

Произведение: Производство вещества *Isochainin* штаммом *Streptomyces Sp.* изолированных от ризосферы почвы коренных марокканских растений вида *Аргания Спиноза L*

Содержание

Актиномицетый штамм (обозначается Ap1), выделенный из ризосферы почвы *Argania Спиноза L.* сильно тормозил рост двух патогенов растений: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* и *Verticillium dahliae*. Споро-морфологи предположили, что штамм Ap1 принадлежал к роду *Streptomyces*. Противогрибковое соединение, полученное с помощью Ap1 было очищено ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и распознано как полиеновые макролиды, вещество *isochainin*, по данным ЯМР (ядерно-магнитный резонанс) и масс-спектрометрии. Ap1 показал нормальный биосинтез вещества *isochainin* по сравнению с *S. cellulosaе* АТТС 12625, в котором предшествующий биосинтез не требуется подачи этила (Z) -16-фенилгидатной-9-еновой кислоты в культуру. Кроме того, *Streptomyces Sp.* Штамм Ap1 производит вещество *isochainin* в 6,5-кратной высокой концентрации, чем *Streptomyces cellulosaе* АТТС 12625.

Введение

Поиски и применение антагонистических свойств актиномицетов для борьбы с заболеваниями растений были предметом многих исследований (Крауфорд, 1993, Юан и Крауфорд, 1995). Выявлены противогрибковые свойства актиномицетного агента против нескольких патогенов растений. Хотя, актиномицеты могут подавлять рост *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Архунарао 1971) и рост *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (1992), соответственно типичные агенты фузариозного увядания хлопка и томата.

Актиномицеты самые важные микроорганизмы, которые производят вторичные метаболиты и среди этой группы ген *Streptomyces* вырабатывает практически 75% всех известных антибиотиков (Андерсон и Уэллингтон 2001). Макролиды или макроциклические кольца лактонов являются весьма разнообразным классом разветвленного, антипатогенного соединения, изолированного от актиномицетов. Макроциклическое кольцо полиены,

полученное в основном из ацетата, пропионата и бутирата, что демонстрируется известными исследованиями с радиоактивными предшественниками. (Омура 2002) Полиеновые макролиды выборочно изменяют проницаемость дрожжей и мембрану грибов. Полиены вырабатываются *Streptomyces padanus* и демонстрируют ингибирующий эффект против *Rhizoctonia solani*, типичного агента, вызывающего выпревание капусты (2003) и подавление *Asparagus officinalis L.*, заболевания корней из-за *Fusarium oxysporum* и *Fusarium moniliformae* (Смит 1990).

Среда обитания Марокко и особенная ризосфера почвы эндемического растения *Argania spinosa* продемонстрировали богатый источник актиномицетов с противогрибковым действием против некоторых патогенных микроорганизмов (*Candida albicans*, *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* и *Verticillium dahliae*). *Argania spinosa* (аргановое дерево) растет на юго-западе Марокко на территории более чем в 320,000 кв. миль. Из фруктов арганового дерева добывают аргановое масло, которое традиционно используется, как в косметических, так и в медицинских целях (при ревматизме, гиперхолестеринемии, атеросклерозе) (1999).

Наша программа скрининга для актиномицетов с противогрибковым действием, которые вырабатываются ризосферой почвы *Argania spinosa L.* приводит к естественному веществу *isochainin*, вырабатываемому организмом *Streptomyces* (изолят Ap1), который демонстрирует в пробирке противогрибковую деятельность против *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, возбудителя пальмового фузариоза. Идентификация на генном уровне и противогрибковая активность вырабатываемого изолята Ap1; изоляция, выяснение структуры и физико-химические свойства культуры изолята Ap1 описаны в этом научном труде.

Материалы и методы

Происхождение продуцирующего организма и условия роста

Ap1 был изолирован от ризосферы почвы *Argania spinosa* в регионе Эс-Сувейра (юг Марокко). Культура Ap1 в почве Беннет содержит мясной экстракт (Мерк, Германия) 1 г/л; глюкоза (Мерк) 10 г/л; пептон (Мерк) 2 г/л, дрожжевой экстракт 1 г/л и агар (Дифко) 15 г/л; pH 7.3 используется для выделения противомикробного компонента. 50 саженцев Петри были в инкубаторе при температуре 28 градусов C в течение 7 дней.

Морфологические, культурные и противогрибковые свойства штамма Ap1

Морфологические характеристики были исследованы с помощью микроскопа и электронной микроскопии сканера, как описано в Международном Проекте *Streptomyces*, используя культуру, выросшую при 28 градусах С в течение 3х недель в Беннет (агар и овсяная мука) .

Таблица 1. Противомикробная активность изолята Ap1. Зона ингибирования (мм) грибковых организмов средний показатель +/- SD 3х повторов.

Изолят Ap1 культивировался из агара в почве Беннет при температуре 28 градусов С на протяжении 7 дней. Противогрибковая активность была выявлена с помощью диффузионного метода (Байер 1966) у растений агар сабур, с помощью цилиндрического метода (Торторано 1979). 10-миллиметровый цилиндр срезается и помещается в свежее посаженный агар сабур с микроконидиями *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* и *Verticillium dahliae* (коллекция штаммов лаборатории фитопатологии, Марракеш, Марокко) или с добавлением дрожжей: *Candida albicans* (АТТС 2091) и *S. Cerevisiae* (коллекция штаммов лаборатории микробиологии, Марракеш, Марокко). Пластины подвергаются предварительной диффузии при температуре 4 градуса С в течение 4 часов перед инкубацией при температуре 28 градусов С. Три повтора допускались в каждом эксперименте и диаметры зоны ингибирования (20 мм и более) измерялись через 24 часа в дрожжах и через 48 часов в грибах.

Получение и ВЭЖХ противогрибкового вещества, выработанного Ap1

Вся плотная среда Ap1 (50 пластин петри) была извлечена этилацетатом и отфильтрована. Экстракт выпаривали в вакууме при температуре 35 градусов С до высыхания и ресуспендировали в 1 мл чистого метанола. Противогрибковая активность экстракта против *S. cerevisiae* устанавливалась с помощью бумажного фильтра.

Экстракт метанола пропусклся через подготовительное обращено-фазовое выпаривание на ВЭЖХ хроматографе (Воды 600 Ми, эквивалентно 717 в автоматическом пробоотборнике, 996 фотодиодным детектором и ПО Миллениум), с помощью колонной С-18 обращенной фазы (RP18 (7м) 7.8*300 мм); подвижная фаза для элюирования была смешана в пропорции: 40% ацетонитрила и 60% воды в изократических условиях при 3 мл/мин для очищения противогрибкового вещества.

Очищенное вещество было проанализировано с помощью C18 обращенно-фазовой ВЭЖХ (водное соединение, колонна: водная симметрия C18, 4.6*250мм (5 м), 1 мл/мин расход), оснащенной фотодиодным детектором и ПО Миллениум, в подвижной фазе использовались ацетонитрил и вода (уровень ВЭЖХ), линейный градиент от 10 до 100% ацетонитрила за 30 мин, при 1мл/мин. Длин волны детектора 337 нм.

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Многоканальная связь DC-Folien SIL G/UV254 (Мэчери-Наджел энд Ко) использовалась в двух подвижных фазах: хлороформ/метанол (9:1 в/в) и дихлорметан/метанол (9:1 в/в). Флуоресценция наблюдалась до и после распыления анизальгедида/реагент серной кислоты.

Выяснение структуры

Техники выявления противогрибкового вещества: ультрафиолетовые лучи спектроскопии: Перкин Элмер ламбда 15 (ультрафиолетовые лучи/энергия) спектрометр. *Оптическое вращение*: поляриметр (Перкин Элмер, модель 241). Н ЯМР спектроскопия, модели: Varian Unity 300 (300 MHz), Bruker AMX 300 (MHz), Varian Inova 500 (499.8 MHz). Константа взаимодействия в герцах. Аббревиатуры: s – синглет, d – дублет, dd – дублет дублет, t – триплет, q – квадруплет, m – мультиплет, br – широкий доступ (осветительный прибор) . С ЯМР спектроскопия, модели: Varian Unity 300 (75.5 MHz), Varian Inova 500 (125.7 MHz). Химический сдвиг был измерен относительно тетраметилсилана как внутренний стандарт. Аббревиатуры: АРТ (прилагающийся тест протона): CH/CH3 больше и Cq/CH2 меньше. *Масс-спектроскопия*: EI MS с Varian MAT 731 (70eV), Varian 311 A (70eV), AMD-402 (70eV), высокое разрешение с perflurokerosine в качестве стандарта. ESI MS с масс-спектрометром марки Quattro Triple Quadruple Финниган MAT-Incos 50, ESI MS LCQ (Финниган).

Результаты

Морфологические, культурные и противогрибковые свойства штамма Ap1

Микроскопическое наблюдение воздушного мицелия AP1 показывают, что этот штамм относится к спорным цепям типа *Spiralis*. Споры имеют цилиндрическую форму с гладкой поверхностью. Спорангии и склероции не наблюдаются (Рисунок 1). Эти результаты позволяют отнести изолят Ap1 к генам *Streptomyces*. Противогрибковая активность изолята Ap1 представлена

в таблице 1. Изолят Ap1 проявляет активность против *Furasium oxysporum f.sp. albedinis* и *Verticillium dahliae*.

Изоляция и структурное образование противогрибкового вещества

Только одно противогрибковое вещество было представлено в экстракте метанола культуры Ap1. Противогрибковое вещество было элюировано ВЭЖХ при использовании 37% ацетонитрила; время выдерживания 20.047 мин (длина волны 337 нм) (Рисунок 2). Очищенное вещество имеет УФ-спектр с тремя максимума поглощения: 323, 339 и 356 нм (Рисунок 3). Чистое вещество составляет 25 мг. Физико-химические характеристики противогрибкового вещества, выработанного Ap1 суммированы ниже:

(*расписаны химические формулы*

)

Противогрибковое вещество под воздействием пентаенового антибиотика стало желтым, оптически активным твердым веществом. Оно растворялось в метаноле и не растворялось в хлороформе и дихлорметане. Это дает один отпечаток на ТСХ с Rf 0.35 в хлороформе/метаноле (9:1 в/в) и Rf 0.1 в дихлорметане/метаноле (9:1 в/в), что говорит о достаточно высокой полярности. При распылении анизальдегида/серной кислоты цвет вещества меняется с желтого на коричневый.

Положительное электро-распыление масс-спектра отражает m/z 633.6 (M+Na) и 1243/3 (2M+Na). Негативный ион демонстрирует m/z 609.6 (M-H) и 1219.5 (2M-H), предполагается, что молекулярный вес противогрибкового вещества равен 610 Da.

Н NMR (*Протонный магнитный резонанс*) (рисунок 4) спектр противомикробного вещества показан в олефиновой области одного дублета 6.49 (1H) и нескольких мультиплетов 6.43-5.96 (8H). В алифатической области наблюдаются много мультиплетов 5.09-3.64 (9H), 3.11 (1H, 2.28 (1H) и 1.60-1.20 (21H), один синглет 1.77 (3H) и один триплет 0.84 (3H).

В CNMR (рисунок 5 и 6) наблюдается спектр одного сигнала карбонила 173.1 и 10 атомов углерода с двойной связью 140.5-125.5. Кроме того, заметны

девять ОСН сигналов 73.2-65.3, один метин 52.4, девять метиленов 44.3-21.9 и три атома метил углерода 17.9, 13.7 и 10.9.

H NMR (*Протонный магнитный резонанс*) спектр показывает отсутствие сигналов между 6.5 и 7.8 ч./млн., это показывает, что противогрибковое вещество не содержит атомных групп. Согласно **C NMR** (*ядерно-магнитный резонанс*) спектру это вещество содержит как минимум 9 СН-О фрагментов. Гликозид также был выделен (нет ацетального сигнала), 18 структур остались. Так как молекулярная масса 610 Da только два известных вещества могут приниматься во внимание: *chainin* и *isochainin*. Оба вещества имеют сходную структуру и не могут быть точно установлены в образце. Оптическое вращение вещества *isochainin* и стереоизомерного вещества *chainin* равна -24.4 градусов и - 112.2 градуса соответственно. Измеренное значение было - 26.9 градусов. Данный **NMR** (*Протонный магнитный резонанс*) идентифицировали вещество как *isochainin*; мы также установили, противогрибковое вещество как *isochainin*.

Обсуждение

Isochainin (рисунок 7) это изомер вещества *chainin*, подвида *Chainia* (Гопалакришнан 1968). Структура этого вещества была описана Пандей (1972) как 2 (n-бутил)-16-метил-3,5,7,9,11,13,15,26,27 нонагидроксиоктаноат-16,18,20,22,24-пентановая кислота, 27-лактон. Продукты вещества *Isochainin* отнесены к *Streptomyces cellulosae* АТТС 12625 культуры после добавления специфического предшествующего вещества, этил (Z)-19-фенилгексадек-9-еноата.

Streptomyces cellulosae АТТС 12625 обычно выделяет противогрибковое вещество как главный полиеновый антибиотик (Тайтелл 1955, Ногучи 1988). Однако жирный кислотный состав культуры со средней поверхностью производит необходимое противогрибковое вещество и эфир олиеновой кислоты. (Маккарти 1955).

Что же касается противогрибкового антибиотика, вещество *isochainin* наблюдалось при прямом биосинтезе *S. Cellulosae* АТТС и этил (Z)-19-фенилгексадек-9-еноата, этилолеата аналогового, которые следует добавлять в питательную среду. При добавлении этил (Z)-19-фенилгексадек-9-еноата в среду для ферментации биосинтез противогрибкового антибиотика кардинально сократился, а появились вещество *isochainin* и 3 других новых макролида, которые являются изомерами вещества *isochainin*: 14-гидро-*isochainin*, 1'-гидро-*isochainin* и 14-дигидро-*isochainin* (Ли 1989).

Isochainin вырабатывается штаммом Ap1, выделенным в лаборатории из ризосферы почвы Марокканского местного растения *Argania spinosa L.*, который непосредственно выделяется из Бенетт культуры штамма Ap1. Этот продукт имеет весомое преимущество, т.к. стоит меньше с тех пор, как этил (Z)-19-фенилгексадек-9-еноата был получен путем химического синтеза из двух химических соединений, 5-фенилпентанол и 9-бромонанол. К тому же Ap1 дает в 6.5 раз более лучшую концентрацию (25 мг на литр) по сравнению с *S. Cellulosaе* ATTC 12625. Активность проявляется против *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (MIC:64.2г/мл) и *Verticillium dahliae* (MIC:49 г/мл); предполагается использование произведенного изолята, без клеточной культуры или *isochainin* для биоконтроля увядания финиковой пальмы и вертициллоза оливкового дерева. Идентификация штамма Ap1 на видовом уровне и эксперименты с биоконтролем над увяданием финиковой пальмы с использованием штамма Ap1 или *isochainin* находятся в предварительной стадии.

Подтверждения

Авторы благодарны профессору Хосе Салас Фернандез и Альфредо Фернандез Бранья, медицинский факультет, университет Овьедо, Испания за ВЭЖХ и профессору Хартмут Лаатч, институт органической и биомолекулярной химии, университет Гёттинген, Германия за определение структуры.