



УДК:577.32

Нилуфар ВАХАБОВА,

Базовый докторант Института микробиологии АН РУз

E-mail: nilufarvakhabova@gmail.com

Дилором РУЗИЕВА,

Старший научный сотрудник Института микробиологии АН РУз, к.б.н

E-mail: ruziyeva.1956@mail.ru

Тошхон ГУЛЯМОВА,

Зав.лаборатории Института микробиологии АН РУз, д.б.н

E-mail: tgulyatova@gmail.com

На основе рецензии доцента Ташкентского химико-технологического института, к.н.б Хасанова Х.

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND UREASE INHIBITING ACTIVITY OF FUNGI ISOLATED FROM *ALOE VERA*

Annotation

In this study we have researched urease inhibiting activity of 13 endophytic fungi derived from plant *Aloe vera*. Extracts of endophytic isolates AV5L (88,1%), AV6L (88,0%), AV4L (60%) and AV8R (63%) from plant *Aloe vera* demonstrated great inhibiting activity concerning urease. For comparison, leaf extract of *Aloe vera* revealed moderate inhibiting activity (50%), that concede to the major researched fungi. The standard urease inhibitor thiourea demonstrated the highest level of inhibition (94%). The strains that demonstrated the highest inhibitory activity against urease were tested for phytochemical activity. Flavonoid, terpenoids, tannins, cardiac glycosides and peptides were revealed in those endophyte extracts. The presence of these classes of compounds indicates the potential of these strains as sources of biologically active substances responsible for the inhibition of urease. The results confirm the promising use of endophytic isolates of *Aloe vera*, which have significant potential as a source of natural urease inhibitors.

Key words: endophytic fungi, plant *Aloe vera*, inhibitory activity, phytochemical composition.

ALOE VERA O'SIMLIGIDAN AJRATIB OLINGAN ENDOFIT ZAMBURUG'LARINING FITOKIMYOVIY TAHLILI VA UREAZA INGIBIRLOVCHI FAOLIYATI

Annotatsiya

Ushbu tadqiqotda *Aloe vera* o'simligidan ajratib olingan 13 ta endofit zamburug'larning ureazani ingibirlovchi faolligi tekshirildi. *Aloe vera* o'simligining AV5L (88,1%), AV6L (88,0%), AV4L (60%) va AV8R (63%) endofit izolatlarining ekstraktlarini o'rganish va ularning ureazaga nisbatan yuqori ingibitorlik faolligi ko'rsatildi. Taqqoslash uchun, *Aloe vera* barglari ekstrakti o'rta ingibitorlik faolligini ko'rsatdi (50%). Standart ureaza ingibitori tiokarbamid eng yuqori ingibitorlik darajasini ko'rsatdi (94%). Ushbu birikmalar sinflarining mavjudligi ushbu shtammlarning ureazani ingibirlash uchun ma'sul bo'lgan biologik faol moddalar manbai sifatida potensialini ko'rsatadi. Olingan natijalar tabiiy kelib chiqishi samarali ureaza ingibitorlari manbalari sifatida muhim salohiyatga ega bo'lgan *Aloe vera* endofit izolatlaridan foydalanish istiqbollarini tasdiqlaydi.

Kalit so'zlar: endofit zamburug'lar, *Aloe vera* o'simligi, ingibitorlik faolligi, fitokimyoviy tarkibi.

ФИТОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И УРЕЗОИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОФИТНЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ *ALOE VERA*

Аннотация

В данном исследовании была проведена оценка уреазоингибирующей активности 13 штаммов эндофитных грибов, выделенных из растения *Aloe vera*, с целью предварительного скрининга их потенциала в качестве источников природных ингибиторов уреазы. Экстракты эндофитных изолятов AV5L (88,1%), AV6L (88,0%), AV4L (60%) и AV8R (63%) растения *Aloe vera*, показали их высокую ингибирующую активность в отношении уреазы. Для сравнения, экстракт листьев *Aloe vera* проявил умеренную ингибиторную активность (50%), что уступает большинству исследованных эндофитов. Стандартный ингибитор уреазы-тиомочевина показал максимальный уровень ингибирования (94%). Штаммы, проявившие наибольшую ингибирующую активность в отношении уреазы, были подвергнуты качественному фитохимическому анализу. В экстрактах эндофитов выявлены флавоноиды, терпеноиды, танины, сердечные гликозиды и пептиды. Наличие указанных классов соединений свидетельствует о потенциале этих штаммов как источников биологически активных веществ, ответственных за ингибирование уреазы.

Ключевые слова: эндофитные грибы, растение *Aloe vera*, ингибиторная активность, фитохимический состав.

Введение. Ингибиторы уреазы представляют собой важный класс соединений, способных подавлять активность фермента уреазы, катализирующего гидролиз мочевины с образованием аммиака и углекислого газа. Уреаза является широко распространенным ферментом, присутствующим у бактерий, растений и грибов. Она играет ключевую роль в биохимических процессах, связанных с обменом азота [1]. Согласно ряду исследований, ингибиторы уреазы обладают потенциалом в лечении заболеваний, сопровождающихся повышенным уровнем аммиака в организме, таких как язвенная

болезнь желудка и гастрит [2,3]. Кроме того, в сельском хозяйстве они применяются для предотвращения потерь азота, что способствует повышению эффективности использования удобрений [4]. В последние годы наблюдается рост интереса к природным ингибиторам уреазы, в частности, экстрактам растений и метаболитам эндофитных грибов, которые обладают антибактериальной и антиоксидантной активностью [5,6].

Литературный обзор. *Aloe vera* - это многолетнее растение, которое широко известно своими лечебными и косметическими свойствами. Растение используется в народной медицине на протяжении тысячелетий благодаря своим биологически активным соединениям, таким как флавоноиды, сапонины, полисахариды, витамины и аминокислоты. Эти вещества обуславливают антиоксидантные, противовоспалительные, антисептические и ранозаживляющие свойства растения, что делает его эффективным средством для лечения различных заболеваний кожи, а также улучшения общего состояния организма. Интерес к *Aloe vera* возрастает не только из-за его свойств, но и благодаря разнообразию микроорганизмов, которые ассоциируются с этим растением [7].

Исследования эндофитных микроорганизмов, обитающих в тканях *Aloe vera*, выявили более 20 различных родов, включая несколько ранее неописанных видов. В частности, Yadav и соавт. (2015) выделили эндофитные грибы из *Aloe vera*, обладающие выраженной антифунгальной активностью и способностью продуцировать ферменты, что свидетельствует о высоком биотехнологическом потенциале этих микроорганизмов [8]. Ранее Bhagobaty и Joshi (2011) сообщили о выделении из тканей *Aloe vera* эндофитных грибов, богатых фенольными и флавоноидными соединениями, что подтверждает их высокую метаболическую активность и перспективность в фармакологии [9].

Однако, несмотря на разнообразие метаболитов и их биоактивные свойства, в литературе недостаточно информации о наличии ингибиторов уреазы среди эндофитов *Aloe vera*. Эти данные подтверждают необходимость дальнейших исследований для выявления потенциала эндофитных микроорганизмов и их метаболитов в качестве ингибиторов уреазы.

В связи с этим целью настоящей работы стало выделение эндофитных грибов, ассоциированных с *Aloe vera*, и изучение ингибирующей активности их вторичных метаболитов в отношении уреазы с целью оценки перспектив использования эндофитов *Aloe vera* как основы для разработки новых лекарств, а также для создания экологически безопасных препаратов для применения в сельском хозяйстве.

Материалы и методы. 1. Объектом исследования являлись эндофитные грибы, выделенные из листьев и корней растения *Aloe vera* произрастающего в Ташкенте.

2. **Выделение изолятов эндофитных грибов.** Корни, листья растения стерилизовали этанолом, гипохлоритом натрия и перманганатом калия, с различной длительностью экспозиции частей растений. После обработки дезинфектантами в течении 1-3 минут и промывки стерильной водой, каждый сегмент растения асептически измельчали на кусочки размером не более 0,5 см и помещали в чашки Петри с агаризованной средой Чапека-Докса, содержащей хлортетрациклин в концентрации 50 мг/мл и сульфат стрептомицина в концентрации 250 мг/мл для подавления роста бактериальной микрофлоры. Чашки инкубировали в течении 7-14 дней при температуре 28°C. Последние промывные воды также засевали на чашки Петри с агаризованной средой Чапека-Докса из расчета 100 мкл на чашку. Выросшие грибные изоляты пересевали на среду Чапека-Докса, не содержащую антибиотики [10].

3. **Культивирование изолятов эндофитных грибов.** Культивирование выделенных эндофитов проводили методом глубинной ферментации (ГФ) на картофельно- декстрозной среде на качалке при 180 об/мин, температуре 28°C в течение 7 суток в колбах Эрленмейера объемом 0,5 дм³ и 1 дм³ [29]. Питательную среду засевали или споровым, или мицелиальным инокулюмом. Для получения суспензии спор производили смыв с агарового косячка со средой Чапека-Докса полностью спорулировавшей культуры физ. раствором, содержащим 2% Tween-20, и доводили до концентрации спор 1×10^7 в мл с помощью камеры Горяева. Посев споровым инокулюмом осуществляли из расчета 5% инокулюма от объема среды культивирования. Для получения мицелиального инокулюма колбы с 50 мл среды Чапека-Докса инокулировали суспензией 1×10^7 спор/мл и культивировали на качалке при 180 об/мин, температуре 28°C в течение 3 суток. Посев мицелиальным инокулюмом осуществляли также из расчета 5% инокулюма от объема среды культивирования. Выросшую биомассу культур отделяли центрифугированием при 6 тыс. об/мин и хранили при -4°C. При выборе питательных сред для глубинного культивирования использовали картофельно-декстрозную среду (г/л): Картофель - 200 г, декстроза - 20 г, вода дистиллированная - до 1000 мл, pH 6-6,5 [11].

4. **Экстракция вторичных метаболитов из биомассы.** Вторичные метаболиты выделяли из биомассы эндофитных грибов по методу Hazalin [12].

5. **Определение качественного состава экстрактов.** Качественный состав соединений в экстрактах эндофитных грибов определяли фитохимически по Prabhavathi с сотр. [13] с использованием специфических цветных реакций на основные группы природных соединений. О наличии той или иной группы соединений судили по изменению окраски, появлению мути или выпадению осадка.

6. **Количественное определение ингибирующей активности экстрактов в отношении уреазы.** Измерение активности ингибирования уреазы в этилацетатном экстракте строилось на определении аммиачного продукта по индофенольному методу Weatherburn, 1967 [14].

Статистический анализ. Все эксперименты были проведены в 3-х кратной повторности. Результаты выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с использованием t-критерий Стьюдента. Значения достоверно отличаются от показателя контрольного варианта при $P < 0,05$.

Выводы и рекомендации. *Aloe vera* широко распространено в регионах с субтропическим климатом, включая территорию Узбекистана. В рамках настоящего исследования объектом послужили растения *Aloe vera*, собранные на территории города Ташкента. Для выделения эндофитных микроорганизмов использовали предварительно стерилизованные образцы листьев и корней. В результате микробиологического анализа было получено 13 изолятов эндофитных грибов.

Целью последующего этапа исследования являлась оценка биотехнологического потенциала полученных изолятов, в частности их способности продуцировать соединения с ингибирующей активностью в отношении фермента уреазы, а также проведение фитохимического анализа вторичных метаболитов.

Культивирование эндофитных грибов осуществляли в жидкой картофельно-декстрозной среде (PDB). Для экстракции вторичных метаболитов использовали этилацетат, которым обрабатывали биомассу. Полученные экстракты были исследованы на ингибиторную активность в отношении уреазы *in vitro* с использованием спектрофотометрического метода. В качестве субстрата применялась мочевины, а источником фермента служила уреазы из Jack bean-*Canavalia ensiformis*.

Результаты анализа показали, что практически все экстракты продуцируют метаболиты, которые в разной степени ингибируют активность уреазы.

В целом ингибирующая активность уреазы экстрактов всех изолятов варьировала в диапазоне — от 1,9% до 88,1%, при этом ингибирование выше 60% наблюдалось у 4 из 13 изолятов: AV6L (88,0%), AV8R (63%), AV5L (88,1%) и AV4L (60%). Экстракт из листьев *Aloe vera* проявил умеренную ингибиторную активность, составив 50%, что ниже, чем у большинства исследованных эндофитных штаммов. Стандартный ингибитор уреазы тиомочевина показал максимальный уровень ингибирования 94%, что подтверждает его высокую эффективность (рис.1)

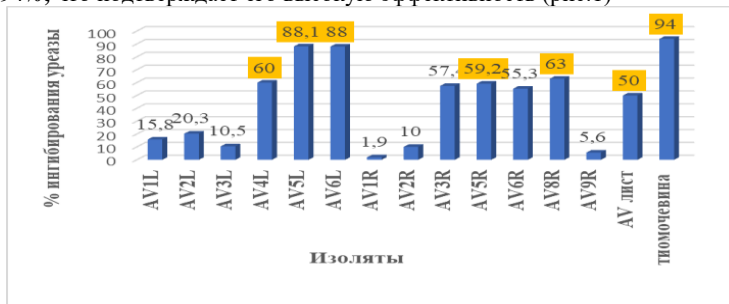


Рис.1. Ингибиторная активность экстрактов внутриклеточных метаболитов эндофитных грибов, выделенных из *Aloe vera*

Для предварительного определения химической природы ингибиторных соединений, обнаруженных в исследуемых штаммах эндофитных грибов, был проведен фитохимический скрининг этилацетатных экстрактов вторичных метаболитов изолятов AV8R (63%), AV4L AV5L, AV6L и AV лист. (Таблица 1).

Таблица 1

Фитохимический состав экстрактов эндофитов

№	Фитохимические компоненты	AV лист	AV8R	AV4L	AV5L	AV6L
1	Алкалоиды	-	-	-	-	-
2	Флавоноиды	+	-	+	+	-
3	Терпеноиды	+	+	+	+	+
4	Сапонины	-	-	-	-	-
5	Танины	+	-	-	+	-
6	Фенолы	-	-	-	-	-
7	Гликозиды	+	+	+	+	+
8	Антрахиноны	-	-	-	-	-
9	Пептиды	+	-	+	+	+

«+» - указывает на наличие вещества, «-» - указывает на отсутствие вещества

Полученные результаты фитохимического скрининга указывают на то, что высокая ингибирующая активность изолятов AV5L, AV6L, AV лист по отношению к уреазе, обусловлена присутствием таких биоактивных классов соединений, как флавоноиды, танины, терпеноиды, сердечные гликозиды и пептиды. Ранее эти группы соединений неоднократно описывались как эффективные ингибиторы уреазы, что подтверждается литературными данными [15].

Наличие сердечных гликозидов и пептидов может также свидетельствовать о дополнительной фармакологической значимости исследуемых метаболитов. Полученные результаты фитохимического скрининга указывают на то, что высокая ингибирующая активность изолятов AV5L, AV6L и AV-лист по отношению к уреазе обусловлена присутствием таких биоактивных классов соединений, как флавоноиды, танины, терпеноиды и пептиды. Эти группы соединений известны своей способностью ингибировать уреазу, что подтверждается результатами ряда научных исследований. В частности, флавоноиды обладают мощными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, а также способны ингибировать активность различных ферментов, включая уреазу [16]. Танины, благодаря своим адсорбирующим и связывающим свойствам, также продемонстрировали ингибирующую активность против уреазы в ряде исследований [17]. Терпеноиды, известные своими антимикробными и противовоспалительными эффектами, также способны оказывать ингибирующее воздействие на уреазу, нарушая её активность [18]. Пептиды, в свою очередь, проявляют антимикробную активность и могут взаимодействовать с активным центром уреазы, препятствуя её функционированию.

Таким образом, биоактивные соединения, выявленные в изолятах *Aloe vera*, могут объяснять их высокую ингибирующую активность в отношении уреазы и подтверждают перспективность дальнейших исследований для разработки препаратов на основе этих соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anuradha Balasubramanian, Karthe Ponnuraj. Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *Mol.Biol.*2010Jul16;400(3):274-83. doi:0.1016/j.jmb. 2010.05.009. Epub 2010 May 13.
2. A.E, Ajadi, A.K.Ajjolakewu, T.A.Sorunke, M.M.Suleiman, S.AAyoola and O.O Abdulai. Therapeutic Potential of Secondary Metabolites from Endophytic Fungi in Biotechnology and Medicine. *Nig.J.Pure and Appl.Sci.*Vol. 37 (Issue 1,2024) e-ISSN 2756-4045
3. Alvarez, M., et al. (2018). *Peptides as Urease Inhibitors: Current Progress and Future Directions*. *Peptide Science*, 108(4), 1-7. DOI: 10.1002/peps.23721

4. Dominika Matczuk, Anna Siczek. Effectiveness of the use of urease inhibitors in agriculture: a review/ International Agrophysics, 2021,35,197-208.
5. Iwona Konieczna, Paulina Arnowiec, Marek Kwinkowski, Beata Kolesinska, Jastuna Fraczyk, Zbigniew Kaminski and Wieslaw Kaca. Bacterial Urease and its role in long lasting human diseases. Current protein and peptide science, 2012, vol13, No.8
6. J.P.Zhang, L.X.Chen, H. B.Lu,W.T. Lin "Urease Inhibitory Activity of Alkaloids from Fusarium and Aspergillus Endophytic Fungi" Phytochemistry. Volume:75,Issue:4,P.87-94,Year: 2017.
7. Ibrahim Kahramonoglu, Chuying Chen, Jinyin Chen and Chunpeng Wan. Chemical Constituents, Antimicrobial Activity, and Food Preservative Characteristics of Aloe vera Gel. Agronomy 2019, 9 (12), <https://doi.org/10.3390/agronomy9120831>
8. Rahul Yadav,Ajay Veer Singn, Samiksha Joshi and Manish Kumar. Antifungal and enzyme activity of endophytic fungi isolated from *Ocimum* and *Aloe vera*. Africa journal of Microbiology research. Vol.9(29), 2015.
9. Bhagobaty, R.K., & Joshi, S.R. (2011). Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Centella asiatica* and *Aloe vera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(3), 104–109.
10. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu R.S., and Hess W. M., "Taxol from Pestalotiopsis microspora, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*," Microbiology (Reading), vol. 142 (Pt 2), pp. 435–440, Feb. 1996, doi: 10.1099/13500872-142-2-435.
11. Wang, X., Min, C., Ge, M., & Zuo, R. (2013). An Endophytic Sanguinarine-Producing Fungus from *Macleaya cordata*, *Fusarium proliferatum* BLH51. *Current Microbiology*, 68(3), 336–341. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0482-7>.
12. Hazalin N.A., Ramasamy K., Lim S.M., Wahab I.A., Cole A.Lj, Majeed A.A.: Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and alternative medicine*. 2009, 9:46.
13. Prabhavathi RM, Prasad MP, Jayaramu M. Studies on Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of *Cissus quadrangularis*. *Adv Appl Sci Res* 2016; 7:11-17.
14. Weatherburn M.W. (1967). Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Analytical Chemistry*, 39(8),971-974.
15. Seyedan, A., et al. (2019). *Flavonoids as Natural Urease Inhibitors: A Review of Mechanisms and Therapeutic Potential. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 1-13. DOI: 10.1080/14756366.2019.1582493.
16. Shabnam Mahernia, Kowsar Bagherzadeh, Faraz Mojab and Massoud Amanlou. Urease Inhibitory Activities of some Commonly Consumed Herbal Medicines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, January 2014.
17. Shokrzadeh, M., et al. (2021). *Tannins as Urease Inhibitors: A Review on Their Mechanisms and Therapeutic Potential. Phytotherapy Research*, 35(2), 389-404. DOI: 10.1002/ptr.6785
18. Shokrzadeh, M., et al. (2021). *Tannins as Urease Inhibitors: A Review on Their Mechanisms and Therapeutic Potential. Phytotherapy Research*, 35(2), 389-404. DOI: 10.1002/ptr.6785