УДК 579.22

PENITSILLIUM BREVICAULE ALBA – CC200 ЭНДОФИТ ЗАМБУРУҒИНИНГ ИККИЛАМЧИ МЕТАБОЛИТЛАРИНИ ХРОМОТОГРАФИЯ УСУЛЛАРИ ЁРДАМИДА ТОЗАЛАШ ВА α-АМИЛАЗА ФЕРМЕНТИГА ИНГИБИТОРЛИК ТАЪСИРИНИ ЎРГАНИШ

И.И. Мухаммедов, Д.М. Рузиева, С.М. Насметова

Мақолада Celosia cristata ўсимлигидан ажратиб олинган Penicillium brevicaule alba – CC200 эндофит замбуруғининг тозаланган фракциялари антидиабетик фаоллиги ўрганилди. Антидиабетик фаоллик α-амилаза ферментининг ингибиторлиги билан баҳоланди. P. brevicaule alba – CC200 эндофит замбуруғининг иккиламчи метаболитлари устунли хромотография ёрдамида қисман тозаланди ва олинган II фракция 91,2 % α-амилазани ингибиторлади. Юқори ингибитор фаоллигига эга бўлган II фракцияда юпқа қатламли хромотография (ЮҚХ) ва сифат таҳлиллари натижасида юрак гликозидлари ва терпеноидлар борлиги аниқланди.

Калит сўзлар: *Penicillium brevicaule alba - CC200, Чапек-Докс, α-амилаза, α-глюкозидаза, устунли хромотография, ЮҚХ, юрак гликозидлар, терпеноидлар.*

В исследовании была изучена противодиабетическая активность очищенных фракций эндофитного гриба Penicillium brevicaule alba - CC200, выделенного из растения Celosia cristata. Противодиабетическую активность оценивали по ингибированию фермента – панкреатической α-амилазы. Вторичные метаболиты эндофитного гриба P. brevicaule alba-CC200 были частично очищены с помощью колоночной хроматографии. Установлено, что фракция II ингибировала активность α-амилазы на 91,2%. В результате качественного анализа, методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) установлено, что активность фракции II обусловлена содержанием сердечных гликозидов и терпеноидов.

Ключевые слова: *Penicillium brevicaule alba - CC200, Чапек-Докс, а-амилаза, а-глюкозидаза, колоночная хроматография, ТСХ, сердечные гликозиды, терпеноиды.*

КИРИШ

Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти маълумотига кўра, ҳозирги кунда ер юзида қандли диабетга чалинган беморлар 400 миллиондан зиёд экани аниқланган. Таҳлилларга кўра, ушбу кўрсаткич 2030 йилга бориб 550 миллиондан ортиши мумкин. Ўзбекистонда эса мазкур касаллик билан 220 минг нафар киши рўйхатга олинган [1]. Сўнгги йилларда қандли диабет ўлим сабаблари орасида учинчи ўринни эгаллади, юрак-қон томир ва онкологик касалликлар эса иккинчи ўринда туради. Қандли диабетнинг ижтимоий оқибатлари ҳам салбийдир, чунки ушбу касалликни даволаш соғлиқни сақлаш тизимидан жуда катта харажатларни талаб қилади [2. Б. 14]. Қандли диабет – бу углеводлар, липидлар ва оқсилларнинг метаболик бузилишлари билан кечадиган, сурункали гипергликемия мавжудлиги билан тавсифланган касаллик [3. Б. 118].

Сўнгги ўн йилликда қандли диабетни даволашнинг бир қатор янги усуллари таклиф қилинди, аммо учта йўналиш асосий бўлиб қолмоқда: а) 1-тоифа қандли диабет билан касалланган беморларга диета, инсулин; б) 2-тоифа қандли диабет учун истеъмолдаги гипогликемик агентлар; с) умумий тартиб ва жисмоний фаолият [2. Б. 14].

2-турдаги диабетни даволашда турли хил терапевтик йўналишлар мавжуд. α-амилаза каби углеводни гидролизловчи ферментларни ингибирлаши постпрандиал қонда глюкоза даражасини пасайтириш учун муҳим йўналишлардан биридир. Қандли диабетни даволаш учун клиник амалиётда қўлланиладиган бундай ингибиторлар турли хил ошқозон-ичак тракти салбий таъсири билан боғлиқ эканлиги маълум. Шунинг учун камроқ салбий таъсирга эга бўлган табиий манбалардан амилаза ингибиторларини аниқлаш зарур. *Caesalpinia bonducella* ўсимлигиниг сувли экстракти α-амилаза фаоллигини 87,26% га ингибирлади [3. Б. 457-462]. *Capparis spinosa* нинг этанол экстракти олиниб α-амилазага ингибиторлик таъсири ўрганилди. Илдиз ва барглардан олинган экстрактларнинг 25 мг/мл концентрацияси 97,31 – 98,92 % α-амилазани ингибирлади [4. Б. 1-4].

S. persica дан ажратиб олинган иккиламчи метаболитларнинг in-vitro шароитида α-амилаза ингибитор фаоллигини ва унинг фаолияти учун жавобгар бўлган кимёвий таркиби ўрганилди. *S. persica* нинг сувли экстракти юқори даражада α-амилаза фаоллигини 72,39% га ингибитирлади ва 65,99% ингибитор қийматига эга акарбозага нисбатан 376 мкг/мл IC50 қийматига эга. ЮҚХ таҳлилида 15 хил аралашма мавжудлиги аниқланди [5. Б. 127-136]. Араб мамлакатларида *N. oppositifolia* ўсимлигидан диабет касаллигини даволашда ишлатилган. Тажрибаларда *N. oppositifolia* нинг метанол экстракти устунли хроматографияда н-гексан ва этил ацетат ҳаракатланувчи фаза ёрдамида 3-оксолупенал ва катонон кислотаси тозалаб олинди. 3-оксолупенал ва катонон кислотаси α-амилаза ингибитори акарбозага нисбатан 46,2 мг/мл (101,6 мМ) ва 52.4 мг/мл (119,3 мМ) IC50 қийматларини кўрсатди. 3-оксолупенал (62,3 мг/мл ёки 141,9 мМ) катонон кислотасига нисбатан (88,6 мг/мл ёки 194,8 мМ) α-глюкозидазани нисбатан кўпроқ ингибирлади. Антиоксидант фаоллиги жиҳатидан н-бутанол фракцияси *DPPH* ва *АБТС* радикалларни фаол зарарсизлади [6. Б. 1-19]. *Salacia oblong* ўсимлигининг илдиз экстрактининг антидиабетик фаолиятини баҳолаш учун фитокимёвий текширилди ва ГС-МС таҳлили ўтказилди. Илдиз сув билан экстракция қилинди ва фитокимёвий таҳлилда феноллар, флавоноидлар, алкалоидлар, терпеноидлар, танинлар, сапонинлар каби иккиламчи метаболитларнинг асосий синфлари аниқланди. Умумий флавоноид, терпеноид ва танинлар α-амилаза ва α-глюкозидаза феррментларига ингибитор сифатида таъсир кўрсатилди. Илдиз экстракти IC50 қийматлари α-амилаза ва α-глюкозидазани ингибирлаш учун 73,56 мг/мл ва 80,90 мг/мл оптимал миқдори аниқлади. ГС-МС таҳлиллари орқали ўн бешта кимёвий моддалар аниқланди [7. Б. 1-10]. *Stachys viticina Boiss* барглари таркибидаги эфир мойининг (ЭМ) ингибиторлик хусусиятларини in-vitro, микробларга қарши, антикансант, антиоксидант, метаболик ферментлар ва циклоксигеназа (COX) ни баҳолашга қаратилди. ГС-МС таҳлили *S. viticina ЭМ* таркибида 52 та аралашманинг мавжудлигини аниқлади, уларнинг асосий қисми эндо-борнеол, эвкалиптол ва эпизонаренлардир. Эфир мойи йўғон ичак ва *HeLa* саратон ҳужайраларига қарши ситотаксик фаолликни, шунингдек, учта грам-мусбат, учта грам-манфий бактериялар ва иккита замбуруғларга қарши антибактериал таъсир кўрсатди. Бундан ташқари, ЭМ α-амилаза (56,52% 45,22 мг/мл га тенг)

ва α-глюкозидаза (63,09 мг/мл га нисбатан 69,82%) ингибиторлик потенциали аниқланди [8. Б. 1-14].

Nigella sativa уруғларининг фитокимёвий таркиби эритувчиларда эриши ва антидиабетик фаоллиги текширилди. Уруғлар бешта эритувчида – метанол, этанол, н-гексан, нефт эфири ва хлороформда экстракция қилинди. Хлороформ экстрактидан ташқари барча экстрактларда фитокимёвий моддалар мавжуд, аммо метанол экстрактида фитокимёвий моддалар кўп миқдорда аниқланди. α-амилаза ингибиторлиги ҳам метанол экстракти учун юқори (68,5%) эканлиги аниқланди [9. Б. 53-58]. Trigonella hamosa ўсимлигидан олинган экстарктлар антиоксидант ва α-амилазани ингибитор фаоллиги концентрацияга боғлиқ ҳолда IC50 қийматлари мос равишда 0,19 ва 35 мг/мл.ни ташкил этди. Максимал α-амилазани ингибиторлаш даражаси 72,64% ни ташкил қилди [10. Б. 165-172].

Албидопирон Атлантика океанининг тубидаги чўкмалардан ажратилган актиномисет *Streptomyces sp.* томонидан синтез қилинади. Албидопироннинг кимёвий тузилиши олти аъзодан иборат ароматик лактон бўлиб, унинг 3-иловасида метил гуруҳи, 4-позицияда ОН гуруҳи, 6-позицияда сирка кислотаси анилин амидининг қолдиғидан иборат. Албидопирон антибиотик эмас, аммо тирозин кинослари билан биргаликда тирозин фосфорланишини тартибга солувчи тирозин фосфат Б (ТФВ)нинг фаолиятини сусайтиради. ТФВ инсулиннинг асосий салбий регуляторидир (инсулин рецепторининг фосфор ҳолатини бошқаради). Шу муносабат билан ТФВ ингибиторлари диабетни даволаш учун самарали воситадир [11. Б. 75-79].

Euphorbia hirta бегона ўтларидан ажратиб олинган Botryodiplodia teobromae эндофит замбуруғидир. Замбуруғлар кумуш нанопартикулларни синтез қилиш учун 1мМ $AgNO_3$ билан ишлов берилди. Кумуш нанозаррачалар ишлаб чиқарилиши ҳужайра фильтри ва юзаси рангининг рангсиздан тўқ жигар ранггача ўзгариши ёрдамида тасдиқланди. Botryodiplodia theobromae замбуруғларидан синтез қилинган кумуш нанопартикуллар α-амилаза учун энг юқори ингибиторлик фоизини (94%) кўрсатади [12. Б. 72-76]. Artocarpus heterophyllus ўсимлигининг баргларидан эндофит замбуруғлари ажратиб олинди. Олинган экстрактларнинг α-амилазага ингибитор фаоллиги 89 % ни, стандарт акарбозада 71 % ни кўрсатди [13. Б. 731-734].

2-тоифа диабет билан касалланган беморларни даволашда α-гликозидаза ферментининг ингибиторлари қўлланилмоқда. Улардан бири, акарбоза – бу псевдо-тетрасахарид бўлиб, у овқат ҳазм қилиш ферменти билан боғланадиган жойлар учун моно ва дисахаридлар билан рақобатлашади ва ингичка ичакда углеводларнинг кетма-кет ферментациясини ва углеводлар сўрилишини секинлаштиради [2. Б. 15; 4. Б. 311-320]. Аммо акарбоза асосан α-глюкозидаза ингибитори сифатида танилган ва қорин бўшлиғининг кенгайиши, метеоризм ва диарея каби ножўя таъсирларни келтириб чиқаради [14. Б. 1-3; 15. Б. 158-160].

Фармацевтикада табиий маҳсулотлар стандарт синтетик моддаларга қараганда кўпроқ таркибий хилма-хилликни таъминлаб, янги бирикмаларни топиш учун катта имкониятларни таклиф этади [16. Б. 11-16]. Қонда глюкоза миқдорини пасайтириш қандли диабетга чалинган беморларнинг яшаб қолиш даражасини оширишда самарали воситадир. Ўсимликлардан ажратиб олинадиган эндофит замбуруғлар диабетни даволаш учун иккиламчи метаболитларни ишлаб чиқаришда муқобил манба бўлиши мумкин [17. Б. 107-111].

Эндофит замбуруғлар – бу потенциал биологик фаолликка эга бўлган кимёвий муҳим бирикмаларнинг яширин хазина-

сидир. Кўплаб табиий бирикмалар турли хил эндофитлардан ажратилган [18. Б. 8]. Эндофит замбуруғлар томонидан ишлаб чиқарилган биофаол бирикмалар алкалоидлар, бензопиранонлар, хинонлар, ситохалазинлар, депсипептидлар, энниатинлар, флавоноидлар, фурандионлар, изокумаринлар, пептидлар, поликетонлар, феноллар, гидрохинонлар, терпеноидлар, тетралонлар ва ксантонлар аниқланган. Шунинг учун эндофитлар янги биологик фаол бирикмаларнинг кимёвий захирасини ташкил этади, улар антиоксидант, микробларга қарши, диабетга қарши, паразитларга қарши, вирусларга қарши, инсектицидларга қарши, антибиотик, иммуносупрессив ва иммуномодулятор воситалари сифатида фармацевтика ва агрокимё саноатида қўлланилади [19. Б. 242-254; 20. Б. 1-26]. Эндофит замбуруғлар ўсимлик ҳужайраларида яшаши учун турли хил кимёвий моддаларни ишлаб чиқаради. Симбиотик муносабат туфайли улар фармацевтик жиҳатдан муҳим биологик фаол бирикмалар ва фермент ингибиторларини ажратади. *Gymnema sylvestre* ўсимлигидан 32 та эндофитлар ажратиб олиниб улардан *Fusarium equiseti* эндофит замбуруғи α-амилаза ва α-глюкозидазага ингибиторлиги кузатилди [21. Б. 1-13]. α-амилаза ингибитори сифатида *Penitsillium oxalicum* нинг метанол экстракти IC 50 қиймати 46,73 мг/мл.ни, хлороформ экстракти 59,20 мг/мл.ни ташкил қилди [22. Б. 119-122]. *Acacia nilotica* ўсимлигидан *Aspergillus awamori* эндофит замбуруғлари ажратиб олинган экстрактлар α-амилазани 81% ва α-глюкозидазани 80% га ингибиторлади [23. Б. 301-311].

Celosia cristata ўсимлигидан ажратиб олинган P. *brevicaule alba - CC200* эндофит замбуруғининг иккиламчи метаболитлари ошқозон ости α-амилаза ферментининг ингибитори сифатида ўрганилган. Олинган иккиламчи метаболитларни этилацетат экстракти 93% α-амилазага юқори ингибитор фаоллигини кўрсатди ва экстракт таркибида терпеноид, сапонин, гликозид ва фенол компонентлари борлиги сифат таҳлилида аниқланди [24. Б. 71-75]. Шу билан бирга аниқланган моддаларнинг қайси бири ингибитор фаоллигини амалга ошираётганлигини тасдиқлаш учун ЮҚХ, устунли хромотография ва сифат таҳлил усуллари орқали тушунтириш зарур бўлади.

МАТЕРИАЛЛАР ВА УСЛУБЛАР

Эндофитларни ўстириш. Кейинги ажратиб олинган биомассаларни тўплаш ва биологик фаолликни аниқлаш учун эндофит замбуруғлар ферментация қилинди. Бунинг учун штаммлар суюқ Чапек-Докс муҳитида 180 айл/мин. шакерда, 280С ҳароратда, 7 кун давомида ўстирилди. Культураларнинг биомассаси центрифугада 6000 айлана тезликда ажратиб олинди ва 40С да сақланди.

Эндофит замбуруғларнинг биомассасидан иккиламчи метаболитларни ажратиб олиш. Биологик фаолликни аниқлаш учун, эндофит замбуруғларнинг биомассасидан метаболитларни ажратиб олишда *Hazalin* ва бошқаларнинг услубига биноан, *Lang* ва бошқаларнинг ўзгартиришлари билан амалга оширилди [25. Б. 9-46]. Бунинг учун 5 г биомасса *Potter* гомогенизаторида гомогенат ҳолга келтирилди ва уни конусли кольбага солиб 50 мл этилацетат қуйилди, экстракцияни хона ҳароратида айланма шакерда бир кун давомида қолдирилди. Кейин аралашма қоғоз фильтрда фильтрланди (*Whatman №1*) ва сувли қатламни олиб ташлаш учун Na_2SO_4 40 мкг/мл қўшилди, аралашма роторли буғлатгичда қуритилди, сўнг 1 мл диметил сулфоксид (ДМСО)

қўшилди. Олинган экстрактни қайта ишлатиш учун 40С ҳароратда сақланди.

Эндофит замбуруғ экстрактларининг α-амилаза фаоллигига таъсирини аниқлаш. α-амилаза фаоллигини аниқлаш ўсимлик экстрактларида қўлланиладиган усул бўйича амалга оширилди [26. Б. 5334-5341]. Крахмал эритмаси субстрат сифатида 1 г/10 мл сув миқдорида тайёрланди, 2 дақиқа қайнатилди, дистилланган сув билан 100 мл ҳажмга етказилиб, 2–3 кунгача қўлланилди. Препаратнинг тайёрланган 2 мл крахмалига 100 мкл ошқозон ости бези α-амилаза (0,1 M Na-ацтат буффер 13 мл.ни ташкил қилади pH 7,2), 100 мкл эндофит замбуруғ экстракти, 2 мл ацетат буфер 30°C да 10 дақиқа давомида инкубация қилинди. Сўнг инкубация реакцияси тўхтаталиб 10 мл йод реактивига солинди ва оптик зичлиги *SPECOL – 1300* спектрофотоколориметрда 630 нм тўлқин узунлигида ўлчанди. Йод реагентини тайёрлаш учун 0,5 гр кристал йод, 5 гр калий йодид олинди ва 250 мл дистилланган сувда эритилди; ишчи эритмани олиш учун ушбу реагентдан 2 мл 0,1 M HCl билан 100 мл.га қўшилди. Тажриба намунасидан фарқли ўлароқ, назорат намунасига экстракт қўшилмади. Таъсир этувчининг фаоллиги (A0-At)\A0×100% формуласи билан ифодаланади, A0 ва At крахмалнинг йод эритмаси билан биринчи ва охирги вақт оралиғи ҳисобланади. Таққословчи ингибиторлик фаолияти сифатида тижорат ингибитори, акарбоза ишлатилган.

Сифат таҳлили. Экстрактлардаги таркибий қисмларнинг сифат таркибини аниқлаш Visweswari ва бошқаларнинг тавсифига биноан компонентларни дифференциал бўяш орқали аниқланди [27. Б. 2770-2776].

Танинлар ва фенол табиатли моддаларнинг мавжудлиги олинган экстрактга 2 мл 1% $FeCL_3$ эритмасидан 2-3 томчи қўшиб аниқланди. Темир ионлари борлиги танинлар қора-кўк ёки қора-яшил рангни, феноллар бинафша рангни бериши орқали аниқланади.

Сапонинларнинг мавжудлиги 1 мл экстрактга 5 мл иссиқ сувда (60°C) эритиб, барқарор кўпик ҳосил бўлгунча 5 дақиқа давомида қаттиқ силкитиб аниқланди. Кейинги 30 дақиқа давомида кўпик ҳажми сақланиб қолади.

Терпеноидларнинг мавжудлиги 0,5 мл экстрактга 2 мл хлороформ ва 3 мл H_2SO_4 (концентрация) билан аралаштириш орқали аниқланди. Қизил-жигар ранг, бинафша босқичлари орасидаги шаклланиш терпеноидларнинг мавжудлигини кўрсатди.

Антрахинонларнинг мавжудлиги 2 мл экстрактга 4 мл гексан билан аралаштириб, сўнг чайқаш орқали аниқланди. Бундай ҳолда экстракт 2 қатламга ажралиши кузатилди. Юқори қатлам ажратилиб пастки қатламга 4 мл суюлтирилган 10% аммиак билан ишлов берилди ва пастки қатламнинг ранги аниқланди. Бинафшапушти ранг антрахинонлар мавжудлигини кўрсатди.

Юрак гликозидларининг мавжудлиги 1 мл экстрактга 1 мл муз сирка кислотаси билан аралаштириб, сўнгра 1 томчи 3% темир хлорид метанолга қўшиб аниқланди. Кейин H_2SO_4 (концентрация) найча орқали идиш деворига томизилди, пастки қатламнинг ранги аниқланди. Мовий-яшил рангда бўяш юрак гликозидлари борлигини кўрсатди.

Юпқа қатламли хроматография (ЮҚХ).

Юпқа қатламли хроматографияда компонентлар турғун ва ҳаракатчан фазалар ўртасида тақсимланади. Таркибий қисмларнинг ажралиши турғун ва ҳаракатчан фазаларда унинг қутблигига қараб ЮҚХ пластинкаларида ҳар хил тезликда ҳаракатланади. ЮҚХ учун 10x10 sm ўлчамдаги *SIGMA-ALDRICH Silicagelon TLCAL* пластинкалари ишлатилди. Пластинкалар қуйидаги элюетларда: бензол: метанол (40:8) стандарт хроматографик

камерада бажарилди. 25 мг/мл концентрациядаги экстрактлардан 25 мкл ҳажмдан пластинкаларнинг старт чизиғига томизилди. Хроматографик камерадан олинган пластинкалар қуритилиб, ажралган моддаларни аниқлашда қуйидаги усуллардан фойдаланилди: 254 нм.да ультрабинафша чироқ остида; эксикаторда йод буғи билан; фосфор-молибден кислотасининг 20% спиртдаги эритмаси; H_2SO_4 кислотасининг 10% метанолдаги эритмаси билан пуркалди ва 110°С да қуритилди.

Устунли хроматография.

Экстрактларни қисман тозалаш Kaur ва бошқаларнинг ўзгартиришлари билан амалга оширилди. Экстракт силикагель (100–250 ўлчамдаги) устунга (2×25 см) ўрнатилди. Амалдаги ҳаракатланувчи фаза хлороформ: этилацетат: чумоли кислота 5:4:1 нисбатда. Ушбу ҳал қилувчи тизим ёрдамида ҳар бири 10 мл фракциялар йиғилиб, тегишли равишда I ва II деб белгиланди. II фракцияда фаоллик кузатилди. Фаол фракцияларнинг кимёвий табиати сифат таҳлиллари ва ЮҚХ усуллари ёрдамида аниқланди [28. Б. 1-13].

Натижалар такрорий таҳлилнинг ўртача кўрсаткичи эди.

НАТИЖАЛАР ВА МУҲОКАМА

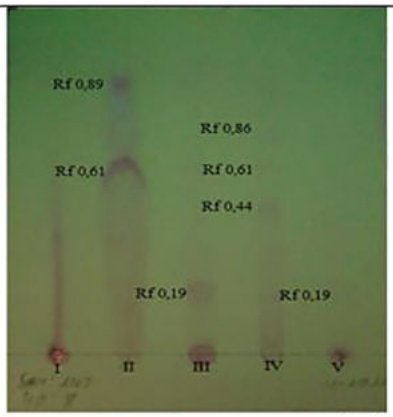
Гипергликемияда α-амилаза ва α-гликозидаза ферментларини ингибиторлаши мумкин бўлган 58 та бирикма аниқланди. Бу моддалар асосан флавонлар, флавон гликозидлари, тритерпенлар, алкалоидлар, танинлар ва бошқа полифенол бирикмаларга тегишлидир [29. Б. 1-10]. Қисман тозаланган фермент ингибиторлари юқори фаолликка олиб келади, максимал ингибитор фаоллик морфологик ва молекуляр таҳлиллар асосида аниқланади [28. Б. 1-13].

Бизнинг натижаларимиз шуни кўрсатдики, *P. brevicaule alba* – CC200 этилацетат экстракти таркибида амилаза фаоллигининг ингибиторлиги учун жавоб берадиган бирикмалар мавжуд, шу сабабли экстрактда тозалаш ишлари олиб борилди. Экстрактлардан устунли хроматография усулида бешта фракция олиниб, ДМСОда эритилди ва α-амилаза ингибитори сифатида текширилди. 1-жадвалдаги маълумотлардан кўриниб турибдики, энг юқори ингибитор фаоллик II фракцияда 91,2 % ни ташкил қилди, хроматографик тозалашдан олдинги метанол фракцияси 88,7% ни ташкил қилган. Паст ингибитор фаоллик I фракцияда 58,4 % ни, III фракцияда 26 % ни, IV фракцияда 38,7 % ни ва V фракцияда 12,4 % ни ташкил қилди.

1-жадвал

***P. brevicaule alba* – *CC200* эндофит замбуруғи иккиламчи метаболитларининг устунли хроматография усулида олинган фракцияларининг ингибиторлик даражаси ва ЮҚХ таҳлили**

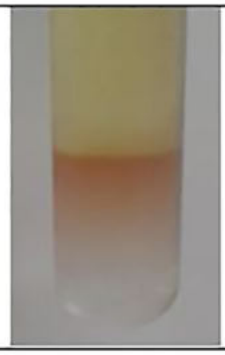
Фракциялар	α-амилаза % ингибитори	Rf
I	58,4	-
II	91,2	0,89
		0,61
III	26	0,19
IV	38,7	0,86
		0,61
		0,44
V	12,4	0,19



Элюет система: бензол: метанол (5:1). Қўлланилган намуналар ҳажми 25 мкл. Аниқловчи реактив: фосфор-молибден кислотасининг 20% спиртли эритмаси.

Устунли хроматография усулида олинган фракциялар ЮҚХ ёрдамида моддаларнинг кимёвий тозалиги текширилди. ЮҚХ пластинкаларига фосфор-молибден кислотасининг 20% спиртли эритмаси билан ишлов берилганда, доғлар кўк рангга бўялди, бу эса сопанин ва тритерпенларнинг мавжудлиги билан боғлиқ. *Jasleen Kaur* ва бошқаларнинг тадқиқотида *Alternaria* эндофит замбуруғининг қисман тозаланган ва ЮҚХ пластинкалардаги доғларга FeCl3 билан ишлов берилганда, доғлар бинафша рангга бўялган, буни фракция таркибида фенол бирикмаларининг ҳусусиятига боғлаш мумкин [28. Б. 1-13]. *Colletotrichum capsici* эндофит замбуруғидан олинган ва қисман тозаланган III фракция кучли антидиабетик таъсирга эга эканлиги аниқланди. Бундан ташқари, масс спектрометрия билан аниқлаш шуни кўрсатдики, III фракциядаги бирикмалар асосан ёғ кислотаси ва фенолик бирикмалардир [30. Б. 283-286]. *Mentha piperita* (ялпиз) ўсимлигидан ажратиб олинган эндофит бактерияларнинг этилацетат экстрактлари ГХ-МС спектри ёрдамида текширилганда, терпеноидлар, формалдегид ва эвгенол биологик актив моддалар аниқланди [31. Б. 395-400]. *In vitro* шароитида *C. uredinicola* эндофит замбуруғлари метанол экстракти таркибидаги биологик муҳим фитокимёвий моддаларни антиоксидант, антидиабет ва антихолинестераза фаоллиги аниқланди. *C. uredinicola* экстракти сифат таҳлилида флавоноидлар, танинлар, алкалоидлар, гликозидлар, феноллар, терпеноидлар ва кумаринларнинг мавжудлигини кўрсатади [32. Б. 13-34].

P. brevicale alba – CC200

Фракция	α-амилаза % ингибитори	Терпеноидлар	Юрак гликозидлари
II	91,2		

1-расм. Устунли хроматография усули билан олинган II фракциянинг сифат таҳлили

Шунингдек, юқори ингибитор фаолликка эга бўлган II фракция бир нечта кимёвий синфлар учун сифат реакциялари орқали текширилган. 91,2 % α-амилаза ингибиторига эга бўлган фракцияда юрак гликозидлари ва терпеноидларнинг мавжудлиги аниқланди (1-расм).

Кўпгина тадқиқотлар тритерпенларни нефропатия, эмбриопатия, нейропатия ёки яраларни даволаш каби диабетик асоратларнинг олдини олишда қўллашни таклиф қилади [33. Б. 675-690]. Масалан, олеанолик кислота, бетулин кислотаси ва урсодезоксихолик кислотаси энергия алмашинувида қатнашадиган TGR5 рецепторларининг кучли ингибитори ҳисобланади [34. Б. 178-190]. Nuxia oppositifolia ўсимлигининг энг юқори ингибитор фаоллиги бўлган н-гексан

фракцияси ГХ-МС анализи ёрдамида текширилганда, 3-оксолупенал ва катонон кислотасининг мавжудлигини тасдиқлади [35. Б. 1-26]. Кўпгина ҳисоботлар экстрактларнинг α-амилазага ингибитор таъсирини экстрактларда мавжуд бўлган терпеноидлар билан боғлашади [36. Б. 1993-1998; 37. Б. 614-618].

ХУЛОСА

Celosia cristata ўсимлигидан ажратиб олинган *P. brevicaule alba - CC200* эндофит замбуруғининг иккиламчи метаболитлари устунли хроматография ёрдамида қисман тозаланди ва олинган II фракция 91,2 % α-амилазани ингибиторлади. ЮҚХ ва сифат таҳлиллари шуни кўрсатдики, фракциянинг юқори ингибитор фаолликка эга бўлиши таркибидаги юрак гликозидлари ва терпеноидлар билан боғлиқ.

STUDYING CHROMATOGRAPHY PURIFICATION METHODS AND α-AMYLASE INHIBITORY ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITES OF ENDOPHYTIC FUNGUS *Pencillium brevicaule alba-CC200* WHICH HAS ANTIDIABETIC ACTIVITY

Iqbol I. Muhammedov[1], Dilorom M. Ruzieva[2], Saodat M. Nasmetova[2]

Илмий хабарнома. Серия: Биологик тадқиқотлар – Scientific Bulletin. Series: Biological Research. 2020. 8(52). 83-94.

[1]Andijan State University, Andijan, 170100, str. University, 129 (Uzbekistan).
E-mail: agsu_info@edu.uz
[2]Academy of Sciences Republic of Uzbekistan, Institute of Microbiology, 100128, Uzbekistan, Tashkent, A. Kadyry str., 7b. E-mail: Imb-anruz@mail.ru

Key words: *Penicillium brevicaule alba - CC200, Chapek-Dox, a-amylase, a-glucosidase, columnar chromatography, TLC, cardiac glycosides, terpenoids.*

Synthetic hypoglycemic drugs currently used in diabetes have a number of side effects. Therefore, great attention is paid to the hypoglycemic properties of natural α-amylase inhibitors, especially secondary metabolites in endophytic fungi of medicinal plants.

Bioactive compounds produced by endophytic fungi include alkaloids, benzopyranones, quinones, cytochalazines, depsipeptides, enniatins, flavonoids, furandions, isocoumarins, peptides, polycetones, phenols, hydroquinones, terpenoids, tetralons. Therefore, endophytes form a chemical reserve of new biologically active compounds that are used in the pharmaceutical and agrochemical industries as antioxidants, antimicrobials, anti-diabetic, anti-parasitic, antiviral, insecticidal, antibiotic, immunosuppressive and immunomodulatory agents.

The increase in biomass and inhibitory activity of secondary metabolites in Penicillium brevicaule alba-CC200 strains were studied by growing them in different nutrient media and in two different fermentation regimes. All parameters of growth and activity of endophytes were found to be superior to stationary growth. The most suitable nutrient medium for increasing the inhibitory activity of metabolites was the standard Chapek-Dox.

Secondary metabolites of the P. brevicaule alba - CC200 endophyte fungus have been studied as inhibitors of the pancreatic α-amylase enzyme. The obtained secondary metabolites, ethyl acetate extract, showed high inhibitory activity to 93% α-amylase, and qualitative analysis revealed the presence of terpenoid, saponin, glycoside, and phenol components in the extract.

Ethyl acetate extract of biomass of endophytic fungus P. brevicaule alba-CC200 isolated from Celosia cristata had an inhibitory activity of more than 81%. Preliminary qualitative analysis of the extract of P. brevicaule alba-CC200 showed the presence of a number of chemical classes, including saponins, terpenoids, phenols and glycosides.

Thin-layer chromatography and column chromatography methods were used to qualitatively determine the inhibitory substances studied. In this regard, the secondary metabolites in P. brevicaule alba-CC200 extract were purified using chromatographic methods, and qualitative analysis revealed the presence of cardiac glycosides and terpenoids with inhibitory activity.

The secondary metabolites of the P. brevicaule alba-CC200 endophyte fungus were partially cleared using column chromatography, and the resulting fraction II inhibited 91.2% α-amylase. TLC and qualitative analyses showed that the high inhibitory activity of the fraction was associated with cardiac glycosides and terpenoids.

References:

1. *O‘zbekistonda 220 ming kishi qandli diabet bilan xastalangan* [Online]. URL: https://www.xabar.uz/uz/jamiyat/diabetik

2. Stacenko, M.E., Kosicyna, A.F., Turkina, S.V., Bolotova, S.L. (2002). *Saharnyj diabet*: Uchebno-metodicheskoe posobie. Vyp. 1: Etiologiya, patogenez, klinika, differencial’nyj diagnoz, principy lecheniya. Volgograd: Izdatelstvo VolGU.

3. Bhutkar, M.A., Bhise, S.B. (2012). In vitro assay of alpha amylase ingibitory activity of some indigenous plants. *International Journal of Chemical Science*. 10(1). Pp. 457-462.

4. Selfayan, M., Namjooyan, F. (2016). Ingibitory effect of Capparis spinosa extract on pancreatic alpha-amylase activity. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 18(4). Pp. 1-4.

5. Twinkle, B., Salalkar, B.K. (2016). Exploiting the therapeutic potential of secondary metabolites from Salvadora persica for diabetes using in silico and in vitro approach. *Journal of Life Science and Biotechnology*. 5. Pp. 127-136.

6. Alqahtani, A.S., Hidayathulla, S., Rehman, M.T., ElGamal, A.A., Al-Massarani, Sh., Razmovski-Naumovski V., Alqahtani M.S., El Dib R.A., AlAjmi M.F. (2020). Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme ingibition and antioxidant potential of 3-oxolupenal and katononic acid isolated from Nuxia oppositifolia. *Biomolecules*. 10. Pp. 1-19.

7. Gladis Raja Malar Chelladurai, Chellaram Chinnachamy. (2018). Alpha amylase and Alpha glucosidase ingibitory effects of aqueous stem extract of Salacia oblonga and its GC-MS analysis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 54(1). Pp. 1-10.

8. Nidal Jaradat, Nawaf Al-Maharik. (2019). Fingerprinting, Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, Cyclooxygenase and Metabolic Enzymes Inhibitory Characteristic Evaluations of Stachys viticina Boiss. Essential Oil. *Molecules*. 24. Pp. 1-14.

9. Hazrat Belal, Ruksana Yesmin, Al Mamun, Nazmul Hasan, Dobirul Islam, Hanif Ali, Atikur Rahman, Amirul Islam. (2016). Evaluation of In vitro anti-diabetic and anti-inflammatory effects of Nigella sativa seed extracts in five different solvent systems. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research. Vol. 1*. Issue 6. Pp. 53-58.

10. Sameer H. Qari and Nayer M. Fahmy. (2017). Evaluation of some biological activities of Trigonella hamosa aerial parts. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 9(11). Pp. 165-172.

11. Hohmann, C., Schneider, K., Bruntner, C. et al. (2009). Albidopyrone, a new alpha-pyrone-containing metabolite from a marine-derived Streptomyces sp. NTK 227. J*ournal of Antibiot (Tokyo)*. 2(62). Pp. 75-79.

12. Vardhana Janakiraman, Mercy Jenifer, Sivasankaran Ramarajan. (2018). Anti-Diabetic and Anti-Cancer Effects of Silver Nanoparticles Synthesised from Botryodiplodia theobromae-An Endophytic Fungi isolated from Euphorbia hirta – A Weed. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 53(1). Pp. 72-76.

13. Madara, Kumari, Ireshika, De Silva. (2018). Alpha-Amylase Ingibition Activity of Endophytic Fungi Isolated from Leaves of Artocarpus heterophyllus. *International Journal of Science and Research. Vol. 7*. Issue 8. Pp. 731-734.

14. Conget, I. (2002). Diagnosis, Classification and Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Revista Española de Cardiología*. 55(5). Pp. 118.

15. Scheen, A.J. (1998). Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. *Diabetes & Metabolism.* 4(4). Pp. 311-320.

16. Mahmoud, N., Habibi, A.E., Hazareh, N., Parichehreh, Y. Parivar, K., Larijani, B. (2011). Trans Chalcone: a novel small molecule inhibitor of mammalian alpha-amylase. *Molecular Biology Reports*. 38(3). Pp. 1617-1620.

17. Al-Zuhair, S., Dowaidar, A., Kamal, H. (2010). Inhibitory effect of dates extracts on α-amylase and α-glucosidase enzymes relevant to non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of Biochemistry, Technology*. 2(2). Pp. 158-160.

18. Nemec, K., Schubert-Zsilavecz, M. (2003). Medizinische Chemie. From teprotide to captopril: Rational design of ACE ingibitors. *Pharmazie in Unserer Zeit*. 32(1). Pp. 11-16.

19. Hidayati, W., Padillah, A., Maharadingga, N., Hikmawanti, N., Prastiwi, R., Pratiwi, A., Farahmayuni, L., Syahputra, R., Fahrul, M. (2018). The Alpha-Amylase Ingibition Potential of Endophytic Fungi from Indonesian Bay Leaves (Eugenia polyantha WIGHT). In: *Proceedings of the 1st Muhammadiyah International Conference on Health and Pharmaceutical Development*. Pp. 107-111.

20. Sara Raouia. (2018). Doctorate of Sciences. *"Identification of bioactive natural products from endophytic fungi isolated from Globularia alypum"*. 02/07/2018. Université Ferhat Abbas Sétif 1, Faculté des Sciences de la, Nature et de la Vie. Pp. 1-106.

21. Ravindra, P.A., Suneel, K., Sardul, S.S. (2016). Endophytic mycoflora as a source of biotherapeutic compounds for disease treatment. J*ournal of Applied Pharmaceutical Science*. 6(10). Pp. 242-254.

22. Maheshwari, R., Varahalarao, V., Ramars, A., Suryanarayana, M.U. (2017). Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 60. Pp. 1-26.

23. Amit, R., Rajesh, K.S., Saumya, K., Ruchita, T., Rajesh, K., Anurag, K.S., Vibhav, G., Jyoti, Sh.T., Santosh, K.S. (2019). Characterization and evaluation of mycosterol secreted from endophytic strain of Gymnema sylvestre for inhibition of α-glucosidase activity. *Scientific Reports*. 9. Pp. 1-13.

24. Rinky, B., Deeksha, Sh., Pavan, K.A. (2016). Antimicrobial and Antidiabetic Activity of an Penicillium Oxalicum Isolated from Cupressus Torulosa. *International Journal of Biotechnology and Biomedical Sciences*. Vol. 2. Issue 2. Pp. 119-122.

25. Singh, B., Kaur, A. (2015). Antidiabetic potential of a peptide isolated from an endophytic Aspergillus awamori. *Journal of Applied Microbiology*. 2(120). Pp. 301-311.

26. Ruzieva, D.M., Rasulova, G.A, Muhammedov, I.I., Shuhratova, M.L., Sattarova, G.B., Mahkamova, M.P. (2019). Vliyanie razlichnyh rastvoritelej na uroven izvlecheniya vtorichnyh metabolitov iz Penicillium brevicaule alba – CC200, ingibiruyushchih pankreaticheskuyu α-amilazu. *Doklady AN RuZ*. 2. Pp. 71-75.

27. Hazalin, N.A., Ramasamy, K., Lim, S.M., Wahab, I.A., Cole, A.Lj, Majeed, A.A. (2009). Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and alternative medicine*. 9. Article 46.

28. Pavithra, N., Sathish, L., Babu, N., Venkatarathanamma, V., Pushpalatha, H., Reddy, G.B., Ananda, K. (2014). Evaluation of α-amylase, α-glucosidase and aldose reductase inhibitors in ethyl acetate extracts of endophytic fungi isolated from antidiabetic medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 5(12). Pp. 5334-5341.

29. Visweswari, G., Christopher, R., Rajendra, W. (2013). Phytochemical screening of active metabolites present in Withania somnifera root: role in traditional medicine. *International journal of Pharmaceutical Science and Research*. 4(7). Pp. 2770-2776.

30. Jasleen, K., Avinash, Sh., Manish, Sh., Rajesh, K.M., Sanehdeep, K., Amarjeet, K. (2019). Effect of α-glycosidase inhibitors from endophytic fungus Alternaria destruenson survival and development of insect pest Spodoptera litura Fab. and fungal phytopathogens. *Scientific Reports*. 9. Pp. 1-13.

31. Rahul, L.G., Anand, G., Parasuraman, J. (2018). A review of α-glucosidase and α-amylase ingibitors for type 2 diabetes isolated from some important Indian medicinal plants. *Annals of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 1. Issue 1. Article 1003. P. 1-10.

32. Shirly Kumalal, Ng Vini Aprilia, Partomuan Simanjuntak (2017). Identification and characterization of potent antimicrobial secondary metabolite generated from endophytic fungi isolated from Jamblang plant (Eugenia Cumini L.). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol. 10. Issue 4. Pp. 283-286.

33. Shiv, Kr. V., Moti, L., Mira, D. (2017). Structural elucidation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol. 10. Issue 7. Pp. 395-400.

34. Govindappa, M., Thanuja, V., Tejashree, S., Soukhya, C.A., Barge, S., Manojkumar, A., Ravishankar, R.V. (2019). In vitro and in silico antioxidant, anti-diabetic, anti-hiv and antialzheimer activity of endophytic fungi, Cladosporium uredinicola phytochemicals. *International Journal of*

Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine. Vol. 13. Pp. 13-34.

35. Nazaruk, J., Borzym-Kluczyk, M. (2015). The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. *Phytochemistry Reviews*. 14. Pp. 675-690.

36. Genet, C., Strehle, A., Schmidt, C., Boudjelal, G., Lobstein, A., Schoonjans, K., Souchet, M., Auwerx, J., Saladin, R., Wagner, A. (2010). Structure-Activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: Potential impact in diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1(53). Pp. 178-190.

37. Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites: a personal view. *Journal of Antibiotics*. 1(58). Pp. 1-26.

38. Wang, X.L., Jiao, F.R., Yu, M., Lin, L.B., Xiao, J., Zhang, Q., Wang, L., Duan, D.Z., Xie, G. (2017). Constituents with potent a-glucosidase inhibitory activity from Pueraria lobata (Willd.) ohwi. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 9(27). Pp. 1993-1998.

39. Hou, W., Li, Y., Zhang, Q., Wei, X., Peng, A., Chen, L., Wei, Y. (2009). Triterpene acids isolated from Lagerstroemia speciosa leaves as a-glucosidase inhibitors. *Phytotherapy Research*. 5(23). Pp. 614-618.

Муаллифлар ҳақида маълумот:

Мухаммедов Иқбол Илхом ўғли – Андижон давлат университети Зоология ва биокимё кафедраси таянч докторанти. E-mail: muxammedov1989@mail.ru

Рузиева Дилором Муталибовна – биология фанлари номзоди, ЎзР ФА Микробиология илмий текшириш институти катта илмий ходими. E-mail: druzieva@mail.ru

Насметова Саодат Мамажановна – биология фанлари доктори, ЎзР ФА Микробиология илмий текшириш институти катта илмий ходими. E-mail: saodatnasmetova@mail.ru