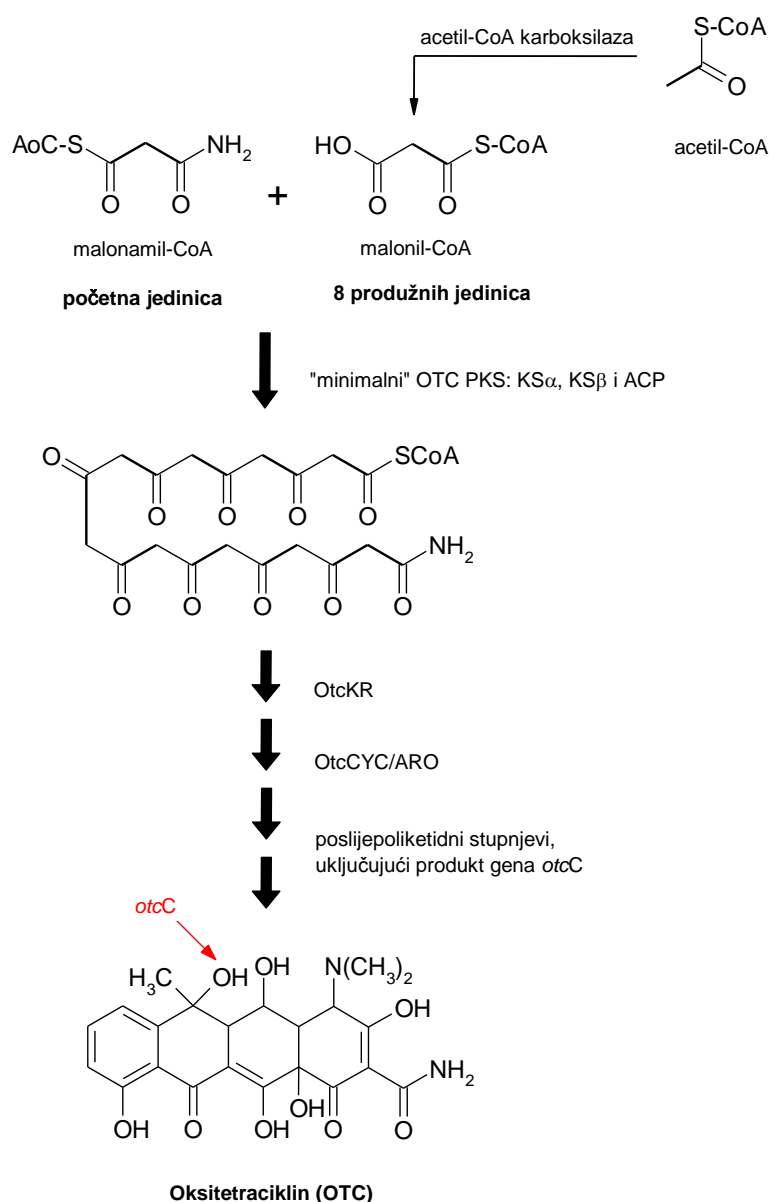


### položaji bitni za vezanje na ribosome

Slika 16. Struktura oksitetraciklina.

Poliketidni lanac je zatim složen u tetracikličku strukturu prvenstveno djelovanjem enzima ketoreduktaze i aromataze, ali uz mogućnost sudjelovanja i drugih enzima. Tako na primjer, metilacija na položaju 6 dovodi do stvaranja 6-metilpretetramida (6-MPT) – prvog intermedijara u biokemijskom putu kojeg je moguće izolirati (McCormick, 1967.). Nasuprot tome, hidrosilaza je odgovorna za pretvorbu 6-metilpretetramida u 4-hidroksi-6-metilpretetramid. Genska nakupina sadrži nekoliko gena koje se prema usporedbi baza podataka može povezati s hidrosiliranjem: *otcC* (potvrđen je kao 6-hidrosilaza), *otcD2*, *otcY1-5* i *otcX1*. Iz rezultata kasnije provedenih studija zaključeno je da je gen *otcX1* odgovoran za ovu konverziju. Isto tako otvorena je mogućnost da je produkt gena *otcX1* samo pomoćni protein u reakciji hidrosilacije. Pretpostavlja se da je jedan od gena, *otcD2* ili

*otcY1-5*, odgovoran za hidroksiliranje spoja 6-MPT, ali i uključen u 5-hidroksiliranje koje slijedi u biosintetskom putu. Hidroksilna skupina na položaju C-4 je zatim reducirana kako bi nastao 4-ketoanhidrotetraciklin (4-keto-6-metilpretetramid). Aminiranjem položaja C-4 nastaje 4-aminoanhidrotetraciklin. Slijedi hidroksiliranje na položaju C-6, kako je već spomenuto, pomoću 6-hidroksilaze te hidroksiliranje na položaju C-5 uz posredovanje produkata gena *otcD2* ili *otcY1-5*. Posljednji stupanj u biosintezi oksitetraciklina je dehidrogeniranje. Nakon toga slijedi izbacivanje gotove molekule antibiotika iz stanice (slika 18).



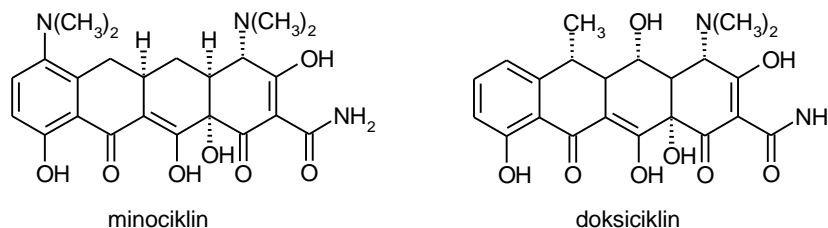
Slika 17. Skraćeni shematski prikaz biosintetskoga puta poliketidnog antibiotika oksitetraciklina u bakterijske vrste *Streptomyces rimosus* (Petković i sur., 2006.).





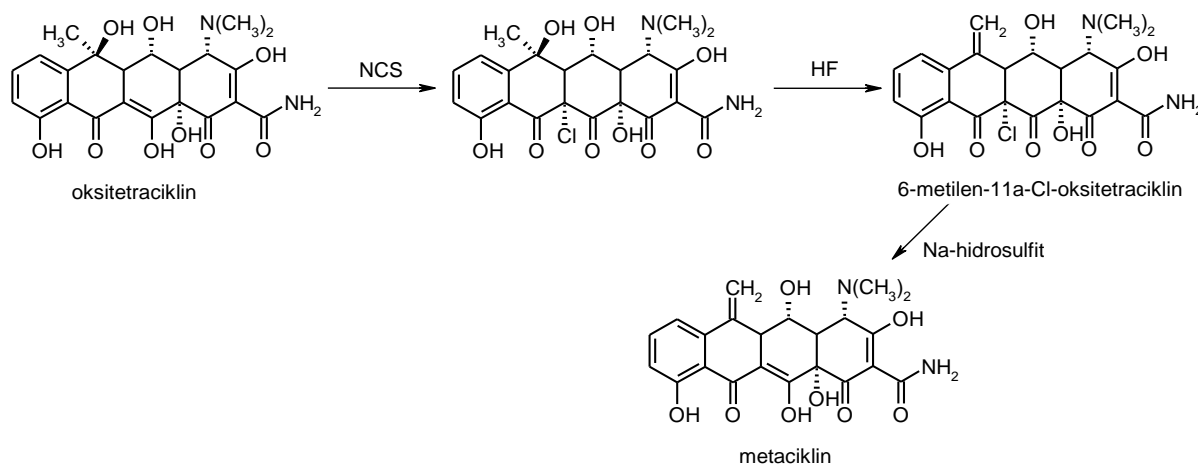
### 2.2.2.2. Doksiciklin

Velika proizvodnja i primjena prirodnih tetraciklina u humanoj i veterinarskoj medicini tijekom desetljeća dovela je do pojave rezistencije i smanjene učinkovitosti ovih antibiotika. Tako je stvorena potreba za razvojem derivata tetraciklina koji će biti u stanju premostiti ove mehanizme rezistencije. Klinički najvredniji tetraciklini druge generacije su minociklin i doksiciklin (slika 19).



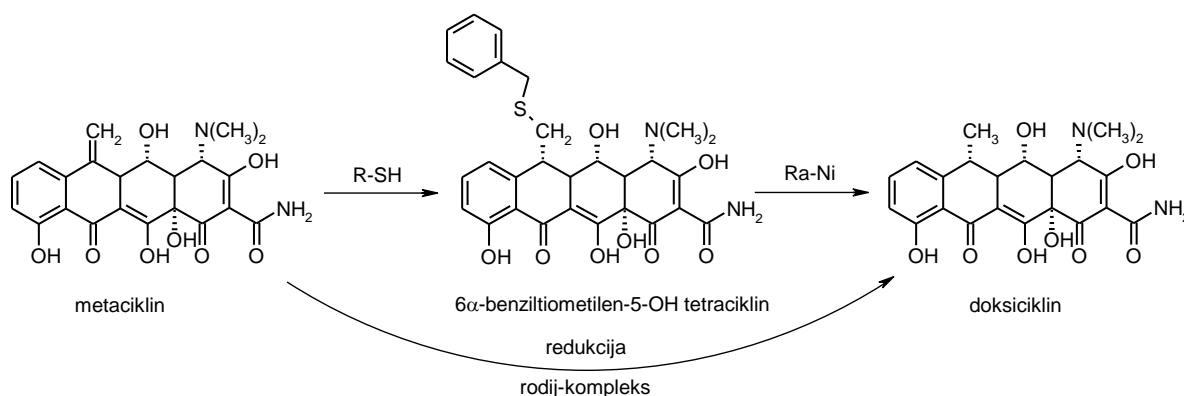
Slika 19. Strukture minociklina i doksiciklina.

Doksiciklin se proizvodi iz oksitetraciklina procesom u kojem se prvo oksitetraciklin prevodi u metaciklin (slika 20) (Nelson *i sur.*, 2001.). Kako bi se izbjeglo stvaranje anhidrotetraciklina, položaj 11a zaštićen je u obliku 11a-kloriranog derivata koji se priprema reakcijom oksitetraciklina s *N*-klorosukcinimidom (NCS). Uvođenje halogena na položaj 11a stabilizira C prsten oksitetraciklina, dopuštajući reakcije s kiselinama, bazama i drugim reagensima. Djelovanjem s bezvodnim fluoridom preferira se egzocikličko dehidriranje kako bi se dobio 6-metilen-11a-kloroksitetraciklin.



Slika 20. Sinteza metaciklina iz oksitetraciklina.

Klor se lako uklanja s položaja 11a reakcijom s natrijevim hidrosulfitom pri čemu nastaje metaciklin. Metaciklin je također klinički značajan tetraciklinski analog koji posjeduje aktivnost prema širokom spektru bakterija. Egzociklička dvostruka veza 6-metilentetraciklina može dalje reagirati s merkaptanima preko radikalske reakcije stvarajući tako anti-Markovnikov sumporni adukt metaciklina (slika 21). U reakciji benzilmerkaptana s metaciklinom nastaje 6 $\alpha$ -benziltiometilen-5-hidroksitetraciklin koji se zatim redukcijom s vodikom uz pomoć Raney-Ni katalizatora prevodi u doksiciklin (6 $\alpha$ -metil-6-deoksi-5-hidroksitetraciklin) (Stephens *i sur.*, 1963.; Villax i Page, 1985.).



Slika 21. Sinteza doksiciklina iz metaciklina.

Alternativno, metaciklin se može direktno stereospecifično reducirati pomoću vodika uz prisustvo kompleksa rodija pri čemu nastaje doksiciklin uz visoke prinose. Ova metoda pokazala se dovoljno dobrom za sintezu doksiciklina u industrijskom mjerilu. Godine 2005. u literaturi je opisan sintetski postupak dobivanja doksiciklina (Charest *i sur.*, 2005.). Postupak se sastoji od 18 stupnjeva, a započinje benzojevom kiselinom koja čini okosnicu B prstena doksiciklina. Različitim reakcijama stvaranja prstena, na jezgru benzojeve kiseline dodani su prstenovi A, C i D. Iskorištenje ove virtuozne demonstracije sintetske organske kemije bilo je 8,3 %.

Zbog nedostatka hidroksilne skupine na položaju C-6, doksiciklin je lipofilniji u odnosu na prirodni OTC. Pored toga, doksiciklin se lakše apsorbira, ima bolja oralna farmakokinetička svojstva i veću antimikrobnu aktivnost. Unatoč dugogodišnjoj intenzivnoj upotrebi tetraciklina, zahvaljujući njihovim različitim farmakološkim svojstvima trenutno se provode intenzivna istraživanja ovih spojeva u liječenju različitih bolesti, poput dermatoloških bolesti, poremećaja imunološkog sustava, mentalnih poremećaja, bolesti krvožilnog sustav

kao i zloćudnih tumora. Na temelju rezultata dobivenih iz pretkliničkih i kliničkih ispitivanja, terapijski potencijal i primjena tetraciklina još će se znatno proširiti (Bahrami *i sur.*, 2012.).

### 2.3. Izolacija prirodnih spojeva

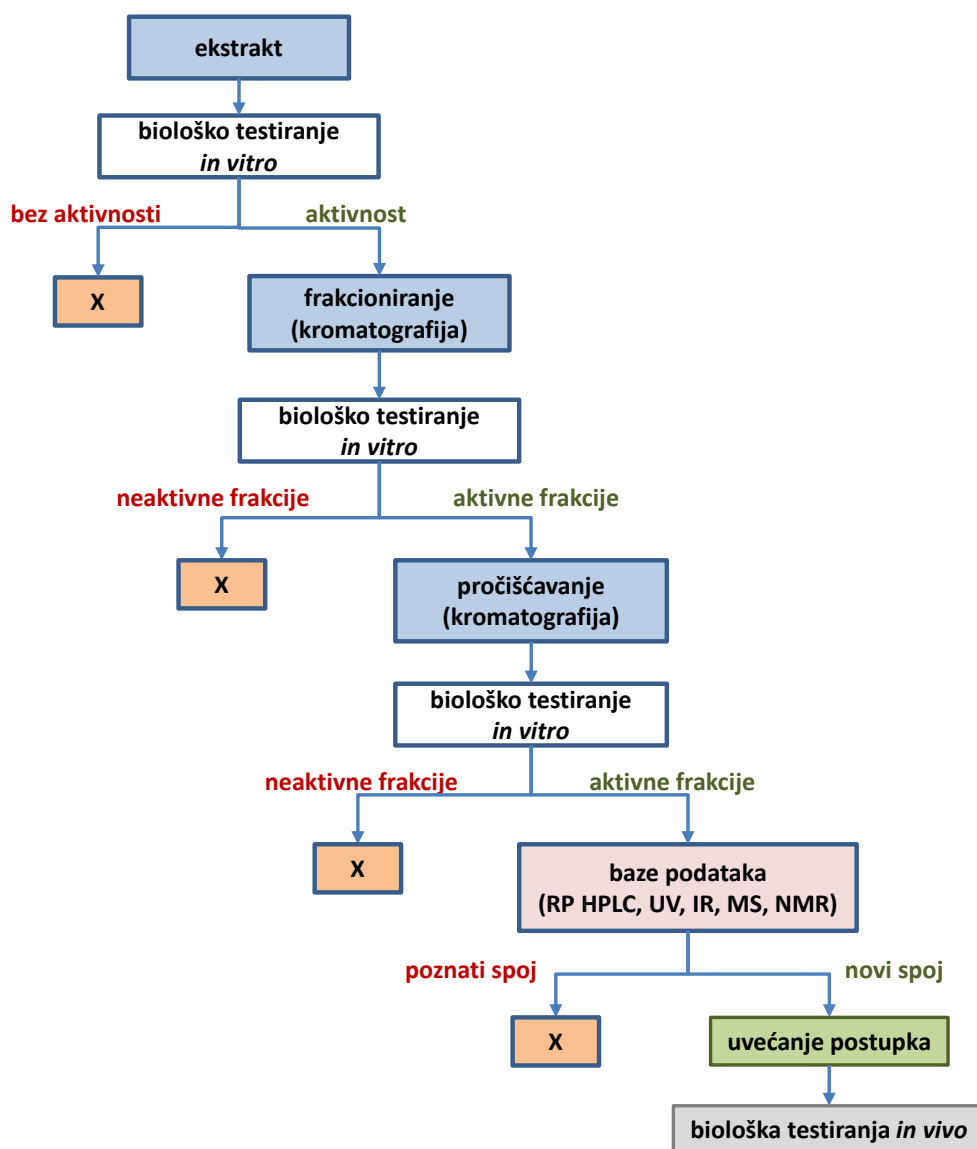
Prirodni produkti mogu biti:

- cijeli organizam (koji nije bio obrađivan osim jednostavnih postupaka konzerviranja),
- dio organizma,
- ekstrakt organizma, ili
- čisti spoj izoliran iz biljke, životinje ili mikroorganizma.

U većini slučajeva prirodni produkti se odnose na sekundarne metabolite – male molekule (do 2000 Da) koje nisu od vitalne važnosti za organizam koji ih proizvodi, a većinom služe organizmima na jedan od dva načina:

- mogu pomoći u rastu, reprodukciji ili širenju organizma u odgovarajućim uvjetima, ili
- mogu osigurati zaštitu od konkurencije ili predatora (Vining, 1992.).

Strategije usmjerene na izolaciju i pročišćavanje ovih prirodnih spojeva u današnje su vrijeme vođene njihovom biološkom aktivnošću u uvjetima *in vitro*, stvaranju baza prirodnih spojeva, te proizvodnji biološki aktivnih spojeva u kulturi stanica, genetskim manipulacijama, kombinatornom kemijom itd. Opći protokol za izolaciju i pročišćavanje prirodnih spojeva uglavnom započinje ekstrakcijom spojeva od interesa iz njihovog prirodnog izvora - iz fermentacijske komine nakon provedene biosinteze, ukoliko se radi o spojevima iz mikroorganizama izoliranih iz prirode. Nakon primarnog pročišćavanja sirovi je ekstrakt zatim razdijeljen na različite frakcije koje sadrže spojeve slične po naboju, polarnosti, veličini molekule i sl. Slijedi drugi stupanj pročišćavanja (i slijedeći po potrebi) primjenom kromatografskih metoda. Svaki ovaj stupanj može biti vođen rezultatima *in vitro* biološkog testiranja (slika 22). Određivanje strukture pročišćenih komponenata postiže se upotrebom spektroskopskih tehnika, posebno 2D nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR) i masenom spektrometrijom (MS). Usporedbom spektroskopskih podataka s podacima iz literature i bazama podataka može se utvrditi da li je izolirani spoj već opisan ili je nov.



Slika 22. Primjer postupka izolacije i pročišćavanja prirodnih spojeva vođen biološkim testiranjem.

### 2.3.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je proces u kojem dvije faze dolaze u međusobni kontakt s ciljem da se ostvari prijenos čestica ili otopljene tvari iz jedne faze u drugu. Za razdvajanje (tj. separaciju) i pročišćavanje bioloških produkata ove faze su najčešće tekućine koje se ne miješaju, a tvar je u topljivom obliku. U nekim slučajevima jedna faza je tekuća, a druga faza je čvrsta. Organsko otapalo često se upotrebljava kao otapalo za ekstrakciju kada je tvar koja se ekstrahira u njemu stabilna. Tipičan primjer su antibiotici male molekulske mase. Ekstrakcija

se obično upotrebljava na početku procesa pročišćavanja biološko aktivnih produkta i tipično prethodi koraku velike razlučivosti (rezolucije) kao što je kromatografija. Ekstrakcija je često koristan stupanj jer doprinosi značajnom smanjenju volumena i/ili može razdvojiti željeni produkt od stanica ili staničnih ostataka (Harrison *i sur.*, 2003.).

U ekstrakciji postoje tri glavne komponente. To su:

1. tvar koju treba izdvojiti iz polazne smjese pomoću otapala,
2. polazna smjesa koja sadrži otoplenu tvar koju treba izdvojiti postupkom ekstrakcije. Polazna smjesa se naziva rafinat nakon što počne gubiti tvar koja prelazi u otapalo, i
3. otapalo predstavlja tekućinu koja apsorbira tvar za ekstrakciju. Nakon obavljene ekstrakcije, otapalo se naziva ekstrakt (Douglas, 2002.).

### **2.3.1.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće**

Ekstrakcija tekuće-tekuće uključuje međusobni kontakt polazne smjese s tekućim otapalom koje se slabo ili nikako ne miješa, a u kojem je topljiva jedna ili više komponenti iz polazne smjese. Nakon dodatka otapala i miješanja s polaznom smjesom, formiraju se dvije različite tekuće faze. Komponenta, koja je više topljiva u otapalu nego u polaznoj smjesi, prijeći će u otapalo, a proces se prijenosa tvari naziva apsorpcija. Prijenos tvari tijekom procesa ekstrakcije može se podijeliti u tri kategorije:

1. prijenos tvari se ostvaruje zbog veće topljivosti komponente u otapalu nego u polaznoj (rafinatnoj) tekućoj fazi,
2. prijenos tvari se ostvaruje zbog većeg masenog protoka otapala ili zbog puno niže koncentracije tvari u otapalu u odnosu na koncentraciju tvari u polaznoj smjesi, i
3. prijenos tvari se ostvaruje zbog kemijske reakcije između otapala i tvari.

Prijenos tvari tijekom ekstrakcije najčešće je posljedica slučaja koji je prvo naveden. Razdvajanje molekula tijekom ekstrakciji tekuće-tekuće ovisi o raspodjeli tvari između tekućih faza. Dizajn procesa ekstrakcije ovisi o međusobnoj sposobnosti miješanja dviju tekućih faza i brzini uravnoteženja tvari između dviju faza. U jednostupanjskom procesu ekstrakcije, ulazna struja je u dodiru sa strujom ekstrakcijskog otapala, a smjesa se dijeli na ravnotežnu ekstrakcijsku i rafinatnu fazu (slika 23). Raspodjela tvari u ravnoteži između dviju tekućih faza određena je koeficijentom raspodjele

$$K = y/x \quad (2.1)$$

gdje su  $y$  i  $x$  koncentracije tvari u ekstrakcijskoj i rafinatnoj fazi. Prema tome, za najmanji volumen ekstrakcijskog otapala poželjno je imati što je moguće veći koeficijent  $K$ . Koeficijent raspodjele blizak vrijednosti jedan zahtijeva velike volumene i puno stupnjeva serijskih ekstrakcija kako bi se ostvario potpuni prijenos tvari iz polazne u ekstrakcijsku fazu. Koeficijenti raspodjele bliski vrijednosti nula ukazuju da uopće nije došlo do ekstrakcije. Koeficijent raspodjele može ovisiti o mnogim parametrima, kao što su veličina molekule koja se ekstrahira, pH, vrsta otapala, temperatura i dr.



Slika 23. Dijagram toka jednostupanjskog uravnoteženog procesa ekstrakcije s prikazanim varijablama tokova (pretpostavljeno je da se dvije faze međusobno ne miješaju).

Općenito, izbor postupka ekstrakcije ovisi o prirodi materijala i spojeva koje treba izolirati. Prije izbora metode potrebno je utvrditi cilj ekstrakcije. Ovdje su navedeni neki od ciljeva:

- nepoznati biološko aktivni spoj,
- poznati spoj koji se nalazi u nekom organizmu,
- grupa strukturno srodnih spojeva unutar nekog organizma,
- svi sekundarni metaboliti proizvedeni iz jednog prirodnog izvora i nisu proizvedeni iz drugog "kontrolnog" izvora (npr. dvije vrste istog roda ili ista vrsta uzgojena u različitim uvjetima), i
- identifikacija svih prirodnih spojeva prisutnih u organizmu radi određivanja kemijskog otiska organizma (engl. chemical fingerprinting) ili radi metabolomičke studije.

Odabir otapala na početku procesa ekstrakcije tipično se temelji na različitoj polarnosti:

- ekstrakcija polarnim otapalima (npr. n-butanol),
- ekstrakcija otapalima srednje polarnosti (etil-acetat, diklormetan, itd.), i
- ekstrakcija nepolarnim otapalima (n-heksan, petroleter, kloroform, itd.) (Satyajit *i sur.*, 2005.).

Nakon obavljenih početnih eksperimenata ekstrakcije različitim otapalima te na temelju rezultata analize dobivenih ekstrakata, odabere se najpovoljnije otapalo. To se jedino ne radi u slučajevima kada je evidentno da različita otapala ekstrahiraju različite komponente prisutne u određenom prirodnom izvoru, tj. djeluju selektivno na jedan spoj ili grupu spojeva. Prilikom izbora postupka ekstrakcije prirodnih spojeva iz mikroorganizama potrebno je uzeti u obzir da su mikrobni metaboliti često proizvedeni u vrlo niskim koncentracijama, a pojedini soj mikroorganizma može proizvesti složenu smjesu spojeva. Metaboliti mogu biti potpuno ili djelomično eksprimirani u fermentacijsku kominu (ekstracelularno) ili se mogu nalaziti unutar stanice (intracelularno). Naravno, ukoliko se očekuju kemijski spojevi određenog tipa tada je moguće osloniti se na već objavljene protokole. Postupak je još složeniji ukoliko je cilj ekstrahirati što je moguće više metabolita ili ukoliko se radi o novom soju mikroorganizma jer su i njegovi metaboliti najčešće nepoznati.

Postoje različiti pristupi za izolaciju mikrobnih metabolita iz fermentacijskih komina. Ukoliko se metaboliti koji nas zanimaju nalaze i intracelularno i ekstracelularno, potrebno je ekstrahirati cjelovitu fermentacijsku kominu. U nekim slučajevima, fermentacijsku kominu se može prije ekstrakcije i liofilizirati (Funayama *i sur.*, 1989.; Cao *i sur.*, 2002.). Ekstrakcija je jednostavnija kada se metaboliti nalaze samo u fermentacijskoj komini te su adsorbirani na ili se nalaze unutar stanice. Slijedeći heurističke principe da se prvo uklanjaju one nečistoće kojih ima najviše, ili one koje se najlakše mogu ukloniti, preliminarno uklanjanje fizikalnih onečišćenja (stanica, staničnih ostataka, netopljivih sastavnih dijelova hranjivog medija) filtracijom ili centrifugiranjem ima svojih prednosti, pogotovo ako se metaboliti nalaze u fermentacijskoj komini. Ekstrakcija spojeva tada se provodi miješanjem fermentacijske komine (vodene faze) s organskim otapalom s kojim se slabo miješa (Machida *i sur.*, 2001.; Liu *i sur.*, 2003.). Promjenom pH vrijednosti vodene faze i odabirući učinkovito otapalo,



metaboliti koji nas zanimaju se mogu selektivno ekstrahirati ovisno o njihovom koeficijentu raspodjele i pKa vrijednosti.

### 2.3.1.2. Adsorpcija

Adsorpcija je proces koji se zbiva kada se tvari iz plinovite ili tekuće faze akumuliraju (vežu) na površini čvrste ili tekuće faze (adsorbent), stvarajući molekularni ili atomski film (adsorbat). Adsorpcija se često koristi u industriji kao npr. u pročišćavanju voda kada se organska onečišćenja vežu na aktivni ugljen ili sintetske smole. Postupci adsorpcije također se mogu upotrijebiti za ekstrakciju sekundarnih metabolita iz fermentacijske komine. Pri tome se koristi činjenica da će većina sekundarnih metabolita biti zadržana kada se fermentacijski medij (vodena otopina) propušta kroz kolonu napunjenu hidrofobnim adsorbentom. Zatim slijedi ispiranje vodom kako bi se isprale anorganske soli i vrlo polarni materijal (korak odsoljavanja), a zatim se provodi elucija organskim otapalom (npr. metanol, aceton i dr.) ili vodenom smjesom organskih otapala čime se dobiva ekstrakt bogat sekundarnim metabolitima (Shiono *i sur.*, 2004.; Yun *i sur.*, 2002.). Adsorbens se katkada može dodati neposredno u fermentacijsku kominu kako bi metaboliti bili "uhvaćeni" čim su proizvedeni (Gerth *i sur.*, 1994.; Lee *i sur.*, 2003.). Kao adsorbensi najčešće se upotrebljavaju silikagel obrnute faze (npr. C18 silikagel), ionski izmjenjivači, mediji koji razlučuju prema veličini (Sephadex G-25) te neionski stiren-divinil benzen polimerni materijali [npr. Amberlit XAD-16, XAD-2, XAD-1180 (Rohm & Haas) te Diaion HP20 i HP 21 (Mitsubishi)]. Za još jače vezivanje može se upotrijebiti brominirani polistiren [Sepabeads SP-107 (Mitsubishi)].

### 2.3.2. Kromatografija

Kromatografija na stupcu ili kolonska kromatografija, LPLC (engl. Low Pressure Liquid column Chromatography) predstavlja jednu od važnijih tehnika u separaciji komponenata iz složenih smjesa kao što su ekstrakti prirodnih produkata. Prema literaturi, kromatografija se definira kao fizikalna metoda razdvajanja (separacije) u kojoj su komponente, koje se trebaju razdvojiti, raspodijeljene između dviju faza, jedne koja je nepokretna (stacionarna) i druge koja prolazi kroz nepokretnu fazu u određenom smjeru (mobilna faza) (Satinder, 2003.). Različiti separacijski mehanizmi ostvaruju se odabirom različitog materijala za stacionarnu i mobilnu fazu.

### 2.3.2.1. Separacijski procesi

Separacija se ostvaruje selektivnom distribucijom komponenta između mobilne i stacionarne faze. Postoje, međutim, brojni faktori koji se odnose na fizikalno-kemijska svojstva mobilne i stacionarne faze te analita, a kontroliraju razne interakcije između analita i ove dvije faze. Brojnost mogućih interakcija između analita i stacionarne faze (adsorbenta) ovisi o veličini čestica stacionarne faze – što je veća površina stacionarne faze veći je broj interakcija. Stacionarna faza s velikom površinom može osigurati bolju separaciju (Satyajit *i sur.*, 2005.). Raspodjela uzorka između dviju faza određena je konstantom ravnoteže, a naziva se još i koeficijentom raspodjele (distribucije),  $K$ . Ravnoteža je dinamički proces, a molekule komponenta prelaze iz jedne u drugu fazu tako da se u prosjeku njihove koncentracije ravnaju prema zakonu raspodjele:

$$K = c_s / c_M \quad (2.2)$$

gdje su  $c_s$  i  $c_M$  koncentracije analita u stacionarnoj i mobilnoj fazi. Konstanta ravnoteže ovisna je o kemijskim svojstvima sustava (Satinder, 2003.).

Budući da su molekule analita zadržane interakcijama s površinom stacionarne faze, separacija se temelji uglavnom na razlici afiniteta adsorpcije molekula analita prema površini stacionarne faze. Veličina adsorpcije molekula analita na površinu stacionarne faze određena je brojnim faktorima, npr. vodikove veze, van der Waalsovima silama, dipol-dipol interakcijama, kiselo-baznim svojstvima, kompleksiranjem, prijenosu naboja, itd. Ostvarena retencija analita najčešće je rezultat kombinacije navedenih interakcija, koje su reverzibilne. Odabir pogodne stacionarne i mobilne faze najvažnije je za ostvarivanje optimalne separacije komponenta iz smjese, maksimizirajući povrat (engl. recovery) analita i izbjegavanje nereverzibilne adsorpcije analita na stacionarnu fazu (Satyajit *i sur.*, 2005.).

### 2.3.2.2. Tipovi stacionarnih faza

Silikagel je u tekućinskoj kromatografiji (LPLC) stacionarna faza koja se najčešće upotrebljava za separaciju prirodnih produkata i može biti komercijalno dostupna u više oblika. Površina silikagela je blago kisela, pa stoga postoji težnja k preferiranoj adsorpciji jako bazičnih supstancija u odnosu prema adsorpciji na neutralni ili bazični adsorbent. Površina silikagela sastoji se od izloženih silanolnih skupina a hidrosilne skupine čine aktivne centre. Polarne komponente koje sadrže karboksilne kiseline, amine ili amide jako se

vežu na silikagel. Nепolarne komponente koje nemaju polarnih skupina, tj. imaju malo ili uopće nemaju mjesta za ostvarivanje vodikovih veza, slabo su vezane na silikagel, te je njihova retencija mala ili je uopće nema. Retencija pojedine komponente također ovisi i o polarnosti mobilne faze. Što je veća sposobnost mobilne faze da stvara vodikove veze, to će se bolje eluirati polarne komponente iz smjese na kolonama punjenim silikagelom. Polarna otapala koja se najčešće upotrebljavaju su etil acetat, metanol i acetonitril. Manje polarna i nepolarna otapala (pentan, heksan, diklormetan) upotrebljavaju se za eluciju nepolarnih komponenata. Ponekad se i male količine vode u organskom otapalu mogu upotrijebiti za eluciju jako adsorbiranih komponenata na silikagelu. U tom slučaju treba paziti da pH vrijednost mobilne faze bude manja od 7, jer u protivnom može doći do otapanja silikagela i time do mogućeg onečišćenja eluata. Silikagel se može kemijski modificirati kako bi se promijenila njegova fizikalna i kemijska svojstva te kromatografske karakteristike. Svrha ovih površinskih modifikacija silikagela je zaklanjanje aktivnih silanolnih skupina vezanjem organskih liganada na dostupna mjesta adsorbenta. Ovi organski ligandi odgovorni su za specifične površinske interakcije. Tako silanolne skupine mogu biti blokirane različitim silikloridima kako bi se dobio ili nepolarni kromatografski medij (obrnuta faza) ili medij srednje polarnosti (vezana normalna faza). Na silikagel se mogu vezati ligandi različitih funkcionalnosti (Cazes, 2004.; Snyder i Kirkland, 1979.). Praktična preparativna upotreba ovih vezanih faza silikagela u LPLC je ipak ograničena zbog njihove visoke cijene. Ovakve se faze više upotrebljavaju u analitičkoj kromatografiji, iako ih visoka rezolucija i selektivnost različitih tipova stacionarnih faza čini vrlo prikladnim za primjenu u LPLC.

### **2.3.2.3. Tekućinska kromatografija normalne faze**

U tekućinskoj kromatografiji normalne faze, NPLC (engl. Normal Phase Liquid Chromatography) polarna stacionarna faza je u međusobnom djelovanju s mobilnom fazom male polarnosti. Interakcije polarnih skupina u analitu (npr. hidroksi, keto, amino, amido, ester, eter ili merkapti) i polarna strana površine dominiraju mehanizmom retencije. Polarne i kisele silanolne skupine podliježu dipolnim i vodikovim vezama i kiselo-baznim interakcijama.

### **2.3.2.4. Tekućinska kromatografija obrnutih faza**

U tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza, RPLC (engl. Reversed Phase Liquid Chromatography) nepolarna stacionarna faza je u međusobnom djelovanju s polarnom, obično

smjesom vodeno-organskom mobilnom fazom. RPLC se najčešće primjenjuje za analite koji se mogu otopiti u vodeno-organskim eluensima. Materijali od kojeg je većinom izrađena stacionarna faza je alkilno modificirani silikagel te polistiren-divinilbenzen (PS-DVB) polimeri (alkilni ligandi vezani na aromatske prstenove). Pokretačke sile za ostvarivanje retencije jesu:

- disperezivne interakcije između nepolarnih liganada s površine i nepolarnih komponenata u analitu, te
- "hidrofobni efekt", tj, nastojanje da se minimizira narušavanje strukture vode.

### 2.3.2.5. Kromatografija isključenjem prema veličini

Kromatografska tehnika koja komponente razdvaja na temelju razlike u njihovoj veličini, naziva se kromatografija isključenjem prema veličini, SEC (engl. Size-Exclusion Chromatography). Ukoliko se pri tome umjesto vodenih otopina koriste organska otapala, tada se ta tehnika još naziva i gel permeacijska kromatografija, GPC (engl. Gel-Permeation Chromatography). Osnovni princip SEC i GPC je razdvajanje molekula prema njihovom hidrodinamičkom volumenu (veličini) i obliku. Stacionarne faze su neadsorbirajuće porozne čestice s porama približno istih veličina kao i veličina molekula koje treba razdvojiti. Velike molekule ne mogu ući unutar pora, molekule srednje veličine mogu djelomično dok male molekule mogu slobodno zalaziti u pore medija. Funkcija medija je da omogući kontinuirano smanjenje dostupnosti molekula čija se veličina povećava. Između stacionarne faze i komponenata ne postoje interakcije, a separacija se odvija na temelju molekulske veličine i oblika molekula analita. Rezultat toga je da se s kolone prvo eluiraju molekule većih molekulskih masa, a zatim one manjih. Budući da je stacionarna faza inertna, povrat uzorka na ovakvom tipu kolona je velik (Satyajit *i sur.*, 2005.).

Jedan od najčešće upotrebljivanih materijala za stacionarnu fazu danas su inertni polimeri od ugljikohidrata. Umreženi polisaharidi, najčešće se upotrebljava dekstran, proizvode tri-dimenzijske mreže od kojih se mogu dobiti čestice s različitom veličinom pora pogodnim za SEC. Za pročišćavanje prirodnih produkata najčešće se upotrebljavaju Sephadex G-10 i G-15 gelovi. Isto tako dostupni su gelovi prilagođeni za rad s organskim otapalima poput dimetilformamida, dimetilsulfoksida, etilen-glikola i vodene otopine metanola. Najčešće upotrebljavan gel za separaciju prirodnih produkata, pogotovo nepolarnih ili spojeva srednje polarnosti, je Sephadex LH-20. On predstavlja hidroksipropilirani oblik Sephadex G-

25. Ova derivatizacija povećala je lipofilnost gela, a istovremeno zadržala njegovu hidrofilnost. Kao rezultat ove dodane lipofilnosti, LH-20 dovoljno bubri u organskim otapalima i omogućava procesiranje prirodnih produkata topljivih u organskim otapalima. Pored gelova dobivenih iz ugljikohidrata još se upotrebljavaju i mediji proizvedeni od poliakrilamida (Bio-Gel P gelovi) koji se mogu koristiti za pročišćavanje makromolekulskih prirodnih spojeva, npr. ugljikohidrata, peptida i tanina (Satyajit *i sur.*, 2005.).

### 2.3.2.6. Tankoslojna kromatografija

Pojam tankoslojne kromatografije, TLC (engl. Thin Layer Chromatography) u stručnu literaturu je uveo E. Stahl 1956. godine, a označava kromatografski separacijski proces u kojem se stacionarna faza nanosi u tankom sloju na čvrsti nosač (Hahn-Deinstrop, 2007.). Glavni razlog za široku primjenu ove tehnike je kvaliteta informacija dobivena u vrlo kratkom vremenu. Rutinski se koristi u mnogim laboratorijima u kemijskoj i farmaceutskoj industriji za obavljanje kvalitativnih ali i semikvantitativnih zadataka. Osnovni preduvjet je da spoj ili smjese spojeva (ekstrakti) koji se analiziraju budu topljivi u otapalu ili smjesi otapala. Općenito, metoda TLC se upotrebljava kada:

- su supstance nehlapive ili slabe hlapivosti,
- se veći broj uzoraka mora analizirati istovremeno, jeftino i unutar određenog vremenskog roka,
- uzorci koji se analiziraju mogu oštetiti LC ili GC kolone,
- se supstance koje se analiziraju ne mogu detektirati LC ili GC metodama ili samo uz velike poteškoće, te kada
- se komponente iz smjese nakon separacije moraju detektirati pojedinačno ili se moraju podvrgnuti različitim metodama detekcije za redom (npr. u probiru lijekova), i dr.

Metoda TLC se također može upotrebljavati i kao preparativna tehnika za izolaciju i pročišćavanje komponenata koje nas zanimaju. Sloj sorbenta korišten za ovu svrhu je deblji nego na normalnoj TLC ploči, a razlozi korištenja TLC metode u preparativne svrhe je taj što su za razvoj i provedbu metode potrebni minimalno vrijeme i troškovi investiranja. Položaj zone (mrlje) na tankoslojnom kromatogramu može se opisati pomoću *retencijskog faktora*,  $R_f$ , koji je definiran kao kvocijent dobiven dijeleći udaljenost između zone i startne linije s udaljenošću fronte otapala od startne linije:

$$R_f = \frac{Z_s}{Z_F - Z_0} \quad (2.3)$$

$R_f$  – retencijski faktor

$Z_s$  - udaljenost između zone i startne linije (mm); mjeri se do sredine zone

$Z_F$  - udaljenost fronte otapala od linije nivoa otapala (mm)

$Z_0$  - udaljenost nivoa otapala od startne linije (mm)

Retencijski faktor ne daje informacije o upotrebljenom kromatografskom procesu ili pod kojim je uvjetima rezultat ostvaren.  $R_f$  vrijednost je uvijek  $\leq 1$ . Često se ova vrijednost množi sa 100 i navodi kao cijeli broj te kao takav služi za kvalitativni opis tankoslojnih kromatograma. Slijedeći parametar važan za korisnike metode TLC je *konstanta protoka* ili *konstanta brzine* ( $\kappa$ ), a predstavlja brzinu migracije fronte otapala. On služi za izračunavanje vremena potrebnog za razvoj kromatograma TLC kod različitih udaljenosti separacije uz konstantni sorbent, sustav otapala, tip komore i temperaturu. Konstanta protoka definirana je slijedećim izrazom:

$$\kappa = \frac{Z_F^2}{t} \quad (2.4)$$

gdje je:

$\kappa$  - konstanta protoka ( $\text{mm}^2/\text{s}$ ),

$Z_F$  - udaljenost fronte otapala od linije nivoa otapala (mm)

$t$  – vrijeme trajanja razvoja kromatograma (s)

Valja napomenuti da konstanta protoka ovisi i o površinskoj napetosti i viskoznosti sustava otapala (što je veća viskoznost i manja površinska napetost sustava otapala, manja je brzina migracije fronte otapala).

*Stacionarne faze za TLC:* postoje brojne stacionarne faze koje omogućavaju provedbu različitih načina kromatografije. Materijal za prevlačenje općenito se nanosi kao tanak sloj (npr. 250  $\mu\text{m}$  debljine sloj silikagela) u pogodnom otapalu na staklenoj ploči (20  $\times$  20 cm). Većina najčešće upotrebljivanih ploča TLC dostupno je komercijalno pa ih nije potrebno pripremiti u laboratoriju. U konvencionalne metode TLC stacionarna faza obično je silikagel, a mobilna faza je sastavljena od smjese otapala. Suprotno uvriježenom vjerovanju, separacija metodom TLC nije samo zbog adsorpcije na silikagelu. Budući da silikagel uvijek sadrži

određenu malu količinu vode, ta se metoda ponaša kao sredstvo raspodjele. Nadalje, otapala mobilne faze adsorbirana su na silikagel tijekom razvoja kromatograma i tako omogućavaju drugi mehanizam adsorpcije. Ionska mjesta na silikagelu dozvoljavaju ionsku izmjenu, dok se zbog nečistoća metala prisutnih u silikagelu omogućava odvijanje miješanih mehanizama tijekom određene separacije. Različiti se materijali, međutim, upotrebljavaju za prevlačenje ploča TLC kako bi se omogućili različiti načini kromatografije (Satinder, 2003.):

- adsorpcija – silikagel, aluminij oksid, dijatomejska zemlja,
- raspodjela – celuloza, dijatomejska zemlja, silikagel,
- ionska izmjena – celulozni fosfat, polietilimin celuloza, DEAE celuloza,
- izlučivanje prema veličini molekula – Sephadex G-25/50/75/100, i
- mješoviti način:
  - ploče TLC presvučene poliamidima - *e*-polikaprolaktam, acetilirani *e*-polikaprolaktam, poliakrilonitril,
  - ploče TLC na normalnoj fazi – većina separacija na silikagelu uz upotrebu relativno nepolarne mobilne faze; i adsorpcija i raspodjela zastupljene su u ovim separacijama,
  - ploče TLC na obrnutoj fazi – separacije se temelje većinom na mehanizmu raspodjele; ovakve ploče TLC mogu se upotrebljavati za dobivanje izvrsnih separacija ili mogu pomoći u potrazi za i optimiranju mobilne faze za metodu HPLC jer se ove stacionarne faze često upotrebljavaju i za metodu HPLC.

Tijekom pripreve ploča TLC, stacionarnoj fazi se dodaju aditivi koji joj pomažu u prijanjanju na nosač. Oni će, također, međusobno povezati i čestice stacionarne faze. Isto tako, stacionarnoj fazi se mogu dodati i tzv. *fluorescentni indikatori*, npr. manganom aktivirani cink-silikat. Veličina čestica indikatora ne prelazi veličinu čestica sorbenta. Izlaganjem ovakve ploče TLC UV svjetlu kratkih valnih duljina ( $\lambda = 254$  nm) izaziva se žuto-zelena emisija. Kiselo-stabilni fluorescentni indikatori u sloju modificiranog silika gela kada se ozračuje UV svjetlom emitiraju blijedo plavu boju. Prednost ovih indikatora je u tome da će sve UV aktivne supstance (one s konjugiranim  $\pi$ -elektronskim sustavom poput aromatskih spojeva) kada se kromatogram izloži UV svjetlu kratkih valnih duljina, postati vidljive kao tamne zone na svijetloj emitirajućoj podlozi. Valja napomenuti da, isto tako, postoje i fluorescentni indikatori koji emitiraju plavo, žuto-zeleno ili crveno svjetlo kada se izlože UV zračenju većih valnih duljina ( $\lambda = 366$  nm). Za određene separacije često je neophodno

impregnirati sloj sorbenta s otopinom anorganskog ili organskog sredstva, npr. za određivanje tetraciklinskih antibiotika upotrebljava se otopina EDTA. Impregnirane ploče TLC za neke aplikacije se mogu nabaviti komercijalno, dok ih za ostale korisnik mora sam pripremiti.

*Aplikacija uzorka:* uzorak je obično otopljen u nekom lakohlapivom otapalu (preporuka je da se ono u potpunosti ukloni prije početka razvoja kromatograma). Otopina uzorka od 10 – 100  $\mu\text{L}$  se nanese na analitički TLC na visini od oko 2 cm iznad baze ploče, u obliku kruga malog promjera. O količini nanešenog uzorka ovisi mogućnost detekcije komponenata i mogućnost razvlačenja zone. Prikladna priprema, a zatim i aplikacija uzorka, među najvažnijim su zahtjevima za ostvarivanjem izvrsnih svojstava metode TLC.

*Mobilne faze:* odabir mobilne faze ovisi o načinu (mehanizmu) kromatografije koji će se upotrijebiti za određeni uzorak. Pored odabira stacionarne faze, mobilna faza predstavlja čimbenik s najvećim utjecajem na tankoslojni kromatogram. Kod kromatografije s mehanizmom adsorpcije može se upotrijebiti jedno otapalo iz eluotropne serije (različiti sustavi otapala poredani prema njihovoj kromatografskoj jakosti), iako se češće upotrebljava smjesa otapala nego samo jedno otapalo. Najlakši način mijenjanja relativne adsorpcije uzorka (i  $R_f$  vrijednosti, odnosno brzinu migracije) je promijeniti otapalo: jaka (polarna) otapala smanjuju adsorpciju, a slaba (nepolarna) je povećavaju. Kisele i bazične komponente mogu pomoći u daljnjem poboljšanju separacije.

Sustav otapala trebao bi osiguravati slijedeća primarna svojstva:

- otapati smjesu supstancija,
- prenositi supstancije kroz sloj sorbenta,
- ostvarivati  $R_f$  vrijednosti srednjeg raspona ili što je moguće bliže ovom rasponu, i
- pružati odgovarajuću selektivnost za supstancije koje treba međusobno razdvojiti.

Jednostavnost korištenja, brzina i mala cijena metodu TLC čine svestranom i naširoko primjenjenom tehnikom koja se može lako naučiti. Dok popularnost tehnike HPLC postaje sve veća kao metoda za završno pročišćavanje frakcija ekstrakata za dobivanje pročišćenog prirodnog spoja, metoda TLC i dalje ima centralno mjesto u izolaciji i pročišćavanju prirodnih produkata. Također, metodu TLC se može lako povezati s biološkim testovima pa će vjerojatno i mnogi testovi inhibicije enzima koji koriste kolorimetrijske promjene na ploči TLC biti razvijeni kao prvi jednostavni testovi za određivanje biološke aktivnosti.



## 2.4. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije

Kako je već bilo navedeno, prirodni produkti mogu biti vrlo složenih struktura. Određivanje takvih struktura zahtijeva spektroskopska znanja i bogato iskustvo u kemiji prirodnih spojeva. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) najinformativnija je od svih spektroskopskih metoda koje se u tu svrhu upotrebljavaju. Fenomen nuklearne magnetske rezonancije prvi put je primijećen 1946. godine, a spektroskopija NMR rutinski se primjenjuje u organskoj kemiji od 1960. godine. Od tada je ova tehnika uznapredovala do te razine da je gotovo postala znanost sama za sebe. Srećom, ova tehnika se može primijeniti u većini slučajeva određivanja strukture i bez pomoći eksperata za NMR.

Efekt spektroskopije NMR temelji se na prirodnom svojstvu da neke atomske jezgre posjeduju nuklearni spin ( $I$ ), a zbog postojanja spina ove se jezgre ponašaju poput magnetskih štapića. Kada se na ove jezgre primjeni magnetsko polje, one se u njemu mogu orijentirati u  $2I + 1$  smjera. Jezgre s neparnim masenim brojem imaju nuklearne spinove od  $1/2$  ili  $3/2$  ili  $5/2$  itd. Tako  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ , koje su u primjeni spektroskopije NMR najvažnije, imaju nuklearne spinove od  $1/2$ . To znači da u primjenjenom magnetskom polju mogu zauzeti jednu od dvije orijentacije – onu niže energije, koja je u smjeru primjenjenog polja, ili orijentaciju više energije koja je suprotna orijentaciji primjenjenog magnetskog polja. Razlika u broju jezgara koje se nalaze u stanju niže energije i broju jezgara koje se nalaze u stanju više energije određena je Boltzmanovom raspodjelom. Kada se na ovakav sustav primjeni radiofrekvencijski signal, raspodjela jezgara u magnetskom polju se mijenja ukoliko se primjenjena radiofrekvencija podudara s frekvencijom na kojoj nuklearni magnet prirodno precesira u određenom magnetskom polju - neke od jezgara na nižem energetsom stanju promovirane su u stanje više energije. Stoga je frekvencija rezonancije ovisna o jačini primjenjenog magnetskog polja i o prirodi jezgre koja se ispituje. U magnetskom polju jakosti 2,35 Tesla (23,49 kilogaussa) jezgra  $^1\text{H}$  rezonira pri frekvenciji od 100 MHz, a jezgra  $^{13}\text{C}$  rezonira pri frekvenciji od 25,14 MHz. Što je veća jakost primjenjenog magnetskog polja, ostvariti će se veća razlika između broja jezgara na nižem i višem energetsom stanju (Williams i Fleming, 1997.).

Spektar NMR se snima (mjeri) na jedan od dva načina. U tradicionalnoj metodi kontinuiranoga vala, CW (engl. Continuous Wave), mali dio primjenjenog radiofrekvencijskog signala apsorbiran je promovirajući neke jezgre u stanje više energije, a ova razlika zabilježena je instrumentom NMR. Spektar je snimljen kao apsorbancija ( $y$  os, raste

prema gore) u ovisnosti o frekvenciji (x os, raste od desna prema lijevo). U modernoj metodi Fourier transform (FT) NMR, radio-frekvencijski signal primjenjuje se kao snažan puls koji pokriva cijelo frekvencijsko područje karakteristično za jezgru koja se ispituje. FT-NMR tehnikom postiže se bolja rezolucija i osjetljivost, pa se metoda kontinuiranog vala praktično više i ne primjenjuje. Točna frekvencija pri kojoj svaka jezgra tj. svaki atom dolazi u rezonanciju nije određena samo primjenjenim magnetskim poljem, već također i minimalnim razlikama u magnetskom okruženju koje osjeti svaka jezgra. Ove minimalne razlike najviše su uzrokovane varijacijama u elektronskoj gustoći u susjedstvu svake jezgre, što dovodi do toga da će svaki kemijski različit atom u strukturi molekule doći u rezonanciju pri različitoj frekvenciji od ostalih atoma. Elektroni utječu na mikrookruženje stoga jer njihovo kretanje (spin) stvara magnetsko polje. Budući da je rasap frekvencija uzrokovan različitim kemijskim, tj. magnetskim okruženjem, opisuje se da signali imaju *kemijski pomak* prema nekoj standardnoj frekvenciji. Kada se ova razlika u frekvenciji signala ( $\nu_s$ ) i standarda ( $\nu_{\text{TMS}}$ ) podijeli s radnom frekvencijom (u MHz) dobije se broj koji je neovisan o primjenjenom magnetskom polju i koji se nalazi u povoljnom rasponu. Kontrolni standard je uvijek tetrametilsilan (TMS), a kemijski pomak  $\delta$  se definira kao položaj u spektru NMR pri kojem dolazi do rezonancije pojedine jezgre u njenoj molekulskoj okolini (Pine, 1994):

$$\delta = \nu_s \text{ (Hz)} - \nu_{\text{TMS}} \text{ (Hz)} / \text{radna frekvencija (MHz)} \quad (2.5)$$

Tako će parametar  $\delta$ , koji mjeri položaj signala, uvijek biti isti bez obzira na jakost uređaja na kojem se spektar snima. Ovaj parametar nema jedinicu, a izražava se kao frakcija primjenjenog polja u dijelovima na milijun (ppm). Čimbenici koji utječu na kemijski pomak mogu biti intramolekulski (induktivni efekt, anizotropija kemijskih veza) te intermolekulski (vodikove veze, temperatura, otapalo). Ukoliko susjedna jezgra posjeduje spin, taj će spin utjecati na magnetsko okruženje promatrane jezgre, a signal koji je detektiran neće biti jednostavan singlet, već multiplet čija složenost ovisi o prirodi i broju susjednih atoma. Za ovu pojavu se kaže da su atomi *spin-spin* spregnuti, a razlika signala u Hz se naziva *konstanta sprege*,  $J$ . Konstanta sprege dalje se kvalificira kao sprega preko jedne veze, ( $^1J$ ), preko dviju veza ( $^2J$ ) itd. Iznos konstante sprege je informativan i prvenstveno ovisi o geometriji veza oko promatranog atoma te o prisustvu elektronegativnih atoma (pomiču vrijednost konstanti sprege prema gornjim granicama područja). Magnetske jezgre također mogu ostvariti interakciju kroz prostor, no ova interakcija ne dovodi do sprezanja. Interakcija kroz prostor se

ostvaruje tako da se jedna jezgra ozrači njenom rezonantnom frekvencijom, a druga jezgra se detektira kao jači ili slabiji signal od normalnog. Ova pojava se naziva *nuklearnim Overhauserovim efektom* (NOE). Efekt NOE se primjećuje pri kratkim udaljenostima, približno 2-4 Å i opada rapidno kako se udaljenost između jezgara povećava.

### 2.4.1. Dvodimenzijaska nuklearna magnetska rezonancija

Dva ključna jednodimenzijaska (1D) eksperimenta NMR u određivanju strukture molekula pružaju informacije o povezanosti različitih skupina ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  i  $\text{CH}$ ) u molekuli (preko informacija o svim sprezanjima između ovih atoma) te o mnogim prostornim odnosima atoma u molekuli (NOE). Oba ova pojedinačna eksperimenta NMR mogu se provesti u dvodimenzijaskoj spektroskopiji NMR (2D NMR) pri čemu se istovremeno ozračuju i detektiraju svi prijelazi u spinskom sustavu. Dok standardni spektar 1D NMR prikazuje ovisnost intenziteta pikova o frekvenciji, u dvodimenzijaskom spektru intenzitet se prikazuje u ovisnosti o dvjema frekvencijama, uobičajeno navedenim kao  $F1$  i  $F2$ . Postoji nekoliko načina kako se ovaj spektar može grafički prikazati:

- panoramski ili pseudotrodimenzijski prikaz,
- konturni prikaz,
- presjeci, i
- projekcije.

Najčešće upotrebljavani prikaz je kada se intenziteti pikova crtaju kao linije kontura poput onih na topografskim mapama, a omogućava lako očitavanje frekvencija.

Tri su osnovne kategorije 2D spektroskopije NMR:

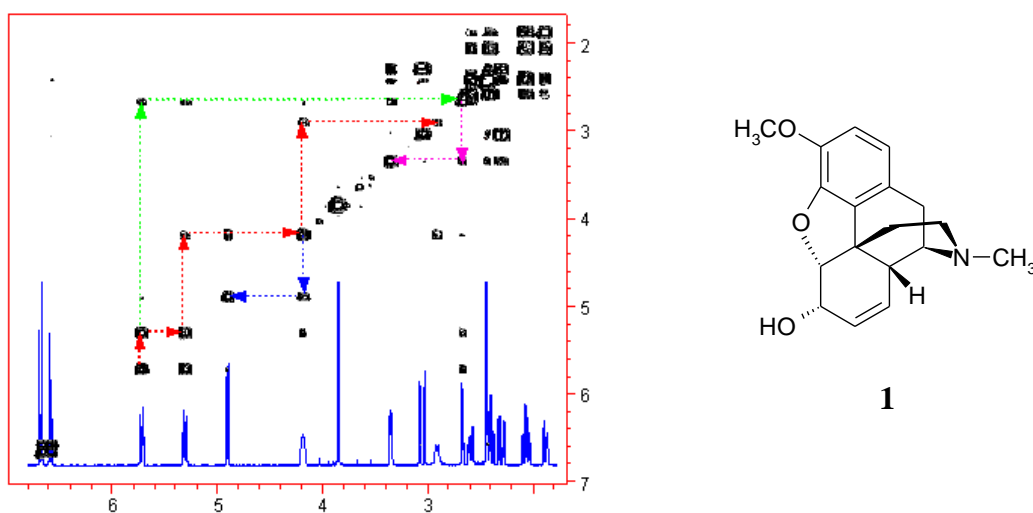
- spektroskopija korelacije kemijskih pomaka,
- spektroskopija razdvajanja sprege spin-spin, i
- spektroskopija višestrukih kvantnih prijelaza.

Spektroskopija korelacije kemijskih pomaka u rutinskoj je upotrebi, dok se preostale dvije upotrebljavaju za rješavanje manje-više specifičnih situacija u određivanju strukture

složenih molekula. Navedene tehnike u tekstu koji slijedi pripadaju spektroskopiji korelacije kemijskih pomaka.

### 2.4.1.1. Spektar COSY

Eksperiment 2D koji ukazuje na sve *spin-spin* spregnute protone (homonuklearne sprege) u jednom spektru naziva se spektar COSY (engl. COrrelated SpectroscopY). U spektru COSY dvije identične osi kemijskog pomaka crtaju se okomito jedna na drugu, a dijagonala dobivene ploče u ovakvom prikazu predstavlja konture jednodimenzijskog spektra. Svi pikovi koji su međusobno *spin-spin* spregnuti prikazani su kao *unakrsni-pikovi* (konture) koji su simetrično smješteni u odnosu na dijagonalu – pik koji se nalazi u gornjem lijevom trokutu ima odgovarajući pik u donjem desnom trokutu na prikazu spektra. Koordinate svakog unakrsnog-pika su kemijski pomaci dvaju protona koji se međusobno sprežu (Williams i Fleming, 1997.). Mreža sprezanja prikazana je na slici 24 u spektru COSY molekule kodeina.



Slika 24. Spektar COSY kodeina **1** (x os  $\delta_H$  [ppm]; y os  $\delta_H$  [ppm]) (<http://www.acornnmr.com>).

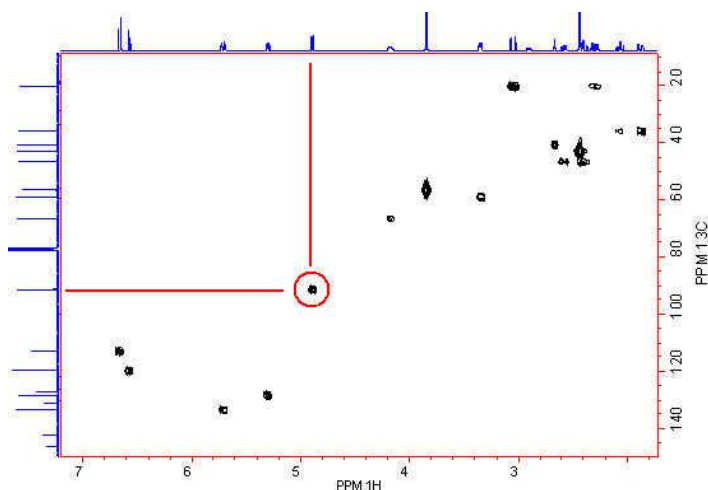
### 2.4.1.2. Spektar NOESY

Spektar 2D koji bilježi sve proton-proton signale NOE koji se zbivaju u molekuli u jednom eksperimentu naziva se spektar NOESY. Površno ga se može usporediti sa spektrom COSY, utoliko jer se na svakoj okomito postavljenoj osi nalaze kemijski pomaci protona, a normalni spektar se pojavljuje na dijagonali. Razlika je u tome što sada unakrsni-pikovi

indiciraju one protone koji su bliski u prostoru, tj. dokaz su interakcija kroz prostor, a ne kroz vezu. Dakle, spektar NOESY pruža ključne informacije o geometriji molekule.

### 2.4.1.3. Spektar $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ COSY

Kada se spektar protona poveže sa spektrom ugljika (heteronuklearne sprege), tada je moguće potpuno odrediti i protone i ugljike, tj. odrediti koji se protoni nalaze na pojedinim ugljicima. Na taj način uvelike se olakšava određivanje strukture molekule. Pored toga, pomoću osi na kojoj se nalaze ugljici može se razriješiti često nekoliko preklapajućih signala protona. Takav spektar još se naziva i spektar HMQC (engl. Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) (slika 25). Dakle, spektar HMQC prikazuje direktno povezane  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$ , a pikovi u ovom spektru predstavljaju  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  korelacije ostvarene preko jedne veze ( $^1J$ ). Spektri 1D  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektar nalaze se na osima prikaza. Kemijski pomaci protona i ugljika zapravo su koordinate svakog pika na ploči kontura, što pomaže u očitavanju pikova. Budući da je riječ o heteronuklearnom eksperimentu, dvije osi spektra su različite, a sam prikaz nije simetričan poput spektra COSY, pa tako ovdje nema pikova na dijagonali. Na slici 25 crveno je označen pik koji pokazuje da je  $^{13}\text{C}$  pik na 91,5 ppm vezan s pikom  $^1\text{H}$  na 4,9 ppm. Vrijeme potrebno za snimanje spektra HMQC ovisi o količini materijala i obično traje pola sata ili manje.

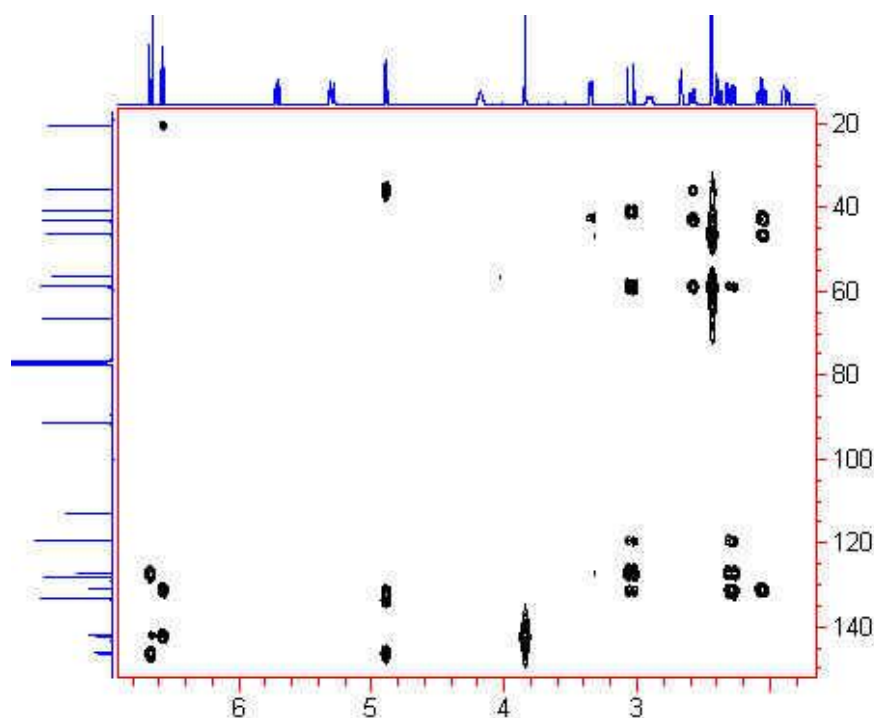


Slika 25. Spektar HMQC kodeina (x os  $\delta_{\text{H}}$  [ppm]; y os  $\delta_{\text{C}}$  [ppm]) (<http://www.acornnmr.com>).

### 2.4.1.4. Spektar $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ COSY kroz više veza

U ovom spektru kemijski pomaci ugljika povezani su s kemijskim pomacima onih protona koji su od njih razdvojeni kroz više veza, obično dvije ili tri ( $^2J$ ,  $^3J$ ). Ovakav spektar još se naziva i spektar HMBC (engl. Heteronuclear Multiple Bond Connectivity). 1D  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$

spektri prikazani su duž rubova 2D spektra. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  predstavljaju koordinate svakog pika na ploči kontura što je izrazito korisno u određivanju i slaganju kovalentne strukture molekule. Dobivene informacije predstavljaju proširenje/nadogradnju informacija dobivenih iz spektra HMQC, ali ih je složenije analizirati. Slika 26 prikazuje spektar HMBC kodeina, **1** (3,3 mg/0,65 ml  $\text{CDCl}_3$ ). 2D koordinate pikova koji se pojavljuju odgovaraju kemijskim pomacima ugljika i protona razdvojenih (obično) s dvije i/ili tri veze. Nažalost, vrijednosti sprege preko dvije i tri veze mogu se preklopiti budući da se dva seta informacija u ovom spektru ne mogu razdvojiti.



Slika 26. Spektar HMBC kodeina (x os  $\delta_H$  [ppm]; y os  $\delta_C$  [ppm]) (<http://www.acornnmr.com>).

Iako je eksperiment HMBC dizajniran tako da se priguše korelacije preko jedne veze ( $^1J$ ), u spektru se ipak mogu pojaviti i neke od njih. Kod koncentriranih uzoraka koji u sebi imaju konjugirane sustave, u spektru se mogu primijetiti i korelacije kroz 4 veze ( $^4J$ ). Za pik u spektru HMBC ne može se odmah znati kroz koliko veza je ostvarena korelacija između protona i ugljika, tj. preko koliko veza su proton i ugljik razdvojeni. Stoga je analiza spektra postupak u kojem se pokušava odrediti korelacija za sve pikove, a zatim se testira dosljednost i provjerava da niti jedna postavka ne zahtijeva nevjerojatna i nemoguća sprežavanja. Bez obzira na složenost interpretacije spektra, ova tehnika je od velike važnosti jer je sada moguće povezati cjeline na način na koji to do sada nije bilo moguće. Vrijeme potrebno za snimanje

spektra HMBC ovisi o količini materijala i može trajati od jednog do nekoliko sati (obično se snimanje obavlja preko noći).

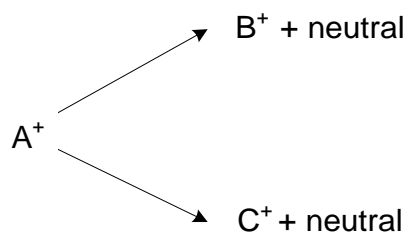
U spektroskopiji NMR postoje još brojne tehnike koje svojim povezivanjem mogu dati i više dimenzijske spektre (3D i 4D), a iz njih crpiti važne informacije za određivanje trodimenzijskih struktura relativno velikih molekula poput proteina i malih dijelova DNA.

## 2.5. Spektrometrija masa

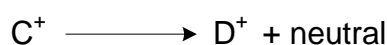
U najjednostavnijem obliku spektrometar masa dizajniran je za obavljanje tri osnovne funkcije:

- da prevede u paru spojeve čija hlapivost jako varira,
- da proizvede ione iz rezultirajuće parne faze, i
- da razdvoji ione prema njihovom odnosu mase i naboja ( $m/z$ ) te da ih nakon toga detektira i zabilježi.

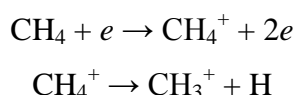
Dakle, spektrometar masa je uređaj za proizvodnju i vaganje (određivanje) iona. Uređaji koji proizvode ione iz plinske faze gotovo uvijek dodaju dostatnu vibracijsku energiju ionu koji će do neke mjere fragmentirati da bi nastao novi ion uz gubitak neutralne specije, npr:



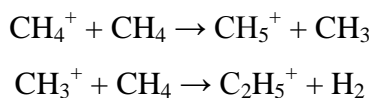
S primljenom dovoljnom vibracijskom energijom,  $\text{B}^+$  i/ili  $\text{C}^+$  mogu se i dalje razlagati (fragmentirati), npr:



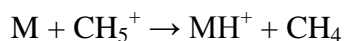
Kada se niz iona ( $A^+$ ,  $B^+$ ,  $C^+$ , itd.) razdvoji i zabilježi, kao rezultat se dobije spektar masa. Ovaj spektar predstavlja zabilješku zastupljenosti svakog iona ( $y$  os) u odnosu na vrijednost  $m/z$  ( $x$  os). Najzastupljenijem ionu dogovorno se pripisuje vrijednost 100 %. Ukoliko je  $A^+$  proizveden jednostavnom ionizacijom uzorka, tada masa  $A^+$  daje molekulsku masu uzorka. Spektri negativnih iona također se mogu proizvesti, iako se manje upotrebljavaju od spektara pozitivnih iona. Za dobivanje iona iz termalno hlapivih materijala najčešće se upotrebljava metoda *ionizacije elektronima*, EI (engl. Electron Ionization ili Electron Impact) te metoda *kemijske ionizacije*, CI (engl. Chemical Ionization). U metodi EI uzorak je preveden u plinovito stanje u dijelu spektrometra masa koji se naziva izvor iona, gdje je zatim izložen sudarima s elektronima čija je energija dovoljna da ionizira molekulu ili atom. Energija elektrona je tolika da može osim ionizacije uzrokovati i opsežnu fragmentaciju molekule što dovodi do česte odsutnosti molekularnog iona, tj. molekuli se ne može odrediti molekulsku masu. Ipak, ovo je i prednost metode EI jer fragmentacijski uzorak iona može pomoći u karakterizaciji molekule, pogotovo ako se radi o poznatom spoju čiji spektar masa već postoji i može ga se usporediti s dobivenim spektrom analiziranog uzorka. Metodom kemijske ionizacije, CI, može se izbjeći problem intenzivne fragmentacije. Naime, metoda CI je blaga metoda ionizacije koja proizvodi ione s manjim viškom energije. Kao rezultat, spektar masa je jednostavniji jer je i fragmentacija manja, a zastupljenost molekularnog iona je veća. Ionizacija se ostvaruje pomoću reagensijskog plina (metan, izobutan ili amonijak) koji ulazi u ionizacijsku komoru gdje je ioniziran pomoću elektrona velike energije, npr.:



Dobiveni ion sada se može sudariti s neutralnom molekulom. Glavne bimolekularne reakcije koje se događaju jesu:



Kada su molekule uzorka prevedene u paru u ovoj smjesi iona, ion  $\text{CH}_5^+$  se ponaša kao jaka kiselina i protonira uzorak:



Zbog toga je u spektru CI informacija o molekulskoj masi dobivena protonacijom molekula uzorka, a zabilježena vrijednost  $m/z$  je za jedinicu veća od prave molekulske mase.



---

Ostale metode koje se upotrebljavaju za određivanje molekulske mase (300 – 1000 000 daltona, Da) polarnih komponenata su *bombardiranje brzim atomima*, FAB (engl. Fast Atom Bombardment) te *ionizacija elektroraspršenjem*, ESI (engl. ElectroSpray Ionization).

Bombardiranje brzim atomima, metoda FAB, koristi atome visoke energije kako bi se raspršio i ionizirao uzorak u jednom koraku. Zraka neutralnih atoma plemenitog plina (ksenon) usmjerena je na tekući ili kruti uzorak. Udar ove zrake visoke energije uzrokuje raspršivanje (prelazak u plinovitu fazu) molekula analita te njihovu ionizaciju u jednom stupnju. Ova tehnika je prikladna za spojeve čija je molekulska masa i nekoliko tisuća daltona. Budući da za prevođenje uzorka u plinovitu fazu nije potrebno zagrijavanje, tehnika FAB također je korisna za istraživanja termalno labilnih spojeva koji se raspadaju pri drugim ionizacijskim tehnikama.

Ionizacija elektroraspršenjem, metoda ESI, često se upotrebljava za tehniku LC-MS spojeva koji su termalno labilni i velikih molekulskih masa. Elektroraspršenje se postiže primjenom visokog napona između metalne igle na ulazu i prve pregrade za usmjeravanje iona u ionizacijskoj komori. Elektroraspršenje se postiže pri tlaku koji je blizak atmosferskom pa bi se mehanizam procesa ionizacije mogao objasniti teorijom da nakon što tekućina napusti mlaznicu, na raspršenim kapima električno polje inducira naboj. Kako otapalo isparava, kapljica se smanjuje, a gustoća naboja na površini kapljice se povećava. Kapljica napokon dostiže točku u kojoj je coulomb-ovo odbijanje električnog naboja veće od površinske napetosti kapljice i tada dolazi do eksplozije kapljice i stvaranja višestruko nabijenih iona analita. Tipičan spektar ESI pokazuje distribuciju molekulskih iona s različitim brojem naboja. Budući da elektroraspršenje proizvodi višestruko nabijene ione, spojevi s velikom molekulskom masom se pojavljuju na manjim  $m/z$  vrijednostima. Ovo povećava raspon masa analizatora tako da se spojevi s velikom molekulskom masom mogu analizirati u jeftinijem masenom spektrometru.

Nakon što su proizvedeni, ioni se ubrzavaju pod djelovanjem električnog polja prema analizatoru masa. Analizator masa razdvaja ove ione prema njihovoj vrijednosti  $m/z$ . Odabir analizatora masa ovisi o njegovoj moći razdvajanja, rasponu masa, brzini skeniranja te o limitu detekcije koji je potreban za pojedine aplikacije. Povezivanjem plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS), te tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS), dobiva se snažna kombinacija u smislu određivanja strukture prirodnih ili sintetskih spojeva iz smjesa. Komponente iz složenih smjesa se razdvoje plinskom, odnosno tekućinskom

kromatografijom, a spektrometar masa se zbog visoke osjetljivosti i velikih brzina skeniranja upotrebljava za identifikaciju i kvantifikaciju pojedinih komponenata iz malih količina materijala eluiranog iz plinskog ili tekućinskog kromatografa. Metoda LC-MS se upotrebljava i za određivanje termalno labilnih spojeva koje je teško razdvojiti plinskom kromatografijom.

## 2.6. Ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija

Ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija (UV/VIS) predstavlja mjerenje valne duljine i snage ultraljubičastog/vidljivog svjetla koje apsorbira uzorak. Ultraljubičasti i vidljivi spektar organskih spojeva povezan je s prijelazima između energetske nivoa elektrona. Ultraljubičasto i vidljivo svjetlo ima dovoljnu energiju da promovira vanjske elektrone na energetski više razine. Valna duljina apsorbiranog svjetla je ona koja ima dovoljno energije potrebne za premještanje elektrona s razine niže energije (vezujuća orbitala) na razinu više energije (ne-vezujuća orbitala). Apsorbancija svjetla određena je dvama zakonima. *Lambertov* zakon tvrdi da je frakcija apsorbiranog polaznog svjetla neovisna o jačini izvora svjetla. *Beerov* zakon tvrdi da je apsorbancija razmjerna broju molekula (atoma) koje svjetlo apsorbiraju. Dakle, *Beer-Lambertov* zakon predstavlja linearni odnos između apsorbancije i koncentracije tvari koja apsorbira i može se predstaviti slijedećim izrazom:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon l c \quad (2.6)$$

gdje su  $I_0$  i  $I$  intenziteti polaznog i transmitiranog svjetla,  $l$  je duljina puta kojim svjetlo prolazi kroz otopinu,  $c$  je koncentracija tvari u otopini,  $\varepsilon$  je molarni ekstincijski koeficijent, a  $\log_{10}(I_0/I)$  je apsorbancija,  $A$ , ili optička gustoća. Budući da su pobuda elektrona, tj. apsorbancija, i povrat elektrona u osnovno stanje brzi procesi, ravnoteža se ostvaruje vrlo brzo. Zbog toga je apsorbancija UV-vidljivog svjetla kvantitativno vrlo precizna. Jednostavni linearni odnos između apsorbancije i koncentracije, te relativno lako mjerenje UV-vidljivog svjetla, učinili su spektroskopiju UV/VIS osnovom za mnoge kvantitativne analitičke metode. Spektar UV/VIS obično izražava ovisnost apsorbancije ( $A$ ) o valnoj duljini svjetla ( $\lambda$ ) i prikazuje nekoliko širokih apsorpcijskih vrpca. Zbog toga spektroskopija UV/VIS pruža ograničenu količinu kvalitativnih informacija o strukturi molekule. Većina apsorbancije organskih spojeva proizlazi iz prisutnosti  $\pi$  (nezasićenih) veza. Prisustvo apsorpcijske vrpce

na određenoj valnoj duljini često je dobar indikator prisustva kromofora. Unatoč tome, položaj apsorpcijskog maksimuma nije fiksiran, već ovisi djelomično o molekulskoj okolini kromofora te o otapalu u kojem je uzorak otopljen. Konjugacija dvostruke veze s dodatnim dvostrukim vezama povećava i intenzitet i valnu duljinu apsorpcijske vrpce. Iako UV-vidljivi spektri ne omogućavaju apsolutno određivanje nepoznatih spojeva, često se upotrebljavaju kako bi se potvrdio identitet nekog spoja ili tvari usporedbom izmjerenog spektra s referentnim spektrom.

## 2.7. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija (IR) također je važna metoda u prikupljanju informacija o strukturi i prepoznavanju kemijskih spojeva, ali služi i kao analitičko sredstvo za određivanje čistoće/kvantifikacije spojeva. Infracrveno se odnosi na dio elektromagnetskog spektra koji se nalazi između vidljivog dijela spektra i područja mikrovalova. U spektroskopiji IR organske molekule apsorbiraju infracrvenu radijaciju koja se zatim prevodi u molekulske vibracije. Postoje dva tipa molekulskih vibracija – istežanje i savijanje. Kada se energija radijacije podudara s energijom specifične molekulske vibracije tada dolazi do apsorbancije. Odnos energije radijacije, valne duljine i frekvencije definiran je slijedećim izrazom:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu} \quad (2.7)$$

gdje je  $h$  planckova konstanta ( $6,6 \times 10^{-34}$  J/s),  $\nu$  je frekvencija (Hz),  $\lambda$  valna duljina (cm), a  $c$  brzina svjetlosti ( $3 \times 10^{10}$  cm/s). Prema tome, energija je proporcionalna frekvenciji zračenja, a obrnuto proporcionalna valnoj duljini. Spektar IR tipično na svojoj x-osi umjesto valne duljine ima njenu recipročnu vrijednost, tzv. *valni broj*,  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ). Iz gore navedenog izraza slijedi da povećanje vrijednosti valnog broja odgovara povećanju energije zračenja. U spektru IR vibracije s većom energijom nalaze se na lijevo. Na y-osi se nalazi postotak transmitancije (% T), a apsorbancija energije zračenja predstavljena je kao vrpca (“udubljenje”) u krivulji spektra: nulta transmitancija odgovara apsorbanciji svjetla od 100 % pri danoj valnoj duljini. Jačine vrpce također se mogu izraziti i kao apsorbancija,  $A$ . Apsorbancija je recipročna vrijednost transmitancije:

$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) \quad (2.8)$$

Čak i jednostavne organske molekule mogu dati složene spektre IR. Složenost i valni brojevi pikova u spektru pružaju informacije o molekuli. Složenost spektra je korisna prilikom usporedbe vrpce spektra istraživane molekule sa vrpcom u spektru poznatog spoja. Valni brojevi (ponekad navedeni i kao frekvencije) pri kojima organske molekule apsorbiraju zračenje pružaju informacije o funkcionalnim skupinama koje se nalaze u molekuli. Određene grupe atoma apsorbiraju energiju i time stvaraju vrpce na približno istim valnim brojevima (frekvencijama) - tako se spektar IR analizira uz pomoć tablica koje povezuju frekvencije s funkcionalnim skupinama.

## 2.8. Antimikrobna testiranja

### 2.8.1. Minimalna inhibitorna koncentracija

Kemijska, biološka ili fizikalna testiranja neophodna su kako bi se točno odredio ciljani spoj ili spojevi iz složenih ekstrakata prirodnih spojeva. U današnje je vrijeme istraživanje prirodnih spojeva više usmjereno na ciljanu izolaciju određenih spojeva (izolacija vođena testovima), a ne više na izolaciju svih komponenata sadržanih u ekstraktu. Ciljane komponente mogu pripadati određenim kemijskim klasama spojeva i tako posjedovati određena fizikalna svojstva ili posjedovati izvjesnu biološku aktivnost. Stoga bi i prikladan test trebao biti sastavni dio protokola za ekstrakciju i izolaciju (Satyajit *i sur.*, 2005.). Provedbom testa minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) može se procijeniti i utvrditi antibakterijska (antimikrobna) aktivnost ekstrakata, frakcija ili pročišćenih komponenata. Test MIK je definiran kao najmanja koncentracija (antimikrobne) tvari koja će u potpunosti inhibirati vidljivi rast mikroorganizma nakon inkubacije preko noći (ovaj period se može produljiti za organizme poput anaeroba koji za rast zahtijevaju produljenu inkubaciju) (Andrews, 2001.; Islam *i sur.*, 2008.). Test MIK se upotrebljava u dijagnostičkim laboratorijima kako bi se potvrdila otpornost mikroorganizama prema antibioticima, ali se koristi i kao istraživačka alatka kako bi se *in vitro* odredila antimikrobna aktivnost novih spojeva. Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije opće je prihvaćeno da raspon koncentracija antibiotika bude u dvostrukim razrjeđenjima. Standardne otopine antibiotika (pročišćenih spojeva) pripremaju se u koncentraciji od 1 mg/mL, dok se standardne otopine

ekstrakata obično pripremaju u koncentracijama od 5 mg/mL. Bakterijske kulture se pripremaju inkubacijom jedne kolonije u hranjivom mediju pri 37 °C tijekom noći. Nakon uzgoja, stanice bakterija se odvajaju centrifugiranjem, a dobiveni sediment se resuspendira u fiziološkoj otopini. Suspenzija bakterija se zatim razrjeđuje na koncentraciju od  $5 \times 10^5$  CFU/mL (engl. *Colony Forming Unit*, CFU – broj mikrobnih stanica koje mogu tvoriti mikrobne kolonije). Test se zatim provodi razrjeđivanjem suspenzije mikroorganizma s otopinom antibiotika (engl. broth dilution method) koristeći mikrotitarske pločice s 96 jažica. Testovi se obično provode u triplikatu.

---

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Mikroorganizmi

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći mikroorganizmi:

- *Streptomyces rimosus* R6-500; proizvođač oksitetraciklina (Gravius i sur., 1993)
- *S. rimosus* ZGL1 (Hranueli i sur., 1995)
- *S. rimosus* ZGL5 (Hranueli i sur., 1995)

#### 3.1.2. Mikroorganizmi za antimikrobna testiranja

- *Staphylococcus aureus* ATCC 27661
- *Staphylococcus aureus* ATCC 27659
- *Staphylococcus aureus* / B 0329
- *Staphylococcus aureus* / iMLS / B 0538
- *Staphylococcus aureus* / cMLS / B 0330
- *Staphylococcus aureus* / M / B 0331
- *Streptococcus pneumoniae* / B 0541
- *Streptococcus pneumoniae* / cMLS / B 0328
- *Streptococcus pneumoniae* / M / B 0326
- *Streptococcus pyogenes* / B 0542
- *Streptococcus pyogenes* / iMLS / B 0543
- *Streptococcus pyogenes* / cMLS / B 0544
- *Streptococcus pyogenes* / B 0545
- *Moraxella chatarralis* / B 0324
- *Haemophilus influenzae* / B 0529
- *Enterococcus faecalis* / B0004
- *Escherichia coli* / B0001
- *Saccharomyces cerevisiae* / B0332
- *Streptococcus pneumoniae* / B 0627
- *Streptococcus pneumoniae* / B 0633

### 3.1.3. Hranjive podloge

- Hranjiva podloga (GR2d) za uzgoj bakterija *S. rimosus*:

<i>Dekstrin</i>	40 g
<i>CSL</i>	16 g
<i>CaCO<sub>3</sub> (kalcit)</i>	7 g
<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	2 g
<i>Mliječna kiselina</i>	1,4 mL
destilirana voda do 1 L	

Prije sterilizacije je potrebno podesiti pH na 7.5 (10% NaOH). Sterilizacija se provodi 30 minuta pri 121 °C.

- Čvrste hranjive podloge za uzgoj i čuvanje bakterija *S. rimosus*:

#### *Sladni agar (SA)*

<i>Glukoza</i>	4 g
<i>Sladni ekstrakt</i>	10 g
<i>Kvašćev ekstrakt</i>	4 g
<i>Agar</i>	20 g
destilirana voda do 1 L	

Prije sterilizacije je potrebno podesiti pH na 7.1 (10% NaOH). Sterilizacija se provodi 40 minuta pri 115 °C.

#### *Soja – manitol agar (SM)*

<i>Soja brašno</i>	20 g
<i>Manitol</i>	20 g
<i>Agar</i>	20 g
destilirana voda do 1 L	

Prije sterilizacije je potrebno podesiti pH na 7.6 (10% NaOH). Sterilizacija se provodi 30 minuta pri 121 °C.

- Hranjiva podloga za biosintezu oksitetraciklina (A-217):

<i>Dekstrin</i>	<i>100 g</i>
<i>CaCO<sub>3</sub> (kalcit)</i>	<i>5 g</i>
<i>CaCO<sub>3</sub> (socal)</i>	<i>5 g</i>
<i>CSL</i>	<i>15 g</i>
<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	<i>7 g</i>
<i>NH<sub>4</sub>Cl</i>	<i>2,5 g</i>
<i>MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O</i>	<i>2 g</i>
<i>MnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O</i>	<i>0,1 g</i>
<i>CoCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O</i>	<i>6 mg</i>
<i>NaF</i>	<i>0,1 mg</i>
<i>ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O</i>	<i>20 mg</i>
<i>Unidan</i>	<i>0,3 mL</i>
<i>BAN (α-amilaza)</i>	<i>0,04 mL</i>
vodovodna voda	do 1 L

pH je prirodni, sterilizacija 30 minuta pri 121 °C.

#### **3.1.4. Materijali korišteni za filtraciju**

- dijatomejska zemlja
- filtrirni papir (obični)

#### **3.1.5. Materijali korišteni za ekstrakciju**

- etil-acetat, p.a., Kemika
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O, p.a., Kemika
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, p.a., Kemika

#### **3.1.6. Materijali korišteni za kromatografiju**

- n-heksan, p.a., Kemika
- etil-acetat, p.a., Kemika
- metanol, p.a., Kemika



- kloroform, p.a., Kemika
- acetonitril, p.a., Merck
- octena kiselina, p.a., Kemika
- oksalna kiselina, p.a., Kemika
- kloridna kiselina, 36%-tna, Kemika
- trifluorocтена kiselina, p.a., Merck
- sumporna kiselina, 98%-tna, Kemika
- silikagel (normalne faze), silica gel 60, 43-60  $\mu\text{m}$ , Merck
- silikagel (obrnute faze), RP-18 LiChrospher 100, 12  $\mu\text{m}$ , Merck
- silikagel (obrnute faze), RP-8 LiChrospher 100, 10  $\mu\text{m}$ , Merck
- ploče TLC, Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck
- ploče TLC, RP-18F<sub>254</sub>, Merck
- Preparativne ploče TLC, silica gel 60, Merck
- Diaion HP 21, Mitsubishi Chemical Corporation
- oksiteraciklin dihidrat, Pliva
- tetraciklin hidroklorid, > 99%, Sigma
- doksiciklin hidroklorid, > 99%, Sigma

### 3.1.7. TLC i HPLC sustavi mobilnih i stacionarnih faza

Tijekom rada za analizu filtrata, ekstrakata i frakcija korištene su metode TLC i HPLC sa sustavima mobilnih i stacionarnih faza prikazanih u tablici 1.

- Otopine za HPLC:

#### Kalijev fosfatni pufer pH=2,4

Izvagati 4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i otopiti u 1700 mL MilliQ vode (voda pročišćena na Millipore aparatu, električna provodnost > 18  $\text{mS cm}^{-1}$ ). Koristeći 10%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  podesiti pH vrijednost otopine na 2,4. Prebaciti otopinu u menzuru od 2 L i dopuniti do 2 L te promiješati.

#### $\text{H}_3\text{PO}_4$ (10 %)

U odmjernu tikvicu od 1 L dodati 700 mL MilliQ vode, pažljivo dopuniti sa 100 mL fosfatne kiseline (98 %), te nadopuniti MilliQ vodom do 1 L.

#### sumporna kiselina (0,1 %)

U odmjernu tikvicu od 1 L dodati 700 mL MilliQ vode i pažljivo dodati 1 mL sumporne kiseline (96 %), te nadopuniti MilliQ vodom do 1 L.

trifluorocтена kiselina (0,1 %)

U odmjernu tikvicu od 1 L dodati 700 mL MilliQ vode i pažljivo dodati 1 mL trifluorocтene kiseline, te nadopuniti MilliQ vodom do 1 L.

Tablica 1. Kromatografski sustavi i metode za TLC i HPLC.

Oznaka metode	Stacionarna faza	Mobilna faza
TLC-A	Silikagel impregniran s 10 % EDTA, pH=7	diklormetan 59 metanol 36 voda 6
TLC-B	Silica gel 60	kloroform 9 metanol 1 voda/octena kiselina 0,1
TLC-C	Silica gel RP-18 <sub>F254s</sub> (Merck)	acetonitril 1 metanol 4 0,2 M oksalna kiselina 4
HPLC-A	Kolona: Symetry; RP-C18; 250×4,6 mm; 5µm (Waters) 1 mL/min	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH=2,4); acetonitril: 20 % tijekom 5 min 50 % do 14 min 20% od 15 do 20 min
HPLC-B	Kolona: Zorbax Eclipse XDB-C8; 150×4,6 mm; 3,5µm (Agilent); 0,5 mL/min; UV 270 nm	voda/sumporna kiselina (pH=2,2); acetonitril: 15 – 60 % u 10 min 60 % od 10 do 15 min 15% od 15 do 20 min
SP-HPLC	Kolona: Symetry; RP-C18; 300×7,8 mm; 5µm (Waters) 2,0 mL/min; UV 270 nm	voda/sumporna kiselina (pH=2,2); acetonitril: 35 % do 3 min 70 % od 3 do 25 min 35% od 25 do 30 min

## 3.2. OPREMA

### 3.2.1. Instrumenti

Eksperimentalni dio proveden je koristeći sljedeću glavnu opremu:

- centrifuga – Sharples, T-1 (komprimirani zrak), 50 000 o/min,
- centrifuga, BECKMAN; rotor JA-20
- vaga, Mettler Toledo, PG 5002-S

- sustav za filtraciju – vakuum pumpa, Büchnerov lijevak,
- sustav za ekstrakciju – staklena kolona punjena rolanim mrežicama od metalnog lima, stakleni lijevci za odjeljivanje različitog kapaciteta,
- sustav za otparavanje otapala pri sniženom tlaku – Büchi-vakuum sustav,
- kromatografske kolone - Büchi (i.d. 25 mm; 30 cm),  
- GE Healthcare (XK 26/60)
- analitički kromatografski sustav– Knauer HPLC sustav (uključuje komponentu za odabir otapala, otplinjač (degazer), kvaternu pumpu K-1001, automatski uzorkivač (engl. autosampler) s mogućnošću grijanja ili hlađenja (Triathlon, Spark Holland), UV detektor K-2600),
- preparativni kromatografski sustav– Knauer HPLC sustav (kao analitički osim umjesto automatskog uzorkivača sadrži komponentu za ručno injektiranje uzorka).
- NMR, Bruker, DRX 300 (Pliva), DRX 400 (University of Strathclyde), DRX 500 (Pliva)
- spektrofotometar FT-IR BIO-RAD Excalibur
- spektrofotometar UV Perkin-Elmer Lambda 10
- spektrometar MS Finnegan MAT 8200 ili Micromass Qtof 2



Slika 27. **A** - centrifuga Sharples (model T-1); **B** - preparativni kromatografski sustav.

### 3.2.2. Računalni program

Za kontrolu HPLC sustava Knauer i obradu kromatograma korišten je program Eurochrom, v1.65.

## 3.3. Metode

### 3.3.1. Biosinteza

Uzgoj i biosinteza bakterije *S. rimosus* ZGL1 i *S. rimosus* ZGL5 raden je prema postupku i s materijalima za uzgoj bakterije *S. rimosus* R6-500 (proizvodnog soja oksitetraciklina).

#### 3.3.1.1. Uzgoj cjepiva bakterija *S. rimosus*

Početno cjepivo bakterije *S. rimosus* pripravljeno je uzgojem na rotacijskoj tresilici. 100 mL hranjive podloge za uzgoj cjepiva u Erlenmeyer tikvicama od 500 mL nacijepjeno je s 1 mL kulture *S. rimosus*; uzgoj se provodio 48 sati pri 28 °C i rotaciji tresilice od 220 o/min. Ovako pripravljeno cjepivo čuvano je u zamrzivaču pri –20 °C te po potrebi korišteno za obnovu cjepiva, uzgoj biomase i biosinteze. Mikroorganizam se trajno čuva u liofiliziranom obliku.

#### 3.3.1.2. Dubinski uzgoj bakterije *S. rimosus* i biosinteza

Pokusi biosinteze provedeni su u tikvicama na rotacijskoj tresilici i u laboratorijskim bioreaktorima. Trajanje procesa biosinteze bilo je 144 sata (6 dana), pri temperaturi od 28 °C. Biosinteza u EM tikvicama od 500 mL: tikvica s po 50 mL hranjive podloge za uzgoj oksitetraciklina se nacijepila s 5 mL uzgojenog cjepiva. Biosinteza je provedena i u laboratorijskom bioreaktoru “Microferm-MF-214”, ukupnog volumena 14 L. Uzgoj se provodio uz vrtnju miješalice od 800 o/min i uz opskrbu zrakom 1 L L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Ukupni volumen reakcijske smjese u bioreaktoru bio je 8 L. Tijekom procesa se mogu uzimati uzorci za analitičku obradu.

### 3.3.2. Izolacija i pročišćavanje sekundarnih metabolita

Proces obrade fermentativne komine bakterije *S. rimosus* ZGL1 i izolacija biosintetiziranih supstancija koje su u njoj prisutne općenito se sastoji od sljedećih stupnjeva:

- Fermentativna komina uz miješanje se zakiseljava oksalnom kiselinom ili kloridnom kiselinom (razrijeđenom 1:1) dok pH vrijednost komine ne dostigne vrijednost između 1,8 – 2,2. Dodavanjem anorganske soli ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,6 kg/L) postižu se poželjnija svojstva komine za ekstrakciju. Nakon zakiseljavanja, kominu je potrebno miješati oko 30 minuta. Zatim slijedi odvajanje supernatanta od micelija centrifugiranjem (protočna centrifuga pri brzini od 50000 o/min ili *batch* način pri brzini od 10000 o/min tijekom 20 minuta) ili filtriranjem kroz sloj filtracijske (dijatomejske) zemlje pomoću vakuuma.
- Filtrat fermentacijske komine zasićen anorganskom soli dovodi se u kontakt s organskim otapalom (n-butanol, etil-acetat) s kojim se ne miješa u omjeru 2:1 ili 1:1 upotrebom lijevka za odjeljivanje ili na kolonskom ekstraktora uz isti omjer filtrata i organskog otapala. Nakon odjeljivanja slojeva postupak ekstrakcije se može ponoviti (ukupno 2-3 puta). Na kraju organski alikvoti se spoje te uparavaju pod sniženim pritiskom kako bi se iz ekstrakta uklonilo organsko otapalo. Preostane kruti, smolasti ostatak.
- Upareni ekstrakt analizira se kromatografijom na tankom sloju (TLC) i/ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Na temelju dobivenih rezultata može se odabrati najprihvatljiviji sustav za kromatografiju uparenog ekstrakta na stupcu slikagela pri niskom (LPLC) ili srednjem tlaku (MPLC).
- Dodatno pročišćavanje izoliranih supstanci od prisutnih onečišćenja često se može postići procesom istaloživanja supstance iz zasićene otopine blagim otparavanjem otapala u struji dušika ( $\text{N}_2$ ).

### 3.3.2.1. Izolacija i pročišćavanje spojeva C1, C2 i C3

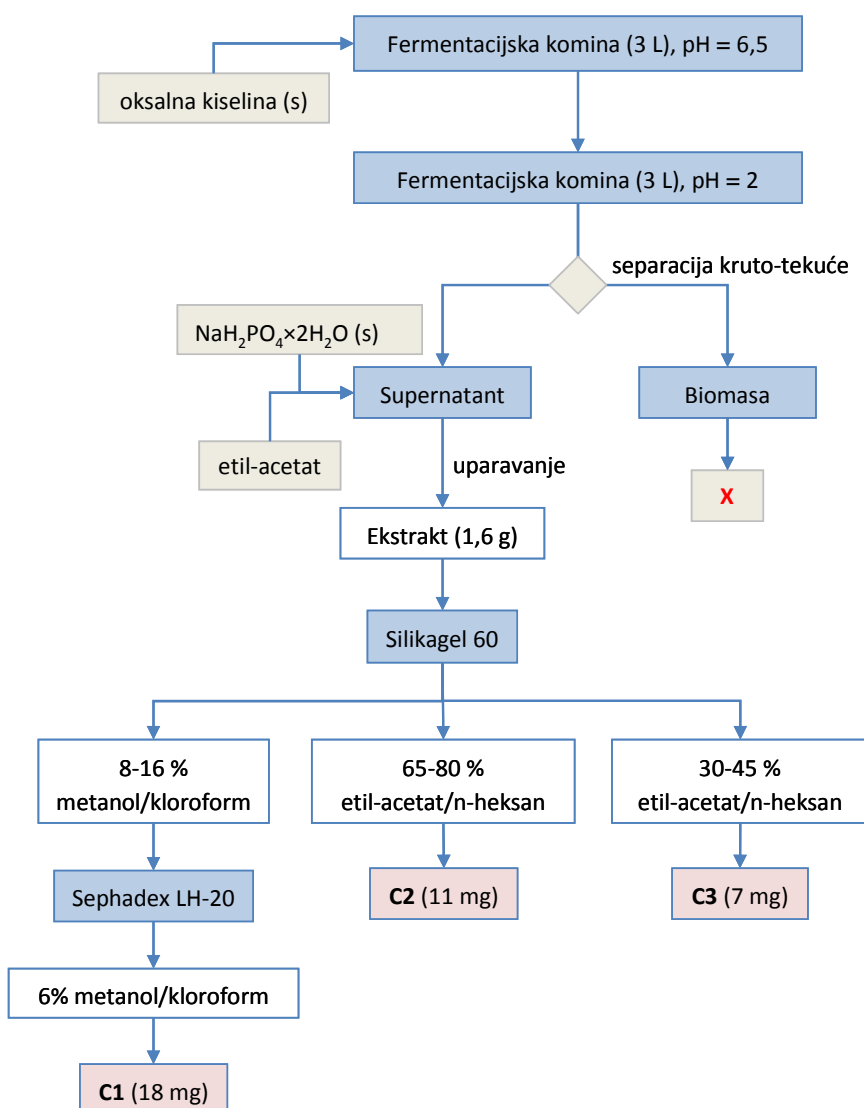
Fermentacijska komina (3 L) zakiseljena je oksalnom kiselinom na pH=2 te je zasićena s natrijevim dihidrogenfosfatom dihidratom (1,8 kg). Nakon 30 min miješanja, biomasa je odjeljena centrifugiranjem pri brzini okretaja od 10000 min<sup>-1</sup> tijekom 20 min. Supernatant je dekantiran i dodatno profiltriran preko naboranog filtrirnog papira. Filtrat je u lijevku za odjeljivanje pomiješan s etil-acetatom (1:1). Nakon odjeljivanja slojeva, vodeni dio je još jednom ekstrahiran s etil-acetatom u istom omjeru. Ekstrakti su spojeni te im je dodan bezvodni natrijev sulfat. Nakon filtracije kroz naborani filter papir ekstrakt je uparen na rotacijskom vakuum uparivaču pri temperaturi do 40 °C. Dobiveno je oko 1,6 g smolastog ostatka. Upareni ekstrakt razdijeljen je na dva dijela (0,9 g i 0,7 g) koji su frakcionirani kromatografijom na stupcu silikagela sa smjesom otapala **A** (kloroform – metanol) i smjesom otapala **B** (n-heksan – etil-acetat) postepeno povećavajući udio polarnije komponente u smjesi za eluaciju (slika 28).

Pročišćavanje spoja C1: 0,9 g uparenog ekstrakta nanešeno je na kolonu silikagela. Frakcije eluirane s udjelom metanola 8-16 % su spojene i uparene pri sniženom pritisku. Uslijedilo je daljnje pročišćavanje uparenog ostatka na koloni punjenoj Sephadex LH-20 smolom sa smjesom za eluaciju 6 % metanol – 94 % kloroform. Frakcije koje su prema TLC analizi sadržavale pretežito spoj **C1** su spojene i koncentrirane pri sniženom pritisku. Dobiven je svijetlo žuti talog spoja **C1** (18 mg).

Pročišćavanje spoja C2: 0,7 g uparenog ekstrakta nanešeno je na kolonu silikagela. Frakcije eluirane s udjelom etil-acetata 65-80 % su spojene i uparene pri sniženom pritisku. Ostatak je otopljen u otprilike 1 mL metanola i spremljen na +4 °C. Nakon 24 sata dobiven je žuti talog spoja **C2** (11 mg).

Pročišćavanje spoja C3: kao u prethodnom slučaju, frakcije eluirane s udjelom etil-acetata 30-45 % su spojene i uparene pri sniženom pritisku. Ostatak je otopljen u otprilike 1 mL metanola i spremljen na +4 °C. Nakon 24 sata dobiven je žuti talog spoja **C3** (7 mg).

Ekstrakcija, koncentriranje i pročišćavanje spojeva praćeno je kromatografijom TLC na pločama silikagela (Merck) i sustavom otapala kloroform:metanol:voda = 9:1:0,1.



Slika 28. Shematski prikaz izolacije i pročišćavanja spojeva **C1**, **C2** i **C3** iz ekstrakta fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* ZGL1.

### 3.3.2.2. Izolacija i pročišćavanje spoja **C1**

#### - Obrada fermentacijske komine i ekstrakcija

Fermentacijska komina (6,5 L, pH=6,7) zakiseljena je koncentriranom kloridnom kiselinom na pH=2,5. Biomasa je separirana u protočnoj centrifugi pri brzini okretaja rotora od 50000 min<sup>-1</sup> i protoku crpke za dobavu fermentativne komine od 5 L/h. Dobiveno je oko 6 L supernatanta i oko 300 g vlažne biomase (micelija).

Supernatant je ekstrahiran etil-acetatom u omjeru 1:2 (6 L supernatanta s 12 L etil-acetata) upotrebom kolonskog ekstraktora pri protoku crpke za dobavu supernatanta od 3 L/h i protoku crpke za dobavu etil-acetata od 6 L/h. Nakon odjeljivanja slojeva, ekstraktu je dodan bezvodni natrijev sulfat. Nakon filtracije kroz naborani filtrirni papir, ekstrakt je uparen na rotacijskom vakuum uparivaču pri temperaturi do 40 °C. Dobiveno je oko 5,3 g smolastog ostatka.

Vlažni micelij bakterije *S. rimosus* ZGL1 (300 g) ekstrahiran je metanolom (900 mL) miješanjem tijekom 60 minuta. Nakon filtracije preko naboranog filtrirnog papira, metanolni ekstrakt je uparen na rotacijskom vakuum uparivaču pri temperaturi do 40 °C. Uljasti ostatak u tikvici ponovo je ekstrahiran etil-acetatom, a ekstrakt je uparen na rotacijskom vakuum uparivaču. Dobiveno je oko 3,7 g smolastog ostatka.

- *Priprema kolone za kromatografiju pri srednjem tlaku (MPLC)*

Pakiranje kolone: borosilikatna kolona (i.d. 25 mm; 30 cm; Büchi) napunjena je silikagelom obrnute faze (Lichrospher 100, RP-18; 12 µm, Merck). Kolona se napuni silikagelom pomoću spremnika za pakiranje u kojem se nalazi silikagel u suvišku. Kolona sa spremnikom se spoji na izvor dušika ili stlačenog zraka koji se zatim pod tlakom od 10 bar propušta kroz kolonu pakirajući tako sloj silikagela u koloni. Kada više nema promjene razine silikagela u spremniku, kolona je potpuno napunjena, a kroz nju se nastavi propuštati dušik još 10-20 minuta radi postizanja što bolje homogenosti pakiranog sloja silikagela u koloni. Zatim se prekine dovod dušika te kada se tlak u koloni izjednači s okolnim tlakom, spremnik se skine s kolone, a kolona spoji na kromatografski sustav.

Kondicioniranje kolone: prije upotrebe, tj. nanošenja uzorka na kolonu, silikagel je potrebno isprati od mogućih nečistoća iz proizvodnog procesa te kondicionirati. Ispiranje silikagela obrnute faze započinje propuštanjem nepolarnog otapala kroz kolonu, npr. n-heksana. Zatim slijede još 2-3 stupnja ispiranja s otapalom čija je polarnost veća od polarnosti prethodno upotrijebljenog otapala. U ovom slučaju sljedilo je ispiranje s etil-acetatom, zatim metanolom ili acetonitrilom, te naposljetku s vodom. Količina otapala za ispiranje kolone iznosi 1-2 volumena kolone (CV), a za završni stupanj ispiranja/kondicioniranja kolone i više. Uzorak se na kolonu nanosi otopljen u vodi ili u smjesi vode s minimalnim udjelom nekog organskog otapala (npr. metanola), ovisno o topljivosti uzorka.



- *Fracioniranje ekstrakta supernatanta*

Upareni ekstrakt supernatanta fermentacijske komine (5 g) nanešen je na pripremljenu kolonu (Büchi; i.d. 25 mm; 30 cm) punjenu sa silikagelom RP-18 (Lichrospher 100; 12  $\mu$ m, Merck; 120 g) otopljen u smjesi vode i acetonitrila (9:1). Fracioniranje ekstrakta provedeno je kromatografijom pri srednjem tlaku (MPLC), upotrebom kromatografskog sustava i smjesom otapala acetonitril-voda od 0-50 % acetonitrila u stupnjevima po 10 %. Sakupljeno je 40 frakcija. Prema rezultatima HPLC analize, frakcije eluirane s udjelom acetonitrila 30-40 % su spojene i uparene pri sniženom pritisku. Vodeni ostatak je ekstrahiran etil-acetatom (1:1). Nakon odjeljivanja slojeva, u organski sloj je dodan bezvodni natrijev sulfat. Ekstrakt je filtriran kroz naborani filtrirni papir i uparen pri sniženom pritisku na rotavaporu. U tikvici je nakon uparavanja otapala ostao žuti talog koji je otapanjem u maloj količini metanola (1-2 mL) prebačen u staklenu kivetu i spremljen na +4 °C. Nakon 12 sati dobiven je svijetlo žuti talog spoja **C1** (170 mg).

- *Fracioniranje ekstrakta micelija*

Na temelju HPLC analize, ekstrakt micelija (3,7 g) također je fracioniran upotrebom istog sustava stacionarne (Lichrospher 100 RP-18; 12  $\mu$ m, Merck; 300 g) i mobilne faze (acetonitril-voda od 0-50 % acetonitrila u stupnjevima od po 10%). Sakupljeno je 86 frakcija. Nakon HPLC analize, spojene su frakcije eluirane s udjelom acetonitrila oko 30 %. Prema HPLC kromatogramu dobivena je smjesa s većinskim udjelom dvije komponente,  $R_t$  (1) =5,3 min i  $R_t$  (2) =13,0 min. Ove komponente nisu pročišćene kao zasebni spojevi zbog premale količine materijala za sljedeći stupanj pročišćavanja.

Biosinteza, ekstrakcija i pročišćavanje spoja praćeno je metodama TLC i HPLC navedenim u tablici 1. Frakcije su spojene prema sličnosti u retencijskom vremenu (hidrofilnosti) komponenata i intenzitetu pikova u kromatogramu HPLC.

### **3.3.2.3. Izolacija i pročišćavanje spoja C4**

- *Obrada fermentacijske komine i ekstrakcija*

Postupak obrade fermentacijske komine identičan je postupku koji je opisan u poglavlju 3.3.2.2. Dobiveno je oko 3,5 g uparenog ekstrakta supernatanta.

- *Priprema kolone za kromatografiju pri srednjem tlaku (MPLC)*

Postupak pripreme kolone za kromatografiju istovjetan je postupku koji je opisan u poglavlju 3.3.2.2. s razlikom da je umjesto acetonitrila u ovom eksperimentu korišten metanol.

- *Fracioniranje ekstrakta supernatanta*

Upareni ekstrakt supernatanta fermentacijske komine (3,5 g) otopljen u smjesi vode i metanola (9:1) te je apliciran na pripremljenu kolonu (GE Healthcare; i.d. 26 mm; 60 cm) punjenu sa silikagelom RP-18 (Lichrospher 100 RP-18; 12  $\mu$ m, Merck; 300 g). Fracioniranje ekstrakta provedeno je kromatografijom pri srednjem tlaku (MPLC), upotrebom kromatografskog sustava i smjesom otapala metanol-voda povećavajući udio metanola od 20-60 %. Sakupljeno je 42 frakcije. Prema rezultatima HPLC analize, određene frakcije su spojene i uparene pri sniženom pritisku. Vodeni ostatak je ekstrahiran etil-acetatom (1:1). Nakon odjeljivanja slojeva, u organski sloj je dodan bezvodni natrijev sulfat. Ekstrakt je filtriran kroz naborani filtrirni papir i uparen pri sniženom pritisku. U frakcijama eluiranim s udjelom metanola 40-45 % (frakcije 30-31) dobiveno je 15 mg žutog taloga spoja **C1**.

Ekstrakt frakcija eluiranih s udjelom metanola 30-35 % (frakcije 17-25) dalje je pročišćavan upotrebom polupreparativnog HPLC (sustav SP-HPLC). Frakcija koja je sadržavala pik ( $R_t \sim 7,3$  min) je uparena, vodeni ostatak je ekstrahiran etil-acetatom (1:1). Organskom sloju je dodan bezvodni natrijev sulfat. Nakon filtracije kroz naborani filtrirni papir, ekstrakt je uparavan na rotacijskom vakuum uparivaču. U tikvici je nakon uparavanja otapala ostao svijetli talog spoja **C4** (45 mg). Shematski prikaz izolacije i pročišćavanja spojeva **C1** i **C4** prikazan je na slici 29.

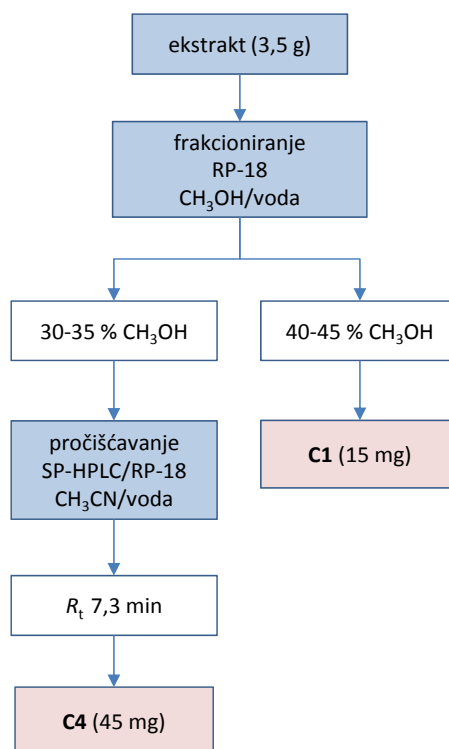
#### **3.3.2.4. Izolacija i pročišćavanje spojeva C5 i C6**

- *Obrada fermentacijske komine i ekstrakcija*

Postupak obrade fermentacijske komine identičan je postupku koji je opisan u poglavlju 3.3.2.2. Dobiveno je oko 2,8 g uparenog ekstrakta supernatanta.

- *Priprema kolone za kromatografiju pri srednjem tlaku (MPLC)*

Postupak pripreme kolone za kromatografiju istovjetan je postupku koji je opisan u poglavlju 3.3.2.3. s razlikom da je umjesto silikagela RP-18 u ovom eksperimentu korišten silikagel RP-8.



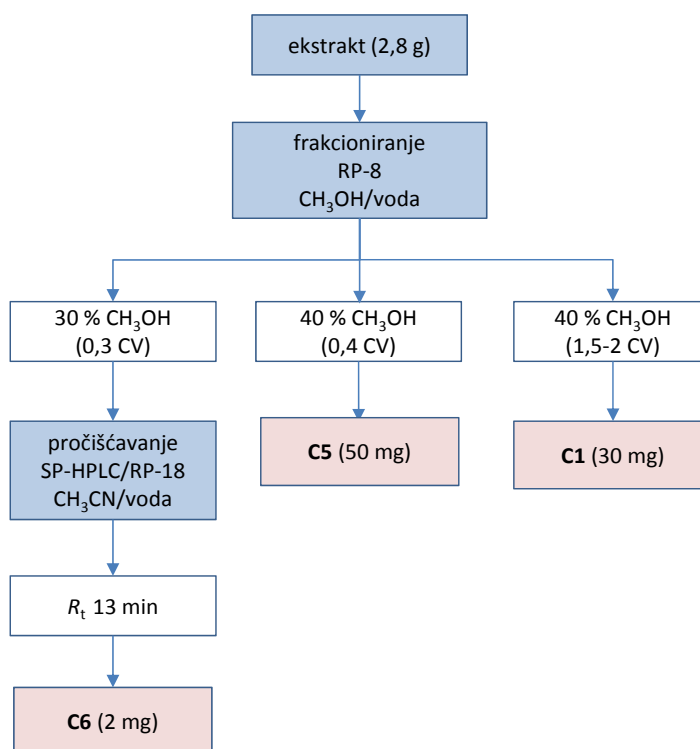
Slika 29. Shematski prikaz izolacije i pročišćavanja spoja **C4** iz ekstrakta fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* ZGL1.

- *Frakcioniranje ekstrakta supernatanta*

Upareni ekstrakt supernatanta fermentacijske komine (2,8 g) otopljen u smjesi vode i metanola (9:1) nanešen je na pripremljenu kolonu (Büchi; i.d. 26 mm; 60 cm) punjenu sa silikagelom RP-8 (Lichrospher 100 RP-8; 10  $\mu$ m, Merck; 300 g) (slika 30). Frakcioniranje ekstrakta provedeno je kromatografijom pri srednjem tlaku (MPLC) upotrebom kromatografskog sustava i sa smjesom otapala metanol-voda povećavajući udio metanola od 0-40 % u stupnjevima po 5 %. Sakupljeno je 57 frakcija. Prema rezultatima HPLC analize, određene frakcije su spojene i uparene pri sniženom pritisku. Vodeni ostatak je ekstrahiran etil-acetatom (1:1). Nakon odjeljivanja slojeva, u organski sloj je dodan bezvodni natrijev sulfat. Ekstrakt je filtriran kroz naborani filtrirni papir i uparen pri sniženom pritisku na

rotacijskom vakuum uparivaču. U frakcijama eluiranim s udjelom metanola 40 % (tijekom 0,4 CV) dobiven je talog spoja **C5** (50 mg). U frakcijama eluiranim s udjelom metanola 40 % (tijekom 1,5 – 2 CV) dobiven je žuti talog spoja **C1** (30 mg).

Ekstrakt frakcija eluiranih s udjelom metanola 30 % (tijekom 0,3 CV) dalje je pročišćavan upotrebom polupreparativnog HPLC (sustav SP-HPLC). Frakcija koja je sadržavala pik ( $R_t = \sim 13$  min) je uparena, vodeni ostatak je ekstrahiran etil-acetatom (1:1). Organskom sloju je dodan bezvodni natrijev sulfat. Nakon filtracije kroz naborani filtrirni papir, ekstrakt je uparen na rotacijskom vakuum uparivaču pri sniženom pritisku. U tikvici su se nakon uparavanja otapala pojavili bezbojni kristali spoja **C6** (2-3 mg).



Slika 30. Shematski prikaz izolacije i pročišćavanja spojeva **C5** i **C6** iz ekstrakta fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* ZGL1.

### 3.3.2.5. Izolacija i pročišćavanje spoja **C7**

#### - Obrada fermentacijske komine i ekstrakcija

Fermentacijska komina (oko 1,8 L) zakiseljena je razrijeđenom kloridnom kiselinom (1:1) na pH=2,5. Nakon 20 minuta miješanja, fermentacijska komina je pomiješana s etil-

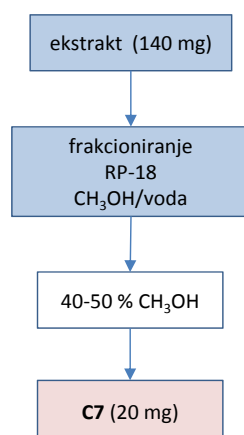
acetatom (1:1), pri čemu je došlo do stvaranja emulzije. Nakon djelomičnog odjeljivanja slojeva, ekstrakt je uparen na rotacijskom vakuum uparivaču pri temperaturi do 40 °C i sniženom pritisku. Dobiveno je oko 140 mg uljastog uparenog ekstrakta.

- *Priprema kolone za kromatografiju pri niskom tlaku (LPLC)*

Staklena kolona (i.d. 10 mm) napunjena je silikagelom RP-18 (15 g) koji je u koloni ispiran i kondicioniran s 2 CV otapalima ovim redosljedom: n-heksan, etil-acetat, metanol i voda.

- *Frakcioniranje ekstrakta supernatanta*

Upareni ekstrakt fermentacijske komine (140 mg) otopljen je u smjesi vode i metanola (9:1) te je nanešen na pripremljenu kolonu punjenu sa silikagelom RP-18 (Lichrospher 100 RP-18; 12 µm, Merck; 15 g) (slika 31). Frakcioniranje ekstrakta provedeno je kromatografijom pri niskom tlaku (LPLC) sa smjesom otapala metanol-voda, povećavajući udio metanola (0-50 %) u stupnjevima od 2 % (0-10 %), a zatim u stupnjevima od 5 % (10-20%), odnosno 10 % (20-50 %). Sakupljeno je 24 frakcije. Prema rezultatima HPLC analize (metoda HPLC-A), određene frakcije su spojene i uparene pri sniženom pritisku. Vodeni ostatak je ekstrahiran etil-acetatom (1:1). Nakon odjeljivanja slojeva, u organski sloj je dodan bezvodni natrijev sulfat. Ekstrakt je filtriran kroz naborani filtrirni papir i uparen pri sniženom pritisku na rotacijskom vakuum uparivaču. U frakcijama eluiranim s udjelom metanola 40-50 % dobiven je talog spoja **C7** (20 mg).



Slika 31. Shematski prikaz izolacije i pročišćavanja spoja **C7** iz ekstrakta fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* ZGL1.

### 3.3.3. Određivanje strukture pročišćenim spojevima

Strukture pročišćenim metabolitima određene su i predložene prvenstveno na temelju podataka dobivenih iz dvodimenzijskih homonuklearnih i heteronuklearnih NMR eksperimenata (300 MHz, 400 MHz i 500 MHz), koristeći se metodama  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY za direktno H-H sprezanje, HMQC za H-C interakcije kroz jednu vezu ( $^1J$ ) te HMBC tehnikom za određivanje H-C interakcija kroz dvije ( $^2J$ ) i tri veze ( $^3J$ ). Podaci spektrometrije masa (MS) kao i podaci spektroskopskih metoda UV/VIS te IR, također su korišteni za upotpunjavanje spoznaje o strukturi pojedinih spojeva.

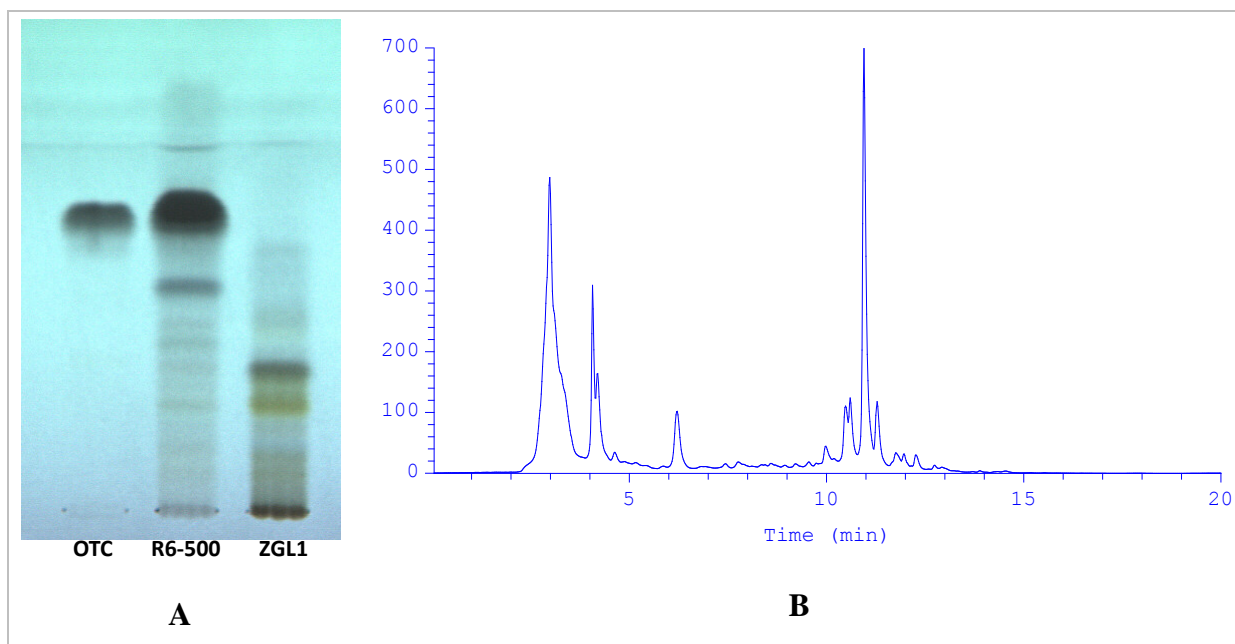
### 3.3.4. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost uparenim ekstraktima filtrata fermetacijske komine te pročišćenom spoju C1 određena je provedbom testa minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) koristeći Gram-pozitivne i Gram-negativne mikroorganizme koji su navedeni u poglavlju 3.1.2.

## 4. REZULTATI

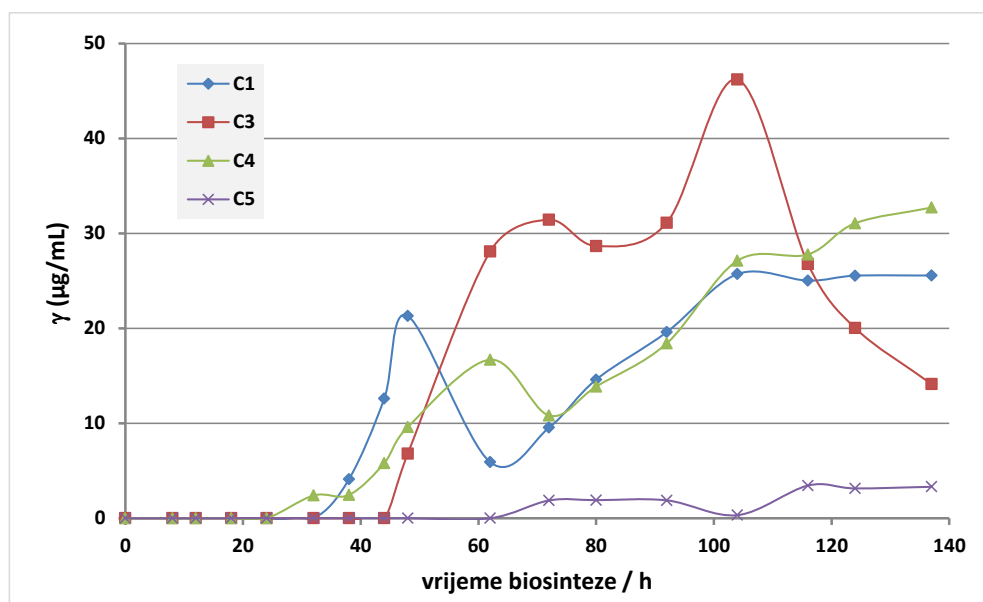
### 4.1. Izolacija i pročišćavanje poliketidnih spojeva

Preliminarni TLC i HPLC profili filtrata fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja ZGL1 (slika 32 A i B) ne sadržavaju oksitetraciklin (OTC) niti doksiciklin (DOTC). Prisutno je, međutim, nekoliko spojeva od kojih se jedan sintetizira u većoj količini od ostalih. Ovi spojevi označeni su oznakama **C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5** i **C6**, prema redoslijedu kojim su izolirani i pročišćeni do stupnja koji omogućava njihovu strukturnu karakterizaciju.



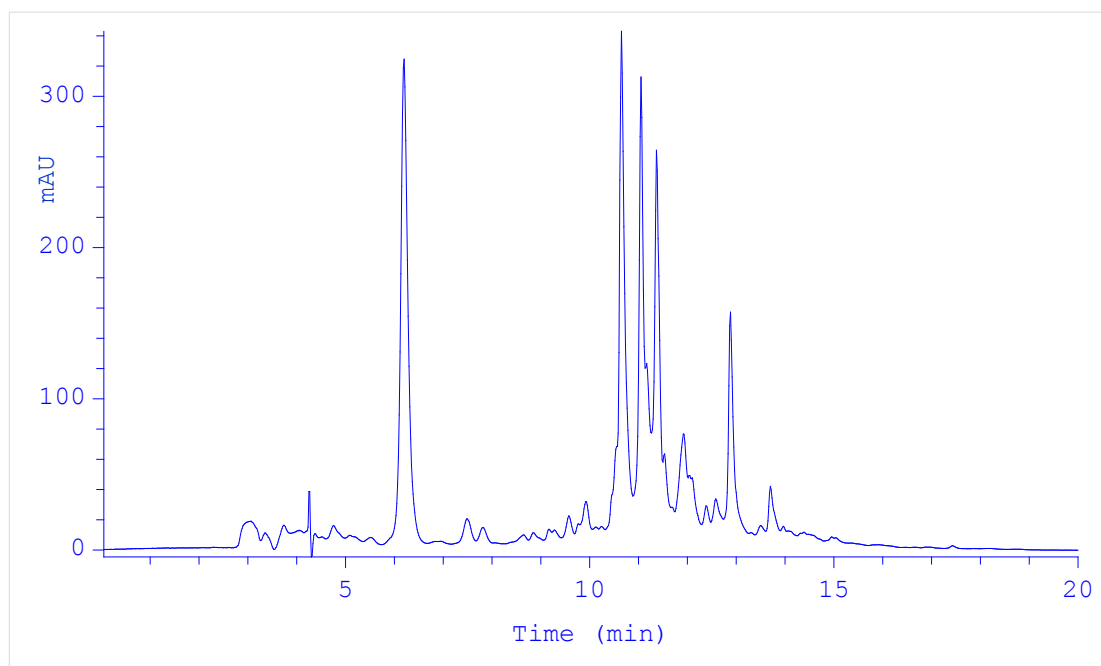
Slika 32. **A** - Kromatogram TLC filtrata fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* sojeva R6-500 i ZGL1. Kao standard upotrijebljen je OTC. **B** - HPLC profil filtrata fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja ZGL1.

Koncentracija pojedinih komponenata tijekom fermentacije procijenjena je posredno tehnikom HPLC pomoću standarda OTC. Na slici 33 može se uočiti da biosinteza navedenih komponenata započinje nakon tridesetog sata fermentacije, a procijenjena koncentracija komponente s najvećim prinomom na završetku biosinteze kreće se oko 30 mg/L.



Slika 33. Koncentracije pojedinačnih komponenata tijekom biosinteze bakterije *S. rimosus* soja ZGL1, procijenjene pomoću kalibracijske krivulje standarda OTC.

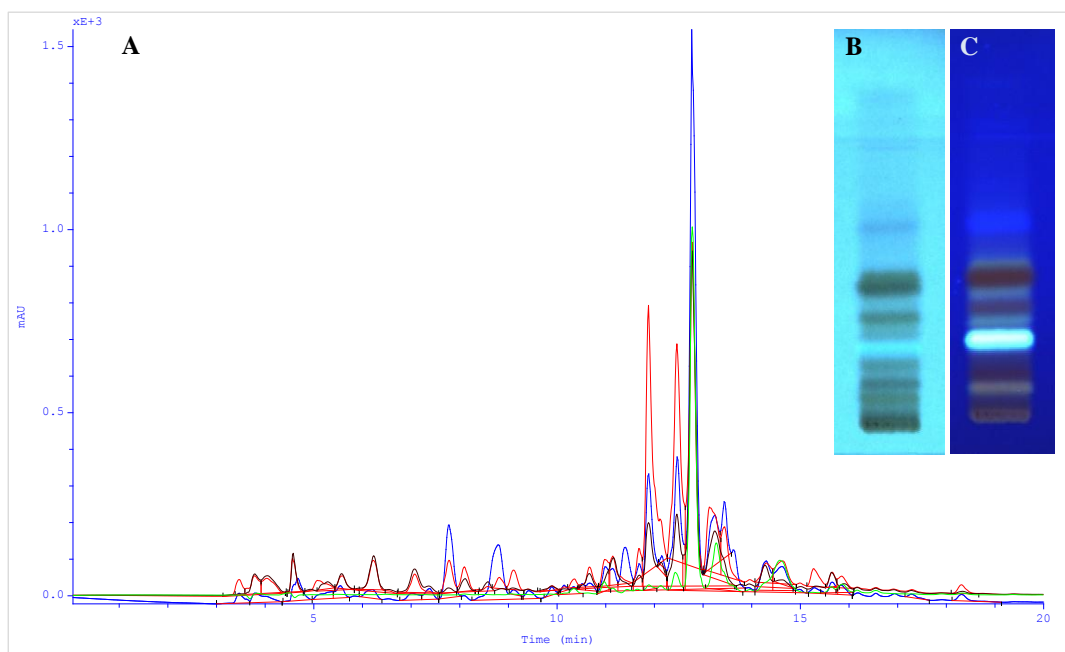
Brojnost supstanci i njihov relativni kvantitativni omjer u ekstraktu filtrirane fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* rekombinantnog soja ZGL1 nakon uparavanja etil-acetata određen je tehnikom HPLC (slika 34).



Slika 34. Kromatogram HPLC ekstrakta fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja ZGL1.

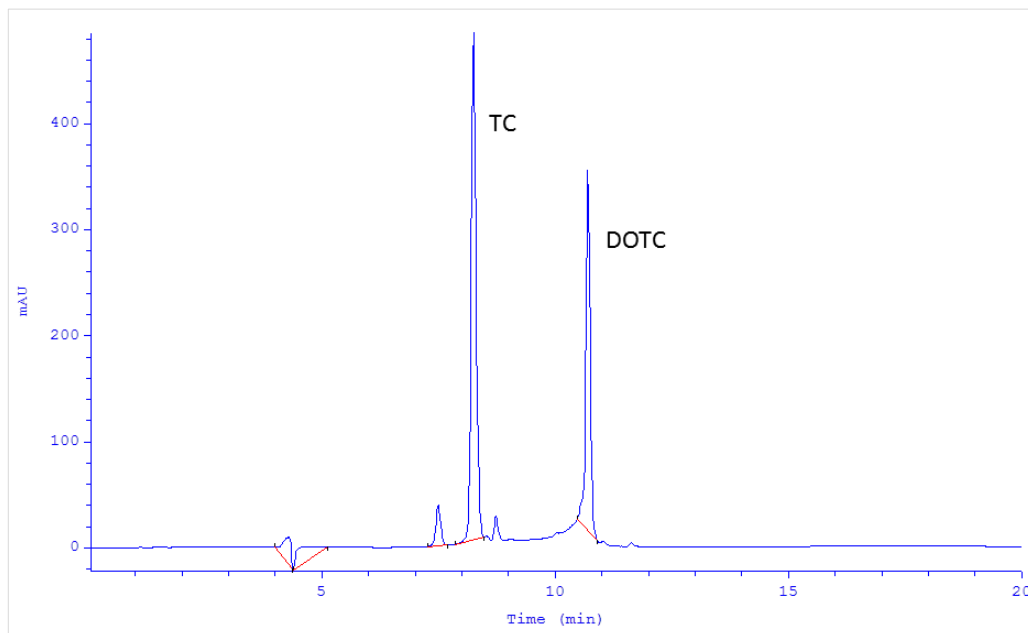


Kromatogram pokazuje da u području retencijskog vremena od devete do trinaeste minute postoji velik broj komponenata sličnih hidrofilnih/hidrofobnih svojstava. Pomoć u razlikovanju pojedinih komponenata prisutnih u ekstraktu, osim po retencijskom vremenu, ostvaruje se i detekcijom UV istovremeno na četiri valne duljine (slika 35).



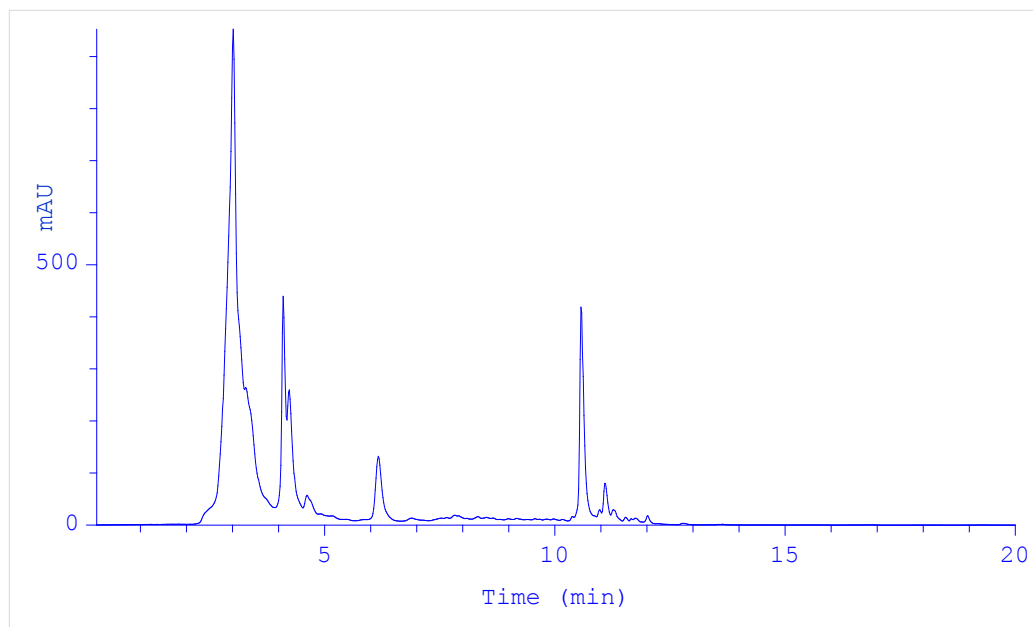
Slika 35. **A** - Kromatogram HPLC ekstrakta filtrirane fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja ZGL1; zapis kromatograma izrađen je istovremeno na četiri valne duljine (230, 270, 290 i 360 nm). Prednost ovakvog načina detekcije je da apsorbancije određenih valnih duljina pojedinih pikova pružaju dodatne informacije o strukturnoj sličnosti/različitosti komponenata prisutnih u uzorku ekstrakta. **B** i **C** - Kromatogrami TLC istog uzorka; detekcija pri 254 nm (**B**) i 366 nm (**C**).

Budući da je DOTC spoj za koji se pretpostavljalo da će biti proizvod biosinteze rekombinantnog soja ZGL1, pored standarda OTC, u analizama uzoraka pomoću tehnika HPLC i TLC, za usporedbu i identifikaciju komponenata u uzorcima korišteni su i standardi TC i DOTC (slika 36).



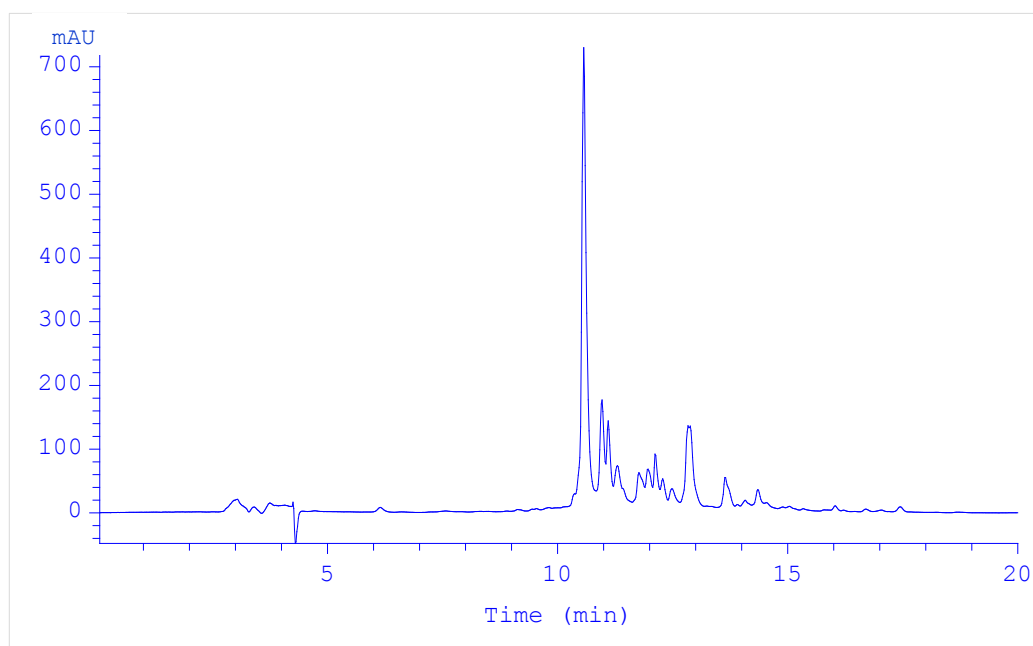
Slika 36. Kromatogram HPLC standarda tetraciklina (TC) i doksiciklina (DOTC).

Učinkovitost postupka ekstrakcije filtrata fermentacijske komine soja ZGL1 etil-acetatom, provjeravala se analizom rafinata pomoću metode HPLC (slika 37).

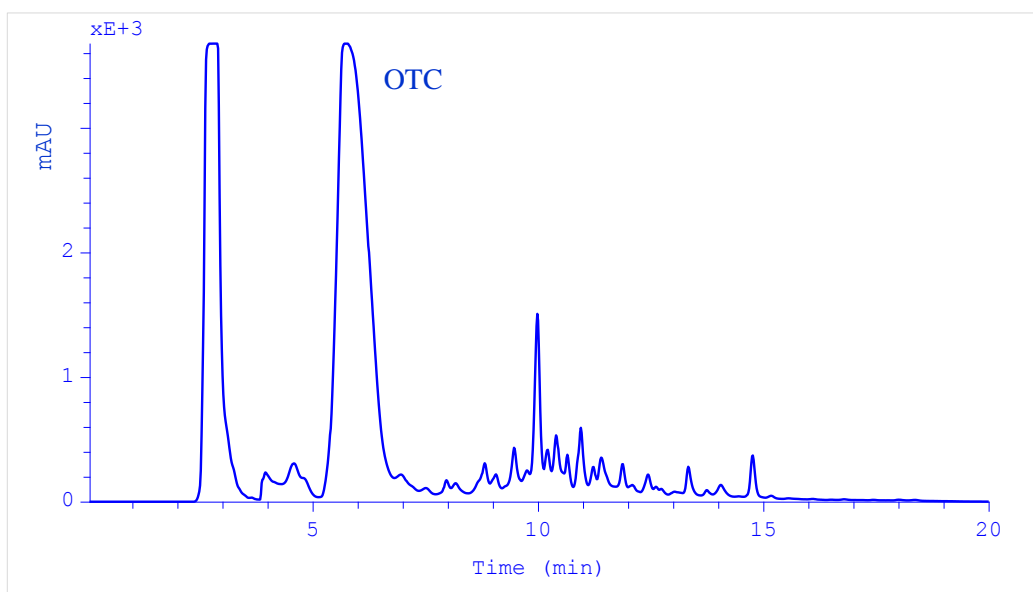


Slika 37. Kromatogram HPLC rafinata fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja ZGL1.

Analiza HPLC ekstrakta micelija (slika 38) ukazuje na prisustvo brojnih komponenata u području retencijskog vremena kao i u kromatogramu ekstrakta fermentacijske tekućine, ali slabijeg intenziteta.



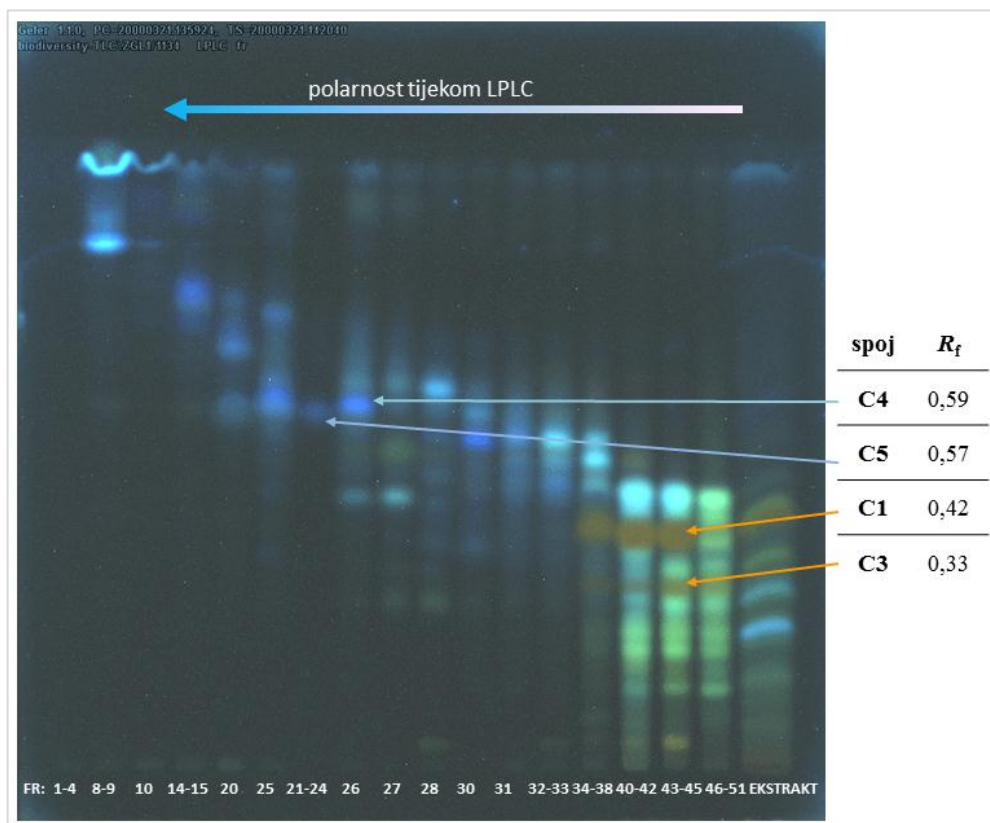
Slika 38. Kromatogram HPLC ekstrakta micelija fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja ZGL1. Micelij (biomasa) dobiven je nakon centrifugiranja fermentacijske komine (separacija kruto – tekuće) i ekstrahiran je miješanjem s metanolom.



Slika 39. Kromatogram HPLC ekstrakta filtrirane fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja R6-500. Intenzivni pik ( $R_t = 5,99$  min) predstavlja biosintetizirani OTC.

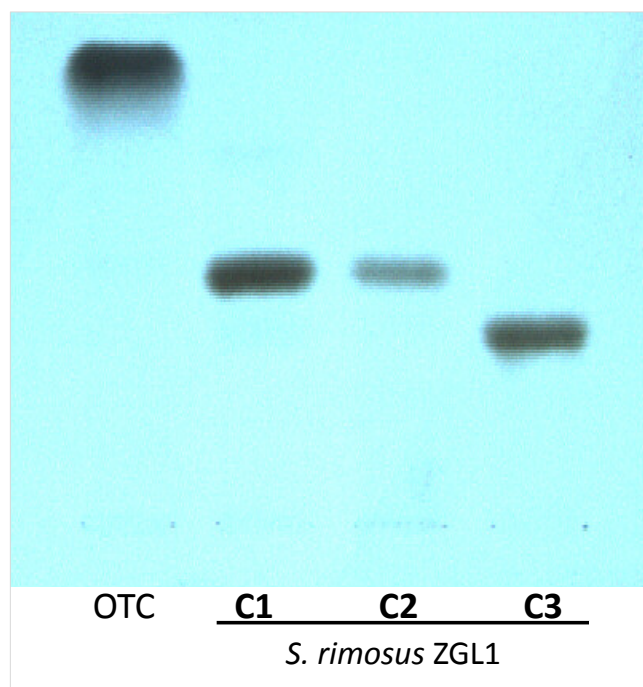
Fermentacija bakterije *S. rimosus* roditeljskog soja R6-500 služila je kao pozitivna i negativna kontrola. Rezultat analize HPLC ekstrakta jedne takve filtrirane fermentacijske komine soja R6-500, na kojoj dominira pik OTC, prikazan je na slici 39.

Primarno pročišćavanje (frakcioniranje) priređenih ekstrakata fermentacijske tekućine rekombinantnog soja ZGL1 provedeno je kromatografijom na koloni (LPLC ili MPLC), a analiza dobivenih frakcija provedena je upotrebom analitičkog HPLC. Na temelju HPLC rezultata pojedine frakcije su spojene, tj. grupirane su prema sastavu. Analiza TLC tako spojenih frakcija prikazana je na slici 40.



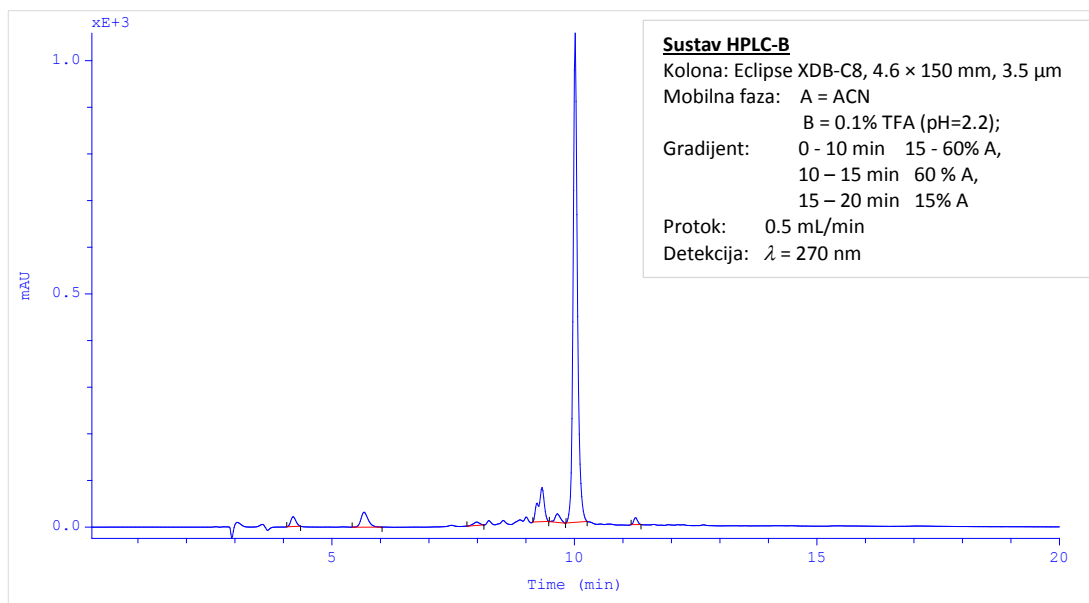
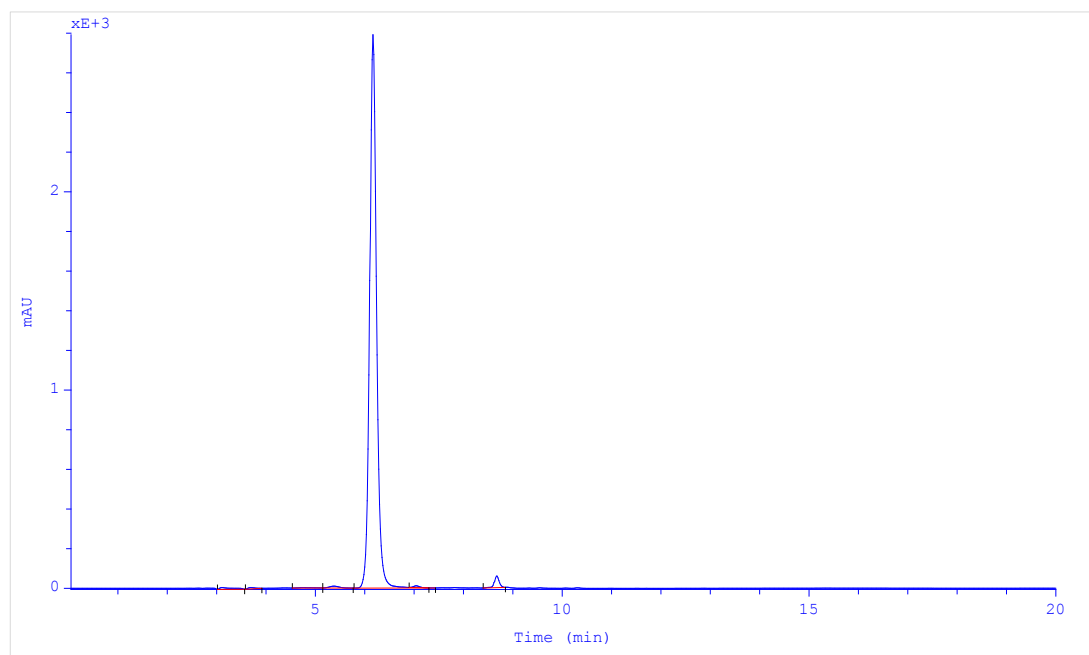
Slika 40. Kromatogram TLC frakcija nakon primarnog pročišćavanja ekstrakta filtrata fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja ZGL1 kromatografijom na stupcu silika gela RP-18 (detekcija pri 366 nm; stacionarna faza: silikagel impregniran s 10 % EDTA pH=7; mobilna faza: diklormetan:metanol:voda = 59:36:6).

Analizom TLC pročišćenih spojeva **C1**, **C2** i **C3** i standarda OTC potvrđeno je da spojevi koji nastaju biosintezom rekombinantnog soja ZGL1 ne predstavljaju OTC (slika 41).



Slika 41. Kromatogram TLC standarda OTC i spojeva **C1**, **C2** i **C3** pročišćenih iz ekstrakta filtrata fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja ZGL1 (detekcija pri 254 nm; stacionarna faza: RP-18 silika gel (F<sub>254</sub>); mobilna faza: acetonitril:metanol:0,2 M oksalna kiselina = 1:4:4).

Kad je to bilo moguće, čistoća dobivenim spojevima određena je analizom HPLC. Tako je sadržaj spoja **C1** određen u masenom udjelu od 94 % (slika 42), a sadržaj spoja **C4** određen je u masenom udjelu od gotovo 99 % (slika 43).

Slika 42. Kromatogram HPLC s glavnim pikom koji predstavlja spoj **C1**.Slika 43. Kromatogram HPLC pročišćenog spoja **C4**.

## 4.2. Određivanje struktura poliketidnih spojeva

### 4.2.1. Strukturna karakterizacija spojeva C1, C2 i C3

Struktura spoja **C1**, kao i ostalih pročišćenih spojeva, određena je prvenstveno na temelju analize 1D i 2D spektara NMR, kao što je to navedeno u poglavlju 3.3.3. Asignacije protona i atoma ugljika iz spektara NMR spojeva **C1**, **C2** i **C3** prikazane su u tablici 2 i tablici 3. Korelacije protona i ugljika kroz dvije ( $^2J$ ), tri ( $^3J$ ) i četiri ( $^4J$ ) veze iz spektra HMBC za spoj **C1** prikazane su na slici 44. Strukture spojeva **C1**, **C2** i **C3**, određene na taj način, prikazane su na slici 45.

Molekularna formula spoja **C1** određena je kao  $C_{18}H_{15}NO_7$  na temelju podataka spektrometrije masa FAB (prilog 7) [uočena monoizotopna masa iona  $m/z = 358 (M+H)^+$ ]. Spektar  $^{13}C$  NMR za spoj **C1** (prilog 3) pokazuje sedamnaest signala. Još jedan ugljik uočen je na 39,1 ppm čiji se signal preklapa sa signalom otapala DMSO- $d_6$ . Od ukupno osamnaest C-atoma tri su  $sp^3$  hibridizirana (metilni, metilenski i kvaterni C-atom), a petnaest je  $sp^2$  hibridiziranih (četiri metinska, osam kvaternih i tri karbonilna C-atoma).

Apsorpcijske vrpce u spektru IR (prilog 8) na  $1675\text{ cm}^{-1}$  i  $1614\text{ cm}^{-1}$  upućuju na poliketidnu strukturu, odnosno na strukturu s više karbonilnih skupina. Nekoliko apsorpcijskih maksimuma u spektru UV/VIS (prilog 9) na 211,0; 270,5; 303,0 i 374,5 nm ukazuju na složeni sustav konjugacije u strukturi molekule.

Spektar  $^1H$  NMR (prilog 1) jasno ukazuje na prisutnost metilne i metilenske skupine. Rezonancije amidnih protona ( $\delta$  7,74 i 7,64), kao i hidroksilnih protona ( $\delta$  12,41; 11,97 i 6,29), dodatne su informacije iz protonskog spektra. Da se doista radi o protonima hidroksilnih skupina i amino skupine potvrđeno je spektrima  $^1H$  NMR miješanjem uzorka s  $D_2O$  (prilog 2) nakon čega su signali ovih protona nestali.

Pretpostavljeno je da je signal dubleta na 3,72 ppm u spektru  $^1H$  NMR s konstantom sprege od 16 Hz, karakterističnom za geminalne protone koji se nalaze u nejednolikoj elektronskoj okolini, zapravo AB-kvartet metilenskih protona koji se nalaze na ugljiku ( $\delta$  39,1) čiji je signal preklapljen sa signalom otapala. Rezonancija olefinskog protona (triplet) na 7,69 ppm izražava *orto*-sprezanja sa susjednim protonima ( $\delta$  7,42 i 6,95) koji se pojavljuju kao dubleti ( $^3J$  7,6 odnosno 8,4 Hz), navodeći tako da pripadaju istom aromatskom prstenu.

Tablica 2. Kemijski pomaci ( $\delta$ , ppm) i konstante sprege ( $J$ , Hz) u spektrima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spojeve **C1** i **C3**.

H/C	$\delta_{\text{H}}$		$\delta_{\text{C}}$	
	C1	C3	C1	C3
1	7,40 (1H, s)	7,39 (1H, s)	119,1	119,2
2	/	/	141,8	141,1
3	/	/	126,2	126,2
4 (OH)	12,41 (1H, br)	12,41 (1H, br)	158,3	158,3
5 (OH)	11,97 (1H, s)	11,94 (1H, s)	161,5	161,6
5a	/	/	113,0	113,0
6	6,95 (1H, d, $J = 8,4$ )	6,95 (1H, d, $J = 8,4$ )	116,0	116,1
7	7,69 (1H, t, $J = 8,0$ )	7,69 (1H, t, $J = 8,0$ )	137,4	137,6
8	7,42 (1H, d, $J = 7,6$ )	7,42 (1H, d, $J = 7,6$ )	117,1	117,2
8a	/	/	152,0	152,0
9 (OH)	6,29 (1H, s)	6,31 (1H, s)	69,4	69,4
9a	/	/	151,5	151,7
10	/	/	191,5	191,5
10a	/	/	111,6	111,9
9-CH <sub>3</sub>	1,51 (3H, s)	1,51 (3H, s)	38,7	38,6
2-CH <sub>2</sub> -	3,72 (2H, ABq, $J = 16$ )	3,81 (2H, ABq, $J = 16$ )	39,1	38,9
COOCH <sub>3</sub>	/	3,61 (3H, s)	/	51,8
COOH	12,51 (1H, br)	/	171,1	170,2
CONH <sub>2</sub>	7,74; 7,64 (2×H, br)	7,76; 7,60 (2×H, br)	166,9	166,8

(400 MHz -  $^1\text{H}$  NMR; 100 MHz -  $^{13}\text{C}$  NMR; svi spektri su snimljeni u DMSO- $d_6$ ; multipliciteti i konstante sprege ( $J$ , Hz) dane su u zagradi – s = singlet, d = dublet, t = triplet, ABq = AB kvartet, br = široki).



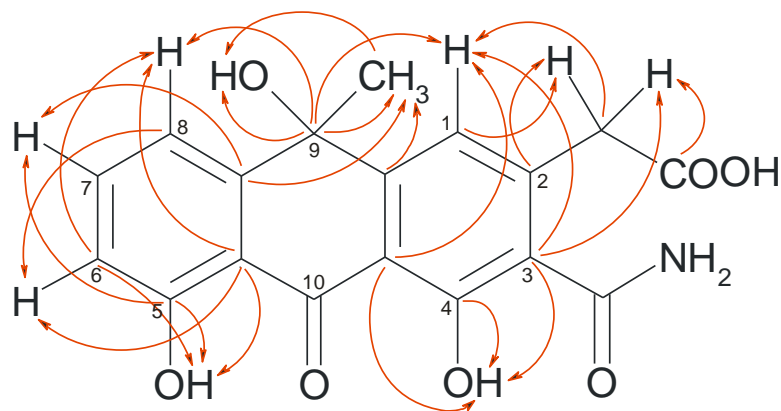
Tablica 3. Kemijski pomaci ( $\delta$ , ppm) i konstante sprege ( $J$ , Hz) u spektrima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **C2**.

H/C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1 (OH)	12,40 (1H, br)	161,5
2	/	126,5
3	/	144,8
4	7,28 (1H, s)	118,4
5	7,42 (1H, d, $J = 7,6$ )	117,5
5a	/	152,0
6	7,68 (1H, t, $J = 8,0$ )	137,3
7	6,93 (1H, d, $J = 8,2$ )	116,0
8 (OH)	11,98 (1H, br)	161,5
8a	/	113,0
9	/	191,4
9a	/	110,9
10 (OH)	6,23 (1H, s)	69,3
10a	/	151,3
10-CH <sub>3</sub>	1,50 (3H, s)	38,2
3-CH <sub>3</sub>	2,37 (3H, s)	20,0
CONH <sub>2</sub>	7,81; 7,53 (2×H, br)	167,4

(400 MHz -  $^1\text{H}$  NMR; 100 MHz -  $^{13}\text{C}$  NMR; svi spektri su snimljeni u DMSO- $d_6$ ; multipliciteti i konstante sprege ( $J$ , Hz) dane su u zagradi – s = singlet, d = dublet, t = triplet, ABq = AB kvartet, br = široki).

Predložena struktura spoja **C1** dodatno je potvrđena na temelju podataka iz spektra HMBC (prilog 6). Na slici 44 prikazane su korelacije između pojedinih ugljika i protona. Kvaterni alifatski C-atom ( $\delta$  69,4) spreže se s dva protona, 1-H i 8-H koji pripadaju različitim

aromatskim prstenima, te s metilnim protonima ( $\delta$  1,51) sugerirajući da je metilna skupina smještena izravno na ovom C-atomu.



Slika 44. Korelacije protona i ugljika kroz više veza ( $^2J$ ,  $^3J$  i  $^4J$ ) u spektru HMBC spoja **C1**.

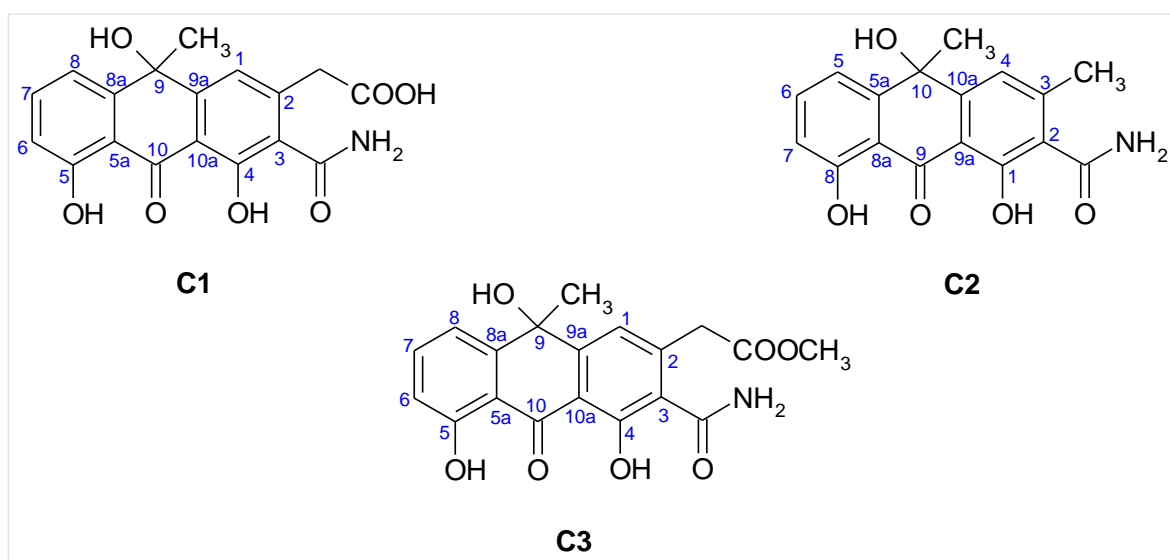
Budući da je područje rezonancije nisko za ovaj  $sp^3$  hibridizirani C-atom, zaključeno je da se na njemu nalazi i hidroksilna skupina ( $\delta$  6,29). Karbonilni C-atom ( $\delta$  191,5) nije pokazivao korelaciju niti s jednim protonom. Zbog toga je smješten nasuprot alifatskog kvaternog C-atoma i zatvoren sa svake strane aromatskim prstenom, čineći tako strukturu antrona. Signal karbonilnog C-atoma u spektru  $^{13}\text{C}$  NMR na 171,1 ppm može se pripisati karboksilnom, umjesto karboksamido C-atomu ( $\delta$  166,9), zbog njegove elektrofilnije okoline. Također, u spektru HMBC uočeno je i sprezanje navedenog karboksilnog C-atoma s metilenskim protonima ( $\delta$  3,72) pa je na temelju toga kao i korelacije metilenskog C-atoma s protonom 1-H, određen položaj metilenske skupine na atomu 2-C aromatskog prstena. Na metilensku skupinu se nadovezuje karboksilna skupina. Naposljetku, spoj **C1** je određen kao (3-karbamoil-4,5,9-trihidroksi-9-metil-10-okso-9,10-dihydroantracen-2-il)octena kiselina (slika 45).

Strukture spojeva **C2** i **C3** potom su utvrđene uspoređujući podatke spektara NMR s onima za spoj **C1**.

Molekulska formula spoja **C2**, određena iz podataka spektra dobivenog metodom EI-MS (prilog 10), je  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$  [ $m/z = 313$  ( $\text{M}^+$ )]. Nadalje, u spektru EI-MS spoja **C2** uočavaju se dva intenzivna pika fragmentacijskih iona ( $m/z = 296$  i  $281$ ) koji indiciraju sukcesivno odvajanje (gubitak) hidroksilne i metilne skupine od molekulskog iona. Iz spektra  $^{13}\text{C}$  NMR

(prilog 11) mogu se uočiti signali sedamnaest C-atoma od kojih su tri  $sp^3$  hibridizirana (dva metilna, jedan kvaterni) i četrnaest  $sp^2$  hibridiziranih (četiri metinska, osam kvaternih i dva karbonilna). Podaci iz spektara  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR odgovaraju podacima spektara spoja **C1**, osim signala za metilenkarboksilni dio strukture, umjesto kojeg se pojavio novi signal metilne skupine na 2,37 ppm u spektru  $^1\text{H}$  NMR (prilog 12) i 20,0 ppm u spektru  $^{13}\text{C}$  NMR (tablice 2 i 3). Korelacija ovog metilnog ugljika s protonom 4-H ( $\delta$  7,28) u spektru HMBC (prilog 13) potvrdila je pretpostavljenu asignaciju. Spoj **C2** određen je kao 1,8,10-trihidroksi-3,10-dimetil-9-okso-9,10-dihidroantracen-2-karboksamid (slika 45).

Spektar EI-MS (prilog 14) prikazuje molekulski ion  $m/z = 371$ , ( $\text{M}^+$ ), određujući molekulsku formulu spoja **C3** kao  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_7$ . Spektar  $^{13}\text{C}$  NMR (prilog 15) otkriva devetnaest C-atoma od kojih su četiri  $sp^3$  hibridizirana (dva metilna, jedan metilenski i jedan kvaterni), a petnaest  $sp^2$  hibridizirana (četiri metinska, osam kvaternih, tri karbonilna). Signali ovih C-atoma poklapaju se s rezonancijama odgovarajućih C-atoma spoja **C1** (tablica 2), osim signala na 58,1 ppm koji se pojavljuje kao novi metoksi C-atom. U spektru  $^1\text{H}$  NMR (prilog 16) signal na 3,61 ppm može se pripisati metilnim protonima. Spektar HMBC pokazuje očekivane korelacije protona i ugljika kod spoja **C3** (spektar nije priložen). Na temelju ovih razmatranja zaključeno je da je spoj **C3** derivat antrona i određen je kao (3-karbamoil-4,5,9-trihidroksi-9-metil-10-okso-9,10-dihidroantracen-2-il)octena kiselina metil ester.



Slika 45. Strukture spojeva **C1**, **C2** i **C3**.

#### 4.2.2. Strukturna karakterizacija spoja C4

Spektar  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **C4** prikazuje signale za trinaest C-atoma od kojih je šest  $sp^3$  hibridiziranih (tri metilna i tri metinska) te sedam  $sp^2$  hibridiziranih (dva metinska, četiri kvaterni i jedan karbonilni) (prilog 19). Nadalje, signali  $sp^3$  C-atoma s rezonancijom na 48,64 i 72,72 ppm ukazuju da su na ova dva C-atoma direktno vezani elektronegativni atomi. Signal na 164,90 ppm upućuje na prisutnost karbonilnog C-atoma, odnosno karboksilne skupine (tablica 4). Podaci iz spektra  $^1\text{H}$  NMR (prilog 20) i 2D spektra HMQC (prilog 21) za spoj **C4** potvrđuju pretpostavke o prisutnosti pojedinih skupina u molekuli. Signali u visokom polju s rezonancijama na 0,72 i 0,92 ppm prema integralu i konstantama sprege upućuju da su u strukturi prisutne dvije metilne skupine (dubleti). Metilne skupine se sprežu s vicinalnim protonom (multiplet) metinske skupine ( $\delta$  2,11) s istim iznosom konstante sprege ( $^3J = 6,8$  Hz) (tablica 4).

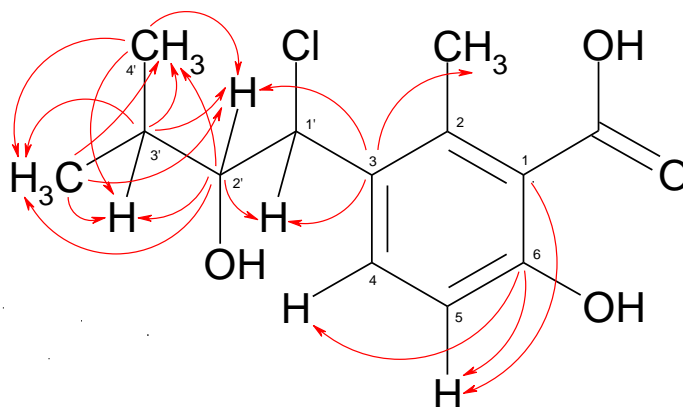
Tablica 4. Kemijski pomaci ( $\delta$ , ppm) i konstante sprege ( $J$ , Hz) u spektrima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **C4**.

H/C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
3'-CH <sub>3</sub>	0,72 (3H, d, $J = 6,8$ )	16,31
2-CH <sub>3</sub>	2,54 (3H, s)	17,31
4' (CH <sub>3</sub> )	0,92 (3H, d, $J = 6,8$ )	19,78
3'	2,11 (1H, m, $J = 6,8$ )	31,44
1'	4,92 (1H, d, $J = 8,5$ )	48,64
2'	4,50 (1H, dd, $J = 8,3; 3,7$ )	72,72
2'-OH	4,10 (1H, br)	/
5	6,68 (1H, d, $J = 8,4$ )	115,02
1	/	125,14
4	7,03 (1H, d, $J = 8,4$ )	130,31
2	/	145,21
3	/	155,24
6 (OH)	12,19 (1H, br)	156,06
COOH	12,75 (1H, br)	164,90

(500 MHz –  $^1\text{H}$  NMR; 125 MHz -  $^{13}\text{C}$  NMR; svi spektri su snimljeni u DMSO- $d_6$ ; multipliciteti i konstante sprege ( $J$ , Hz) dane su u zagradi – s = singlet, d = dublet, m = multiplet, br = široki).

Spomenuti metinski proton dodatno se spreže s još jednim vicinalnim protonom ( $\delta$  4,50; dublet dubleta), ali s manjom konstantom sprege, rezonirajući kao oktet [ $N = n + 1 = (3+3+1)+1$ ]. To se može uočiti u raspregnutom spektru  $^1\text{H}$  NMR. Nadalje, signal protona na 4,92 ppm koji rezonira kao dublet u sprezi je s već spomenutim signalom protona na 4,50 ppm. Navedena sprezanja protona potvrđena su i unakrsnim signalima navedenih pikova u spektru  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (prilog 22), a upućuju na izopentilni fragment u strukturi molekule. Ujedno, vrijednosti rezonancije ova dva signala u nižem polju također upućuju da ovi protoni dijele C-atome na koje su vezani elektronegativni atom ili skupina. Hidroksilna skupina, čiji se signal protona može uočiti na 4,10 ppm kao širi singlet, nalazi na se C-atomu pomaknutom u niže polje ( $\delta$  72,72), a atom klora na susjednom C-atomu sa signalom na 48,64 ppm. Dva dubleta međusobno spregnutih protona s rezonancijom na  $\delta$  6,68 i  $\delta$  7,03 izravno su pridružena metinskim C-atomima s rezonancijama na 115,02 i 130,31 ppm. Budući da signali ova dva protona nisu dodatno sprežana, pretpostavljeno je da se nalaze izolirani na višestruko supstituiranom šesteročlanom aromatskom prstenu kojeg sačinjavaju još četiri preostala kvaterni C-atoma. Supstituenti aromatskog prstena stoga su izopentilni alifatski dio te metilna, karboksilna i hidroksilna skupina sa signalima u spektru  $^1\text{H}$  NMR na 2,54 ppm (singlet) i širokim signalima na 12,75 i 12,19 ppm.

Konačna asignacija svih signala u spektrima NMR potvrđena je na temelju podataka iz spektra HMBC (prilog 23). Budući da C-atomi metilne i karboksilne skupine nisu u korelaciji niti s jednim protonom, smješteni su na suprotnoj strani aromatskog prstena u odnosu na prisutne protone u molekuli (slika 46).

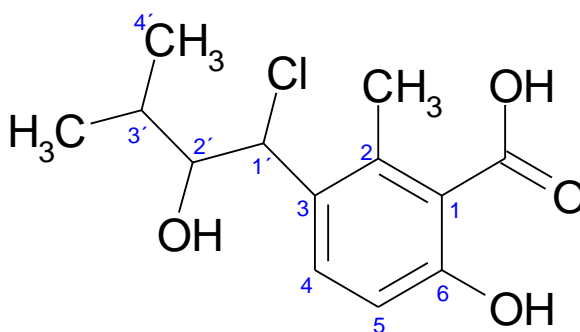


Slika 46. Korelacije protona i ugljika u spektru HMBC spoja **C4**.

Zbog korelacija kvaternog C-atoma ( $\delta$  156,06) s dva aromatska protona, možemo zaključiti da je taj atom odvojen od protona kroz dvije ( $\delta$  6,68), odnosno tri veze ( $\delta$  7,03). Rezonancija navedenog C-atoma najniža je u odnosu na ostale C-atome, osim karboksilnog, i upućuje da je na njega vezana hidroksilna skupina ( $\delta$  12,19). Nasuprot ovom C-atomu smješten je kvaterni ugljik s rezonancijom na 155,24 ppm zbog svoje korelacije s protonima metilne skupine koja je smještena na susjednom C-atomu aromatskog prstena ( $\delta$  145,21). Pored toga, na temelju korelacije istog C-atoma ( $\delta$  155,24) s protonom koji se nalazi u alifatskom dijelu ( $\delta$  4,50), zaključeno je da je izopentilni supstituent vezan upravo na ovaj ugljik.

U spektru IR (prilog 24) uočava se nekoliko vrpce od kojih se ona u području otiska prsta (engl. fingerprint) na  $736\text{ cm}^{-1}$  može pripisati rasteznoj vibraciji veze C-Cl. Dvije vrpce na  $1516$  i  $1592\text{ cm}^{-1}$  potvrđuju prisustvo benzenskog prstena, a prisutnost OH skupine označavaju vrpce u području  $2900 - 3200\text{ cm}^{-1}$ . Karbonilnu skupinu karakterizira prisustvo vrpce na području  $1660\text{ cm}^{-1}$ .

Dakle, molekulska formula spoja **C4** glasi  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{ClO}_4$ , a njegova struktura određena je kao 3-(1-klor-2-hidroksi-3-metilbutil)-6-hidroksi-2-metilbenzojeva kiselina, i prikazana je na slici 47.



Slika 47. Struktura spoja **C4**.

#### 4.2.3. Strukturna karakterizacija spoja **C5**

U odnosu na prethodno opisane spektre spojeva **C1** – **C4**, osnovna karakteristika spektra  $^1\text{H}$  NMR za spoj **C5** je da on ne sadrži signale koji se mogu pripisati benzenskom prstenu (prilog 26). Uočavaju se tri široka signala ( $\delta$  4,92; 12,17 i 12,75) za koje je

pretpostavljeno da pripadaju protonima hidroksilnih skupina. To je i potvrđeno miješanjem uzorka s D<sub>2</sub>O, nakon čega se ovi signali u spektru više nisu mogli zamijetiti. Isto tako, kemijski pomaci dva potonje navedena signala u jako niskom polju, upućuju da pripadaju protonima karboksilne i hidroksilne skupine koje se nalaze na susjednim C-atomima. Signali preostalih protona podliježu jednostavnijim i složenijim cijepanjima, pa se tako u spektru <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (prilog 27) mogu zapaziti unakrsni signali sprezanja protona na 2,11 ppm s protonima na 0,72, 0,92 i 4,50 ppm, čineći ga multipletom. Iznosi integrala spomenutih signala daju vrijednost od jednog, tri, tri i jednog protona, te se time pojašnjava njihova međusobna cijepanja. Tako je multiplet na 2,11 ppm zapravo oktet [ $N = n + 1 = (3+3+1)+1$ ], dok se ostali spomenuti signali pojavljuju kao dubleti s većom ( $\delta$  0,72; 0,92,  $^3J = 6,8$  Hz) i manjom konstantom sprege ( $\delta$  4,50;  $^3J = 3,8$  Hz) (tablica 5). Ova sprezanja upućuju da molekula sadrži izobutilnu skupinu.

Tablica 5. Kemijski pomaci ( $\delta$ , ppm) i konstante sprege ( $J$ , Hz) u spektrima <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR za spoj **C5**.

H/C	$\delta_H$	$\delta_C$
3' (CH <sub>3</sub> )	0,72 (3H, d, $J = 6,8$ )	16,62
CH <sub>3</sub>	2,54 (3H, s)	17,59
2'-CH <sub>3</sub>	0,92 (3H, d, $J = 6,8$ )	20,04
2'	2,11 (1H, m, $J = 6,8; 4,6$ )	31,76
1'	4,50 (1H, d, $J = 3,8$ )	73,03
1'-OH	4,92 (1H, br)	/
2-OH	12,17 (1H, br)	/
3	/	119,32
5	/	145,47
4	/	154,98
2	/	155,53
COOH	12,75 (1H, br)	165,18

(300 MHz – <sup>1</sup>H NMR; 75 MHz – <sup>13</sup>C NMR; svi spektri su snimljeni u DMSO-d<sub>6</sub>; multipliciteti i konstante sprege ( $J$ , Hz) dane su u zagradi – s = singlet, d = dublet, m = multiplet, br = široki).

Rezonancija protona 1'-H na 4,50 ppm predstavlja pomak protona u niže polje pod utjecajem elektronodvlačće skupine u neposrednoj blizini. Radi se o hidroksilnoj skupini 1'-OH čiji je signal na 4,92 ppm. Singlet s rezonancijom na 2,54 ppm i njegov integral od tri protona navodi da se radi o metilnoj skupini koja nije u sustavu sprezanja izobutilnog fragmenta.

Spektar  $^{13}\text{C}$  NMR (prilog 28) prikazuje signale deset C-atoma od kojih je pet  $sp^3$  hibridiziranih (tri metilna i dva metinska) te pet  $sp^2$  hibridiziranih (četiri kvaterna i jedan karbonilni). Signal na 165,18 ppm upućuje na prisutnost karbonilnog C-atoma, odnosno karboksilne skupine (tablica 5). C-atomu (1'-C) na 73,03 ppm pridružena je hidroksilna skupina koja utječe na njegov pomak u niže polje u odnosu na ostale  $sp^3$  hibridizirane C-atome. To je u skladu s pomakom protona 1'-H (4,50 ppm) u spektru  $^1\text{H}$  NMR. Povezanost signala ostalih ugljika u visokom polju s odgovarajućim signalima protona učinjena je na temelju podataka iz spektra HMQC (prilog 29).

Molekulska formula spoja **C5** koja proizlazi iz podataka spektara  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR iznosi  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$ . Međutim, izračunati indeks manjka vodika (engl. Index of Hydrogen Deficiency, IHD) ili ekvivalent dvostruke veze (engl. Double-Bond Equivalents, DBE) (Williams i Fleming, 1997.) za ovu molekulsku formulu iznosi četiri.

$$IHD = 1/2 [2 \times C + 2 + N - (H + X)] \quad 4.1$$

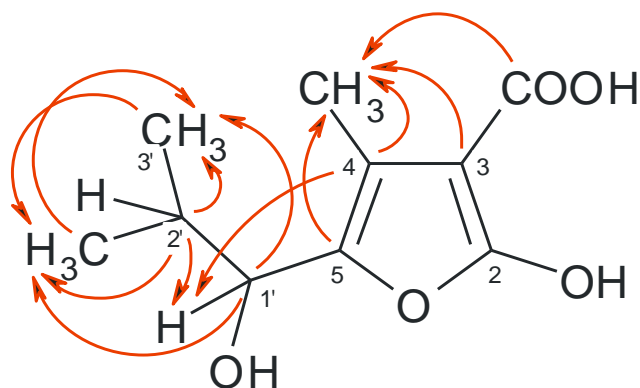
gdje su  $C$ ,  $H$ ,  $N$  i  $X$  broj atoma ugljika, vodika, dušika i halogena u molekuli. Uvrštenjem pojedinih vrijednosti iz predložene molekulske formule dobije se:

$$IHD = 1/2 (2 \times 10 + 2 - 14) = 4$$

Budući da je iz dosadašnjih razmatranja spektara NMR spoja **C5** moguće odrediti tri dvostruke veze (jedna karbonilna iz karboksilne skupine i dvije  $\text{C}=\text{C}$  koje čine četiri kvaterna olefinska C-atoma), preostaje da je još jedan ekvivalent dvostruke veze moguće dobiti svrstavanjem četiri olefinska C-atoma u aromatski prsten koji zatvaraju zajedno s atomom kisika. Prema tome, konačna molekulska formula spoja **C5** bila bi  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5$ . Predložena

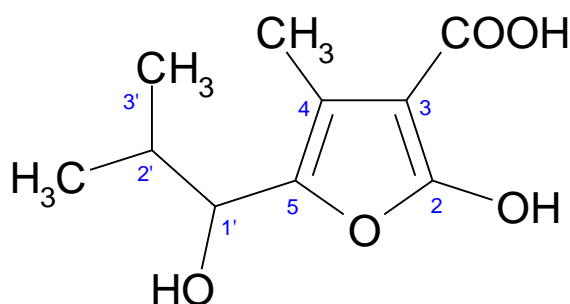


struktura spoja **C5** dalje je utvrđena na temelju podataka iz spektra HMBC (prilog 30), a na slici 48 prikazane su glavne korelacije između pojedinih ugljika i protona.



Slika 48. Korelacije protona i ugljika kroz više veza ( $^2J$ ,  $^3J$  i  $^4J$ ) u spektru HMBC spoja **C5**.

Naposljetku, iz navedenih razmatranja struktura spoja **C5** određena je kao 2-hidroksi-5-(1-hidroksi-2-metilpropil)-4-metilfuran-3-karboksilna kiselina, a prikazana je na slici 49.



Slika 49. Struktura spoja **C5**.

#### 4.2.4. Strukturna karakterizacija spoja **C6**

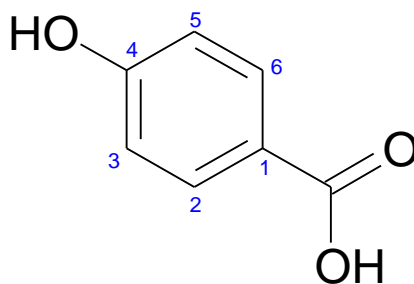
Molekulska formula spoja **C6** određena je na temelju podataka spektara  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR (prilozi 33 i 34). U spektru  $^{13}\text{C}$  NMR može se očitati pet signala koji se nalaze u području rezonancije  $sp^2$  hibridiziranih C-atoma (tablica 6). Dva signala koja predstavljaju tercijarne (metinske) C-atome dvostrukog su intenziteta u odnosu na ostale signale, što upućuje na simetričnost strukture, odnosno preklapanje signala za dva para C-atoma. Prema tome,

pretpostavljeno je da molekula spoja **C6** sadrži ukupno sedam C-atoma (četiri metinska i tri kvaterna od kojih je jedan karbonilni). Na simetričnost molekule ukazuju i podaci spektra  $^1\text{H}$  NMR, gdje se za signale na 6,68 i 7,03 ppm mogu uočiti intenzivna dva dubleta s konstantama sprege  $^3J = 8,5$  Hz, karakterističnim za sprezanje susjednih protona koji se nalaze na aromatskom prstenu. Prema integralu, intenzitet ovih signala dvostruko je veći od signala još dva protona koji se nalaze u spektru i tako navode na zaključak da ovi dubleti pripadaju dvama parovima protona koji su simetrično raspoređeni u molekuli. Rezonancija signala na 12,21 ppm upućuje da se radi o signalu protona karboksilne skupine, a signal u također niskom području na 9,27 ppm upućuje na proton hidroksilne skupine. Prema tome, molekulska formula spoja **C6** definirana je kao  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ , a struktura koja proizlazi iz ove formule određena je kao *para*-hidroksibenzojeva kiselina (slika 50).

Tablica 6. Kemijski pomaci ( $\delta$ , ppm) i konstante sprege ( $J$ , Hz) u spektrima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **C6**.

H/C	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	/	125,21
2, 6	7,03 (2H, d, $J = 8,51$ )	130,34
3, 5	6,68 (2H, d, $J = 8,52$ )	115,10
4	/	156,12
OH	9,27 (1H, s)	/
COOH	12,21 (1H, br)	173,22

(300 MHz –  $^1\text{H}$  NMR; 75 MHz -  $^{13}\text{C}$  NMR; svi spektri su snimljeni u DMSO- $d_6$ ; multipliciteti i konstante sprege ( $J$ , Hz) dane su u zagradi – s = singlet, d = dublet, br = široki).



Slika 50. Struktura spoja **C6**.

### 4.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost uparenim ekstraktima filtrata fermentacijske komine te pročišćenom spoju **C1** i **C5** određena je testom minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) koristeći Gram-pozitivne i Gram-negativne mikroorganizme koji su navedeni u poglavlju 3.1.2. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti filtrata i ekstrakta fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* sojeva R6-500 i ZGL1 nalaze se u tablici 7. Filtrati i ekstrakti roditeljskog (R6-500) i rekombinantnog soja (ZGL1) pokazuju vrlo malu antibakterijsku aktivnost prema sojevima bakterija *Staphylococcus aureus* koji su korišteni u testovima MIK.

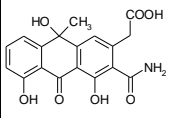
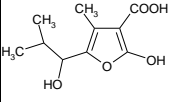
Tablica 7. Procijenjena koncentracija antibiotika antibakterijskog testiranja filtrata i ekstrakata fermentacijske komine bakterije *S. rimosus* soja R6-500 i rekombinantnog soja ZGL1.

Soj	Filtrati		Ekstrakti	
	<i>S. aureus</i> (osjetljiv prema TC)	<i>S. aureus</i> (otporan prema TC)	<i>S. aureus</i> (osjetljiv prema TC)	<i>S. aureus</i> (otporan prema TC)
R6-500	160	bez aktivnosti	> 12800	100
ZGL1	128	128	256	128

MIK ( $\mu\text{g/mL}$ ) za OTC: *S. aureus* ATCC27661 (osjetljiv prema TC) = 1  $\mu\text{g/mL}$   
*S. aureus* ATCC27659 (otporan prema TC) = > 128  $\mu\text{g/mL}$

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti pročišćenim spojevima **C1** i **C5** prikazani su u tablici 8. Vrijednosti MIK za spoj **C5** također ukazuju na njegovu vrlo slabu antibakterijsku aktivnost koja je na razini rezultata dobivenih za filtrat, odnosno ekstrakt fermentacijske komine soja ZGL1. Nažalost, i antimikrobna aktivnost spoja **C1** slijedi ovaj trend. Iako je testiranje spoja **C1** provedeno na više mikroorganizama, vrijednosti MIK za spoj **C1** pokazuju njegovu slabu antimikrobnu aktivnost.

Tablica 8. Rezultati antimikrobnog testiranja (MIK) spoja C1 i spoja C5.

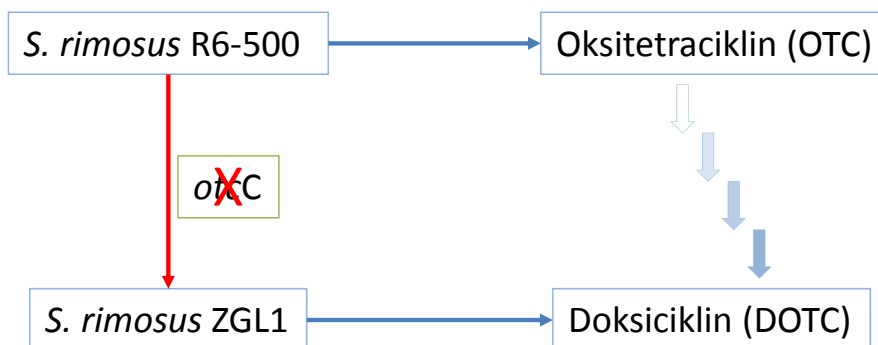
Spoj	<i>S. aureus</i> ATCC27661	<i>S. aureus</i> ATCC27659	<i>S. aureus</i> / B 0329	<i>S. aureus</i> / iMLS / B 0538	<i>S. aureus</i> / cMLS / B 0330	<i>S. aureus</i> / M / B 0331	<i>S. pneumoniae</i> / cMLS / B 0328	<i>S. pneumoniae</i> / M / B 0326	<i>S. pyogenes</i> / B 0542	<i>S. pyogenes</i> / iMLS / B 0543	<i>S. pyogenes</i> / cMLS / B 0544	<i>S. pyogenes</i> / B 0545	<i>M. chatharralis</i> / B 0324	<i>H. influenzae</i> / B 0529	<i>E. faecalis</i> / B 0004	<i>E. coli</i> / B 0001	<i>S. cerevisiae</i> / B0332	<i>S. pneumoniae</i> / B 0627	<i>S. pneumoniae</i> / B 0633
 C1	/	/	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64
 C5	> 128	> 128	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

(/ - nije testirano)

## 5. RASPRAVA

Poznato je da bakterijske vrste *S. rimosus* i *S. aureofaciens* sintetiziraju četiri prirodna aromatska poliketidna tetraciklinska antibiotika. Ti su kemijski spojevi nazvani: tetraciklin (TC), oksitetraciklin (OTC), klortetraciklin (CTC) i 6-demetilklortetraciklin (DMCTC). Većina prirodnih tetraciklina ima zajedničku strukturu s  $\beta$ -diketonskim sustavom u prstenovima B i C koji je presudan za njihovu antibiotsku aktivnost (slika 15) (vidi citate u: O'Hagan, 1991.). Oksitetraciklin je aromatski poliketidni antibiotik, čija je okosnica izgrađena od 19 C-atoma, a sintetizira ga bakterijska vrsta *S. rimosus*. Genska nakupina, čiji su produkti odgovorni za biosintezu antibiotika oksitetraciklina, sastoji se od 23 gena koji su klonirani i djelomično sekvencirani (slike 8 i 9) (Hunter i Hill, 1997.; Hranueli *i sur.*, 1999.; Perić-Concha *i sur.*, 2005.). Antibiotik oksitetraciklin je bio jedan od prvih antimikrobnih spojeva za koje se koristio pojam *široki spektar*. Naime, antibiotik oksitetraciklin posjeduje aktivnost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, posebno rikacijama, mikobakterijama i protozoama (vidi citate u: O'Hagan, 1991.). Velika proizvodnja i primjena oksitetraciklina u humanoj i veterinarskoj medicini tijekom desetljeća dovela je, međutim, do pojave otpornosti i smanjene učinkovitosti ovog antibiotika. Tako je nastala potreba za razvojem derivata oksitetraciklina koji će biti u stanju premostiti ove mehanizme rezistencije. Klinički najvredniji tetraciklini druge generacije su antibiotici minociklin i doksiciklin (slike 19, 20 i 21). Kemijska modifikacija oksitetraciklina u doksiciklin, u industrijskim uvjetima je vrlo skupa (vidi citate u: O'Hagan, 1991.) pa je u tvornici PLIVA započet projekt proizvodnje doksiciklina biosintetskim putem pomoću specijalno konstruiranih bakterijskih sojeva vrste *S. rimosus* u kojih je genska nakupina, čiji produkti sudjeluju u biosintezi oksitetraciklina, izmijenjena pomoću tehnologije genetičkog inženjerstva (Perić-Concha *i sur.*, 2005.; Petković *i sur.*, 2006.). Naime, jedan od gena te genske nakupine, gen *otcC*, sadržava genetičku uputu za anhidrotetraciklin oksigenazu, enzim koji katalizira hidroksilaciju antraciklinske strukture na položaju C-6 nakon što je sintetizirana poliketidna okosnica. Rekombinantni soj bakterije *S. rimosus* ZGL1, u kojem je kopija gena *otcC* inaktivirana insercijom genetičkog biljega, trebao bi teoretski sintetizirati doksiciklin (slike 8 i 51). Gen *otcC* nalazi se na početku takozvane višestruke glasničke molekule RNA (engl. poly-messenger) ispred gena *otcZ* i gena *otrA* (slika 8). Prema tome, njegovom se inaktivacijom transkripcija tih dvaju gena može izbaciti izvan ispravnog okvira čitanja. Da bi se to izbjeglo, te da bi se biološki neaktivan produkt gena *otcC* vratio na isto mjesto u multienzimskom kompleksu PKS, klonirani gen *otcC* inaktiviran je takozvanom mjesno-specifičnom mutagenezom (slika 10). Nakon toga,

zamijenjeni gen *otcC*, inaktiviran je ugradnjom genetičkog biljega, s genom *otcC* inaktiviranim mjesno-specifičnom mutagenезom. Na taj je način konstruiran genetički modificiran soj ZGL5 bakterijske vrste *S. rimosus* (slika 8) (Perić-Concha *i sur.*, 2005.). Sojevi ZGL1 i ZGL5 bakterijske vrste *S. rimosus* uzgajani su u hranjivoj podlozi za biosintezu oksitetraciklina. U fermentacijskim se kominama njihove biosinteze, nakon izolacije, pročišćavanja i kemijske karakterizacije produkata biosinteze tražio produkt strukture doksiciklina.



Slika 51. Shematski prikaz pretpostavljenog načina dobivanja doksiciklina biosintezom – genetskom modifikacijom bakterije *S. rimosus* soj R6-500 konstruiran je soj ZGL1 za koji se pretpostavlja da će sintetizirati antibiotik doksiciklin. Za sada, doksiciklin se proizvodi polusintetski polazeći od molekule oksitetraciklina.

## 5.1. Biosinteza i pročišćavanje spojeva

Analizom uzoraka fermentacijske komine roditeljskog soja bakterije *S. rimosus* soja R6-500 i rekombinantnog soja ZGL1 pomoću tankoslojne kromatografije (slike 32A, 35B i 35C) jasno se vidi da rekombinantni soj ne proizvodi oksitetraciklin (OTC), barem ne u količini koju je, ovim metodama, moguće detektirati. Na kromatogramu TLC uočene su mrlje nekoliko novih supstancija koje u uzorku roditeljskog soja nisu prisutne. Iako bi se iz kromatograma HPLC (slike 32B, 34 i 39) moglo zaključiti o prisutnosti molekule OTC pa i doksiciklina (DOTC) (slika 36) u ekstraktima fermentacijske komine rekombinantnog soja ZGL1, kombinirajući ove rezultate s rezultatima kromatograma TLC, ove su pretpostavke odbačene. Time se potvrđuje korisnost kromatografije TLC kao jednostavne i vrlo informativne tehnike. Unatoč ovim ključnim saznanjima, postupak izolacije i pročišćavanja supstancija nastalih biosintezom rekombinantnog soja ZGL1, nastavljen je iz razloga da se

pročišćenim spojevima odredi struktura te da se na temelju tih rezultata pokuša objasniti uloga i način djelovanja C-6 hidrosilaze u složenom enzimskom sustavu PKS tijekom biosinteze oksitetraciklina.

Procjenjujući brojnost supstancija koje sintetizira, soj ZGL1 možemo svrstati u skupinu tzv. "talentiranih" organizama, tj. onih koji su sposobni sintetizirati velik raspon strukturno različitih sekundarnih metabolita (Burkhardt *i sur.*, 1996.). Iz perspektive (industrijskog) pročišćavanja sekundarnih metabolita, puno su prihvatljiviji sojevi mikroorganizma koji proizvode manji broj supstancija, u količini koja se može povećati optimizacijom sastava hranjivog medija i parametara biosinteze (pH, temperatura, miješanje, aeracija itd.). Analizom filtrata i ekstrakata fermentacijske komine metodama TLC i HPLC uočeno je da su moguće male promjene u broju i količini pojedinih supstancija između provedenih eksperimenata fermentacija. Ovo se može objasniti različitom starošću pojedinih kolonija bakterija koje su upotrebljene za biosintezu od eksperimenta do eksperimenta. Budući da su prinosi pojedinih supstancija tijekom biosinteze rekombinantnog soja ZGL1 bili znatno niži od prinosa oksitetraciklina koje je davao proizvodni soj R6-500, fermentacije soja ZGL1 su se umjesto u Erlenmeyer tikvicama, najčešće provodile u 10 litarskim bioreaktorima koristeći hranjivi medij za biosintezu oksitetraciklina. Koncentracije pojedinih supstancija tijekom biosinteze (slika 33) praćene su uporabom analitičkog sustava HPLC, a procijenjene su usporedbom prema kalibracijskom pravcu standarda OTC. Kako je već prije navedeno, profili koncentracija pojedinih supstancija razlikovali su se između provedenih fermentacija.

Ako se izuzme separacija biomase iz fermentacijske komine nakon završene biosinteze uporabom filtracije ili centrifugiranjem, prvi stupanj u pročišćavanju sekundarnih metabolita predstavlja ekstrakcija tekuće-tekuće (Harrison *i sur.*, 2003.). Na početku su se kao otapalo za ekstrakciju upotrebljavali n-butanol i etil-acetat. Međutim, kasnije je za provedbu ekstrakcije odabran etil-acetat iz sljedećih razloga:

- sadržavao je jednaku količinu sekundarnih metabolita kao i n-butanol,
- stvaranje (stabilnih) emulzija tijekom postupka ekstrakcije bilo je znatno smanjeno u odnosu na emulzije koje su se stvarale upotrebom n-butanola,
- mješljivost etil-acetata s vodenim medijem je manja, a vrelište niže, pa je kasnije uklanjanje etil-acetata jednostavnije i učinkovitije od uklanjanja n-butanola.

Iako učinkovit, etil-acetat nije i dovoljno selektivan kao ekstrakcijsko otapalo na što upućuju kromatogrami TLC i HPLC ekstrakata (slika 35 A, B i C). Pretpostavljeno je da bi se

selektivnija ekstrakcija aromatskih sekundarnih metabolita iz filtrata fermentacijske komine postigla primjenom polimernog materijala kao što je Diaion HP20 ili HP21 (Mitsubishi Chemical Industries Limited) (Shiono *i sur.*, 2004.; Yun *i sur.*, 2002.). Time bi se postigao jednostavniji postupak izolacije i pročišćavanja, a iskorištenja bi bila veća. Stoga je alikvot filtrata fermentacijske komine (500 mL) propušten (filtriran) kroz stupac smole Diaion HP-20 (20 g). Kolona je zatim isprana vodom, a adsorbirani spojevi eluirani su smjesom 10-50 % metanol/voda. Pokazalo se da je ovakav način ekstrakcije potrebno dodatno optimirati kako bi se dobio postupak po učinkovitosti usporediv s postupkom ekstrakcije s etil-acetatom.

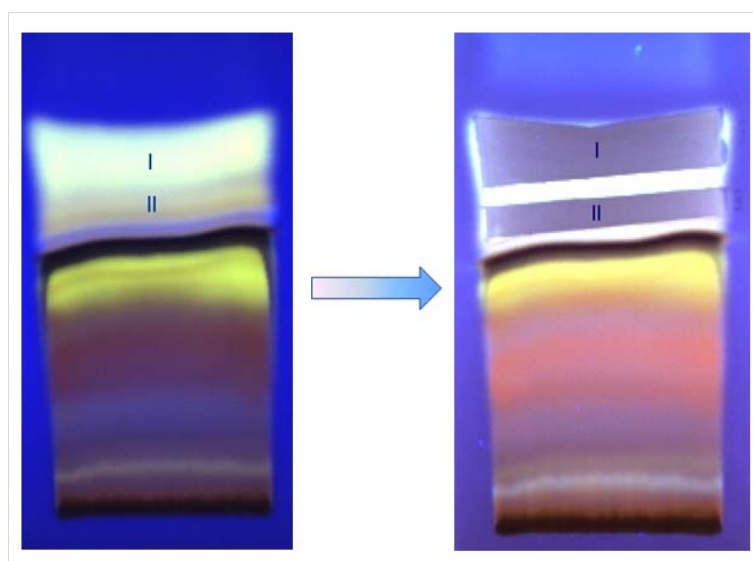
Količine uparenog ostatka dobivenog ekstrakcijom 6 do 8 L filtrata fermentacijske komine kretale su se od 2,5 do 5 g. Analiza HPLC uzorka rafinata (slika 37) pokazala je da ekstrakcija filtrata fermentacijske tekućine nije potpuna. To je i za očekivati budući da se ekstrakcija provodila u najviše dva stupnja. Ipak, sadržaj spojeva u rafinatu znatno je manji od onog u ekstraktu, pa nije bilo porebno uvoditi dodatne stupnjeve ekstrakcije radi povećanja iskorištenja. Ekstrakcijom pomoću metanola bakterijskog micelija (biomase) i analizom takvog ekstrakta, utvrđeno je da se u miceliju nalazi također izvjesna količina sekundarnih metabolita (slika 38). Zbog mogućnosti da se ekstrakcijom micelija pored sekundarnih metabolita ekstrahiraju sastavni dijelovi stanica i stanični ostaci, ova strategija dobivanja sekundarnih metabolita nije se koristila.

Budući da je utvrđeno kako rekombinantni soj ZGL1 s inaktiviranim genom *otcC* ne sintetizira ciljani spoj doksiciklin, postupak izolacije supstancija nije bilo potrebno usmjeriti prema postupcima za izolaciju doksiciklina objavljenim u literaturi (npr. Naidong *i sur.* 1991.). Strategija pročišćavanja supstancija na početku temeljila se na jednostavnim i općim principima koje je nudila literatura – pročišćavanje ekstrakata fermentacijske komine preparativnom tekućinskom kromatografijom na stupcu silikagela. Ubrzo se pokazalo da zbog velikog broja spojeva prisutnih u ekstraktu i male količine u kojoj su biosintetizirani, njihovo izravno dobivanje (u jednom stupnju) nije uspješno. Kombinacijom različitih stacionarnih faza (RP-18; RP-8) i mijenjanjem polarnosti mobilne faze, određene grupe spojeva prisutnih u ekstraktu prvo su frakcionirane, a zatim su pojedine grupe spojeva pročišćavane sljedećim stupnjevima kromatografije primjenom različitog sustava stacionarne i mobilne faze. Tim načinom postignuto je da se pojedine komponente ekstrakta dobiju u količinama koje omogućavaju njihovu strukturnu karakterizaciju.

Zapanjujuća složenost sastava ekstrakta filtrirane fermentacijske tekućine postaje vidljiva analizom frakcija (slika 40) nakon primarnog pročišćavanja ekstrakta



kromatografijom na stupcu silikagela (ili silikagela obrnute faze). Gradijentna promjena polarnosti (hidrofilnosti) u smjesi za eluciju otkriva iznenađujuće bogatsvo spojeva prisutnih u ekstraktu fermentacijske komine. Ovakvi uzorci predstavljaju izazov svakom kromatografskom sustavu, bilo analitičkom ili preparativnom, i stoga ne čudi potreba za nekoliko stupnjeva kromatografije s različitim sustavima stacionarne i mobilne faze kako bi se pročistila pojedina supstancija. Na taj način pročišćeni su spojevi **C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5** i **C6** u količini i čistoći koja je omogućila snimanje spektara potrebnih za određivanje njihove strukture. Pored kromatografije na stupcu, za pročišćavanje pojedinih komponenti primjenio se je i preparativni TLC (slika 52). Međutim, zbog malog kapaciteta TLC ploče, količina i čistoća izoliranih komponenti nije bila dovoljna za snimanje spektara NMR.



Slika 52. Preparativni TLC kromatogram (lijevo) i nakon izrezivanja odabranih zona (silikagel; debljina sloja 2 mm; detekcija pri 366 nm).

Općenito, pročišćavanje supstancija iz fermentacijske tekućine soja ZGL1, dodatno je otežano zbog malih količina u kojima su proizvedeni sekundarni metaboliti. Ipak, pokazalo se da je spoj **C1** dominantan sekundarni metabolit rekombinantnog soja ZGL1 te da ga je moguće izolirati i pročistiti gotovo svim postupcima izolacije i pročišćavanja koji su bili primijenjeni u ovom radu. Pored navedenih spojeva, izoliran je i pročišćen i spoj **C7**, međutim zbog nedovoljno jasnih podataka iz spektara NMR i MS, strukturu ovom spoju nije bilo moguće predložiti u cijelosti, pa se stoga ovaj spoj nije posebno razmatrao. Prema kromatogramima TLC i HPLC ekstrakta rekombinantnog soja ZGL1 (slika 35), vrlo je vjerojatno da se iz

ekstrakta može pročistiti još određen broj spojeva različite duljine poliketidnog lanca, pa ovo može biti tema budućeg rada.

Analizirajući kromatogram TLC (slika 41), iznenađuje činjenica da je  $R_f$  vrijednost spoja **C2** jednaka  $R_f$  vrijednosti spoja **C1**. Naime, za očekivati je da bi nedostajanje karboksilne skupine u spoju **C2** povećalo njegova hidrofobna (lipofilna) svojstva pa bi zadržavanje navedenog spoja u korištenom sustavu bilo veće od spoja **C1**. U skladu s ovim razmatranjima, spoj **C3** s metiliranom karboksilnom skupinom ima  $R_f$  vrijednost manju od spoja **C1**, što govori o doprinosu metilne skupine lipofilnim svojstvima cijele molekule.

Struktura pročišćenim spojevima određena je na temelju asigniranja spektara 1D i 2D NMR, a za spojeve **C1**, **C2** i **C3** podaci iz spektara MS također su potvrdili pretpostavljene strukture. Budući da se radi o novim spojevima, podaci iz spektara NMR pročišćenih spojeva uspoređeni su s dostupnim podacima u literaturi tek nakon što su im određene strukture. Tako su djelomično (ovisno o sličnosti/poklapanju strukture sa spojem iz literature) potvrđene strukture spojeva **C1**, **C2** i **C3** kao derivata antrona (Dagne *i sur.*, 1998.; Anu *i sur.*, 2001, 2002.).

Pročišćeni spojevi pokazuju velik stupanj strukturne različitosti. Može ih se svrstati u dvije skupine; u jednoj su spojevi **C1**, **C2** i **C3** koji pripadaju redu antrona, a drugoj skupini pripadaju spojevi **C4**, **C5** i **C6** koje možemo općenito okarakterizirati kao monocikličke aromatske spojeve. Spojevi ovih dviju skupina znatno se razlikuju u duljini poliketidnog lanca, a samim time i prema načinu slaganja molekule tijekom biosinteze.

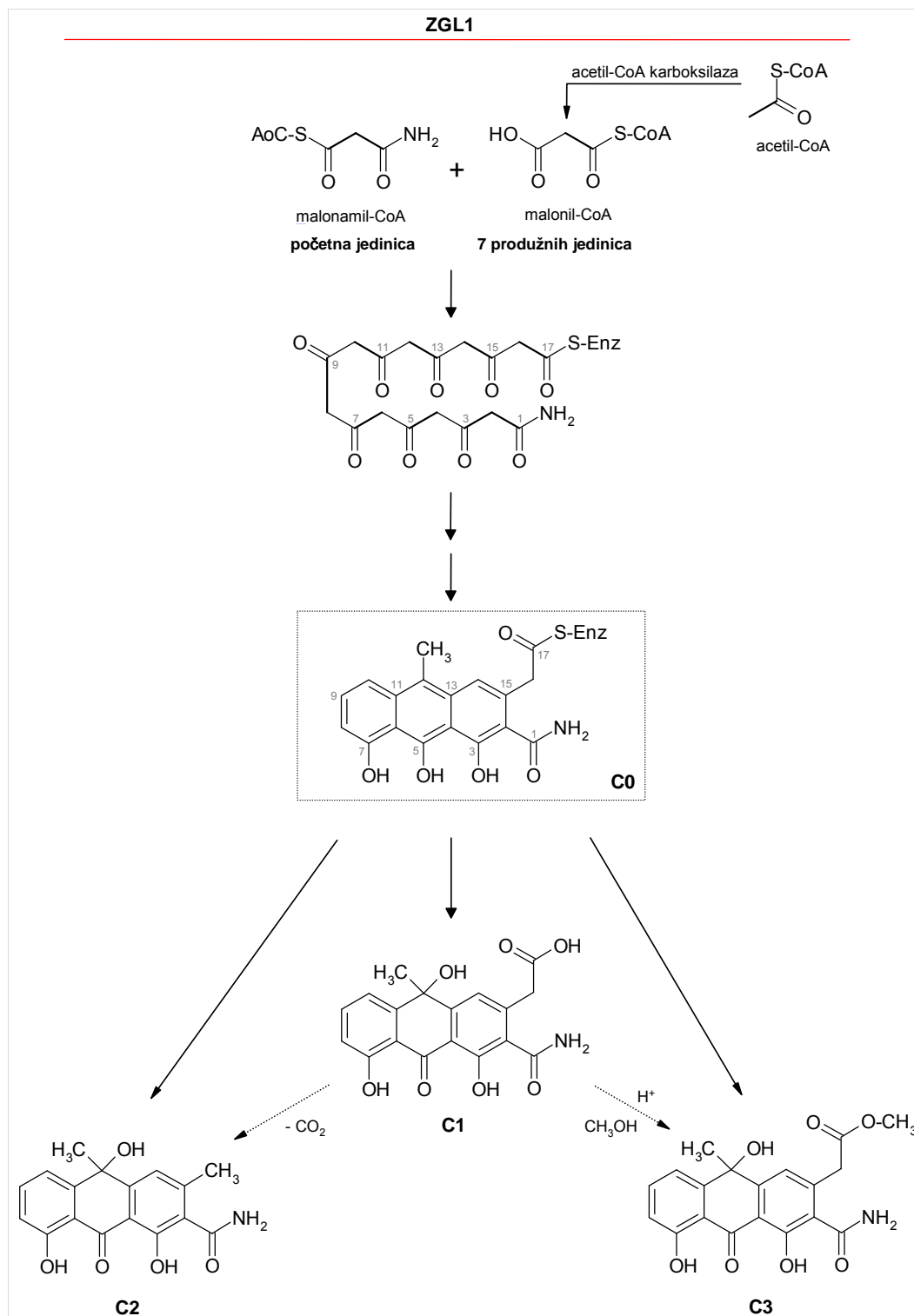
### 5.1.1. Biosinteza spojeva **C1**, **C2** i **C3**

U predloženom putu biosinteze OTC u bakteriji *S. rimosus* (Zhang *i sur.* 2006.), osam acetatnih jedinica dodano je na početnu jedinicu malonamida kako bi se nakon ciklizacije stvorila tetraciklička struktura od 19 C-atoma. Analogno biosintetskom putu OTC, predložen je biosintetski put nastajanja spojeva **C1**, **C2** i **C3** (slika 53). Poliketidna okosnica ovih spojeva sastoji se od 17 C-atoma. Također, sadrži i karboksamido skupinu na početku nastalog lanca i po tome se poklapa sa strukturom poliketidne okosnice OTC. Iz ovoga slijedi da biosinteza ovih antrona započinje na način koji je analogan biosintezi OTC – predloženo je, dakle, da oktaketidna okosnica antrona nastaje iz početne jedinice malonamida na koju je djelovanjem enzima PKS dodano sedam jedinica acetata ( $3 + 7 \times 2 = 17$ ). Molekule acetata su

prije same ugradnje u poliketidnu okosnicu, djelovanjem enzima acetil-karboksilaze prevedene u molekule malonila (aktivirane kao malonil-CoA) i kao takve sudjeluju u reakcijama produljenja poliketidnog lanca. Nakon stvaranja poliketidnog lanca od sedamnaest C-atoma, za pretpostaviti je da zatim slijedi postupna ciklizacija/aromatizacija poliketidnog lanca – prvo dolazi do zatvaranja prstena na položajima 6-11 (prsten C), zatim 4-13 (prsten B) i naposljetku na položajima 2-15 (prsten A). Mogući intermedijer koji iz toga proizlazi i koji se zatim djelovanjem poslijepoliketidnih enzima prevodi u antrone označen je s **C0** (slika 53).

Biosinteza antrona **C2** i **C3** dodatno zahtijeva provedbu reakcije dekarboksilacije, odnosno metilacije (esterifikaciju). Prema tome, za očekivati bi bilo da je spoj **C1** priređen u količini većoj no što su sintetizirani spojevi **C2** i **C3**. I doista, tijekom postupka izolacije i pročišćavanja ovih spojeva iz ekstrakata fermentacijskih komina rekombinantnog soja ZGL1, spoj **C1** uvijek je bio prisutan u količini koja omogućava njegovo relativno izravno dobivanje, dok su spojevi **C2** i **C3** bili na razini ostalih detektiranih metabolita. Također, postoji mogućnost da su spojevi **C2** i **C3** nastali kao produkti degradacije spoja **C1** tijekom postupka pročišćavanja. U tom slučaju u obzir treba uzeti i uvjete pri kojima su spojevi **C2** i **C3** pročišćeni – kromatografija na stupcu silikagela sa smjesom otapala za eluciju n-heksan-etil-acetat pri sobnoj temperaturi.

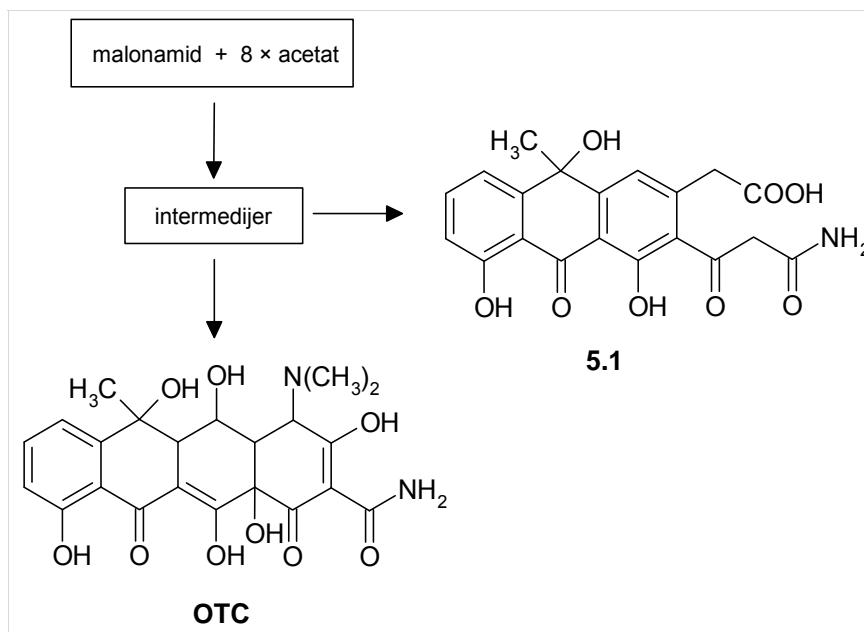
- Dekarboksilacija **C1** → **C2**; reakcije dekarboksilacije inače zahtijevaju veliku energiju aktivacije pa jednostavne acikličke kiseline ne dekarboksiliraju niti uz grijanje (Pine, 1994.). Dekarboksilacija je olakšana ukoliko se na  $\beta$ -položaju nalazi karbonilna skupina (dakle  $\beta$ -ketokiselina) ili bilo koja skupina koja može primiti elektronski par iz veze s karboksilnom skupinom. Struktura **C1** ne pogoduje dekarboksilaciji pa je stoga vjerojatnost nastanka spoja **C2** mala.
- Metilacija **C1** → **C3**; zahtijeva kisele uvjete i prisutnost metanola. Silanolne skupine na silikagelu možemo smatrati kiselim, međutim, za pročišćavanje je korišten etil-acetat. Stoga je vjerojatnost metilacije spoja **C1** u navedenim uvjetima mala.



Slika 53. Predloženi biosintetski put spojeva C1, C2 i C3.

Postoji mogućnost da se dekarboksilacija odvija prije ciklizacije prstena A. U tom slučaju, supstrat se mora otpustiti s ACP, a ciklizacija prstena A odvijala bi se van PKS, tj. to bi bila poslijepoliketidna modifikacija. Ova razmatranja podržavaju tezu da su pročišćeni antroni ipak produkti metabolizma rekombinantnog soja ZGL1.

Triciklički antron **5.1** (slika 54) u literaturi je spomenut kao mogući sporedni produkt koji nastaje tijekom biosinteze OTC (McCormick *i sur.*, 1968.). Izoliran je iz mutiranog soja *S. aureofaciens*. Ovaj metabolit kasnijim biotransformacijama nije preveden u oksitetraciklin, te je tako predstavljen kao sporedni produkt u biosintezi oksitetraciklina. Pretpostavlja se da nastaje neenzimatskim reakcijama polazeći od intermedijera iz određenog stupnja u biosintezi OTC (slika 54).



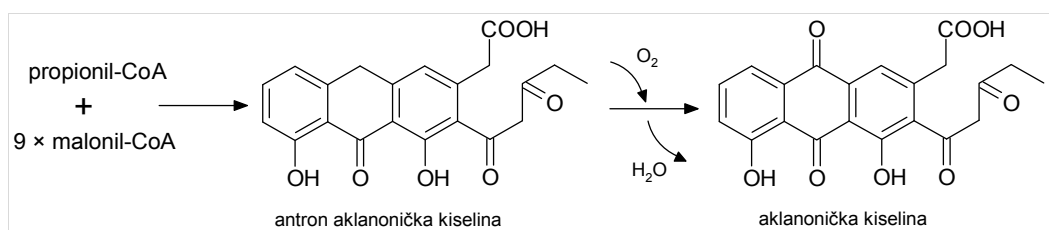
Slika 54. Pretpostavljena shema nastajanja antrona (**5.1**) izoliranog iz mutiranoga soja bakterije *S. aureofaciens*.

Ovaj spoj pokazuje veliku strukturnu sličnost sa spojevima **C1**, **C2** i **C3** koji su izolirani iz rekombinantnog soja ZGL1. Molekulska okosnica antrona **5.1** sastoji se od 19 C-atoma, poput okosnice OTC. Molekulska okosnica antronskih spojeva koje sintetizira rekombinantni soj ZGL1 sastoji se od 17 C-atoma. To bi značilo da je inaktivacija *otcC* gena na biosintezi metabolita utjecala na dva načina:

- određivanjem duljine poliketidnog lanca, tj. došlo je do skraćivanja poliketidne okosnice za 2 C-atoma,
- u ranoj fazi biosinteza je usmjerena na stvaranje tricikličkog antrona umjesto da je nastavljeno očekivano slaganje tetraciklinske strukture koja bi naposljetku rezultirala sintezom doksiciklina.

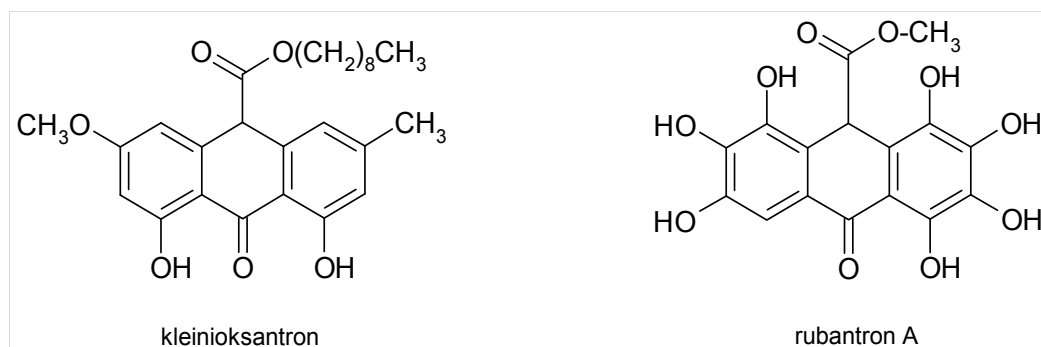
### 5.1.2. Antroni iz drugih PKS sustava

Antrakinoni i njihovi prekursori, antroni, česte su supstancije u različitim organizmima, polazeći od bakterija, gljivica, biljaka pa do nekih životinja (Thomson, 1987.). Poznato je da bakterija *S. galilaeus* specifičnim enzimom oksidira antron aklanoničku kiselinu u odgovarajući antrakinon - aklanoničku kiselinu (Chung *i sur.*, 2002.) (slika 55).



Slika 55. Shema biosinteze aklanoničke kiseline u bakteriji *S. galilaeus*.

Sasvim je uobičajeno antrone pronaći kao sekundarne metabolite biljaka. Primjeri takvih biljnih antrona, izoliranih iz različitih dijelova biljaka, prikazani su na slici 56 (Anu *i sur.*, 2001, 2002.; Flamini *i sur.*, 2002.).



Slika 56. Strukture antrona izoliranih iz biljaka: kleinioksantron iz korijena biljke *Cassia kleinii*; rubantron A iz nadzemnog dijela biljke *Rubus ulmifolius* (pokazuje slabo antimikrobno djelovanje prema bakteriji *Staphylococcus aureus*).

Nažalost, usporedbe radi, biosintetski putevi ovih antrona u biljkama nisu opisani. Unatoč tome, do sada su opisana dva osnovna načina sklapanja poliketidnog lanca u strukture spojenih aromatskih prstenova (Thomas, 2001.): način F (odnosi se na gljivice, tj. eukariote) i način S (odnosi se na streptomicete, tj. prokariote). Stoga se može pretpostaviti da su antroni

prirodni spojevi koji kao produkti poliketid sintaza mogu biti složeni na barem dva načina. Popularna metoda u studijama biosinteze sekundarnih metabolita, pogotovo u bakterija, je upotreba  $^{13}\text{C}$  obogaćenih acetata i/ili malonata koji se ugrađuju u poliketid. Razlog popularnosti izotopima jednostruko ili dvostruko označenih acetata je da se lako mogu detektirati spektroskopijom NMR (Bax *i sur.*, 1981.; Staunton i Weissman 2001.). Mjesta na kojima su ugrađeni izotopi povećati će jačinu signala u odnosu na razinu prirodne učestalosti (1 %). Idealno, za pouzdane dokaze obično se traži najmanje dvostruki iznos originalne veličine signala. Pored toga, jednostavan spektar  $^1\text{H}$ -raspregnuti  $^{13}\text{C}$  NMR koji sadrži signal singleta svakog ugljika može dati potpuni uzorak (engl. pattern) slaganja poliketida. Naravno, prethodno je potrebno precizno asignirati svaki signal u spektru  $^{13}\text{C}$  NMR.

Postoji jasan trend koja grupa organizama proizvodi koji tip spojeva. Tako se alkaloidi (npr. morfin) i fenilpropanoidi smatraju tipčnim metabolitima biljaka, dok se poliketidi (npr. tetraciklin) i neribosomski sintetizirani peptidi (npr. ciklosporin) smatraju specifičnim za mikroorganizme. Nasuprot općoj hipotezi da su biljke "izmislile" sve biosintetske puteve, ovi rezultati potkrepljuju činjenicu da se slični metaboliti mogu naći u različitim vrstama organizama. Mikroorganizmi sa složenim životnim ciklusom i velikim genomom poput aktinomiceta (Bentley *i sur.*, 2002.) koje se često može izolirati kao stanovnike tla, posebno su bogati u biosintetskim putevima te tako upućuju da neki "tipično biljni biosintetski putevi" zapravo mogu imati porijeklo iz mikroorganizama. Zajednice organizama mogle bi objasniti razmjenu DNK te tako eventualno rezultirati u horizontalnom prijenosu gena (Bode i Muller, 2003.).

### 5.1.3. Farmakološka svojstva antrona

Antrakini i antroni vrlo su reaktivni i imaju široku farmakološku aktivnost (Müller 2000.). Antroni lako mogu stvoriti antron anione, a ovi anioni mogu prijeći u antron-radikale i hidroksil-radikale (Hayden *i sur.*, 1994.; Müller, 2000.). Ovi radikali koji potječu od antrona oštećuju stijenke stanica i DNK parove baza ili mogu uzrokovati pucanje vrpce DNK. Ovo svojstvo antrona koristi se u liječenju psorijaze (Müller, 2000.). Antroni također imaju više učinaka na mitohondrije poput inhibicije preuzimanja kisika ili inhibicije ATP što se pokazalo u slučaju antrona antralina (1,8-dihidroksi-9-antron) (Fuchs *i sur.*, 1990.). Najčešće korišteni antron u topikalnom (lokalnom) liječenju psorijaze je antralin. Ipak, učinkovitost ovog lijeka umanjena je njegovim toksičnim sporednim učincima kao što je iritacija kože i upale. Zbog

toksičnosti antrona vrlo je zanimljivo da ih se može pronaći u toliko različitih organizama. Antipsorijatski antroni vjerojatno su najčešće korištena topikalna sredstva za liječenje psorijaze zbog njihove jake aktivnosti protiv rasta humanih keratinocita. Ovi lijekovi stvaraju supstancije s reaktivnim kisikom tijekom njihove autooksidacije pod fiziološkim uvjetima. Ove supstancije su uključene u niz oksidativnih učinaka koji utječu na stanične dijelove: interakcije s DNK, inhibicija različitih enzimskih sustava povezanih s proliferacijom stanica i upalom te uništavanje membranskih lipida (Wiegrebe i Müller, 1995.).

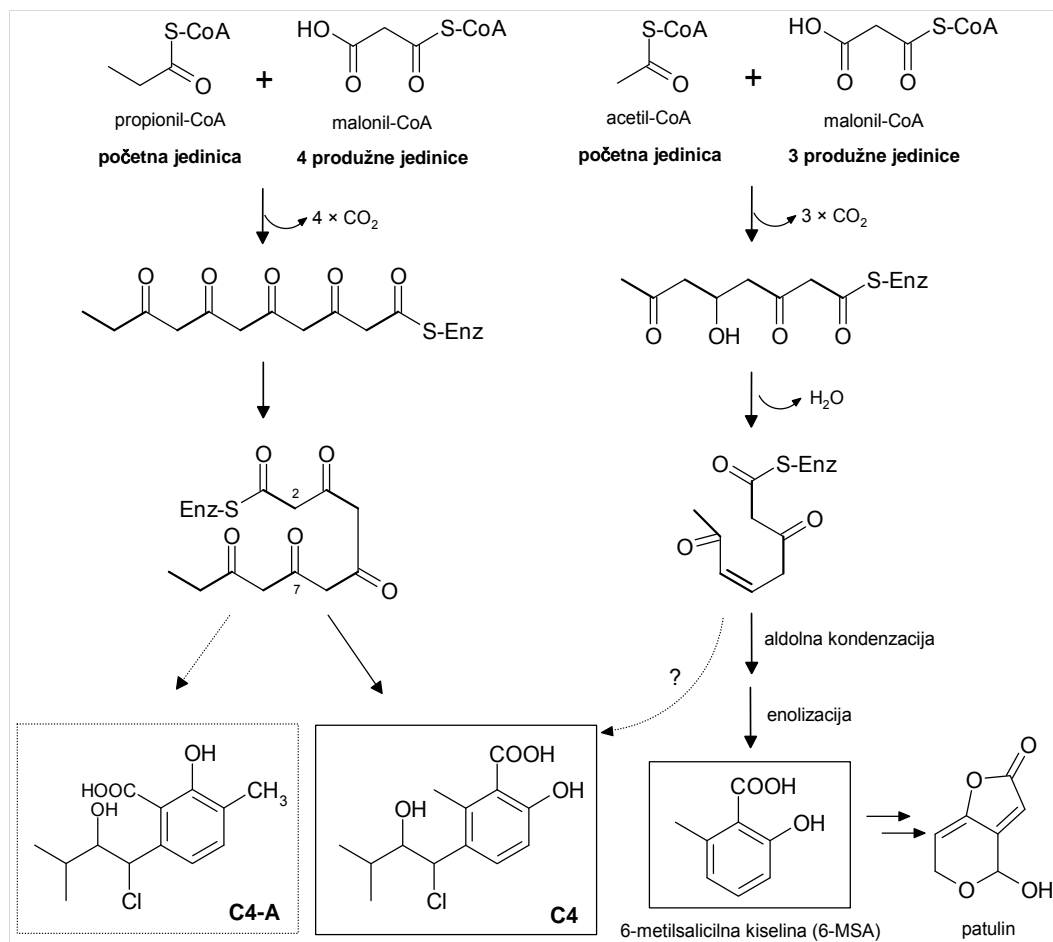
#### 5.1.4. Biosinteza spojeva C4, C5 i C6

Funkcije različitih enzima u sustavima PKS mogu se istražiti preko sekundarnih metabolita budući da su ovi rezultat aktivnosti enzima koje kodiraju geni. U principu, redoslijed stupnjeva biosinteze može se odrediti pomoću izolacije i strukturne karakterizacije intermedijera u biosintezi određenog sekundarnog metabolita (poliketida). Međutim, genetički modificirani sojevi mikroorganizama mogu zbog promijenjene enzimske aktivnosti povećati strukturne varijacije produkata (npr. reakcijama oksidacije, redukcije, metilacije i sl.) pa tako pored glavnog metabolita u manjoj mjeri mogu proizvoditi nekoliko strukturno manje ili više drugačijih spojeva, odražavajući time enzimsku aktivnost specifičnih (određenih) gena. U pravilu, veći broj produkata povećava vjerojatnost pogrešne interpretacije biosintetskog slijeda određenog produkta. Spojevi C4, C5 i C6 strukturno se vrlo razlikuju od antrona izoliranih iz rekombinantnog soja ZGL1 i do sada ovakve strukture u literaturi nisu povezivane s biosintezom tetraciklina. Spojevi C4, C5 i C6 najvjerojatnije su sastavljeni samo od acetata ili acetata i malonata kao polazne jedinice.

Spoj C4 djelomično možemo usporediti s poznatim malim poliketidom, 6-metilsalicilnom kiselinom (6-MSA). Ako u strukturi spoja C4 zanemarimo izopentilni supstituent (slika 57), struktura ostatka molekule identična je 6-MSA. Postavlja se pitanje do kojeg nivoa možemo uspoređivati biosintetske puteve ova dva metabolita? Jednostavni poliketid 6-MSA proizvodi gljivica *Penicillium patulum* (Beck *i sur.*, 1990.; Hopwood, 1997.) i zapravo je intermedijer u biosintezi toksina patulina. Također ima donekle važnost i kao antibiotik. Pretpostavljeno je da se poliketidna okosnica spoja C4 sastoji od 11 C-atoma. Novost u spoju C4 u odnosu na do sada razmatrane poliketide je prisustvo *izo*-supstituenta na aromatskom prstenu. Iz tog razloga kao polazna jedinica u sintezi poliketidnog lanca odabran je propionil na koji je djelovanjem PKS dodano još četiri jedinice malonila. Metilna skupina



bi poslijepoliketidnim reakcijama bila pridodana postranom lancu i tako činila izopentilni supstituent. Ciklizacija poliketidnog lanca zahtjevala bi zatvaranje prstena na položaju 2 i 7. Moguće je da je prije ciklizacije provedena enolizacija poliketidnog lanca, a nastala dvostruka veza bi zatim usmjerila zatvaranje prstena, analogno pretpostavljenoj biositezi 6-MSA.

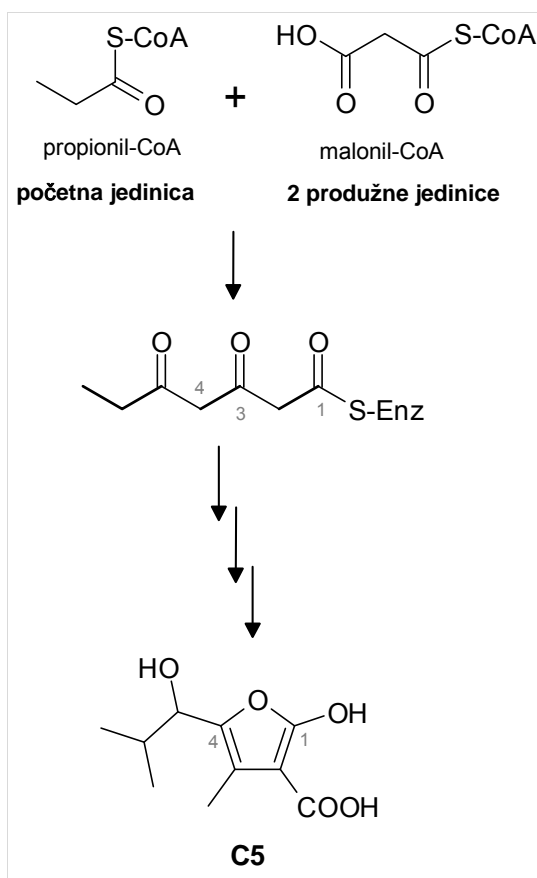


Slika 57. Usporedba predloženih biosintetskih puteva spoja **C4** i 6-metilsalicilne kiseline.

Za očekivati je da bi raspored supstituenata na aromatskom prstenu nastalog cikliziranog intermedijera trebao preferirati biosintezu hipotetskog spoja **C4-A**. Međutim, korelacije C-H uočene u spektru HMBC spoja **C4** ne podržavaju ovakav raspored supstituenata. Očito, nakon ciklizacije odvija se još određeni broj reakcija koje u konačnici daju strukturu određenu izoliranom spoju **C4**. Uzimajući u obzir prevođenje 6-MSA u strukturu toksina patulina, ovakve enzimske pregradnje nisu neostvarive.

Heterociklički poliketidni spojevi sasvim su uobičajeni proizvodi sekundarnog metabolizma različitih organizama. Masne kiseline furana (F-kiseline) produkti su biosinteze algi, bakterija koje žive u morima [npr. *Shewanella putrefaciens* (Shirasaka *i sur.*, 1997.)] i biljaka. Predstavljaju tri- ili tetra-supstituirane derivate furana za koje je karakterističan propilni ili pentilni lanac. F-kiseline reagiraju s peroksil radikalima kako bi stvorile dioksoene. Ovo svojstvo F-kiselina da reagiraju sa slobodnim radikalima doprinosi zaštitnim svojstvima ishrane ribom i ribljim uljima protiv smrtnosti od srčanih bolesti (Spiteller, 2005.).

Spoj **C5** dijeli dosta strukturnih značajki sa spojem **C4**. Raspored i vrsta supstituenata na aromatskom prstenu slijede onaj u spoju **C4**, što navodi da bi i biosinteza spoja **C5** donekle morala slijediti biosintezu spoja **C4**. No, u ovom slučaju umjesto izopentilnog, na položaju 5 furanskog prstena, nalazi se izobutilni lanac supstituiran hidroksilnom skupinom. U biosintezi spoja **C5** pretpostavljeno je da je poliketidni lanac sačinjen od propionata kao polazne građevne jedinice i dvije molekule malonata koje su pridodane propionatu, čineći triketidni lanac od sedam ugljikovih atoma (slika 58).

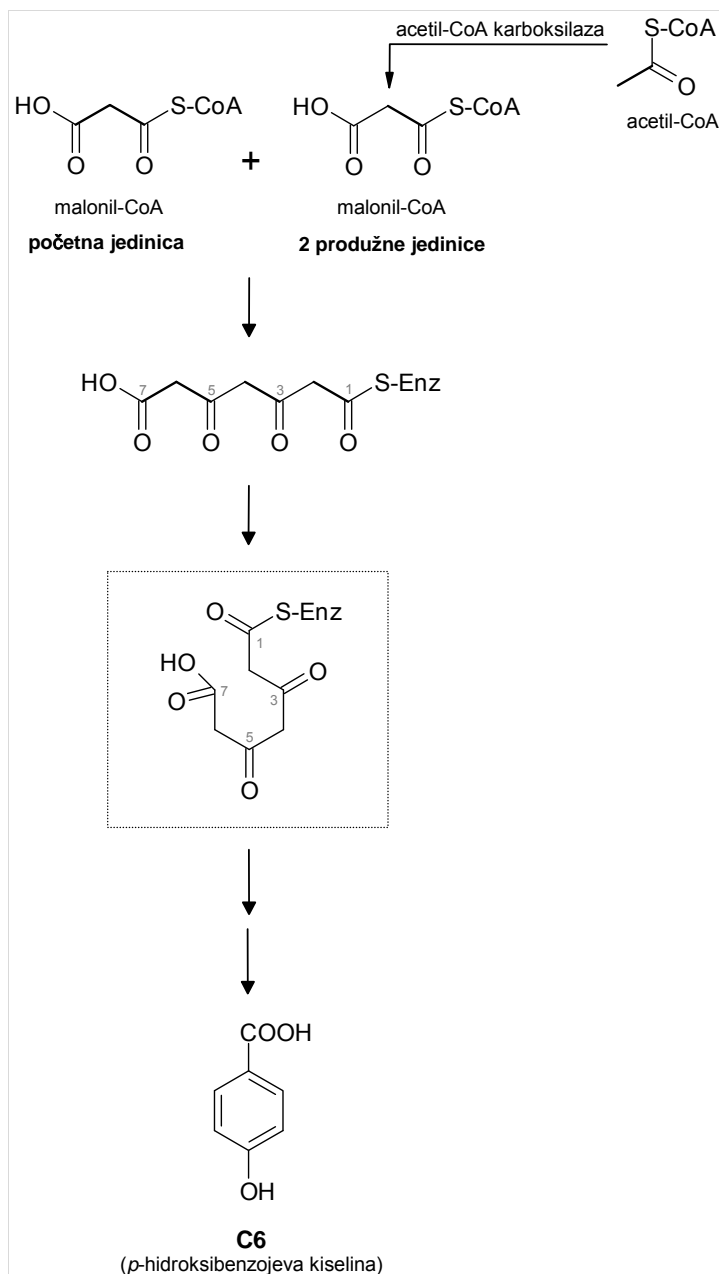


Slika 58. Predloženi biosintetski put spoja **C5**.

Zatvaranje u prsten formiranog poliketidnog lanca ostvaruje se preko položaja 1-4 pri čemu se u prsten ugrađuje atom kisika karboksilne skupine. U tom slučaju formirani poliketid se otpušta s ACP i većina reakcija koje slijede bile bi katalizirane poslijepoliketidnim enzimima. Druga je mogućnost da je ciklizacija poliketidnog lanca usmjerena prethodno stvorenom dvostrukom vezom redukcijom/enolizacijom karbonilne skupine na položaju 3. Tijek ugradnje ostalih supstituenata na slobodne položaje nastalog peteročlanog heterocikla te njegova aromatizacija, odnosno slijed odvijanja reakcija kataliziranih poslijepoliketidnim enzimima teško je predložiti samo na temelju strukture pročišćenog metabolita. Posebno je zanimljivo prisustvo izosupstituenta u spojevima **C4** i **C5**. Poznato je da metilne skupine u poliketidnim strukturama mogu nastati i kao posljedica ugradnje propionata, odnosno butirata u poliketidnu okosnicu. Detalji koji povezuju puteve propionata i butirata otkriveni su i u streptomicetama (Raynolds i *sur.*, 1988.). Na osnovu tih saznanja mala prednost dana je propionatu kao polaznoj jedinici u odnosu na acetat u razmatranju biosinteze spojeva **C4** i **C5**. Studije biosinteze sa supstratima obogaćenim izotopima <sup>13</sup>C ukazale bi na način sklapanja poliketidne okosnice, a usmjerile bi i pretpostavke o kasnijem tijeku biosinteze spojeva **C4** i **C5**. Na temelju dosadašnjih spoznaja o sintezi poliketida u biološkim sustavima i struktura spojeva **C4** i **C5**, možemo tvrditi da strukturalna jednostavnost poliketida ne znači i jednostavnost u biosintetskom putu kojim takvi poliketidi nastaju.

Glikozilirani metil-estri *p*-hidroksibenzojeve kiseline i strukturno srodni fenolftiocerol glikolipidi važni su virulentni faktori bakterije *Micobacterium tuberculosis*. Za oba tipa molekula pretpostavlja se da potiču od *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Međutim, porijeklo ovog biosintetskog prekursora u bakterije *M. tuberculosis* još uvijek nije utvrđeno i za sada se pretpostavlja da nastaje enzimatskom pretvorbom iz korizmata (Stadhagen i *sur.*, 2005.).

Slijedeći jednostavan princip izgradnje poliketidnog lanca, pretpostavljeno je da se biosinteza *p*-hidroksibenzojeve kiseline, tj. spoja **C6** u rekombinantnom soju ZGL1 sastoji od kondenzacije početne jedinice malonil-CoA s još takve dvije produžne jedinice (slika 59), te tako čini triketidni lanac kao poliketidnu okosnicu. Nakon toga slijedi ciklizacija/aromatizacija stvorenog lanca, a poslijepoliketidnim reakcijama preostale karbonilne skupine su potpuno reducirane, odnosno prevedene u hidroksi skupinu što u konačnici odovodi do sinteze jednog od najjednostavnijih poliketida, *p*-hidroksibenzojeve kiseline.



Slika 59. Predloženi biosintetski put spoja **C6** u rekombinantnom soju ZGL1.

Spojevi **C4**, **C5** i **C6** znatno su manji i strukturno različiti od antrona izoliranih i pročišćenih iz istog rekombinantnog soja ZGL1. Pretpostaviti da predstavljaju intermedijere u biosintezi antrona ili ih zahvaljujući činjenici da su izolirani, tj. enzimatski nisu prevedeni u antrone, možemo smatrati sporednim proizvodima biosinteze rekombinantnog soja ZGL1, jednako je vjerojatno.

## 5.2. Antimikrobna testiranja

Od svih pročišćenih spojeva, opsežnijem antimikrobnom testiranju podvrgnut je spoj **C1**. Rezultati ukazuju na njegovu neznatnu antimikrobnu aktivnost i time ga čine farmakološki nezanimljivim. Budući da se antroni u literaturi navode kao spojevi s antipsorijatskom aktivnošću (Muller, 1996.; Muller *i sur.*, 2001.), preporuka bi bila ispitati svojstvo spoja **C1** kao inhibitora psorijaze. Ovisno o postignutim rezultatima, biosintetizirani spoj **C1** može se koristiti i kao takav ili kao polazna molekula za sintezu aktivnijih strukturnih analoga.

Rezultati dobiveni u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da gen *otcC* sadržava genetičku uputu za enzim anhidrotetraciklin oksigenazu koji katalizira hidroksilaciju na položaju C-6 za vrijeme biosinteze antibiotika oksitetraciklina u bakterije *S. rimosus*. Svrha je ovoga doktorskog rada bila da se upotrebom takozvane kombinatorne biosinteze dobiju nove kemijske supstancije s biološkom aktivnošću. Očekivali smo da će odsustvo gena *otcC* iz genske nakupine za biosintezu antibiotika oksitetraciklina dovesti do biosinteze njegova polusintetskog analoga doksiciklina. Neaktivna kopija gena *otcC* genetički je konstruirana na taj način da je unutar njegove sekvencije DNA umetnut dio DNA čiji je produkt odgovoran za otpornost prema antibiotiku gentamicinu. Nakon toga je biološki aktivna kopija gena *otcC* zamijenjena s neaktivnom kopijom istoga gena u kromosomu bakterije *S. rimosus* R6-500. Odabir genetički konstruiranog soja pokazao se vrlo zahtjevnim najvjerojatnije zbog položaja genske nakupine za biosintezu antibiotika oksitetraciklina na samom kraju kromosoma koji je podložan amplifikacijama i delecijama (slika 7) (Gravius *i sur.*, 1993.). Jedan je stabilan genetički konstruirani soj, ZGL1, postao nesposoban sintetizirati antibiotik oksitetraciklin, te je umjesto njega sintetizirao najmanje šest kemijskih supstancija, koje su predstavljene u ovom radu (spojevi **C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5** i **C6**). Pretpostavlja se da roditeljski soj, bakterija *S. rimosus* R6-500, ne može sintetizirati ove spojeve. Tri kemijske supstancije okarakterizirane su kao antroni i kraćeg su poliketidnog lanca nego što je to lanac antibiotika oksitetraciklina. Taj rezultat ukazuje da nedostatak produkta gena *otcC* ima vrlo značajan utjecaj na enzime ketosintazu  $\alpha$  i  $\beta$  (koji su dio 'minimalne' poliketid sintaze antibiotika oksitetraciklina) koji određuju dužinu poliketidnoga lanca (slika 8) (vidi citate u: Hranueli *i sur.*, 2001.; Perić-Concha *i sur.*, 2005.; Petković *i sur.*, 2006.). Taj rezultat, kao i rezultati inaktivacije gena *otcD1* (CYC/ARO) genske nakupine za biosintezu antibiotika oksitetraciklina (Petković *i sur.*, 1999.), ukazuje da broj produžnih građevnih jedinica ne određuje samo 'minimalna' poliketid sintaza već i drugi produkti gena takozvane poslijepoliketidne sintaze. On

podrazumijeva da u biosintezi aromatskih poliketida tipa II sudjeluju enzimski kompleksi koji se sastoje, ne samo od gena čiji produkti sudjeluju u biosintezi poliketidne okosnice (tzv. kostura), već i od gena čiji produkti sudjeluju u poslijepoliketidnoj sintezi (Castaldo *i sur.*, 2008.). Svi antroni opisani u ovoj doktorskoj disertaciji kraćeg su poliketidnog lanca za 2 C-atoma od poliketidnog lanca oksitetraciklina i sadržavaju karboksamido skupinu na jednom kraju poliketidnoga lanca. Ovim rezultatima također je potvrđena spoznaja da je početna građevna jedinica u biosintezi antibiotika oksitetraciklina malonamat (slike 15, 16 i 17) (Thomas i Williams, 1983a.; Thomas i Williams, 1983b.), što je strukturna značajka sačuvana kod svih tetraciklina i odgovorna je za njihovu antibiotsku aktivnost. Slično tome, kada je inaktiviran gen *otcD1* (CYC/ARO) (Petković *i sur.*, 1999.), sva su četiri nova poliketida također sadržavala malonamat kao početnu građevnu jedinicu.

Važnost rekombinantnog soja ZGL1 sastoji se u tome da je genetskim manipulacijama ovom soju inaktivirana aktivnost samo jednog gena, a sve ostale enzimske aktivnosti trebale bi biti sačuvane i potpuno u funkciji. Djelovanje enzima C-6 hidroksilaze događa se nekoliko stupnjeva prije kraja biosinteze oksitetraciklina. Ipak, njegova inaktivacija u soju ZGL1 za posljedicu ima, potpuno u suprotnosti s očekivanjima na temelju dosadašnjih spoznaja, stvaranje produkata tricikličke antronske umjesto tetracikličke tetraciklinske strukture (tj. doksiciklina). Primarni zadatak C-6 hidroksilaze je ugrađivanje hidroksilne skupine na položaj C-6 u intermedijeru pri biosintezi oksitetraciklina, što se zbiva nakon što je već formiran intermedijer tetracikličke strukture (Hunter *i sur.*, 1999.; Zhang *i sur.*, 2006.). Prema tome, za pretpostaviti je da proizvod gena *otcC* ne sudjeluje u izgradnji poliketidne okosnice, ciklizacijama i drugim reakcijama koje prethode hidroksilaciji na položaju C-6. Stoga su očekivane minimalne promjene u strukturi novog (novih) metabolita u odnosu na OTC, odnosno očekivani DOTC. Izolirani produkti **C1**, **C2** i **C3** strukture antrona, pa i ostali spojevi **C4**, **C5** i **C6** izolirani iz fermentacijske komine soja ZGL1, govore da je uloga gena *otcC* ipak složenija i da unutar OTC multienzimskog kompleksa ima utjecaj barem i na određivanje duljine lanca poliketida u nastajanju. Rezultati ovog rada pokazuju da su dosadašnji zaključci u pogledu biosinteze poliketida pojednostavljeni. Funkcije individualnih enzima unutar sustava PKS uvjetovane su i drugim enzimima što vodi k varijacijama u stvaranju metabolita. Ovu pretpostavku potkrepljuju, između ostalih, i rezultati radova na inaktivaciji gena *otcD1* odgovornog za ciklizaciju i aromatizaciju (CYC/ARO) intermedijera u biosintezi oksitetraciklina (soj ZGL3) (Petković *i sur.*, 1999.), koji upućuju na to da navedeni enzim sudjeluje i u određivanju duljine lanca poliketida. Također, rezultati rada koji opisuju biosintezu poliketidnih metabolita u mutiranim *Streptomyces* sojevima HO61 i P67 s

---

inaktiviranim genom koji kodira enzim ketoreduktazu (Kunnaria *i sur.*, 1999.), indiciraju da je za pravilnu kondenzaciju poliketidnog lanca potrebna i aktivnost ketoreduktaze.

Uzimajući u obzir sve navedeno, prikazani rezultati po prvi puta u znanstvenoj literaturi pružaju nedvojbeni dokaz da proteini takozvane poslijepoliketidne biosinteze mogu međusobno stupiti u interakciju s proteinima 'minimalne' poliketid sintaze, kako tijekom prije poliketidne, tako i tijekom poslije poliketidne biosinteze. Očito je dakle, da je protein OtcC bitan partner u kvaternoj strukturi enzimskog kompleksa poliketid sintaze (Perić-Concha *i sur.*, 2005.; Castaldo *i sur.*, 2008.). Unatoč napretku tehnologije koji je omogućio mnoštvo praktičnih pristupa u dizajniranju i probiru lijekova, čini se da pronalaženje lijekova i dalje ostaje dugotrajan, skup, težak i neučinkovit proces s malom mogućnosti za uspjeh!

## 6. ZAKLJUČCI

U ovoj su doktorskoj disertaciji izolirani i pročišćeni novi poliketidi, derivati antrona, koje biosintezom proizvodi genetički modificirani soj ZGL1 bakterijske vrste *Streptomyces rimosus*, te su dobiveni rezultati povezani sa strukturnim značajkama sintetiziranih poliketidnih molekula. Na temelju rezultata ove doktorske disertacije doneseni su sljedeći zaključci:

- Genetički konstruirani soj, ZGL1, bakterijske vrste *S. rimosus* nije sposoban sintetizirati antibiotik oksitetraciklin niti njegov strukturni analog, antibiotik doksiciklin.
- Genetički konstruirani soj, ZGL1, sintetizira nove poliketidne supstancije u odnosu na roditeljski soj R6-500. Ti su spojevi označeni oznakama **C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5** i **C6**, prema redoslijedu kojim su izolirani i pročišćeni do stupnja koji omogućava njihovu strukturnu karakterizaciju.
- Genetički konstruirani soj, ZGL1, najvećim dijelom sintetizira supstanciju **C1** s manjim brojem C-atoma u poliketidnoj okosnici u odnosu na poliketidnu okosnicu oksitetraciklina kojeg sintetizira soj R6-500.
- Primjenom 1D i 2D homonuklearnih i heteronuklearnih NMR eksperimenata, koristeći se metodama  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC te HMBC, kao i podacima spektrometrije masa (MS), odnosno spektroskopije UV/VIS te IR, određene su strukture novopripremljenih spojeva.
- Strukturni analozi **C1**, **C2** i **C3** sa sedamnaest C-atoma u poliketidnoj okosnici derivati su antrona.
- Spojevi **C4** i **C6** derivati su benzojeve kiseline, dok je spoj **C5** derivat furan-3-karboksilne kiseline.



- Pored navedenih spojeva, izoliran je i pročišćen i spoj **C7**, međutim zbog nedovoljno jasnih podataka iz spektara NMR i MS, strukturu ovom spoju nije bilo moguće predložiti u cijelosti, pa se stoga ovaj spoj nije posebno razmatrao.
- Dobiveni spoj **C1** posjeduje vrlo slaba antimikrobna svojstva i kao takav nije zanimljiv za industrijsku proizvodnju. Budući da se antroni u literaturi navode kao spojevi s antipsorijatskom aktivnošću, bilo bi dobro ispitati svojstvo spoja **C1** kao inhibitora psorijaze.
- Nedostatak produkta gena *otcC* ima vrlo značajan utjecaj na enzime ketosintazu  $\alpha$  i  $\beta$  (koji su dio 'minimalne' poliketid sintaze antibiotika oksitetraciklina) koji određuju duljinu poliketidnoga lanca.
- Broj produžnih građevnih jedinica ne određuje samo 'minimalna' poliketid sintaza već i drugi produkti gena takozvane poslijepoliketidne sintaze.

---

## 7. LITERATURA

1. Andrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* (2001) **48**, Suppl. S1, 5-16.
2. Anu, S.J. & J.M. Rao. Oxanthrone esters from the aerial parts of *Cassia kleinii*. *Phytochemistry* (2001) **57**, 583–585.
3. Anu, S.J. & J.M. Rao. Oxanthrone esters from the roots of *Cassia kleinii*. *Phytochemistry* (2002) **59**, 425–427.
4. Bahrami, F., D.L. Morris, M.H. Pourgholami. Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem.* (2012) **12**, 44-52.
5. Bax, A., R. Freeman & T.A. Frenkiel. An NMR technique for tracing out the carbon skeleton of an organic molecule. *J. Am. Chem. Soc.* (1981) **103**, 2102-2104.
6. Beck, J., S. Ripka, A. Siegner, E. Schiltz & E. Schweizer. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene in *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. *Eur. J. Biochem.* (1990) **192**, 487-498.
7. Bentley, S.D., K.F. Chater, A.M. Cerdeno-Tarraga, G.L. Challis, N.R. Thomson, K.D. James, D.E. Harris, M.A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C.W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B.G. Barrell, J. Parkhill & D.A. Hopwood. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* (2002) **417**, 141-147.
8. Bérdy, J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* (Tokyo) (2005) **58**, 1-26.
9. Binnie, C., M. Warren & M.J. Butler. Cloning and heterologous expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* genes involved in oxytetracycline biosynthesis. *J. Bacteriol.* (1989) **171**, 887–895.
10. Bode, H.B. & R. Müller. Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. *Plant Physiol.* (2003) **132**, 1153-1161.
11. Brodersen, D.E., W.M. Jr. Clemons, A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly & V. Ramakrishnan. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* (2000) **103**, 1143-1154.

12. Burkhardt, K., H.P. Fiedler, S. Grabley, R. Thiericke & A. Zeeck. New Cineromycins and Musacins Obtained by Metabolite Pattern Analysis of *Streptomyces griseoviridis* (FH-S 1832) I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activity. *J. Antibiot.* (1996) **49**, 432-437.
13. Cao, S., A.S. Lee, Y. Huang, H. Flotow, S. Ng, M.S. Butler & A.D. Buss. Agonodepsides A and B: two new depsides from a filamentous fungus F7524. *J. Nat. Prod.* (2002) **65**, 1037–1038.
14. Castaldo, G., J. Zucko, S. Heidelberger, D. Vujaklija, D. Hranueli, J. Cullum, P. Wattana-Amorn, M.P. Crump, J. Crosby & P.F. Long. Proposed arrangement of proteins forming a bacterial type II polyketide synthase. *Chem. Biol.* (2008) **15**, 1156-1165.
15. Cazes, J. *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker, Inc., New York (2004).
16. Charest, M.G., C.D. Lerner, J.D. Brubaker, D.R. Siegel, A.G. Myers. A convergent enantioselective route to structurally diverse 6-deoxytetracycline antibiotics, *Science* (2005) **308**, 395-398.
17. Chater, K.F. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* (1993) **47**, 685-713.
18. Chopra I. & M. Roberts. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2001) **65**, 232–260.
19. Chung, Y.J., I. Fujii, S. Harada, U. Sankawa & Y. Ebizuka. Expression, purification, and characterization of AknX anthrone oxygenase, which is involved in aklavinone biosynthesis in *Streptomyces galilaeus*. *J. Bacteriol.* (2002) **184**, 6115-6122.
20. Dagne, E., D. Bisrat, B.E. Van Wyk & A. Viljoen. 10-Hydroxyaloin B 6'-O-Acetate, an Oxanthrone from *Aloe claviflora*. *J. Nat. Prod.* (1998) **61**, 256-257.
21. Demain, A. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999) **52**, 455-463.
22. Douglas, L.E. Liquid-Liquid Extraction. In: *Industrial Chemical Process Design*, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico, City Milan, New Delhi, San Juan Seoul, Singapore, Sydney, Toronto (2002) pp. 257-297
23. Drawz, S.M. & R.A. Bonomo. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* (2010) **23**, 160-201.

24. Finlay, A.C., G.L. Hobby, S.Y. P'an, P.P. Regna, J.B. Routien, D.B. Seeley, G.M. Shull, B.A. Sobin, I.A. Solomons, J.W. Vinson & J.H. Kane. Terramycin, a new antibiotic. *Science* (1950) **111**, 85-87.
25. Flamini, G., S. Catalano, C. Caponi, L. Panizzi & I. Morelli. Three anthrones from *Rubus ulmifolius*. *Phytochemistry* (2002), **59**, 873–876.
26. Friend, E.J. & D.A. Hopwood. The linkage map of *Streptomyces rimosus*. *J. Gen. Microbiol.* (1971) **68**, 187–197.
27. Fuchs, J., R. Milbradt & G. Zimmer. Multifunctional analysis of the interaction of anthralin and its metabolites anthraquinone and anthralin dimer with the inner mitochondrial membrane. *Arch. Dermatol. Res.* (1990) **282**, 47-55.
28. Funayama, S., M. Ishibashi, Y. Ankaru, M. Miyauchi, H. Mori, K. Komiyama & S. Omura. Novel cytotoxic antibiotics, glucopiericidinols A1 and A2. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological characteristics. *J. Antibiot.* (1989) **42**, 1734–1740.
29. Gerth, K., N. Bedorf, H. Irschik, G. Hofle & H. Reichenbach. The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria) I. Soraphen A1a: fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* (1994) **47**, 23–31.
30. Gravius, B., T. Bezmalinović, D. Hranueli & J. Cullum. Genetic instability and strain degeneration in *Streptomyces rimosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1993) **59**, 2220-2228.
31. Hahn-Deinstrop, E. *Applied Thin-Layer Chromatography*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2007).
32. Harrison, R.G., P. Todd, S.R. Rudge & D.P. Petrides. Extraction. In: *Bioseparations Science and Engineering*, Oxford University Press, Oxford (2003) pp. 169-190.
33. Hayden, P.J., K.E. Free & C.F. Chignell. Structure-activity relationship for the formation of secondary radicals and inhibition of keratinocyte proliferation by 9-anthrones. *Mol. Pharmacol.* (1994) **46**, 186-196.
34. Hochstein, F.A., M. Schach von Wittenan, F.W. Tanner Jr. & K. Murai. 2-Acetyl-2-decarboxamidooxytetracycline. *J. Am. Chem. Soc.* (1960) **82**, 5934-5937.
35. Hochstein, F.A., C.R. Stephens, L.H. Conover, P.P. Regna, R. Pasternack, P. Gordon, F.J. Pilgrim, K.J. Brunings & R. B. Woodward. The Structure of Terramycin. *J. Am. Chem. Soc.* (1953), **75**, 5455-5475.
36. Hopwood, D.A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem. Rev.* (1997) **97**, 2465-2497.
37. Hopwood, D.A. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu. Rev. Genet.* (2006) **40**, 1–23.

- 
38. Hranueli, D., B. Gravius, T. Bezmalinović, A. Eichner & J. Cullum. Strain degeneration in industrial streptomycetes. *Food Technol. Biotechnol. Rev.* (1995) **33**, 51-54.
  39. Hranueli, D., J. Cullum, B. Basrak, P. Goldstein & P.F. Long. Plasticity of the *Streptomyces* genome - evolution and engineering of new antibiotics. *Curr. Med. Chem.* (2005) **12**, 1697-1704.
  40. Hranueli, D., N. Perić, B. Borovička, S. Bogdan, J. Cullum, P.G. Waterman & I. Hunter. Molecular biology of polyketide biosynthesis. *Food Technol. Biotechnol.* (2001) **39**, 203-213.
  41. Hranueli, D., N. Perić, H. Petković, G. Biuković, Z. Toman, J. Pigac, B. Borovička, A. Bago, I. Crnolatac, T. Maršić, L. Zhou, S. Matošić, P.G. Waterman, J. Cullum & I.S. Hunter. Novel hybrid polyketide compounds produced by genetic engineering of the oxytetracycline biosynthetic pathway. *Food Technol. Biotechnol.* (1999) **37**, 117-125.
  42. Hunter, I.S. & R.A. Hill. Tetracyclines. In: *Biotechnology of Antibiotics* (2nd edition), W.R. Strohl (Ed.), Marcel Decker, New York (1997) pp. 659-682.
  43. Hutchinson, C.R., J. Kennedy, C. Park, S. Kendrew, K. Auclair & J. Vederas. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie van Leeuwenhoek* (2000) **78**, 287-295.
  44. Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori & S. Omura. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* (2003) **21**, 526-531.
  45. Islam, M.A., M.M. Alam, M.E. Choudhury, N. Kobayashi & M.U. Ahmed. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with their antibiogram, *Bangl. J. Vet. Med.* (2008) **6**, 121-126.
  46. Kunnaria, T., K. Ylihokob, A. Hautalaa, K.D. Klikac, P. Mäntsäläb & J. Hakala. Incorrectly folded aromatic polyketides from polyketide reductase deficient mutants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (1999) **9**, 2639-2642.
  47. Kutchan, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology* (2001) **125**, 58-60.
  48. Lee, J.C., H.R. Park, D.J. Park, H.B. Lee, Y.B. Kim & C.J. Kim. Improved production of teicoplanin using adsorbent resin in fermentations. *Lett. Appl. Microbiol.* (2003) **37**, 196-200.
  49. Liu, Z., P.R. Jensen & W. Fenical. A cyclic carbonate and related polyketides from a marine-derived fungus of the genus *Phoma*. *Phytochemistry* (2003) **64**, 571-574.
-

- 
50. Machida, K., I.S. Trifonov, W.A. Ayer, Z.X. Lu, A. Laroche, H.C. Huang, K.J. Cheng & J.L. Zantige. 3(2H)-Benzofuranones and chromanes from liquid cultures of the mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*. *Phytochemistry* (2001) **58**, 173–177.
  51. McCormick J.R.D. Tetracyclines. *In: Antibiotics*, Vol. II, *Biosynthesis*, Gottlieb D. & Shaw P.D. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin (1967) p.p. 113-122.
  52. McCormick, J.R.D., E.R. Jensen, N.H. Arnold, H.S. Corey, U.H. Joachim, S. Johnson, P.A. Miller & N.O. Sjolander. Biosynthesis of tetracyclines. XI. Methylanthrone analog of protetrone. *J. Am. Chem. Soc.* (1968) **90**, 7127–7129.
  53. Müller, K. Antipsoriatic anthrones: aspects of oxygen radical formation, challenges and prospects. *Gen. Pharmacol.* (1996) **27**, 1325-35.
  54. Müller, K. Current status and recent developments in anthracenone antipsoriatics. *Curr. Pharm. Design* (2000) **6**, 901-918.
  55. Müller, K., H. Reindl & K. Breu. Antipsoriatic anthrones with modulated redox properties. 5. Potent inhibition of human keratinocyte growth, induction of keratinocyte differentiation, reduced membrane damage by novel 10-arylacetyl-1,8-dihydroxy-9 (10H) anthracenones, *J. Med. Chem.* (2001) **44**, 814-21.
  56. Naidong, W., K. Verresen, R. Busson, E. Roets & J. Hoogmartens. Isolation of doxycycline, 6-epidoxycycline and 2-acetyl-2-decarboxamidometacycline from commercial metacycline by preparative column liquid chromatography on silica gel. *J. Chromatography* (1991) **586**, 67-72.
  57. Nelson, M., W. Hillen, R.A. Greenwald, Eds., *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine*, Birkhauser Verlag, Basel (2001).
  58. Nett, M., H. Ikeda & B.S. Moore. Current developments in natural products chemistry. *Nat Prod Rep.* (2009) **26**, 1362-1384.
  59. NMR-related software for Windows and Macintosh (2012) Acorn NMR Inc., <<http://www.acornnmr.com>>. Pristupljeno 4. lipnja 2012.
  60. O'Hagan, D. *The polyketide metabolites*, Ellis Horwood, Chichester, (1991).
  61. Pandza, K., G. Pfalzer, J. Cullum & D. Hranueli. 1997. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiology* (1997) **143**, 1493-1501.
  62. Perić-Concha, N., B. Borovička, P.F. Long, D. Hranueli, P.G. Waterman & I.S. Hunter. Ablation of the *otcC* gene encoding a post-polyketide hydroxylase from the oxytetracycline biosynthetic pathway in *Streptomyces rimosus* results in novel polyketides with altered chain length. *J. Biol. Chem.* (2005) **280**, 37455-37460.
-

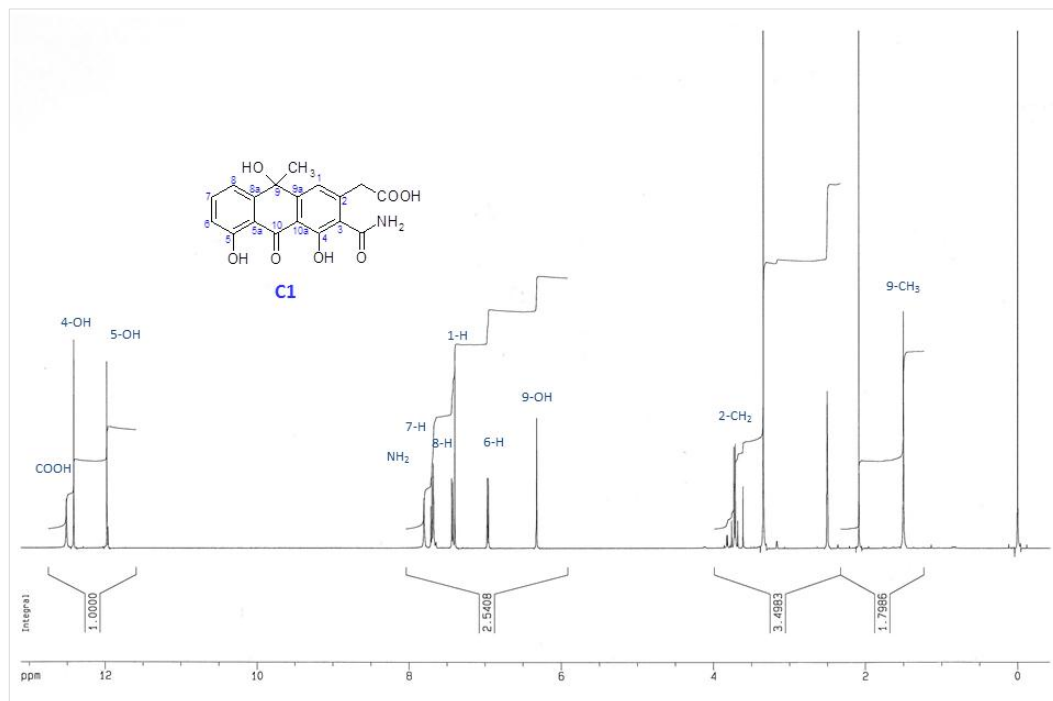
- 
63. Petković, H., J. Cullum, D. Hranueli, I.S. Hunter, N. Perić-Concha, J. Pigac, A. Thamchaipenet, D. Vujaklija & P.F. Long. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline Producer. *Microbiol. Mol. Biol. R.* (2006) **70**, 704–728.
  64. Pigac, J. & M. Alačević. Mapping of oxytetracycline genes in *Streptomyces rimosus*. *Period. Biol.* (1979) **81**, 575–582.
  65. Pine, S.H. *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb (1994).
  66. Redenbach, M., H.M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi & D.A. Hopwood. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map of the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) linear chromosome. *Mol. Microbiol.* (1996) **21**, 77-96.
  67. Reynolds, K.A., D. O'Hagan, D. Gani & J.A. Robinson. Butyrate metabolism in streptomycetes. Characterization of an intramolecular vicinal interchange rearrangement linking isobutyrate and butyrate in *Streptomyces cinnamonensis*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* (1988) **1**, 3195-3207.
  68. Satinder, A. *Chromatography and Separation Science*, Academic Press, Elsevier Science, Maryland Heights (2003).
  69. Satyajit, D.S., Z. Latif & A.I. Gray. *Natural Products Isolation*, Second Edition, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey (2005).
  70. Seshime, Y., P.R. Juvvadi, I. Fujii & K. Kitamoto. Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005) **331**, 253-260.
  71. Shiono, Y., R. Matsuzaka, H. Wakamatsu, K. Muneta, T. Murayama & M. Ikeda. Fascicularones A and B from a mycelial culture of *Naematoloma fasciculare*. *Phytochemistry* (2004) **65**, 491–496.
  72. Shirasaka, N., K. Nishi & S. Shimizu. Biosynthesis of furan fatty acids (F-acids) by a marine bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Biochim Biophys Acta.* (1997) **1346**, 253-260.
  73. Snyder, L.R. & J.J. Kirkland. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (1979).
  74. Spiteller, G. Furan fatty acids: occurrence, synthesis, and reactions. Are furan fatty acids responsible for the cardioprotective effects of a fish diet? *Lipids* (2005) **40**, 755-71.
  75. Stadthagen, G., J. Korduláková, R. Griffin, P. Constant, I. Bottová, N. Barilone, B. Gicquel, M. Daffé & M. Jackson. p-Hydroxybenzoic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* (2005) **280**, 40699-706.
-

- 
76. Staunton, J. & K.J. Weissman. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* (2001) **18**, 380–416.
  77. Stephens, C.R., J.J. Beereboom, H.H. Rennhard, P.N. Gordon, K. Murai, R.K. Blackwood & M.S. von Wittenau. Oxytetracycline biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* (1963) **85**, 2643–2652.
  78. Thomas, R.A. Biosynthetic classification of fungal and streptomycete fused-ring aromatic polyketides. *ChemBioChem.* (2001) **2**, 612-627.
  79. Thomas, R. & D.J. Williams. Oxytetracycline biosynthesis: Origin of the carboxamide substituent, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1983a) **12**, 677-679.
  80. Thomas, R. & D.J. Williams, Oxytetracycline biosynthesis: Mode of incorporation of [1-<sup>13</sup>C] and [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-acetate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1983b) **12**, 128-130.
  81. Thomson, R.H. *Naturally Occurring Quinones III 383. Recent Advances.* Chapman and Hall, London, New York (1987).
  82. Vining, L.C. Roles of secondary metabolites from microbes. *In: Ciba Foundation Symposium 171, Secondary metabolites: Their Function and Evolution*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (1992) pp 184-198.
  83. Villax, I. & P. Page, (1985) U.S. Patent 4,500,458
  84. Watve, M.G., R. Tickoo, M.M. Jog & B.D. Bhole. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* (2001) **176**, 386-390.
  85. Wecke, T. & T. Mascher. Antibiotic research in the age of omics: from expression profiles to interspecies communication. *J. Antimicrob. Chemother.* (2011) **66**, 2689-2704.
  86. Wiegrebbe, W. & K. Müller. Treatment of psoriasis with anthrones-chemical principles, biochemical aspects, and approaches to the design of novel derivatives. *Skin Pharmacol.* (1995) **8**, 1-24.
  87. Williams, D.H. & I. Fleming. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. 5th edition. McGraw-Hill Publishing Co, London (1997).
  88. Weissman, K.J. Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.* (2004) **362**, 2671-2690.
  89. Yun, B.-S., I.-K. Lee, Y. Cho, S.-M. Cho & I.-D. Yoo. New tricyclic sesquiterpenes from the fermentation broth of *Stereum hirsutum*. *J. Nat. Prod.* (2002) **65**, 786–788.
  90. Zhang, W., B.D. Ames, S.C. Tsai & Y. Tang. Engineered biosynthesis of a novel amidated polyketide, using the malonamyl-specific initiation module from the oxytetracycline polyketide synthase. *Appl. Environ. Microbiol.* (2006) **72**, 2573-2580.
-

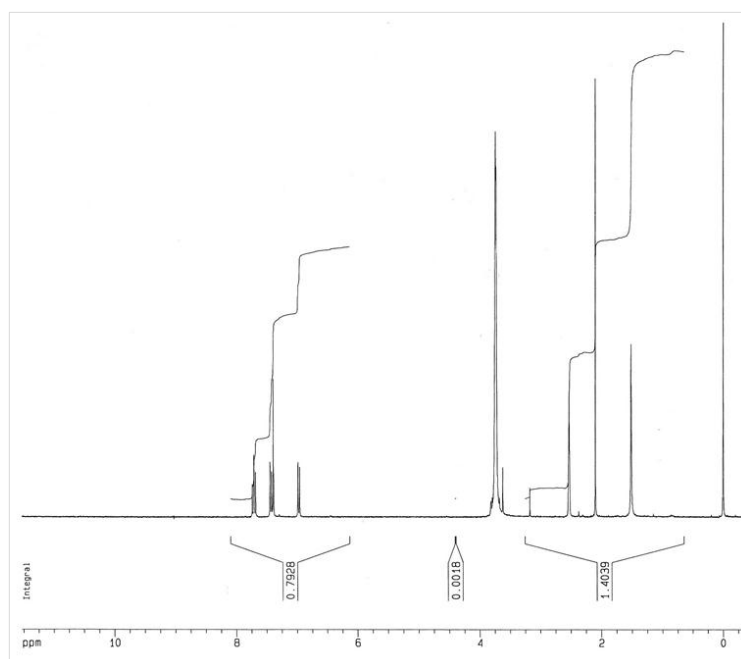


## 8. PRILOZI

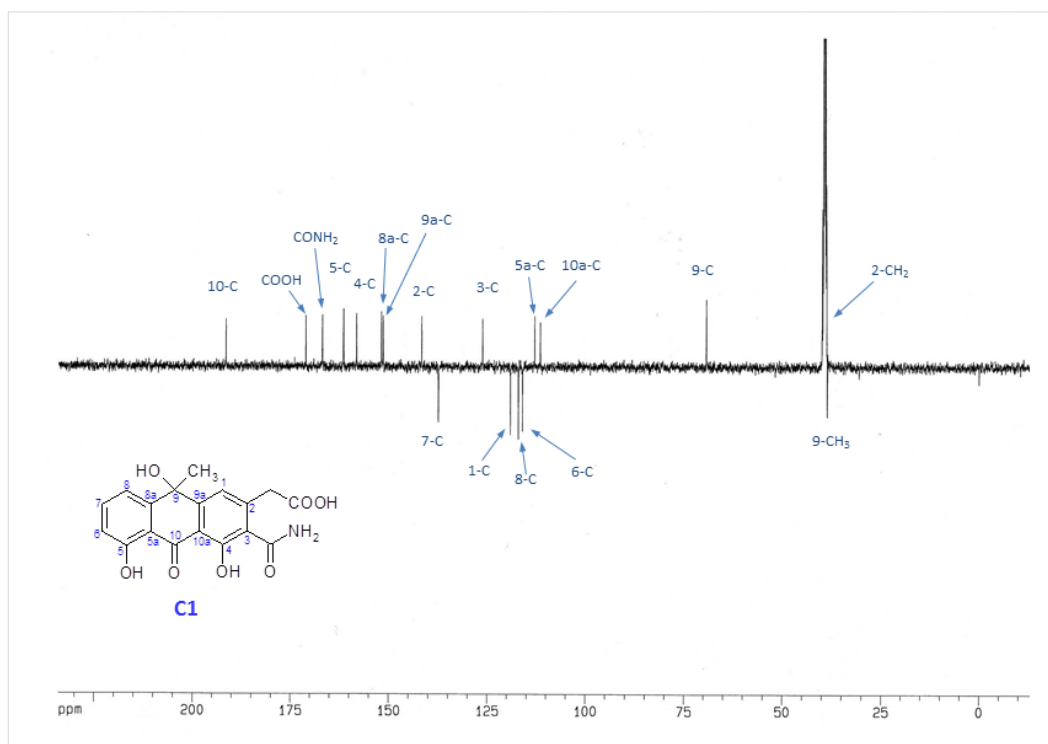
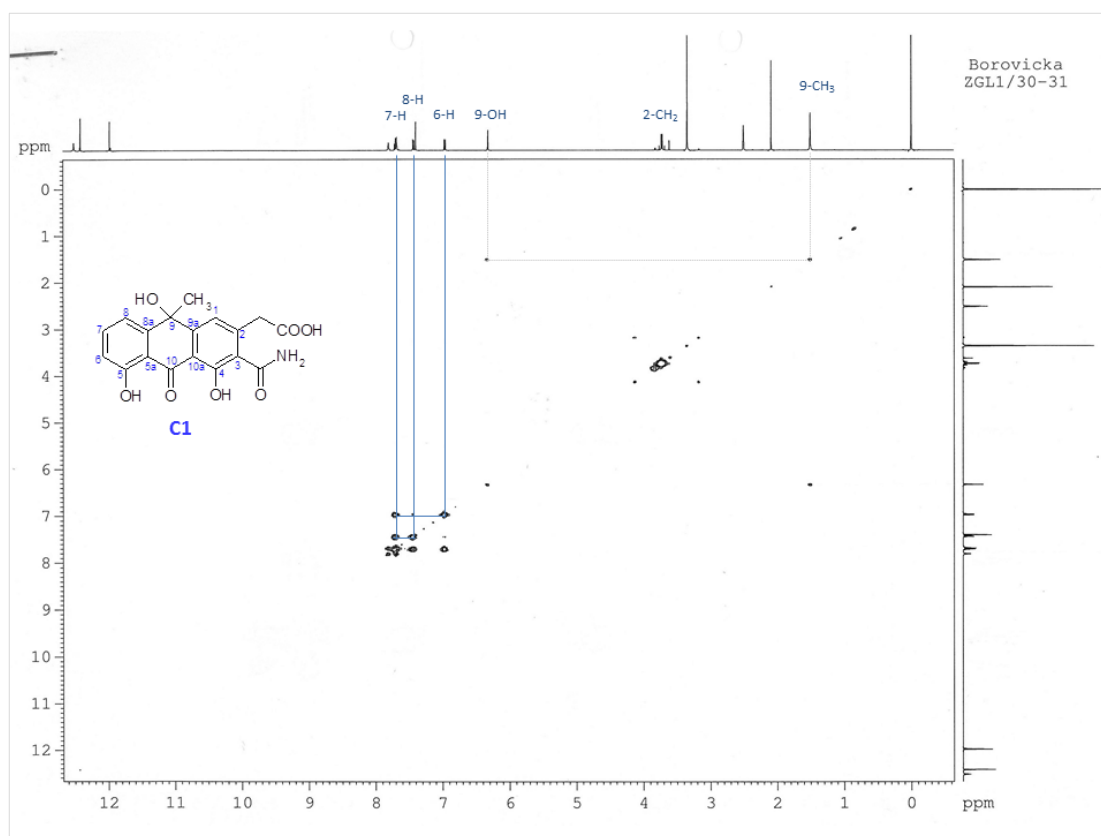
### 8.1. Prilozi određivanju strukture spoja C1

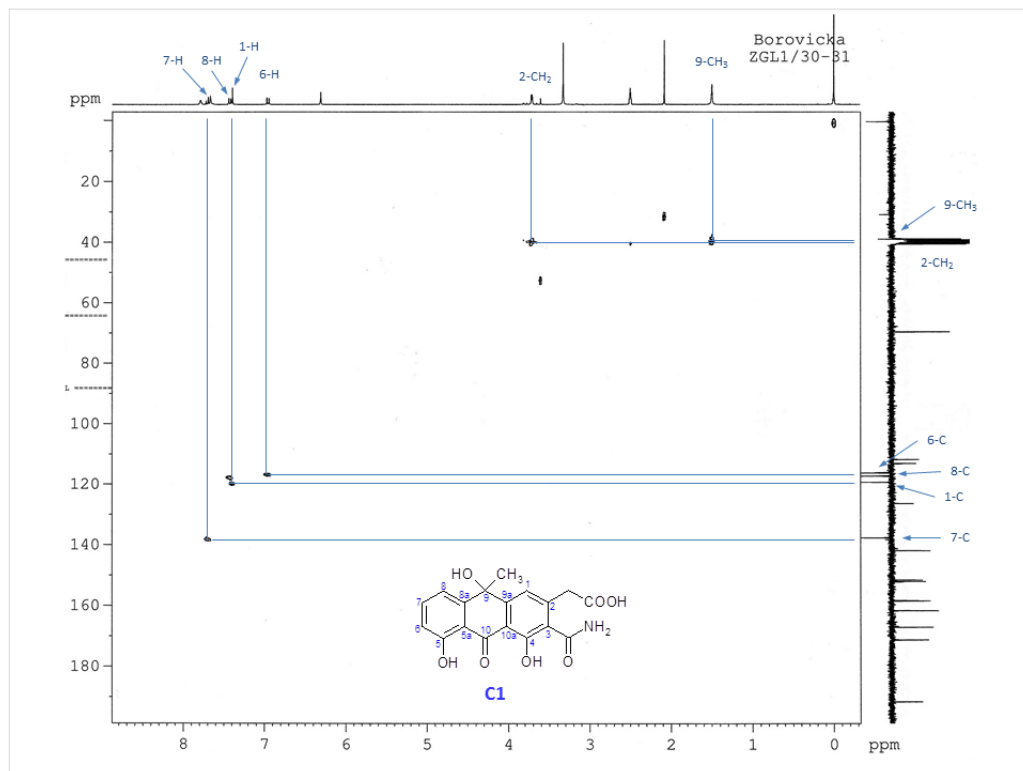
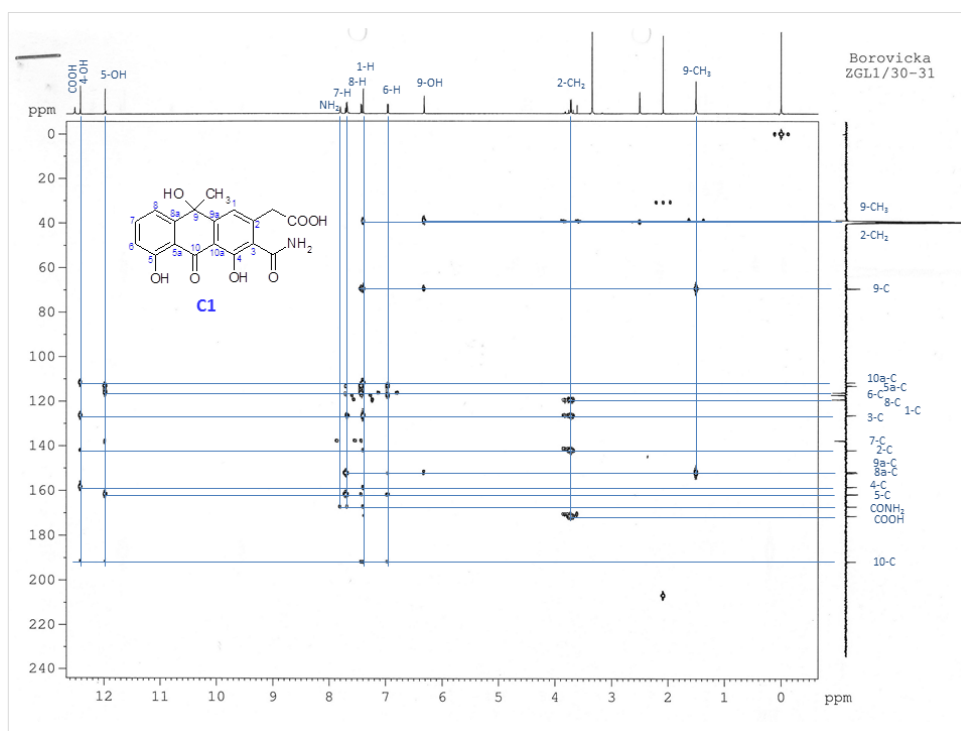


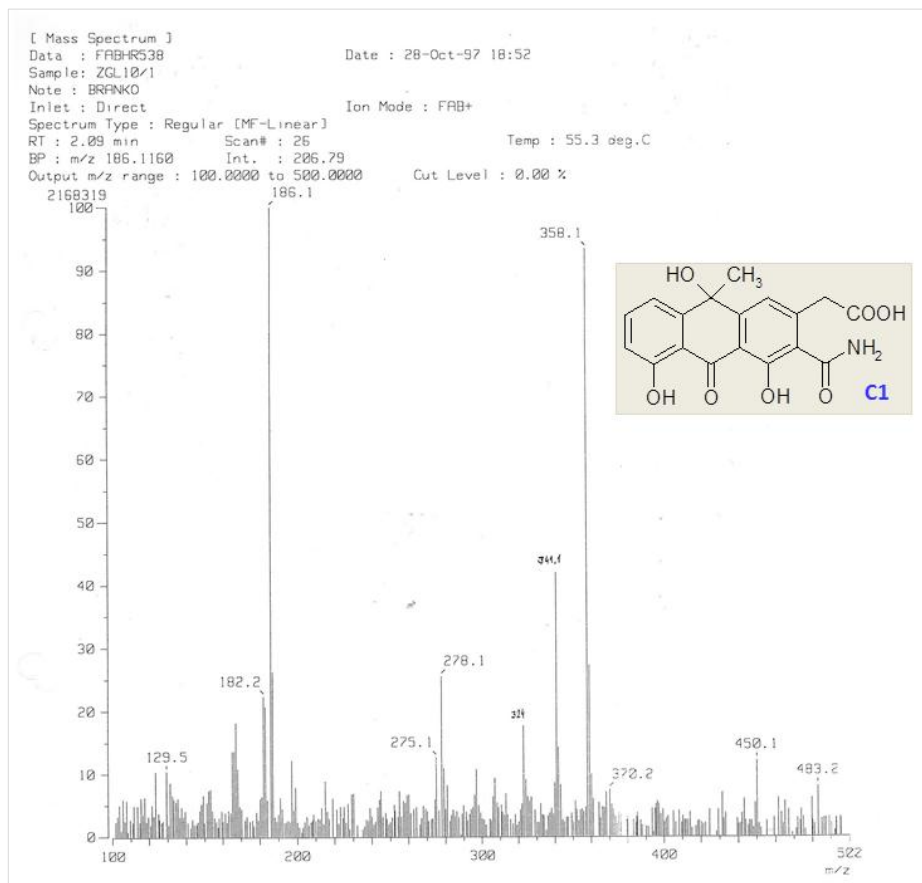
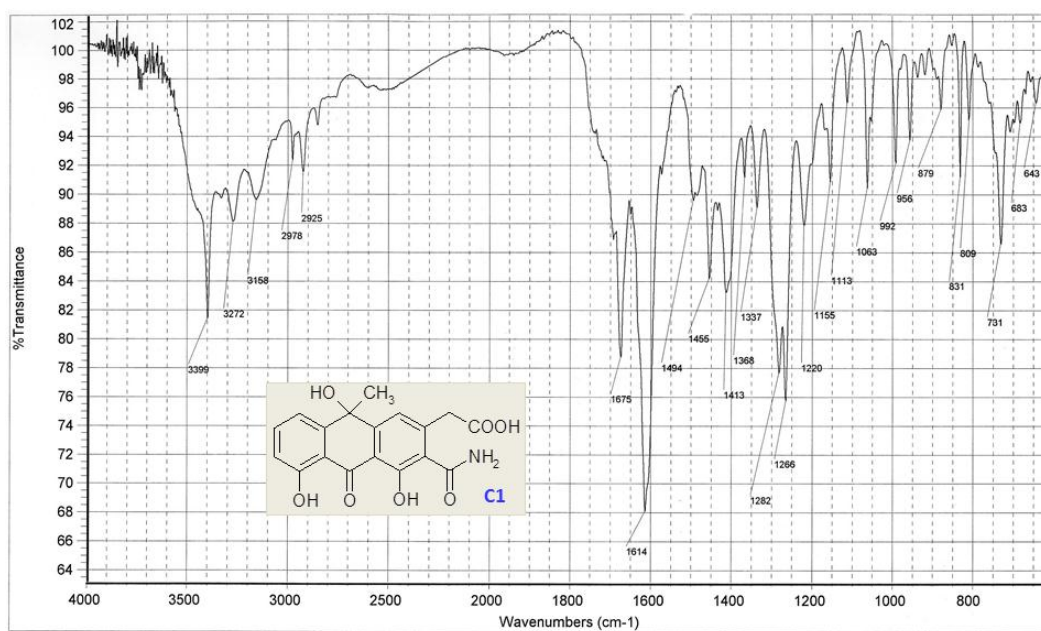
Prilog 1. Spektar  $^1\text{H NMR}$  spoja **C1** (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

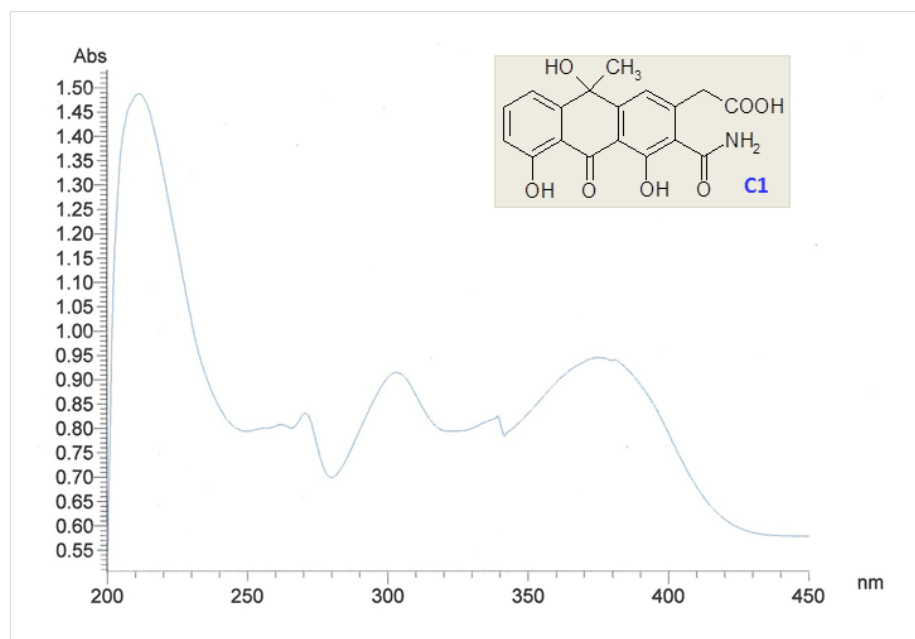


Prilog 2. Spektar  $^1\text{H NMR}$  spoja **C1** nakon miješanja uzorka s  $\text{D}_2\text{O}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Prilog 3. Spektar <sup>13</sup>C NMR spoja **C1** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)Prilog 4. 2D Spektar <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spoja **C1**.

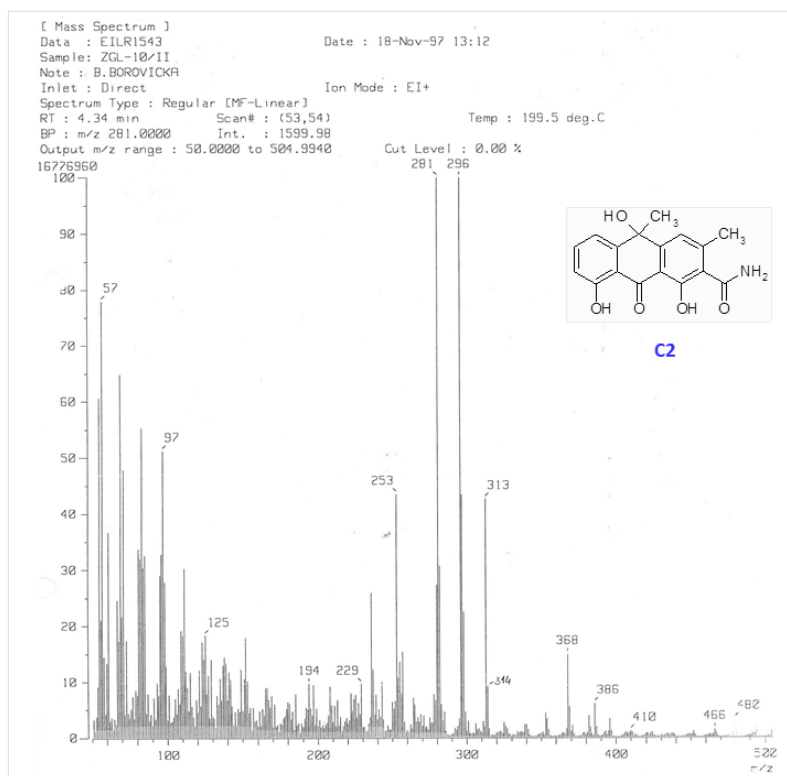
Prilog 5. 2D spektar HMQC spoja **C1**.Prilog 6. 2D spektar HMBC spoja **C1** s naznačenim korelacijama pojedinih protona i C-atoma.

Prilog 7. Spektar MS spoja **C1**.Prilog 8. Spektar IR spoja **C1**.

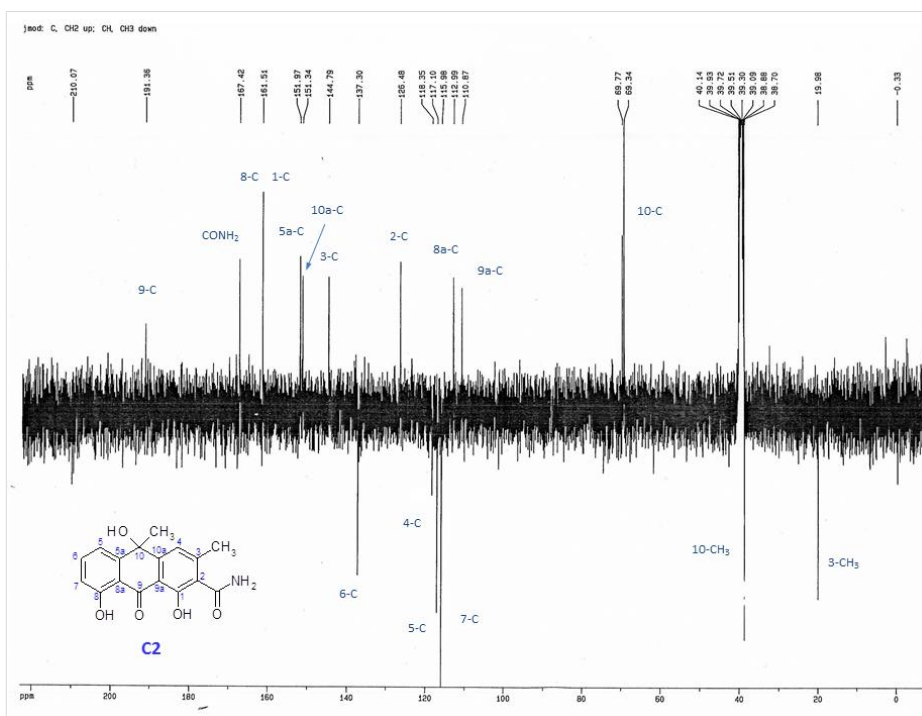


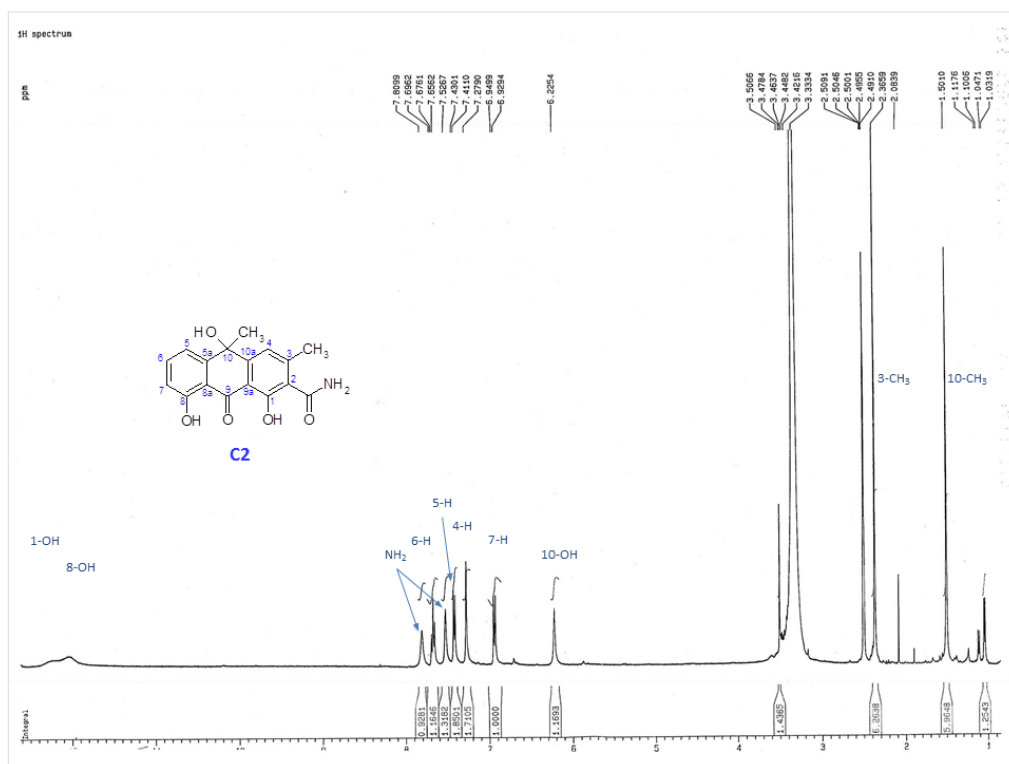
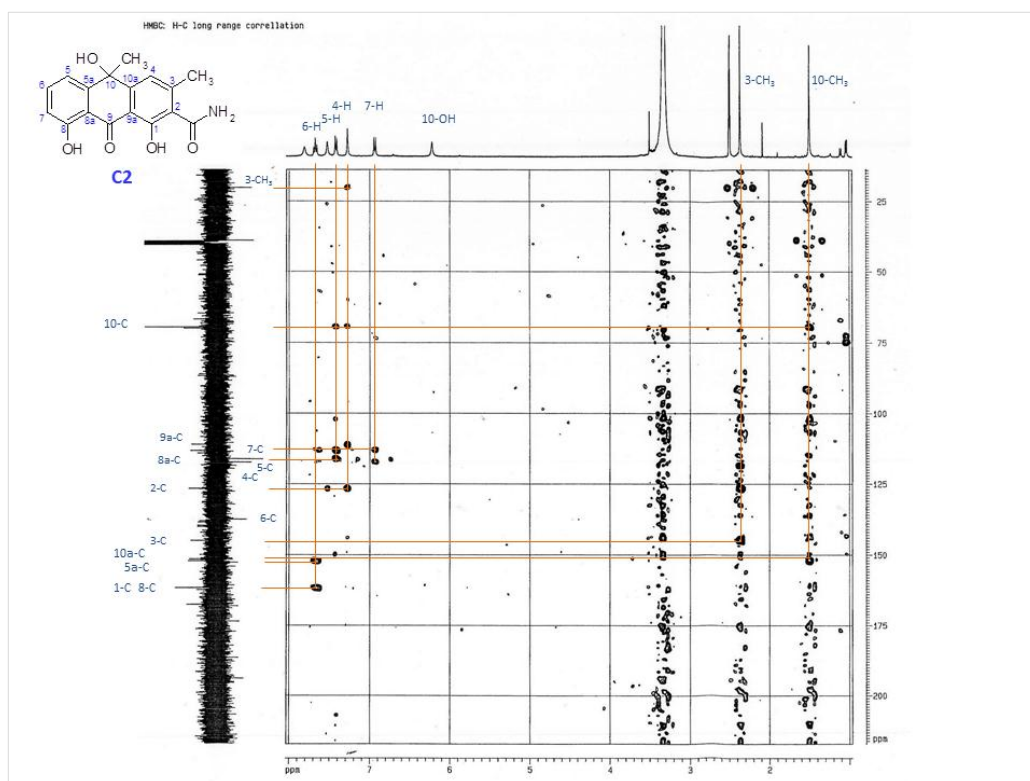
Prilog 9. Spektar UV/VIS spoja C1.

## 8.2. Prilozi određivanju strukture spoja C2

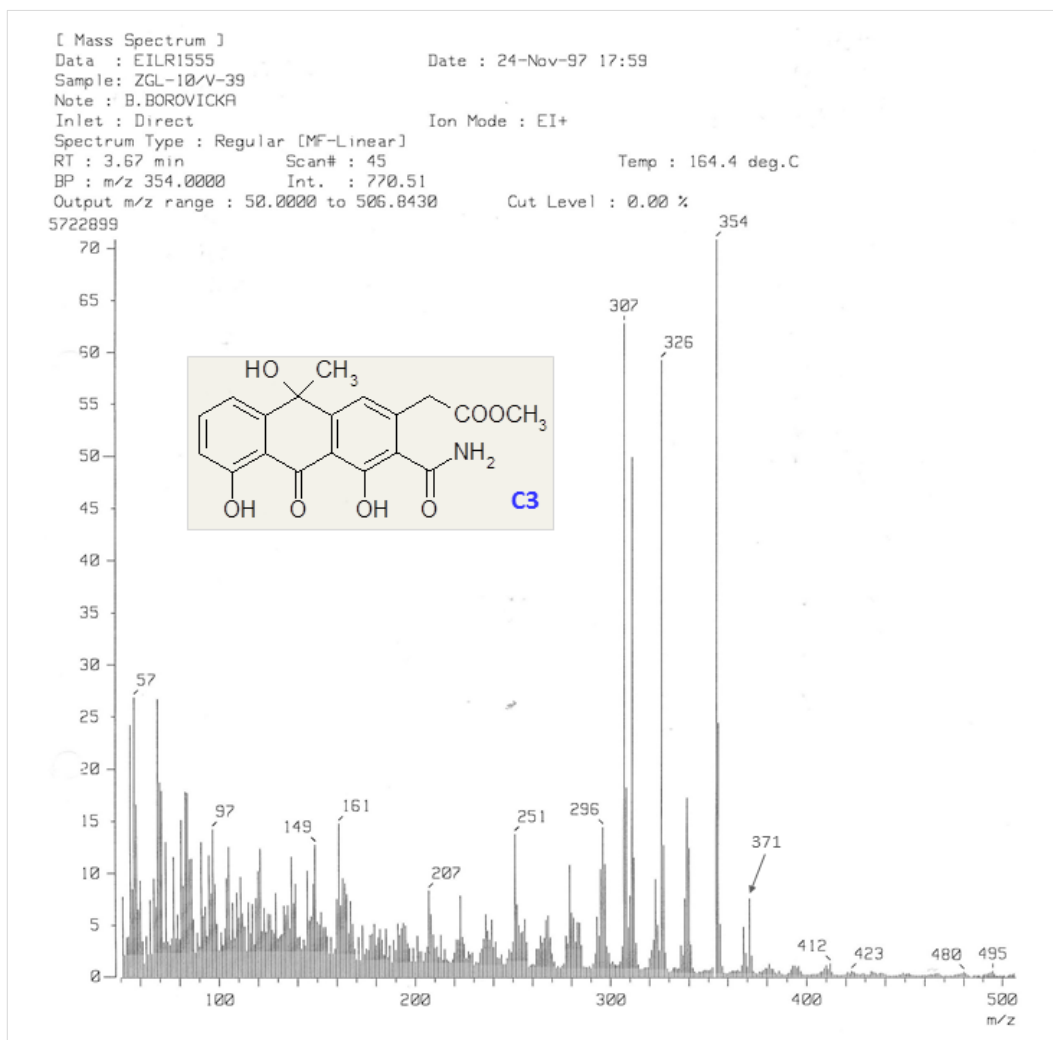


Prilog 10. Spektar MS spoja C2.

Prilog 11. Spektar  $^{13}\text{C}$  NMR spoja C2 (75 MHz, DMSO- $d_6$ )

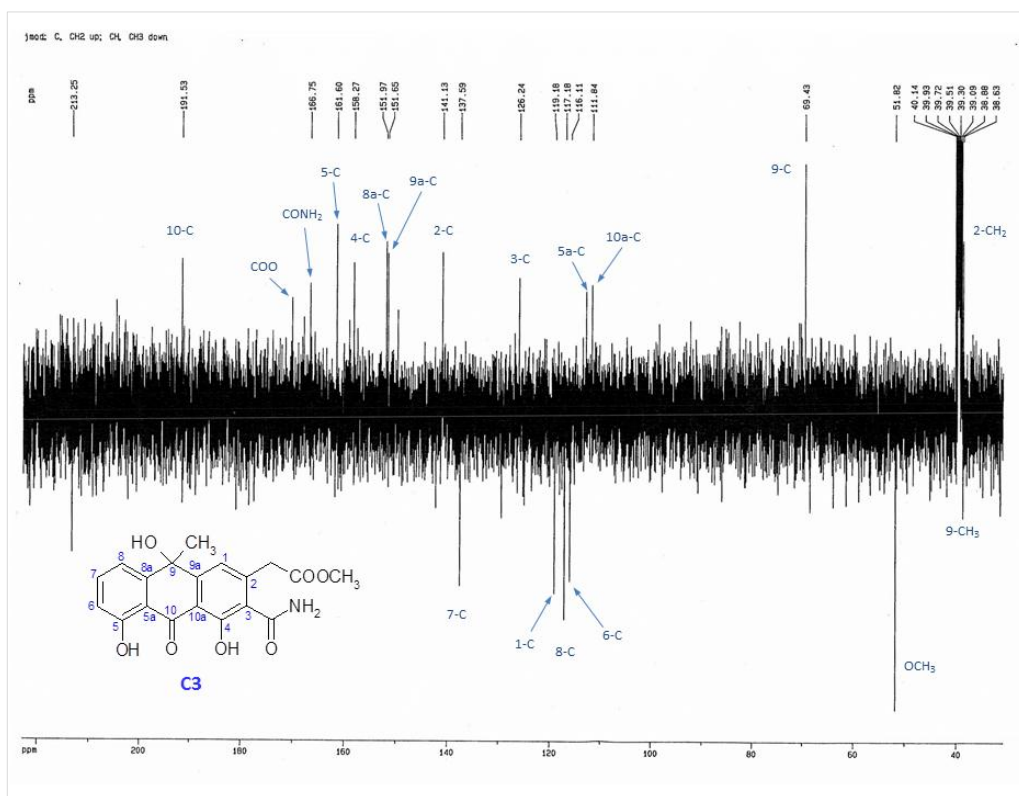
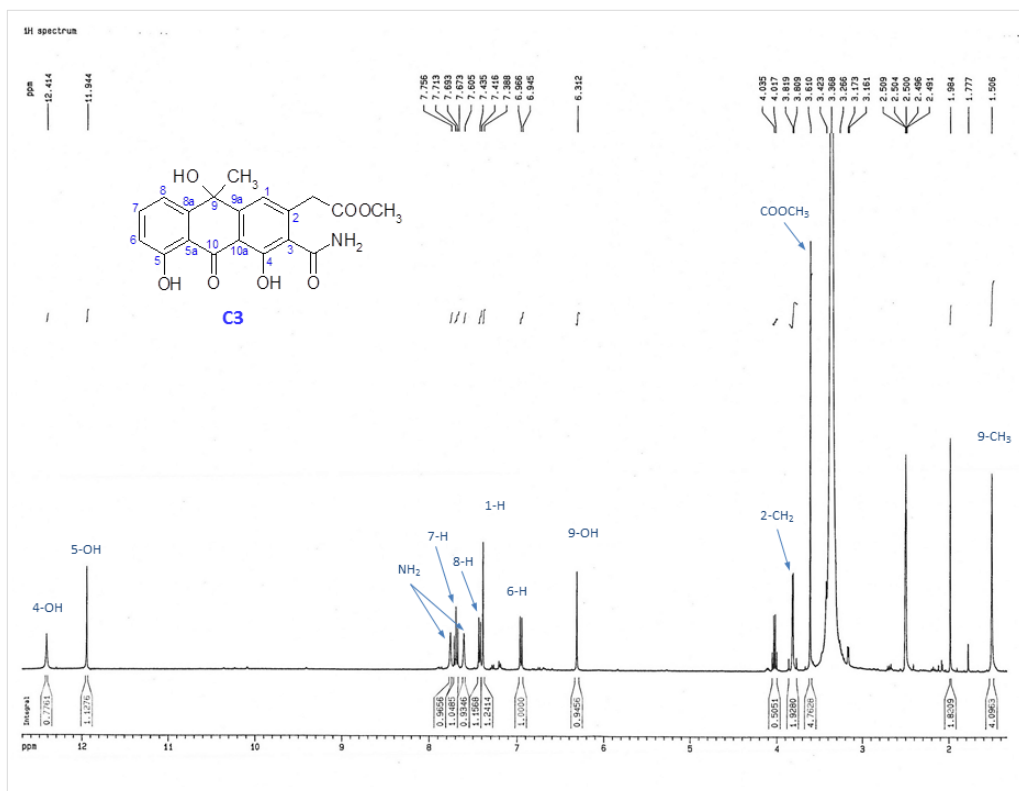
Prilog 12. Spektar <sup>1</sup>H NMR spoja **C2** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).Prilog 13. Spektar HMBC spoja **C2** s naznačenim glavnim korelacijama pojedinih protona i C-atoma.

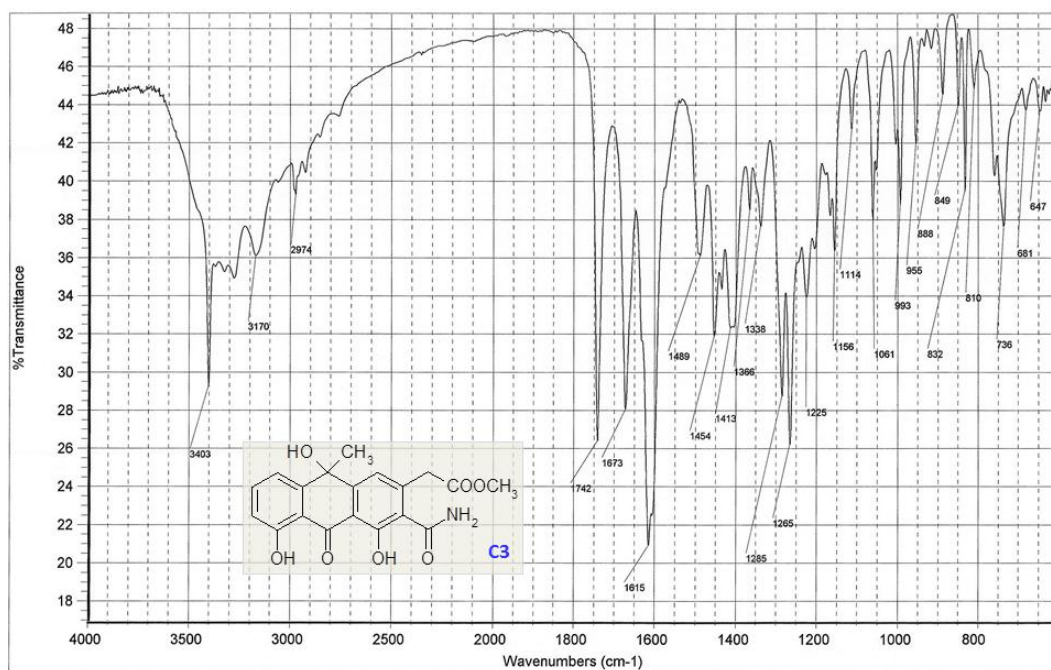
### 8.3. Prilozi određivanju strukture spoja C3



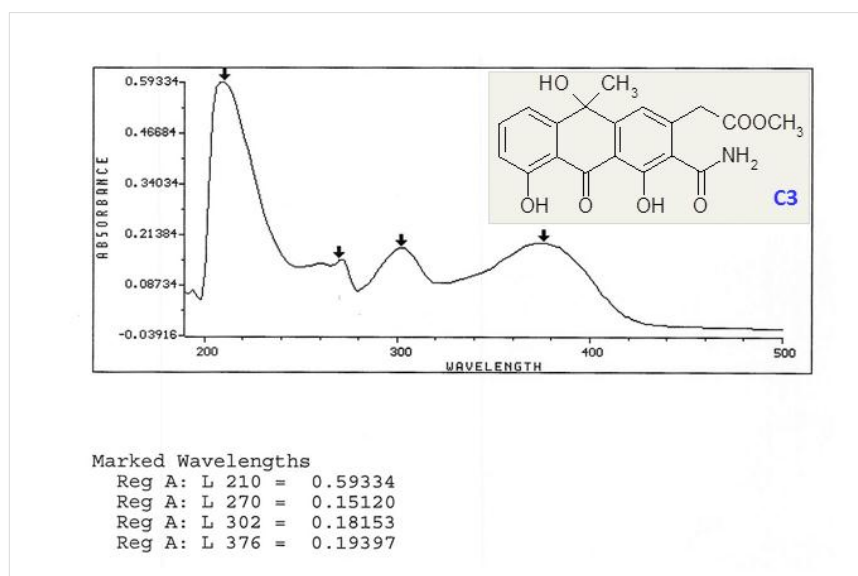
Prilog 14. Spektar MS spoja C3.



Prilog 15. Spektar <sup>13</sup>C NMR spoja **C3** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)Prilog 16. Spektar <sup>1</sup>H NMR spoja **C3** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).

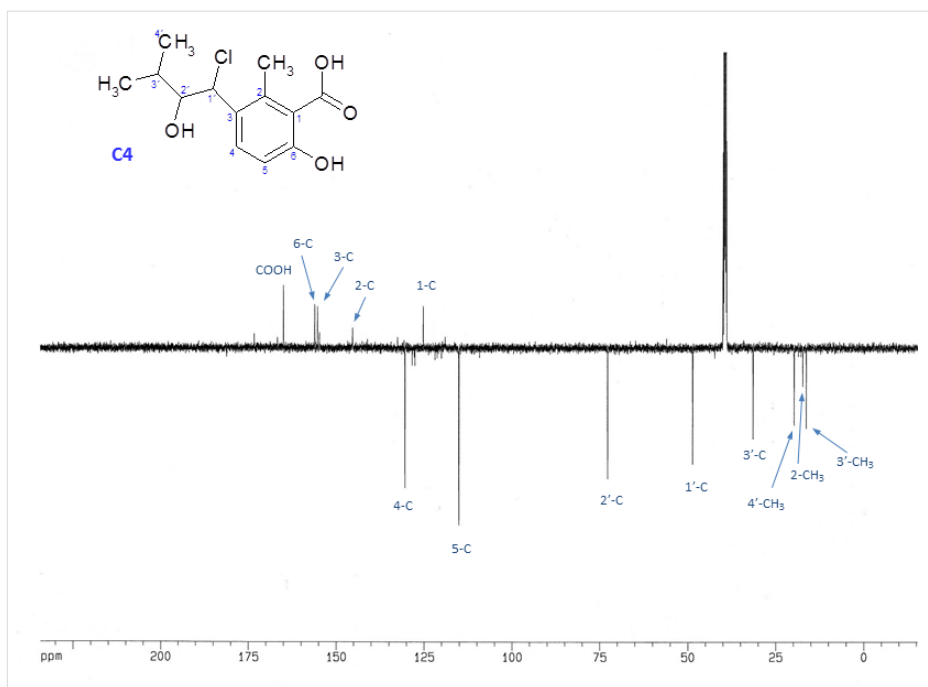
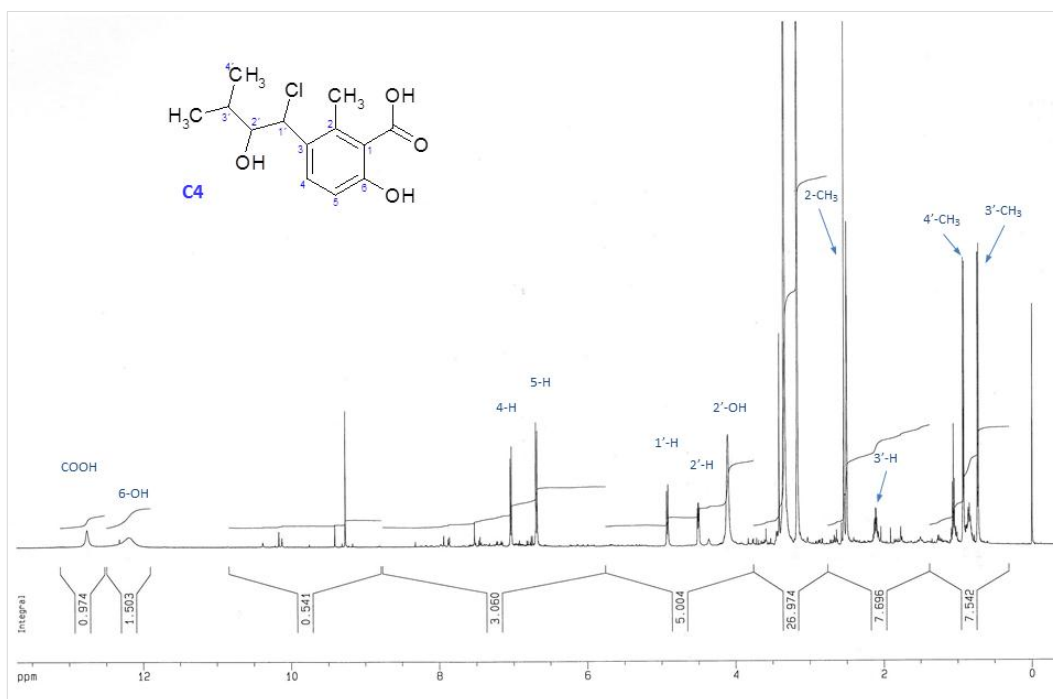


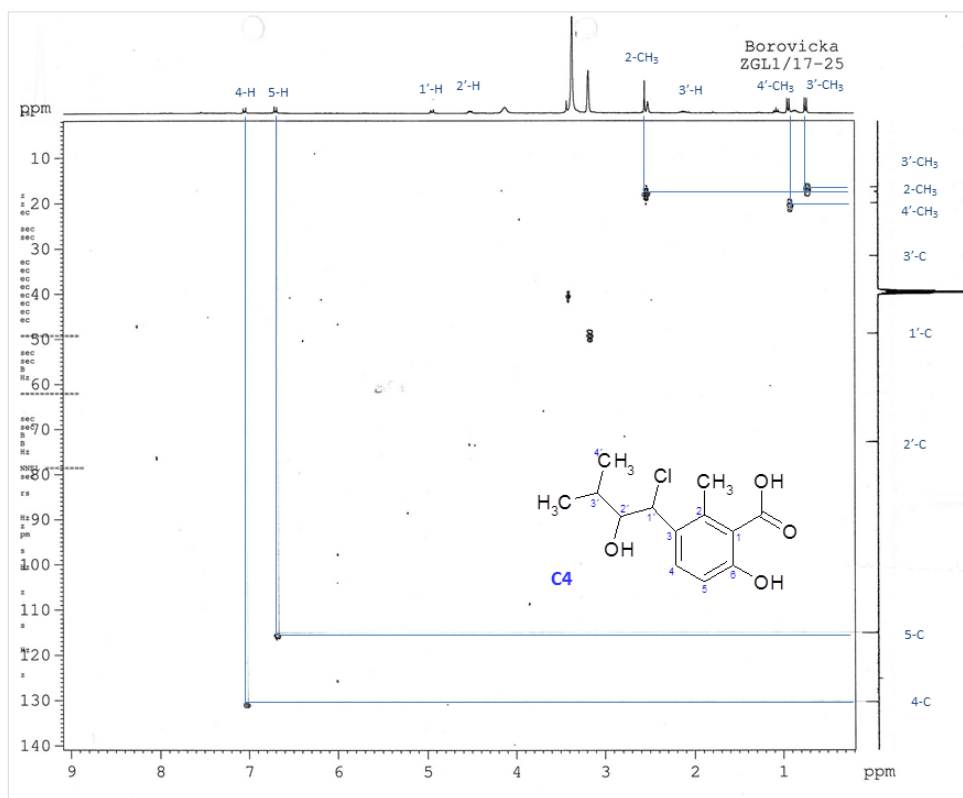
Prilog 17. Spektar IR spoja C3.



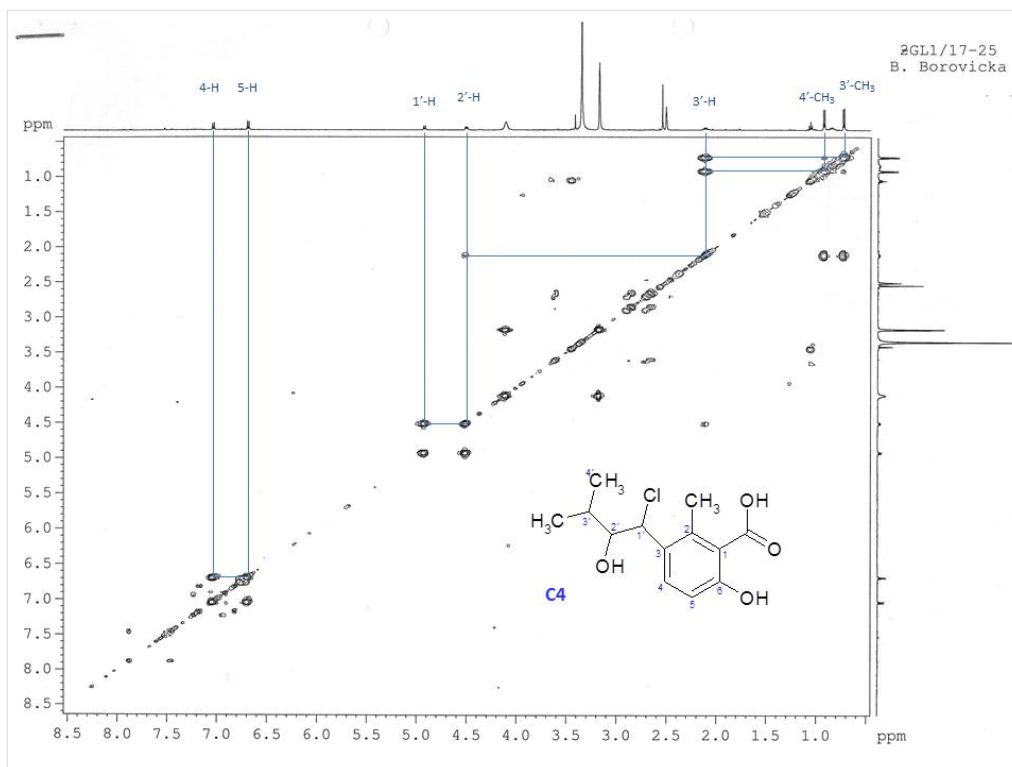
Prilog 18. Spektar UV/VIS spoja C3.

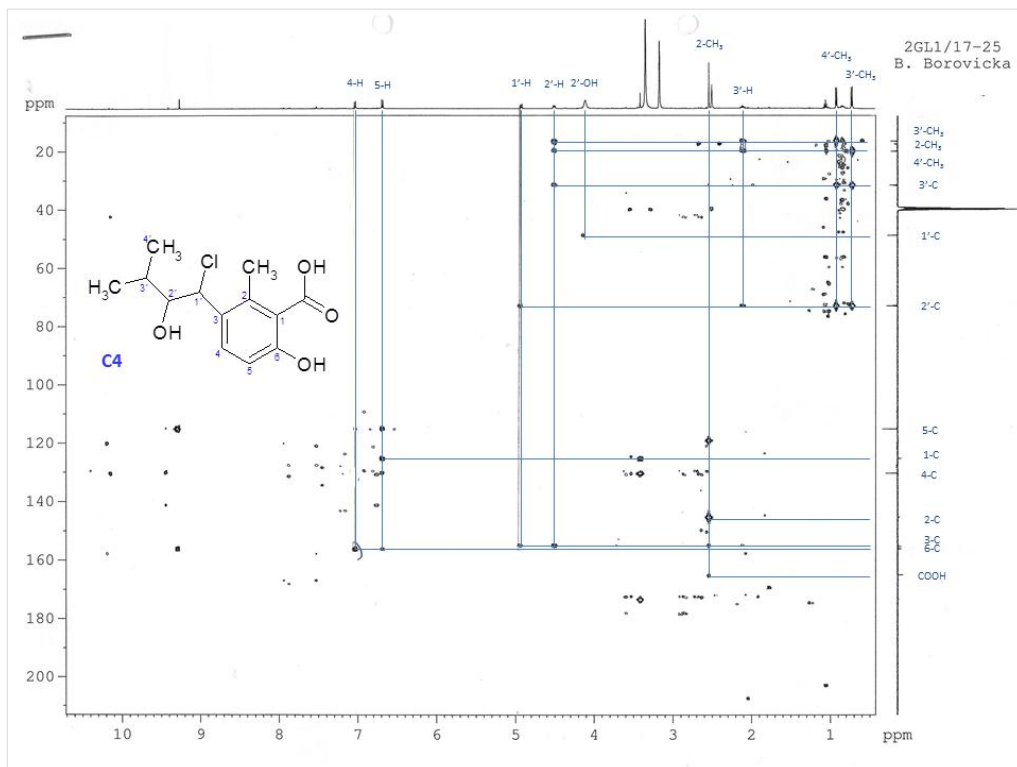
## 8.4. Prilozi određivanju strukture spoja C4

Prilog 19. Spektar  $^{13}\text{C}$  NMR spoja C4 (125 MHz, DMSO- $d_6$ ).Prilog 20. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja C4 (500 MHz, DMSO- $d_6$ ).

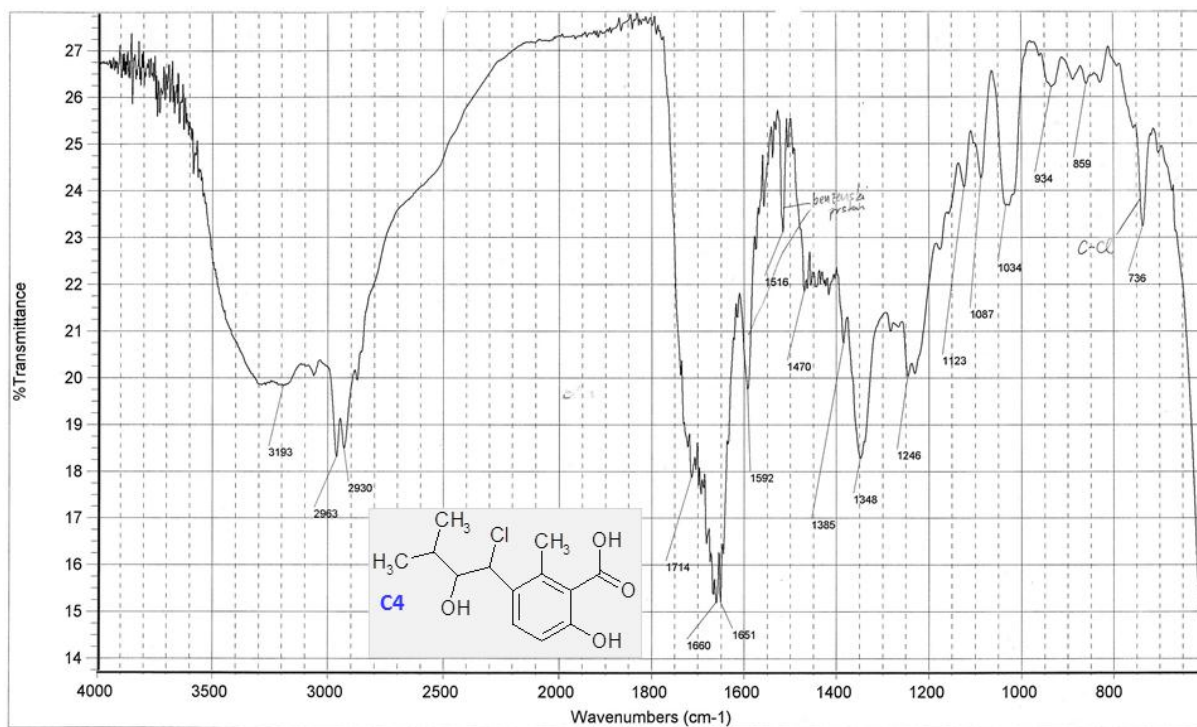


Prilog 21. Spektar HMQC spoja C4 s naznačenim korelacijama protona i C-atoma.

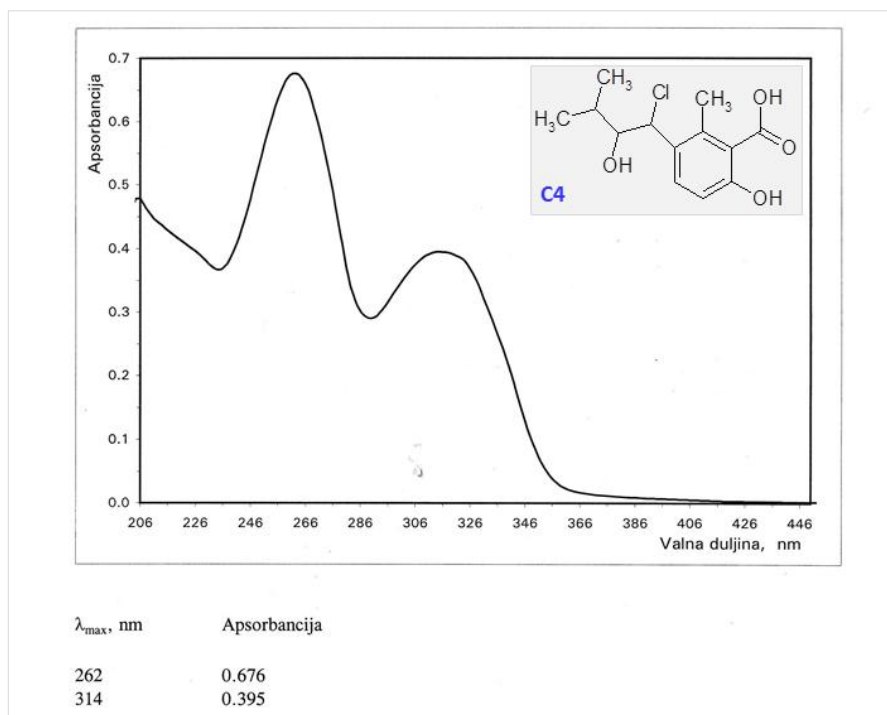
Prilog 22. Spektar <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spoja C4.



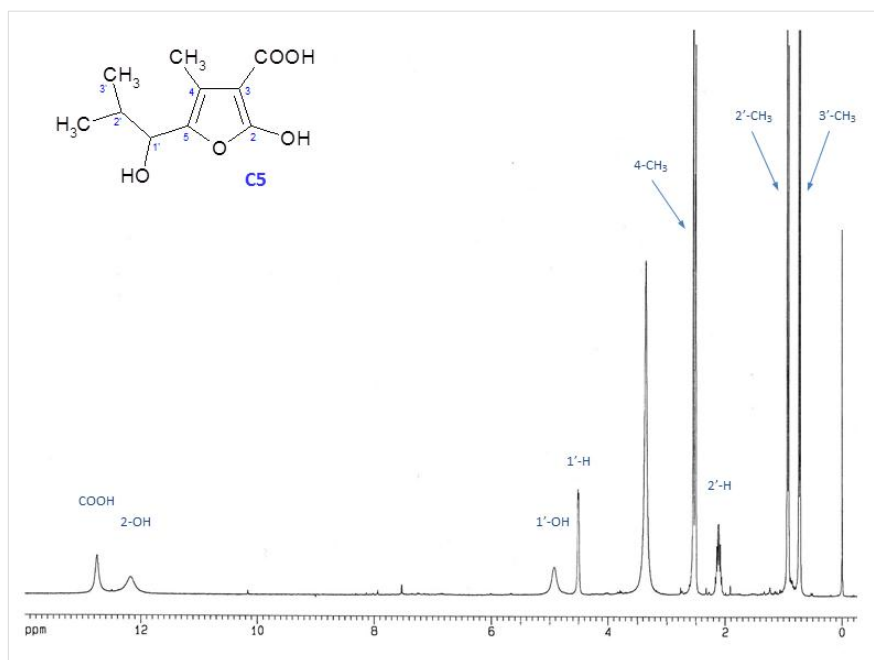
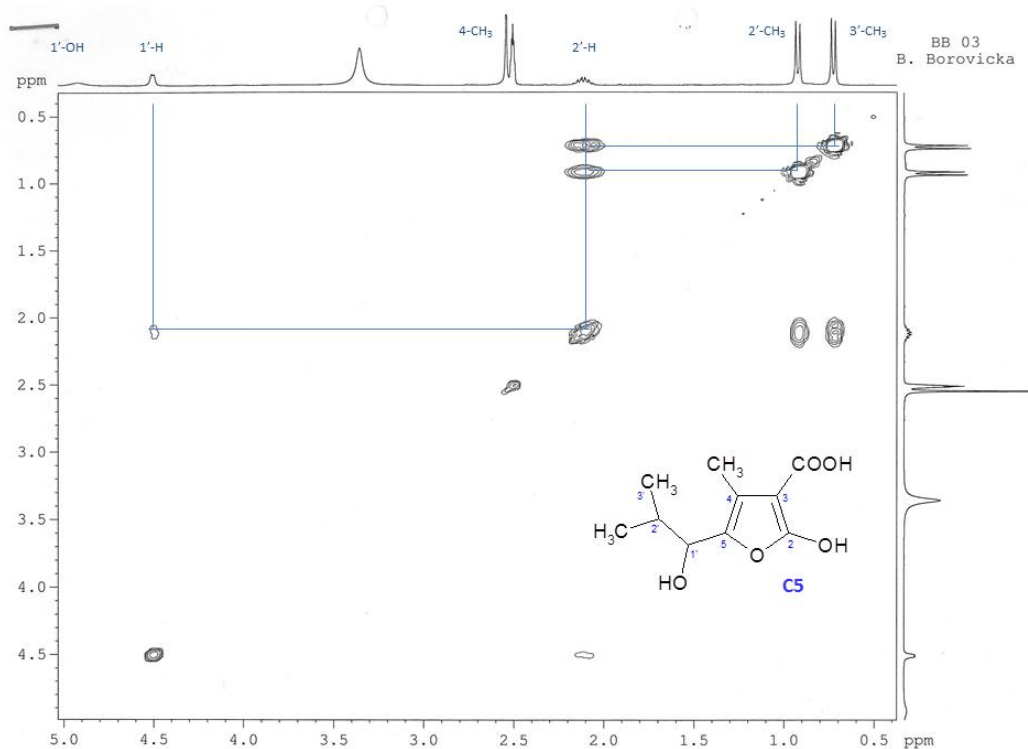
Prilog 23. Spektar HMBC spoja **C4** s naznačenim glavnim korelacijama pojedinih protona i C-atoma.

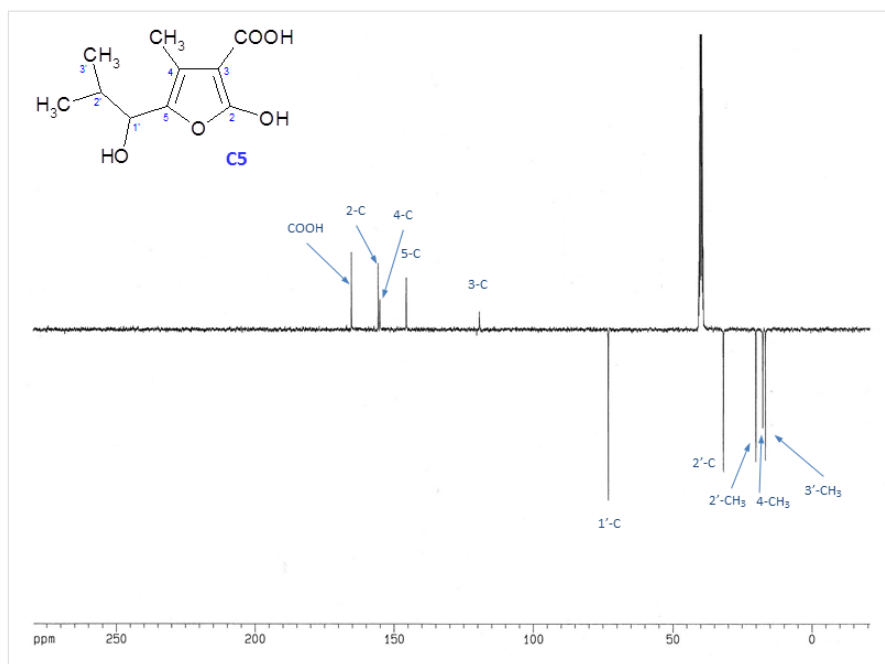
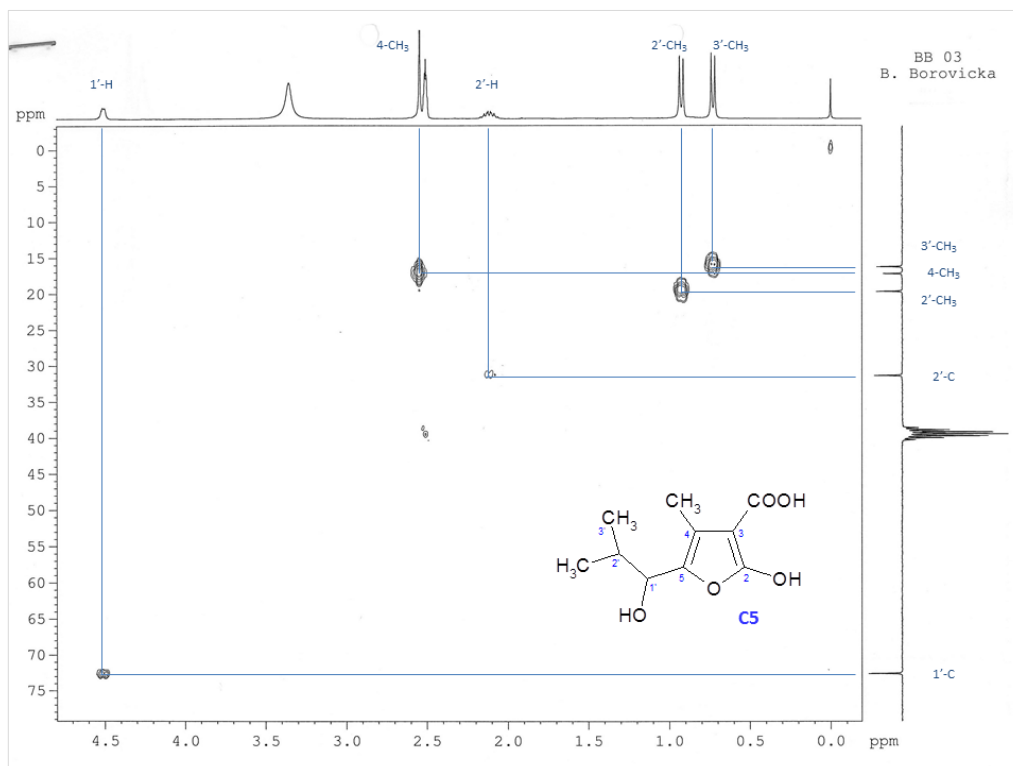


Prilog 24. Spektar IR spoja **C4**.

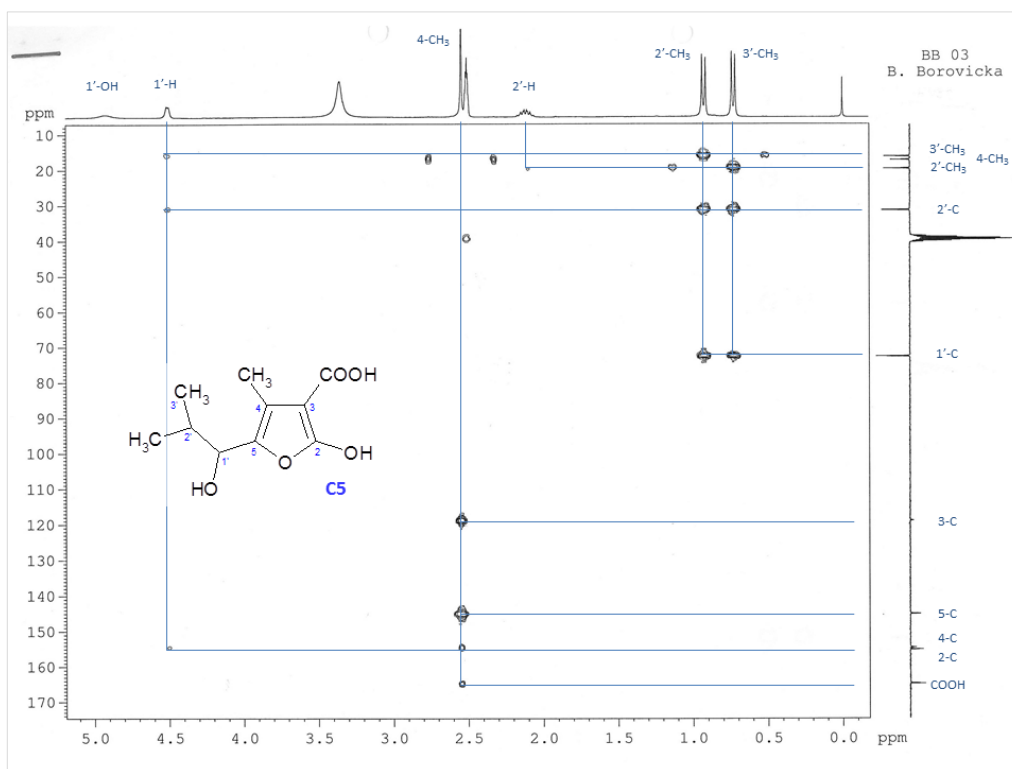
Prilog 25. Spektar UV/VIS spoja **C4**.

## 8.5. Prilozi određivanju strukture spoja C5

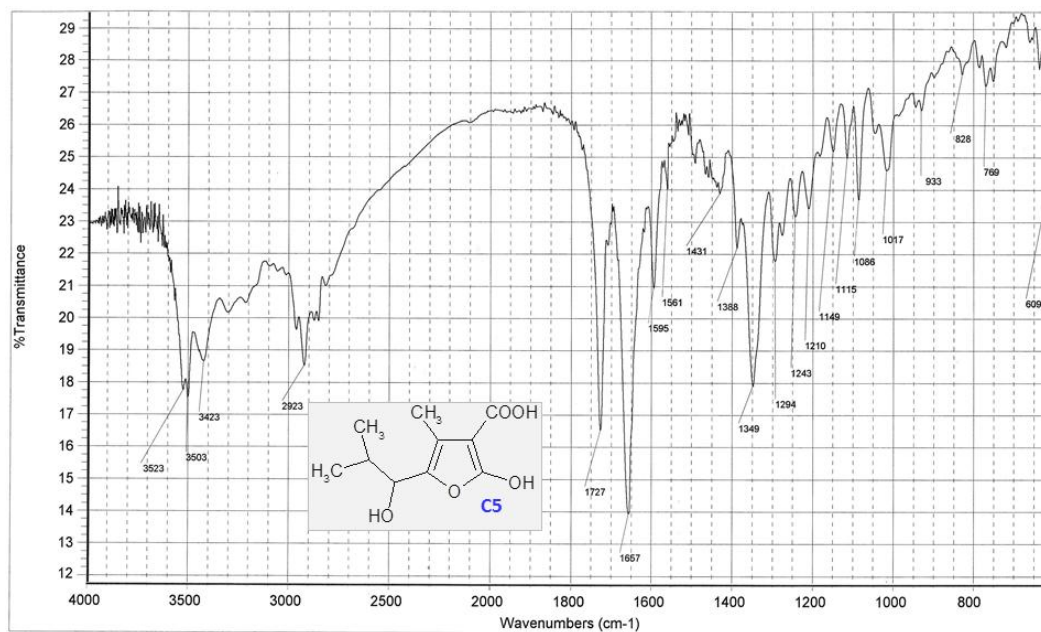
Prilog 26. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja C5 (300 MHz, DMSO- $d_6$ ).Prilog 27. Spektar  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spoja C5.

Prilog 28. Spektar  $^{13}\text{C}$  NMR spoja **C5** (75 MHz, DMSO- $d_6$ )Prilog 29. Spektar HMQC spoja **C5** s naznačenim glavnim korelacijama pojedinih protona i C-atoma.

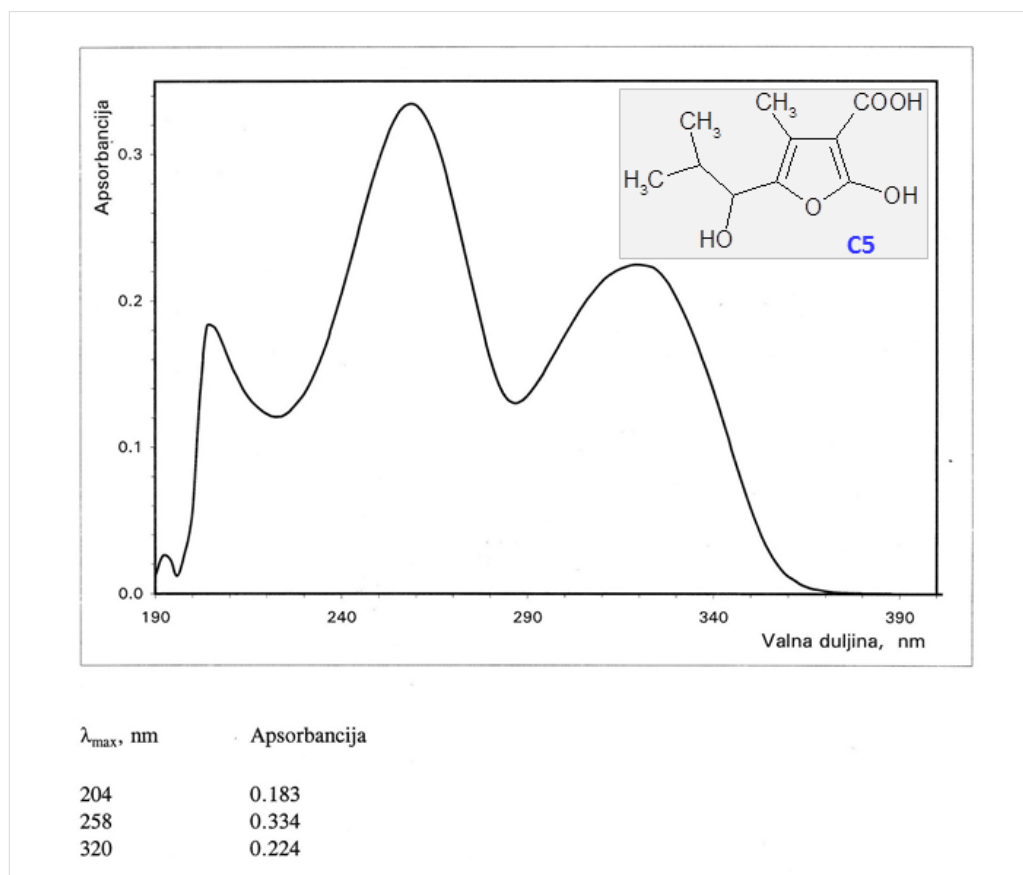




Prilog 30. Spektar HMBC spoja **C5** s naznačenim glavnim korelacijama pojedinih protona i C-atoma.

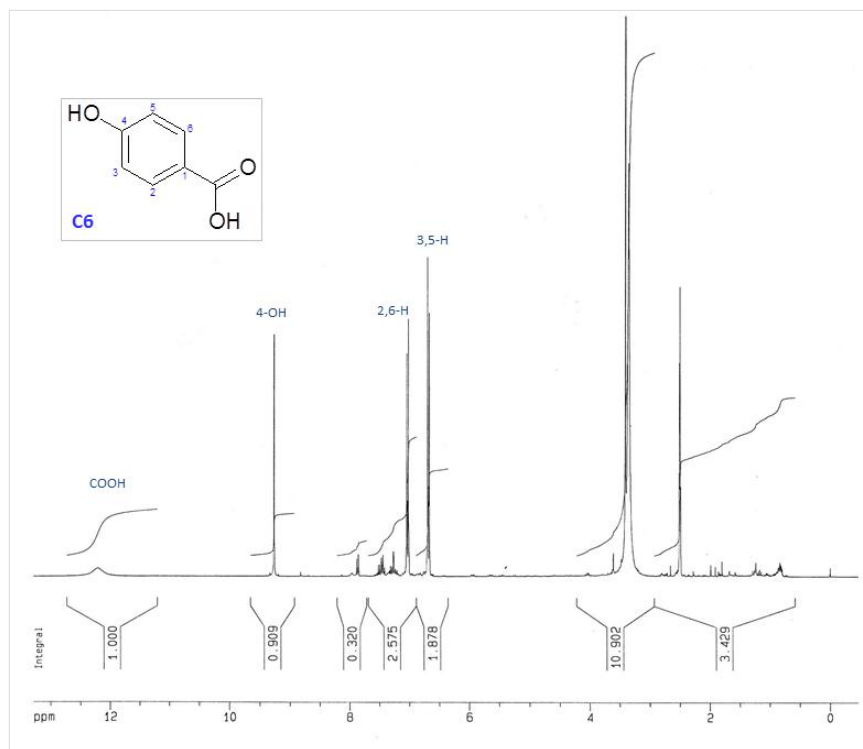


Prilog 31. Spektar IR spoja **C5**.

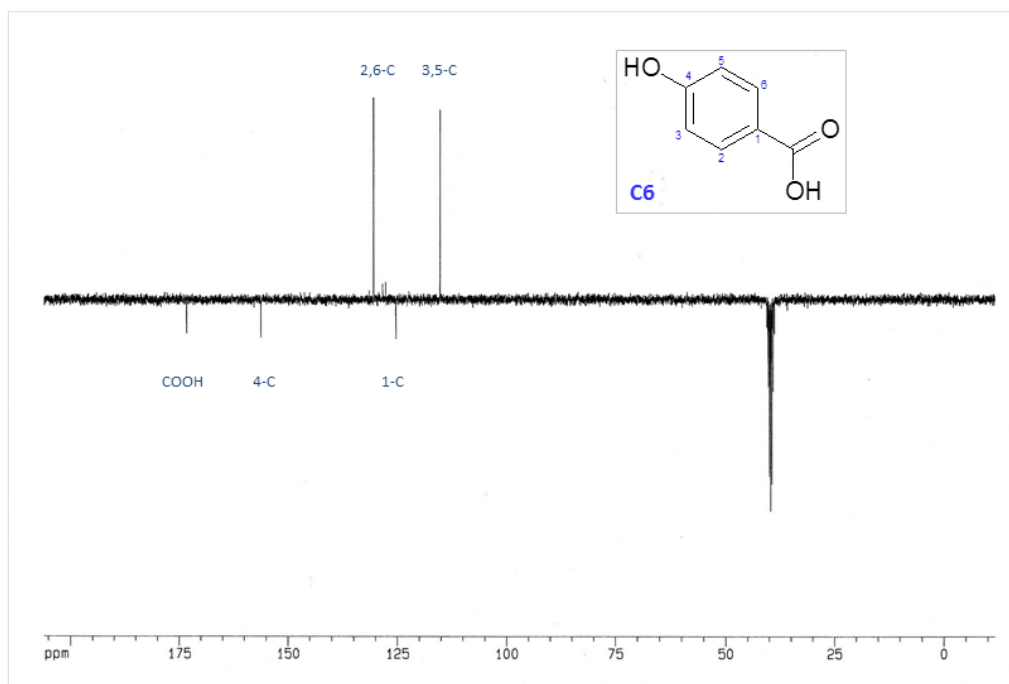


Prilog 32. Spektar UV/VIS spoja C5.

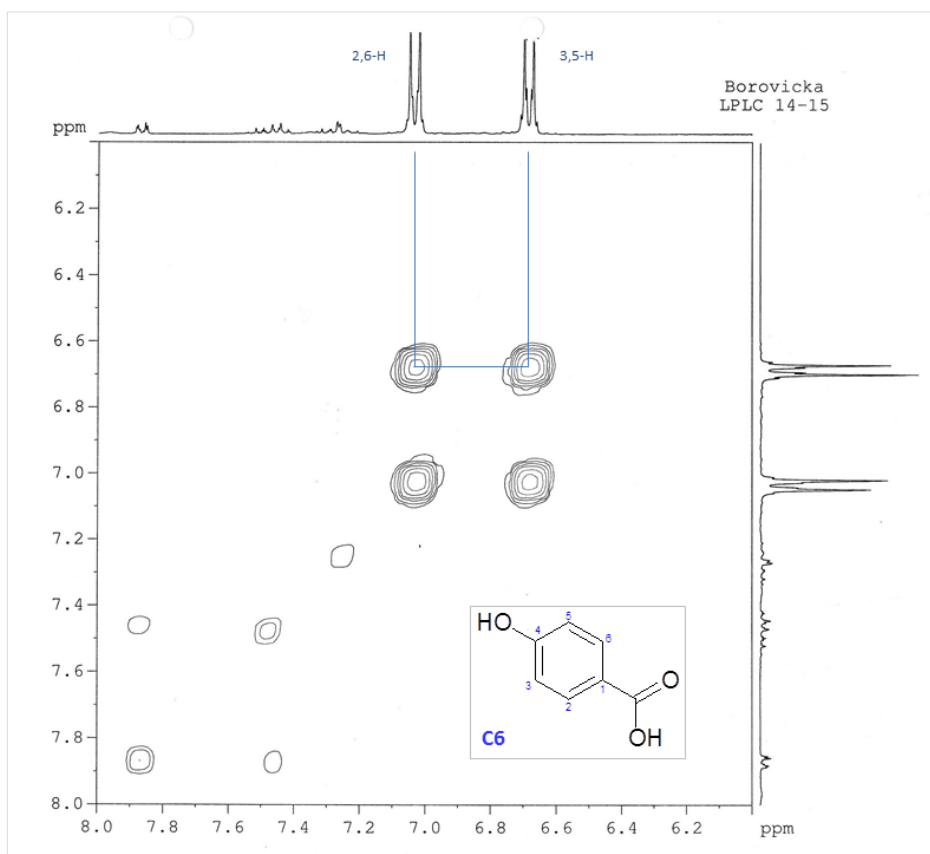
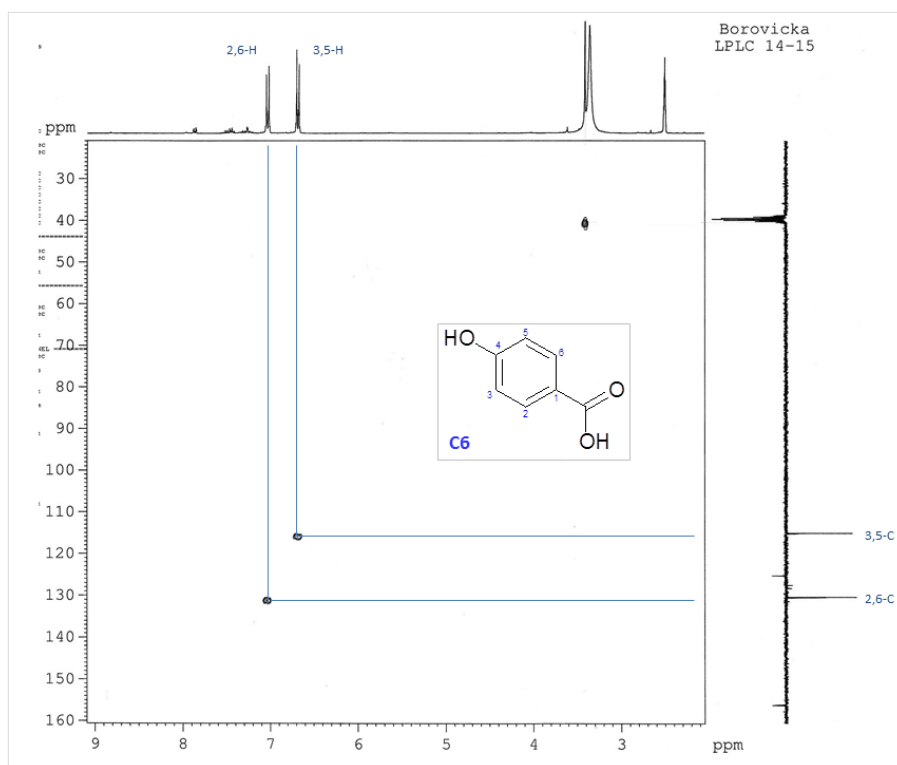
## 8.6. Prilozi određivanju strukture spoja C6



Prilog 33. Spektar <sup>1</sup>H NMR spoja C6 (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).



Prilog 34. Spektar <sup>13</sup>C NMR spoja C6 (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

Prilog 35. Spektar  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spoja C6.

Prilog 36. Spektar HMQC spoja C6 s naznačenim korelacijama protona i C-atoma.