

УДК 582.282.123.2:547

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРИБОВ РОДА *Penicillium* – ПРОДУЦЕНТОВ ЭРГОАЛКАЛОИДОВ И ХИНОЦИТРИНИНОВ

© 2011 г. А. Г. Козловский, В. П. Желифонова, Т. В. Антипова, Н. Ф. Зеленкова

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, 142290

e-mail: Kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 05.07.2010 г.

Четыре культуры грибов рода *Penicillium*, относящихся к различным видам подрода *Furcatum* Pitt: *P. citrinum* Thom 1910, *P. corylophilum* Dierckx 1901, *P. fellutanum* Biourge 1923 и *P. waksmanii* Zaleski 1927, продуцировали эргоалкалоиды агроклавин-1, эпоксиагроклавин-1, их N–N-димеры – димер эпоксиагроклавина-1 и смешанный димер эпоксиагроклавина-1 и агроклавина-1, а также хинолиновые метаболиты – хиноцитринины А и Б. Изучена физиолого-биохимическая характеристика продуцентов. Определены оптимальные условия биосинтеза компонентов метаболома. Добавка цинка в среду стимулировала биосинтез эргоалкалоидов во всех случаях, продукция же хиноцитрининов возрастала только у *P. citrinum*, а у *P. corylophilum*, *P. fellutanum* и *P. waksmanii* подавлялась. Это свидетельствует о том, что гены путей биосинтеза этих метаболитов находятся у продуцентов в разных кластерах.

Грибы рода *Penicillium* представляют интерес как источник метаболического разнообразия из-за их хорошо известной способности к синтезу вторичных метаболитов разнообразной структуры, обладающих широким спектром биологической активности, в том числе алкалоидов, антибиотиков, микотоксинов, иммуномодуляторов, иммунодепрессантов. С древних времен широко используются в медицине представители уникального класса соединений, называемого эргоалкалоидами, традиционным продуцентом которого является спорынья – гриб-паразит *Claviceps purpurea* [1]. К паразитирующим на травах относятся также многочисленные продуценты эргоалкалоидов, относящиеся к семейству Clavicipitaceae. К настоящему времени накоплен большой объем экспериментальных данных по продукции эргоалкалоидов пенициллами в сапрофитных условиях, в том числе на средах определенного состава [2]. Среди этих метаболитов эргоалкалоиды – эпоксиагроклавин-1 и агроклавин-1 (ЭА), биосинтез которых был установлен ранее в процессе скрининга продуцентов эргоалкалоидов у *P. corylophilum* ВКМ F-2156 (Д) и *P. fellutanum* ВКМ F-1073 (= *P. sizovae*) [3, 4]. Недавно эти соединения были обнаружены у *P. citrinum* ВКМ FW-800 и *P. waksmanii* ВКМ FW-2875, выделенных из мерзлых древних отложений [5, 6]. Штамм *P. fellutanum* продуцировал также N–N-димеры эргоалкалоидов – димер эпоксиагроклавина-1 (ДЭД) и смешанный димер эпоксиагроклавина-1 и агроклавина-1 (ДЭА) [7, 8]. У штаммов *P. citrinum* и *P. waksmanii* была также обнаружена способность синтезировать хинолиновые алкалоиды хиноцитринины А и Б (ХЦ) [9].

Цель работы – изучение компоненты метаболома грибов *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. fellutanum* и

P. waksmanii, идентифицировать биологически активные вещества алкалоидной природы, а также исследовать физиолого-биохимические характеристики их роста и развития в связи с биосинтезом вторичных метаболитов.

МЕТОДИКА

Использовали культуры из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ИБФМ РАН – *P. citrinum* Thom 1910 ВКМ FW-800, *P. corylophilum* Dierckx 1901 ВКМ F-2156 (Д), *P. fellutanum* Biourge 1923 ВКМ F-1073 (= *P. sizovae*) и *P. waksmanii* Zaleski 1927 ВКМ FW-2875. Грибы культивировали глубинным способом на контрольной среде следующего состава (г/л): маннит – 50.0, янтарная кислота – 5.4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.3, KH_2PO_4 – 1.0, pH доводили до 5.4 конц. раствором NH_4OH . Цинк вносили в контрольную среду в виде соли $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в концентрации 4.4 мг/л. Грибы выращивали в 150 мл среды в колбах объемом 750 мл при $24 \pm 1^\circ C$ на качалке (200–220 об/мин). Засев среды осуществляли водной суспензией конидий ($1-2 \times 10^7$ спор/мл) 14-суточных культур, выращенных на скошенном суслоагаре. Рост культур оценивали по сухой массе мицелия ежедневно.

Извлечение метаболитов из фильтрата культуральной жидкости, их выделение, очистку и идентификацию проводили по методикам, разработанным ранее [10]. Анализ экстрактов осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках силикагеля (Silica gel 60 F254, “Merck”, Германия) в системах: хлороформ–метанол–25%-ный NH_4OH 90 : 10 : 0.1 (I) и 80 : 20 : 0.2 (II). ЭА обнаружи-

вали по поглощению в УФ-свете и после опрыскивания пластин реактивом Эрлиха. Для детекции N-N-димеров эргоалкалоидов использовали их свечение в УФ-свете при 366 нм и окрашивание после обработки реактивом Драгендорфа. Этот реактив применяли также для визуализации ХЦ. Количественный анализ суммарной смеси эргоалкалоидов (СЭА) и ХЦ проводили по методике [10]. Для количественного определения димеров использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого давления (ВЭЖХ). Работу выполняли на хроматографе с УФ-детектором переменной длины волны и системой обсчета хроматограмм фирмы "LKB-Prilbori A" (Швеция). Рабочая длина волны 280 нм, расход подвижной фазы 0.9 мл/мин, объем пробы 20 мкл. Подвижная фаза состояла из метанола, воды и 25%-ного водного раствора аммиака в соотношении 78 : 22 : 0.0036 (об. %), температура анализа 30°C. Разделение выполняли на колонке, заполненной обращенно-фазовым сорбентом Nova-Pak C 18, 150 × 3.9 мм, ("Waters", США). Общая продолжительность анализа составляла 20 мин. Времена удерживания ДЭЭ и ДЭА составляли 6.20 и 16.04 мин соответственно. Идентификацию соединений проводили, сопоставляя параметры удерживания стандартов и анализируемых соединений. Количественное определение выполняли методом абсолютной градуировки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация метаболитов. В "кислых" экстрактах культуральной жидкости *P. corylophilum* и *P. fellutanum* методом ТСХ на пластинах силикагеля были обнаружены два метаболита с R_f 0.14 и 0.12 (I); 0.67 и 0.62 (II), дающие ярко оранжевую окраску с реактивом Драгендорфа (азотсодержащие соединения), но реактив Эрлиха — реagent на индольные соединения, давал отрицательный результат. Оба метаболита имели одинаковую хроматографическую подвижность в системах растворителей (I) и (II) со стандартными образцами хинолиновых алкалоидов — ХЦ А и Б соответственно. УФ-спектры образцов метаболитов были идентичны и совпадали со спектрами ХЦ ($\lambda_{\text{макс}}$, метанол: 216, 248, 256, 300, 314, 328 нм) [9]. На основании этих данных нами был сделан вывод о том, что соединения, выделенные из "кислых" экстрактов *P. corylophilum* и *P. fellutanum* являются хинолиновыми алкалоидами — ХЦ А и Б.

На хроматограммах "щелочных" экстрактов культуральной жидкости штаммов *P. citrinum*, *P. corylophilum* и *P. waksmanii* помимо основных метаболитов ЭА было обнаружено вещество с R_f 0.35 (I) и 0.75 (II), дающее положительную реакцию с реактивом Драгендорфа, но не окрашиваемые с реактивом Эрлиха. У штаммов *P. citrinum*, *P. corylophilum* был также обнаружен второй метаболит с аналогичными характеристиками, но отличающийся по хроматографической подвижности с R_f 0.30 (I) и 0.74 (II). Выделенные соединения флуоресцировали под УФ-све-

том при 366 нм. УФ-спектры метаболитов были практически идентичны и содержали полосы поглощения, соответствующие замещенному индольному хромофору при 271, 284 и 292 нм, причем максимально интенсивное поглощение наблюдалось при 271 нм, что характерно для N-N-димеров эргоалкалоидов, таких, как ДЭЭ и смешанный ДЭА [7, 8]. Данные ВЭЖХ по хроматографической подвижности и параметрам удерживания исследованных метаболитов и стандартных образцов ДЭЭ и ДЭА также свидетельствовали об их идентичности. Времена удерживания для первого метаболита и для ДЭЭ равны 6.20 мин. Форма размывания пика второго метаболита и время удерживания (16.04 мин) совпали с соответствующими характеристиками для стандартного образца ДЭА. На основании приведенных выше данных, в том числе и по отсутствию реакции с реактивом Эрлиха, специфической для N-N-димеров эргоалкалоидов, можно сделать вывод, что выделенные метаболиты представляют собой соответствующие N-N-димеры эргоалкалоидов — ДЭЭ и ДЭА, ранее обнаруженные у *P. fellutanum* ВКМ F-1073 [7, 8].

Физиолого-биохимические характеристики продуцентов. Культуры, синтезирующие эргоалкалоиды и ХЦ, были выделены в разных географических регионах из почвенных образцов различного геологического возраста. Представителями современной микробиоты являются *P. corylophilum* и *P. fellutanum* [3, 4], а древней, датируемой 100–200 тыс. лет и 1.8–3 млн. лет, *P. waksmanii* и *P. citrinum* соответственно [5, 6]. Логично предположить, что функционирование путей биосинтеза этих вторичных метаболитов обеспечило выживание культур в условиях изменения местообитаний под влиянием внешних факторов в течение значительного времени даже в масштабах эволюции. Гены или кластеры генов путей биосинтеза не перешли в разряд "спящих" или "молчащих", а экспрессируются в довольно широком интервале условий культивирования [11]. Это фактически означает, что ферменты, осуществляющие реакции биосинтеза этих компонентов метаболома, являются конститутивными.

Изученные культуры-продуценты отличались по интенсивности продукции алкалоидов. Наибольшие показатели биосинтеза СЭА и ХЦ в контрольной среде наблюдались у *P. waksmanii*, а у других были значительно ниже (табл. 1). Низкое накопление биомассы (4–8 г/л) и раннее конидиообразование при росте культур на контрольной среде, содержащей большое количество источников углерода, азота и макроэлементов, свидетельствует о недостатке в среде других компонентов, например микроэлементов. Ранее было показано, что только внесение в среду культивирования цинка приводило к стимулированию биосинтеза алкалоидов *P. citrinum* [9]. Внесение этого микроэлемента в среду культивирования для других продуцентов приводило к усилению ростовых процессов и биосинтеза эргоалкалоидов этими культурами (табл. 1). При этом у исследу-

Таблица 1. Влияние ионов цинка на максимальные показатели роста и биосинтеза алкалоидов изученными продуцентами

Продуцент	Наличие цинка	Биомасса, г/л	СЭА, мг/л	$Y_{\text{СЭА/Х}}$, мг/г	ХЦ, мг/л	$Y_{\text{ХЦ/Х}}$, мг/г
<i>P. corylophilum</i>	Контроль (без Zn^{2+})	8.2	9	1.1	1.0	0.12
	Опыт (Zn^{2+})	18.4	54	2.9	1.0	0.05
<i>P. citrinum</i>	Контроль	4.1	4	1.0	2.4	0.59
	Опыт	10.4	140	6.7	7.8	0.75
<i>P. fellutanum</i>	Контроль	7.0	9	1.3	1.0	0.14
	Опыт	15.7	93	5.9	0.9	0.06
<i>P. waksmanii</i>	Контроль	7.1	27	3.8	9.6	1.35
	Опыт	15.9	52	3.3	5.6	0.35

емых штаммов прирост биомассы был практически одинаков, а продукция СЭА различалась. Увеличение их синтеза происходило за счет более активного биосинтеза этих алкалоидов мицелием грибов, поскольку выходы СЭА в расчете на единицу биомассы ($Y_{\text{СЭА/Х}}$) по сравнению с контрольной средой выросли в 2–13 раза. Возможно, как в случае других индолсодержащих алкалоидов, стимулирующий эффект ионов цинка на биосинтез эргоалкалоидов связан с активированием триптофансинтетазы [12].

У разных продуцентов влияние добавок цинка на биосинтез ХЦ продуцентами существенно различалось. Внесение цинка в среду культивирования *P. citrinum* приводило к увеличению накопления ХЦ в 3.3 раза, в основном, за счет усиления ростовых процессов, так как выход ХЦ в расчете на единицу биомассы ($Y_{\text{ХЦ/Х}}$) по сравнению с контрольной средой оставался примерно на том же уровне. У *P. waksmanii* наблюдалось снижение продукции ХЦ в 1.7 раза по сравнению с контрольной средой, а у *P. corylophilum* и *P. fellutanum* ионы цинка не оказали влияния на биосинтез этих алкалоидов (табл. 1). Дальнейшие сравнительные исследования культур продуцентов проводили на среде с добавками цинка.

Динамика роста культур (рисунок) характеризовалась диауксией, что обусловлено наличием в среде двух источников углерода. У *P. citrinum* и *P. waksmanii* на протяжении культивирования наблюдался мицелиальный рост без дифференцировки, а у *P. corylophilum* и *P. fellutanum* конидиообразование начиналось с 4 сут культивирования.

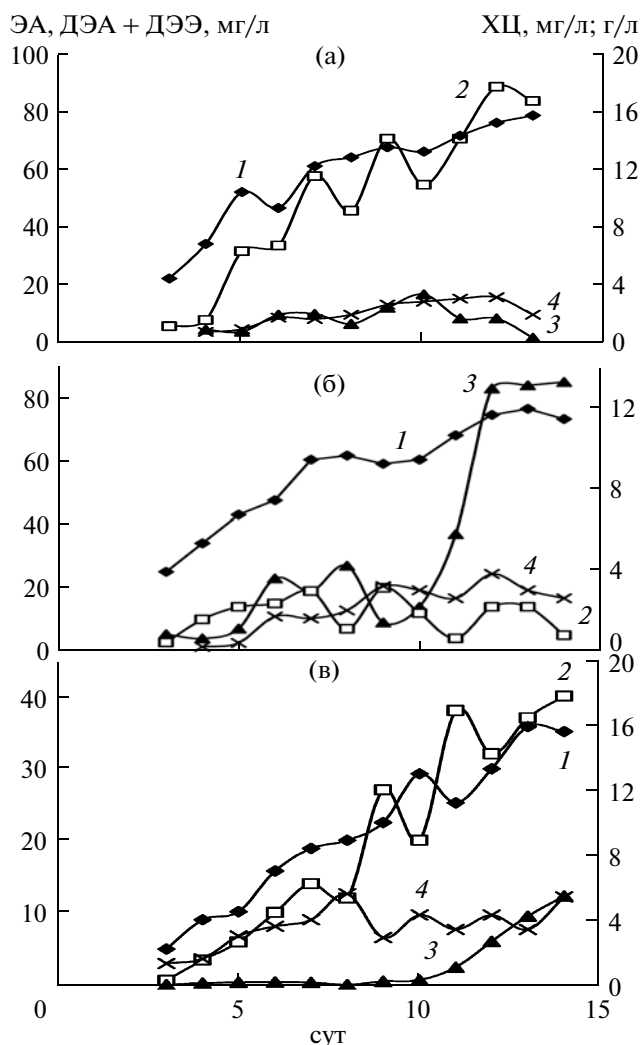
Процесс биосинтеза алкалоидов у изученных культур проходил параллельно росту и имел циклический характер. Наблюдалось падение концентрации ЭА, их димеров и ХЦ и снижение удельной скорости их накопления в культуральной жидкости.

Причем у *P. citrinum* [10] и *P. waksmanii* падение концентрации алкалоидов происходило во вторую лаг-фазу и в начале стационарной фазы роста (10–11 сут), а у *P. corylophilum* и *P. fellutanum* снижение концентрации алкалоидов не так четко соотносилось с ростовыми фазами продуцентов, но происходило также в начале стационарной фазы (8–9 сут). У всех продуцентов максимальная концентрация алкалоидов наблюдалась в стационарной фазе.

К индивидуальным особенностям метаболизма продуцентов можно отнести также и состав эргоалкалоидов. Изучение этого состава у продуцентов показало различия как в соотношении ЭА и их димеров, так и в составе димеров (табл. 2). У *P. citrinum*, *P. corylophilum* и *P. waksmanii* ЭА преобладали и составляли 100, 86 и 77% от общего количества эргоалкалоидов соответственно, а у *P. fellutanum* 86% занимал ДЭЭ. Состав димеров также зависел от продуцента: *P. citrinum*, *P. corylophilum* и *P. fellutanum* синтезировали ДЭЭ и ДЭА, а *P. waksmanii* только ДЭЭ. Причем у *P. corylophilum* в смеси продуцируемых димеров преобладал ДЭА и его содержание составило 62% от их суммарного количества.

Таблица 2. Состав и максимальное содержание (мг/л) эргоалкалоидов у изученных продуцентов

Продуцент	СЭА	ЭА	ДЭЭ	ДЭА
<i>P. corylophilum</i>	88	71	6.5	10.50
<i>P. citrinum</i>	140	140	0.3	0.05
<i>P. fellutanum</i>	98	14	84.0	0.05
<i>P. waksmanii</i>	52	40	12.0	не обнаружен



Динамика роста и биосинтеза алкалоидов при глубинном культивировании *P. corylophilum* (а), *P. fellutanum* (б) *P. waksmanii* (в): 1 – биомасса, г/л; 2 – ЭА, мг/л; 3 – ДЭА + ДЭЭ, мг/л; 4 – ХЦ, мг/л.

Таким образом, нами проведено сравнительное изучение четырех культур–продуцентов вторичных метаболитов, синтезирующих одновременно ЭА (эпоксиагроклавин-1 и агроклавин-1), их N-N-димеры, а также хинолиновые алкалоиды (хиноцитринин А и хиноцитринин Б) – *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, *P. citrinum* и *P. waksmanii*. Метаболическая взаимосвязь путей биосинтеза клавиновых и хинолиновых алкалоидов следует из того, что обе ветви биосинтеза соединений эрголиновой и хинолиновой природы биогенетически связаны шикиматным путем образования их предшественников – триптофана и антраниловой кислоты. Необходимо отметить, что механизмы регуляции синтеза этих аминокислот и их взаимопревращений хорошо известны. Ранее на примере культуры *P. citrinum* нами было однозначно показано, что процессы биосинтеза и экскреции, а

также поглощения как ЭА, так и ХЦ клетками продуцента отражают способы регуляции баланса внутриклеточного триптофана [13].

В последние годы было показано, что гены вторичного метаболизма у грибов находятся в виде кластеров, контролируя синтез ферментов, осуществляющих реакции определенных стадий биосинтеза компонентов метаболома. Это было доказано на культурах, синтезирующих разнообразные по структуре вторичные метаболиты, такие, как антибиотики (пенициллин) [14], алкалоиды (эргоалкалоиды) [15] и микотоксины (паксиллин) [16]. Резонно предположить, что у исследованных нами культур также имеются кластеры генов синтеза эргоалкалоидов – ЭАС-кластер, отвечающий за синтез эргоалкалоидов и ХА – кластер, контролирующий путь синтеза хинолиновых алкалоидов. Имеющиеся немногочисленные данные показывают, что регуляция экспрессии генов метаболических путей находится под влиянием локализации генов в генных кластерах, например пенициллина [14]. Аналогично можно объяснить имеющиеся различия в физиолого-биохимических особенностях изученных штаммов специфичностью организации генов в виде кластеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tudzynski P., Correia T., Keller U.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. № 5–6. P. 593–605.
2. *Kozlovsky A.G.* // Medicinal and Aromatic Plant – Industrial Profiles. Ergot, the Genus *Claviceps* / Eds. V. Kren, L. Cvak. Chur. Harwood Acad., 1999. P. 479–499.
3. *Козловский А.Г., Соловьева Т.Ф., Сахаровский И.Г., Аданин М.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. № 4. С. 535–541.
4. *Козловский А.Г., Веприцкая И.Ю., Гаязова Н.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1986. Т. 12. № 2. С. 205–209.
5. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Аданин В.М., Антипова Т.В., Озерская С.М., Кочкина Г.А., Грефе У.* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 816–821.
6. *Антипова Т.Е., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Козловский А.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 318–323.
7. *Зеленкова Н.Ф., Веприцкая И.Г., Аданин В.М., Сахаровский В.Г., Нефедова М.Ю., Козловский А.Г.* // Докл. АН СССР. 1990. Т. 313. № 6. С. 1494–1496.
8. *Козловский А.Г., Зеленкова Н.Ф., Аданин В.М., Сахаровский В.Г., Аринбасаров М.У.* // Прикл. биохим. и микробиология. 1995. Т. 31. № 5. С. 540–544.
9. *Kozlovsky A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Adanin V.M., Ozerskaya S.M., Kochkina G.A., Schlegel B., Dajhse H.M., Gollmick F.A., Grafe U.* // J. Antibiotics. 2003. V. 56. № 5. P. 488–491.

10. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 568–572.
11. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Зеленкова Н.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 5. С. 572–576.
12. Ловкова М.Я., Бузук Г.Н., Пономарева С.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т. 31. № 1. С. 80–86.
13. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Лысанская В.Я. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 3. С. 334–341.
14. Brakhage A.A., Broun P., Turner G. // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 242. № 1. P. 57–64.
15. Lorenz N., Wilson E.V., Machado G., Shardl C.L., Tudzynski P. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 22. P. 7185–7191.
16. Young C., McMillan L., Telfer E., Scott B. // Mol. Microbiol. 2001. V. 39. № 3. P. 754–764.

Physiological and Biochemical Characteristics of Fungi of the Genus *Penicillium* as Producers of Ergot Alkaloids and Quinocitrinins

A. G. Kozlovskii, V. P. Zhelifonova, T. V. Antipova, and N. F. Zelenkova

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia
e-mail: kozlovski@ipbm.pushchino.ru

Received July 5, 2010

Abstract—Four cultures of fungi of the genus *Penicillium* belonging to *Furcatum* Pitt subgenus, such as *P. citrinum* Thom, 1910; *P. corylophilum* Dierckx, 1901; *P. fellutanum* Biourge, 1923; and *P. waksmanii* Zaleski, 1927, produced the ergot alkaloids, namely, agroclavine-I, and epoxyagroclavine-I; their N–N-dimers, such as dimer of epoxyagroclavine-I and the mixed dimer of epoxyagroclavine-I and agroclavine-I; and also quinoline metabolites, namely, quinocitrinin A and quinocitrinin B. Physiological and biochemical characteristics of the producers were studied. Optimal conditions for the biosynthesis of metabolome components were determined. Zinc additive to the medium stimulated the biosynthesis of the ergot alkaloids in all cases; citrinin production was increased only in *P. citrinum*, and that was suppressed in *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, and *P. waksmanii*. This testifies that genes of the biosynthesis pathways are located in the different clusters of the producers.