

МЕТАБОЛОМИКА ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*

Т.В. Антипова

к.б.н., ст. науч. сотрудник,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ)
обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН (г. Пущино)

В.П. Желифонова

к.б.н., ст. науч. сотрудник, ФИЦ ПНЦБИ РАН ИБФМ РАН (г. Пущино)

А.Г. Козловский

д.б.н., вед. науч. сотрудник, ФИЦ ПНЦБИ РАН ИБФМ РАН (г. Пущино)
E-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Исследован метаболом 113 штаммов грибов рода *Penicillium*, выделенных из различных мест обитания. Профили вторичных метаболитов были успешно применены для видовой идентификации штаммов. У отдельных штаммов, выделенных из современных мест обитания, наблюдался более полный спектр вторичных метаболитов по сравнению со штаммами, выделенными из древних многолетнемерзлых отложений. Найдены новые продуценты биологически активных соединений, которые могут быть перспективны для биотехнологии лекарственных средств.

Ключевые слова: метаболом, хемотаксономия, вторичные метаболиты, биологическая активность.

Для цитирования: Антипова Т.В., Желифонова В.П., Козловский А.Г. Метаболомика грибов рода *Penicillium*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(7):11–19. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-07-02>

Изучение метаболома грибов рода *Penicillium* представляет интерес в связи с широким распространением их в окружающей среде и биосинтезом ими различных биологически активных соединений, обладающих противоопухолевой, антимикробной, гиполипидомической и другими активностями. Из общей численности грибной микрофлоры пенициллы являются одними из наиболее широко распространённых в мире грибов. Естественной средой обитания пенициллов является почва северных широт. Эти грибы, способные колонизировать различные субстраты, в основном растительного происхождения, встречаются в воде, воздухе предприятий по переработке сельскохозяйственной продукции и др. Интерес к таким грибам возник в начале прошлого столетия в результате открытия их способности синтезировать в процессе своей жизнедеятельности биологически активные вещества, которые подавляли рост различных бактерий или ослабляли их развитие. Открытие и применение пенициллина в борьбе с различными инфекционными заболеваниями и воспалительными процессами явилось мощным стимулом для поиска новых, еще более эффективных антибиотических веществ, образуемых различными группами микроорганизмов. В настоящее время множество вторичных метаболитов из пенициллов были выделено и охарактеризовано, многие из которых нашли применения в фарма-

цевтике. Например, важными соединениями, синтезируемыми пенициллами, являются противогрибковый препарат гризеофульвин, иммунодепрессант микофеноловая кислота и препарат для снижения уровня холестерина компактин/мевастатин [1]. Эти примеры иллюстрируют большое значение пенициллов как источников биологически активных соединений, которые находят медицинское применение. Однако некоторые виды грибов рода *Penicillium* могут также продуцировать микотоксины, такие как цитринин, охратоксин и патулин, которые могут представлять опасность для здоровья людей и животных.

В последнее время, благодаря усовершенствованию методов биоинформационного анализа, были идентифицированы гены, участвующие в синтезе вторичных метаболитов. Установлено, что гены синтеза вторичных метаболитов организованы в биосинтетические кластеры генов (BGGs), которые находятся под контролем регуляторов транскрипции (представляющие собой ДНК-связанные белки), действующие либо специфично на гены внутри кластера, либо также и на гены общих метаболических путей [2]. BGGs состоят из основного гена, преимущественно поликетидсинтазы (PKSs) или нерибосомальной пептидсинтазы (NRPS), которые полимеризуют мономеры – короткие молекулы кислот или аминокислот соответственно. Недавнее секвенирование полных

грибных геномов показало, что многие кластеры генов находятся в «спящем» состоянии, и, очевидно, полный биосинтетический потенциал биоактивных молекул грибов до сих пор не известен.

В последнее десятилетие возобновление интереса к открытию новых соединений усилилось, благодаря появлению новых стратегий и методологий. Производительность масс-спектрометров постоянно улучшается, обеспечивается легкий доступ исследователям к спектрам как в положительной, так и в отрицательной ионизации. Использование ультрафиолетовой спектральной информации также важно в процессе установления структуры соединений [3].

В соответствии с новейшей полифазной таксономией профили вторичных метаболитов, наряду с микро-, макроморфологическими и филогенетическими признаками, используются при видовой идентификации пенициллов [4, 5]. Применение вторичных метаболитов для хемотаксономии основывается на эмпирическом наблюдении наличия общих физиологических и биохимических характеристик у филогенетически родственных организмов. Видовая идентификация по морфологическим признакам пенициллов, выделенных из природных субстратов, часто затруднена. Например, у свежих изолятов из низкотемпературных экотопов наблюдается смещение температурного ростового оптимума в сторону более низких температур по сравнению с типовыми штаммами. Кроме того, из-за наличия общих межвидовых морфологических признаков идентификация некоторых близких видов затруднена, но возможна по продукции вторичных метаболитов, имеющих диагностическое значение. Поэтому метаболитные профили, полученные с помощью хроматографии, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии, являются наиболее простым способом получения информативных данных, которые можно использовать для целей таксономии грибов.

Ц е л ь р а б о т ы – обобщение полученных данных по использованию метаболома в видовой идентификации пенициллов и обнаружению новых продуцентов биологически активных соединений.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТАБОЛОМА ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЕНИЦИЛЛОВ

Исследованные штаммы получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ИБФМ РАН (www.vkm.ru). При изучении продук-

ции вторичных метаболитов штаммы культивировали в жидких средах [6, 7]. Метаболиты кислой и щелочной природы извлекали из фильтрата культуральной жидкости трехкратной экстракцией хлороформом при pH 3 и pH 8 соответственно. Анализ экстрактов осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках силикагеля в различных системах растворителей [6]. Вещества обнаруживали по поглощению и флуоресценции в УФ-свете (254 и 360 нм) и после опрыскивания пластин реактивом Драгендорфа для обнаружения азотсодержащих метаболитов, реактивом Эрлиха – индольных алкалоидов и 5%-раствором FeCl₃ в метаноле – фенольной группы. Выделение и очистку метаболитов проводили препаративной ТСХ на пластинах силикагеля. Идентификацию метаболитов осуществляли совместной хроматографией со стандартными образцами, а также сравнением данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии с данными из литературных источников [8] и баз данных (<http://dnpc.chemnetbase.com>). УФ-спектры соединений в метаноле получали на спектрофотометре UV-160A (“Shimadzu”, Япония). Масс-спектры соединений регистрировали на квадрупольном масс-спектрометре LCQ Advantage MAX (“Thermo Finnigan”, Германия), используя одноканальный шприцевой насос для прямого ввода образца в камеру для химической ионизации при атмосферном давлении. Сбор и обработку масс-спектрометрических данных осуществляли с помощью программного обеспечения Xcalibur. Более полную информацию по структуре экзометаболитов получали при анализе МС/МС спектров при энергии коллизии 20–40% как в положительных, так и в отрицательных ионах.

В настоящее время наиболее полно изучены видовые хемотаксономические метаболиты у грибов подрода *Penicillium* [4]. Это связано с повсеместным распространением их в природе и биосинтезом различных микотоксинов. Они являются контаминантами продуктов питания и кормов, активными деструкторами полимеров, выводя из строя приборы и оборудование. Были исследованы профили вторичных метаболитов грибов этого подрода, выделенных из экосистем высоких широт, включая многолетнемерзлые отложения Арктики, мерзлые вулканические пеплы, ископаемую лошадь, криопэги, верхний слой антарктических грунтов и воду антарктического озера [6, 7, 9–13]. Исследования профилей вторичных метаболитов

проводились также у штаммов грибов, выделенных на сыродельных и мясоперерабатывающих предприятиях России [14].

Исследование вторичных метаболитов у грибов, выделенных из экосистем высоких широт, показало, что изученные штаммы по спектру синтезированных метаболитов можно разделить на две группы.

У первой группы идентифицированы основные диагностические маркерные метаболиты видов (табл.). Биосинтез анацина, виридикатинов, ругулозурина В и циклопенинов штаммами ВКМ F-4791, ВКМ F-4792, ВКМ F-4793 и ВКМ F-4803 соответствовал виду *P. polonicum*. Биосинтез виридикатинов, рокефортинов С и D и циклопенинов штаммами ВКМ F-4797 и ВКМ F-4810 позволил отнести их к виду *P. crustosum*. Спектр синтезированных метаболитов штаммом ВКМ F-4798 (коммунезин В, рокефортин С и хетоглобозин А) характерен для вида *P. expansum*. Биосинтез фестуклафина, фумигаклавинов А и В, циклопиазеновой кислоты (ЦПК) штаммом ВКМ F-4802, выделенного из грунта вблизи нефтебазы в Антарктиде, и штаммов ВКМ F-4462 и ВКМ F-4464, выделенных из мерзлых вулканических пеплов Камчатки однозначно указывал на вид *P. palitans*. Биосинтез микофеноловой кислоты (МФК) и рокефортина С, а также хороший рост на среде Чапека–Докса с 0,5%-ной уксусной кислотой штамма ВКМ F-4795 свидетельствовал о принадлежности к виду *P. roqueforti*. Штаммы ВКМ F-4453 и ВКМ FW-2648 характеризовались небольшой скоростью роста, психротолерантностью, а штамм ВКМ F-4453 – и галотолерантностью. Обнаружение продукции фумихиназолинов F и G, РС-2 и микроморфологические признаки этих штаммов подтверждают их принадлежность к виду *P. thymicola* – новому виду, отнесенному Фрисвадом и Самсоном к секции *Viridicata* серии *Verrucosa*. В настоящее время известно всего лишь несколько штаммов вида *P. thymicola*, которые были выделены в различных географических регионах из воздуха, гербарного материала и почвы [4]. Штамм ВКМ F-4453 был выделен в Арктике из воды криопэга с датировкой 100–120 тыс. лет, а ВКМ FW-2648 – из современного мерзлого грунта на Колыме [12].

У второй группы штаммов спектр идентифицированных метаболитов представлен одним соединением (см. табл.). У штаммов ВКМ

FW-1447, ВКМ F-4460, ВКМ F-4461, ВКМ F-4463, ВКМ F-4465, ВКМ F-4466, ВКМ ВКМ F-4433, ВКМ F-4423, ВКМ F-4421, ВКМ F-4424 идентифицирована только ЦПК. Продукция только ЦПК характерна для одного вида *P. camemberti*. Для других видов пенициллов серии *Camemberti*, продуцирующих ЦПК, хемотаксономическими маркерами выступают и другие соединения: для *P. commune* – ругулолазины, для *P. palitans* – фумигаклавины. Принимая в расчет выраженные культурально-морфологические признаки и тот факт, что способность к синтезу ругулолазинов могла быть утрачена при длительном выживании (более 100 тыс. лет) в многолетнемерзлых отложениях, все вышеперечисленные штаммы были отнесены к виду *P. commune*. У ВКМ F-4799 идентифицирована ЦПК, а у штаммов ВКМ F-4397, ВКМ F-4399, ВКМ F-4400, ВКМ F-4407 идентифицированы фумигаклавины А и Б, фестуклафин, являющиеся хемотаксономическими маркерами вида *P. palitans*. Биосинтез МФК штаммом ВКМ F-4801 указывал на вид *P. brevicompactum*. У штамма ВКМ F-4800 обнаружен только аурантиамин. Это соединение – хемотаксономический маркер видов *P. aurantiogriseum*, *P. frei* и *P. cavernicola*, может также встречаться у *P. neoehinulatum*. На основании морфологических признаков и биосинтеза аурантиамина этот штамм отнесен к виду *P. aurantiogriseum*.

По морфологическим признакам штаммы ВКМ F-4456, ВКМ FW-2604, ВКМ F-4458, ВКМ F-4459, ВКМ F-4467, ВКМ F-4468, выделенные из разновозрастных отложений Арктики и Антарктиды, отнесены к секции *Viridicata*. Идентификация видов в этой секции часто проблематична из-за наличия общих межвидовых морфологических признаков, в связи с чем особый смысл имеет определение способности штаммов к продукции вторичных метаболитов, имеющих диагностическое значение. У изученных штаммов идентифицированы вещества одного метаболического семейства – циклопенины и виридикатины. В серии *Viridicata* эти соединения служат хемотаксономическими маркерами видов *P. cyclopium* Westling, *P. frei* Frisvad et Samson, *P. neoehinulatum* (Frisvad, Filtenborg et Wicklow) Frisvad et Samson, *P. polonicum* Zalessky; а в серии *Solita* – видов *P. discolor* Frisvad et Samson, *P. echinulatum* Fassatiouva и *P. solitum* Westling.

Таблица. Метаболом исследованных грибов рода *Penicillium*

| Вид | Число штаммов | Диагностические метаболиты [4, 5] | Идентифицированные метаболиты |
|-------------------------------------|---------------|--|---|
| <i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx | 1 | Анацин, аурантин, аурантиамина, пеницилловая кислота, веррукозидины, псеуротины, террестовая кислота | Аурантиамин [6] |
| <i>P. brevicompactum</i> Dierckx | 4 | Микофеноловые кислоты, бревианамид А, Растрик фенолы | Микофеноловая кислота [6, 14] |
| <i>P. chrysogenum</i> Thom | 18 | Хризогины, рокефортины, мелеагрин, пенициллины, ксантоциллин X | Хризогины, рокефортины, мелеагрин, пенициллин G, квестимицин А, ксантоциллин X [7] |
| <i>P. citreonigrum</i> Dierckx | 1 | Цитреовиридин | Цитреовиридин [6] |
| <i>P. citrinum</i> Biourge | 5 | Цитринин, хинолактаины, цитринадины | Цитринин, циклоцитринол [17]; Эпоксиягроклавин-I, агроклавин-I, хиноцитринины А и Б (хинолактаины) [19] |
| <i>P. commune</i> Thom | 17 | ЦПК, ругуловазины, виридикатины | ЦПК, ругуловазины [11, 12, 14] |
| <i>P. corylophyllum</i> Dierckx | 1 | Хинолактаины | Эпоксиягроклавин-I, агроклавин-I, хиноцитринины А и Б (хинолактаины) [19] |
| <i>P. crustosum</i> Thom | 2 | Циклопенол, рокефортины, террестовая кислота, пенинтрем А | Рокефортины С и D, циклопенол, циклопенин, циклопептин, виридикатин, 3-метоксивиридикатин [6] |
| <i>P. expansum</i> Link | 1 | Патулин, рокефортин С, коммунезины, хетоглобозины, цитринин | Коммунезин В, хетоглобозин А, рокефортин С [6] |
| <i>P. griseofulvum</i> Dierckx | 1 | Гризеофульвин, патулин, рокефортин, ЦПК, циклопиамин, циклопиамид, пенициллин | Гризеофульвин [12] |
| <i>P. nalgiovense</i> Laxa | 10 | Хризогины, пенициллины | Хризогины, пенициллин G [7, 15] |
| <i>P. palitans</i> Westling | 7 | ЦПК, фумигаклавины, палитантин | ЦПК, фумигаклавины А и Б, фестуклавин [6, 10, 12] |
| <i>P. polonicum</i> Zalessky | 6 | Пеницилловая кислота, анацин, циклопенин, циклопептин, виридикатины, ругулозувин Б | Анацин, циклопенин, циклопептин, виридикатин, 3-метоксивиридикатин, ругулозувин Б [6, 14] |
| <i>P. restrictum</i> Gilman, Abbott | 1 | – | Андрастины А и С, фоменон [6] |
| <i>P. roqueforti</i> Thom | 6 | Рокефортины, изофумигаклавины, микофеноловая кислота, PR-токсин | Рокефортины С и D, изофумигаклавины А и Б, фестуклавин, микофеноловая кислота, PR-токсин [6, 14, 15] |
| <i>P. sizovae</i> Baghdadi | 1 | Хинолактаины | Эпоксиягроклавин-I, агроклавин-I, хиноцитринины А и Б (хинолактаины) [19] |
| <i>P. solitum</i> Westling | 7 | Циклопенин, циклопептин, виридикатин, палитантин, компактины | Циклопенин, циклопептин, виридикатин, 3-метоксивиридикатин, N-ацетилтриптамин [1, 6] |
| <i>P. thymicola</i> Frisvad, Samson | 2 | Фумихиназолин F, PC-2 | Фумихиназолины F и G, PC-2 [12, 13] |
| <i>P. variable</i> Sopp | 15 | – | Ругуловазины А и В [8, 16] |
| <i>P. verrucosum</i> Dierckx | 7 | Охратоксины А и Б, цитринин | Охратоксины А и В, цитринин [10, 15] |

Морфологические признаки, проявляемые на диагностических средах, адаптированных к искусственным условиям поддержания культур, а также биосинтез циклопенинов и виридикатинов, позволили отнести эти штаммы к виду *P. solitum*. Биосинтез N-ацетилтриптамина, виридикатинов и циклопенинов штаммом ВКМ F-4804, выделенного из грунта, загрязненного нефтепродуктами на острове Кинг-Джордж в Антарктиде, также позволил отнести этот вид к *P. solitum*. Для остальных видов, продуцирующих циклопенины и виридикатины, в состав маркерных метаболитов входят и другие соединения. Так, для вида *P. discolor* обязателен биосинтез хетоглобозина А, для *P. neoechinulatum* – пеницилловой кислоты и аурантиамина, для *P. polonicum* – пеницилловой кислоты, веррукофортинов (пуберулинов), виридикатов и анацина, для *P. cyclopium* – пеницилловой кислоты и веррукофортинов, для *P. freii* – пеницилловой кислоты и аурантиамина. Штамм *P. griseofulvum* ВКМ F-4455 синтезировал поликетидный метаболит – гризеофульвин, что подтверждает видовое наименование этого штамма. Штаммы ВКМ F-4415–4419 синтезировали охратоксины А и В. У штаммов ВКМ F-4415 и ВКМ F-4416 другими исследователями была обнаружена продукция цитринина [15]. Охратоксин А служит хемотаксономическим маркером только у двух видов – *P. verrucosum* и *P. nordicum* [4]. Близкие по микроморфологическим и большинству макроморфологических признаков эти виды различаются цветом реверса на среде YES и спектром вторичных метаболитов. Некоторые изоляты *P. verrucosum*, кроме охратоксина А, способны также синтезировать цитринин и верруколон, в то время как у *P. nordicum* хемотаксономическим маркером, кроме охратоксина А и верруколлона, выступает также анацин. Красно-коричневый реверс на агаризованной среде YES, биосинтез охратоксинов и цитринина штаммами ВКМ F- 4415 – 4419, несомненно, свидетельствуют о принадлежности данных культур к виду *P. verrucosum*.

Обнаруженные профили вторичных метаболитов у относящихся к секции *Chrysogena* штаммов пенициллов, выделенных из низкотемпературных экотопов, входили в число маркерных признаков для видов секции *Chrysogena* – *P. chrysogenum* Thom, *P. nalgiovense* Лаха и вида *P. persicinum* L. Wang et al. [5]. Известно, что для *P. chrysogenum* хемотаксономическими маркерами служат пенициллин G, хризогинины, рокефортины,

мелеагрин, показана возможность продукции ксантоциллинов и PR-токсина, для *P. nalgiovense* – пенициллин G, хризогинины, налгиовензин, налгиолаксин, диапортин, диподазин, тогда как для *P. persicinum* – рокефортины и гризеофульфин. По спектру метаболитов виду *P. chrysogenum* полностью соответствовали штаммы ВКМ F-4601, ВКМ F-4603, ВКМ F-4505, ВКМ F-4610 и ВКМ F-4614 [7]. У 13 исследованных штаммов микро- и макроморфологические признаки соответствовали виду *P. chrysogenum*, но биосинтеза пенициллина G, обязательного для этого вида, не наблюдалось. Из хемотаксономических маркеров у них идентифицированы различные хризогинины, а спектр рокефортинов варьировал. Так, у штаммов ВКМ F-4598, ВКМ F-4600, ВКМ F-4605, ВКМ F-4611 идентифицированы рокефортин и мелеагрин, а у штаммов ВКМ F-4612 и ВКМ F-4613 обнаружены дополнительно гландиколины А и Б. Биосинтез хризогининов и рокефортина штаммами ВКМ F-4596, ВКМ F-4599, ВКМ F-4602, ВКМ F-4604, ВКМ F-4607 и ВКМ F-4428 свидетельствовал о принадлежности их к виду *P. persicinum*. Однако у них не идентифицирован другой обязательный хемотаксономический маркер вида – гризеофульвин, а макро- и микроморфологические признаки больше соответствовали виду *P. chrysogenum*, а не *P. persicinum*. Биосинтез пенициллина G и хризогининов у штаммов ВКМ F-4597, ВКМ F-4606 и ВКМ F-4429 однозначно указывал на принадлежность их к виду *P. nalgiovense*, несмотря на то, что у них не были идентифицированы другие маркеры данного вида – налгиовензин, налгиолаксин, диапортины, диподазин. Идентификация штаммов ВКМ F-4435 и ВКМ F-4608 была затруднена из-за обнаружения у них метаболитов только одного биосинтетического семейства – хризогининов. Однако ранее обнаруженная иммуноферментным анализом способность к биосинтезу PR-токсина у ВКМ F-4435 [15] и морфологические признаки соответствовали виду *P. chrysogenum*, а ВКМ F-4608 – *P. nalgiovense*.

Изучение биосинтеза вторичных метаболитов у штаммов, выделенных на сыродельных и мясоперерабатывающих предприятиях, показало способность к синтезу ЦПК и ругуловазинов у штаммов ВКМ F-4478, ВКМ F-4485, ВКМ F-4486, ВКМ F-4487, ВКМ F-4488, ВКМ F-4500, ВКМ F-4501, что является характерным признаком для вида *P. commune* [14]. Образование рокефортинов С и D, изофумигаклавинов А и Б, фестуклафина штам-

мами ВКМ F-4479, ВКМ F-4483, ВКМ F-4484, ВКМ F-4489, ВКМ F-4498, а также морфологические признаки соответствовали *P. roqueforti*. Биосинтез штаммами ВКМ F-4482 и ВКМ F-4497 метаболитов, относящихся к пуберулинам и циклопенинам указывал только на один вид – *P. polonicum* [4]. Продукция МФК, а также микро и макроморфологические признаки штаммов ВКМ F-4480, ВКМ F-4481, ВКМ F-4502, проявляемые ими на диагностических агаризованных средах, соответствовали виду *P. brevicompactum*. Ранее при идентификации по морфологическим признакам только один штамм был отнесен к виду *P. brevicompactum*, а два других – к *P. verrucosum*. Особый интерес представляет обнаружение 2-ацетилхиназолин-4-она из серии хризогинов у шести штаммов ВКМ F-4490–4495, ранее отнесенных к *P. commune*. Наличие данного метаболита и отсутствие пигментации, характерной для *P. chrysogenum*, *P. persicinum* и *P. rubens*, позволило отнести все эти штаммы к виду *P. nalgiovense*.

У видов грибов родов *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Biverticillium* спектр экзометаболитов исследован недостаточно полно и продолжает изучаться в настоящее время. Микро- и макроморфологические признаки штамма ВКМ F-4796 соответствовали подроду *Aspergilloides* секции *Exilicaulis* виду *P. restrictum*. Штамм продуцировал андрастины А и С, фоменон. Андрастин А описан для некоторых видов грибов секции *Chrysogena*, *P. roqueforti*, *P. crustosum*, *P. corylophilum*, а фоменон у видов *P. corylophilum* и *P. commune*. Штамм ВКМ F-4796 выделен в месте утечки нефтепродуктов на научной станции в Антарктиде [6]. Микро- и макроморфологические признаки штамма ВКМ F-4794 соответствовали виду *P. citreonigrum*. У штамма был обнаружен цитреовиридин А [6]. Для некоторых изолятов вида *P. citreonigrum* известна продукция различных метаболитов поликетидной структуры, в том числе цитреовиридина. Штамм ВКМ F-4794 выделен из грунта в непосредственной близости от инсенераторной установки, сжигающей бытовые отходы и работающей на дизельном топливе на научной станции в Антарктиде [6].

Вид *P. variabile* отнесен к подроду *Biverticillium* секции *Simplicia*. Исследованные штаммы этого вида, выделенные как из современных местообитаний (ВКМ F-2075, ВКМ F-4436, ВКМ F-4437, ВКМ F-4439, ВКМ F-4440), так и из длительномерзлых грунтов (ВКМ F-4396, ВКМ

F-4411, ВКМ F-4412, ВКМ F-4413, ВКМ F-4805, ВКМ F-4414, ВКМ F-4806, ВКМ F-4807, ВКМ F-4808, ВКМ F-4809), продуцировали ругуловазины А и Б [8, 16]. Эти метаболиты являются хемотаксономическими маркерами грибов подрода *Biverticillium*. У штаммов вида *P. variabile* была обнаружена продукция ругуловазинов А и В. Таким образом, биосинтез ругуловазинов достаточно распространен для данного вида, в связи, с чем ругуловазины могут считаться его хемотаксономическим маркером.

Для вида *P. citrinum* характерна продукция цитринина, хинолактацинов, цитринадинов. Этот вид относится к подроду *Furcatum* секции *Citrina*. Штаммы ВКМ F-253, ВКМ F-1079, ВКМ F-3013 и ВКМ F-3053, выделенные из различных мест обитания, синтезировали цитринин. У трех из них ВКМ F-253, ВКМ F-3013 и ВКМ F-3053 обнаружен неизвестный ранее метаболит поликетидной природы циклоцитринол [17]. Клавиновые эргоалкалоиды эпоксиагроклавин-І и агроклавин-І выявлены у *P. citrinum* ВКМ F-4043D. У этого штамма найдена продукция хинолиновых алкалоидов хиноцитрининов А и Б [18]. Хиноцитринины и хинолактацины являются практически идентичными по структуре соединениями, различающиеся положением гидроксильной группы. У штаммов *P. corylophilum* ВКМ F-2156 (Д), *P. sizovae* ВКМ F-1073 наблюдался аналогичный спектр метаболитов [19]. Для грибов этих видов диагностическим маркером являются хинолактацины. Следует отметить, что продукция клавиновых алкалоидов этими штаммами возможно, обусловлена применяемой средой культивирования, которая благоприятна для биосинтеза индолсодержащих соединений.

Таким образом, исследован метаболом 113 штаммов грибов рода *Penicillium*, выделенных из различных местообитаний, в том числе из многолетнемерзлых отложений Арктики и Антарктики. На основе профилей вторичных метаболитов, а также микро- и макроморфологических признаков, определены видовые наименования штаммов. У отдельных штаммов, выделенных из современных местообитаний, наблюдался более полный спектр вторичных метаболитов по сравнению штаммами, выделенными из многолетнемерзлых отложений, имеющих возраст от 15 до 600 тыс. лет. Так, у десяти штаммов *P. commune*, выделенных из древних арктических отложений, наблюдался биосинтез только ЦПК, а у семи штаммов, выделенных

на сыродельных предприятиях, происходил биосинтез ЦПК и ругуловазинов. Большинство из исследованных штаммов *P. palitans*, выделенных из вечной мерзлоты, не синтезировало один из основных маркеров ЦПК, в отличие от штамма, выделенного из грунта вблизи нефтебазы на острове Кинг-Джордж в Антарктиде. На основании приведенных исследований можно сделать вывод, что метаболомика может успешно применяться для целей таксономии грибов рода *Penicillium*.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИТОВ

При изучении метаболома пенициллов обнаружены новые продуценты фармацевтически значимых соединений, перспективных в качестве новых медицинских препаратов. Продукция микофеноловой кислоты (до 400 мг/л) обнаружена у штаммов пенициллов видов *P. brevicompactum* и *P. roqueforti*. Микофеноловые кислоты и её производные – микофенолят натрия и микофенолят мофетила – являются основными субстанциями лекарственных препаратов, которые обладают иммунодепрессивным действием и используются в качестве профилактики острого отторжения трансплантата у больных с аллогенными трансплантатами почки. Гризеофульвин, квестиомицин А, ксантоциллин Х, используемые ранее как антибактериальные и антифунгальные средства, в настоящее время рассматриваются как перспективные противоопухолевые соединения [20]. Андрастины являются мощными ингибиторами фарнезилтрансферазы, основного фермента биосинтеза холестерина. Известно также, что андрастин А проявляет сильные противоопухолевые свойства, специфически блокирует функцию белка Рах, а также способствует внутриклеточному накоплению противораковых соединений в опухолевых клетках. Фоменон проявляет антималярийную активность и противомикробные свойства. Коммунезин В обладает высокой цитотоксичностью против культур клеток лейкемии человека P-338, U-937, ТНР-1, NAMALWA, MOLT-3 и SUP-B15 со значениями ED₅₀ 0,5, 10,4, 11,4, 9,9, 8,1 и 7,2 мкг/мл соответственно [20]. Хетоглобозин А проявляет антибактериальную, антигрибковую и противоопухолевую активность, индуцируя апоптоз в клетках хронической лимфоцитарной лейкемии. Цитреовиридин А относится к классу ингибиторов F(1)-субъединицы АТФ-синтазы. Фестуклавин обладает высокой антибиотической активностью по отношению к болезне-

творным бактериям, включая *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Производные фестуклавина, подавляют транспорт нуклеозидов в некоторых опухолевых клетках, ингибируют синтез ДНК и РНК. Проведенные исследования фармакологической активности эпоксиагроклавина-I показали, что соединение обладает нейротропной активностью, оказывает умеренное гипотензивное действие, замедляет частоту сердечных сокращений, снижает реактивность сосудистой системы на норадреналин. Хиоцитринины А и В, эффективные против грамположительных, грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов, также обладают цитотоксичностью для опухолевых клеток: LC₅₀ (мкг/мл) для клеток фибробластов мышей линии L-929 – 33,1; 18,6, для клеток лейкемии человека линии К-562 – 19,5; 7,8 и HeLa >50; >50 соответственно [18]. Для фумихиназолинов F и G была показана противораковая активность на клетки лимфолейкоза Р 388 (ED₅₀ 13,5 и 13,8 мкг/мл соответственно). Таким образом, в процессе скрининга штаммов грибов найдены новые продуценты биологически активных соединений, которые могут быть перспективны для производства лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован метаболом грибов рода *Penicillium*, выделенных из различных местообитаний, в том числе: многолетнемерзлые отложения Арктики, мерзлые вулканические пеплы, ископаемая лошадь, криопэги, верхний слой антарктических грунтов и вода антарктического озера. Профили вторичных метаболитов были успешно применены для целей таксономии грибов рода *Penicillium*. У отдельных штаммов, выделенных из современных мест обитания, наблюдался более полный спектр вторичных метаболитов по сравнению со штаммами, выделенными из многолетнемерзлых отложений, имеющих возраст от 15 до 600 тыс. лет. В результате проведенных скринингов найдены новые продуценты биологически активных соединений, которые могут быть перспективны для биотехнологии лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grijseels S., Nielsen J.C., Nielsen J., Larsen T.O., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Frandsen R.J.N., Workman M. Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories // Fungal Biol Biotechnol. 2017; 4: 8.
2. Nielsen J.C., Grijseels S., Prigent S., Ji B., Dainat J. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of

- secondary metabolite production in *Penicillium* species. // Nature Microbiology. 2017; 2: 17044.
3. Nielsen K.F., Larsen T.O. The importance of mass-spectrometric dereplication in fungal secondary metabolite analysis // Front. Microbiol. 2015; 6: 71.
 4. Samson R.A., Frisvad J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites // Stud. Mycol. 2004; 49: 1–241.
 5. Houbraeken J., Frisvad J.C., Seifert K.A., Overy D.P., Tuthill D.M., Valdez J.G., Samson R.A. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview *Chrysogena* // Persoonia. 2012; 29: 78–100.
 6. Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М., Козловский А.Г. Экзометаболиты грибов рода, выделенных из различных экосистем высоких широт // Микробиология. 2018. № 87. С. 519–529.
 7. Козловский А.Г., Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М. Экзометаболиты грибов секции *Chrysogena* рода *Penicillium*, выделенных из низкотемпературных экотопов // Микробиология. 2016. № 85. С. 145–153.
 8. Cole R.J., Schweikert M.A. Handbook of secondary fungal metabolites. Amsterdam: Acad. Press, 2003; 1–3: 1925.
 9. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В. Биосинтез клавиновых эргоалкалоидов грибом *Penicillium palitans* Westling 1911, выделенным из многолетнемерзлых древних отложений // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. № 45. С. 202–206.
 10. Желифонова В.П., Антипова Т.В., Озерская С.М., Кочкина Г.А., Козловский А.Г. Вторичные метаболиты грибов рода *Penicillium*, выделенных из многолетней мерзлоты, как хемотаксономические маркеры // Микробиология. 2009. № 78. С. 393–398.
 11. Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Козловский А.Г. Новые продуценты биологически активных соединений – грибы рода *Penicillium*, выделенные из вечной мерзлоты // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. № 47. С. 318–23.
 12. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Баскунов Б.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М. Профили вторичных метаболитов грибов рода *Penicillium*, выделенных из многолетней арктической и антарктической многолетней мерзлоты, как элементы полифазной таксономии // Микробиология. 2012. № 81. С. 332–338.
 13. Желифонова В.П., Антипова Т.В., Козловский А.Г. Биосинтез фумихиназолинов грибом *Penicillium thymicola* // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. № 48. С. 334–339.
 14. Kozlovsky A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Baskunov B.P., Ivanushkina N.E., Ozerskaya S.M. Exometabolites of mycelial fungi isolated in production premises of cheese-making and meat-processing plants // Food Addit. Contaminants: Part A. 2014; 31: 300–306.
 15. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М. Иммуноферментный анализ PR-токсина в таксономической оценке грибов рода *Penicillium* Link // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. № 43. С. 505–510.
 16. Антипова Т.В., Желифонова В.П., Кочкина Г.А., Козловский А.Г. Особенности роста и биосинтеза ругуловазинов у грибов *Penicillium variabile* Sopp 1912 // Микробиология. 2008. № 77. С. 502–507.
 17. Kozlovsky A.G., Zhelifonova V.P., Adanin V.M., Ozerskaya S.M., Grafe U. Cyclocitrinol, a new metabolite from *Penicillium citrinum* // Pharmazie. 2000; 55: 470–471.
 18. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В. Гриб *Penicillium citrinum*, выделенный из вечномерзлотных древних отложений, как продуцент эргоалкалоидов и новых хинолиновых алкалоидов хиноцитрининов // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. № 41. С. 568–572.
 19. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Зеленкова Н.Ф. Физиолого-биохимическая характеристика грибов рода *Penicillium* – продуцентов эргоалкалоидов и хиноцитрининов // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. № 47. С. 469–473.
 20. Bladt T.T., Frisvad J.C., Peter Boldsen Knudsen P.B., Larsen T.O. Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi // Molecules. 2013; 18: 11338–11376.

Поступила 27 мая 2019 г.

METABOLOMICS OF THE GENUS *PENICILLIUM* FUNGI

© Authors, 2019

T.V. Antipova

Ph.D. (Biol.) Senior Research Scientist, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms (IBPM RAS)

V.P. Zhelifonova

Ph.D. (Biol.) Senior Research Scientist, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms

A.G. Kozlovsky

Dr.Sc. (Biol.) Leading Research Scientist, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms

E-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

The metabolome of the 113 *Penicillium* fungi strains isolated from various habitats were investigated, including from the permafrost of the Arctic and Antarctic. In polyphasic taxonomy, the new system that has been used in recent years to identify the fungi of the genus *Penicillium*, secondary metabolite profiles are applied together with the micro- and macro-morphological characteristics of the strains. The species identification of penicilliae by morphological features, isolated from natural substrates, is often difficult. For example, in fresh isolates from low-temperature ecotopes, a shift of temperature growth optimum is observed toward lower temperatures compared with typical strains. Therefore, the metabolite profiles obtained using metabolomic are the easiest way to obtain informative data that can be used for the purposes of the taxonomy of fungi. As a result of screenings, profiles of secondary metabolites were successfully applied to

the species identification of strains. Some strains isolated from modern habitats had a more complete spectrum of diagnostic secondary metabolites compared with strains isolated from permafrost from 15 to 600 thousand years old. For example, 10 strains of *P. commune*, isolated from ancient Arctic sediments, synthesized only CPA, and 7 strains, isolated at cheese-making factory, formed CPA and rugulovasines. New producers of biologically active compounds were found which may be promising for drug biotechnology. The production of mycophenolic acid, which is used as an immunosuppressive agent, is found in the strains of *P. brevicompactum* and *P. roqueforti*.

Key words: *metabolome, chemotaxonomy, secondary metabolites, biological activity.*

For citation: Antipova T.V., Zhelifonova V.P., Kozlovskiy A.G. Metabolomics of the genus *Penicillium* fungi. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(7):11–19. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-07-02>

REFERENCES

1. Grijseels S., Nielsen J.C., Nielsen J., Larsen T.O., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Frandsen R.J.N., Workman M. Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories // *Fungal Biol Biotechnol.* 2017; 4: 8.
2. Nielsen J.C., Grijseels S., Prigent S., Ji B., Dainat J. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. // *Nature Microbiology.* 2017; 2: 17044.
3. Nielsen K.F., Larsen T.O. The importance of mass-spectrometric dereplication in fungal secondary metabolite analysis // *Front. Microbiol.* 2015; 6: 71.
4. Samson R.A., Frisvad J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites // *Stud. Mycol.* 2004; 49: 1–241.
5. Houbraken J., Frisvad J.C., Seifert K.A., Overy D.P., Tuthill D.M., Valdez J.G., Samson R.A. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview *Chrysogena* // *Persoonia.* 2012; 29: 78–100.
6. Antipova T.V., Zhelifonova V.P., Baskunov B.P., Kochkina G.A., Ozerskaya S.M., Kozlovskiy A.G. Ekzometabolity gribov roda, vydelennyh iz razlichnyh ekosistem vysokih shirot // *Mikrobiologiya.* 2018. № 87. S. 519–529.
7. Kozlovskiy A.G., Antipova T.V., Zhelifonova V.P., Baskunov B.P., Kochkina G.A., Ozerskaya S.M. Ekzometabolity gribov sekcii *Chrysogena* roda *Penicillium*, vydelennyh iz nizkotemperaturnykh ekotopov // *Mikrobiologiya.* 2016. № 85. S. 145–153.
8. Cole R.J., Schweikert M.A. *Handbook of secondary fungal metabolites.* Amsterdam: Acad. Press, 2003; 1–3: 1925.
9. Kozlovskiy A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V. Biosintez klavinovykh ergoalkaloidov gribov *Penicillium palitans* Westling 1911, vydelennym iz mnogoletnerzlykh drevnykh otlozhenij // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2009. № 45. S. 202–206.
10. Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Ozerskaya S.M., Kochkina G.A., Kozlovskiy A.G. Vtorichnye metabolity gribov roda *Penicillium*, vydelennyh iz mnogoletnej merzloty, kak hemataksonomicheskie markery // *Mikrobiologiya.* 2009. № 78. S. 393–398.
11. Antipova T.V., Zhelifonova V.P., Baskunov B.P., Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Kozlovskiy A.G. Novye producenty biologicheskii aktivnykh soedinenij – griby roda *Penicillium*, vydelennye iz vечноj merzloty // *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya.* 2011. № 47. S. 318–23.
12. Kozlovskiy A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Baskunov B.P., Kochkina G.A., Ozerskaya S.M. Profily vtorichnykh metabolitov gribov roda *Penicillium*, vydelennyh iz mnogoletnej arkticheskoy i antarkticheskoy mnogoletnej merzloty, kak elementy polifaznoj taksonomii // *Mikrobiologiya.* 2012. № 81. S. 332–338.
13. Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Kozlovskiy A.G. Biosintez fumihinazolinov gribov *Penicillium thymicola* // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2012. № 48. S. 334–339.
14. Kozlovskiy A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Baskunov B.P., Ivanushkina N.E., Ozerskaya S.M. Exometabolites of mycelial fungi isolated in production premises of cheese-making and meat-processing plants // *Food Addit. Contaminants: Part A.* 2014; 31: 300–306.
15. Burkin A.A., Kononenko G.P., Kochkina G.A., Ozerskaya S.M. Immunofermentnyj analiz PR-toksina v taksonomicheskoy ocenke gribov roda *Penicillium* Link // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2007. № 43. S. 505–510.
16. Antipova T.V., Zhelifonova V.P., Kochkina G.A., Kozlovskiy A.G. Osobennosti rosta i biosinteza rugulovazinov u gribov *Penicillium variable* Sopp 1912 // *Mikrobiologiya.* 2008. № 77. S. 502–507.
17. Kozlovskiy A.G., Zhelifonova V.P., Adanin V.M., Ozerskaya S.M., Grafe U. Cyclocitrinol, a new metabolite from *Penicillium citrinum* // *Pharmazie.* 2000; 55: 470–471.
18. Kozlovskiy A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V. Gribov *Penicillium citrinum*, vydelennyj iz vechnomerzlotnykh drevnykh otlozhenij, kak producent ergoalkaloidov i novykh hinolinovykh alkaloidov hinocitrininov // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2005. № 41. S. 568–572.
19. Kozlovskiy A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Zelenkova N.F. Fiziologo-biohimicheskaya harakteristika gribov roda *Penicillium* – producentov ergoalkaloidov i hinocitrininov // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2011. № 47. S. 469–473.
20. Bladt T.T., Frisvad J.C., Peter Boldsen Knudsen P.B., Larsen T.O. Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi // *Molecules.* 2013; 18: 11338–11376.