

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЭНДОФИТНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS FISCHERI VOIR*, ИНГИБИРУЮЩИХ АКТИВНОСТЬ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ

Д.М.Рузиева, М.М.Йулдошева, Г.А.Расулова, Т.Г.Гулямова

<https://doi.org/10.5281/zenodo.8367114>

**Аннотация.** Распространенность ожирения растет угрожающими темпами но, к сожалению, в настоящее время на рынке доступно лишь несколько препаратов. В настоящем исследовании представлены данные исследований качественной идентификации и извлечения вторичных метаболитов эндофитного гриба *Aspergillus fischeri VOIR*, выделенного из корня растения *Viola odorata*, обладающие способностью подавлять активность панкреатической липазы. Установлено, что при ступенчатом фракционировании исходного этилацетатного экстракта эндофитного гриба *A.fischeri VOIR* наиболее высокая ингибиторная активность наблюдается в бутанольной фракции и составляет 84,9%. Качественный анализ бутанольной фракции наглядно свидетельствовал о присутствии биоактивных соединений, таких как флавоноиды и пептиды. В результате очистки суммарной бутанольной фракции *A.fischeri VOIR*

т

о

н

**Ключевые слова:** Орлистат, эндофит, вторичные метаболиты, ингибиторная активность, тонкослойная хроматография, флавоноиды.

**Аннотация.** Ҳозирги кунда аҳоли ўртасида семириб кетишининг юқори суръатда ўсиб бориши кузатилмоқда, аммо афсуски, сотувда семиришига қарши санокли дорилар мавжуд. Ушбу тадқиқотда *Viola odorata* ўсимлигининг илдизидан ажратиб олинган *Aspergillus fischeri VOIR* эндофит замбуругининг ошқозон ости беги липазасини ингибирлаш хусусиятига эга бўлган иккиламчи метаболитларни экстракциялаш ва улар ўстида ўтказилган сифат таҳлиллари юзасидан маълумотлар келтирилган. Тадқиқот натижасига кўра, *A.fischeri VOIR* эндофит замбуругининг дастлабки этилацетат экстрактини дифференциал фракциялаш натижасида энг юқори ингибитор фаоллик бутанол фракциясида бўлиб, 84,9% ни ташкил қилди. Бутанол фракцияси сифат таҳлилдан ўтказилганда, биофаол бирикмаларнинг флавоноидлар ва пептидларга тегишли эканлиги аниқланди. *A.fischeri VOIR*нинг умумий бутанол фракциясини юққа қатламли хроматография усулида тозалаш натижасида  $R_f$  0,75 бўлган энг фаол Б-2 фракциясининг ошқозон ости беги липазасига ингибиторлик фаоллиги 57,2 % ни ташкил қилди, сифат таҳлилларига кўра улар флавоноид табиатли моддалар эканлиги маълум бўлди.

о

**Калим сўзлар:** Орлистат, эндофит замбуруг, иккиламчи метаболитлар, ингибитор фаоллик, юққа қатламли хроматография, флавоноидлар.

**Abstract.** The prevalence of obesity is increasing at an alarming rate but, unfortunately, only a few drugs are currently available on the market. The present study presents data on the qualitative identification and extraction of secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus fischeri VOIR* isolated from the root of *Viola odorata*, which have the ability to inhibit the activity of pancreatic lipase. It was found that during stepwise fractionation of the initial ethyl acetate extract of the endophytic fungus *A.fischeri VOIR*, the highest inhibitory activity was observed in the butanol fraction and amounted to 84.9%. Qualitative analysis of butanol fraction

о

т

о

б

р

clearly indicated the presence of bioactive compounds such as flavonoids and peptides. As a result of purification of the total butanol fraction of *A. fischeri* VOIR by thin-layer chromatography, the most active fraction B-2 with  $R_f$  0.75 was selected, the inhibitor activity of which under the given conditions is 57.2% and qualitatively belong to flavonoids.

**Keywords:** Orlistat, endophyte, secondary metabolites, inhibitor activity, thin-layer chromatography, flavonoids.

### Введение

В настоящее время ожирение растет угрожающими темпами. Ожирение является мировой проблемой, которая может способствовать развитию различных заболеваний, таких как дислипидемия, метаболический синдром, гипертония и повышенный риск сердечно-сосудистой смертности [1]. Согласно недавнему докладу Всемирной организации здравоохранения во всем мире более 1 миллиарда взрослых имеют избыточный вес, по крайней мере 300 миллионов из них страдают ожирением [2,3]. Было реализовано несколько стратегий, направленных на поиск методов лечения критической проблемы ожирения. Одним из терапевтических подходов к профилактике ожирения является замедление всасывания жирных кислот путем ингибирования липазы в пищеварительном тракте [4]. Панкреатическая липаза (ПЛ) является первичным пищеварительным ферментом, катализирующим гидролиз сложноэфирных связей три- и диглицеридов до моноглицеридов и свободных жирных кислот. Ингибиторы ПЛ относятся к лекарствам периферического действия, опосредующим прямое снижение всасывания калорий в желудочно-кишечном тракте и влияющим на абсорбцию липидов [5,6]. В настоящее время единственным лекарством от ожирения такого типа, одобренным для длительного применения, является ингибитор липазы Орлистат [7]. Это насыщенное производное липстатина, потенциального природного ингибитора ПЛ, полученного из *Streptomyces toxytricini* [8]. Однако, длительное применение Орлистата сопровождается тяжелыми побочными эффектами, включая гепатотоксичность, камни в желчном пузыре, в почках, острый панкреатит, что требует разработки новых безопасных и эффективных препаратов для лечения ожирения [9].

Исследования микробных натуральных продуктов, в частности, эндофитных грибов лекарственных растений, становится предметом повышенного интереса [10]. Это связано с тем, что эндофиты, это группа микроорганизмов, бессимптомно обитающих внутри тканей растений, признаны как огромный и мало исследованный ресурс уникальных химических структур. В частности, эндофиты антилипидимических растений за счет способности синтезировать те же самые вещества, что и растение-хозяин, в том числе и ингибиторы панкреатической липазы, являются весьма перспективным объектом как альтернативные продуценты гиполипидимических соединений с минимальными побочными эффектами. Перспективность эндофитных грибов, как возможных продуцентов ингибиторов липазы впервые была показана Gupta et al. [11,12] при скрининге культуральных фильтратов 70 эндофитных грибов. Качественный анализ выявил ингибиторный потенциал у изолятов 57TBVALM, 33TBVALM и 1CSSTOT, но только один изолят 57TBBLAM (*Penicillium*), проявлял значение  $IC_{50}$  3.69 мкг/мл, сравнимое с  $IC_{50}$  2.73 мг/мл Орлистата как позитивного контроля [11].

Katosh et al. [13] провели оценку ингибирующей активности 27 изолятов эндофитов, выделенных из *V.odorata*. Согласно полученным ими данным, экстракты семи эндофитов проявляли ингибиторную активность со значением  $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ . Из них наиболее перспективным оказался экстракт VOLF4 (*Aspergillus sp.*), проявляющий ингибиторную активность с  $IC_{50} 3.8 \mu\text{g/mL}$ .

Проведенные нами ранее исследования ингибиторной активности эндофитов, выделенных из различных лекарственных растений, показали, что этилацетатный экстракт эндофита *A.fischeri* VOIR, выделенного из *Viola odorata* на 91,5% подавляет активность панкреатической липазы [14]. Учитывая то, что эндофиты продуцируют различные группы химических соединений, целью настоящей работы было извлечение и идентификация природы ингибиторных метаболитов эндофитного гриба *Aspergillus fischeri* VOIR.

### **Материалы и методы**

**Культивирование.** Эндофитный гриб *Aspergillus fischeri* VOIR выращивали глубинным культивированием на среде Чапека-Докса на качалке при 180 об/мин, в течение 7 дней. Биомассу гриба отделяли от культуральной жидкости и вторичные метаболиты экстрагировали этилацетатом из расчета 1 г биомассы в 5 мл растворителя в течение 24 часов на круговой качалке при 180 об/мин при комнатной температуре. Смесь фильтровали через бумагу (Whatman №1). Экстракты упаривали досуха на вакуумном испарителе и добавляли 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) Полученные экстракты хранили при  $-4^{\circ}\text{C}$  до использования.

**Фракционирование вторичных метаболитов.** Фракционирование вторичных метаболитов из этилацетатного экстракта биомассы эндофитов проводили по схеме, описанной Kumar et al [15], включающей последовательную экстракцию водой, бутанолом, смесью метанола с гексаном (1:1). Экстракты сушили на роторном испарителе и добавляли 1 мл диметилсульфоксида. Полученные сухие экстракты хранили при  $-4^{\circ}\text{C}$  до использования.

### **ТСХ анализ бутанольной фракции *Aspergillus fischeri* VOIR**

Тонкослойную хроматографию экстрактов проводили на пластинках Silicagel on TLCALfoils фирмы SIGMA-ALDRICH. Размер пластин составлял 10x10, 10x15 см в системе: бензол:хлороформ (20:1) в стандартной хроматографической камере. 25 мкл экстракта наносили на пластинки вручную микрошприцем на расстоянии 1 см от нижнего края. Пластинку с нанесенными веществами погружали в предварительно насыщенную парами подвижной фазы камеру. Хроматографические полосы после разделения выскабливали и экстрагировали в бутаноле. Изображение пластинки проводили в УФ-свете при длине волны 254 нм.

**Определение ингибиторной ПЛ активности фракций.** 50 мг липазы ("Sigma", 60 ед/мл) суспендировали в 10 мл трис-НСl буфера, содержащего 2,5 мМ трис и 2,5 мМ NaCl, рН 7,4. Раствор интенсивно встряхивали в течение 15 мин и центрифугировали при 4000 об/мин 10 мин и отбирали супернатант. Исходные растворы экстрактов и стандарта Ксеникала готовили в ДМСО с линейными концентрациями в диапазоне 2–2000 мкг/мл. Конечная реакционная смеси состояла из 875 мкл буфера, 100 мкл фермента и 20 мкл экстракта в различной исходной концентрации, предварительно инкубированных в течение 5 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  с последующим добавлением 10 мкл субстрата (4-нитрофенилпальмитата в 10 мМ в ацетонитриле). Количество ДМСО в конечной концентрации не превышало 2%.

Оптическую смесь измеряли на спектрофотометре (УФ-вид модели UV-5100) через 5 минут при 405 нм [16]. Процент ингибирования рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = (A_e - A_t) / A_e \times 100$$

где  $A_e$  - оптическая плотность ферментного контроля (без ингибитора), а  $A_t$  - разница между оптической плотностью исследуемого образца с субстратом и без него. В качестве препарата сравнения использовали Ксеникал.

#### ***Определение качественного состава экстрактов вторичных метаболитов эндофитных грибов.***

Качественный состав соединений в экстрактах эндофитных грибов определяли фитохимическими методами по Visweswari [17].

Наличие танинов и фенольных веществ определяли путем добавления к 2 мл полученного экстракта 2-3 капель 1% раствора  $FeCl_3$ . В присутствии ионов железа танины дают черно-синий или черно-зеленый цвет, фенолы - фиолетовый.

Наличие сапонинов устанавливали путем растворения 1 мл экстракта в 5 мл горячей воды ( $60^\circ C$ ) с дальнейшим интенсивным встряхиванием в течение 5 минут до образования стойкой пены. Объем пены сохранялся в течении последующих 30 минут.

Наличие терпеноидов определяли путем смешивания 0,5 мл экстракта с 2 мл хлороформа и 3 мл  $H_2SO_4$  (конц.) Образование между фазами красно-коричневого окрашивания говорило о наличии терпеноидов.

Наличие антрахинонов устанавливали смешиванием 2 мл экстракта с 4 мл гексана и последующим встряхиванием. При этом наблюдалось разделение экстракта на 2 слоя. Верхний слой отделяли, обрабатывали 4 мл разведенного 10% аммиака и определяли окраску нижнего слоя. Фиолетово-розовая окраска говорила о наличии антрахинонов.

Наличие сердечных гликозидов определяли путем смешивания 1 мл экстракта с 1 мл ледяной уксусной кислоты и последующим добавлением 1 капли 3% хлорида железа в метаноле. Затем добавляли по стенке пробирки  $H_2SO_4$  (конц.) и определяли окраску нижнего слоя. Сине-зеленое окрашивание говорило о наличии сердечных гликозидов.

Наличие алкалоидов основаны на способности алкалоидов образовывать не растворимые в воде соединения с солями тяжелых металлов, с комплексными йодидами, комплексными кислотами и другими соединениями кислотного характера. Эти реакции позволяют установить наличие алкалоидов даже при незначительном их содержании. Раствор йода в растворе калия йодида (реактив Вагнера, реактив Бушарда) с алкалоидами образуют бурые, трудно растворимые в воде осадки. К 1 мл экстракта добавляют 5 капель реактива для осаждения алкалоидов. При наличии алкалоидов появляется бурый осадок.

Тест на пептиды: к 2 мл каждого экстракта добавляли 1 мл 40 % гидроксида натрия и несколько капель 1% сульфата меди; образование фиолетового-голубого цвета указывает на присутствие молекул пептидной связи в экстракте образца.

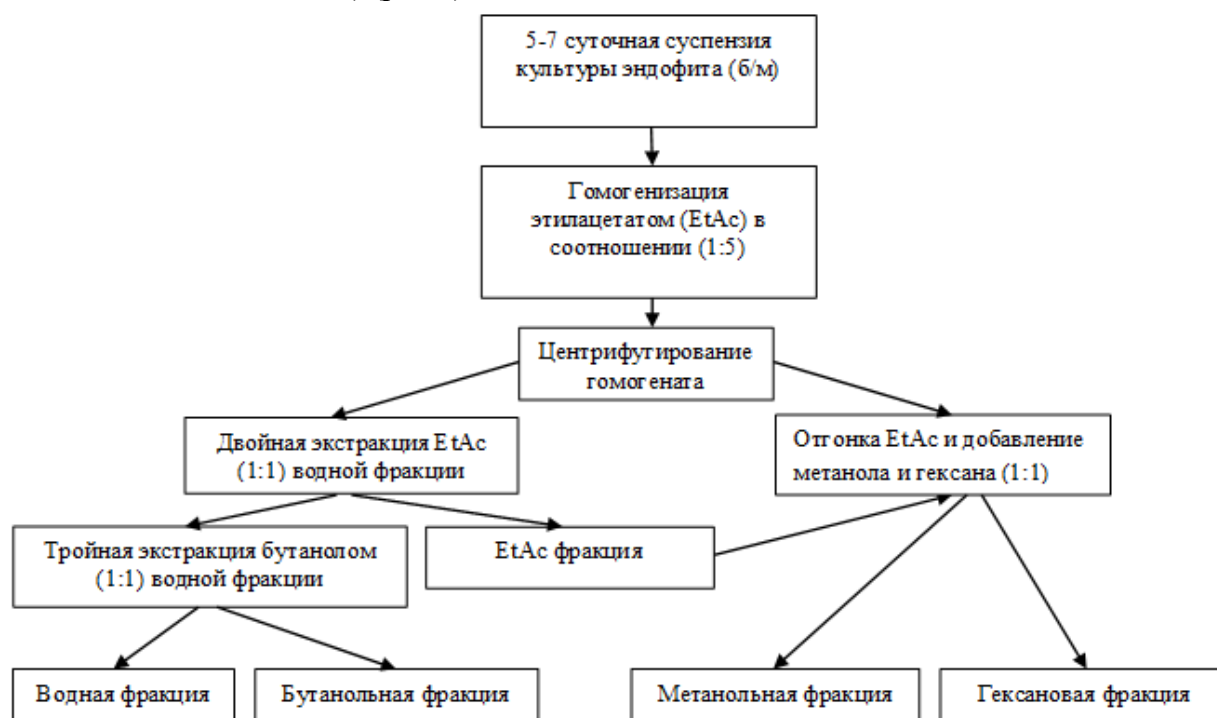
Тест на флавоноиды: к 2 мл каждого экстракта добавляли несколько капель 20% гидроксида натрия, наблюдается образование интенсивного желтого цвета. К нему было добавляем несколько капель 70% разбавленной соляной кислоты и желтый цвет исчезает. Образование и исчезновение желтого цвета указывает на присутствие флавоноидов.

Все эксперименты проводили в 3-х повторностях.

#### **Результаты и обсуждение**

Проведенные ранее нами исследования, по изучению состава и свойств внутриклеточных метаболитов эндофитного гриба *A.fischeriVOIR*, ингибирующей активность панкреатической липазы, показали наиболее высокое значение ингибиторной активности – 91,5 % в этилацетатном экстракте. Учитывая то, что эндофиты продуцируют различные группы химических соединений, нами проведено извлечение активных ингибиторных метаболитов из этилацетатного экстракта биомассы *Aspergillus fischeriVOIR* методом ступенчатого фракционирования и определение их природы.

Разделение вторичных метаболитов проводили по схеме, предложенной Kumar et al [18], включающей последовательную экстракцию исходного этилацетатного экстракта, водой, смесью метанола с гексаном (1:1) и бутанолом. В результате из исходного этилацетатного экстракта было получено четыре фракции (водная, бутанольная, метанольная и гексановая) (рис.1).



**Рис.1. Схема очистки вторичных метаболитов исходного этилацетатного экстракта *A.fischeriVOIR* методом дифференциального фракционирования в различных растворителях. (Kumar et al. 2013)**

Как видно из данных, представленных на рис.2, исходное содержание сухих экстрактивных веществ в этилацетатном экстракте составляло 65 мг/г биомассы, а ингибиторная активность к панкреатической липазе – 91,5%. При фракционировании суммарного этилацетатного экстракта органическими растворителями с различной полярностью в бутанольную фракцию извлекается основная часть метаболитов этилацетатного экстракта – 35 мг/г биомассы с ингибиторной активностью 84,9%. Водой фракционируются 8,5 мг/г биомассы с активностью - 39,6%. Низкий уровень экстрактивных веществ - 4 мг/г и 4,2 мг/г биомассы с ингибиторной активностью – 29,8% и 12,2%, наблюдается в гексановой и метанольной фракциях, соответственно.





**Рис.2. Выход вторичных метаболитов и их ингибиторная активность экстрактов, полученных фракционированием исходного этилацетатного экстракта *A.fischeriVOIR***

Фитохимический анализ состава компонентов, присутствующих в бутанольной фракции, показал, что из девяти определяемых химических классов соединений (терпеноиды, фенолы, антрахиноны, сердечные гликозиды, танины, флавоноиды, сапонины, пептиды и алкалоиды) в бутанольной фракции обнаруживаются флавоноиды и пептиды (таблица 1).

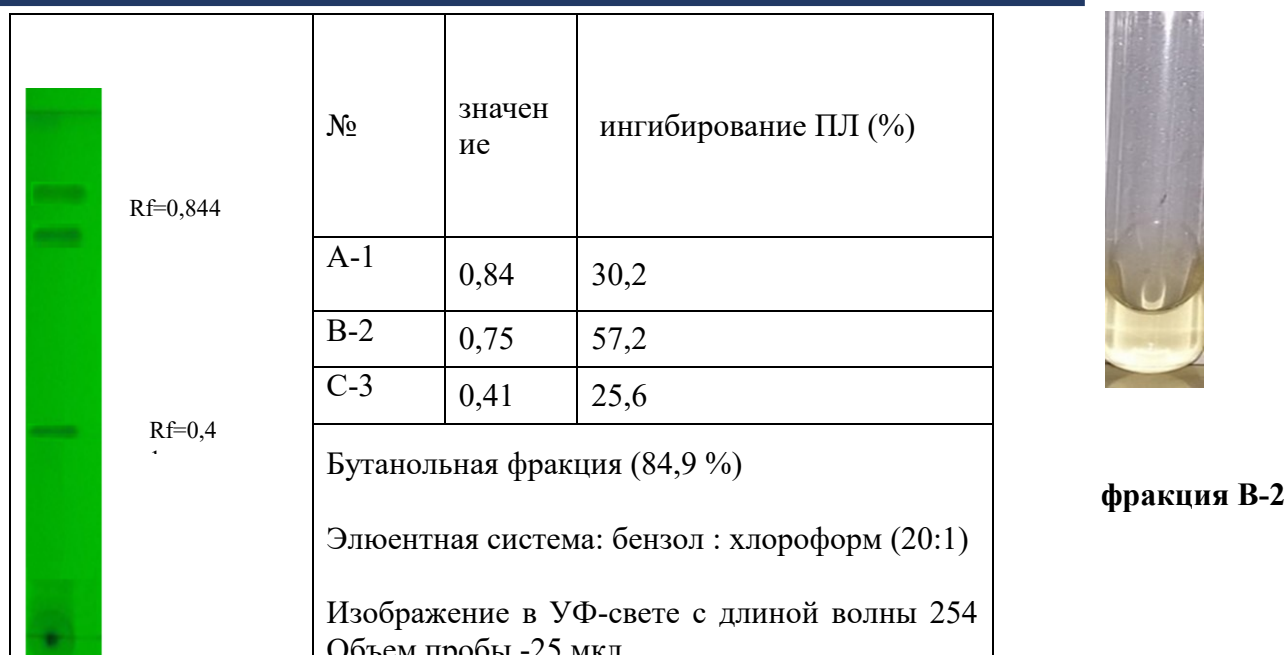
**Таблица 1.**

**Фитохимический анализ бутанольной фракции *A.fischeriVOIR***

Терпеноиды	Антрахиноны	Флавоноиды	Пептиды	Сердечные гликозиды	Сапонины	Алкалоиды	Фенолы	Танины
—	—			—	—	—	—	—

Для идентификации ингибиторного соединения бутанольную фракцию эндофитного гриба *A.fischeriVOIR*, разделяли тонкослойной хроматографией в системе бензол : хлороформ (20:1).

**ТСХ анализ бутанольной фракции эндофитного гриба *A.fischeriVOIR***



**Рис.3** Разделение вторичных метаболитов бутанольной фракции эндофитного гриба *A. fischeriVOIR*

Результаты хроматографирования показали четкое разделение бутанольной фракции на 3 полосы с различными значениями Rf. Определение ингибиторной ПЛ активности каждой из фракций показало значения ингибиторной активности 30,2%, 25,6%, и самый высокий уровень активности, составляющий 57,2%, принадлежал пробе В-2. (рис.3).

Качественный анализ фракции В-2 показал положительную реакцию на флавоноиды, о чем свидетельствует окрашивание пробы в желтый цвет при добавлении 20% раствора NaOH (рис.3)

Таким образом, ингибирование липазы суммой вторичных метаболитов *A. fischeriVOIR* связано с веществами флавоноидной природы. Следует отметить, что в течение последних 20 лет флавоноидам уделяется большое внимание в связи с их разнообразными биоактивными свойствами, как это показано на примере высокой противовирусной эффективности глицирризина и хризина против ВИЧ [19-20].

Результаты наших исследований согласуются с данными литературы, в которых сообщается об ПЛ-ингибирующих свойствах флавоноидов эндофитных грибов *Aspergillus nidulans* и *Aspergillus oryzae*, выделенных из *Ginkgo biloba L* [21].

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что эндофит *A. fischeriVOIR* продуцирует соединения флавоноидной природы с высокой ПЛ-ингибирующей активностью и может рассматриваться как потенциальный источник для получения натуральных препаратов от ожирения.

## REFERENCES

1. World Health Organization (2015) Global health observatory data, risk concerns.
2. Arbeeny C.M. Addressing the unmet medical need for safe and effective weight loss therapies. *Obes. Res.* 2004, 12, 1191–1196. [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)]
3. Harrold J., Williams G., Wong S. Neuroendocrine targets for the treatment of obesity: physiological roles and unrealized opportunities. *Curr Med Chem* 2003, 3, 141–155. [[Crossref](#)], [[Google Scholar](#)]

4. Lowe M.E. Pancreatic triglyceride lipase and colipase: insights into dietary fat digestion. *Gastroenterology*. 1994;107:1524–36.
5. Elangham C.S. Current strategies in the development of anti-obesity drugs and their safety concerns. *Vet.Pathol.* 46:10-24, 2009
6. Colon-Gonzalez F., Kim G.W., Lin J.E., Valentino M.A., Waldman S.A. Obesity pharmacotherapy: what is next? *Mol Asp Med*. 2013;34:71–83.
1. 7.Orlistat (marketed as Alli and Xenical) Information. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm180076.htm>
7. Weibel E.K., Hadvary P., Hochuli E., Kupfer E., Lengsfeld H. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot*. 1987;40:1081–5.
8. Drent M.L., van der Veen, E.A. Lipase inhibition: a novel concept in the treatment of obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 1993, 17, 241–244. [[Google Scholar](#)]
9. Dias D.A., Urban S., Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Meta*. 2012;2:303–36.
10. Gupta M., Saxena S., Goyal D. Potential pancreatic lipase inhibitory activity of an endophytic *Penicillium* species. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2015;30:15–21
11. Gupta M., Saxena S., Goyal D. Lipase inhibitory activity of an endophytic fungal species of *Aegle marmelos*: a bioresource for potential pancreatic lipase inhibitors. *Symbiosis*. 2014; 64:149–57.
12. M.Katoch, A.Paul, G.Singh and S.N.C. Sridhar. Fungal endophytes associated with *Viola odorata* Linn. as bioresource for pancreatic lipase inhibitors. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2017) 17:385
13. Gulyamova T.G., Ruzieva D.M., Yoldosheva M.M., Rasulova G.A., Kondrasheva K.V. Screening of Pancreatic Lipase Inhibitors of Endophytic Fungi of Medicinal Plants in Uzbekistan. *Biosci Biotech Res Asia* 2022, Vol. 19(4), p. 1037-1044
14. Susheel Kumar, Nutan Kaushik. Endophytic Fungi Isolated from Oil-Seed Crop *Jatropha curcas* Produces Oil and Exhibit Antifungal Activity. 2013; Vol 8 (2 ) e56202 doi:10.1371/journal.pone.0056202
15. Katoch, A.Paul, G. Singh and S.N.C.Sridhar. Fungal endophytes associated with *Viola odorata* Linn. as bioresource for pancreatic lipase inhibitors Katoch et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2017) 17:385 DOI 10.1186/s12906-017-1893-y.
16. Visweswari G., Christopher R., Rajendra W. Phytochemical screening of active metabolites present in *Withania Somnifera* root: Role in traditional medicine. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 2013;4(7):2770-2776.
17. Kumar S., Kaushik N. (2013) Endophytic Fungi Isolated from Oil-Seed Crop *Jatropha curcas* Produces Oil and Exhibit Antifungal Activity. *PLoS ONE* 8(2): e56202. doi:10.1371/journal.pone.0056202
18. R.Ushasri and R.Anusha. In vitro anti-diabetic activity of ethanolic and acetone extracts of endophytic fungi *Syncephalastrum racemosum* isolated from the seaweed *Gracilaria corticata* by alpha-amylase inhibition assay method. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2015) 4(1): 254-259.



19. S.J.Higginbotham\*, A.E.Arnold, A.Ibanez, C. Spadafora, P.D. Coley, T.A.Kursar. Bioactivity of Fungal Endophytes as a Function of Endophyte Taxonomy and the Taxonomy and Distribution of Their Host Plants. PLOS one, September 2013, V. 8, 9,1-119.
20. [Min Qiu](#), [Rui-sheng Xie](#), [Yu Shi](#), [Haihua Zhang](#) & [Hai-min Chen](#). Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. [Annals of Microbiology](#) volume 60, pages143–150 (2010).