

Я.И. Савчук, А.М. Зайченко, Е.С. Цыганенко

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины
ул. Академика Заболотного, 154, 03143 Киев, Украина*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *PENICILLIUM SP. 10-51*

*В результате колоночной хроматографии (силикагель «L» II ст. активности 100/160 мкм) хлороформного экстракта из культурального фильтрата *Penicillium sp. 10-51* было выделено две активные фракции (хлороформ и хлороформ-ацетон, 5:1). Кристаллизация позволила получить два вещества. Изучение физико-химических и спектральных характеристик этих веществ дало основание для идентификации их с курвулярином и гидроксикурвулярином, обладающим широким спектром биологического действия.*

Ключевые слова: курвулярин, гидроксикурвулярин, метаболиты, экстракция, хроматография, биологическая активность.

Микроскопические грибы являются не только объектом чисто научного интереса. Они широко применяются в сельском хозяйстве, медицине, пищевой промышленности, косметологии и других областях. Особое место среди них занимают представители р. *Penicillium* – известные продуценты многих биологически активных соединений. С точки зрения биотехнологии, они относятся к перспективным микроорганизмам – продуцентам витаминов, аминокислот, ферментов и других полезных веществ. Наряду с этим следует заметить, что микроскопические грибы, обладая фитопатогенными и токсигенными свойствами, могут наносить значительный ущерб сельскому хозяйству. Традиционные методы борьбы с этими крайне опасными биологическими агентами, основанные на использовании химических средств, уже давно не отвечают требованиям современности, и отрицательно влияют на состояние окружающей среды и здоровье теплокровных животных.

Именно поэтому в настоящее время перед биотехнологией ставится задача по поиску и разработке новых «естественных» способов борьбы с нежелательными биологическими агентами, включая фитопатогенные микроскопические грибы.

В результате ранее проведенного нами скрининга 52 изолятов микромицетов относительно их способности продуцировать соединения с антибиотическими и фитотоксическими свойствами были отобраны три штамма с широким спектром антибиотического действия [5]. Наиболее активным среди них оказался изолят, предварительно идентифицированный нами как *Penicillium sp. 10-51*.

В этом исследовании предполагалось осуществить культивирование этого гриба и выделение из его культурального фильтрата активного вещества. Выделение активного вещества в свою очередь предусматривало отработку условий экстракции активной фракции, ее очистки и получение его в кристаллическом виде. Дальнейшие исследования были направлены на изучение некоторых физических и химических характеристик активных соединений с целью обеспечения их первичной идентификации и выявления их биологических свойств.

Материалы и методы. Гриб культивировали в колбах Эрленмейера (700 мл), которые содержали 100 мл жидкой среды Чапека с глюкозой (20 г/л) как единственным источником углерода, в течении 21 суток при температуре 27–28 °С без освещения.

В качестве тест-систем были использованы: грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus* B918, *Bacillus subtilis* 617, *B. licheniformis* 5), грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli* B906, *Salmonella abony* B921), фитопатогенные бактерии (*Pseudomonas syringae* 7591, *Erwinia aroideae* 8636), фитопатогенные грибы (*Botrytis cinerea* F-16812), дрожжи (*Candida albicans* 690, *C. kefyr* 899, *Trichosporon cutaneum* 1502) и зеленые водоросли (*Chlorella vulgaris* 193, 197, 500 и *C. kessleri* 205). В процессе эксперимента был использован общепринятый метод лунок [4].

Культуры микромицетов были предоставлены в наше распоряжение отделом физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, за что мы искренне признательны его сотрудукам.

© Я.И. Савчук, А.М. Зайченко, Е.С. Цыганенко, 2012

В процессе отрабатывания условий экстракции активного вещества и колоночной хроматографии были использованы данные сборной хроматографии по Шевчику [4]. В качестве сорбента использовали силикагель «L» производства фирмы «Lachema» (Чехия) второй степени активности по Брокману, размеры частиц – 100/160 мкм, параметры колонки – 25×300 мм.

Для элюции с колонки использовали растворители (н-гексан, хлороформ, ацетон, вода) и их системы в порядке возрастания полярности. Объем собираемых фракций составлял 50 мл, скорость протока – 0,5 мл/мин.

Тестирование фракций осуществляли с помощью приведенных выше индикаторных культур, а также с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах «Silufol» UV-254 производства фирмы «Kavallier» (Чехия). Для разгонки были использованы следующие системы растворителей: бензол : этилацетат : метанол (соотношение 5: 5: 1) и толуол : изопропанол : муравьиная кислота (соотношение 6: 3: 1).

Визуализация пятен на пластинах осуществлялась в камере с парами йода.

Элементный анализ кристаллических соединений был проведен по методу сплавления с металлическим натрием [6], температура плавления полученного вещества определялась по Кофлеру [7], среднее ее значение определяли после проведения 5-6 измерений.

Спектральные характеристики определяли в УФ- и ИК- областях спектра, с использованием спектрофотометров «Specord» и UR-10 (Германия).

Результаты и их обсуждение. В процессе проведенного скрининга было установлено, что культуральные фильтраты *Penicillium sp. 10-51* проявляют антибиотическую активность относительно различных групп микроорганизмов (таб. 1). В частности, была отмечена их высокая активность по отношению к фитопатогенным бактериям *P. syringae* 7591, *E. aroideae* 8636, зоны задержки роста которых составляли 28 и 32 мм соответственно, а также к зеленым водорослям (*d* зоны задержки роста 28–34 мм).

Таблица 1

Антибиотическая активность культурального фильтрата *Penicillium sp. 10-51* в отношении бактерий, микроскопических грибов и водорослей

Изолят	Диаметры зон задержки роста тест-культур, мм														
	Бактерии						Дрожжи	Водоросли				Фитопатогенные грибы			
	Грамположительные			Грамотрицательные											
	<i>S. aureus</i> B918	<i>B. subtilis</i> 617	<i>B. licheniformis</i> 5	<i>E. coli</i> B906	<i>S. abony</i> B921	<i>P. syringae</i> 7591	<i>E. aroideae</i> 8636	<i>C. albicans</i> 690	<i>C. kefir</i> 899	<i>T. cutaneum</i> 1502	<i>C. vulgaris</i> 193	<i>C. vulgaris</i> 197	<i>C. vulgaris</i> 500	<i>C. kessleri</i> 205	<i>B. cinerea</i> P-16812
<i>Penicillium sp. 10-51</i>	13	20	24	18	13	28	32	18	29	20	30	32	34	28	21

Особого внимания заслуживает антифунгальное действие культурального фильтрата *Penicillium sp. 10-51*, которым обладали лишь некоторые штаммы. Культуральные фильтраты *Penicillium sp. 10-51* сдерживали рост не только дрожжей, но и фитопатогенного *B. cinerea* P-16812 (*d* зоны задержки роста 21 мм).

Впоследствии было установлено, что этот штамм проявляет максимальную активность к тест-культурам только на 21 сутки культивирования.

Данные сборной хроматографии свидетельствуют о том, что активное соединение имеет полярный характер, а лучшими растворителями для его экстракции являются хлороформ и этилацетат.

В результате трехразовой экстракции хлороформом и последующим упариванием экстрактов из культурального фильтрата *Penicillium sp. 10-51* был получен маслянистый остаток – после предварительной очистки от неполярных липидных примесей с помощью жидкостного перераспределения (н-гексан – ацетонитрил) и депигментации (активированный уголь), с последующим фракционированием с помощью колоночной хроматографии.

Элюция с колонки подтвердила, что фракции №№ 7-10 (хлороформ) обладают высокой активностью по отношению к индикаторным культурам и хроматографически представлены одним пятном с Rf 0,56 (система – бензол : этилацетат : метанол, соотношение: 5 : 5 : 1). Эти фракции объединяли и упаривали при пониженном давлении. Путем кристаллизации из бензола было получено 82,6 мг вещества белого цвета, которое было обозначено нами как P10.

Менее активными оказались фракции № 13-16 (система – хлороформ : ацетон, соотношение: 5 : 1). Хроматографически они были также представлены одним пятном с Rf 0,42 (система – толуол : изопропанол : муравьиная кислота, соотношение: 6 : 3 : 1). Путем кристаллизации из смеси метанола и н-гексана, после высушивания, было получено 12,7 мг игольчатых кристаллов белого цвета. Соединение было обозначено нами как P16.

Исследование ряда физических и химических характеристик выделенных активных соединений показало, что оба вещества состоят только из основных компонентов органических соединений, таких, как углерод, водород и кислород. Что касается других элементов, то было установлено, в частности, отсутствие азота в обоих препаратах (отсутствие желтой окраски реакционной смеси в течении 2 минут). Отсутствие серы было установлено по реакции с ацетатом свинца. В обоих из исследуемых соединений также не было обнаружено элементов группы галогенов.

При определении температуры плавления препарата P10 было показано, что она составляет 205–207 °С. Спиртовой раствор этого препарата в УФ-области спектра давал три характерных максимума поглощения 223, 270 и 305 нм со значениями молярной экстенции (ε): 11200, 6400 и 5100 соответственно. Спектр поглощения в ИК-области для препарата P10 (таблетки KBr) был представлен полосами (см⁻¹) 3300, 1706, 1665, до, 1608, 1160, 1050 и 841 соответственно.

Сравнение полученных данных с приведенными в литературе [9, 12, 15-17,19] с высокой степенью достоверности дает основания для идентификации соединения P10 с курвулярином – метаболитом, образуемым представителями *pp. Curvularia, Alternaria, Penicillium, Cercospora* и *Aspergillus*.

А более полярное соединение P16, с учетом анализа полученных спектральных характеристик (UV_{λmax}^{EtOH} нм (ε) 221(9340), 273 (5640) і 306 (4660); ІЧ_{νmax}^{KBr} см⁻¹ 3280, 1725, 1690, 1610, 1592, 1270, 1170, 850), также с высокой степенью достоверности, может быть идентифицировано с гидроксикурвулярином – производным курвулярина.

Что касается биологической активности полученных веществ, то данные литературы и собственных исследований свидетельствуют о широком спектре их свойств. В частности, эти соединения являются высокоселективными ингибиторами фермента NO-синтазы, который тесно связан с системой иммунного ответа у теплокровных, что имеет большое значение для разработки лекарственных средств против аутоиммунных заболеваний [14,20]. Курвулярин и его производные также являются эффективным ингибиторами клеточного деления и используются для изучения механизмов этого процесса [12]. Важной, с точки зрения практического применения выделенных нами соединений, является их антимикробная и антифунгальная активность. Так, установлено, что культуральный фильтрат *Penicillium sp. 10-51* выявляет антибиотическое действие относительно грамположительных и грамотрицательных бактерий, микроскопических водорослей, дрожжей и фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea*. Как уже отмечалось, разработка новых средств борьбы с фитопатогенными грибами является одним из приоритетных заданий фитопатологии. Представители *p. Botrytis* являются неспецифическими паразитами, которые повреждают листья, проростки, плоды многих культурных растений, а наибольший ущерб они наносят виноградникам. При контакте со спорами грибов в процессе употребления вина или виноградного сока, изготовленных из заплесневелых ягод, в организме человека могут появиться аллергические реакции [11]. Поскольку *B. cinerea* выявляет высокую устойчивость к синтетическим фунгицидам, в настоящее время разрабатываются новые методы биоконтроля за распространением этого вредителя. В частности, в качестве биологического агента предлагается использовать гриб *Ulocladium atrum*, который является антагонистом по отношению к представителям *p. Botrytis* [13].

Курвулярин, как нам кажется, нельзя отнести к специфическим продуктам вторичного обмена, поскольку, как было показано [12,15,18], его способны продуцировать представители

микроміцетів, генетически віддаленні друг від друга. Таким образом, біосинтез курвулярина не повністю відповідає класическому розумінню вторичного метаболізму [8,10,21]. Деякі дослідники вважають [1,2], що вторичні метаболіти є видоспецифіческими продуктами біосинтезу, які не мають якогось-лібо важливого значення для життя їх продуцентів. С таким твердженням важко погодитися, і очевидно, що курвулярин, як і інші метаболіти [3], грає певну роль в процесі життєдіяльності продуцентів. Так, нами показано, що курвулярин має широкий спектр антибіотическої активності, з іншої сторони курвулярин може виконувати роль регулятора фізіологічески важливих процесів в організмі продуцента, зокрема, впливати на процес спороутворення [15,18]. Не слід також виключати того, що цей метаболіт і його похідні можуть виконувати різні функції у різних продуцентах.

Таким образом, метаболіти, виділені нами з культурального фільтрату *Penicillium sp. 10-51*, а також сам ізолят перспективні в боротьбі з фітопатогенним грибом *B. cinerea*. Слід також відзначити, що курвулярин, проявляючи антифунгальне дієвство, здатен інгібувати процес спороутворення у іншого фітопатогена – *A. tomato* [15].

Суммувавши отримані дані, можна зробити висновок, що курвулярин і гідроксикурвулярин, завдяки широкому спектру біологіческої активності, можуть бути перспективними для розв'язання чистих наукових проблем і практических завдань біотехнологіческої науки.

Я.І. Савчук, О.М. Зайченко, К.С. Циганенко

*Інститут мікробіології і вірусології НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна*

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОЗАКЛІТИННИХ МЕТАБОЛІТІВ *PENICILLIUM SP. 10-51*

Резюме

В результаті колонкової хроматографії (сілікагель «L» II ст. активності 100/160 мкм) хлороформного екстракту із культурального фільтрату *Penicillium sp. 10-51* було виділено дві активні фракції (хлороформ і хлороформ-ацетон, 5:1). Методом кристалізації були отримані дві сполуки. Вивчення фізико-хімічних і спектральних характеристик цих речовин дало підстави ідентифікувати їх як курвулярин і гідроксикурвулярин, котрі мають широкий спектр біологіческої активності щодо бактерій, дріжджів, зелених водоростей та фітопатогенних мікроміцетів.

Ключові слова: курвулярин, гідроксикурвулярин, метаболіти, екстракція, хроматографія, біологіческа активність

Ya.I. Savchuk, O.M. Zaichenko, K.S. Tsiganenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

BIOLOGICAL ACTIVITY OF *PENICILLIUM SP. 10-51* EXOMETABOLITES

S u m m a r y

Silica gel column chromatography (silica gel «L» II kind of activity 100/160 mkm) of the chloroform extract from the cultural filtrate of *Penicillium sp. 10-51* gave two fractions (chloroform and chloroform-acetone, 5:1) having biological activity. Recrystallization yielded two compounds. On the basis of physico-chemical and spectral data these compounds were identified as curvularin and hydroxycurvularin, which have a large spectrum of biological action as to bacteria, yeast, blue-green algae and phytopathogenic micromycetes.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: curvularin, hydroxycurvularin, metabolites, extraction, chromatography, biological activity

The authors address: Savchuk Ya.I., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Беккер З.Э. Физиология грибов и их практическое использование. – М.: Изд-во Моск. универ., 1963. – 267 с.
2. Билай В.И. Основы общей микологии. — Киев: Вища шк., 1980. – 359 с.
3. Зайченко А.М. Биосинтез дендродохинов микроскопическими грибами.// Автор. дис. д-ра биол. наук. – Киев, 1989. – 47с.
4. Методы экспериментальной микологии //Под ред. В.И.Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. – 550с.
5. Савчук Я.І., Зайченко О.М. Оцінка потенціалу мікроміцетів щодо синтезу біологічно активних речовин// Мікробіол. журн. – 2010. – 72, № 2. – С. 15–20.
6. Черонис Н. Микро- и полумикрометоды органической химии. – М.: Иностранная литература, 1960. – 551 с.
7. Лазуревский Г.В., Терентьева И.В., Шамиурин А.А. Практикум работ по химии природных соединений. – М.: Высшая школа, 1966. – 335 с.
8. Bezborodov A.M. On secondary metabolites: their functions and biogenesis// Folia microbiol. – 1978. – 23, N 6. – P. 509–510.
9. Bicalho B., Gonsalves R.A.C., Zibordi A.P.M. et al. Antimycobacterial and cytotoxicity activity of synthetic and natural compounds // Z. Naturforsch., Sec. A. – 2003. – N 38 – P. 746–762.
10. Calam C.T. Secondary metabolism as an expression of microbial growth and development// Folia microbiol. – 1979. – 24, N 3. – P. 276–285.
11. Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt Lehrbuch und Atlas Von Heinz P. R. Seeliger und Theresia Heymer// Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag, 1981. – 268 s.
12. Kobayashi A., Hino T., Yata S., Itoh T. J., Sato H., and Kawazu K. Unique spindle poisons, curvularin and its derivatives, isolated from *Penicillium* species// Agric. Biol. Chem. – 1988 – N 52. – P. 3119–3123.
13. Elzner S., Schmidt D., Schollmeyer D. et al. Biological control of *Botrytis* spp. by *Ulocladium atrum* through competitive colonization of necrotic plant tissues// Plant Research International. – Wageningen, 2004. – P. 253.
14. Erkel G., Rether J., Ank T., Sterner O. A novel inhibitor of the JAK/STAT pathway from a *Penicillium* species// J. Antibiot. – 2003. – P.84–95.
15. Hyeon S., Ozaki A., Suzuki A., Tamura S. Isolation of α,β -dehydrocurvularin and β -hydroxycurvularin from *Alternaria* tomato as sporulation-suppressing factors// Agric. Biol. Chem. – 1976. – N 40. – P. 1663–1674.
16. Ikan R. Natural Products – a laboratory guide// New York: Acad. Press, 1991 – 2nd ed. – 1991.
17. Lai S., Shizuri Y., Yamamura S. et al. Biosyntheses of antibiotic A26771B by *Penicillium turbatum* and dehydrocurvularin by *Alternaria cincinerarie*: comparison of stereochemistry of polyketide and fatty acid enoyl thiol ester reductase// Bull. Chem. Soc. Japan. – 1991. – 64, N 3. – P. 1048–1050.
18. Turner B.W., Aldrige D.C. Fungal metabolites II// London; New York: Academic Press, 1983. – 783 p.
19. Vesonder R.F., Ciegler A., Fennel D. J. Environ. Biosynthetic incorporation of advanced precursors into dehydrocurvularin, a polyketide phytotoxin from *Alternaria cincinerarie*// Sci. Health B. – 1976. – 11, N 4. – P. 289–298.
20. Yao Y., Hausding M., Erkel G., Anke T., Fürstermann U., Kleinert H. Sporogen, S14-95, and S-curvularin, three inhibitors of human inducible nitric-oxide synthase expression isolated from fungi// Mol. Pharmacol. – 2003, – N 63, – P. 383–391.
21. Zähler H. What are secondary metabolites?// Folia microbiol. – 1979. – 24, N 5. – P. 435–443.

Отримано 17.05.2011