



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
“СТЕФАН АНГЕЛОВ”**



Анна Иванова Бръчкова

***Изолиране, идентификация и биологично
действие на β -карболинови алкалоиди и
дикетопиперазини от антарктически
микроорганизми от вида *Laceyella sacchari****

АВТОРЕФЕРАТ

на ДИСЕРТАЦИЯ

**за присъждане на образователна и научна степен «Доктор»
в професионално направление: 4.3 „Биологически науки”,
научна специалност 01.06.12. „Микробиология”**

Научен ръководител:

Проф., д-р, дхн, инж. химик Венета Иванова

София 2018

Дисертационният труд съдържа 161 страници и е илюстриран с 51 фигури, 12 таблици и 2 схеми. Библиографската справка включва 305 литературни източника, от които 3 на кирилица и 302 на латиница.

В автореферата е използвано номериране на фигурите и таблиците, което не съответства на номерирането в дисертационния труд.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Националния семинар по „Приложна микробиология и микробни биотехнологии” на 09.11.2017 г. в Института по микробиология "Стефан Ангелов", БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, 1113 София.

Изследванията, включени в дисертацията, са проведени в Департамента по приложна микробиология, лаборатория по Микробен биосинтез и екология – ИГ по Химия на природни вещества, Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН, с подкрепата на проект № BG051PO001-3.3.04/32.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 27.04.2018 г. от 11 ч в заседателната зала на Института по микробиология «Стефан Ангелов», БАН, ул. «Акад. Г. Бончев» бл. 26 на открито заседание на Научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Института по микробиология „Стефан Ангелов”, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, 1113 София, както и са публикувани съгласно ЗРАСРБ на адрес www.microbio.bas.bg



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
“СТЕФАН АНГЕЛОВ”**



Анна Иванова Бръчкова

***Изолиране, идентификация и биологично
действие на β -карболинови алкалоиди и
дикетопиперазини от антарктически
микроорганизми от вида *Laceyella sacchari****

АВТОРЕФЕРАТ

**на
ДИСЕРТАЦИЯ**

**за присъждане на образователна и научна степен «Доктор»
в професионално направление: 4.3 „Биологически науки”,
научна специалност 01.06.12. „Микробиология”**

Научен ръководител:

Проф., д-р, дхн, инж.химик Венета Иванова

Научно жури:

**Доц., д-р Людмила Кабаиванова – рецензент, председател на
Научното жури**

Проф., д-р Николай Генов, дхн – рецензент

Проф., д-р Венета Иванова, дхн – становище

Проф., д-р Пенка Мончева – становище

Доц., д-р Адриана Гущерова – становище

София 2018

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

BAB	– биологично активни вещества
КТ	– културална течност
МИК	– минимална инхибираща концентрация
ТСХ	– тънкослойна хроматография
ПТСХ	– препаративна тънкослойна хроматография
EDB	– еквивалентни двойни връзки
TFA	– трифлуороцетна киселина
TCA	– трихлороцетна киселина
DMSO	– диметилсулфоксид
ACN	– ацетонитрил
DMF	– диметилформамид
MeOH	– метанол
EtOH	– етанол
BuOH	– бутанол
EtOAc	– етилацетат
Ac	– ацетил
(CH ₃) ₂ CO	– ацетон
d	– деутериран
HPLC	– високоефективна течна хроматография
GC/MS	– газова хроматография / мас-спектрометрия
R _t	– време на задържане
R _f	– фактор на задържане
RP	– обратна фаза
HR	– високо разрешение
MS	– мас-спектрометрия
ЯМР	– ядрено-магнитен резонанс
UV	– ултравиолетов
Vis	– видим
1D	– едnodименсионален
2D	– двудименсионален
(ESI-MS) ⁺	– електроспрей йонизация – масспектрометрия с положителен йон
ESI-HRMS	– масспектрометрия-електроспрей йонизация с високо разрешение
¹ H-ЯМР	– протонен ядрено-магнитен резонанс
¹³ C-ЯМР	– въглероден ядрено-магнитен резонанс
HSQC	– 2D Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	– heteronuclear multiple-bond correlation
APT	– Attached Proton Test
HPLC/DAD/ESI-MS	– аналитична високо ефективна течна хроматография/UV-Vis с диод арай детектор/електроспрей йонизация с положителен йон-масспектрален анализ
[cyclo (Pro-Leu)]	– цикло (пролил-левцин)
[cyclo (Pro-Phe)]	– цикло (пролил-фенилаланин)
[cyclo (Leu-Val)]	– цикло (левцил-валин)
[cyclo (Phe-Leu)]	– цикло (фенилаланил-левцин)

[cyclo (Leu-Leu)]	– цикло (левцил- левцин)
ДНК	– дезоксирибонуклеинова киселина
РНК	– рибонуклеинова киселина
Mm.	– молекулна маса
Da	– Далтона
Cross-peak	– Крос-пик – точка на пресичане между сигналите на протони и въглеродни атоми при 2D-ЯМР спектри
PCR	– полимеразна верижна реакция

УВОД

Антарктида е най-студеният, ветровит и най-недостъпният континент на планетата Земя, с присъщи затруднения за научни изследвания. Той е единственият континент на планетата, който до голяма степен е непроучен. Редица научни изследвания подчертават значителната роля на континента. В последните две десетилетия усилено се изследва микроорганизмовият свят, битуващ в студените региони на планетата Земя. Особено голям интерес представлява малко проученият континент Антарктида. Данните за наземните микробни съобщества на Антарктида са все още оскъдни. В международните научни издания се появиха редица публикации, третиращи биоразнообразието, условията за преживяемост и биопродукцията на екстремни микроорганизми, адаптирани към условията на живот на континента Антарктида. Но на този етап не всичко е проучено, изследванията продължават и неминуемо водят до нови факти и явления.

С разкриване на систематичната принадлежност на микро- и макроорганизмите обект на изследване са и биологично активните вещества (БАВ), които те продуцират. През последните години, в резултат на бурното развитие на медицината, фармацията и биотехнологиите, нараства все повече необходимостта от търсене на нови биологично активни вещества (антибиотици, витамини, алкалоиди, полиненаситени мастни киселини, стероиди и др.), които биха могли да бъдат изолирани от полярни микроорганизми. Изучаването на биологично активните вещества от полярни микроорганизми е едно от най-актуалните направления в съвременната микробиология и биохимия. Тяхното биотехнологично приложение буди научен интерес. Особено

голям интерес представлява изолирането и доказването на химически структури на нови и познати алкалоиди от полярни микроорганизми, принадлежащи към групите на β -карболиновите алкалоиди и дикетопиперазините (циклични дипептиди).

Карболините са алкалоиди, които съдържат в структурата си индол, кондензиран с пиридинов пръстен. В зависимост от това на коя позиция е разположен азотният атом в пиридиновия пръстен, карболините биват α , β , γ и δ . Карболините съдържат два азотни атома (пиролов и пиридинов) в трицикличната система и наличието на тези два азотни атома определя основните физични свойства на тази група съединения. β -карболиновите алкалоиди са открити в много видове растения и животни, а също така и в някои бактерии. Тези вещества имат важна роля в медицината. Употребяват се при лечение на малария, невралгия, паркинсон, ревматизъм, колики, астма, очни болести и др. Последните изследвания доказват антибактериално, антигъбно, антипротозойно, антипаразитно, антитуморно и антиоксидантно действие.

Дикетопиперазините принадлежат към клас циклични органични съединения, които се получават в резултат на взаимодействие между две α -аминокиселини с отцепване на две молекули вода и образуване на пептидни връзки. Те са възможно най-малките циклични пептиди. Дикетопиперазините се синтезират от α -аминокиселини при различни организми и се считат за вторични метаболити. Някои протеази като дипептидилпептидази отцепват крайни аминокиселини от протеините и образуват дипептиди, които по естествен път циклизират и формират дикетопиперазини с различни странични вериги. Двата вида дикетопиперазини – природни и синтетични, показват антимикробно действие (включително антибактериално, антигъбно, антивирусно и антитуморно). Антибиотичното действие на дикетопиперазините (циклични дипептиди) е в пряка зависимост от тяхната конфигурация.

Синтезата на широка гама БАВ от полярни микроорганизми е едно от основните направления в развитието на приложната микробиология. Обект на изолиране, охарактеризиране и идентификация са микроорганизмите, синтезиращи важни БАВ. Тяхната биопродуктивност би могла да се повиши чрез селекция на щамовете, насочена регулация на биосинтезата и въвеждане на генетични методи с цел получаване на производствени щамове.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертационна разработка е да се изследват и идентифицират до вид два непроучени щама микроорганизми, изолирани от екскременти на пингвини, колекционирани на остров Ливингстън, Антарктида и да се проучи биопродукцията им по отношение на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини (циклични дипептиди).

С оглед на така поставената цел беше необходимо да се решат следните по-важни **Задачи**:

1. Да се идентифицират двата щама, първоначално предоставени като *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-22A, до вид посредством молекулярно биологични методи.
2. Да се изследват културалните течности (с аналитични методи) на обектните микроорганизми (*Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A) с цел установяване на компонентния състав на биосинтезираните β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини (циклични дипептиди).
3. Да се изследва динамиката на синтез на дикетопиперазини (циклични дипептиди) от антарктическият щам *Laceyella sacchari* IMBAS-22A.
4. Да се разработят оптимални лабораторни технологии за култивиране на щамовете, за изолиране и пречистване на доказаните β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини от културалните течности на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A.
5. Разделяне на биологичните смеси от β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини с хроматографски методи на отделни компоненти и изолирането им в молекулно-хомогенен вид.
6. Да се идентифицират и докажат химическите структури на изолираните β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини с метода на метаболомиката, химични и спектрални методи [HPLC/DAD/ESI-MS, еднодименсионални и двудименсионални ЯМР анализи (^1H , ^{13}C , APT, HSQC и HMBC)].
7. Да се изследва антимикробното действие на изолираните β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини спрямо Грам-положителни, Грам-отрицателни бактерии, дрожди и филаментозни гъби.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Идентификация на *Thermoactinomyces* sp. щамове IMBAS-14A и IMBAS-22A до вид чрез молекулярно биологични методи: Култивиране на двата щама при оптимални условия; изолиране на тотална геномна ДНК; провеждане на гел-електрофореза върху изолираната ДНК от *Thermoactinomyces* sp. щамове IMBAS-14A и IMBAS-22A; полимеразна верижна реакция (PCR) и секвениране, проведено от фирма MACROGEN (Холандия) по метода на Sanger; използване на БЛАСТ анализ;

2. Получаване на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини (циклични дипептиди) от културалните течности на *Laceyella sacchari* щам IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* щам IMBAS-22A

2.1. Щамове-продуценти: Като обект на проведените изследвания се използваха ферментационните течности на бактериалните култури *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A. Двата щам са изолирани от екскременти на пингвини, колекционирани на остров Ливингстън, Антарктида. Пробите са предоставени от Третата българска експедиция (Антарктида, 1995-1996 г.). Щамовете са изолирани и морфологично определени първоначално до род *Thermoactinomyces* от доц. А. Гущерова (Kosmachev, 1954) и предоставени като щамове *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-22A. На базата на предпочитаната температура за растеж и развитие е установено, че двата щам са термофили с оптимална температура на растеж при 50°C и са депозирани в колекцията на Института по микробиология към Българската Академия на Науките (БАН).

2.2. Условия на култивиране: Спорови суспензии на културите *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A се инокулират в Ерленмайерови колби (500 ml), съдържащи 50 ml среда в следния състав: 0.5% пептон, 0.5% царевичен екстракт, 1.0% нишесте, 0.5% NaCl и 0.5% CaCO₃; рН 7.2 преди автоклавиране. Култивирането се проведе на Шутел апарат с 325 min⁻¹ при 50°C в продължение на 18 часа. С получения вегетативен мицел (5%) се инокулира ферментор Biotec, съдържащ 7.0 L хранителна среда в същия състав. Ферментацията се проведе в продължение на 48 часа при 50°C.

2.3. Изолиране и пречистване на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини от културалните течности на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A: Изолирането на суровите продукти от културалните течности на посочените щамове се проведе с екстракционни и утаечни методи. Пречистването на получените сложни органични смеси се проведе с колонни хроматографии, като беше приложен следният адсорбент: Silica gel 60 (70-230 mesh), а елуирането на търсените активни молекули се осъществи с подходящи подвижни фази в градиент. Фракциите се събираха с фракционен колектор APS-I.

2.4. Препаративно разделяне на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини чрез препаративна тънкослойна хроматография (ПТСХ): Разделянето на β -карболините и дикетопиперазините се проведе със стандартни препаративни плаки със закрепен силикагелов слой. Сухите остатъци (x 20.0 mg), разтворени в метанол се нанасят върху препаративни силикагелови тънкослойно-хроматографски плаки (Silica gel 60 F₂₅₄, 20×20 cm, Merck), прилагайки подвижни фази, съобразени с поляритета на изследваните вещества. Разделителните зони, съответстващи на компонентите на β -карболиновите алкалоиди и дикетопиперазините се проявяват директно върху плаките, детектирани при 254 и 366 nm в UV-светлина, след което се засмукват с вакуум апарат

и елуират с 96% метанол (Merck).

2.5. Антимикробно действие на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини: За тестване на биологичното действие на β -карболините и дикетопиперазините беше използван агар-дифузионният метод съгласно Европейската фармакопея (1997).

2.6. Препаративно разделяне на β -карболинови алкалоиди чрез HPLC: Колона: Nucleodur RP-18 (250 $\times$ 10 mm, 10 μ m). Подвижна фаза: метанол-вода/0.1% TFA (8.0:2.0). Скорост на потока: 8.0 ml/min. Детекция: 245 nm. Елуатите от HPLC се концентрират до отстраняване на метанола, реекстрахират се с етилацетат и се концентрират под вакуум до сух остатък. Получени са в молекулно-хомогенен вид компонент 1 (12 mg) и компонент 2 (2 mg).

2.7. Разделяне на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини с аналитична тънкослойна хроматография (ТСХ): ТСХ е проведена върху хроматографски плаки Silica gel 60, F₂₅₄ (Merck) в разработени различни по полярност подвижни фази. За откриването на изследваните вещества върху тънкослойните плаки се прилагаха специфични химични реагенти, като 0.5% разтвор на ванилин в метанол/сярна киселина, 0.5% разтвор на ванилин в метанол/сярна киселина/оцетна киселина, реагента на Ерлих, Сакагучи и др.

2.8. Аналитична високо ефективна течна хроматография /UV-Vis с диод арай детектор/Електроспрей йонизация с положителен йон – масспектрален анализ (HPLC/DAD/ESI-MS): HPLC/DAD/ESI-MS анализът е приложен за охарактеризиране на компонентния профил на β -карболиновите алкалоиди и дикетопиперазините (циклични дипептиди), намиращи се в етилацетатния екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* щамове IMBAS-14A и IMBAS-22A. Етилацетатните фракции бяха разделени чрез аналитична високоефективна течна хроматография (HPLC), с колона (Phenomenex Gemini C-18 100 $\times$ 3 mm, 5 μ m) и прилагане на линейен градиент от 0-100% ацетонитрил + 0.2% мравчена киселина във вода в продължение на 30 min със скорост на потока 1.0 ml/min. След елуиране през детектор с диодна матрица (Linear UV-Vis-205), 50 μ l/min от потока беше разделен в ESI-маспектрометъра, работещ в положителен йонен режим (Massdetector Finnigan LCQ).

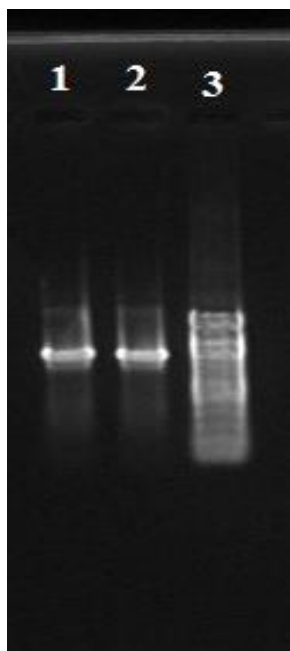
2.9. Общи експериментални процедури: Идентификацията на β -карболиновите алкалоиди и дикетопиперазините се проведе със следните спектрални методи: Електроспрей-маспектрите (ESI-MS) бяха заснети на LCQ Finnigan Mass Spectrometer. Електроспрей-маспектрите с високо разрешение (ESI-HRMS) бяха заснети на APEX IV, 7T, FT-ICR MS Bruker Daltonik. Еднодименсионалният протонен ядрено-магнитен резонансен спектър [^1H (300 и 600 MHz)] и еднодименсионалният въглероден ядрено-магнитен резонансен спектър [^{13}C (75.5 и 125.7 MHz)] се проведеха в Ацетон- d_6 и CDCl_3 на Bruker AMX-300 и на Varian Inova 600 (599.740 MHz) спектрометър. Данните за ^{13}C мултиплетност са получени от APT експерименти. Двудименсионалните ЯМР спектри (HSQC и HMBC) са снети по конвенционални методи. UV-Vis-спектрите (λ_{max} в nm) са снети на апарат Specord 2000 (Analytic Jena, Германия).

3. Изследване динамиката на синтез на дикетопиперазини (циклични дипептиди) от антарктически щам *Laceyella sacchari* IMBAS-22A: С проведеното изследване се определя оптималният час на култивиране на щам, при който концентрацията на дикетопиперазините (циклични дипептиди) е най-висока в културалната течност на щам. Пробите от културалната течност са взети на 24-я, 48-я и 72-я час. Тестването на пробите се проведе с аналитична високо ефективна течна хроматография (HPLC) и аналитична тънкослойна хроматография (ТСХ).

Резултати и обсъждане

1. Идентификация на антарктическите щамове до вид чрез молекулярно биологични методи

Двата антарктически щам на базата на морфологични, биохимични и физиологични критерии са идентифицирани първоначално до род *Thermoactinomyces* от доц. А. Гущерова (Kosmachev, 1954) и представени като щамове *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-22A. За постигане на точна видова идентификация на двата щам приложихме златния стандарт в бактериалната таксономия – секвенционен анализ на части от рибозомалния оперон в съчетание с биохимични тестове. За осъществяването на молекулярно-биологичните методи бяха получени препарати от тотална ДНК по метода на "Protocol: Purification of total DNA from plant tissue (mini protocol)" на фирма QIAGEN (САЩ) за всеки щам. Изолираните нативни ДНК бяха използвани в последващите PCR (Polymerase chain reaction) анализи. С помощта на универсални праймери за актиномицети беше амплифициран 16S генът от рибозомалния (rnp) оперон при двата щам (16S рДНК) съгласно метода на PCR. Получените продукти са визуализирани в 1% (w/v) агароза (Alfa Aesar) на фиг. 1.



Фиг.1. Агарозна гел-електрофореза (1% w/v) на 16s-рДНК от *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-22A, получена при амплифициране чрез PCR с оптимизирана температура на хибридизация на праймерите.

На стартова ямка:

1 е проба на 16s-рДНК, изолирана от щам *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и амплифицирана при температура на хибридизация при 58°C;

2 е проба на 16s-рДНК, изолирана от щам *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-22A и амплифицирана при температура на хибридизация 62,8°C;

3 е маркерът, съдържащ ДНК FERMENTAS 50-3000 b.p.

Амплифицираната 16S рДНК беше подложена на секвенционен анализ в Macrogen Inc. (филиал Холандия) с помощта на 3730xlДНК секвенатор (Thermo Fisher Scientific, САЩ) по метода на Sanger. Получените секвенции на 16S-рДНК от *Thermoactinomyces sp.* щамове IMBAS-14A и 22A бяха анализирани с програма Chromas 2.3 (Technelysium Pty Ltd., Австралия) и видовата принадлежност на щамове бе определена чрез BLAST (сравнителен анализ) и намиране на най-близката секвенция в базата данни (NCBI-Genbank). В резултат на сравнителния анализ бе установено 99% сходство на двата щама *Thermoactinomyces sp.* IMBAS-14A и 22A с щамове от вида *Thermoactinomyces sacchari* (таблица 1), който от 2005 г. е с ново таксономично название *Laceyella sacchari*. Същият висок процент на идентичност бе отчетен и с щамове UICC B-78 и UICC B-76, идентифицирани като новооткрития вид *Laceyella tengchongensis* (Zhang et al., 2010) (таблица 1). Според Zhang и колектив двата вида са близкородствени. Този резултат може да се обясни с настъпилите изменения във филогенетичната подредба на род *Thermoactinomyces*. По-рано видът *Laceyella sacchari* е бил познат със старото си име *Thermoactinomyces sacchari*. След предложението на Yoon видът да бъде прекласифициран в друг род, той придобива новото име *Laceyella sacchari* (Yoon et al., 2005). При изследванията на Yoon и сътрудници се установява, че *Thermoactinomyces sacchari* има различен профил на менахинони (при него преобладава менахинон-9) спрямо другите видове от същия род и достатъчно голяма разлика в гена на 16S рДНК в сравнение с други видове от рода *Thermoactinomyces* и това дава основание видът да бъде прекласифициран в друг род – *Laceyella* (Yoon et al., 2005).

Таблица1. Секвенционен и БЛАСТ анализ на антарктически щамове IMBAS-14A и 22A

Щам	Получени секвенции 5'-3'	Степен на сходство
IMBAS-14A	AGTAGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGC CGCGTGAGTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTGTTCTGA AGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTCAGGAGAAAGCCCCGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTAT CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCATTAAAGT CAGGTGTGAAAGGCTGCGGCTCAACCGCAGAGCGGCACCTGAA ACTGGATGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCCGGT GTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCACTGGCG AAGGCGGCTCTCTGGCCTGTTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGC GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAGGTGTGGGGGGTCTACCTCGGTGCCG AAGGTAACCCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG	99% с <i>Laceyella sacchari</i> 99% с <i>Laceyella tengchongensis</i>

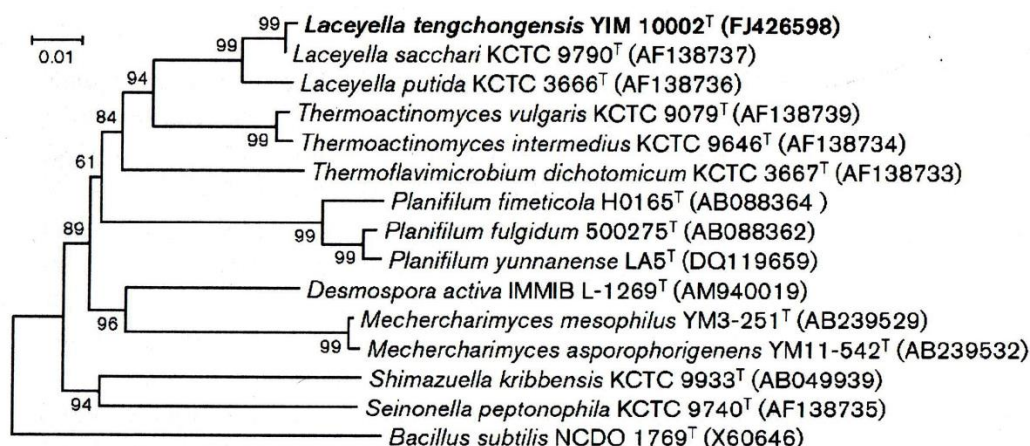
	GCTTGACATCCCGCTGACCGCTCCAGAGATGGAGCTTCCCTTCG GGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTTCACTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATC GCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACAGCCGG TGAAAGCCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAATCATCATGC CCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAA TGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGGAGCTAATCCACAAAACCG GTCTCAGTTCGGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGCC GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTG	
IMBAS-22A	AGTAGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGC CGCGTGAGTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTGTTCTGA AGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTCAGGAGAAAGCCCCGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTAT CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCAATTAAAGT CAGGTGTGAAAGGCTGCGGCTCAACCGCAGAGCGGCACCTGAA ACTGGATGACTTGAGTGACAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCCGGT GTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAAGTGGCG AAGGCGGCTCTCTGGCCTGTTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGC GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAGGTGTCGGGGGGTCTACCCTCGGTGCCG AAGGTAACCCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGG GCTTGACATCCCGCTGACCGCTCCAGAGATGGAGCTTCCCTTCG GGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTTCACTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATC GCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACAGCCGG TGAAAGCCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAATCATCATGC CCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAA TGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGGAGCTAATCCACAAAACCG GTCTCAGTTCGGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGCC GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTG	99% с <i>Laceyella sacchari</i> 99% с <i>Laceyella tengchongensis</i>

* 16s рДНК секвенцията на *Laceyella sacchari* щам IMBAS-14A е депозирана в NCBI-Ген Банката под номер MG585354.

16s рДНК секвенцията на *Laceyella sacchari* щам IMBAS-22A е депозирана в NCBI-Ген Банката под номер MG589924.

Независимо от високата дискриминативна способност на секвенционния 16S-рДНК анализ двата щама *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и 22A не могат еднозначно да се определят до един вид. Затова получените данни от BLAST анализите бяха комбинирани с тези, получени с други методи за отличаването от видовете *Laceyella sacchari* и *Laceyella tengchongensis*, съгласно изискването на полифазната таксономия. Според Zhang et al., 2010, *Laceyella tengchongensis* не разгражда нишестето, докато *Laceyella sacchari* притежава тази метаболитна активност. Максималната температура на растеж при *Laceyella tengchongensis* е 70°C, докато при *Laceyella sacchari* е 65°C. Биохимичните тестове с *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-22A доказват способността на щамовете да разграждат

нишесте (Gousterova et al., 2014). Експериментално е установено, че максималната температура на растеж на щамовете *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и IMBAS-22A е 60°C (непубликувани данни). Следователно изследваните два антарктически щама могат да бъдат идентифицирани като *Laceyella sacchari* (Lacey 1971). Това ни дава основание да предложим преименуването на *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-22A на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A.



Фиг.2. Филогенетична дендрограма на семейство *Thermoactinomycetaceae* с включените в него щамове от вида *Laceyella sacchari* и *Laceyella tengchongensis*. *Bacillus subtilis* е извън сем. *Thermoactinomycetaceae*. (по Zhang et al., 2010). Линията показва 1% секвенционна дивергенция.

По наши данни това е първото съобщение за наличие на този вид в антарктически проби от 1996 г. Идентифицирането му до вид *Laceyella sacchari* допълва научната информация за ареала на този вид.

БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВТОРИЧНИ МЕТАБОЛИТИ (β-КАРБОЛИНОВИ АЛКАЛОИДИ И ДИКЕТОПИПЕРАЗИНИ), ПРОДУЦИРАНИ ОТ АНТАРКТИЧЕСКИ МИКРООРГАНИЗМИ

Преживяването на микроорганизмите в антарктически условия на живот изисква от съответните родове и видове особена приспособяемост и издръжливост срещу стресиращите фактори като например недостиг на субстрат, UV-лъчения, ниски температури в продължително дълъг период от време и кратковременни интензивни нагрявания през антарктическото лято. Ето защо би трябвало да се очаква генетично приспособяване на антарктическите организми към факторите на стреса. Всичко това предполага в глобален аспект биосинтезата на известни и нови метаболити с уникални структури и специфично биологично действие. Антарктида е единственият континент на планетата Земя, който до голяма степен е непроучен.

Алкалоидите от групите на β -карболините и дикетопиперазините (циклични дипептиди), продуцирани от антарктически щамове, са относително малко на брой и разработени недостатъчно.

Карболините са алкалоиди, които съдържат в структурата си индол, кондензиран с пиридинов пръстен. В зависимост от това на коя позиция е разположен азотният атом в пиридиновия пръстен (1, 2, 3 и 4^{та} позиция), карболините биват α , β , γ и δ . Карболините съдържат два азотни атома (пиролов и пиридинов) в трицикличната система и наличието на тези два азотни атома определя основните физични свойства на тази група съединения, като пироловият азот е по-слабо алкален от пиридиновия.

Дикетопиперазините, познати още като диоксопиперазини или пиперазиндиони, са клас органични съединения, които се състоят от пиперазинов пръстен и две кетогрупи, свързани със самия пръстен. Възможни са три вида позиционни изомери на дикетопиперазините в зависимост от разположението на двете кетогрупи в пръстена: 2,3-, 2,5- и 2,6-изомери. 2,5- дикетопиперазините са циклодипептиди, получавани чрез кондензация на две α -аминокиселини. От тези три изомера на дикетопиперазините 2,5-derivatите са обект на най-голям интерес.

В процеса на търсене на нови БАВ с антимикробно действие бяха изследвани два щамове - *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A, изолирани от екскременти на пингвини, колекционирани на остров Ливингстън, Антарктида. Остров Ливингстън, на който в последните две десетилетия се установи и работи българската научно-изследователска експедиция, е вторият по големина остров на Антарктида. Притежава площ от 845 км², като 90% от неговата територия е постоянно покрита с лед и само 10% през антарктическото лято е свободна от сняг и лед (Lopes – Martinez и сътр., 1992).

Пробите от екскременти на пингвини са предоставени от Третата българска експедиция (Антарктида, 1995-1996). Щамовете са изолирани и морфологично определени първоначално до род *Thermoactinomyces* (Kosmachev, 1954). На базата на предпочитаната температура за растеж и развитие е установено, че двата щамове са термофили с оптимална температура на растеж при 50°C и са депозирани в колекцията на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ към Българската академия на науките.

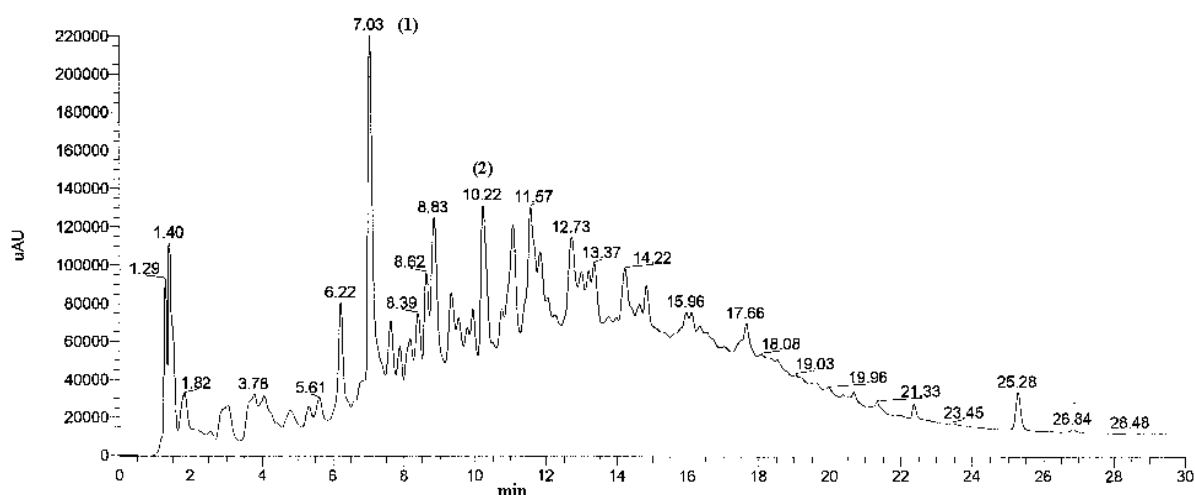
2. Култивиране, изолиране, идентификация и биологично действие на β -карболинови алкалоиди от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A

2.1. Култивиране на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A

Култивирането на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A се проведе двустадийно. Спорова суспензия на културата *Laceyella sacchari* IMBAS-14A се инокулира в Ерленмайерови колби, съдържащи хранителна среда в следния състав: пептон, царевичен екстракт, нишесте, NaCl и CaCO₃, рН преди автоклавиране 7.2. Култивирането се проведе на Шутел апарат при 50°C в продължение на 18 часа. С получения вегетативен мицел (5%) се инокулира ферментор Biotec, съдържащ хранителна среда в същия състав. Ферментацията се проведе в продължение на 48 часа при 50°C. Методът за култивирането на *Laceyella sacchari* щам IMBAS-14A е предложен от доц. А. Гущерова и Kosmachev (Kosmachev, 1954). Предварителните изследвания чрез аналитични методи върху културалната течност (КТ) на разработвания щам показаха, че 70-80% от съдържанието на алкалоидите се намира в културалния филтрат, а 20-30% в мицела.

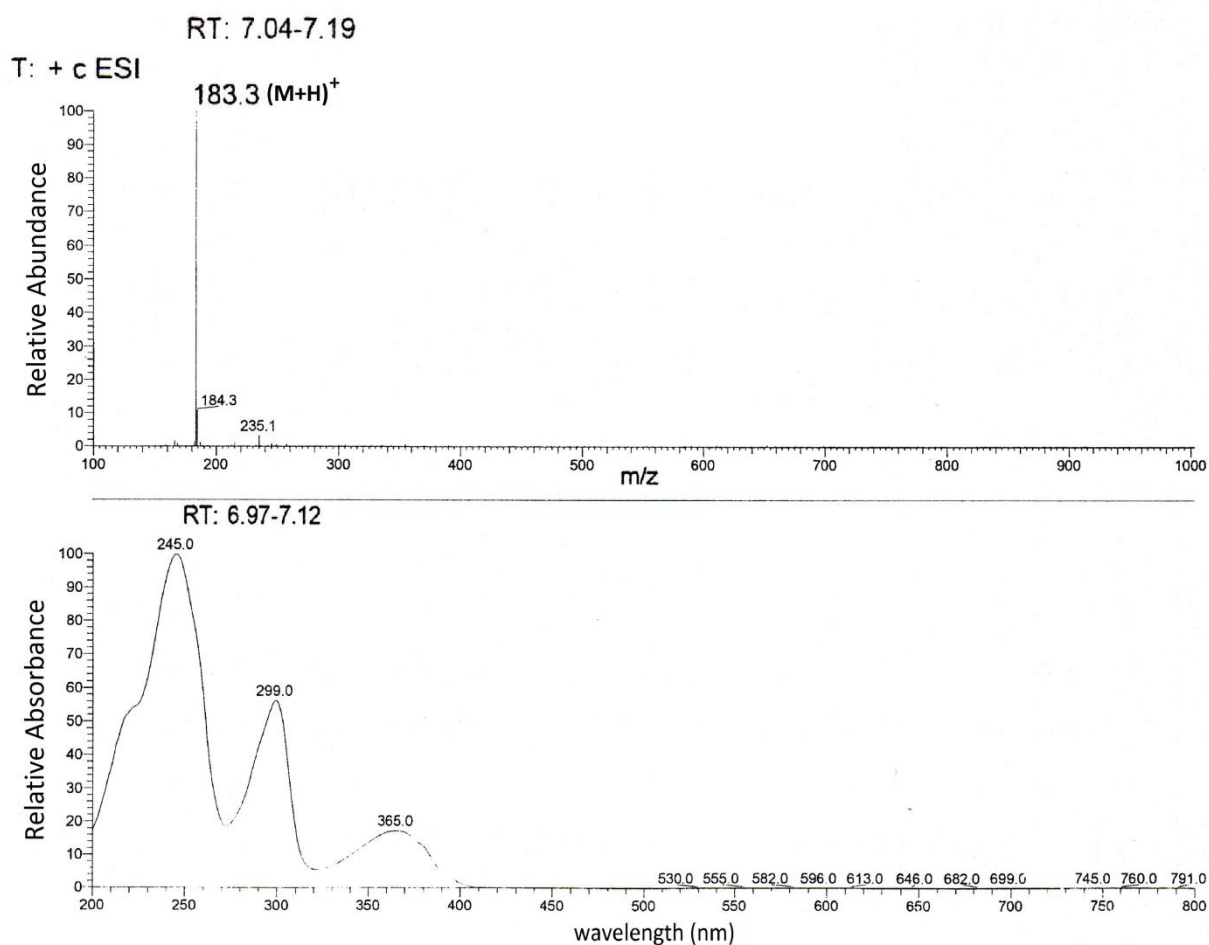
2.2. Аналитична високо ефективна течна хроматография/UV-Vis с диод арай детектор/Електроспрей йонизация с положителен йон-масспектрален анализ (HPLC/DAD/ESI-MS)

HPLC/DAD/ESI-MS анализът (метабономика) е приложен за охарактеризиране на компонентния състав на вторични метаболити (алкалоиди), намиращи се в етилацетатния екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A.

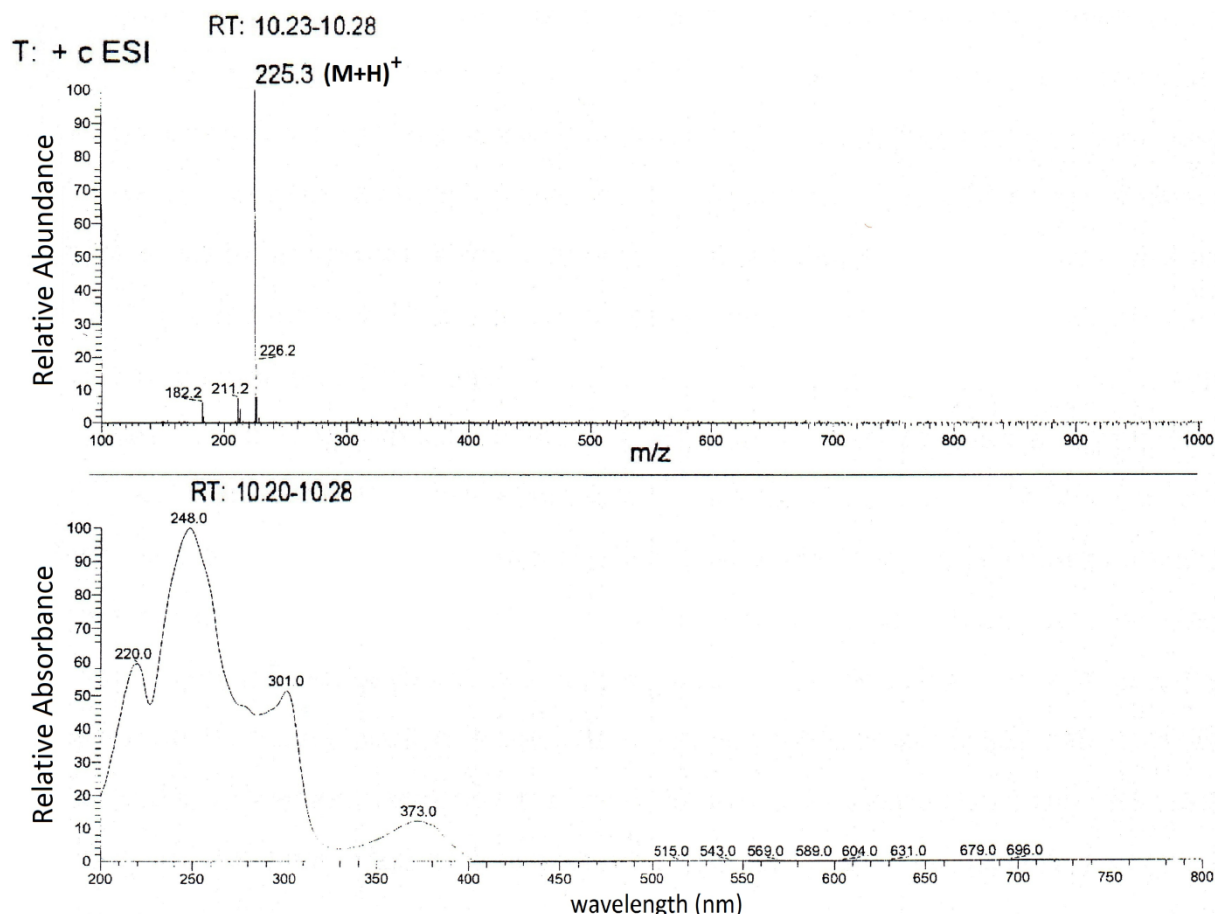


Фиг. 3А. HPLC-анализ на етилацетатния екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A. Наблюдават се 2 интензивни и добре разделени пика с времена на задържане: (1- $t_R = 7.03 \text{ min}$ и 2- $t_R = 10.22 \text{ min}$)

На базата на HPLC/DAD/ESI-MS анализите (фиг.3А, фиг.3Б и фиг.3В), проведени върху компонентите **1** и **2** (пикове 1 и 2), е получена информация за абсорбционните максимуми в UV-Vis спектрите и за протонирани молекулни йони на компонентите **1** и **2**. Мас-спектрите с електроспрей йонизация с високо разрешение дават информация за емпиричните формули на компонентите **1** и **2**: Компонент **1**- $C_{12}H_{10}N_2$, $183.3 (M+H)^+$; Компонент **2**- $C_{14}H_{12}N_2O$, $225.3 (M+H)^+$. Таблица 2 обобщава времената на задържане в HPLC хроматограмата, UV-Vis и мас-спектралните характеристики на компонентите **1** и **2**, получени в резултат на HPLC/DAD/ESI-MS анализи. Въз основа на получените данни и сравнени с нискомолекулни вторични метаболити, предоставени от база данни, бихме могли двата компонента да ги отнесем към групата на β -карболиновите алкалоиди.



Фиг. 3Б. ESI(+)-MS и UV-Vis (DAD) анализи на компонент **1**



Фиг.3В. ESI(+)-MS и UV-Vis (DAD) анализи на компонент 2

Таблица 2. HPLC, UV-Vis и MS анализи на компонентите **1** и **2** в етилацетатен екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A

Компоненти	t_R (min)	HPLC-UV-Vis (DAD) (nm)	HPLC-ESI-MS	
			Протониран молекулен йон (M+H) ⁺ (m/z)	(M+H) ⁺ фрагменти [m/z (relative abundance, %)]
Компонент 1	7.03	220, 245, 299, 365	183.3	183.3 (100), -
Компонент 2	10.22	220, 248, 301, 373	225.3	225.3 (100), 211.2 (10), 182.2 (8)

Метаболомиката, представена чрез комбинации от аналитична високо ефективна течна хроматография/UV-Vis с диод арай детектор/електроспрей йонизация с положителен йон–масспектрален анализ (HPLC/DAD/ESI-MS); газова хроматография / електроспрей йонизация с положителен йон–масспектрален анализ (GC/ESI-MS) и аналитична високо ефективна течна хроматография/ядрено-магнитен резонанс (HPLC/¹H-ЯМР), е сравнително нов метод за качествено и количествено определяне на

група сродни съединения или на съединения от специфичен метаболитен път. Използва се за качествено и количествено определяне на всички метаболити или за метаболитен отпечатък (fingerprint). Също така намира приложение за класификация на пробата чрез бърз анализ без разширена идентификация на съединенията. Газовата хроматография в комбинация с мас-спектрометрията е един от най-мощните и широко използвани методи. Но за определянето на много биомолекули е необходима предварителна химическа дериватизация, без която е възможен само анализът на лесно летливи вещества. При някои макромолекули и полярни метаболити методът е неприложим. Високо ефективната течна хроматография, комбинирана с UV-Vis и мас-спектрометрията в сравнение с газ-хроматографията /мас-спектрометрията има по-ниско хроматографско разрешение, но е по-подходяща за широк обхват от вещества с различен поляритет. Мас-спектрометрията се използва за идентификация и количествен анализ на метаболити след тяхното разделяне с високо ефективна течна хроматография или газова хроматография. Разработени са библиотеки, съдържащи мас-спектрални данни, които позволяват идентификацията на метаболитите на базата на тяхната фрагментация при йонизация. Метаболомиката е метод, който е много добре приложим за идентификацията на известни метаболити, за които има данни в библиотеката на апарата (Novotny et al., 2008). Доказателството на пълната химическа структура на метаболитите и същевременно коректното позициониране на страничните им функционални групи изисква тяхното изолиране в молекулно-хомогенен вид и прилагане на 1D и 2D ЯМР методи или рентгеноструктурен анализ.

2.3. Изолиране, пречистване и препаративно разделяне на β -карболинови алкалоиди от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A

Изолирането на β -карболиновите алкалоиди се осъществи от мицела и културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A. Изолирането, пречистването и разделянето на β -карболиновите алкалоиди от културалната течност на изследвания щам е представено на схема 1. След корекция на рН на културалната течност до 8.0-8.5 бяха приложени към мицела и културалния филтрат екстракционни методи. Обединените екстракти от двата обекта и концентрирани до сух остатък (суров продукт) бяха пречистени със силикагелова колонна хроматография. Компонентите на суровия продукт се елуират от колоната последователно с подходящи подвижни фази. На отделни етапи от лабораторната технология са отделени фракции, съдържащи β -карболинови алкалоиди (компоненти 1 и 2).

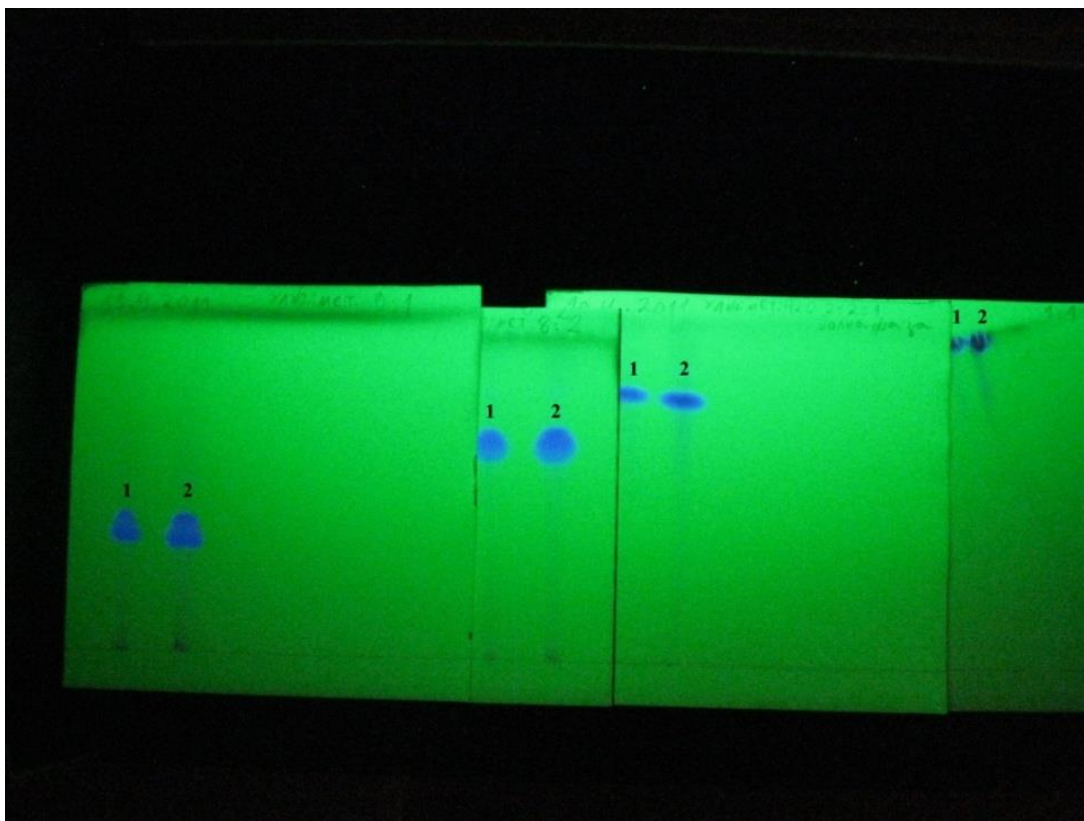
Схема 1. Изолиране и пречистване на β -карболинови алкалоиди от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A



Пътят на колоната относно търсенето и пречистването на β -карболиновите алкалоиди се контролираше с аналитична тънкослойна хроматография (ТСХ) върху силикагелови тънкослойни плаки (Merck 60, F₂₅₄) в подвижна фаза хлороформ-метанол (9.0:1.0, v/v). Хроматографските петна бяха детектирани с UV лампа при 366 и 254 nm. По-натанъшното пречистване и разделяне на компонентите на β -карболиновите алкалоиди се проведе с препаративна тънкослойна хроматография (ПТСХ). Крайното пречистване и разделяне на алкалоидите се осъществи с високоефективна течна хроматография (HPLC).

Чистотата на изолираните вещества беше контролирана с аналитична тънкослойна хроматография (ТСХ) върху силикагелови тънкослойни плаки (Merck 60, F₂₅₄) в подвижни фази: хлороформ-метанол (9.0:1.0, v/v); хлороформ-метанол (8.0:2.0, v/v); хлороформ-метанол-вода (2:2:1) (v/v/v), долна фаза и етилметилкетон-етанол-амоняк (1.0:1.0:1.0, v/v/v). В тези подвижни фази компонентите **1** и **2** притежават следните R_f стойности: 0.33, 0.57 0.77 за компонент **1** и 0.30, 0.52 0.74 за компонент **2**. Подвижната фаза в етилметилкетон-етанол-амоняк (1.0:1.0:1.0, v/v/v) се оказва неподходяща за аналитичното разделяне на веществата (фиг.4). Хроматографските петна бяха детектирани с UV лампа при 366 и 254 nm и визуализирани при проявяване със следните химични реагенти: 0.5% разтвор на ванилин в метанол/сярна киселина/оцетна киселина и реагент на Ерлих с последващо нагряване при 120° C за 3-5 минути. Оцветяването на хроматографските петна е в синьовиолетово и синьо (фиг.4).

Компонентите **1** и **2** са изолирани като жълти аморфни субстанции, разтворими в низши алкохоли, диметилсулфоксид, N,N-диметилформамид, ацетон и етилов ацетат, но неразтворими във вода и *n*-хексан. И двата компонента флуоресцират, детектирани са под UV лампа при 366 и 254 nm. Показват положителни цветни реакции с реагента на Ерлих, което предполага наличие на индолов скелет в структурите им. Също така показват цветни реакции с реагента на Драгендорф (присъствие на N) и 3% разтвор на ванилин-сярна киселина. UV-Vis спектрите показват абсорбционни максимуми при 220, 245, 299 и 365 nm за компонент **1** и при 220, 248, 301, 373 nm за **2**. Компонент **1** е с молекулна маса 182 Da, емпирична формула C₁₂H₁₀N₂ и предполага 9 еквивалентни двойни връзки и/или пръстени (EDB) в структурата си.

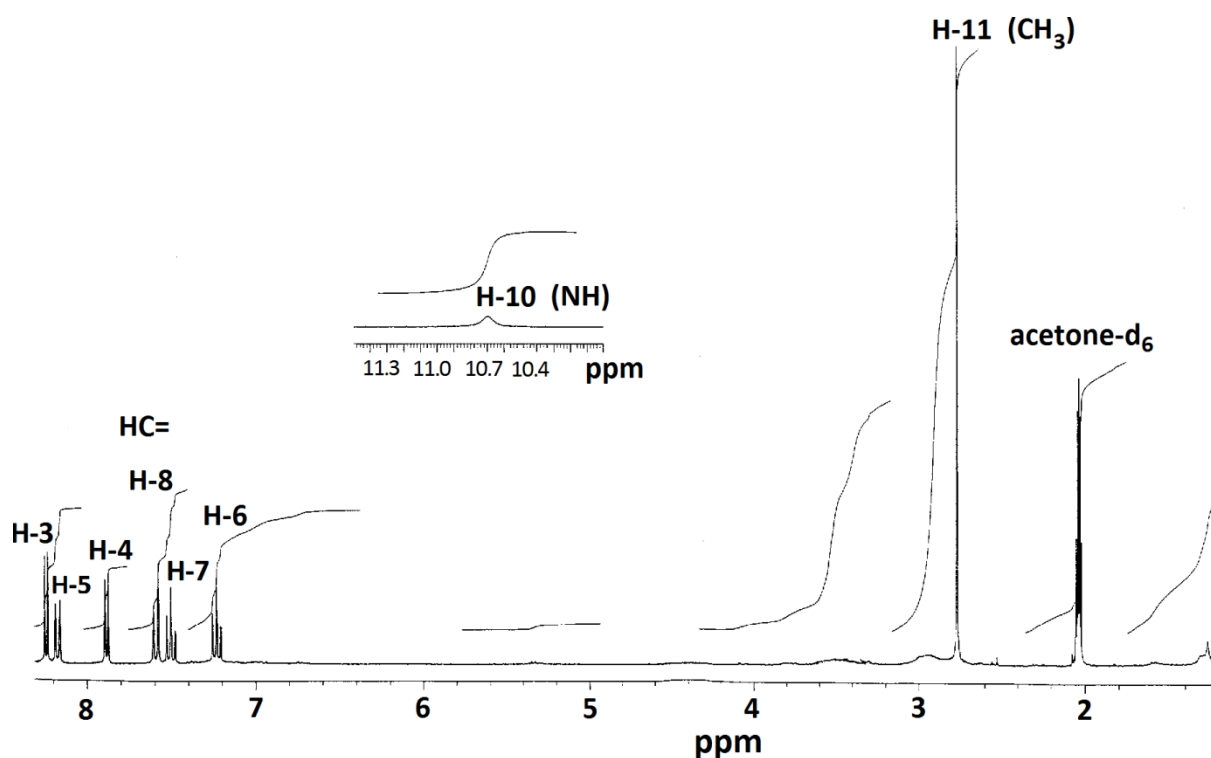


Фиг.4. Аналитични тънкослойни хроматограми (ТСХ) на изолираните компоненти **1** и **2** в следните подвижни фази: хлороформ-метанол (9.0:1.0, v/v); хлороформ-метанол (8.0:2.0,v/v);хлороформ-метанол-вода(2.0:2.0:1.0, v/v/v), долна фаза; етилметилкетон-етанол-амоняк (1.0:1.0:1.0, v/v/v). Детектиране **при 254 nm**.

2.4. Доказване на пълните химически структури на β -карболинови алкалоиди, изолирани от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A

2.4.1. Доказване на пълната химическа структура на компонент **1 (β -карболинов алкалоид)**

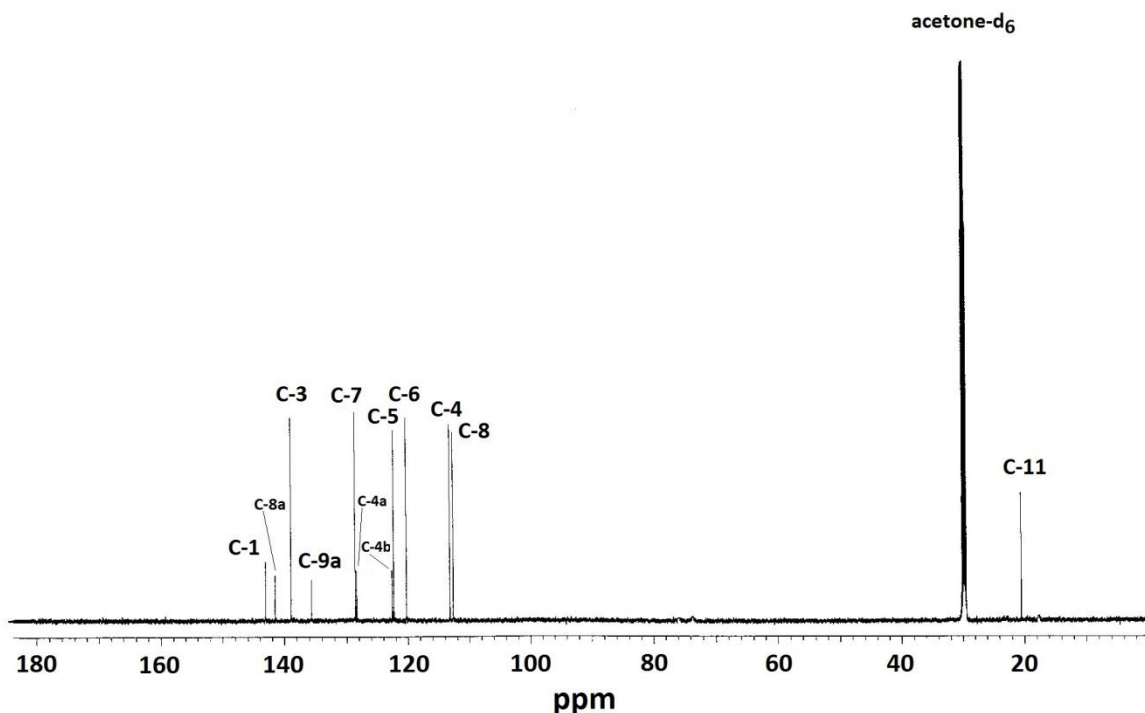
Пълната химическа структура на компонент **1** е доказана на базата на масспектрални анализи по метода на електроспрей йонизация, положителен йон с високо разрешение (ESI-HRMS) (фиг.3А и 3Б) и интензивни ЯМР анализи (^1H , ^{13}C , АРТ, HSQC и HMBC). На фиг. 5 е представен еднодименсионалният протонно ядрено-магнитен резонансен спектър, сканиран в деутериран ацетон при 300 MHz [1D ^1H -ЯМР спектър (в Acetone- d_6 , 300 MHz)]. Този спектър подава информация за броя на протоните, които съответстват на емпиричната формула и участват в структурата на веществото, а също така и данни за коуплунг константи (разлика в честотата между пиковите, $J = \text{Hz}$, при мултиплетност).



Фиг.5. 1D ^1H -ЯМР спектър (в Acetone- d_6 , 300 MHz) на компонент **1**

Интерпретацията и анализът на еднодименсионалния протонен ядрено-магнитен резонансен спектър (^1H ЯМР спектър) на компонент **1** показва наличие на сигнали в слабо поле при δ_{H} 8.22 (H-3), 7.84 (H-4), 8.19 (H-5), 7.21 (H-6), 7.50 (H-7) и 7.60 (H-8), съответстващи на 6 ароматни протона. Наблюдава се един сигнал при δ_{H} 10.70, принадлежащ на протон към NH група и един ароматен метилов синглет, съдържащ 3 протона при δ_{H} 2.79.

На фиг. 6 е показан еднодименсионалният въглероден ядрено-магнитен резонансен спектър, сканиран в деутериран ацетон при 125.7 MHz [1D ^{13}C -ЯМР спектър (в Acetone- d_6 , 125.7 MHz)]. Броят на сигналите върху базовата линия, изразени в ppm, определят броя на въглеродните атоми, участващи в емпиричната и структурна формула на изследваното вещество.



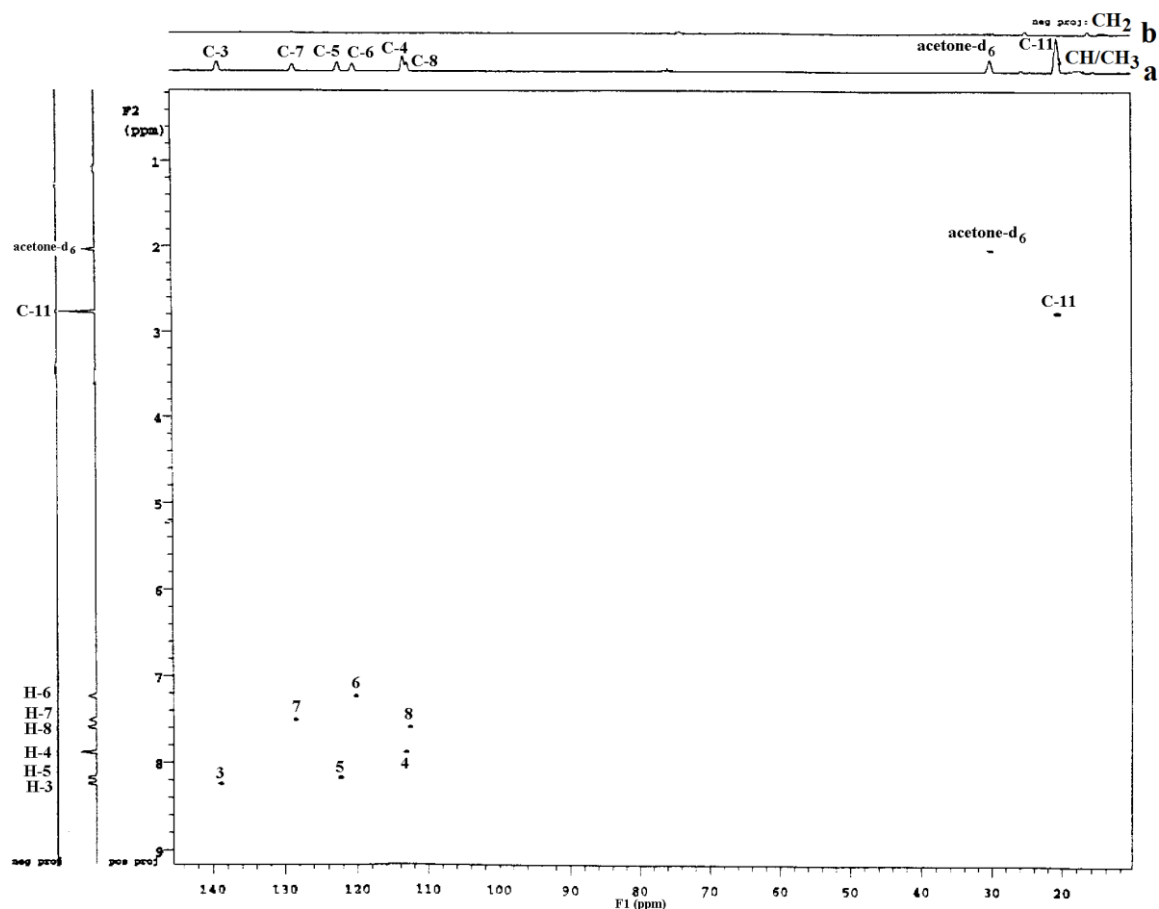
Фиг. 6. 1D ^{13}C -ЯМР спектър (в Acetone- d_6 , 125.7 MHz) на компонент **1**

В ^{13}C ЯМР спектър на компонент **1** се наблюдават сигналите на 12 въглеродни атома, от които 11 ароматни въглерода [6 CH и 5 Cq (кватернерни въглеродни атома, които не са свързани с водородни атоми)]. Интензитетът на сигналите на кватернерните въглеродни атоми е значително по-малък от интензитета на сигналите, които принадлежат на въглеродни атоми, пряко свързани с водород. В спектър се наблюдава и сигналът на един ароматен метилов въглерод при δ_{C} 20.6. Сигналите на всички водородни и въглеродни атоми са сумирани в Таблица 3.

От проведените експерименти беше установено, че данните от едноразмерните (1D) ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР спектри не са достатъчни за коректното доказване на пълната химическа структура на изследваното вещество. Те подават информация само за броя и вида на функционалните групи. Много важно значение за доказателството на пълната структура са двумерните (2D) ЯМР спектри, от които може да се установи точната позиция на функционалните групи спрямо въглеродните атоми.

Двумерният ^1H , ^{13}C -HSQC спектър (2D Heteronuclear Single Quantum Coherence) е сканиран в две посоки (^1H и ^{13}C) и подава информация за купелуването на

сигналите на въглеродните атоми със сигналите на директно свързаните с тях протони в структурата на изследваното вещество. Пресечната точка на взаимодействие се нарича Cross-peak.

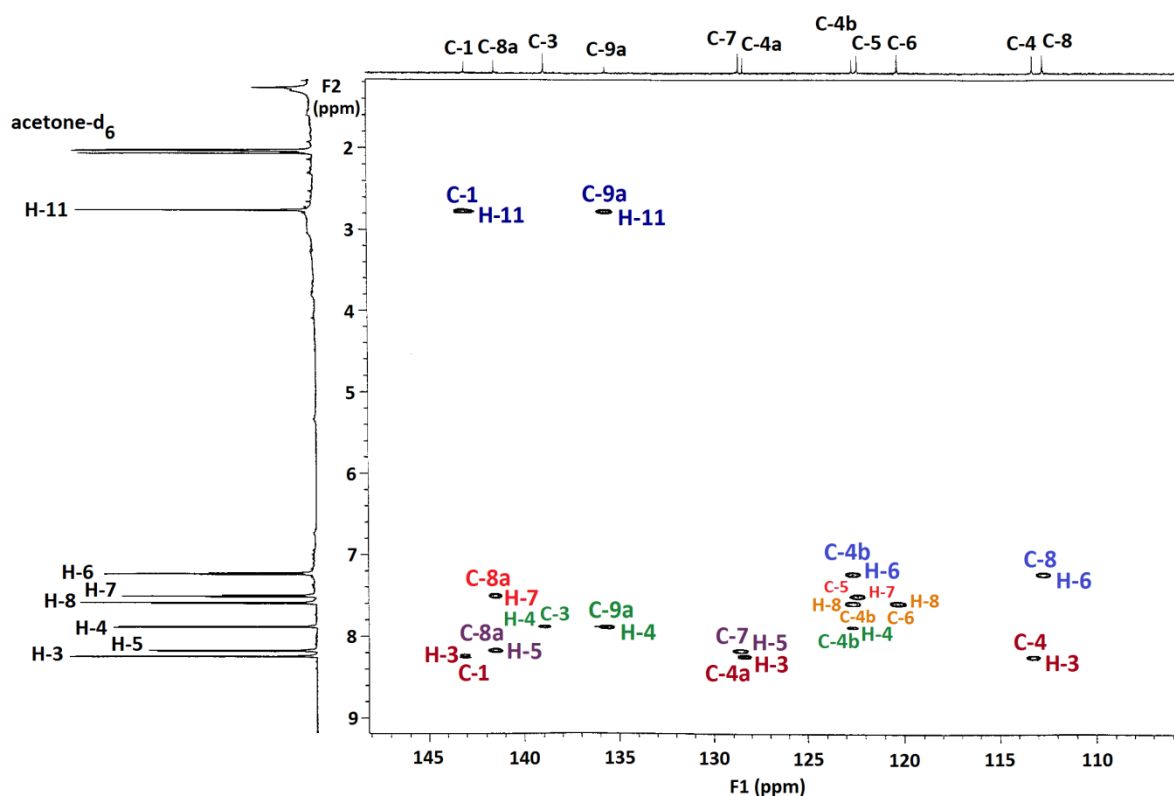


Фиг. 7. 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (APT- Attached Proton Test) спектър (в Acetone- d_6) на компонент 1

При 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (APT- Attached Proton Test) техниката се наблюдава диференциация на сигналите на въглеродните атоми, участващи в метилови ($\text{CH}_3\text{-q}$), метиленови ($\text{CH}_2\text{-t}$) и метинови групи (CH-d). От тук следва, че CH_3 и CH въглеродните сигнали (квартети и дублети) се появяват върху линия **a**, а CH_2 сигналите (триплети) върху линия **b**. В този вид спектри сигналите, кореспондиращи на кватернерни въглеродни атоми (Cq) – не се появяват. Спектърът на фиг. 7 показва, че в структурата на изследваното вещество присъстват CH_3 (метилови) и CH (метинови) въглеродни сигнали, а сигналите на CH_2 (метиленови) отсъстват.

2D - Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) експеримент се използва в ЯМР спектроскопията на органични молекули и е от съществено значение за доказване на пълната химическа структура. Сканиран е в две посоки (^1H и ^{13}C) и подава информация за купелуването на сигнали на протони със сигналите на въглеродните

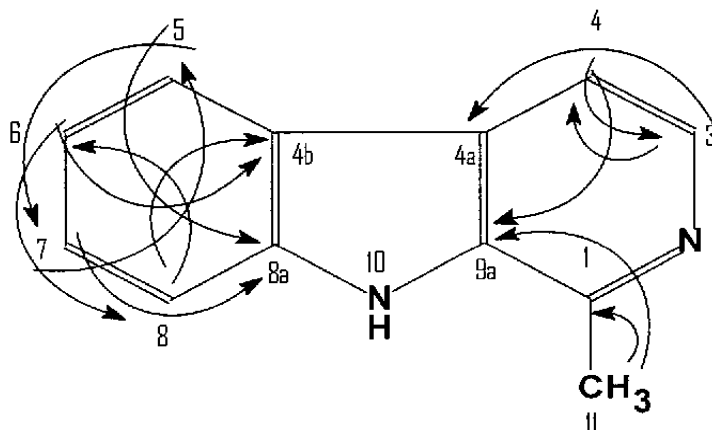
атоми, отместени във **втора и трета позиция**, а и много рядко и в четвърта позиция. Пресечната точка на взаимодействие се нарича Cross-peak (крос-пик). Крос-пиковите дават сигналите на кореспондиращите протони и въглероди, отместени във втора и трета позиция. Или HMBС-спектърът е експеримент на дългото купелуване. Интерпретацията на този спектър е от много важно значение за коректното подреждане на въглеродните атоми, което съответства на номерацията в предложената структурна формула на изследваното вещество.



Фиг. 8. 2D ^1H , ^{13}C -HMBС спектър (в Acetone- d_6), (range δ_{C} 105-148) на компонент 1

HMBС спектърът на компонент **1** (фиг.8) е експеримент на дългото купелуване и показва купелуване между протона на Н-3 при δ_{H} 8.22 с кватернерния въглерод С-4а при δ_{C} 128.4 и ароматния въглерод С-4 при δ_{C} 113.2. Подобно купелуване беше наблюдавано между Н-4 (δ_{H} 7.84) с кватернерния въглерод С-9а (δ_{C} 135.6) и ароматния въглерод С-3 при δ_{C} 138.9. Крос-пикове също така се наблюдават при пресичането на сигналите на ароматните протони Н-5 (δ_{H} 8.19), Н-6 (δ_{H} 7.21), Н-7 (δ_{H} 7.50) и Н-8 (δ_{H} 7.60) със сигналите на ароматните въглероди С-7 при δ_{C} 128.6, С-8 при δ_{C} 112.7, С-5 при δ_{C} 122.3, С-6 при δ_{C} 120.3 респективно и сигналите на кватернерните въглероди С-

8a, C-4b, C-8a, C-4b при δ_C 141.5 и 122.6. Остатъчният метилов сигнал (синглет) на H₃-11 (δ_H 2.79) показва HMBC корелация с кватернерните въглероди C-1 (δ_C 143.0) и C-9a (δ_C 135.6) (фиг.8, 9 и таблица 3).



Фиг.9. ^1H , ^{13}C -HMBC (стрелки) корелация в структурата на компонент **1**

На базата на химическите характеристики и интерпретацията на представените едноразмерни и двумерни ЯМР спектри и мас-спектрални анализи е установена пълната химическа структура на компонент **1** (виж таблица 3).

Доказаната пълна химическа структура на компонент **1** показва, че изолираната субстанция е идентична на 1-метил- β -карболин (1-метил-9H-пиридо[3,4-*b*] индол) (харман). 1-метил- β -карболинът (**1**) принадлежи към групата на индоловите алкалоиди. Структурата му представлява трициклична система, където индоловото ядро е кондензирано с метил- β -пиридинов пръстен. Физико-химичните свойства на 1-метил β -карболина (**1**) се определят от наличието на два различни азотни атома в трицикличната система - пиридов и пиридин азотен атом.

2.4.2. Идентификация на компонент **2** (β -карболинов алкалоид), изолиран от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A.

Идентификацията на компонент **2** е проведена по метода на метаболомиката, представена чрез комбинация от аналитична високо ефективна течна хроматография/UV-Vis с диод арай детектор/електроспрей йонизация с положителен йон-масспектрален анализ (HPLC/DAD/ESI-MS) (фиг. 3A и 3B). Подобие на UV-Vis спектрите между компонентите **1** и **2** предполага и подобие в структурите им. Абсорбционните максимуми в UV-Vis спектъра на компонент **2** са при 220, 248, 301 и 373 nm (фиг. 3B), леко отместени към по-дълговълновата област на спектъра

(батохромен ефект), което ни дава основание компонент **2** да го отнесем към групата на бета-карболиновите алкалоиди.

Таблица 3. ^1H и ^{13}C ЯМР химични отмествания на компонент **1** (1-метил- β -карболин) в *Acetone- d_6* , (600 MHz и 125.7 MHz, TMS като вътрешен стандарт, химични отмествания в δ)

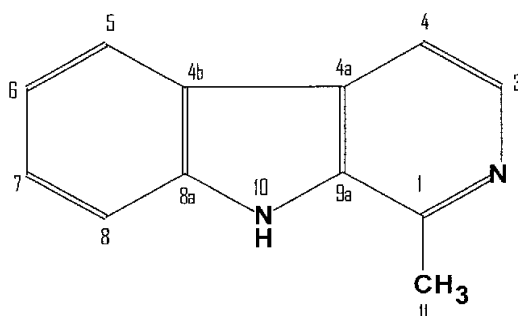
Позиция	δ_{H} , J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	δ_{C}	Групи
1	-		143.0 s	Cq
2	-		-	N
3	8.22 (1H, d, 5.3 Hz)	C-1, C-4, C-4a	138.9 d	HC=
4	7.84 (1H, d, 5.6 Hz)	C-3, C-4b, C-9a	113.2 d	HC=
4a	-		128.4 s	Cq
4b	-		122.6 s	Cq
5	8.19 (1H, d, 8.0 Hz)	C-7, C-8a	122.3 d	HC=
6	7.21 (1H, t, 6.8 Hz)	C-4b, C-8	120.3 d	HC=
7	7.50 (1H, t, 7.2 Hz)	C-5, C-8a	128.6 d	HC=
8	7.60 (1H, d, 8.0 Hz)	C-4b, C-6	112.7 d	HC=
8a	-		141.5 s	Cq
9a	-		135.6 s	Cq
10	10.70 (1H, s, br)		-	NH
11	2.79 (3H, s)	C-1, C-9a	20.6 q	CH ₃

Идентификацията на компонент **2** е установена на базата на абсорбционните максимуми в UV-Vis спектъра; на протонирания молекулен йон при m/z 225.3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, получен с електроспрей йонизация мас-спектрометрия (ESI-MS); на базата на емпиричната формула $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$, която е получена при масспектрален анализ с електроспрей йонизация с високо разрешение (ESI-HRMS) върху пик с време на задържане при 10.22 min. Емпиричната формула предполага 10 двойни еквивалентни връзки и/или пръстени в структурата му.

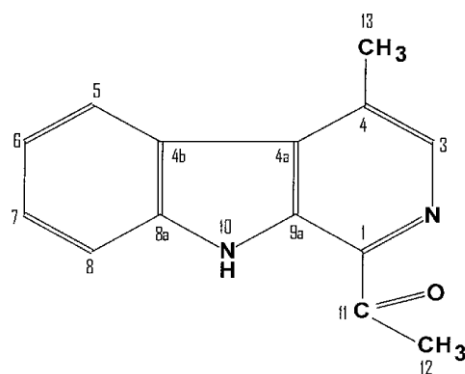
Компонент **2** е подобен на компонент **1**, като молекулната му маса е 224 Da, с емпирична формула $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ и се различава с 42 масови единици от молекулната

маса на компонент **1** (молекулна маса 182 Da; C₁₂H₁₀N₂). Структурната разлика между двата компонента се дължи на присъствието на една ацетилна група (COCH₃) в структурата на компонент **2**. Съгласно литературните база данни компонент **2** е идентифициран с предполагаема частична структура като 1-ацетил-4-метил-β-карболин. Коректните позиции на метиловата и ацетилната група в трицикличната система изисква допълнителни изследвания чрез двуменционални ЯМР анализи и по-специално с HMBC-анализи (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Компонент **2** беше изолиран като молекулно-хомогенна субстанция в количества, които не ни позволиха провеждане на следващите ЯМР анализи. Метаболомиката е много подходящ метод за идентификация на вещества с познати структури. По литературни данни 1-ацетил-4-метил-β-карболина (фиг.10) не е изолиран от природни източници.

На фиг.10 са представени химическите структури на компонентите **1** и **2**. Проведеното изследване е осъществено за първи път върху термофилния щам *Laceyella sacchari* IMBAS-14A. 1-Метил-β-карболинът (харман) (16, 19) многократно е изолиран от различни природни източници и е вещество с много важни биологични свойства.



Компонент **1**



Компонент **2**

Фиг.10. Структури на 1-метил-β карболин (компонент **1**) и 1-ацетил-4-метил-β-карболин (компонент **2**)

2.5. Антимикробно действие на изолираните β-карболинови алкалоиди от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A.

Таблица 4. Изследване на антимикробното действие *in vitro* на 1-метил- β -карболин (1) и 1-ацетил-4-метил- β -карболин (2) по агар-дифузионния метод

Тест-култури	Диаметър на зоната на инхибиране (mm)	
	1-метил- β -карболин	1-ацетил-4-метил- β -карболин
<i>Bacillus mycoides</i>	17.2	18.1
<i>Bacillus subtilis</i>	15.6	16.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	13.0	14.2
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	12.8	13.2
<i>Proteus vulgaris</i>	21.9	22.7
<i>Escherichia coli</i>	17.5	16.0
<i>Candida tropicalis</i>	20.0	21.2
<i>Candida albicans</i>	19.2	19.9
<i>Mucor miehei</i>	18.3	17.5
<i>Penicillium notatum</i>	14.8	13.6

3. Изолиране, идентификация и биологично действие на дикетопиперазини (циклични дипептиди) от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

3.1. *Laceyella sacchari* IMBAS -22A се култивира по метод, описан в т. 2.2.

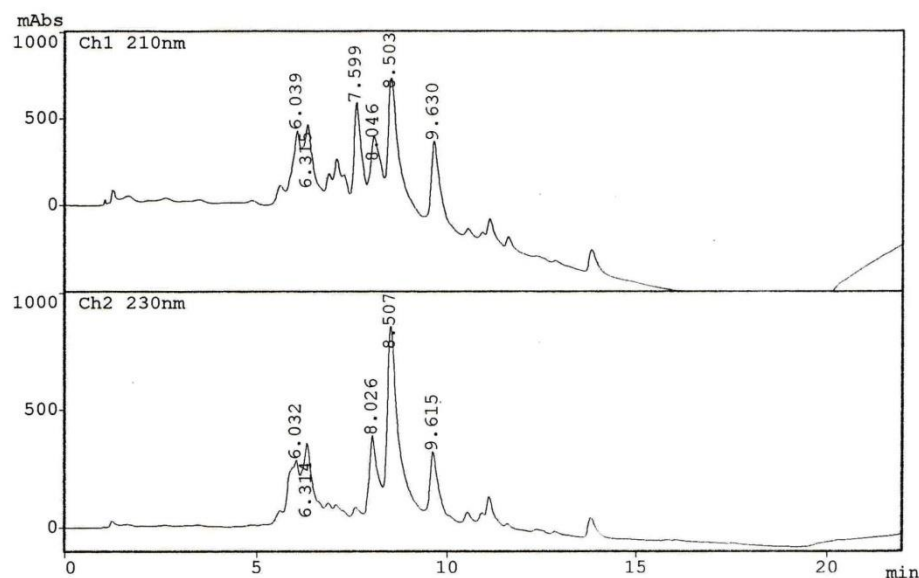
(Дис.Материали и методи), аналогично на култивирането на *Laceyella sacchari* IMBAS -14A. Ферментацията се проведе в продължение на 48 часа при 50°C.

3.2. Изследване динамиката на синтез на дикетопиперазини (циклични дипептиди) от антарктически щам *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

Изследване динамиката на синтез на дикетопиперазините (циклични дипептиди) от антарктическият щам *Laceyella sacchari* IMBAS-22A се проведе на 24-я, 48-я и 72-я час от култивирането на щама. Целта на проведеното изследване бе да се определи оптималният час на култивиране на щама, при който концентрацията на дикетопиперазините (циклични дипептиди) е най-висока в културалната течност на щама. Пробите от културалната течност на 24-я, 48-я и 72-я час (х 40 ml) се екстрахират с по 20 ml етилацетат. Етилацетатните екстракти се концентрират под вакуум до сухи остатъци, които се разтварят в по 3 ml метанол и се тестват с аналитична високо

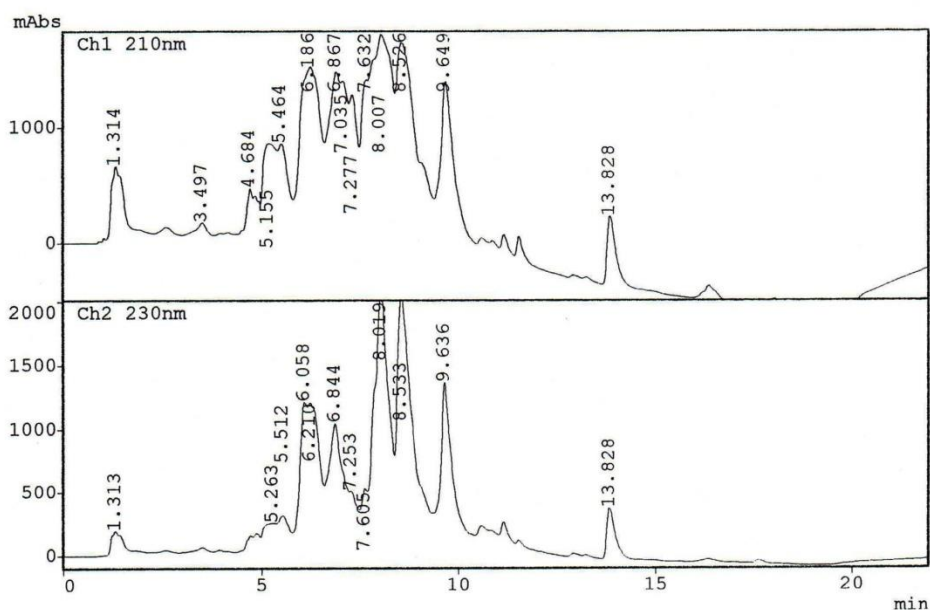
ефективна течна хроматография (HPLC) и аналитична тънкослойна хроматография (ТСХ).

*** Chromatogram ***

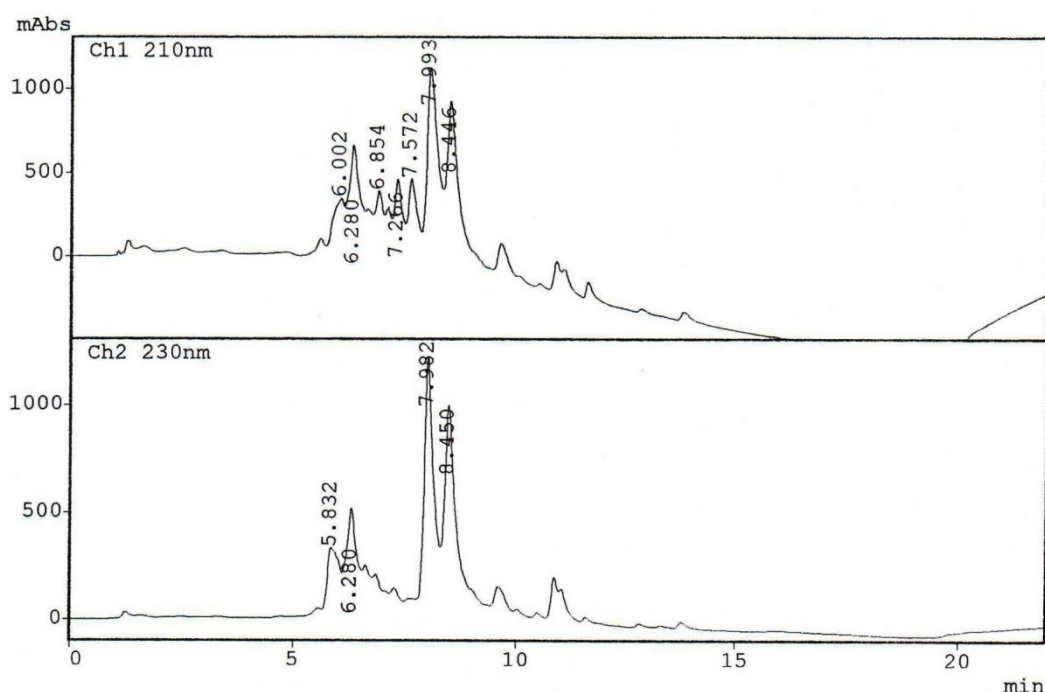


Фиг.11. Проследяване динамиката на синтез на дикетопиперазини (циклични дипептиди) на **24-я час** от култивирането на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A. Дикетопиперазините се екстрахират от културалната течност с етилацетат и тестват с аналитична HPLC: Колонa Nucleosil 100 C₁₈ (5.0µm, 125 x 3.0 mm); Компонентите се елуират в градиент: 0.1% TFA във вода / ацетонитрил (100%). Време на провеждане на хроматограмата: 22 min; Скорост на потока: 1.0 ml/min; Детекция: 210 и 230 nm. Наблюдават се пикове със следните времена на задържане (t_R) в min: компонент 1 с време на задържане (t_R) 6.04 min; компонент 2 с t_R 6.31 min; компонент 3 с t_R 7.59 min; компонент 4 с t_R 8.50 min и компонент 5 с t_R 9.63 min

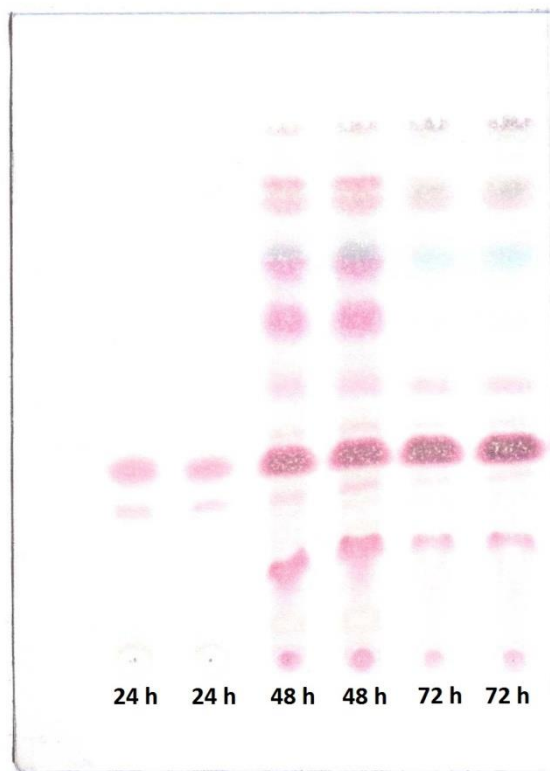
*** Chromatogram ***



Фиг.12. Проследяване динамиката на синтез на дикетопиперазини (циклични дипептиди) на **48-я час** от култивирането на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A. Дикетопиперазините се екстрахират от културалната течност с етилацетат и тестват с аналитична HPLC: Колона Nucleosil 100 C₁₈ (5.0µm, 125 x 3.0 mm); Компонентите се елуират в градиент: 0.1% TFA във вода / ацетонитрил (100%). Време на провеждане на хроматограмата: 22 min; Скорост на потока: 1.0 ml/min; Детекция: 210 и 230 nm. Наблюдават се пикове със следните времена на задържане (t_R) в min: компонент 1 с време на задържане (t_R) 3.49 min; компонент 2 с t_R 4.68 min; компонент 3 с t_R 6.18 min; компонент 4 с t_R 6.86 min; компонент 5 с t_R 8.007 min; компонент 6 с t_R 9.64 min; компонент 7 с t_R 13.82 min.



Фиг.13. Проследяване динамиката на синтез на дикетопиперазини (циклични дипептиди) на **72-я час** от култивирането на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A. Дикетопиперазините се екстрахират от културалната течност с етилацетат и тестват с аналитична HPLC: Колона Nucleosil 100 C₁₈ (5.0µm, 125 x 3.0 mm); Компонентите се елуират в градиент: 0.1% TFA във вода / ацетонитрил (100%). Време на провеждане на хроматограмата: 22 min; Скорост на потока: 1.0 ml/min; Детекция: 210 и 230 nm. Наблюдават се пикове със следните времена на задържане (t_R) в min: компонент 1 с време на задържане (t_R) 6.28 min; компонент 2 с t_R 6.85 min; компонент 3 с t_R 7.99 min; компонент 4 с t_R 8.44 min.



Фиг.14. Проследяване динамиката на синтез на вторични метаболити (дикетопиперазини) на 24, 48 и 72-я час от култивирането на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A (екстрахирани от културалната течност с етилацетат) с аналитична тънкослойна хроматография (ТСХ). Тънкослойната хроматография се проведе върху силикагелови плаки (Merck 60, F₂₅₄) в подвижна фаза: хлороформ-метанол (95.0:5.0,v/v). Визуализирането на хроматографските петна се осъществи с реагент на 0.5% разтвор на ванилин в метанол/ сярна киселина/ оцетна киселина и нагряване на 120 °C за 3-5 минути.

Данните от аналитичната високоефективна течна хроматография (HPLC) и тънкослойната хроматография (ТСХ) (фиг. 11, 12, 13 и 14) убедително доказват, че синтезът на дикетопиперазини (циклични дипептиди) е най-висок на 48-ия час от култивирането на *Laceyella sacchari* щам IMBAS-22A.

3.3. Аналитична високо ефективна течна хроматография / UV-Vis с диод арай детектор / Електроспрей йонизация с положителен йон – масспектрален анализ (HPLC/DAD/ESI-MS)

HPLC/DAD/ESI-MS анализът (метабономика) е приложен за охарактеризиране на компонентния състав на вторични метаболити (дикетопиперазини), намиращи се в етилацетатния екстракт от културалния филтрат на щам *Laceyella sacchari* IMBAS-22A. На базата на HPLC/DAD/ESI-MS анализите, проведени върху компонентите 1-5 (пикове 1-5) е получена информация за абсорбционните максимуми в UV-Vis спектрите и техните протонирани молекулни йони.

Таблица 5. HPLC/UV-Vis и MS анализи на компонентите **1 - 5** в етилацетатен екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

Компоненти	t_R (min)	HPLC/UV-Vis (DAD) (nm)	HPLC-ESI-MS	
			Протониран молекулен йон (M+H) ⁺ (m/z)	(M+H) ⁺ фрагменти [m/z (relative abundance, %)]
Компонент 1	3.71	207.0	211.2	211.2(100),420.9 (14)
Компонент 2	4.61	203.0, 276.0	245.1	245.1(100),267.1 (10)
Компонент 3	6.28	226.0	213.1	213.1(100),424.9 (30)
Компонент 4	6.98	228.0, 283.0	261.1	261.1(100),520.7 (7)
Компонент 5	8.07	226.0	227.2	227.2(100),453.0 (19)

3.4. Изолиране, пречистване и препаративно разделяне на дикетопиперазини (циклични дипептиди) от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

Изолирането, пречистването и разделянето на дикетопиперазините (циклични дипептиди) от културалната течност на *Laceyella sacchari* щам IMBAS-22A е представено на схема 2. След корекция на рН на културалната течност до 8.0-8.5, последната се центрофугира, като се разделя на мицел и културален филтрат. Към двата обекта бяха приложени екстракционни методи. Изолираните активни молекули бяха пречистени и разделени като молекулно-хомогенни субстанции последователно чрез силикагелови колонни и препаративни тънкослойни хроматографии (ПТСХ). Изолираните по схема 2 дикетопиперазини от **1-5** са безцветни аморфни субстанции, разтворими в низши алкохоли, диметилсулфоксид, N,N-диметилформамид, ацетон, етилов ацетат и хлороформ, но неразтворими във вода, етер и *n*-хексан. И петте компонента се откриват с UV светлина при 254 nm. Показват положителни цветни реакции с реагентите на Ерлих, Драгендорф (присъствие на N) и 0.5% разтвор на ванилин в метанол/сярна киселина/оцетна киселина. Отрицателни цветни реакции демонстрират спрямо реагентите на Sakaguchi (отсъствие на гуанидинова група), нинхидрин (отсъствие на първична аминогрупа).

Таблица 6. Физико-химични свойства на дикетопиперазиновите компоненти **1, 2, 3, 4 и 5**, изолирани от КТ на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

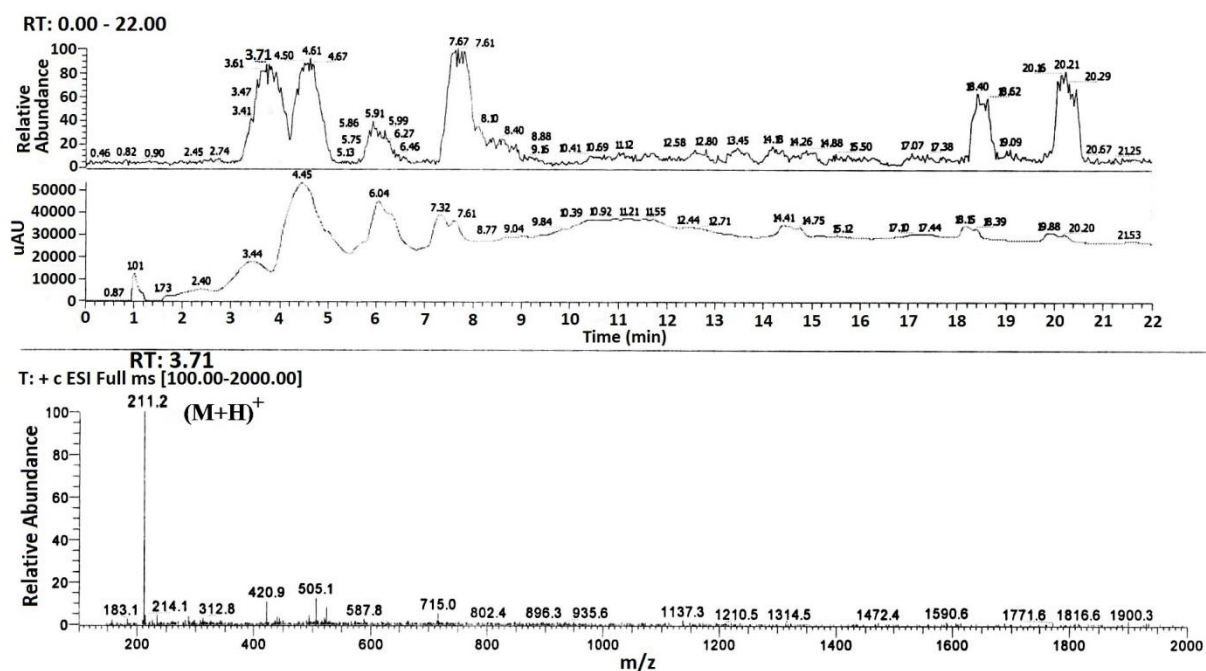
Компоненти	1	2	3	4	5
Външен вид	Безцветен аморфен прах	Безцветен аморфен прах	Безцветен аморфен прах	Безцветен аморфен прах	Безцветен аморфен прах
(ESI-MS) ⁺ (m/z)	211.2(M+H) ⁺	245.1(M+H) ⁺	213.1(M+H) ⁺	261.1(M+H) ⁺	227.2(M+H) ⁺
Молекулна маса (Da)	210.2	244.1	212.1	260.1	226.2
Емпирична формула	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₂	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm	207.0	203.0, 276.0	226.0	228.0, 283.0	226.0
ТСХ (R _f) хлороформ-метанол (9.0:1.0,v/v)	0.27	0.31	0.42	0.49	0.54

3.5. Идентификация на химическите структури на дикетопиперазинови активни молекули, изолирани от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS- 22A

Идентификацията на компонент **1** се проведе чрез прилагане метода на метаболомиката (HPLC/DAD/ESI-MS). Потвърждаване на химическата структура след изолирането му в молекулно-хомогенен вид беше осъществено с еднодименсионални ЯМР експерименти (¹H , ¹³C и APT) и сравняване на получените данни с референтни субстанции. Интерпретацията на фиг.15 е представена на таблици 5 и 6. Мас-спектърът е заснет върху пик с време на задържане 3.71 min.

Схема 2. Изолитране и пречистване на дикетопиперазини (циклични дипептиди) от културалната течност на *Laceyella sacchari* щам IMBAS-22A





Фиг.15. HPLC-ESI(+)-MS анализ на компонент 1 [cyclo(Pro-Leu)] (дикетониперазин, цикличен дипептид) в етилацетатния екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

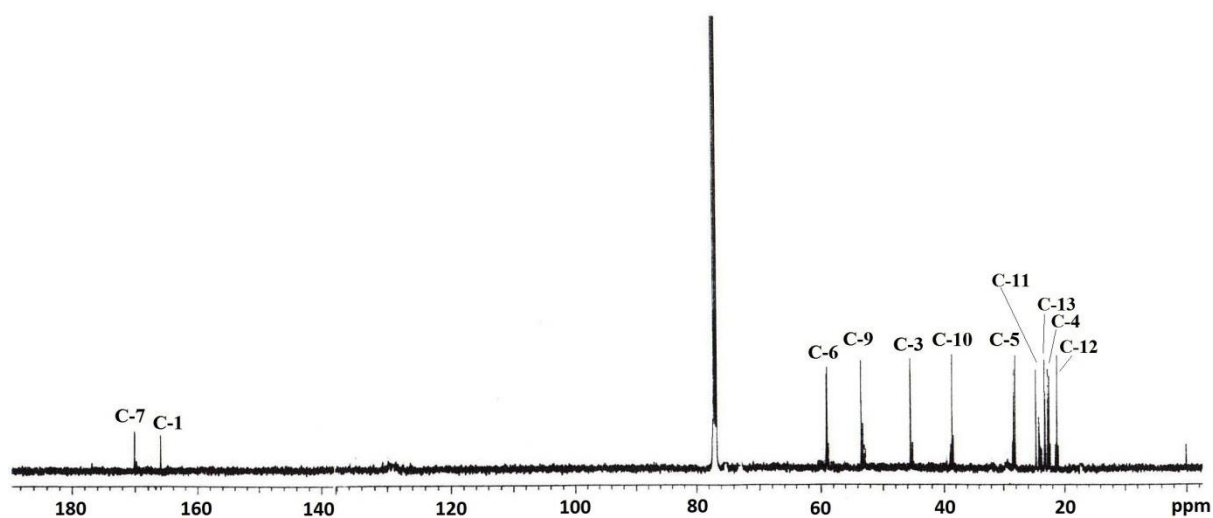
На фиг. 16 е представен еднодименсионалният въглероден ядрено-магнитен резонансен спектър, сканиран в деутериран хлороформ при 125.7 MHz [1D ^{13}C -ЯМР спектър (в CDCl_3 , 125.7 MHz)]. Този спектър подава информация за броя на въглеродните атоми, които съответстват на емпиричната формула и участват в структурата на веществото.

В ^{13}C ЯМР спектъра на компонент 1, изолиран като молекулно-хомогенна субстанция, се наблюдават сигналите на 11 въглеродни атома, от които 2 принадлежат на сигналите на карбонилни въглеродни атоми при δ_{C} 166.50 и 171.00, на 4 метиленови въглеродни атома (δ_{C} 22.80, 28.20, 38.81 и 45.60) и 3 метинови въглеродни атома (δ_{C} 24.80, 53.40 и 59.10). В спектъра се наблюдават и сигналите на 2 алифатни метилови въглерода при δ_{C} 21.40 и 22.95 (фиг. 16).

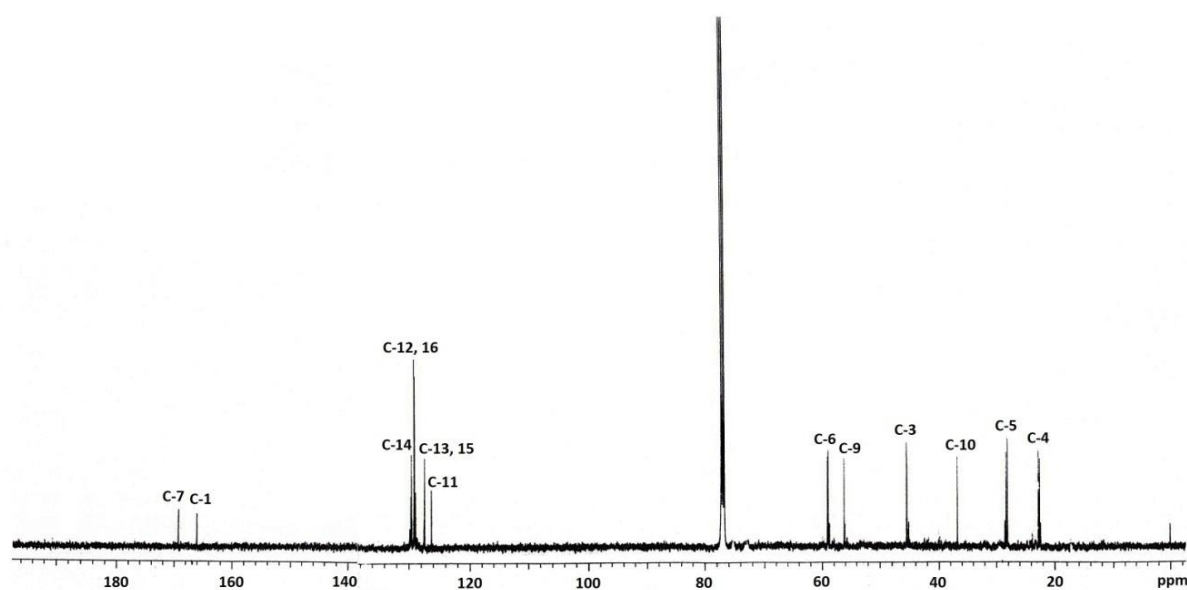
При техниката на еднодименсионалния ^{13}C -ЯМР (APT – Attached Proton Test) се наблюдава диференциация на сигналите на въглеродните атоми, участващи в метилови групи (CH_3 -q, квартети), метиленови групи (CH_2 -t, триплети), метинови групи (CH -d, дублети) и Cq-синглети. Кватернерните въглеродни атоми (синглети) не са пряко свързани с водородни атоми. От тук следва, че сигналите на $-\text{CH}_3$ (метиловы) и $-\text{CH}$ - (метиновы) въглеродни атоми се появяват от горната страна на базовата линия, а сигналите на $-\text{CH}_2$ - (метиленовите) и кватернерните въглеродни атоми (Cq) - от долната

страна на базовата линия на спектъра. Техниката на АРТ – Attached Proton Test дава информация за броя на метиловите, метиленовите, метиновите групи и кватернерните въглеродни атоми, участващи в структурата на изследваното вещество (Дис.,фиг.30).

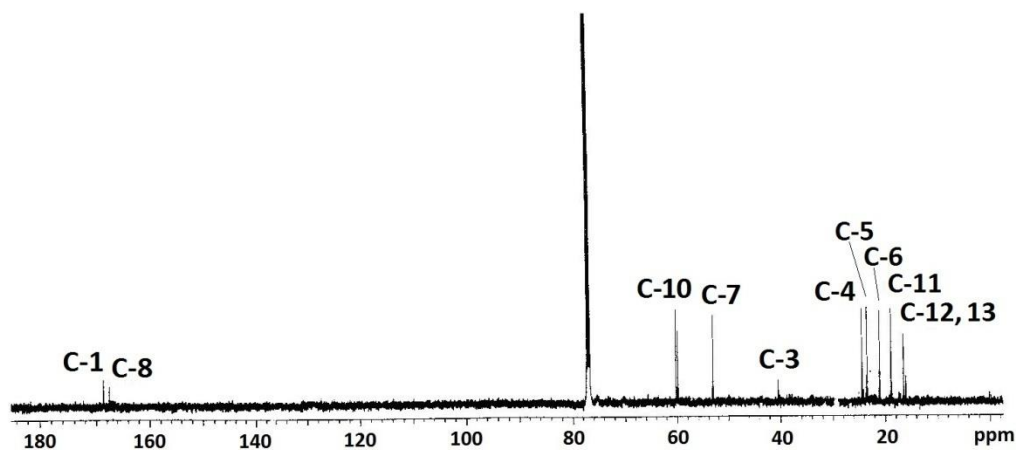
Идентификацията на останалите четири компонента се проведе аналогично на компонент **1**, като беше приложен методът на метаболомиката (HPLC/DAD/ESI-MS), 1D ЯМР експерименти и сравняване с референтни субстанции. Мас-спектралният анализ и UV-Vis спектърът на компонент **2** са сканирани върху пик с време на задържане 4.61 min (фиг.17).



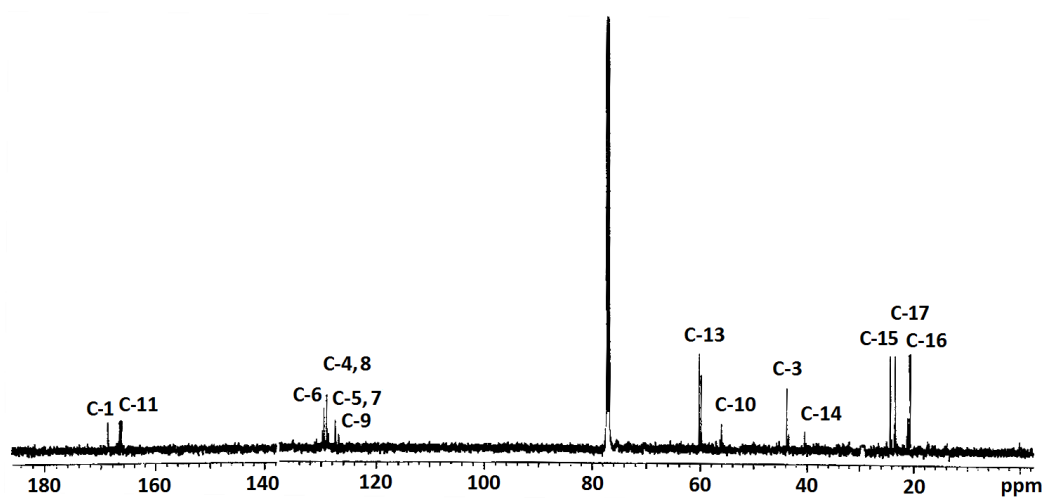
Компонент 1



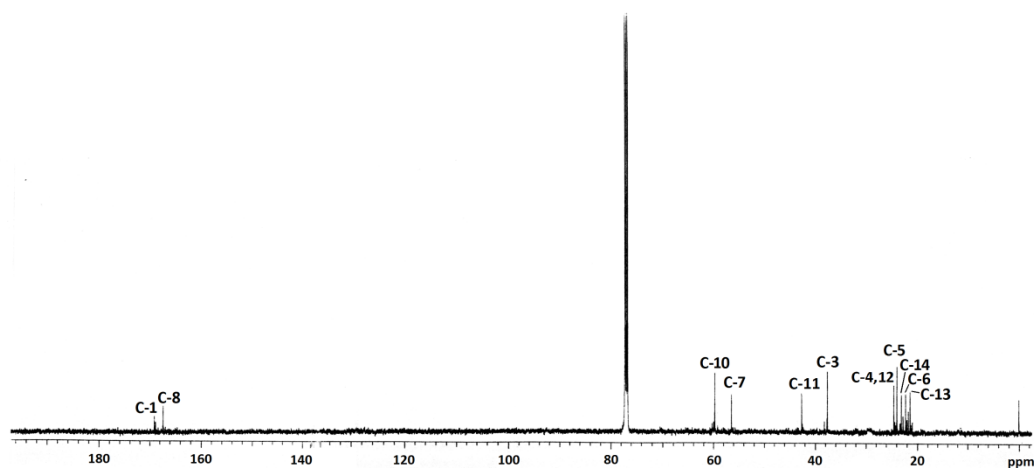
Компонент 2



Компонент 3



Компонент 4



Компонент 5

Фиг.16. ^{13}C -ЯМР спектри (в CDCl_3 , 125.7 MHz) на компонент 1[cyclo (Pro-Leu)]; компонент 2[cyclo (Pro-Phe)]; компонент 3[cyclo(Leu-Val)]; компонент 4 [cyclo(Phe-Leu)] и компонент 5 [cyclo (Leu-Leu)] (дикетопиперазини, циклични дипептиди), изолирани от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

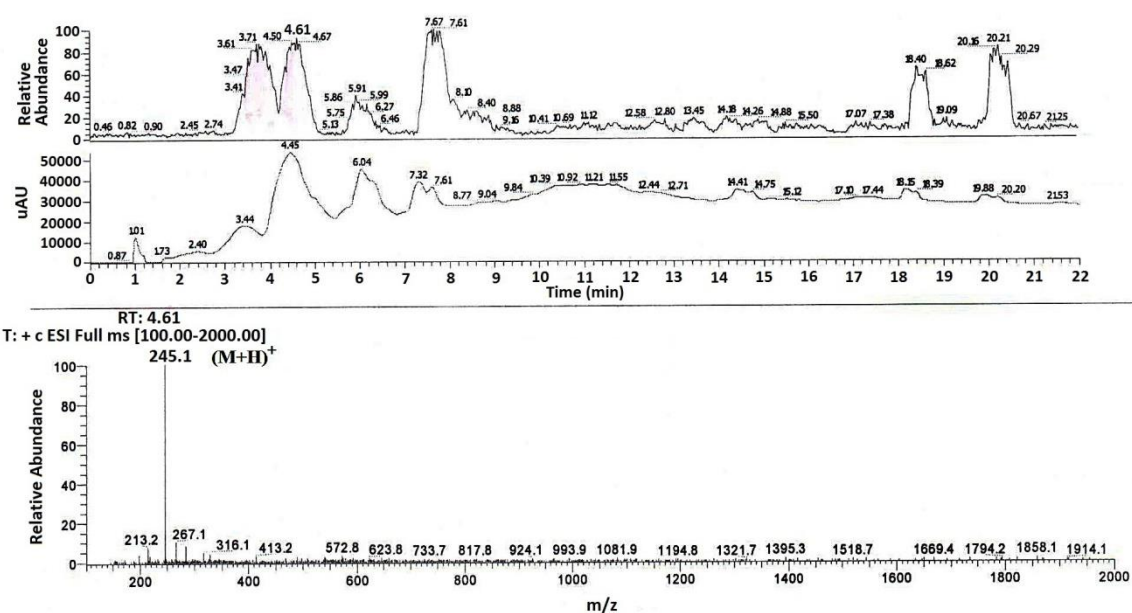
В ^{13}C ЯМР спектъра на компонент **2** се наблюдават сигналите на 14 въглеродни атома, от които 2 принадлежат на сигналите на карбонилни въглеродни атоми при δ_{C} 166.00 и 169.90, на сигналите на 4 метиленови (δ_{C} 22.62, 28.54, 36.90 и 45.60) и 2 метинови въглеродни атома (δ_{C} 56.26 и 59.30). В ^{13}C ЯМР спектъра се наблюдават също сигналите на 6 ароматни въглерода [5 CH и 1 Cq (кватернерни въглерода, които не са свързани с водородни атоми)]. Интензитетът на сигналите на кватернерните въглеродни атоми е значително по-малък в сравнение с интензитета на сигналите, които принадлежат на въглеродни атоми, пряко свързани с водород (фиг.16).

Идентификацията на компонент **3** се проведе също чрез прилагане метода на метаболомиката (HPLC/DAD/ESI-MS анализи) и еднодименсионални ЯМР експерименти (^1H и ^{13}C -ЯМР и APT). Мас-спектралният анализ и UV-Vis спектърът са сканирани върху пик с време на задържане 6.28 min (фиг.18).

В ^{13}C ЯМР спектъра на компонент **3** се наблюдават сигналите на 11 въглеродни атома. Два от тях принадлежат на сигналите на карбонилни въглеродни атоми при δ_{C} 167.80 и 168.30, един сигнал на метиленов въглероден атом (δ_{C} 40.10) и 4 сигнала на метинови въглеродни атоми при δ_{C} 19.40, 24.13, 53.20 и 60.00. В спектъра се наблюдават и сигналите на 4 алифатни метилови въглерода при δ_{C} 16.10, 16.12, 21.30 и 23.30 (фиг.16).

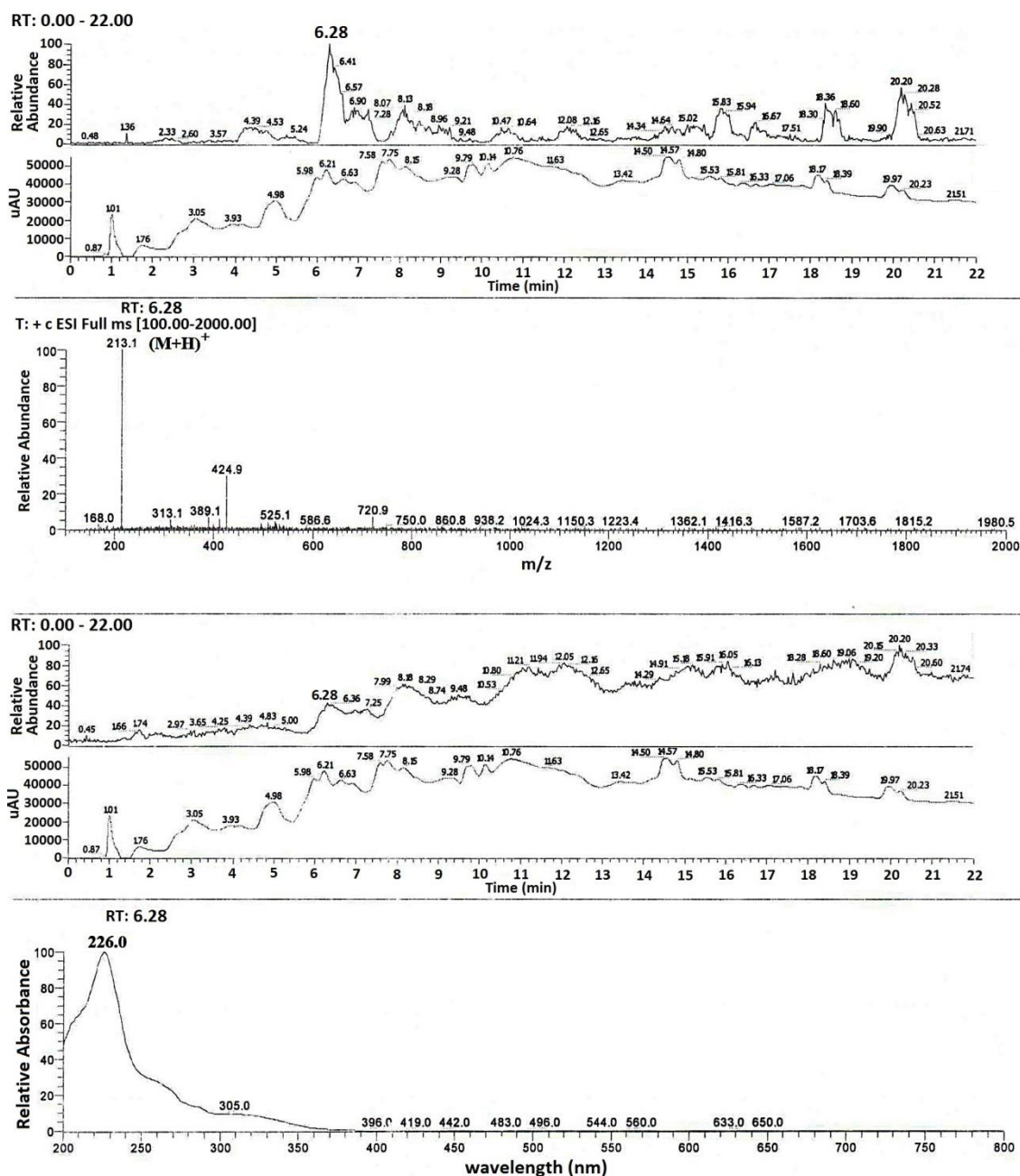
На фиг. 19 са представени мас-спектралният анализ и UV-Vis спектърът на компонент **4**, сканирани върху пик с време на задържане 6.98 min.

RT: 0.00 - 22.00



Фиг.17. HPLC-DAD-ESI(+)^{MS} анализ на компонент 2 [cyclo (Pro-Phe)] (дикетопиперазин, цикличен дипептид) в етилацетатния екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

В ¹³C ЯМР спектъра на компонент 4 се наблюдават сигналите на 15 въглеродни атома. Два от тях принадлежат на сигналите на карбонилни въглеродни атоми при δ_c 167.00 и 168.90. Наблюдават се сигналите на 6 ароматни въглеродни атома (5 CH и 1 C_q), два метиленови (δ_c 44.00 и 40.10) и три метинови въглеродни атома (δ_c 24.12, 56.10 и 60.10). В спектъра се наблюдават и сигналите на 2 алифатни метилови въглерода при δ_c 21.20 и 23.00 (фиг.16).

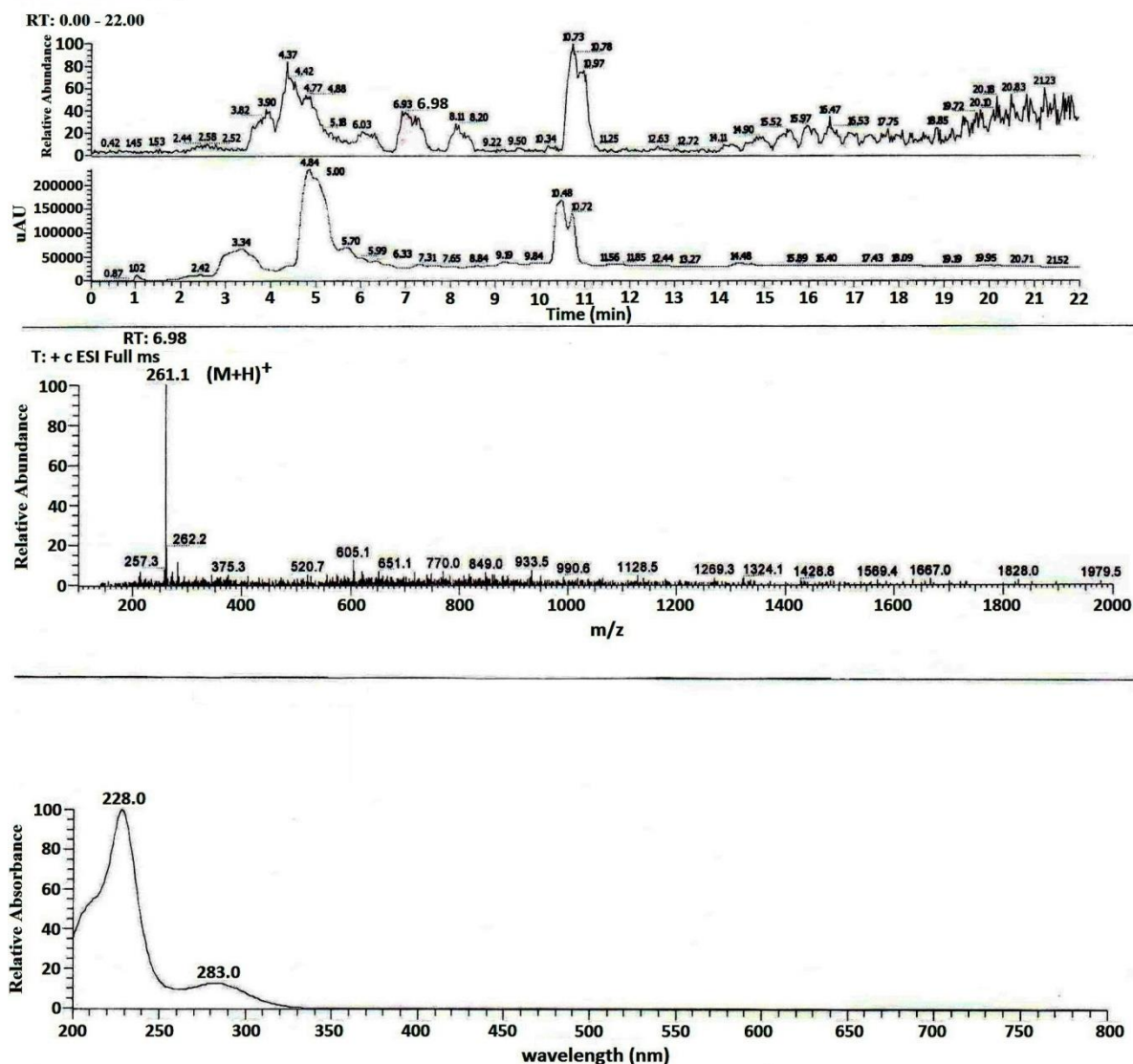


Фиг.18. HPLC-DAD-ESI(+)MS анализ на компонент 3 [cyclo (Leu-Val)] (дикетопиперазин, цикличен дипептид) в етилацетатния екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

Идентификацията на компонент 5 се проведе подобно на останалите дикетопиперазини, а именно чрез прилагане метода на метаболомиката (HPLC/DAD/ESI-MS анализи) (фиг.20) и с еднодименсионални ЯМР експерименти.

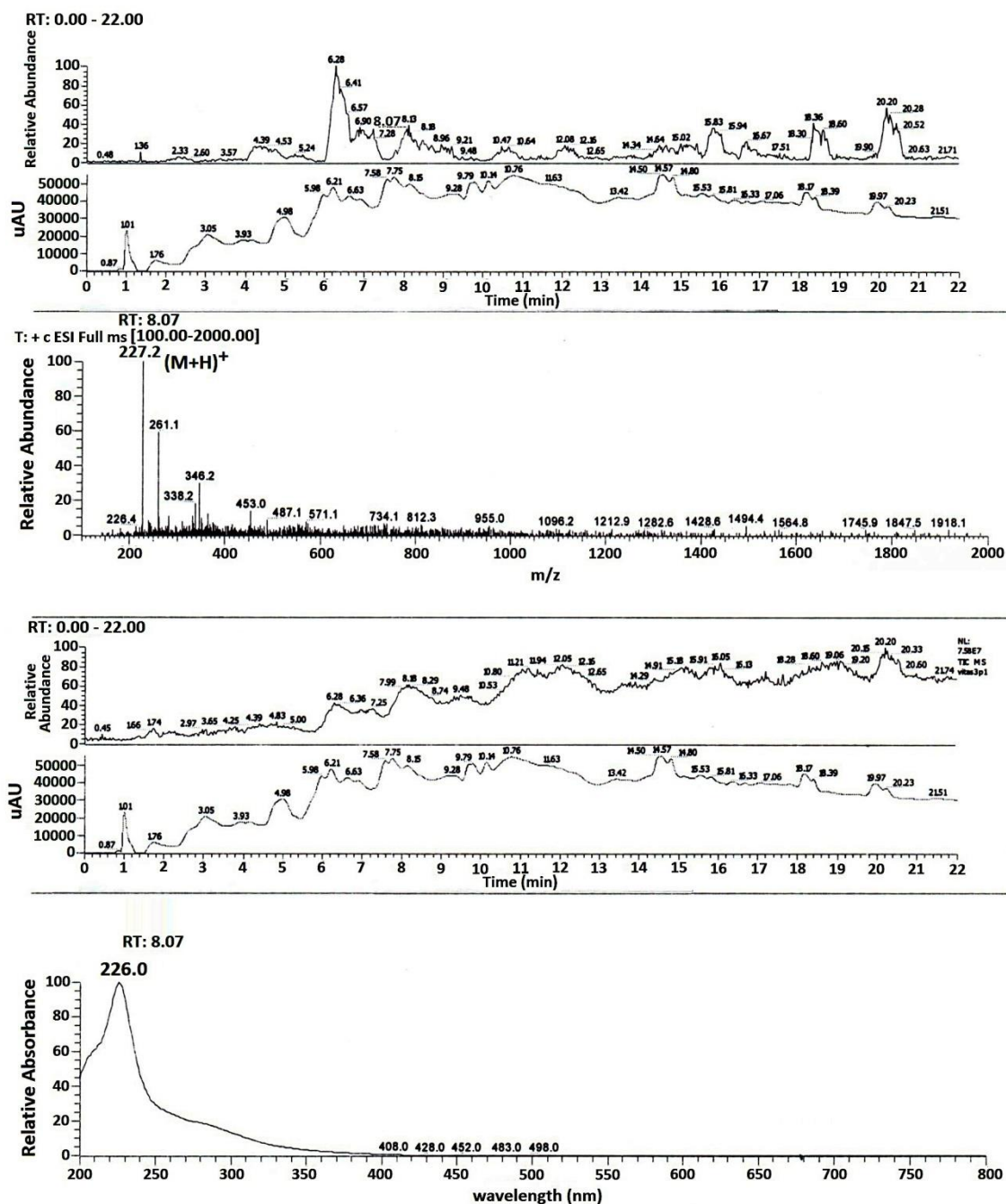
В ¹³C ЯМР и АРТ спектрите на компонент 5 са отбелязани сигналите на всичките 12 въглеродни атома, които принадлежат към два карбонилни въглерода при δ_c 169.00 и 167.50, два метиленови (δ_c 42.50 and 37.90) и четири сигнала на метинов

въглеродни атоми при δ_c 60.00, 56.20, 24.50 и 24.00). В спектъра се наблюдават също сигналите на въглеродни атоми, отнесени към 4 метилови групи при δ_c 23.30, 22.50, 21.50 и 21.20 (фиг.16).



Фиг.19. HPLC-DAD-ESI(+)-MS анализ на компонент 4 [cyclo (Phe-Leu)] (дикетопиперазин, цикличен дипептид) в етилацетатния екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

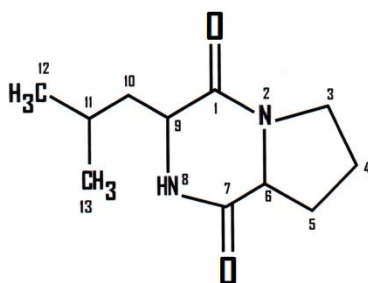
^1H - ЯМР и ^{13}C -ЯМР (APT – Attached Proton Test в CDCl_3 , 125.7 MHz) спектрите и тяхната детайлна интерпретация са представени в „Резултати и обсъждане” на Дисертацията. Изолираните 5 молекулно-хомогенни 2,5-дикетопиперазина (циклични дипептиди) са идентифицирани като *Cyclo(Pro-Leu)*, *Cyclo(Pro-Phe)*, *Cyclo(Leu-Val)*, *Cyclo(Phe-Leu)* и *Cyclo(Leu-Leu)* (фиг.22). Идентификацията на изолираните дикетопиперазини се проведе чрез прилагане метода на метаболомиката



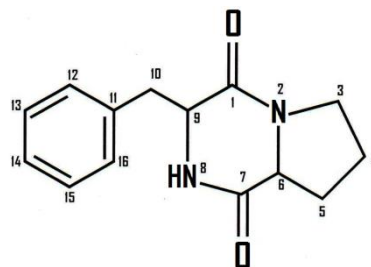
Фиг.20. HPLC-DAD-ESI(+)-MS анализ на компонент 5 [*cyclo (Leu-Leu)*] (дикетопиперазин, цикличен дипептид) в етилацетатния екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

(HPLC/DAD/ESI-MS), ЯМР експерименти (^1H и ^{13}C -ЯМР и APT) и сравняване на получените данни с референтни субстанции. Цикличните дипептиди *Cyclo(Pro-Leu)*, *Cyclo(Leu-Val)* и *Cyclo(Leu-Leu)* (Ren at al., 2010; Gao at al., 2014), (Feng at al., 2006), (Huang at al., 2007), състоящи се от две алифатни α -аминокиселини, имат абсорбционни максимуми в UV-Vis спектрите при 207.0 и 226.0 nm, докато *Cyclo(Pro-Phe)* и

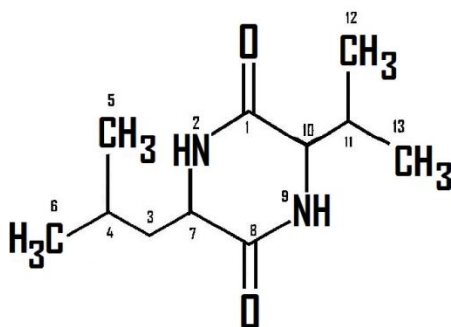
Cyclo(Phe-Leu) (Strom et al., 2002), (Gondry et al., 2009) показват абсорбционни максимуми при 203.0, 276.0 и 228.0, 283.0 nm. Абсорбционните максимуми при 276.0 и 283.0 nm са доказателство, че в структурата на веществата се съдържа ароматно ядро.



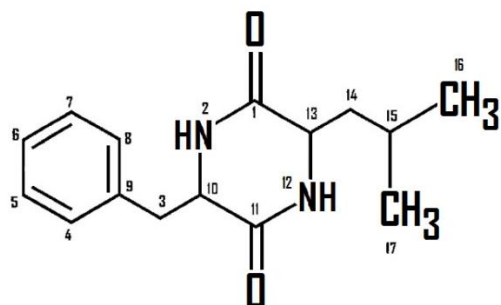
Компонент 1 Cyclo(Pro-Leu)



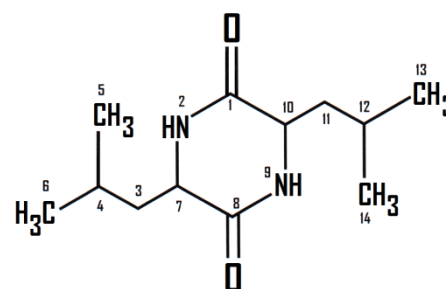
Компонент 2 Cyclo(Pro-Phe)



Компонент 3 Cyclo(Leu-Val)



Компонент 4 Cyclo(Phe-Leu)



Компонент 5 Cyclo(Leu-Leu)

Фиг.21. Структури на компонент 1[Cyclo(Pro-Leu)], компонент 2[Cyclo(Pro-Phe)], компонент 3[Cyclo(Leu-Val)], компонент 4[Cyclo(Phe-Leu)] и компонент 5[cyclo(Leu-Leu)], изолирани от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A

3.6. Антимикробно действие на изолираните дикетопиперазини (циклични дипептиди) от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A.

Изолираните и идентифицирани дикетопиперазини (циклични дипептиди) от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A са изследвани за антимикробно

действие *in vitro* спрямо следните тест-култури: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* и *Mucor miehei* (таблица 7).

Таблица 7. Антимикробно действие *in vitro* на дикетопиперазини (циклични дипептиди) по агар-дифузионния метод

Дикетопиперазини	Тесткултури [диаметър на зоната на инхибиране (mm)]					
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Mucor miehei</i>
<i>Cyclo (Pro-Leu)</i>	12.5	13.5	14.0	0	12.0	14.7
<i>Cyclo (Pro-Phe)</i>	13.0	14.0	14.5	0	12.5	15.0
<i>Cyclo (Leu-Val)</i>	12.0	13.0	13.5	0	12.0	14.0
<i>Cyclo (Phe-Leu)</i>	13.0	14.0	14.5	0	12.5	15.0
<i>Cyclo (Leu-Leu)</i>	12.5	13.5	14.0	0	12.0	14.3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Антарктида е единственият континент на планетата Земя, който до голяма степен е непроучен. По-голямата част от континента Антарктида е покрита с лед поради постоянно ниските температури през цялата година. Въпреки екстремните климатични условия, които съществуват в ледения континент, са открити микроорганизми във всички установени хабитати на Антарктида. В последните две десетилетия усилено се изследва микроорганизмовият свят, битуващ в студените региони на планетата Земя.

В процеса на търсене на нови биологично активни вещества с антимикробно действие бяха изследвани два щама – *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A, изолирани от екскременти на пингвини, колекционирани на остров Ливингстън, Антарктида. Пробите от екскременти на пингвини са предоставени от Третата българска експедиция (Антарктида, 1995-1996). На базата на предпочитаната температура за растеж и развитие е установено, че двата щама са термофили с оптимална температура на растеж при 50°C и са депозиранни в колекцията на Института по микробиология „Стефан Ангелов” към БАН. Изследваните микроорганизми *Laceyella sacchari* щамове IMBAS-14A и IMBAS-22A са продуценти на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини (циклични дипептиди). Изследваната

от нас бактерия *Laceyella sacchari* отдавна е известна със своите разнообразни ензимни активности. Ето защо тя представлява интерес при изолирането на биологично активни вторични метаболити. Проучена е и е установена за първи път биопродукцията на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини (циклични дипептиди). Откриването им за първи път в щамове на *Laceyella sacchari* е важно събитие за характеристиката на този вид бактерия. Двата щам, идентифицирани до един и същ вид (*Laceyella sacchari*), са продуценти и на двете химични групи, но се различават по количествения синтез. *Laceyella sacchari* щам IMBAS-14A синтезира по-голямо количество β -карболинови алкалоиди в сравнение с *Laceyella sacchari* щам IMBAS-22A. И обратно, по-добрият продуцент на дикетопиперазини е *Laceyella sacchari* щам IMBAS-22A.

Изолираните от нас β -карболинови алкалоиди (1-метил- β -карболин и 1-ацетил-4-метил- β -карболин) са жълти аморфни субстанции, разтворими в низши алкохоли, диметилсулфоксид, N,N-диметилформамид, ацетон и етилов ацетат, но неразтворими във вода и *n*-хексан. И двата компонента флуоресцират, детектирани под UV лампа при 366 и 254 nm. Показват положителни цветни реакции с реагента на Ерлих, което предполага наличие на индолов скелет в структурите им. Също така показват цветни реакции с реагента на Драгендорф (присъствие на N) и 3% разтвор на ванилин-сярна киселина. UV-Vis спектрите показват абсорбционни максимуми при 220, 245, 299 и 365 nm за 1-метил- β -карболин и при 220, 248, 301, 373 nm за 1-ацетил-4-метил- β -карболин. 1-метил- β -карболинът (**1**) е с молекулна маса (Mm.) 182 Da, емпирична формула $C_{12}H_{10}N_2$ и предполага 9 двойни еквивалентни връзки и/или пръстени в структурата си, докато 1-ацетил-4-метил- β -карболинът е с молекулна маса 224 Da, емпирична формула $C_{14}H_{12}N_2O$ и 10 двойни еквивалентни връзки и/или пръстени в структурата му. Двата β -карболинови алкалоида се различават с 42 масови единици. Структурната разлика между двата компонента се дължи на присъствието на една ацетилна група ($COCH_3$) в структурата на 1-ацетил-4-метил- β -карболина (**2**). Пълната химическа структура на 1-метил- β -карболина (**1**) е доказана с метаболомика (HPLC/DAD/ESI-MS) и интензивни ЯМР анализи (1H , ^{13}C , APT, HSQC и HMBC). Идентификацията на частичната структура на 1-ацетил-4-метил- β -карболин (**2**) е проведена по метода на метаболомиката (HPLC/DAD/ESI-MS). По литературни данни 1-ацетил-4-метил- β -карболинът (**2**) (фиг.10) не е изолиран от природни източници. 1-метил- β -карболинът и 1-ацетил-4-метил- β -карболинът са с ценни биологични свойства, тъй като показват активност спрямо Грам-положителни, Грам-отрицателни бактерии, дрожди и филаментозни гъби.

Изолираните и идентифицирани 5 молекулно-хомогенни дикетопиперазина (циклични дипептиди) [*Cyclo(Pro-Leu)*, *Cyclo(Pro-Phe)*, *Cyclo(Leu-Val)*, *Cyclo(Phe-Leu)* и *Cyclo(Leu-Leu)*] са азот-съдържащи органични вещества с базични свойства и горчиви на вкус. Те са безцветни аморфни субстанции, разтворими в MeOH, EtOH, BuOH, DMSO, DMF, (CH₃)₂CO, EtOAc и CHCl₃, но неразтворими във вода, етер и *n*-хексан. И петте компонента се откриват с UV светлина при 254 nm. Показват положителни цветни реакции с реагентите на Ерлих, Драгендорф (присъствие на N) и 0.5% разтвор на ванилин в метанол/сярна киселина/оцетна киселина. Отрицателни цветни реакции демонстрират спрямо реагентите на Sakaguchi (отсъствие на гуанидинова група) и нинхидрин (отсъствие на първична аминогрупа). Идентификацията на изолираните дикетопиперазини (циклични дипептиди) се проведе чрез прилагане метода на метаболомиката (HPLC/DAD/ESI-MS), еднодименсионални ЯМР експерименти (¹H и ¹³C-ЯМР и APT) и сравняване на получените данни с референтни субстанции.

2,5-дикетопиперазините се синтезират от α-аминокиселини при различни организми и се считат за вторични метаболити. Някои протеази като дипептидилпептидазите отцепват крайни аминокиселини от протеините и образуват дипептиди, които по естествен път циклизират и формират дикетопиперазини (циклични дипептиди) с различни странични вериги. В нашата разработка изолирахме две групи циклични дипептиди, които са конструирани от две алифатни α-аминокиселини и втората група от една алифатна и една ароматна α-аминокиселина. Основният признак, по който може да се разпознае вида на дикетопиперазините (циклични дипептиди), са абсорбционните максимуми в UV-Vis спектрите. Цикличните дипептиди *Cyclo(Pro-Leu)*, *Cyclo(Leu-Val)* и *Cyclo(Leu-Leu)* (Ren at al., 2010; Gao at al., 2014), (Feng at al., 2006), (Huang at al., 2007), състоящи се от две алифатни α-аминокиселини, имат абсорбционни максимуми в UV-Vis спектрите при 207.0 и 226.0 nm, докато *Cyclo(Pro-Phe)* и *Cyclo(Phe-Leu)* (Strom at al., 2002), (Gondry at al., 2009) показват абсорбционни максимуми при 203.0, 276.0 и 228.0, 283.0 nm. Абсорбционните максимуми при 276.0 и 283.0 nm са доказателство, че в структурата на веществата се съдържа ароматно ядро. Изолираните и идентифицирани дикетопиперазини (циклични дипептиди) са изследвани за антимикробно действие *in vitro* спрямо Грам-положителни, Грам-отрицателни бактерии, дрожди и гъби (таблица 7). Антимикробната активност на изследваните дикетопиперазини е относително добра.

Спрямо *Escherichia coli* са неактивни. Установихме, че микроорганизми, адаптирани и преживяващи в условията на Антарктида наред с биопродукцията на известни досега биологично активни вторични метаболити, продуцират и вещества с непознати структури.

ИЗВОДИ

1. Установено е, че *Thermoactinomyces* sp. щам IMBAS-14A и *Thermoactinomyces* sp. щам IMBAS-22A, изолирани от екскременти на пингвини, колекционирани на остров Ливингстън, Антарктида, принадлежат на вида *Laceyella sacchari*.
2. Разработена е лабораторна технология за получаване на β -карболинови алкалоиди от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A. Определени са физико-химичните характеристики на изолираните в молекулно-хомогенен вид два компонента на β -карболиновите алкалоиди.
3. Доказана е пълната химическа структура на β -карболиновия алкалоид 1-метил- β -карболин (харман), изолиран от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A.
4. Доказана е предполагаемата частична структура на 1-ацетил-4-метил- β -карболин по метода на метаболомиката (HPLC/DAD/ESI-MS). 1-ацетил-4-метил- β -карболинът се различава от 1-метил- β -карболина с 42 масови единици. Структурната разлика между двата компонента се дължи на присъствието на една ацетилна група (COCH_3) в структурата на 1-ацетил-4-метил- β -карболина. По литературни данни 1-ацетил-4-метил- β -карболинът не е изолиран от природни източници.
5. 1-метил- β -карболинът и 1-ацетил-4-метил- β -карболинът показват активност спрямо Грам-положителни, Грам-отрицателни бактерии, дрожди и филаментозни гъби.
6. Изследвана е динамиката на синтез на дикетопиперазини (циклични дипептиди) от антарктическият щам *Laceyella sacchari* IMBAS-22A. Установено е, че синтезът на дикетопиперазини (циклични дипептиди) е най-висок на 48-ия час от култивирането на щама.
7. Разработена е лабораторна технология за получаване на дикетопиперазини (циклични дипептиди) от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-22A. Определени са физико-химичните характеристики на изолираните пет

компонента на дикетопиперазините.

8. Три от изолираните дикетопиперазини (циклични дипептиди) са идентифицирани като *Cyclo(Pro-Leu)*, *Cyclo(Leu-Val)* и *Cyclo(Leu-Leu)*. Те се състоят от две циклизирани алифатни α -аминокиселини и имат абсорбционни максимуми в UV-Vis спектрите при 207.0 и 226.0 nm.
9. Втората група изолирани дикетопиперазини (циклични дипептиди) са идентифицирани като *Cyclo(Pro-Phe)* и *Cyclo(Phe-Leu)*. Те показват в UV-Vis спектрите абсорбционни максимуми при 203.0, 276.0 и 228.0, 283.0 nm. Структурите им се състоят от една алифатна и една ароматна α -аминокиселина.
10. Изолираните и идентифицирани дикетопиперазини са изследвани за антимикробно действие *in vitro* спрямо Грам-положителни, Грам-отрицателни бактерии, дрожди и гъби. Антимикробната активност на изследваните дикетопиперазини е относително добра. Спрямо *Escherichia coli* са неактивни.

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път са изследвани два непроучени щама *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-22A, изолирани от екскременти на пингвини, колекционирани на остров Ливингстън, Антарктида, продуценти на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини (циклични дипептиди). Двата щама са идентифицирани до вида *Laceyella sacchari* с помощта на молекулярно биологични методи. Тези данни допълват научната информация за ареала на този вид.
2. Разработени са оригинални лабораторни технологии за изолиране, пречистване и препаративно хроматографско разделяне на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини от културалните течности на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A.
3. Доказана е пълната химическа структура чрез HPLC/DAD/ESI-MS, 1D и 2D ЯМР-анализи (^1H , ^{13}C , APT, HSQC и HMBC) на β -карболиновия алкалоид 1-метил- β -карболин (харман), с Мм. 182 Da и емпирична формула $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2$, изолиран от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A.

Алкалоидът преди това е изолиран многократно от медицински растения и от *Pseudomonas* sp. K44-1 и за първи път от *Laceyella sacchari*.

4. Доказана е предполагаемата частична структура на 1-ацетил-4-метил- β -карболина по метода на метаболомиката (HPLC/DAD/ESI-MS). 1-ацетил-4-метил- β -карболинът е с Мм. 224 Da, емпирична формула $C_{14}H_{12}N_2O$ и за първи път е изолиран от природни източници.
5. Получени са нови данни по отношение на биопродукцията на щам *Laceyella sacchari* IMBAS-22A. Той е продуцент на дикетопиперазините (циклични дипептиди) *Cyclo(Pro-Leu)*, *Cyclo(Pro-Phe)*, *Cyclo(Leu-Val)*, *Cyclo(Phe-Leu)* и *Cyclo(Leu-Leu)*, които са с антимикробно действие. Те са изолирани за първи път от вида *Laceyella sacchari*.

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Bratchkova A., Ivanova V. Bioactive metabolites produced by microorganisms, collected in Antarctica and Arctic (Review, Medical biotechnology). *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 2011, 25 (5): 1-7. (IF=0.760)

Bratchkova A., Ivanova V., Gousterova A., Laatsch H. β -carboline alkaloid constituents from a *Thermoactinomyces* sp. strain, isolated from Livingston island, Antarctica. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 2012, 26,(3): 3005-3009. (IF=0.622)

Bratchkova A., Ivanova V. Isolation, identification and biological activities of cyclic dipeptides from Antarctic microorganisms. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 2017, 70(10): 1389-1398. (2016 IF=0.251)

ОТКРИТИ ЦИТАТИ В ДОСТЪПНАТА ЛИТЕРАТУРА

Bratchkova A., Ivanova V., Gousterova A., Laatsch H. β -carboline alkaloid constituents from a *Thermoactinomyces* sp. strain, isolated from Livingston island, Antarctica. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 2012, 26(3): 3005-3009. (IF=0.622)

1. Bertelli, P. R., Biegelmeier, R., Rico, E. P., Klein-Junior, L. C., Toson, N. S. B., Minetto, L., Bordignon, S. A. L., Gasper, A. L., Moura, S., de Oliveira, D. L., Henriques, A. T. Toxicological profile and acetylcholinesterase inhibitory potential of *Palicourea deflexa*, a source of β -carboline alkaloids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2017, 201: 44-50

Bratchkova A., Ivanova V. Bioactive metabolites produced by microorganisms, collected in Antarctica and Arctic (Review, Medical biotechnology). *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 2011, 25(5): 1-7. (IF=0.760)

1. Liu, J., Zhang, D., Dong, L., Wang, N. A preliminary study on the population amount and functional activity of soil nitrogen cycle microbes in Fildes Peninsula of Antarctica. *Chinese Journal of Polar Research*, **2017**, 29(1): 82-89.
2. Mondini, A., Esposito, F. P., Tortorella, E., Tedesco, P., Aurilio, M., De Martino, N., Festa, C., Monti, M. C., D'Auria, M. V., De Pascale, D. ANTARCTIC MARINE ENVIRONMENT AS A SOURCE OF NOVEL ANTIMICROBIAL COMPOUNDS. *Biologia Marina Mediterranea*, **2016**, 23(1): 306-307
3. Giudice, A. L., Fani, R. Antimicrobial Potential of Cold-Adapted Bacteria and Fungi from Polar Regions. Chapter of *Biotechnology of Extremophiles: Volume 1 of the series Grand Challenges in Biology and Biotechnology*, **2016**: 83-115.
4. Gromek, S. M., West, A. M., Balunas, M. J. Off the Beaten Path: Natural Products from Extreme Environments, Chapter 12, *Marine Biomedicine: From Beach to Bedside*. Backer, B. J.(Ed.), CRC Press, **2015**, pp 341-379.

Участия в научни форуми

Постери:

В ЧУЖБИНА

Bratchkova A., Ivanova V., Gousterova A., Laatsch, H. Alkaloids from a *Thermoactinomyces* sp. strain, isolated from Livingston island, Antarctica. *Microbiologia balcanica* 2011, 7th Balkan congress of microbiology, 8th congress of Serbian microbiologists, October 25-29, 2011, Belgrade, Serbia. *Ecological and applied microbiology* p. 296.

В БЪЛГАРИЯ

Bratchkova A., Ivanova V., Gousterova A., Laatsch H. β -carboline alkaloid constituents from a *Thermoactinomyces sp.* strain, isolated from Livingston Island, Antarctica. Institute of Molecular Biology Roumen Tsanev, 50 Years Anniversary Molecular Biology Conference, Sofia, Bulgaria, October 6-7, 2011, PD10.

Иванова, В., **Бръчкова, А.**, Гущерова, А. Изолиране, идентификация и биологично действие на природни дикетопиперазини от антарктически микроорганизми, Докторантски симпозиум на тема “Молекулярната биология – отблизо. Предизвикателства и перспективи”, 1 – 2 декември 2014 г., Институт по молекулярна биология "Акад. Румен Цанев", БАН