

УДК 577.13

ДЫХАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И БИОСИНТЕЗ АЛКАЛОИДОВ ГРИБОМ *Penicillium citrinum* Thom

© 2025 г. А. Ю. Аринбасарова¹ *, Т. В. Антипова¹, В. П. Желифонова¹, А. Г. Меденцев¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН ФИЦ ПНЦ БИ РАН,
Пушино, 142290 Россия

*e-mail: aarin@rambler.ru

Поступила в редакцию 11.09.2024 г.

После доработки 28.10.2024 г.

Принята к публикации 10.11.2024 г.

Гриб *Penicillium citrinum* ВКМ F-4043Д, выделенный из древних многолетнемерзлых отложений в Арктике, является активными продуцентом хинолиновых алкалоидов (хиноцитрининов А и В) и клавиновых эргоалкалоидов (агроклавина-I и эпоксиагроклавина-I). Изучена динамика дыхательной активности в процессе роста гриба в среде с двумя несбраживаемыми субстратами — сукцинатом и маннитом. Показано, что потребление кислорода клетками сопряжено с динамикой двухфазного роста и синтеза алкалоидов, максимальная дыхательная активность проявлялась одновременно с максимальными скоростями синтеза алкалоидов и накопления биомассы. Ингибиторный анализ дыхания гриба показал, что наряду с основной, цитохромной, дыхательной цепью функционирует альтернативный, цианидрезистентный, путь переноса электронов, подавляемый бензгидроксамовой кислотой. Показано, что гриб *P. citrinum* способен расти в присутствии антимицина А — ингибитора переноса электронов на цитохромном участке дыхательной цепи. В этом случае альтернативная оксидаза функционирует в качестве единственной терминальной оксидазы, которая способна поддерживать рост гриба и биосинтез алкалоидов. При использовании глюкозы в качестве субстрата роста биосинтез как алкалоидов, так и цианидрезистентной оксидазы не наблюдался.

Ключевые слова: *Penicillium*, хинолиновые алкалоиды, клавиновые эргоалкалоиды, цианидрезистентная оксидаза

DOI: 10.31857/S0555109925020058 EDN: EOHLN

Грибы рода *Penicillium* продуцируют множество вторичных метаболитов, в том числе хинолиновые алкалоиды, синтез которых индуцируется в определенных условиях и зависит от источника углерода, температуры и стадии роста [1–4]. Хинолиновые алкалоиды широко распространены в природе и образуются грибами [2–5], растениями [6] и бактериями [7]. Эти соединения проявляют биологическую активность, в том числе антибиотическую, цитотоксическую и др. [8, 9]. Так, псевданы (хинолиновые соединения с предельной алифатической цепью) ингибируют перенос электронов по дыхательной цепи, а также стимулируют АТФ-азную активность митохондрий печени крыс и грибов [8]. Хинолактаины ингибируют ацетилхолинэстеразу и являются перспективными лекарственными средствами при лечении болезни Альцгеймера [10].

Эргоалкалоиды как биологически активные соединения первоначально были обнаружены у *Claviceps purpurea* и в настоящее время производятся в промышленных масштабах. Грибы рода *Penicillium* способны синтезировать эргоалкалоиды клавинового типа, которые также представляют интерес для биотехнологии [11].

Penicillium citrinum ВКМ F-4043Д, выделенный из древних многолетнемерзлых отложений, синтезирует два класса алкалоидов, проявляющих биологическую активность — клавиновые эргоалкалоиды (эпоксиагроклавин-I и агроклавин-I) и хинолиновые алкалоиды (хиноцитринины А и В) [12, 13]. Проведенные ранее исследования фармакологической активности эпоксиагроклавина-I показали, что соединение оказывает нейротропное и умеренное гипотензивное действие (замедляет частоту сердечных сокращений, снижает реактив-

ность сосудистой системы на норадреналин) [14]. Хиноцитринины действуют как антимикробные агенты против грамположительных, грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов. Кроме того, показана их цитотоксичная активность на опухолевые клетки (фибробласты мышей и клетки лейкемии человека) [13]. Оказалось [15], что одним из механизмов антибиотического действия хиноцитрининов может быть их способность проявлять разобщающее действие на окислительное фосфорилирование у бактерий и грибов, следствием которого является активация дыхания, снижение дыхательного контроля, уменьшение коэффициента АДФ/О и снижение мембранного потенциала. В связи с высокой токсичностью синтезируемых хиноцитрининов, обусловленной их разобщающими свойствами, представляло интерес изучение активности дыхания гриба-продуцента в процессе роста и накопления хинолиновых алкалоидов.

Известно [16, 17], что в определенных, стрессовых, условиях в митохондриях грибов наряду с основной цитохромной дыхательной цепью может функционировать альтернативный, цианид-резистентный, путь окисления, специфически подавляемый БГК (рис. 1). У грибов и дрожжей альтернативная оксидаза обнаружена при переходе в стационарную фазу роста, обусловленном истощением глюкозы [16]. Более раннее появление альтернативной оксидазы (в логарифмической фазе роста) у грибных организмов может быть инду-

цировано различными факторами — воздействием оксидантов, ионами меди (Cu^{2+}), источниками серы, повышением температуры, культивированием в условиях лимита по кислороду (O_2), а также при использовании несбраживаемых субстратов (этанола, цитрата, сукцината, пирувата). Появление альтернативного пути окисления наблюдается также при росте грибов в присутствии ингибиторов дыхания, включая антимицин А, цианид, СО и H_2S [16].

Целью данного исследования было показать в сравнительном аспекте участие основной дыхательной цепи и альтернативной цианид-резистентной оксидазы в синтезе алкалоидов грибом *Penicillium citrinum* ВКМ F-4043D.

МЕТОДИКА

В работе использовали гриб *Penicillium citrinum* ВКМ F-4043D (= FW-800), полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН. Выращивание гриба осуществляли в среде (ВКМ), содержащей (г/л): маннит — 50.0; янтарная кислота — 5.4; KH_2PO_4 — 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.004; вода дистиллированная; значение pH среды довели до 5.4 концентрированным раствором аммиака. Среду засевали 2 мл суспензии 14-суточной культуры гриба, $(1-2) \times 10^7$ спор/мл. Гриб культивировали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 150 мл среды, при 24°C и 220 об./мин. Отбор проб прово-

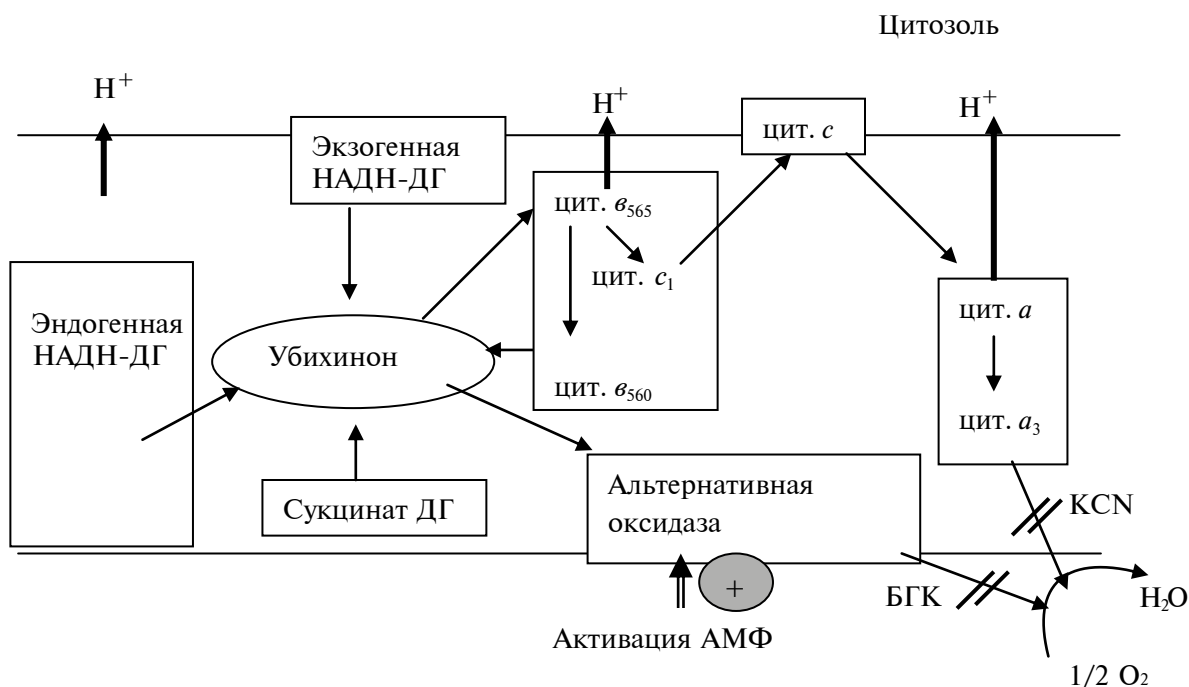


Рис. 1. Схема дыхательной цепи грибов, дрожжей и растений [16].

Цианид-резистентная альтернативная оксидаза ответвляется от основной дыхательной цепи на уровне убихинона (коэнзима Q), активируется АМФ и ингибируется бензгидроксамовой кислотой (БГК).

дили ежесуточно. Рост гриба оценивали по изменению сухой массы мицелия.

Выделение метаболитов из фильтрата культуральной жидкости и количественное определение клавиновых эргоалкалоидов (ЭА) и хиноцитрининов (ХЦ) в образцах проводили по ранее описанной методике [18].

При определении дыхательной активности была использована биомасса гриба, трижды промытая дистиллированной водой. Потребление кислорода грибом измеряли с помощью закрытого тefлоновой пленкой платинового электрода в 25 мМ Трис-фосфатном буфере (pH 7.0) при температуре 22–25°C. Концентрацию растворенного в среде кислорода принимали равной 250 мкМ. Активность дыхания выражали в нмоль O_2 /мин/мг сухого мицелия.

Для выяснения участия альтернативной оксидазы в биосинтезе алкалоидов был проведен ингибиторный анализ дыхательной активности гриба. Были использованы: специфический ингибитор альтернативной оксидазы — бензгидроксамовая кислота (БГК) (5 мМ), а также ингибиторы цитохромного участка цепи переноса электронов — антимицин А (10 мкМ), действующий на уровне “коэнзим Q — цитохром σ ”, и цианид калия (1 мМ), действующий на уровне терминальной цитохромоксидазы.

Активность альтернативной оксидазы (вклад в общее дыхание клеток) определяли по разнице между общим потреблением кислорода и потреблением кислорода в присутствии БГК.

Расчет основных характеристик роста и биосинтеза алкалоидов. Удельную скорость роста гриба (μ , $ч^{-1}$) рассчитывали по формуле [19]:

$$\mu = ((\lg x - \lg x_0)/t) \times 2.3.$$

Удельную скорость образования продукта культурой (q_p , г/г·ч) [19]:

$$q_p = (p - p_0)/x \times t,$$

где x_0 — концентрация биомассы в начальный момент времени; x — концентрация биомассы в конечный момент времени; p_0 — концентрация продукта в начальный момент времени; p — концентрация продукта в конечный момент времени; t — время.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием стандартных методов, обеспеченных программой Microsoft Office Excel 2013. Анализы биомассы и метаболитов проводили не менее чем в трех повторностях. Их содержание представлено в виде среднего арифметического значения $\pm$ стандартная ошибка. Доверительные интервалы не превышали $\pm 5\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2а представлены данные, характеризующие рост гриба *P. citrinum* и биосинтез метаболитов. Можно видеть, что рост в среде, содержащей два источника углерода, сукцинат и маннит, характеризовался диауксией. При этом максимальная удельная скорость роста биомассы отмечалась на 3 и 7 сут и составляла 0.056 и 0.015 $ч^{-1}$. Двухфазность роста продуцента на двух субстратах согласуется с динамикой синтеза алкалоидов, причем максимальный биосинтез совпадал с максимальной удельной скоростью роста биомассы. Так, в течение 3–5 сут, а также 7–10 сут роста

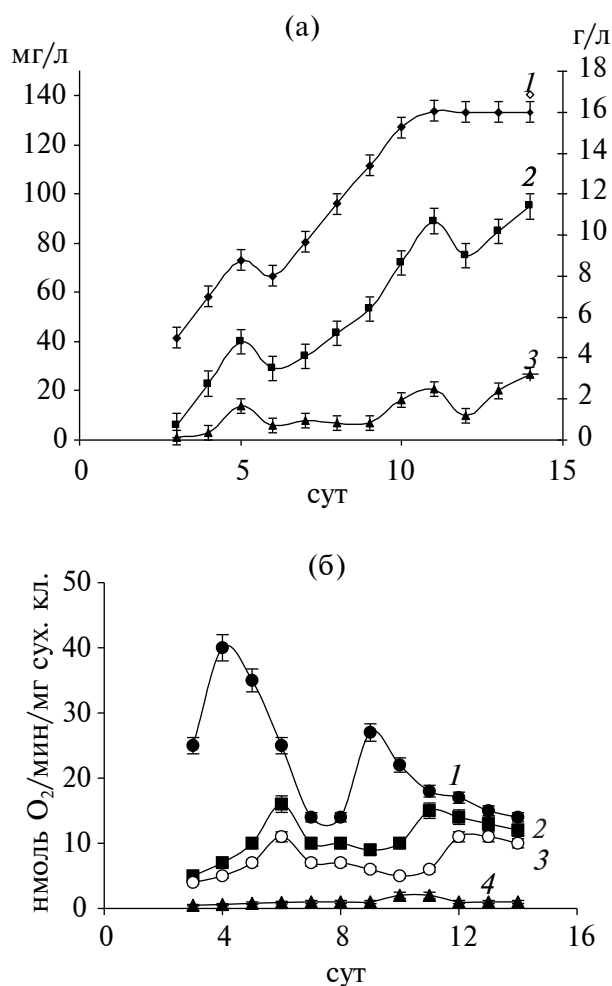


Рис. 2. Биосинтез метаболитов (а) и дыхательная активность (б) в процессе роста гриба *P. citrinum* в среде, содержащей сукцинат и маннит. (а): 1 — биомасса (г/л); 2 — эргоалкалоиды (мг/л); 3 — хиноцитринины (мг/л). (б): 1 — потребление кислорода в отсутствие ингибиторов; 2 — потребление кислорода в присутствии 1 мМ KCN (максимально возможная активность альтернативной оксидазы); 3 — реальная активность альтернативной оксидазы; 4 — дыхание в присутствии 1 мМ KCN и 5 мМ БГК.

удельная скорость образования ЭА составляла соответственно 0.14 и 0.033 мг/г·ч. В эти же периоды отмечалось и максимальное продуцирование ХЦ, соответственно 0.015 и 0.011 мг/г·ч. Накопление метаболитов в культуральной жидкости достигало максимальных значений на 5 и 10 сут, что соответствовало концентрации ЭА, равной 40 и 74 мг/мл, а в случае ХЦ — 6 и 12 мг/мл. Следует отметить, что синтез метаболитов, ЭА и ХЦ, отмечался уже в логарифмической фазе роста продуцента.

На рисунке 26 (кривая 1) можно видеть наличие двух последовательных максимумов общего потребления кислорода клетками (4 и 9 сут), которые по времени совпадали с фазой наибольшей удельной скорости роста. Прекращение роста сопровождалось падением дыхательной активности. Наблюдаемые максимумы дыхательной активности совпадали по времени с периодами наиболее активного биосинтеза алкалоидов, что свидетельствует о том, что образование вторичных метаболитов может происходить при высоких скоростях роста и потребления кислорода. Таким образом, показана согласованность динамики дыхательной активности с накоплением биомассы и алкалоидов в среде культивирования.

На рис. 26 (кривая 2) можно увидеть, что потребление кислорода продуцентом во всех фазах роста частично ингибировалось цианидом, что указывает на наличие в клетках альтернативной оксидазы. Частичное ингибирование дыхательной активности также наблюдалось в присутствии БГК (на рисунке не показано), что в свою очередь указывает на функционирование у гриба цианидрезистентной оксидазы. Реальный вклад альтернативного пути переноса электронов в общее дыхание клеток, определенный по разнице между общей активностью дыхания и активностью дыхания в присутствии БГК, представлен на рис. 2, кривая 3. Полное ингибирование имело место только при совместном действии цианида и БГК (кривая 4).

Как показано на рис. 26, кривые 2 и 3, альтернативная оксидаза появлялась уже на начальных фазах роста и достигала максимума на фоне снижения общего дыхания клеток (кривая 1).

С целью изучения роли альтернативной оксидазы в биосинтезе алкалоидов гриб выращивали в присутствии ингибитора переноса электронов — антимицина А (10 мкМ). На рис. 3а видно, что антимицин А тормозил рост продуцента и накопление алкалоидов. Так, содержание биомассы и алкалоидов в среде роста снижалось на 40–50% по сравнению с контролем, однако продуктивность биосинтеза клеткой оставалась на прежнем уровне. При этом заметного снижения скорости потребления кислорода в присутствии антимицина А не наблюдалось (рис. 3б, кривая 1).

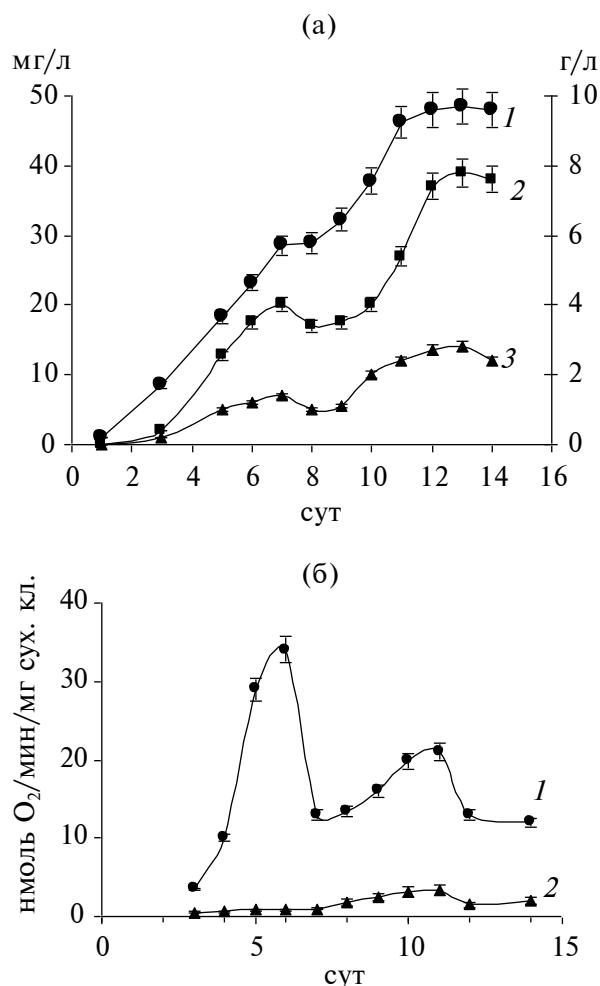


Рис. 3. Биосинтез метаболитов (а) и дыхательная активность (б) в процессе роста гриба *P. citrinum* в присутствии антимицина А (10 мкМ).

(а): 1 — биомасса (г/л); 2 — эргоалкалоиды (мг/л); 3 — хиноцитринины (мг/л); (б): 1 — потребление кислорода в присутствии антимицина А; 2 — потребление кислорода в присутствии антимицина А и 5 мМ БГК.

Следует отметить, что при культивировании гриба в присутствии антимицина А биосинтез алкалоидов также характеризовался наличием двух максимумов, которые совпадали по времени с максимальным потреблением кислорода. Эти данные непосредственно указывают на зависимость между биосинтезом метаболитов и активностью цианидрезистентной оксидазы.

Снижение уровня биомассы и ЭА в присутствии антимицина А обусловлено, вероятно, тем, что при функционировании альтернативного пути переноса электронов, который ответвляется от основной дыхательной цепи на уровне убихинона, имеет место шунтирование двух пунктов сопряжения на цитохромном участке дыхательной цепи. При этом окисления субстратов, отдаю-

щих электроны на уровне убихинона (сукцинат, а-глицерофосфат, НАДН), и сопряженного с ним синтеза АТФ, не происходит. АТФ синтезируется только в первом пункте сопряжения при окислении НАД⁺-зависимых субстратов (пируват, малат, а-кетоглутарат и др.). То есть, при функционировании альтернативного пути в клетках снижается запасание энергии в доступной форме, что в конечном итоге и отражается в уменьшении синтеза биомассы и ЭА. Следует отметить, что в указанных условиях альтернативная оксидаза является единственным путем переноса электронов и генерации энергии, поддерживающим рост гриба и биосинтез алкалоидов.

Было также обнаружено, что при использовании глюкозы в качестве субстрата (вместо сукцината и маннита) отмечалось полное отсутствие биосинтеза как алкалоидов, так и альтернативной оксидазы (на рисунке не показано). Ранее также было показано [20], что замена маннита на глюкозу приводит к полному подавлению продукции пискарининов грибом *P. piscarium*. Это важный момент в понимании тактики выживания микроорганизмов и запуска защитных механизмов, в том числе синтеза вторичных метаболитов и реорганизации биоэнергетических процессов при стрессе, например, в условиях “питательного” стресса, когда используется комплекс таких субстратов, как сукцинат и маннит.

Таким образом, в процессе роста гриба *P. citrinum* F-4043Д на несбраживаемых субстратах (сукцинате и манните) наряду с основной цитохромной дыхательной цепью функционирует альтернативный путь окисления, который способен поддерживать рост гриба и биосинтез алкалоидов. Эти данные дополняют представление о физиологической роли цианидрезистентной оксидазы, которая выполняет компенсаторную функцию в условиях нарушения энергетического баланса (нарушение переноса электронов по цитохромной цепи), а также изменения физиологического состояния клеток (при росте на несбраживаемых субстратах).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen W.H., Song M.M., Pang X.Y., Tian X.P., Wang F.Z., Liu Y.H., Wang J.F. // Nat. Prod. Res. 2023. V. 37. № 3. P. 389–396.
2. Kozlovsky A.G., Kochkina G.A., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Ivanushkina N.E., Ozerskaya S.M. // Folia Microbiol. 2020. V. 65. P. 95–102.
3. Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O., Samson R.A. // Studies in Mycology. 2004. V. 49. P. 201–241.
4. Козловский А.Г., Антипова Т.В., Желифонова В.П. // Прикл. биохимия и микроб. 2015. Т. 51. № 2. С. 236–241.
5. Pang X., Lin X., Zhou X., Yang B., Tian X., Wang J., Xu Sh., Liu Y. // Fitoterapia. 2020. V. 140. P. 104406.
6. Jian J.Y., Fan Y.M., Liu Q., Jin J., Yuan C.M., Gu W. et al. // Chem Biodivers. 2023. V. 20. № 2. P. e202201097.
7. Khan M.S., Gao J., Zhang M., Xue J., Zhang X. // PLoS One. 2022. V. 17. № 6. P. e0269640.
8. da Silva M.F.d.G.F., Fernandes J.B., Forim M.R., Vieira P.C., de Sá I.C.G. Natural Products. / Ed. K. Ramawat, J.M. Mérillon, JM. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. P. 715–859.
9. Thawabteh A., Juma S., Bader M., Karaman D., Scrano L., Bufo S.A., Karaman R. // Toxins. 2019. V. 11. № 11. P. 656.
10. Takahashi S., Kakinuma N., Iwai H., Yanagisawa T., Nagai K., Suzuki K. et al. // J. Antibiot. (Tokyo). 2000. V. 53. № 11. P. 1252–1256.
11. Shahid M.G., Nadeem M., Gulzar A., Saleem M., Rehman H.U., Ghafoor G.Z. et al. // Toxins. 2020. V. 12. № 7. P. 427.
12. <https://doi.org/10.3390/toxins12070427>
13. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Аданин В.М., Озерская С.М., Кочкина Г.А., Грефе У. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 816–821.
14. Kozlovsky A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Adanin V.M., Ozerskaya S.M., Kochkina G.A. et al. // J. Antibiot (Tokyo). 2003. V. 56. № 5. P. 488–491.
15. Патент РФ 2010. № 2386692.
16. Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г., Козловский А.Г. // Прикл. биохимия и микроб. 2007. Т. 43. № 6. С. 701–704.
17. Акименко В.К., Козловский А.Г., Меденцев А.Г., Головченко Н.П., Аринбасаров М.У. // Биохимия. 1976. Т. 41. № 12. P. 2220–2227.
18. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 1457–1472.
19. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Зеленкова Н.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 5. С. 572–576.
20. Перт С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
21. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В. // Прикл. биохимия и микроб. 2013. Т. 49. № 1. С. 5–16.

Respiratory Activity and Biosynthesis of Alkaloids by the Fungus *Penicillium citrinum* Thom

A. Yu. Arinbasarova^{a,*}, T. V. Antipova^a, V. P. Zhelifonova^a, and A. G. Medentsev^a

^aSkryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, FRC Pushchino Centre for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: aarin@rambler.ru

The fungus *Penicillium citrinum* VKM F-4043D isolated from ancient permafrost deposits in the Arctic is an active producer of quinoline alkaloids (quinocitrinines A and B) and clavine ergot alkaloids (agroclavine-I and epoxyagroclavine-I). During fungal growth in a medium with two non-fermentable substrates — succinate and mannitol, the dynamics of respiratory activity was studied. Oxygen consumption by cells was shown to be associated with the dynamics of two-phase synthesis of biomass and alkaloids, the maximum respiratory activity had been coincided with the maximum rates of alkaloid synthesis and biomass accumulation. As shown by inhibitory analysis of fungal respiration, along with the main, cytochrome, respiratory chain, an alternative, cyanide-resistant, electron transfer pathway functions, which is suppressed by benzhydroxamic acid. It has been shown that the fungus *P. citrinum* is capable of growing in the presence of antimycin A, an inhibitor of electron transfer in the cytochrome region of the respiratory chain. In this case, the alternative oxidase functions as the only terminal oxidase capable of supporting fungal growth and alkaloid biosynthesis. When glucose was used as a growth substrate, biosynthesis of both alkaloids and cyanide-resistant oxidase was not observed.

Keywords: *Penicillium*, quinoline alkaloids, clavine ergot alkaloids, cyanide-resistant oxidase