

УДК 579.61.2

**Гулямова Т.Г., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Каримова Ф.А., Расулова Г.А.,  
Лобанова К.В.**

*Институт микробиологии АН Узбекистана*

**Мурадов П.З.**

*Институт микробиологии НАН Азербайджана*

## **СОДЕРЖАНИЕ ЛОВАСТАТИНА В РАЗЛИЧНЫХ ШТАММАХ *ASPERGILLUS TERREUS*\***

***T. Gulamova, D. Ruziyev, S. Nasmetova, F. Karimova, G. Rasulova,  
K. Lobanova***

*Uzbekistan Academy of Science, Microbiology Institute*

***P. Muradov***

*Azerbaijan National Academy of Science, Microbiology Institute*

## **CONTENTS LOVASTATIN IN DIFFERENT STRAINS *ASPERGILLUS TERREUS***

**Аннотация.** Изучены 30 штаммов мицелиальных грибов *Aspergillus terreus*, выделенных из различных почвенных образцов (ил, красная почва, корка соли с почвой), взятых из территории Республики Узбекистан, как возможных продуцентов ловастатина и родственных ему соединений. Выявлено 4 активных штамма исследованного вида, один из которых наряду с ловастатином способен продуцировать также незначительное количество симвастатина. Исходное содержание (до 121 мг/л) ловастатина в биомассе активных штаммов дает основание считать их вполне перспективными для использования с этой целью.

**Ключевые слова:** *Aspergillus*, статины, ловастатин, *Neurospora crassa*, симвастатин.

**Abstract.** 30 strains of filamentous fungi *Aspergillus terreus*, isolated from different soil samples (red soil, the peel of salt with soil) in Uzbekistan, as potential producers of lovastatin and related compounds have been studied. Four active strains of investigated sample have been found. One of them together with lovastatin is capable to produce small amounts of simvastatin. Original content of lovastatin in the biomass of active strains gives grounds to consider them quite promising for this purpose.

**Key words:** *Aspergillus*, statin, lovastatin, *Neurospora crassa*, simvastatin.

Ловастатин (Mevacor<sup>®</sup>) относится к лекарственным препаратам, снижающим уровень холестерина в крови. Это соединение поликетидной структуры действует как конкурентный ингибитор 3-гидроксиметил-коэнзим А редуктазы, ключевого фермента в биосинтезе холестерина [1 – 4]. В последнее время широко обсуждаются плейотропные эффекты статинов, в том числе противораковая и антибиотическая активность, что расширяет перспективы их использования [4]. Путем избирательного ферментативного деацетилирования боковой цепи молекулы ловастатина получают симвастатин – более эффективный препарат, известный под коммерческим названием Zocor<sup>™</sup>[6].

Ловастатин образуется как вторичный метаболит различных родов нитчатых грибов, таких, как *Monascus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, но коммерческое производство ловастатина основано на глубинной ферментации *Asp. terreus*, и большая часть исследований связана именно с этим микроорганизмом [5]. В этой связи интерес к аспергиллам как продуцентам соединений статиновой природы продолжает оставаться актуальным, одновременно с молекулярно-генетическим изучением биосинтеза поликетидов в *Asp. terreus* развиваются методы фер-

\* © Гулямова Т.Г., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Каримова Ф.А., Расулова Г.А., Лобанова К.В., Мурадов П.З.

ментации для производства статинов [4].

В Институте микробиологии АН Узбекистана на протяжении ряда лет из различных природных субстратов была собрана обширная коллекция аспергилл, в том числе 30 штаммов *Asp.terreus*, статинообразующая способность которых не изучена. В этой связи целью данной работы было определение уровня ловастатина в этих штаммах.

### Экспериментальная часть

30 штаммов мицелиальных грибов *Aspergillus terreus*, выделенных из различных почвенных образцов (ил, красная почва, корка соли с почвой) Навоийской, Сурхандарьинской и Ташкентской областей, а также ризосферы тамариска, верблюжьей колючки, саксаула, картофеля и лимона с глубины 10-15 см в различное время года, были любезно предоставлены коллекцией промышленно важных микроорганизмов Института микробиологии АН РУз.

Первичный скрининг статинообразующей способности исследуемых культур грибов проводили модифицированным методом агаровых блоков [7], основанным на специфическом подавлении ловастатином роста тест-культуры *Neurospora crassa* (ВКМ-875) при поверхностном культивировании. В качестве позитивного контроля использовали ловастатин, калибровочную кривую строили в пределах концентраций ловастатина от 20 до 121 мкг/мл.

Глубинное культивирование культур проводили в 500 мл колбах Эрлемейера, содержащих 100 мл среды следующего состава: картофельная мука – 300, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 2, солодовый экстракт – 5, рН5,5. Культивирование проводили 7–22 суток при 26°C на качалке при 60 об/мин.

Выделение статинов из мицелия отобранных штаммов после фильтрации культуральной жидкости проводили по Манзони [9] 0,02 М HCl (300 мл) при комнатной температуре в течение 1 часа. Биомассу экстрагировали 2 раза дихлорметаном, по одному разу – этилацетатом и ацетонитрилом. Экс-

тракты объединяли, подсушивали ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) и концентрировали до конечного объема 4 мл.

Идентификацию и количество продуцируемых статинов определяли методом ВЭЖХ в системе ацетонитрил: 0,1% фосфорная кислота (70:30) на колонке Zorbax Eclipse XDB C-18 (3,0x100 мм) с использованием в качестве стандартов ловастатина (Gedeon Richter) и симвастатина (АЙВЭКС Фармасьютикалс)[10].

### Результаты обсуждения

К настоящему времени для определения уровня ловастатина используется метод ВЭЖХ, который является довольно дорогим для первичного анализа большого числа образцов, как это имеет место при скрининге. Именно поэтому был предложен метод агаровых блоков, основанный на фунгицидной активности ловастатина, присутствующего в экстрактах исследуемых грибов по отношению к грибу *Neurospora crassa*, позволяющий анализировать большое число изолятов с хорошей степенью достоверности и воспроизводимости. Этот метод был успешно применен, например, при отборе изолятов после мутагенной обработки промышленного штамма *Asp. terreus* ATCC20542 [7]. Нами при скрининге статинообразующих штаммов аспергилл этим методом было установлено, что из 30 испытываемых галотолерантных штаммов аспергилл способностью подавлять рост тестовой культуры *Neurospora crassa* обладают экстракты только 10 культур (табл. 1). Как видно из данных, представленных в табл.1, ингибирование роста тест-культуры экстрактами местных штаммов происходит в пределах от 5 до 19 мм. Наиболее значительный ингибиторный эффект на рост гриба вызывали экстракты 4 штаммов – *Asp.terreus* 2, *Asp.terreus* 4, *Asp.terreus* 6 и *Asp.terreus* 20, у которых зоны подавления роста заметно больше зоны позитивного контроля, которым служил ловастатин в концентрации 10 мкг/мл. Следует отметить, что контрольный диск с этилацетатом (негатив) не оказал ингибиторного эффекта.

Таблица 1

Содержание ловастатина в наиболее активных штаммах *Asp.terreus*

№	Штаммы микромицетов	Зона подавления (мм)	Количество ловастатина (мкг/мл)
1.	<i>Aspergillus terreus-4</i>	19	2,8
2.	<i>Aspergillus terreus-20</i>	16	2,1
3.	<i>Aspergillus terreus-2</i>	13	1,5
4.	<i>Aspergillus terreus-6</i>	11	1,1
5.	<i>Aspergillus terreus-10</i>	9	0,8
6	<i>Aspergillus terreus-11</i>	8	0,7
7.	<i>Aspergillus terreus-30</i>	7	0,5
8.	<i>Aspergillus terreus-15</i>	6	0,3
9.	<i>Aspergillus terreus-16</i>	6	0,3
10.	<i>Aspergillus terreus-9</i>	5	0,1
	Контроль: <i>Ловастатин ацетонитрил</i>	20	3,0

В соответствии с калибровочной кривой размеры зон ингибирования экстрактами этих штаммов соответствуют концентрации ловастатина от 0,1 до 2,8 мкг/мл. Таким образом, по активности экстрактов против *Neurospora crassa* были отобраны 4 штамма: *Asp.terreus 2*, *Asp.terreus 4*, *Asp.terreus 6* и *Asp. terreus 20*.

Для определения уровня продуцирования ловастатина в динамике роста отобранные штаммы выращивали на жидкой картофельно-глюкозной среде. Для выделения статинов из культур-продуцентов после глубинного выращивания на жидких средах многие авторы используют культуральную суспензию, не отделяя предварительно биомассу от культуральной жидкости. Однако, как показали исследования Manzoni et. al [9], 83% от общего содержания статинов в *Asp. terreus* локализуется именно в биомассе, в то время как в культуральной жидкости обнаруживается не более 17% продукта. Более того, экстракция из тотальной культуральной суспензии драматически снижает уровень извлечения статинов. Опираясь на эти данные, для пер-

вичного определения количественного содержания и качественного состава статинов, продуцируемых отобранными штаммами при глубинном культивировании мы использовали биомассу отобранных культур.

Как видно из данных, представленных на рис. 1, динамика продуцирования ловастатина у отобранных штаммов сильно отличается друг от друга, что указывает на необходимость подбора соответствующих сред культивирования. Следует отметить, что в исследованиях J.L. Casas Lopez [8] при подборе условий культивирования максимальный титр ловастатина в штамме *Asp.terreus* ATCC20542 на оптимизированной среде составлял 229,8 мг/л среды. По результатам ВЭЖХ-анализа наибольшее содержание в штаммах *Asp.terreus 6*, *2*, *4* и *20* составило 22, 36, 80 и 121 мг/л среды, соответственно, на разных сроках культивирования. Таким образом, исходное содержание ловастатина в местных штаммах дает основание считать их вполне перспективными для оптимизации условий культивирования.

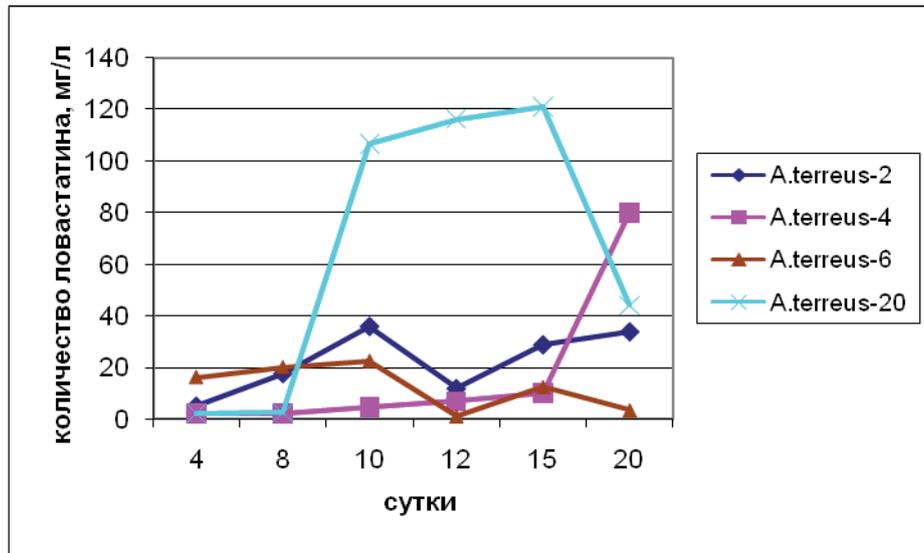


Рис. 1. Содержание ловастатина в отобранных штаммах *Asp.terreus*.

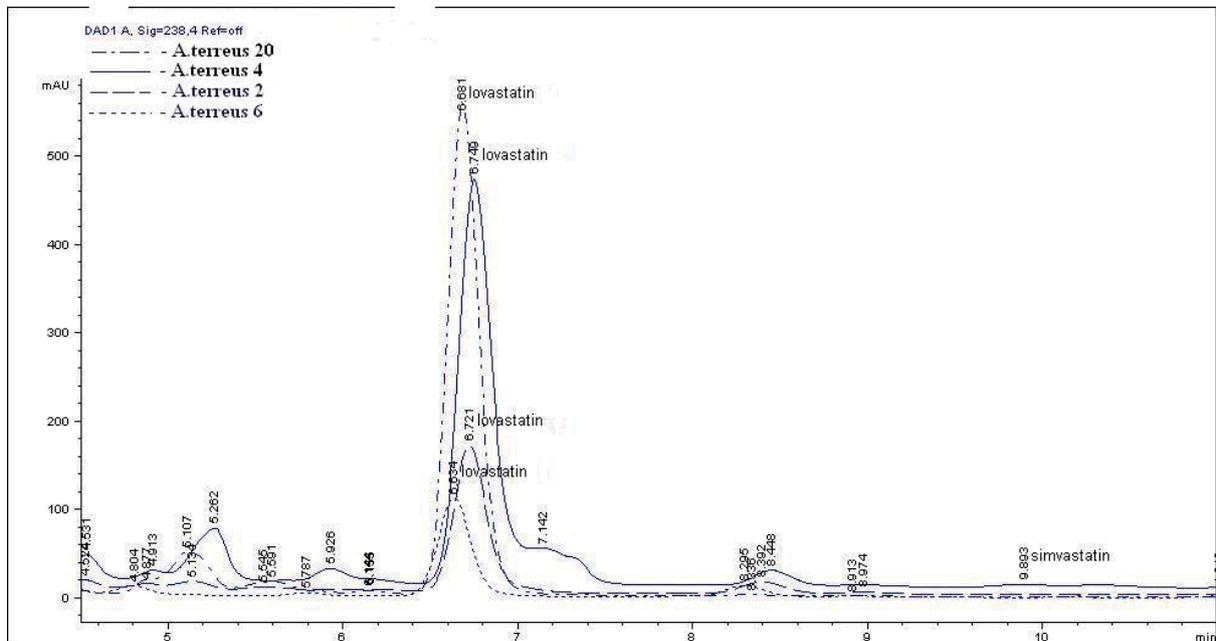


Рис. 2. Хроматографическое разделение внутриклеточных экстрактов штаммов *Asp.terreus* 4, *Asp.terreus* 6, *Asp.terreus* 2, *Asp.terreus* 20, выращенных на картофельно-глюкозной среде.

При ВЭЖХ-анализе на хроматограммах экстрактов как основной метаболит статиновой природы во всех четырех штаммах нами был выявлен ловастатин (рис.2). Однако, в отличие от остальных штаммов, при разделении экстрактов штамма *Asp.terreus* 4 проявлялся минорный пик, соответствующий по времени удерживания симвастатину. Как было отмечено выше, симвастатин получают

полусинтетическим путем деацетилированием экзогенного ловастатина культурой с соответствующей трансформирующей активностью [6]. В этой связи присутствие симвастатина в экстракте *Asp.terreus* 4 означает, вероятно, что в этом штамме есть ферментативная система для подобной трансформации, и этот факт требует особого внимания.

В результате проведенных нами исследований продуцирования ловастатина в местных штаммах *Asp.terreus* впервые выявлено 4 активных штамма, один из которых наряду с ловастатином способен продуцировать также незначительные количества симвастатина. В целом, полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой исходной концентрации ловастатина в местных штаммах аспергилл и необходимости более детального исследования их потенциальной статинообразующей активности.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V. et al . Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol-lowering agent. Proc Natl Acad Sci USA. 1980. Vol.77. P. 3957-3961.
2. Demain A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms // Appl Microbiol Biotechnol., 1999 V.52. P.455-463.
3. Hajjaj H., Niederberger P, Duboc P. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in chemically defined medium//Appl.Environ.Microbiol. 2001. V.67, P.2596-2602
4. Barrios-Gonzales J., Miranda R.U. Biotechnological production and applications of statins // Appl Microbiol Biotechnol. 2010. V.85. N 4. P.869-83.
5. M. Manzoni, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol –lowering drugs // Appl.Microbiol.Biotechnol. 2002. V.58. P.555-564.
6. Daborah RA, Lein J., Conder MJ, Tewalt GL. Enzymatic deacetylation of simvastatin. British Patent GB2255974(1992).
7. Kumar M.S, Pallapothu Mahendra Kumar, Hemant M. Sarnalik. A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay//Journal of Microbiological Methods. 2000. V.40. P.99-10.
8. Lopez C.J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Acien Fernandez F.G., Molina Grima E., Chisti Y. Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology // Journal of Chem.Technol. Biotechnol. 2004. V.79. P.1119-1126.
9. Manzoni M. Rollini M., Bergomi S., Cavazzoni V. Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains//Biotechnol. Technigues. 1998. V.12. P.529-532.
10. Friedrich J., Zuzek M., Bencina M., Cimerman A., Strancar A., Radez I. High performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths//J. Chromatogr. 1996. V. 704. P.363-367.