

УДК 579.64

**А.Г. Чинчлей¹, С.А. Толочкина¹, И.О. Растимешина¹,
И.П. Драгалин²**

¹ Институт микробиологии и биотехнологии АНМ, ул. Академическая, 1, MD-2028 Кишинев, Молдова; тел.: +373 22 725055; angela_cincilei@yahoo.fr

² Институт химии АНМ, Академическая, 1, Кишинев, Молдова.

НОВЫЕ ПРОДУКТЫ МИКРОБНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СКЛАРЕОЛА: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА, ОЦЕНКА

*Впервые из почв Центральной зоны Молдовы были отобраны активные штаммы микроскопических грибов, способные к трансформации молекулы склареола по окислительно-восстановительному пути. Была детально исследована скорость разложения и продукты микробной трансформации лабданового дитерпеноида склареола, подобраны среда и оптимальные условия для накопления ценных метаболитов склареола грибами родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Полученные новые продукты биотрансформации склареола активны против ряда фитопатогенов.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: биотрансформация, дитерпеноид склареол, микромицеты, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*

Склареол (лабдановый дитерпеноид) является природным компонентом эфирного масла *Salvia sclarea L. (Labiatae)*. Это главный компонент конкрета шалфея. Его получают также из отходов эфиромасличного производства. На основе склареола производят ароматизаторы для пищевой и табачной промышленности, а также вещества для фармацевтики [1]. Склареол известен как ингибитор роста растений, регулятор роста грибов и антибактериальный агент [1, 2].

Многообразие сфер применения производных склареола и растущие потребности производства ставят задачу разработки более эффективных способов и методов их получения. Наряду с химическими методами, для модификации молекулы склареола используют энзимные системы микроорганизмов, которые действуют как биокатализаторы при проведении высокоселективной стереотрансформации склареола в соединения, труднодоступные для химического синтеза, и которые могут использоваться как основа синтеза в химии природных соединений. Метод микробной трансформации может применяться для направленного получения новых производных склареола [3].

© А.Г. Чинчлей, С.А. Толочкина, И.О. Растимешина, И.П. Драгалин



Материалы и методы

Отбор активных культур проводили из лабораторной коллекции микроорганизмов-деструкторов различных ароматических и гетероциклических соединений, выделенных из почв Центральной зоны Молдовы. Скрининг и микробную трансформацию веществ осуществляли на жидкой безуглеродной минеральной среде Е-8 [4] при 28 °С на термостатируемой качалке (180 об/мин). Кроме того, используя физиологически апробированные параметры содержания органического углерода, эксперименты по микробной трансформации склареола проводили на среде Е-8 в градиенте углерода (глюкозы):

глюкоза, (г/л): 1,0 2,5 5,0 7,5 10,0 12,5 15,0 17,5 20,0

углерод, (г/л): 0,41 1,03 2,07 3,10 4,41 5,17 6,21 7,24 8,28

Склареол вносили из расчета 50 мг/л. Для учета абиотических эффектов (фотодеградации и др.) и возможных артефактов, в каждом опыте ставили по два контроля: химический - «среда + склареол», и биологический - «среда + культура». Реализацию процесса биотрансформации склареола проверяли в течение 30 дней, через каждые 24 часа. Экстракцию продуктов трансформации склареола из культуральной жидкости (КЖ) проводили этилацетатом или хлороформом [1]. Для качественного определения склареола и его метаболитов использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах "Silufol UV 254" в системе растворителей этилацетат-гексан (9:1). Вещества на пластинах проявляли иодом и анисовым альдегидом в серной кислоте [5]. Более полная характеристика полученных метаболитов была дана с применением методов УФ-, ИК-, масс-спектрологии, а также ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии.

Для изучения антибиотической активности склареола использовали метод диффузии в агар [6]. На поверхности агаровой пластинки, засеянной тест-культурой, раскладывали бумажные диски с веществами согласно схеме:

1. Культуральная жидкость *Penicillium sp. 176*;
2. Склареол — «химический контроль»;
3. Метаболит А-5 — димеризованный продукт трансформации склареола.

Учет роста микроорганизмов и измерение диаметра зон лизиса проводился: для бактерий — на 1, 3, 5 сутки, для грибов — спустя 3, 5, 7 суток.

Результаты и их обсуждение

На способность к биотрансформации склареола были изучены 14 штаммов бактерий и грибов. В результате скрининга выделено три штамма микроскопических грибов, активно утилизирующих склареол в качестве единственного источника углерода. Это представители родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* [7-10]. Установлено, что отобранные микромицеты различаются как по скорости и степени разложения склареола, так и по спектру его метаболитов.

В целом процесс трансформации склареола протекает наиболее интенсивно первые 7 суток, когда степень утилизации препарата достигает 60 % от внесенного количества. Далее процесс замедляется, и в период с 22-х до 30-х суток ферментации грибы используют всего 6 % субстрата (табл. 1).

Убыль склареола в культуральной жидкости сопровождается ростом мицелия активных культур.



Таблица 1

Динамика микробной трансформации склареола

Микроорганизмы	Остаточное количество склареола, %			
	7 сут.	14 сут.	21 сут.	30 сут.
<i>Penicillium sp. 176</i>	78,9	63,5	54,5	48,9
<i>Aspergillus sp. 120</i>	78,9	58,8	45,7	39,8

Установлено, что на процесс трансформации склареола микромицетами *Penicillium sp. 176* влияют доступность и количество углерода в среде. На безуглеродной среде Е-8, где склареол служит единственным источником углерода, грибы проводят глубокое ферментативное расщепление субстрата и образуют 7 - 8 стабильных метаболитов. Это свидетельствует о высоких потенциальных возможностях ферментативных систем исследуемых микромицетов. Однако образование большого числа метаболитов существенно усложняет их разделение и очистку до индивидуальных веществ. На среде Е-8 в присутствии глюкозы как дополнительного источника углерода образуется только 3 стабильных продукта трансформации склареола.

На основании ТСХ анализов, для препаративной ферментации и наработки метаболитов были отобраны штаммы *Penicillium sp. 176* и *Aspergillus sp. 120*, которые активно трансформируют склареол с образованием 5-ти метаболитов. Были изучены и сформулированы физиологические и биохимические характеристики активных культур *Penicillium sp.176* и *Aspergillus sp.120*, с идентификацией их как штаммы *Penicillium camemberti CNM-FP-03* и *Aspergillus alliaceus CNM-FA-01* и депонированием в Национальную коллекцию непатогенных микроорганизмов как культуры микроорганизмов, способные к трансформации склареола.

Предварительные исследования химической структуры полученных соединений позволили предположить, что трансформация склареола активным штаммом *Penicillium camemberti CNM-FP-03* протекает по окислительному пути, с формированием смеси из 7 индивидуальных продуктов – гомодримановые С(16) полифункциональные соединения (-СНО; -СООН; -ОН и α , β -ненасыщенный кетон).

Наибольший интерес представляет димеризованный продукт трансформации А-5 (химическая формула $C_{20}H_{22}O_7$), выделенный нами из кислой части неполярной фракции гидроксированных метаболитов. Это аморфное соединение А-5 впервые получено и описано нами в процессах трансформации склареола микроорганизмами ($T_{пл}$ 183-185 °С, $[\alpha]_D^{25} = -1258$ (С=0,055%, MeOH, l=100 мм). Выявленная биологическая и оптическая активность нового димерного соединения может быть обусловлена его химической структурой с хиральными углеродными атомами и внутримолекулярными водородными связями, которая в растворе, благодаря кето-енольной таутомерии, проявляется и в виде фенольной формы молекулы.

Получение и очистка необходимого количества метаболитов склареола позволило нам выявить их биологическую активность по отношению к фитопатогенным тест-культурам (табл. 2).



Таблица 2

Антибиотическое действие склареола и его производных
(диаметр зон лизиса, мм)

Вариант опыта	<i>Pseudomonas syringae</i> 0010	<i>Corynebacterium michiganense</i> 13 - А	<i>Corynebacterium citri</i> 0011	<i>Erwinia carotovora</i> 8992	<i>Xanthomonas campestris</i> 8003	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 8628	<i>Aspergillus niger</i> 0012
1	10,7	10,0	10,0	0	10,0	10,0	0
2	16,5	11,0	16,7	13,2	14,7	18,2	16,7
3	13,2	13,0	13,7	13,0	15,2	13,0	0

Примечание:

1. Культуральная жидкость *Penicillium camemberti* CNM-FP-03;
2. Склареол – «химический контроль»;
3. Метаболит А-5 – димеризованный продукт трансформации склареола.

Согласно данным, представленным в таблице 2, исследуемые тест-культуры были устойчивы к действию экстракта КЖ *Penicillium camemberti* + склареол. Размер зон лизиса изучаемых фитопатогенов под действием склареола варьирует от 11,0 до 18,0 мм. Бактерии *Pseudomonas syringae* (диаметр зоны лизиса – 16,5 мм), *Corynebacterium citri* (16,7 мм), *Agrobacterium tumefaciens* (18,2 мм) могут быть охарактеризованы как чувствительные к действию склареола.

Установлено антибиотическое действие склареола на грибы *Aspergillus niger*. В зоне лизиса диаметром 16,7 мм наблюдалось уменьшение плотности газона более чем на 50 %.

Диапазон негативного действия метаболита А-5 по отношению к испытуемым тест-культурам варьирует в пределах 13,0 - 15,2 мм – «средняя чувствительность» по шкале Биргер [6]. В то же время, угнетение роста фитопатогенов под действием метаболита А-5 было самым продолжительным (более 40 суток), в отличие от варианта «чистый склареол».

Таким образом, проведенные исследования подтвердили наличие биологической активности микробных метаболитов склареола. На основании полученных результатов был получен патент на штамм *Aspergillus alliaceus* CNMN FA 01 [11]. В дальнейшем был разработан лабораторный регламент для получения соединений с антимикробной активностью в процессе глубинного культивирования микроскопического гриба *Penicillium camemberti* CNMN FP-03.

Исследования химических структур полученных веществ позволяют предположить окислительный путь метаболизма склареола микромицетами родов *Penicillium* и *Aspergillus*, возможность получения ранее не известных продуктов его трансформации. Этот механизм ведет к окислительной деградации не только боковой цепи, но и цикла А декалиновой системы лабдановой структуры, а также к полифункционализации цикла В молекулы склареола. Под действием активных культур-трансформаторов происходит димеризация как исходных соединений, так и их производных, с

образованием кислородных мостиков у димеров.

Полученные данные представляют большой интерес в экологическом плане (утилизация отходов местной эфиромасличной промышленности) и для расширения арсенала химии природных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kouzi S.A., McChesney J.D. Microbial Metabolism of the Diterpene Sclareol // *Helvetica Chimica Acta*. — 1990. — Vol. 73. — P. 2157-2164.
2. Aranda G., Lallemand J.-I., Hammoumi A., Azerad R. Microbial Hydroxylation of Sclareol by *Mucor plumbeus* // *Tetrahedron Letters*. — 1991. — Vol. 32. — Nr. 15. — P. 1783-1786.
3. J.R.Hanson. The Microbiological Transformation of Diterpenoids // *Natural Product Reports*. — 1992. — Nr. 9. — P. 139-149.
4. Ерошин В.К., Перцовская А.Ф., Скрыбин Г.К. О росте гриба *mucorales* на парафине // *Микробиология*. — 1965. — Т. 34. — Вып. 5. — С. 883-887.
5. Курхнер Ю. Тонкослойная хроматография.—М.: Мир, 1981. — С. 222-284.
6. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования*. Под ред. М.О. Биргера.— М.: Медицина, 1982. — 464 с.
7. Raper K.B., Thom Ch. A manual of the Penicillia. Baltimore: Williams, Wilkins & Co, USA, 1949. — 817 p.
8. Raper K.B., Fennell D.I. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams, Wilkins & Co, USA, 1965. — 686 p.
9. Пугоничко Н.М. Пенициллин: Ключи для определения видов.—Киев: Наук. думка, 1972. — 150 с.
10. Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы: Определитель.—К.: Наук. думка, 1988. — 204 с.
11. Cincilei A., Dvornikova T., Tolocikina S. Tulpina de fungii *Aspergillus alliaceus* CNMN FA 01 — destructoare a xenobioticelor // *Brevet de Invenție MD 2364*, 2004.

А.Г. Чинчлей¹, С.А. Толочкина¹, И.О. Растимешина¹, И.П. Драгалін²

¹ Институт микробиологии та біотехнології АНМ, вул. Академічна, 1, MD-2028 Кишинів, Молдова; тел.: +373 22 725055; angela_cincilei@yahoo.fr

² Институт химии АНМ, вул. Академічна, 1, Кишинів, Молдова.

НОВІ ПРОДУКТИ МІКРОБНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ СКЛАРЕОЛУ: ОТРИМАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ, ОЦІНКА

Реферат

Вперше, серед місцевих мікроскопічних грибів, були відібрані активні штами, здатні до трансформації молекули склареолу на рівні периферичних окиснювально-відновних реакцій. Була детально досліджена швидкість розкладання та продукти мікробної трансформації склареолу, здійснено добір середовищ та оптимальних умов



для акумуляції цінних метаболітів склареолу активними штамми грибів родів *Aspergillus* та *Penicillium*. Отримані нові продукти біотрансформації склареолу, активні щодо деяких фітопатогенів. Штами *Penicillium camemberti* CNM-FP-03 і *Aspergillus allicaceus* CNM-FA-01 були ідентифіковані та депоновані в Національну колекцію непатогенних мікроорганізмів як культури мікроорганізмів, що здатні до трансформації склареолу.

К л ю ч о в і с л о в а: біотрансформація, лабдановий дитерпеноїд, склареол, мікроміцети, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*

A.G. Chinchlei¹, S.A. Tolochkina¹, I.O. Rastimeshina¹, I.P. Dragalin²

¹ Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM, Academicheskaya str., 1, Chisinau, Moldova;

² Institute of Chemistry of ASM, Chisinau, Moldova
Academicheskaya str., 1, MD-2028 Chisinau, Moldova, angela_cincilei@yahoo.fr

NEW PRODUCTS OF MICROBIOLOGICAL TRANSFORMATION OF SCLAREOL: CHARACTERISTICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Summary

For the first time, the active strains of local micro fungus were selected, responsible for the transformation of sclareol molecule at the peripheral level of oxidation-reduction reactions have been selected. The speed of biodegradation of sclareol and the optimal conditions for preparative gathering of the precious metabolites of sclareol by the active fungus of gg.*Aspergillus* and *Penicillium* have been thoroughly investigated. There were obtained new products of the sclareol biotransformation, with activity against some phytopathogens. The physiological and biochemical characteristics of active strains of *Penicillium sp.176*, *Aspergillus sp. 120* were formulated, with their further identification; the strains *Penicillium camemberti* CNM-FP-03 and *Aspergillus alliaceus* CNM-FA-01 were identified and deposited in the NCNM as the strains of microorganisms capable to the transformation of sclareol.

К e y w o r d s: biotransformation, diterpenoid sclareol, micromycetes, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*

