

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА С ПОМОЩЬЮ *GLOMERELLA FUSARIOIDES*

Ихсанов Ербол Сагинович

студент PhD, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы

Султанова Нургуль Адайбаевна

д-р. хим. наук, доцент, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы

Абилов Жарылкасын Абдурахитович

д-р. хим. наук, профессор, факультет химии и химической технологии, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы

Мухаммед Ихбал Чоудхари

д-р. хим. наук, профессор, Международный центр химических и биологических наук, Университет Карачи, Пакистан, г. Карачи

Biotransformation of plant extract with *Glomerella fusarioides*

Yerbol Ikhsanov

PhD student, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Iqbal Mohammed

Doctor of Science, Professor, Director of International Center for Chemical and Biological Sciences, Karachi University, Pakistan, Karachi

Nurgul Sultanova

Doctor of Science, Assistant Professor Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Zharylkasyn Abilov

Doctor of Science, Professor of department of organic chemistry natural compounds chemistry and polymers Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Аннотация. В статье рассматривается химический

состав 50 % спиртового экстракта из надземной части растения *Tamarix hispida* Wild семейства *Tamaricaceae* модифицированного с помощью грибов вида *Glomerella fusarioides* (ATCC 9552) и изученных методов высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектором. В результате отмечено значительное изменение химического состава экстракта, в частности обнаружено несколько азотосодержащих соединений, ранее не обнаруженных в семействе *Tamaricaceae*.

Abstract. The chemical composition of a 50 % alcohol extract from the aerial part of the *Tamarix hispida* Wild plant of the family *Tamaricaceae* modified with fungi of the species *Glomerella fusarioides* (ATCC 9552) and the methods of HPLC-MS. As a result, a significant change in the chemical composition of the extract was noted, in particular, several nitrogen-containing compounds, previously not found in the *Tamaricaceae* family, were detected.

Ключевые слова: *Tamarix hispida* Wild; *Glomerella fusarioides*; биокатализ.

Keywords: *Tamarix hispida* Wild; *Glomerella fusarioides*; Biocatalysis.

Введение. В природе существует множество мест способных быть источником новых, перспективных видов микроорганизмов способных вырабатывать ферменты для биокатализа [1, с. 918].

Грибы традиционно были одной из наиболее изученных систем для выделения микробных метаболитов, а также для реакций биотрансформации. Выделение грибов из окружающей среды вызвало интерес исследователей, поскольку было установлено, что только очень немногие существующие виды грибов изучены в полной мере [2, с. 12027].

Воздействие грибов на объект происходит путем естественного заражения и дальнейшего развития колоний грибов в окружающей среде, обеспечивающей благоприятные условия (наличие питательной среды, температурный режим и влажность) [3, с. 604].

Под воздействием веществ, выделяемых колониями микроорганизмов возможно протекание множества химических процессов, наибольший интерес из которых представляют реакции гидроксирования, окисления, восстановления, сульфоксидирования, эпоксидирования, окисление линейных и циклических кетонов Байера-Виллигера, микробное стереоселективное биовосстановление или энантиоселективный гидролиз [4, с. 41].

В нашей статье мы рассматриваем применение метода биотрансформации к экстракту, полученному из надземной части растения *Tamarix hispida* с целью повышения его биологической активности.

Растение *Tamarix hispida* Willd. характеризуется разнообразием состава природных биологически активных веществ, обладающих широким спектром биологического действия в

том числе антимикробной, противогрибковой активностью, есть информация о применении экстрактов тамарикса при таких заболеваниях, как сифилис и бесплодие, растение используется в традиционной медицине как вяжущее, мочегонное средство [5, с. 278; 6, с. 1928]. Кроме того, в нескольких исследованиях доказана антиоксидантная и антимикробная активность некоторых видов *Tamarix*.

В качестве модифицирующего грибка нами выбран грибок вида *Glomerella fusarioides* (ATCC 9552) промотирующий преимущественно реакции окисления, алкилирования и замещения [7, с. 616].

Методика. На начальном этапе нами был получен 50 % этанольный экстракт из надземной части растения *Tamarix hispida* Willd по следующей методике: 500 г надземной части растения вида *Tamarix hispida* залили 10 л растворителя и проводили экстракцию при комнатной температуре в течении 72 часов, полученное извлечение затем сконцентрировали на ротационном испарителе и высушили до полного удаления растворителя при температуре, не превышающей 40 °С.

Параллельно нами была подготовлена реакционная среда, содержащая в себе достаточно развитую колонию грибов *Glomerella fusarioides*. Для чего в заранее приготовленную питательную среду были инокулированы споры *Glomerella fusarioides* и оставлены на качалке при температуре 25 °С на 72 часа. Затем, в колбы с колонией грибов и питательной средой вносится растворённый в стерильной воде экстракт *Tamarix hispida*, после чего колба ставится на качалку.

С целью определения влияния срока выдержки на химический состав нами было подготовлено две пробы оставленные на 7 и 14 суток.

Далее растворы были отделены от грибов методом фильтрования, после чего фильтрат был проэкстрагирован бутанолом в делительной воронке. Полученные водная и бутанольная фракции были высушены методом лиофилизации.

Полученный экстракт исследовали методом высокоэффективным жидкостным хроматографе с масс-селективным детектором Aligent Technologies 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS при следующих условиях: использовали колонку Poroshell 120 EC-C18 (длинна – 50 мм, диаметр 3 мм, размер частиц сорбента 4,0; 2,7 и 1,9 мкм), с 10 % водным раствором метанола в качестве исходного растворителя и 90 % метанолом в качестве конечного растворителя при давлении 11,5 мПа и температуре 40 °С. Компоненты идентифицировали по масс-спектрам и временам удерживания, с использованием библиотеки NIST и Wiley LC/MS.

Также было проведено определение противораковой активности экстрактов по следующей методике. Модифицированные клеточные линии MCF-7 после слияния клетки собирали и плакировали в 96-луночных планшетах с обработанной культурой ткани (плотность посева 8000 клеток / лунка для MCF-7 в среде с 100 мкл). На следующем этапе в лунки добавляется испытуемое вещество при концентрации 50 мкМ и проводится инкубирование в течение 48 часов. Для натуральных экстрактов концентрация составляла 50 мкг / мл.

После 48 часов инкубации соединения удаляли и в каждую лунку добавляли 200 мкл МТТ при 0,5 мг / мл и инкубировали при 37 ° С в течение 3 часов.

Кристаллы формазана, образованные путем восстановления МТТ, растворяли в 100 мкл ДМСО и поглощение брали при 570 нм с использованием микропластинчатого считывателя (Spectra Max plus, Molecular Devices, CA, USA) [8, с. 4827].

Результаты и обсуждение. В результате нами был получен химический состав 4 образцов, из них – 2 водные фракции 7 и 14 суток выдержки, и 2 аналогичные бутанольные фракции.

В первом образце, бутанольной фракций семидневной выдержки нами было идентифицировано 5 соединений, доминирующими из которых являются гамабуфоталин и уксусной кислоты, 1,1', 4'-триацетокси-5,5'-диизопропил-6,7,6', 7'-тетраметокси-3,3'-диметил-[2,2'] бинафталин-4-ил эфир (Таблица 1).

Таблица 1.**Химический состав бутанольной фракций экстракта *Tamarix hispida* после 7 суток**

Название соединения	Формула	Время удержания	Содержание %
Гамабуфоталин	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	0,31	52,02
Уксусной кислоты, 1,1 ', 4'-триацетокси-5,5'-диизопропил-6,7,6', 7'-тетраметокси-3,3'-диметил- [2,2 '] бинафталин-4-ил эфир	C ₄₀ H ₄₆ O ₁₂	5,75	45,36
Грис (п-нитрофенил) фосфат	C ₁₈ H ₁₂ N ₃ O ₁₀ P	6,53	0,55
5 β; -Чолан-24-ова кислота, 4-(23-карбокси-7,12-диоксо-24-нор-5 β; -хлор-3-ен-3-ил) -3,7,12-триоксо-, диметиловый эфир	C ₅₀ H ₇₀ O ₉	7	0,43
α-Пиридон, 5-метил-1,3,4,6-тетрафенил	C ₃₀ H ₂₃ NO	7,7	1,65

Образец с 14 дневной выдержкой имеет в целом аналогичный химический состав, также доминирующим соединениями являются гамабуфоталин и уксусной кислоты, 1,1 ', 4'-триацетокси-5,5'-диизопропил-6,7,6', 7'-тетраметокси-3,3'-диметил- [2,2 '] бинафталин-4-ил эфир также обнаружено некоторое количество Церкоспорина (Таблица 2).

Таблица 2.**Химический состав бутанольной фракции экстракта *Tamarix hispida* после 14 суток**

Название соединения	Формула	Время удержания	Содержание %
Гамабуфоталин	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	0,35	56,37
(6-оксо-1-фенил-1,6-дигидропиридазин-3-илокси) уксусная кислота, этиловый эфир	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₄	5,25	1,11
Церкоспорин	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₀	5,77	4,84
10- (метоксикарбонил) -N-ацетилкохинол	C ₂₂ H ₂₅ NO ₇	6,59	0,24
Уксусная кислота, 1,1 ', 4'-триацетокси-5,5'-диизопропил-6,7,6', 7'-тетраметокси-3,3'-диметил- [2,2 '] бинафталин-4-ил эфир	C ₄₀ H ₄₆ O ₁₂	7,06	37,44

Химический состав водных фракций, как видно из данных представленных в таблице 3, значительно отличается от бутанольного, доминированием полярных азото и серосодержащих соединений в частности (6-оксо-1-фенил-1,6-дигидропиридазин-3-илокси) уксусной кислоты, этиловым эфиром содержащимся в количестве 44,29 % однако в значительном количестве идентифицированы и менее полярные вещества такие как 5 β; -Чолан-24-ова кислота, 4-(23-карбокси-7,12-диоксо-24-нор-5 β; -хлор-3-ен-3-ил) -3,7,12-триоксо-, диметиловый эфир.

В водной фракции образца четырнадцатидневной выдержки доминирующими веществами являются 2-пропеновой кислоты, 3-фенилпропиловый эфир, 5 β; -Чолан-24-ова кислота, 4-(23-карбокси-7,12-диоксо-24-нор-5 β; -хлор-3-ен-3-ил) -3,7,12-триоксо-, диметиловый эфир, Холестан-26-овая кислота, 3,7,12-тригидрокси-, (3α, 5β, 7α, 12α) и Хиноксалин, 2,3-дифенил что в целом согласуется с

тенденцией, выявленной в семидневной водной фракций (Таблица 4).

Таблица 3.

Химический состав водной фракции экстракта *Tamarix hispida* после 7 суток

Название соединения	Формула	Время удержания	Содержание %
5 β; -Чолан-24-ова кислота, 4- (23-карбокси-7,12-диоксо-24-нор-5 β; -хлор-3-ен-3-ил) -3,7,12-триоксо-, диметиловый эфир	C50H70O9	0,23	22,9
L-треонин, N- [N- [N- [1- [N- [N- [N- (3-гидрокси-1-оксоикозил) -L-треонил] -L-валил] -L-аланил] -L -пропил] -L- лейцил] -L-валил] -, & beta; -лактон	C52H93N7O11	0,37	15,38
3-Форбинопропаноловая кислоты, 9-ацетил-14-этил-13,14-дигидро-21- (метоксикарбонил) -4,8,13,18-тетраметил-20-оксо-, 3,7,11,15-тетраметил- 2-гексадецениловый эфир, [3s- [3.	C55H76N4O6	0,61	2,43
[5- (5-циано-3,4-диметил-1Н- пиррол-2-илметилен) -3,4-диметил-5Н- пиррол-2-илтио] [5- (5-циано-4,4,5 -триметил-4,5-дигидр о-3Н-пиррол-2-илметилен) -4,4-диметилпирролиден] уксусной кислоты, трет-бутиловый эфир	C35H44N6O2S	1,45	0,46
1,3,4,5,6,7-гексагидро-2Н- пириндин-2-он	C8H11NO	2,01	0,51
(6-оксо-1-фенил-1,6-дигидропиридазин- 3-илокси) уксусной кислоты, этиловый эфир	C14H14N2O4	5,31	44,29
Гедунин, 1,2-дигидро-	C28H36O7	5,73	3,33
Уксусной кислоты, 1,1 ', 4'-триацетокси-5,5'-диизопропил-6,7,6', 7'-тетраметокси-3,3'-диметил- [2,2 '] бинафталин-4-ил эфир	C40H46O12	6,63	1,42
Хиноксалин, 2,3-дифенил-	C20H14N2	6,8	3,36
D-глюкопиранозид, (3β, 22α, 25S) -22,25-эпокси-3-метоксиф уро-5-ен-26-ил 2,3,4,6-тетра-О-метил-	C38H62O9	7,18	5,92

В дальнейшем, так как в составе бутанольных экстрактов было обнаружен гамабуфоталин обладающий противоопухолевой активностью, нами было принято решение проверить образцы на этот тип активности. Полученные данные представлены в таблице 5.

Таблица 4.

Химический состав водной фракции экстракта *Tamarix hispida* после 14 суток

Название соединения	Формула	Время удержания	Содержание %
2-пропеновая кислота, 3-фенилпропиловый эфир	C12H14O2	0,22	19,51
5 β; -Чолан-24-ова кислота, 4-	C50H70O9	0,42	11,8

(23-карбоксит-7,12-диоксо-24-нор-5 β; -хлор-3-ен-3-ил) -3,7,12-триоксо-, диметиловый эфир			
Фенил-1-пропантиол	C9H12S	0,59	5,06
L-Серинамид, 1-метил-5-оксо-L-пропил- N, 1-диметил-L-гистидил-N, 1-L- триптофил-N, N, N2, O-	C34H48N8O6	1,58	0,54
1- [3- (2-диметиламиноэтил) -1H- индол-5-ил] -N- метилметансульфонамид	C14H21N3O2S	1,84	0,46
Холестан-26-овая кислота, 3,7,12-тригидрокси-, (3α, 5β, 7α, 12α)	C27H46O5	5,33	27,04
4-амино-2-метил-5,6-триметиленпирем идин	C8H11N3	5,76	4,81
4- (2-метил-1-циклогексенил) -транс-3-бутен-2-он 2,4-динитрофенилгидразон	C17H20N4O4	6,12	2,08
Спиро [9,9 '] дифторен-2,2'-диметанол, диацетат	C31H24O4	6,48	5,13
Хиноксалин, 2,3-дифенил	C20H14N2	6,8	13,31

Таблица 5.

Противоопухолевая активность

№	Образец	Процент ингибирования
1	Бутанольная фракция экстракта <i>Tamarix hispida</i> после 7 суток	30
2	Бутанольная фракция экстракта <i>Tamarix hispida</i> после 14 суток	57
3	Водная фракция экстракта <i>Tamarix hispida</i> после 7 суток	23
4	Водная фракция экстракта <i>Tamarix hispida</i> после 14 суток	22
4	Бутанольная фракция экстракта <i>Tamarix hispida</i> (без трансформации)	36
4	Водная фракция экстракта <i>Tamarix hispida</i> (без трансформации)	1

Из представленных данных мы видим, что наибольшую активность проявляет образец номер 2, то есть бутанольная фракция экстракта тамарикса после 14 суток, однако, при этом, наибольший рост активности, более чем в 20 раз, отмечен в водных фракциях.

Выводы. Нами изучен химический состав 4 образцов водных и бутанольных фракций модифицированного экстракта. Установлено, что наибольший рост активности отмечается в водных фракциях, однако в абсолютных значения выделяется бутанольная. Исходя из этого можно предположить, что в неразделённом состояний экстракт после трансформации потенциально может демонстрировать активность более 70 %, однако этот вопрос требует более подробного изучения.

Тем не менее, нами получен результат демонстрирующий значительный рост биологической активности в следствии воздействия грибов вида *Glomerella fusarioides* на 50 % этанольный экстракт из надземной части *Tamarix hispida*.

Список литературы:

1. Takashi Kikuchi, Toshihiro Akihisa, Harukuni Tokuda, Motohiko Ukiya, Kenji Watanabe, and Hoyoku Nishino- Cancer Chemopreventive Effects of Cycloartane-Type and Related Triterpenoids in in Vitro and in Vivo Models. – J. Nat. Prod. 2007, 70, 918-922.
2. Syed Adnan Ali Shah, Huey Ling Tan, Sadia Sultan, Muhammad Afifi Bin Mohd Faridz, Mohamad Azlan Bin Mohd Shah, Sharifah Nurfaizilah and Munawar Hussain- Microbial-Catalyzed Biotransformation of Multifunctional Triterpenoids Derived from Phytonutrients. – Int.J. Mol. Sci.2014, 15 12027-12060.
3. Toshihiro Akihisa, Kenji Watanabe, Risa Yoneima, Takashi Suzuki and Yumiko Kimura- Biotransformation of Cycloartane-Type Triterpenes by the Fungus *Glomerella fusarioides*. – J. Nat. Prod. 2006, 69, 604-607.
4. Obsidiana Abril, Carol C. Ryerson, Christopher Walsh, And George M. Whitesides- Enzymatic Baeyer-Villiger Type Oxidations of Ketones Catalyzed by Cyclohexanone Oxygenase- Bioorganic Chemistry 1989 17, 41-52.
5. Toshihiro Akihisa, Yoshio Takamine, Kazuo Yoshizumi, Harukuni Tokuda, Yumiko Kimura, Motohiko Ukiya, Toro Nakahara, Toshihiro Yokochi, Eiichiro Ichiishi and Hoyoku Nishino - Microbial Transformations of Two Lupane-Type Triterpenes and Anti-Tumor-Promoting Effects of the Transformation Products. – J. Nat. Prod. 2002, 65, 278-282.
6. Lin-min Feng, Shuai Ji, Xue Qiao, Zi-wei Li, Xiong-hao Lin, and Min Ye Biocatalysis of Cycloastragenol by *Syncephalastrum racemosum* and *Alternaria alternata* to Discover Anti-Aging Derivatives. – Adv. Synth. Catal. 2015, 357, 1928- 1940.
7. Nighat S. Clinically useful anticancer, antitumor and antiwrinkle agent, ursolic acid and related derivatives as medicinally important natural product. – J Enzym Inhib Med Chem 2011-26, 616-642.
8. Scudiere D.A., Shoemaker R.H., Paul K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., and Boyd M.R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Research, 48, 4827-4833.