

Образование деструксинов копротрофным штаммом *Beauveria felina* № 7

М. В. БИБИКОВА, Т. О. ПУЖЕВСКАЯ, А. Н. ДАНИЛЕНКО, И. А. СПИРИДОНОВА,
Г. В. ЗАТОНСКИЙ, А. В. АЛЕКСАНДРОВА, А. В. КАТЛИНСКИЙ

Государственный научный центр по антибиотикам, Москва
Институт биохимической физики РАН, Москва
Биологический факультет МГУ им. М. И. Ломоносова, Москва
Первый Московский Государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова

Production of Destruxins by Coprotrophic *Beauveria felina* No. 7 Strain

M. V. BIBIKOVA, T. O. PUZHEVSKAYA, A. N. DANILENKO, I. A. SPIRIDONOVA,
G. V. ZATONSKY, A. V. ALEKSANDROVA, A. V. KATLINSKY

National Research Centre of Antibiotics, Moscow
Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow
M. I. Lomonosov Moscow University, Moscow
I. M. Sechenov 1st Moscow State Medical University, Moscow

Выделен (с шерсти землеройки) и охарактеризован по образованию комплекса циклодепептидов деструксинов штамм *Beauveria felina* № 7. Установлено, что штамм продуцирует значительное количество деструксина В и псевдодеструксина С. Показана способность выделенных деструксинов ингибировать образование биоплёнки штаммом *P.aeruginosa* ATCC 27853.

Ключевые слова: штамм гриба *Beauveria felina* № 7, деструксины, выделение, идентификация, биологическая активность.

Beauveria felina No. 7 strain was isolated from the shrewmouse wool and characterized by production of a complex of destruxins cyclodepsipeptides. The strain was shown to produce significant quantities of destruxin B and pseudodestruxin C. The destruxins were found to be able to inhibit formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27833.

Key words: *Beauveria felina* No. 7, destruxins, isolation, identification, biological activity.

В процессе скрининга гипополипидемических соединений, продуцируемых различными видами грибов, был отобран штамм *Beauveria felina* № 7, обнаруженный на шерсти землеройки бурозубки.

При выделении активного начала было установлено, что биологическая активность штамма определяется комплексом депсипептидов деструксинов. Впервые деструксины были выделены из культуры *Metarrhizium anisopliae* как быстро действующие инсектициды [1–3].

В дальнейшем специалисты из Бразилии при проведении широкого скрининга продуцентов биологически активных соединений из микроорганизмов, обитающих в море, сообщили о выделении комплекса деструксинов, продуцируемых культурой *Beauveria felina* [4].

Исследование образования определенных пептидов и циклодепептидов грибами культурами представляет большой интерес для био-

технологии, связанный с широким спектром их биологических активностей, необычным механизмом действия и необычной молекулярной структурой. Некоторые из них относятся к токсинам, другие рассматриваются как перспективные соединения с антиатерогенными свойствами, с антибиотической, антивирусной, антигрибной, противовоспалительной и противоопухолевой активностями [5]. Показана высокая цитотоксическая активность деструксинов в отношении лейкоза мышей Р388 [6].

Исследование образования пептидов различными грибными культурами является дополнительным критерием при уточнении таксономического положения отдельных родов микромицетов, а также распространения в природе инсектицидных микромицетов.

Материал и методы

Таксономическое изучение. Культурально-морфологические признаки. Выделенный продуцент изучали с использованием набора сред для определения таксономического положения грибов: минеральный агар Гаузе 1, Гаузе 2, глицерин-нитратная среда, среда Чапека с глюкозой, солодовый агар, сусло-агар.

© Коллектив авторов, 2010

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а. ГНЦА

Учитывали диаметр (d) колонии, цвет и форму воздушного мицелия (ВМ), цвет субстратного мицелия (СМ), наличие растворимого пигмента (РП) на 7-е и 14-е сутки роста.

Микроморфологические исследования. Микроморфологический анализ культур осуществляли с помощью микроскопирования свежих препаратов в виде суспензии, а также микроскопированием роста штамма в тонком слое на стёклах (разные сутки роста) при использовании микроскопа МБИ-15 У 4.2. А. Осуществляли микроскопирование окрашенных метиленовой синью мазков при увеличении в 40–900 раз. Исследовали характер роста и форму мицелия, конидиофоры, фиалиды и конидии. Ультраструктуру изучали с помощью метода электронной микроскопии (микроскоп «Hitachi» (S-405 A) при увеличении до 30000 раз).

Среды и условия ферментации. Грибную культуру *Beauveria felina* № 7 выращивали и хранили на агаризованной среде Райстрика. Выращенные в течение 14 суток культуры хранили при 4°C. Культуру, выращенную в пробирках на скошенном агаре, использовали в качестве посевного материала, высевая блоком в жидкую среду.

Глубинное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера объёмом 750 мл, содержащих 200 мл питательной среды А9 [7]. Ферментацию проводили на круговой качалке с частотой вращения от 3,3 с⁻¹ до 4,3 с⁻¹ при 24°C, в течение 7 суток.

Определение антимикробной активности нативного растора и ацетоновых экстрактов из мицелия проводили методом диффузии в агар в отношении тест-культур *Aspergillus niger* 137 а, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Rhodococcus rhodochrous* 451 и *Mycobacterium* spp. 3207. При определении антимикробной активности концентрат комплексных соединений вносили в количестве 200 мкл в лунки, вырезанные в агаре, заражённом тест-культурами. О величине МПК каждого исследуемого образца судили по диаметру зон подавления роста тест-организма.

Выделение антибиотических веществ. По окончании ферментации мицелиальную массу отделяли центрифугированием. Активные соединения извлекали из биомассы ацетоном. Ацетоновые экстракты концентрировали на вакуум-испарительной установке (ИР-1) до водного остатка. Биологически активные вещества переводили в петролейный эфир или хлороформ. Экстракты концентрировали на вакуум-выпарной установке (ИР-1), осадки высушивали. Компонентный состав полученных таким образом препаратов исследовали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Silufol (производства фирмы Kavalier, Чехия), в системе растворителей петролейный эфир — ацетон (1,5:1). Дальнейшую очистку препаратов для получения активных фракций осуществляли хроматографическими методами.

Физико-химические характеристики выделенных антибиотиков определяли методом ТСХ. Экстракты в петролейном эфире и хлороформе наносили на хроматографическую пластинку Silufol (УФ-254) в количестве 10 мкл и хроматографировали в системе растворителей петролейный эфир — ацетон (1,5:1). Анализировали под УФ лампой Desaga Geraet Heidelberg (GDR), затем проявляли в эксикаторе парами йода и закрепляли полученный результат раствором перманганата калия. УФ-спектры получали на спектрофотометре Shimadzu UV-240. Очистку антибиотика осуществляли методом ВЭЖХ на хроматографе Gilson, оснащённом УФ -детектором и препаративной колонкой Zorbax C18. Масс-спектры были сняты на приборе Agilent 6330.

Результаты и обсуждение

Описание культуры *Beauveria felina* № 7. Штамм *Beauveria felina* № 7 отличается хорошим ростом на большинстве питательных сред. На среде сусло-агар колония достигает диаметра 2,5–4

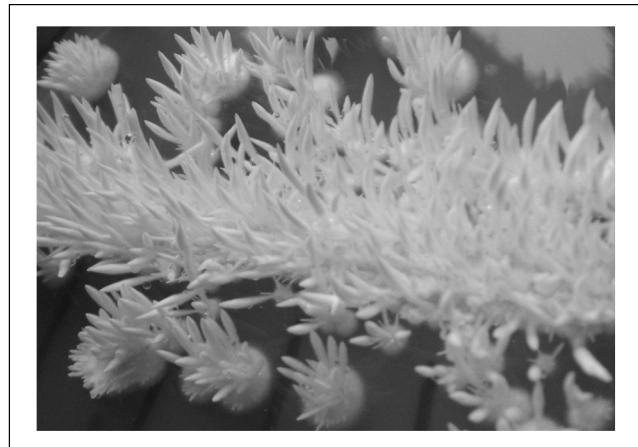


Рис. 1. Рост культуры *Beauveria felina* при посеве на солодовой агаризованной среде.

Время роста культуры — 14 суток.

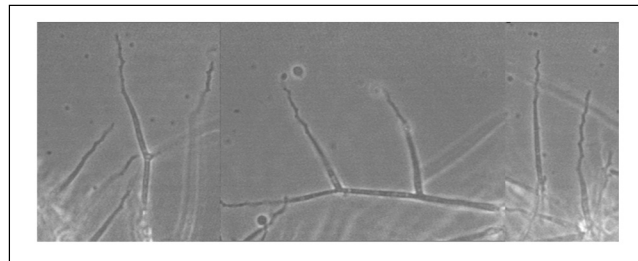


Рис. 2. Электронная микроскопия *Beauveria felina*. (Ув. ×20000 раз).

см на 7-й день роста при температуре 22°C в темноте. На довольно бедном, бесцветном, паутинистом мицелии, стелющемся по субстрату, образуются плотные, тонкие, неветвящиеся, белые коремии, имеющие постоянную толщину 1–1,5 мм и достигающие в длину 6 см (8 см при росте в пробирке). При росте на свету коремии проявляют положительный фототропизм. Обратная сторона колонии бесцветная или слегка желтоватая, экссудат не образуется, пигмента, окрашивающего среду, нет, запах отсутствует.

Исследуемая культура *Beauveria felina* № 7 была выращена методом укола на солодовый агар, результаты представлены на рис. 1.

Споры и вид спороносцев исследовали методом сканирующей электронной микроскопии. Как видно из фотографии, полученной методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 2), конидиогенные клетки образуются по всей поверхности коремии, непосредственно на мицелии или группами на коротких слегка расширенных веточках, имеют бутылевидную форму со слегка вздутым основанием и суженной, часто согнутой верхней частью, на которой последовательно на небольших зубчиках образуются конидии. Конидиогенная область, в отличие от таковой у *Beauveria bassiana*, удлиняется не сильно. Конидии

Таблица 1. Антимикробная активность

Тест-культура	Диаметр зон подавления роста, мм	
	ацетоновый экстракт из мицелия (100 мкл)	нативный раствор (100 мкл)
<i>Aspergillus niger</i> 137 a	25	15
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	35	25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12	14
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> 451	30	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	23	20

бесцветные, гладкостенные, полушаровидные, яйцевидные до короткоэллиптических, иногда с приострѐнным основанием, $2-3,5 \times 2,5-5$ мкм.

Таким образом, морфологические и микроскопические признаки штамма № 7 соответствуют описанию типовой культуры *Beauveria felina* (DC.) J. W. Carmich.

Этот гриб впервые был описан в 1815 г. как *Clavaria felina*, в 1832 г. как *Isaria feline* [8, 9]. И только в 1980 г Дж.В. Кармайкл с соавторами перенес его в род *Beauveria* на основании образования симподулоконидий, а не фиалоконидий, как у типового вида рода *Isaria* [10]. По современной классификации этот вид относится к анаморфному роду *Beauveria*, связанному с представителями семейства Cordycipitaceae, порядка Нуроскреales, отдела Ascomycota [11]. Представленные данные показывают, что таксономия штамма *Beauveria felina* еще не устоялась, в связи с чем оценка образования вторичных метаболитов является важным таксономическим признаком.

Данный вид чаще всего отмечается как копротроф. Обнаруженный нами на шерсти землеройки бурозубки штамм, скорее всего, развивался как копротроф или сапротроф в местах связанных с жизнью зверьков: гнезда или общественные уборные и распространялся на шерсти животных.

Антимикробная активность нативного раствора и экстрактов из мицелия культуры *B.felina* № 7. При росте в погруженных условиях в среде А9 на качалке через 7 суток роста культура № 7 образует антибиотик широкого спектра действия, как в мицелии, так и в нативном растворе, что было определено методом диффузии в агар (диаметр лунки 8 мм). Данные представлены в табл. 1.

Образуемый антибиотик практически равномерно распределяется как в нативном растворе, так и в мицелии. Наблюдается высокая антигрибная активность продуцируемого антибиотика в отношении мицелиальных и дрожжевых грибов, высокая активность выявлена в отношении *R.rhodochrous* 451 и значительная активность в отношении и *P.aeruginosa* и *B.subtillis*

Таким образом, исследуемый экстракт из мицелия и нативный раствор культуры *B.felina* № 7, выращенной в погруженных условиях, проявляют высокую антифунгальную и антимикробную активность.

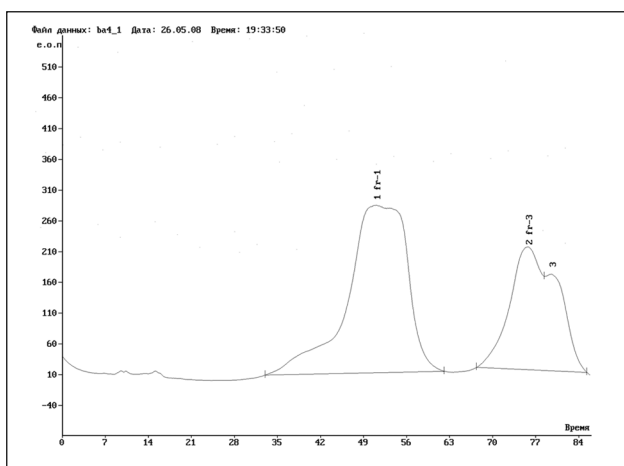


Рис. 3. Препаративная хроматография предварительно очищенного препарата (объединенные фракции № 4—9) из *B.felina* № 7.

Условия хроматографирования: колонка — Zorbax C18 (5 мкм, 250×22 мм); подвижная фаза — 56% водный этанол; скорость протока подвижной фазы — 5 мл/мин; объем пробы, нанесенной на колонку — 1 мл; регистрация — УФ при длине волны 220 нм.

Выделение антибиотика. Антибиотик извлекали из ацетонового экстракта мицелия продуцента. Изучение фракционного состава осуществляли методом ТСХ. Комплексный препарат из культуры *B.felina* № 7 исследовали в системе растворителей: петролейный эфир — ацетон (1,5:1) на пластинах Silufol 254 UV. На колонке с кизельгелем проводили первичную очистку с выделением фракции № 4—9, обладающей высокой антибактериальной активностью.

Дальнейшее разделение и накопление чистых фракций комплексного препарата, полученного из *B.felina* №7 проводили методом ВЭЖХ в изократическом режиме на хроматографе Gilson, оснащенный УФ-детектором и препаративной колонкой Zorbax C18. Оптимальные условия разделения комплекса были определены экспериментально при их разделении в градиентном режиме (рис. 3).

Степень очистки полученных препаратов проверяли методом ВЭЖХ в градиентном режиме на колонке Platinum EPS C18 (5 мкм; 250×4,6 мм). Полученные хроматограммы имели по одному пику.

Выделенные фракции были проанализированы по масс-спектральным свойствам (рис. 4 и 5).

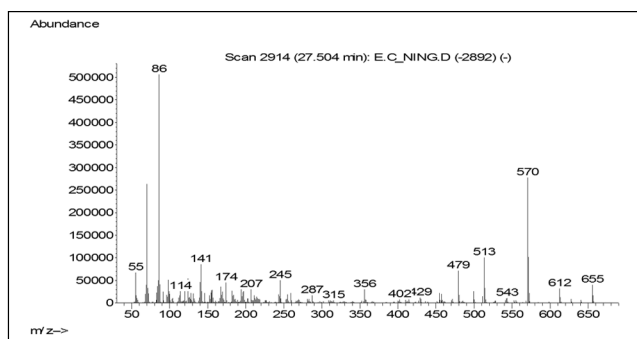


Рис. 4. Масс-спектрометрия фракции 1.

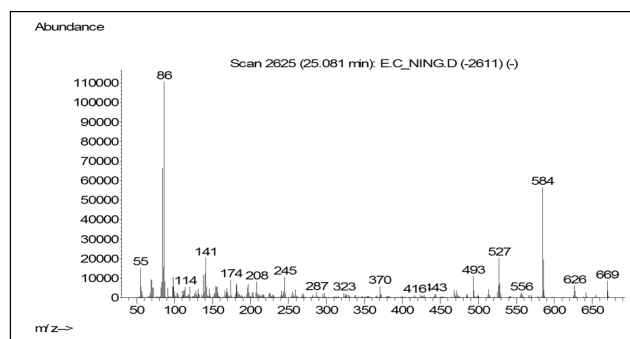
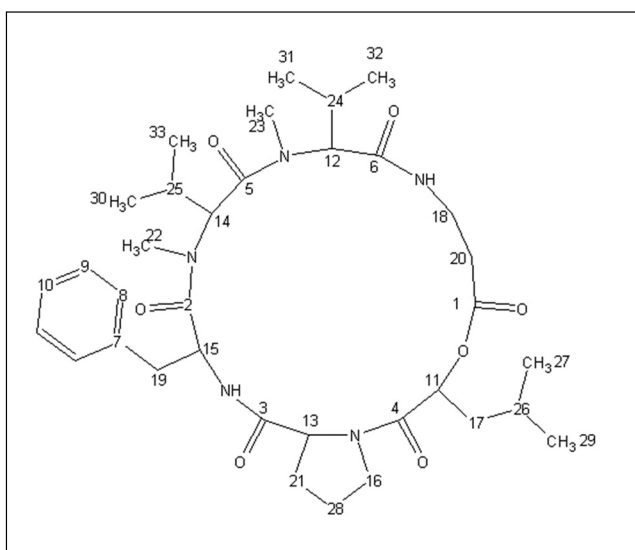


Рис. 5. Масс-спектрометрия фракции 3.

Рис. 6. Структурная формула антибиотика (фракция 1).
Структура: Cyclo(PheValVal-NH-CH₂CH₂COO-LeuPro).

Сравнение фракций 1 и 3 показало, что выделенные два вещества с молекулярными массами 655 и 669 отличаются на одну CH₂ группу. Судя по нечётной величине молекулярной массы весу и наличию чётных фрагментов (m/z 86, 114, 208 и др) в молекуле имеется нечётное число атомов азота. По характеру фрагментов сами вещества, по-видимому, являются пептидами и имеется депси группа (разница на 28 между массами).

Полученные чистые фракции были проанализированы методами ПМР и ЯМР, что позволило определить структуру антибиотиков комплекса (рис. 6 и рис. 7, табл. 2 и табл. 3).

Таким образом было установлено, что исследуемый штамм *B.felina* № 7 продуцирует комплекс деструксинов, из которых мажорными компонентами, доступными для выделения и очистки, являются деструксин В (фракция 1) и псевдодеструксин С (фракция 3).

Следует отметить, что псевдодеструксин был описан в 2008 г., выделен из *B.felina*, обитающей в море на водорослях *Caulerpa* spp. Для определения структуры вещества авторами использовались данные высокоразрешающей

Таблица 2. Химические сдвиги антибиотика (фракция 1)

N	¹ H	¹³ C
1	—	175.6
2	—	175.2
3	—	173.8
4	—	172.2
5	—	171.7
6	—	170.6
7	—	138.1
8	7.33	130.1
9	7.33	129.8
10	7.27	128.3
11	5.35	74.8
12	4.44	67.9
13	4.22	62.4
14	5.20	59.1
15	4.75	55.2
16	3.46	48.4
17	1.87/1.50	39.3
18	4.08/3.31	36.9
19	3.19/2.99	35.9
20	2.76/2.52	35.9
21	2.25/2.14	33.0
22	3.12	30.3
23	2.97	29.9
24	2.44	29.2
25	2.42	28.9
26	1.98	26.0
27	1.04	23.7
28	1.81/1.26	22.8
29	1.06	21.2
30	0.91	20.7
31	0.93	20.3
32	0.98	19.9
33	0.90	19.3

масс-спектрологии и сравнение с литературными данными [4].

Способность ингибировать рост биоплёнки *P.aeruginosa* ATCC 27853. Была установлена способность ингибировать рост биоплёнки *P.aeruginosa* ATCC 27853 у фракций 1 и 3, выделенных из культуры *B.felina* № 7. Более выраженная активность выявлена у фракции 3, которая в концентрации 9 мкг/мл снижала уровень образования биоплёнок тест-культурой на 30%. Более того, показано, что выживаемость бактерий в биоплёнках при совместном применении отобран-

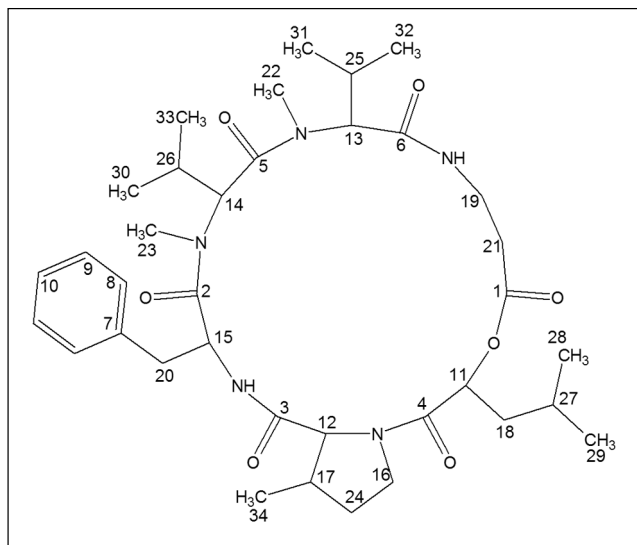


Рис. 7. Структурная формула антибиотика (фракция 3).
Cyclo(PheValVal-NH-CH₂CH₂COO-LeuPro-β-Me).

ных препаратов и гентамицина значительно уменьшалась. Наблюдалось потенцирование действия антибиотика в отношении тест-культуры *P.aeruginosa* ATCC 27853 (МПК снижалось в 2–3 раза) [12].

Заключение

Таким образом, выделен и охарактеризован по образованию комплекса циклодепептидов деструксинов штамм *Beauveria felina* № 7, выделенный с шерсти землеройки. Показано, что штамм продуцирует значительное количество деструксина В и псевдодеструксина С. Этот штамм изначально был отобран нами как продуцент гипопицидиических соединений: экстракт из мицелия ингибировал включение меченого ацетата в холестерин в культуре клеток гепатоцитов человека Нер 2. Следует отметить, что аналог выделенных нами антибиотиков — деструксин Е ингибировал накопление окисленных липопротеидов низкой плотности в культуре клеток макрофагов J774 [13]. Показано, что деструксин В специфически и дозозависимо ингибирует вакуольную АТФазу. Отмечается, что ингибиторный эффект слабее, чем у

ЛИТЕРАТУРА

1. Suzuki A., Kuyama S., Kodair Y., Tamura S. Structural elucidation of destruxin A. *Agric Biol Chem* (Tokyo) 1966; 30: 517–518.
2. Suzuki A., Taguchi H., Tamura S. Isolation and structure elucidation of three new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxins C and D and desmethyldestruxin B, produced by *Metarrhizium anisopliae*. *Ibid* 1970; 34: 813–816.
3. Suzuki A., Kawakami K., Tamura S. Detection of destruxins in silkworm larvae infected with *Metarrhizium anisopliae*. *Ibid* 1971; 35: 1641–1643.
4. Vita-Marques de A. M., Lira S. P., Berlinck R. G. S. et al. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. *Quim. Nova* 2008; 5 (31): 1099–1103

Таблица 3. Химические сдвиги антибиотика (фракция 3)

N	¹ H	¹³ C
1	-	174.1
2	-	173.7
3	-	171.8
4	-	171.0
5	-	170.3
6	-	169.1
7	-	136.6
8	7.29	128.7
9	7.29	128.4
10	7.22	126.9
11	5.32	73.2
12	3.75	67.8
13	4.94	66.4
14	5.18	57.6
15	4.69	53.7
16	3.35/3.71	45.1
17	2.51	39.9
18	1.39/1.90	38.4
19	3.29/4.08	35.4
20	3.00/3.18	34.5
21	2.52/2.78	34.4
22	3.12	28.9
23	2.97	28.4
24	1.52	28.3
25	2.43	27.8
26	2.41	27.5
27	1.99	24.6
28	1.04	22.3
29	1.05	19.9
30	0.91	19.3
31	0.92	18.9
32	0.91	18.5
33	0.97	17.9
34	1.11	17.8

бафиломицина А1 и фолимицина (известные макролидные ингибиторы вакуольной АТФазы) [14].

Таким образом, деструксины представляют больший интерес с точки зрения перспективы применения в медицине, так как эти соединения проявляют такие биологические свойства, которые могут быть использованы для создания новых лекарственных препаратов для лечения сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, терапии микозов. Разработка лекарственных препаратов на основе деструксинов требует широких и разносторонних исследований.

5. Pedras M. S. C., Zaharia L. I., Ward D. E. Cyclic depsipeptides that present an array of biological activities such as insecticidal, cytotoxic, antiviral, immuno-depressant and phytotoxic. *Phytochemistry* 2002; 59: 579.
6. Françoise Odier, Alain Vey, Bureau J. P. *In vitro* effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells: study of destruxins A, B and E. *Biology of the Cell*, 1992; 74: 267–271.
7. Бибилова М. В., Рыбакова А. М., Востров С. Н., Иваницкая Л. П. Оптимизация состава ферментационной среды для биосинтеза циклоспорины штаммами 392 и 1096//Успехи в области изучения и производства антибиотиков. Труды института ВНЦА-ВНИИА. Выпуск XX. М. 1991.
8. Matsushima T. Microfungi of the Solomon Island and Papua-New Guinea. Osaka: Kobe 1971; 78.

9. *Hoog de G. S.* The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. // *Studies in Mycology*. 1972; 1: 41.
10. *Carmichael J. W., Kendrick B. W., Connors I. L., Sigler L.* Genera of *Hyphomycetes*. Edmonton, Alberta: University of Alberta Press. 1980; 368.
11. *Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A.* Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 10th ed. UK: CABI-Europe. 2008; 784.
12. *Пужевская Т. О., Бибикова М. В., Грамматикова Н. Э. и др.* Влияние природных гипополипидемических соединений на формирование биоплёнок штаммами рода *Pseudomonas*. Антибиотики и химиотер 2009; 1—2: 10—13.
13. *Naganuma S., Kuzuya N., Sakai K. et al.* Inhibition of the accumulation of lipid droplets in macrophage J774 by bafilomycin B1 and destruxin E. *Biochim Biophys Acta* 1992; 5: 1126: 1: 41—48.
14. *Huroi M., Shiragami N., Takatsuki A.* Destruxin B, a specific and readily reversible inhibitor of vacuolar-type H⁺-translocating ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 2: 1358—1365.