

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТ-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ НА РОСТОВЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ САПРОФИТНЫХ ШТАММОВ *CLAVICEPS PURPUREA* (FR.) TUL.

А.Г. Барсегян

к.б.н., ст. науч. сотрудник, отдел биотехнологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: anton.barseg@mail.ru

Т.А. Савина

к.б.н., зав. отделом биотехнологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: savina-tatyana57@yandex.ru

Определено влияние аминокислот-предшественников на ростовые и биосинтетические показатели сапрофитной культуры *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. лабораторного штамма E24-09 ВИЛАР. Установлено, что совместное присутствие в субстрате аминокислот триптофана, пролина и метионина положительно влияет как на уровень накопления эргоалкалоидов, так и на их состав. Отмечено негативное влияние на ростовые и биосинтетические характеристики гриба избыточной дозы триптофана.

Ключевые слова: сапрофитный штамм, *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., триптофан, пролин, метионин, эргоалкалоиды, индольные соединения.

Эргоалкалоиды занимают важное место в фармацевтической промышленности, так как используются в качестве фармакологических средств разнообразного направления и механизма действия. Считается, что большинство эффектов эргоалкалоидов объясняется их взаимодействием с рецепторами нейромедиаторов адреналина, норадреналина, дофамина и серотонина [1].

В настоящее время для получения эргоалкалоидов активно ведутся работы по изучению использования сапрофитной культуры гриба спорыньи, для выращивания которого традиционно применяются методы глубинного и поверхностного культивирования, которые заключаются в выращивании мицелиальной культуры гриба на питательных средах, содержащих в своем составе компоненты, необходимые для биогенеза эргоалкалоидов [2].

Биосинтез эргоалкалоидов начинается на генетическом уровне и продолжается на уровне физиологической реализации. Гены, участвующие в биосинтезе эргоалкалоидов, находятся под жестким метаболическим контролем. Образование эргоалкалоидов является результатом изменений в физиологическом состоянии продуцента. Причем, как правило, рост культур и синтез эргоалкалоидов – процессы, конкурирующие за ключевые ме-

таболические интермедиаты. В настоящее время многочисленные исследователи связывают инициацию метаболизма эргоалкалоидов с изменениями ряда параметров – морфологических признаков, концентрации ферментов и их субстратов, содержания питательных веществ и внешних стрессовых факторов [2–4].

В регуляцию биосинтеза эргоалкалоидов вовлечены в основном процессы, характерные для первичного метаболизма. Предшественниками эргоалкалоидов, образованными в процессе первичного метаболизма, являются аминокислоты триптофан, метионин, мевалоновая кислота и пролин [2, 5, 6].

В проведенных ранее исследованиях был определен уровень накопления свободных аминокислот мицелием гриба спорыньи. Отмечено, что на стадиях, предшествующих синтезу алкалоидов (для продуцирующей культуры), происходит повышение образования аминокислот-предшественников [7].

Цель исследования – изучение экзогенного влияния основных аминокислот-предшественников биосинтеза эргоалкалоидов на ростовые и биосинтетические показатели сапрофитной культуры спорыньи лабораторного штамма E24-09 ВИЛАР.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил лабораторный штамм сапрофитной культуры *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. – E24-09 ВИЛАР, характеризующийся нарастанием мицелия в количестве 6–7 г/л сухой массы; содержанием производных индола – 0,20% от сухой массы мицелия, присутствием алкалоидов β-эргокриптина и эрготамина.

Суспензию конидий получали из 30-суточной культуры гриба, выращенной на агаризованной среде. Засев колб с жидкой питательной средой проводили из расчета 1 мл суспензии конидий плотностью $3,5 \cdot 10^6$ шт./мл на 100 мл питательной среды. Количество конидий подсчитывали, используя камеру Горяева. Колбы помещали в термостатическое помещение с постоянной температурой 26 °С на подвесную качалку с эллиптической траекторией качания, совершающей 98–100 об/мин. Выращивание осуществляли на питательных средах, разработанных специально для культивирования сапрофитной спорыньи. Все работы проводили в стерильных условиях. Для оценки скорости роста мицелия учитывали сухую массу мицелия в граммах на литр питательной среды.

Биохимические исследования проводили со свежим мицелием на 28-е сутки культивирования с учетом того, что аминокислоты являются продуктами первичного метаболизма и в период интенсивного роста расходуются главным образом на синтез конституциональных пептидов. Оставшийся после периода интенсивного роста пул свободных аминокислот может быть вовлечен в метаболические пути синтеза вторичных соединений, к которым относятся и эргоалкалоиды.

Для предварительной оценки присутствия эргоалкалоидов использовали колориметрический анализ по методу Румпеля [8–10].

Качественный контроль накопления эргоалкалоидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [8]. Хроматографию проводили на пластинках MERK 20×20 см. Величины R_f для стандартных образцов эргоалкалоидов определяли экспериментально [7].

Эксперименты планировали с использованием методов постановки факторных экспериментов и ставили в 3–5 повторностях. Контрольный вариант по тексту обозначали как «чистая культура». Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием пакета программ Statistika.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемыми факторами служили основные аминокислоты – триптофан, метионин, пролин. Было выдвинуто предположение, что введение в состав питательной среды данных аминокислот в заведомо избыточных количествах приведет к повышению суммарного выхода эргоалкалоидов.

Исследовали три концентрации каждого фактора:

эксперимент 1 – концентрация «нормальная», соответствующая содержанию аминокислот в мицелии, при котором наблюдался синтез индольных производных, выбранная по результатам проведенных ранее экспериментов [7];

эксперимент 2 – концентрация «эквимоллярная», рассчитанная из теоретических представлений о необходимом уровне аминокислот для синтеза 1 г эргоалкалоидов;

эксперимент 3 – концентрация «избыточная», превышающая в 50 раз концентрацию эксперимента 1 (табл. 1).

Ставились трехфакторные эксперименты (факториальная схема $2 \times 2 \times 2$), где проверялось влияние каждого фактора индивидуально и при их сочетаниях.

В результате экспериментов (табл. 2) было установлено, что с увеличением концентраций аминокислот наблюдались значимые различия в уровне накопления биомассы мицелием. Четко отслеживалась тенденция негативного влияния избыточного уровня триптофана. На питательных средах, содержащих в своем составе данную аминокислоту, уровень накопления биомассы с увеличением концентрации снижался на 25 и 51% соответственно. Вместе с тем на средах, содержащих только пролин и метионин или их сочетание, масса мицелия была несколько выше, чем на контрольной питательной среде. Наибольшего уровня накопления биомассы удалось достичь на среде, содержащей в своем составе только метионин в эквимоллярной концентрации.

Таблица 1. Концентрации аминокислот при введении в состав питательной среды, г/л

Эксперимент	Триптофан	Метионин	Пролин
1	0,001	0,002	0,002
2	0,034	0,024	0,019
3	0,05	0,1	0,1

Таблица 2. Влияние аминокислот на накопление биомассы мицелиальной культурой лабораторного штамма *Cl. purpurea* (Fr.) Tul. – E24-09 ВИЛАР, выращиваемого в условиях глубинного культивирования

Исследуемый фактор*	Масса сухого мицелия, г/л		
	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3
0 (контроль)	7,62±0,49	7,62±0,49	7,62±0,49
A	7,26±0,35	5,48±0,37	3,57±0,84
B	7,85±0,01	8,51±0,13	7,97±0,17
C	7,56±0,10	7,96±0,02	7,69±0,16
AB	7,35±0,01	5,76±0,46	4,16±0,03
AC	7,23±0,05	5,56±0,06	3,99±0,26
BC	7,76±0,06	7,99±0,12	7,75±1,02
ABC	7,15±0,02	6,19±2,05	3,65±0,12

Примечание: * – обозначение факторов эксперимента: А – триптофан; В – метионин; С – пролин.

Таблица 3. Влияние аминокислот на суммарное содержание индольных производных в мицелии лабораторного штамма *Cl. purpurea* (Fr.) Tul. – E24-09 ВИЛАР

Исследуемый фактор*	Масса сухого мицелия, г/л		
	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3
0 (контроль)	0,198±0,002	0,198±0,002	0,198±0,002
A	0,209±0,002	0,205±0,009	0,071±0,009
B	0,200±0,004	0,202±0,002	0,205±0,001
C	0,191±0,005	0,199±0,001	0,188±0,004
AB	0,215±0,004	0,221±0,009	0,075±0,001
AC	0,201±0,005	0,207±0,005	0,079±0,006
BC	0,201±0,001	0,204±0,002	0,218±0,009
ABC	0,215±0,008	0,219±0,001	0,086±0,001

Примечание: * – см. табл. 2.

Визуальные и микроскопические исследования показали, что при выращивании в условиях глубинного культивирования мицелий во всех вариантах по своей морфологии соответствовал морфологии исходного лабораторного штамма. Мицелий образовывал конгломераты диаметром до 6 мм, изначально белого цвета, которые с возрастом принимали серый оттенок.

Оценивая биосинтетическую потенцию сапрофитного штамма по суммарному содержанию индольных производных, можно отметить, что из всех изучаемых эффекторов значимым являлся триптофан. Присутствие его в питательном субстрате в дозах экспериментов 1 и 2 обеспечивало достаточно высокое накопление биологически ак-

тивных веществ. Отмечено его взаимодействие с пролином, где содержание суммы производных индола на 8–11% превышало контрольный вариант. В больших дозах триптофан отрицательно влиял на биосинтетический показатель культуры; снижение содержания суммы индольных соединений при этом составляло 65% от контроля.

Установлено отсутствие столь значимого влияния аминокислот пролина и метионина на биосинтетические процессы мицелия.

При исследовании экстракта мицелия методом ТСХ обнаруживались существенные различия хроматографической картины образцов в зависимости от аминокислоты, добавленной в состав питательного субстрата (табл. 4).

Таблица 4. Хроматографическая характеристика мицелиальной культуры лабораторного штамма *Cl. purpurea* (Fr.) Tul. – E24-09 ВИЛАР, выращенной на среде с добавлением аминокислот

Вариант опыта*	Эксперимент 1		Эксперимент 2		Эксперимент 3	
	R _f	Соответствие стандарту	R _f	Соответствие стандарту	R _f	Соответствие стандарту
0 (контроль)	0,385	β-Эргокриптин	0,385	β-эргокриптин	0,385	Отсутствует
	0,59	Эрготаминин	0,59	Эрготаминин	0,59	Отсутствует
А	0,090	Отсутствует	0,090	Отсутствует	0,090	Эрготаминин
	0,127	Сетоклавин	0,127	Сетоклавин	0,300	Сумма α,β-эргокриптининов
	0,135	Отсутствует	0,135	Отсутствует	0,590	Отсутствует
	0,350	α-Эргокриптин	0,350	α-Эргокриптин	0,850	–
	0,590	Эрготаминин	0,590	Эрготаминин	0,910	–
	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов	–	–
	0,910	Отсутствует	0,910	Отсутствует	–	–
В	0,110	Отсутствует	0,110	Отсутствует	0,110	Отсутствует
	0,385	β-Эргокриптин	0,385	β-Эргокриптин	0,385	β-Эргокриптин
	0,590	Эрготаминин	0,590	Эрготаминин	0,590	Эрготаминин
	0,910	Отсутствует	0,910	Отсутствует	0,910	Отсутствует
С	0,100	Отсутствует	0,100	Отсутствует	0,100	Отсутствует
	0,385	β-Эргокриптин	0,385	β-Эргокриптин	0,240	Отсутствует
	0,59	Эрготаминин	0,59	Эрготаминин	0,385	В-эргокриптин
	0,810	Отсутствует	0,810	Отсутствует	0,59	Эрготаминин
	–	–	–	–	0,810	Отсутствует
АВ	0,090	Отсутствует	0,090	Отсутствует	0,090	Отсутствует
	0,127	Сетоклавин	0,127	Сетоклавин	0,120	Отсутствует
	0,135	Отсутствует	0,135	Отсутствует	0,300	Отсутствует
	0,350	α-Эргокриптин	0,350	α-Эргокриптин	0,590	Эрготаминин
	0,590	Эрготаминин	0,590	Эрготаминин	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов
	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов	0,910	Отсутствует
	0,910	Отсутствует	0,910	Отсутствует	–	–
АС	0,090	Отсутствует	0,090	Отсутствует	0,090	Отсутствует
	0,127	Сетоклавин	0,127	Сетоклавин	0,127	Сетоклавин
	0,135	Отсутствует	0,135	Отсутствует	0,135	Отсутствует
	0,350	α-Эргокриптин	0,350	α-Эргокриптин	0,590	Эрготаминин
	0,590	Эрготаминин	0,590	Эрготаминин	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов
	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов	0,910	Отсутствует
	0,910	Отсутствует	0,910	Отсутствует	–	–
ВС	0,110	Отсутствует	0,110	Отсутствует	0,110	Отсутствует
	0,385	β-Эргокриптин	0,385	β-Эргокриптин	0,385	β-Эргокриптин
	0,590	Эрготаминин	0,590	Эрготаминин	0,590	Эрготаминин
	0,910	Отсутствует	0,910	Отсутствует	0,910	Отсутствует
АВС	0,090	Отсутствует	0,090	Отсутствует	0,090	Отсутствует
	0,127	Сетоклавин	0,127	Сетоклавин	0,120	Отсутствует
	0,135	Отсутствует	0,135	Отсутствует	0,300	Отсутствует
	–	–	0,145	Эрготамин	0,590	Эрготаминин
	0,350	α-Эргокриптин	0,350	α-Эргокриптин	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов
	0,590	Эрготаминин	0,590	Эрготаминин	0,910	Отсутствует
	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов	0,850	Сумма α,β-эргокриптининов	–	–
	0,910	Отсутствует	0,910	Отсутствует	–	–

Примечание: * – см. табл. 2.

Так, на хроматограмме мицелия, выращенного на контрольной питательной среде, обнаруживались зоны, соответствующие стандартам β -эргокриптина и эрготаминина. На средах эксперимента 1, содержащих в своем составе триптофан как единственную аминокислоту, так и в комплексе с другими аминокислотами, обнаруживались зоны, соответствующие стандартам сетоклавина, α -эргокриптину и сумме эргокриптининов. Хроматографическая картина образцов, полученных из мицелия, выращенного на питательных средах, не содержащих триптофан, отличалась от контрольного образца только наличием неидентифицируемых зон, обладающих флуоресценцией, но не окрашиваемых реактивом Ван-Урка.

Оценка хроматографической картины исследуемых образцов эксперимента 2 не показала существенных различий с предыдущим экспериментом, кроме образца, выращенного на среде, содержащей в своем составе все три изучаемые аминокислоты. На хроматограмме этого образца обнаруживались зоны, соответствующие стандартам эрготаминина и эрготаминина, эргокриптининов и эргокриптининов, т.е. всех значимых эргоалкалоидов эргокриптинового штамма.

На хроматографической картине эксперимента 3 отсутствовали зоны, соответствующие стандартам эргоалкалоидов, обнаруженные при других изучаемых уровнях триптофана в питательной среде. Можно предположить, что негативное влияние избыточных концентраций триптофана связано с высокой регуляторной ролью, которую играет как сам триптофан, так и его производные. Вполне вероятно, что высокий уровень триптофана, оказывая негативное влияние на метаболические процессы по принципу обратной связи, подавляет развитие культуры дальше некоего заданного уровня. Это предположение подтверждается тем, что уровень накопления производных индола на средах со сверхвысоким содержанием триптофана был очень низок и на хроматограмме отсутствовали зоны, соответствующие стандартам эргоалкалоидов.

Выводы

В условиях проведенного эксперимента установлено, что присутствие в питательной среде

всех изучаемых аминокислот в концентрациях, равных содержанию их в мицелии и экспериментально рассчитанных, обеспечивает достаточно высокий уровень синтеза мицелием производных индола, в составе которых присутствуют все искомые эргоалкалоиды. Но при этом наблюдается достаточно низкий уровень накопления мицелиальной массы.

Отметим, что не в одном случае не удалось достичь расчетного уровня синтеза эргоалкалоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Niti Sharma, Vinay K. Sharma, Hemanth Kumar Manikya-mand, Acharya Bal Krishna. Ergot Alkaloids: A review on therapeutic applications // *European Journal of Medicinal Plants*. 2016. V. 14. № 3. P. 1–17.
2. Ржевхачек З. Некоторые аспекты регуляции синтеза эргоалкалоидов // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1992. Т. 28. Вып. 6. С. 828–843.
3. Tudzynski P., Correia T., Keller U. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids // *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer-Verlag. 2001. DOI 10.1007/s002530100801.
4. Савина Т.А., Шаин С.С., Быков В.А., Курапов Б.П., Трегубов В.М. Применение методов глубинного культивирования для выращивания инфекционного материала спорыньи *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. // Сб. науч. трудов, посвященный 70-летию Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений. 2000. С. 362–369.
5. Решетилова Т.А., Козловский А.Г. Биосинтез алкалоидов мицелиальными грибами // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1990. Т. 26. Вып. 3. С. 291–306.
6. Соловьева Т.Ф., Баскунов Б.П., Бузилова И.Г., Решетилова Т.А. Экзогенный триптофан как фактор, регулирующий алкалоидообразование у *Penicillium aurantio-virens* Biourge ВКМ F-229 // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1999. Т. 35. № 3. С. 313–318.
7. Барсегян А.Г. Разработка методов селекции и повышения продуктивности штаммов-продуцентов эргоалкалоидов в сапрофитных условиях культивирования: Дис. ... канд. биол. наук. М. 2009. 175 с.
8. Комарова Е.Л., Шаин С.С. Идентификация селекционных штаммов спорыньи по алкалоидному составу индивидуальных склероциев // *Химико-фармацевтический журнал*. 1998. Т. 32. № 8. С. 34–37.
9. Шалагина А.И., Баньковская А.Н., Островский Н.И. О составе алкалоидов, образуемых *Claviceps purpurea* Tul. // *Микробиология*. 1970. Т. XXXIX. С. 67–70.
10. Rumpel W. Einfache serienmabige Bestimmung des Alkaloidwertes von Einzelsklerotien des Mutterkorns // *Farmazie*. 1955. Bd. 10. № 3. P. 204–206.

Поступила 12 октября 2016 г.

THE STUDY OF INFLUENCE OF THE AMINO ACID-PRECURSORS ON THE GROWTH AND BIOSYNTHETIC CHARACTERISTICS OF SAPROPHYTIC STRAINS *CLAVICEPS PURPUREA* (FR.) TUL.

© A.G. Barsegyan, T.A. Savina, 2017

A.G. Barsegyan

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Biotechnology Department,
All-Russia Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: anton.barseg@mail.ru

T.A. Savina

Ph.D. (Biol.), Head of Biotechnology Department, All-Russia Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

The influence of the amino acid-precursors on the growth and biosynthetic characteristics of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. saprophytic culture lab strain E-2409 VILAR was determined. It was found that in the joint presence in substrate of amino acids tryptophan, proline and methionine there is a positive effect both on the amount of ergot alkaloids accumulation and their composition. It has been found that excessive doses of tryptophan have a negative impact on the growth and biosynthetic characteristics of the fungus.

Key words: *saprophytic strain, Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., *tryptophan, proline, methionine, ergot alkaloids, indole derivatives.*

REFERENCES

1. Niti Sharma, Vinay K. Sharma, Hemanth Kumar Manikyamand Acharya Bal Krishna. Ergot Alkaloids: A review on therapeutic applications // European Journal of Medicinal Plants. 2016. V. 14. № 3. P. 1–17.
2. Rzhahachek Z. Nekotoryie aspektyi regulyatsii sinteza ergoalkaloidov // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 1992. T. 28. Vyip. 6. S. 828.
3. Tudzynski P., Correia T., Keller U. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids // Applied Microbiology and Biotechnology. Springer-Verlag. 2001. DOI 10.1007/s002530100801.
4. Savina T.A. Shain S.S., Bykov V.A., Kurapov B.P., Tregubov V.M. Application of submerged cultivation for growing infectious material of ergot *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. // Collection of scientific works dedicated to the 70th anniversary of the All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants. 2000. P. 362–369.
5. Reshetilova T.A., Kozlovskiy A.G. Biosynthesis of alkaloids by mycelial fungi // Applied Biochemistry and Microbiology. 1990. V. 26. № 3. P. 291–306.
6. Solovyova T.F., Baskunov B.P., Buzilova I.G., Reshetilova T.A. Exogenous tryptophan as a regulatory factor in the formation of alkaloids by *Penicillium aurantio-virens* Biourge BKM F-229 // Applied Biochemistry and Microbiology. 1999. V. 35. № 3. P. 313–318.
7. Barsegyan A.G. Development methods of selection and improving productivity of producing strains in saprophytic culture: Dissertation for the degree of candidate of biological sciences. M. 2009. 175 c.
8. Komarova E.L., Shain S.S. Identification of selected strains of ergot by alkaloid composition of individual sclerotia // Chem-Pharm. Journe. 1998. V. 32. № 8. C. 34–37.
9. Shalagina A.I., Bankovskaya A.N., Ostrovskiy N.I. About the structure of alkaloids formed by *Claviceps purpurea* Tul. // Mycobiology. 1970. T. XXXIX. P. 67–70.
10. Rumpel W. Einfache serienmabige Bestimmung des Alkaloidwertes von Einzelsklerotien des Mutterkorns // Farmazie. 1955. Bd. 10. № 3. P. 204–206.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Хелепин (таблетки, мазь) рег. №№ 87/1186/10; 87/1186/7 – противовирусное средство при заболеваниях, вызываемых ДНК-геномными вирусами группы герпеса, получаемое из травы дикорастущего растения леспециды копеечников (*Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag.).

Хелепин Д (таблетки, мазь, глазные капли), рег. №№ 94/108/6; 94/108/7; 99/47/11 – противовирусное средство, получаемое из травы культивируемого растения десмодиума канадского (*Desmodium canadense* D.C.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru