

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА МИКРОКРИСТАЛЛИЗАЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЛИШАЙНИКОВ

© 2022

Касьянова А.П., Корчиков Е.С.

Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва
(г. Самара, Российская Федерация)

Аннотация. В статье приводятся фотографии кристаллов фумарпротоцетраровой, эверновой, усниновой, солориновой, оливеторовой, перлатоловой, физодаловой, салациловой, тамноловой кислот и атранорина, полученных из ацетоновых вытяжек лишайников. Форма кристаллов специфична для каждого вещества, а их количество, размеры и степень агрегации зависят от концентрации в растворе. Звёздчатые кристаллы имеют атранорин, салациновая и эверновая кислоты, причём наиболее крупные у атранорина, а самые мелкие – у салациновой кислоты; палочковидные разветвлённые кристаллы образуют солориновая и фумарпротоцетраровая кислоты, более широкие у первой, но более длинные у второй; овальная форма кристаллов у более крупной тамноловой и мелкой и узкой перлатоловой кислоты; усниновая, физодаловая и оливеторовая кислоты образуют уникальные формы кристаллов – призматическую, игольчатую разветвлённую и перистую соответственно. Наблюдать кристаллы вторичных метаболитов лишайников удаётся при обычном световом микроскопе под объективом $\times 40$ без иммерсионного масла. Для последующей сравнительной оценки количества веществ необходимо стандартизировать навеску изучаемого таллома лишайника, использовать строго фиксированный объём ацетона, просматривать не менее четырёх сторон высохшей капли на предметном стекле и в баллах выявлять их суммарное количество, отмечая наличие, степень разветвления и агрегации кристаллов в конгломераты.

Ключевые слова: фумарпротоцетраровая кислота; эверновая кислота; усниновая кислота; солориновая кислота; оливеторовая кислота; перлатоловая кислота; физодаловая кислота; салациловая кислота; тамноловая кислота; атранорин; кристаллы вторичных метаболитов лишайников.

MICROCRYSTALLIZATION METHOD USE FOR ASSESSING THE CONTENT OF SECONDARY METABOLITES OF LICHENS

© 2022

Kasyanova A.P., Korchikov E.S.

Samara National Research University (Samara, Russian Federation)

Abstract. The paper presents photographs of crystals of fumarprotocetraric, evernic, usnic, solorinic, olivetoric, perlatolinic, physodalic, salazinic, tannolic acids and atranorin obtained from their acetone extracts of lichens. The shape of the crystals is specific to each substance, and their number, size and degree of aggregation depend on the concentration in the solution. Stellate crystals have atranorine, salazinic and evernic acids, with atranorine having the largest and salazinic acid having the smallest; rod-shaped branched crystals form solorinic and fumarprotocetraric acids, wider in the first, but longer in the second; the oval shape of crystals in the larger tannolic and small and narrow perlatolinic acid; usnic, physodalic and olivetoric acids form unique crystal forms – prismatic, needle branched and pinnate, respectively. It is possible to observe crystals of secondary metabolites of lichens with a conventional light microscope under a $\times 40$ lens without immersion oil. For the subsequent comparative assessment of the amount of substances, it is necessary to standardize the suspension of the studied lichen thallus, use a strictly fixed volume of acetone, view at least four sides of the dried drop on the slide and identify their total number in points, noting the presence, degree of branching and aggregation of crystals into conglomerates.

Keywords: fumarprotocetraric acid; evernic acid; usnic acid; solorinic acid; olivetoric acid; perlatolinic acid; physodalic acid; salazinic acid; tannolic acid; atranorin; crystals of secondary metabolites of lichens.

Химический состав лишайников очень специфичен, так как для лишайников в целом и для каждого из их компонентов (микобионта и фотобионта) в отдельности характерен особый тип метаболизма [1, р. 33]. Органические вещества, встречающиеся в лишайниках, по своей природе подразделяются на две основные группы: первичные и вторичные вещества (метаболиты). Первичные вещества – это белки, аминокислоты, полисахариды, витамины и прочие органические соединения, которые, будучи синтезированы фотобионтом или микобионтом, находятся внутри их клеток – часто они растворимы в воде. Подобные соединения встречаются также, например, у свободноживущих грибов, водорослей и высших растений [2, с. 173]. Среди полисахаридов преобладает лихенин – полимер, мономером которого является D-глюкоза [3, с. 603]. Вторичные лишайниковые ве-

щества синтезируются микобионтом, хотя углерод, необходимый для их синтеза, грибной компонент лишайника получает от синтезирующего органические соединения фотобионта. Вторичные вещества находятся в талломе лишайника экстрацеллюлярно, накапливаясь на поверхности грибных гиф. Обычно они нерастворимы в воде [2, с. 173]. К настоящему времени выявлено более 600 вторичных метаболитов лишайников [4, р. 42].

Концентрация вторичных лишайниковых веществ не всегда остаётся постоянной, так как она зависит от воздействия абиотических факторов, таких как влажность, свет, температура, время года и т.п. [5, с. 76]. Так, например, было отмечено, что концентрация усниновой кислоты в талломах *Cladonia arbuscula*, *Cladonia stellaris* и *Flavocetraria cucullata* зависит от времени года [6, с. 48]: наибольшее её ко-

личество накапливается в июне, а наименьшее – в декабре. Встречаются и наблюдения, когда наибольшая концентрация выявляется в период весна – осень, но наименьшее содержание остаётся неизменным и отмечается зимой [7, с. 89]. Конечно, здесь следует учитывать, что в талломах лишайников содержание воды колеблется в самых широких пределах, в связи с чем довольно сложно проводить исследования по изучению химического состава данных организмов. Тем не менее есть указания в литературе, что наибольшее содержание вторичных лишайниковых метаболитов наблюдается в местах с частым выпадением осадков, например, в условиях лесного пояса [8, с. 79]. Предполагается, что при повышенной влажности фотобионт начинает активно работать, и в связи с этим интенсивно синтезируются в лишайнике вторичные метаболиты. Опираясь на вышеприведённые данные, можно сказать, что вторичные метаболиты более интенсивно образуются при температуре от +1°C до +12°C и в хорошо освещённых местах, например, в светлохвойной тайге [5, с. 73] или лесах с достаточно высокой разреженностью древостоя. Было выявлено также, что вторичные лишайниковые вещества не накапливаются с возрастом лишайника, что они являются соединениями, которые активно используются в их обмене веществ [8, с. 81].

Для качественного и количественного определения вторичных метаболитов лишайников чаще всего используют тонкослойную хроматографию, включая высокоэффективную тонкослойную хроматографию и высокоэффективную жидкостную хроматографию [9, р. 281], хотя исторически самыми первыми применялись методы нанесения химических реагентов непосредственно на слоевище лишайника (точечные тесты) для получения характерных изменений цвета и микрохимические методы [10, р. 117]. Несмотря на то, что микрохимические методы менее чувствительны, чем методы хроматографии, которые стали уже классическими в лихенологии, особенно после работ Ч.Ф. и У.Л. Калберсонов (по: [9, р. 281]), они довольно просты, дешёвы, более быстрые и не требуют специального оборудования. Однако имеющиеся в литературе образцы формы кристаллов (например, [11, р. 43–44; 12, р. 124–125]) получены из экстрактов с использованием в качестве растворителя глицерин-ледяную уксусную кислоту, глицерин-этанол-воду, глицерин-этанол-орто-толуидин и другие, причём нигде не указывается ацетон, хотя он широко используется для первичной экстракции вторичных лишайниковых метаболитов при тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии [9, р. 284, 285].

Целью данной работы является описание кристаллов некоторых вторичных метаболитов лишайников из ацетоновых вытяжек для последующего их использования при оценке влияния экологических факторов на их накопление в талломах.

В качестве объектов исследования были использованы следующие виды лишайников: *Bryocaulon divergens*, *Cladonia phyllophora*, *Cladonia stellaris*, *Dactylina ramulosa*, *Flavocetraria nivalis*, *Solorina crocea*, *Stereocaulon alpinum*, *Thamnolia vermicularis* из Чукотского автономного округа и *Evernia prunastri*, *Parmelia sulcata* из Самарской области.

Методы исследования

В первом эксперименте получали чистые вторичные метаболиты лишайников методом тонкослойной хроматографии. Для этого измельчали образцы и до-

бавляли 1 мл ацетона. Через неделю наносили ацетоновый экстракт лишайника на пластины для тонкослойной хроматографии, помещали на 10 минут в пары ледяной уксусной кислоты, а потом в хроматографическую камеру с сольвентом С (толуол и уксусная кислота в соотношении 17:3) [11, р. 51]. Для идентификации веществ использовали облучатель хроматографический с $\lambda = 254$ нм и $\lambda = 380$ нм, а также обработку 10% раствором серной кислоты с последующим прогреванием при температуре +110°C. Зная Rf-фактор и цвет вещества после обработки серной кислотой, а также интенсивность и характер его свечения в ультрафиолетовых лучах, можно определить вид химического соединения [11]. Чтобы получить чистое вещество, все эксперименты осуществляли в двукратной повторности, при этом половину пластин использовали для идентификации веществ, а другую оставляли без обработки серной кислотой, на ней только определяли вещества под ультрафиолетом. После всего этого скальпелем снимали силикагель с чистым веществом в пробирку Эппендорфа и экстрагировали 4–5 каплями чистого ацетона.

Во втором эксперименте получали кристаллы чистых вторичных метаболитов лишайников из ацетоновых экстрактов. Капилляром брали каплю экстракта из пробирки Эппендорфа и перемещали на чистое предметное стекло. После высыхания ацетона предметное стекло просматривали в микроскоп Микромед-6 на наличие кристаллов при увеличении $\times 280$ и фотографировали с помощью программы TopView 3.7.27.74.

Результаты и их обсуждение

Нам удалось идентифицировать и выделить в чистом виде 10 вторичных лишайниковых метаболитов: фумарпроцеттаровую, эверновую, усниновую, солориновую, оливеторовую, перлатоловую, физодаловую, салациловую, тамноловую кислоты и атранорин, с которыми и проводили все дальнейшие исследования.

Оказалось, что разные вторичные метаболиты кристаллизуются в разных частях капли экстракта при высыхании растворителя (ацетона) на предметном стекле. Так, у самого края капли следует искать кристаллы эверновой кислоты и атранорин; на периферии капли, но не у самого края – салациновой кислоты; в центре капли обычно образуются кристаллы фумарпроцеттаровой, усниновой, физодаловой, солориновой, тамноловой, оливеторовой и перлатоловой кислот.

Форма кристаллов специфична для каждого вещества и представлена на рисунке 1, а их количество, размеры и степень агрегации зависят от концентрации в растворе, что в свою очередь определяется экологическими условиями произрастания, возраста особей и других факторов. Характеристика выявленных десяти веществ приведена в таблице 1.

Выявлено, что звёздчатые кристаллы имеют атранорин, салациновая и эверновая кислоты, причём наиболее крупные у атранорина, а самые мелкие – у салациновой кислоты. Палочковидные разветвлённые кристаллы образуют солориновая и фумарпроцеттаровая кислоты, более широкие у первой, но более длинные у второй. Овальная форма кристаллов у более крупной тамноловой и мелкой, и узкой перлатоловой кислоты. Усниновая, физодаловая и оливеторовая кислоты образуют уникальные формы кристаллов – призматическую, игольчатую разветвлённую и перистую соответственно.

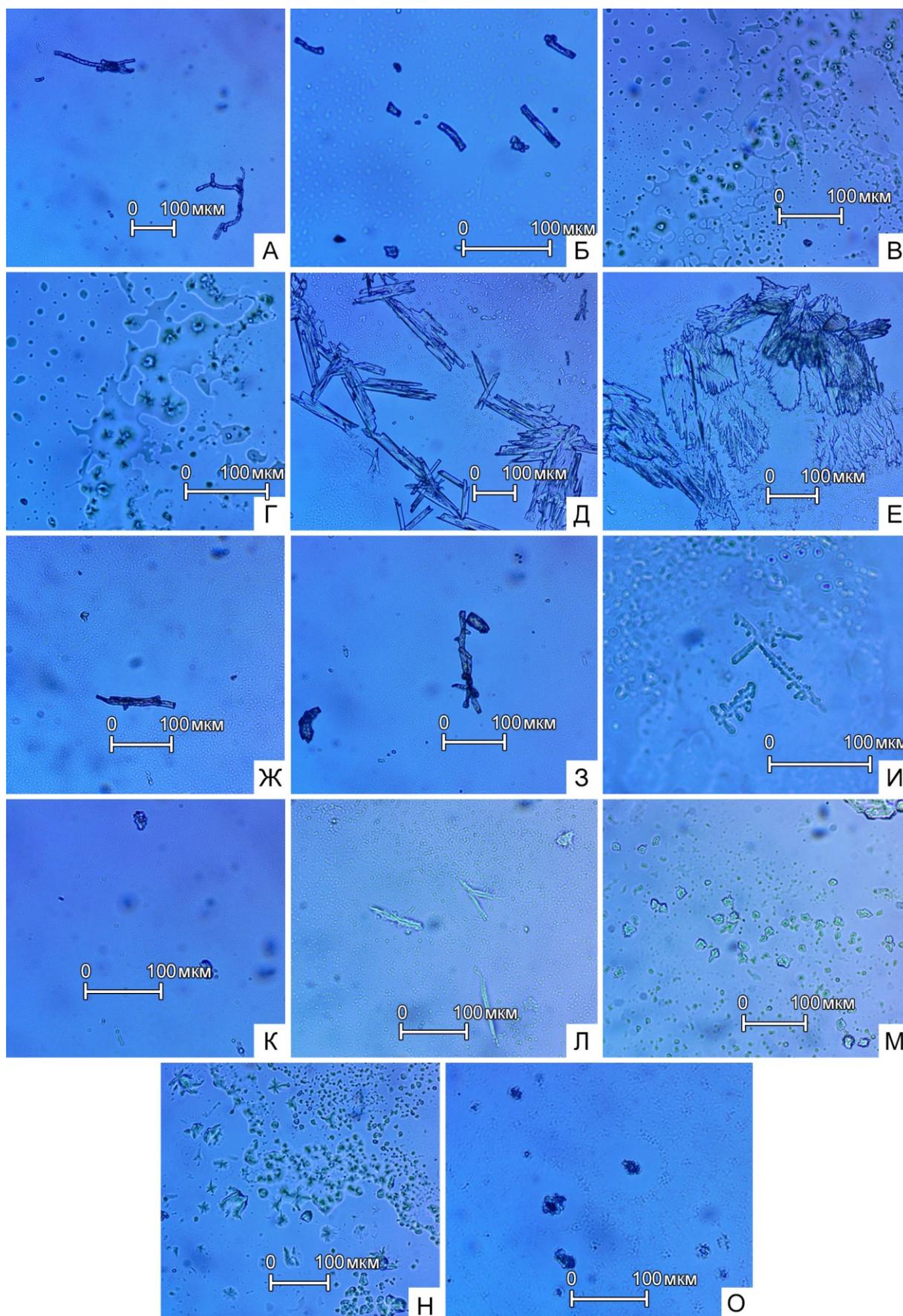
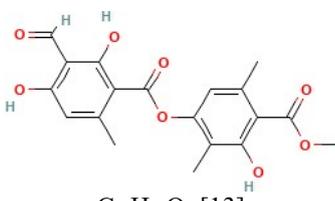
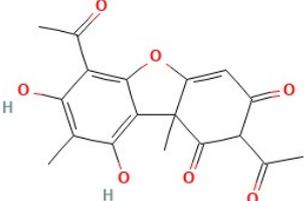
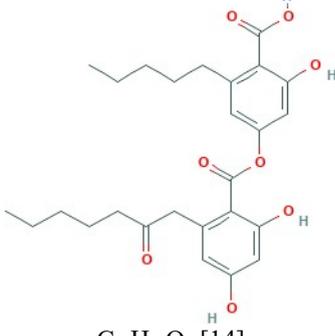
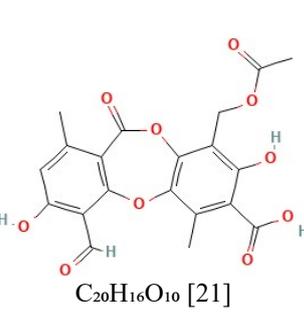
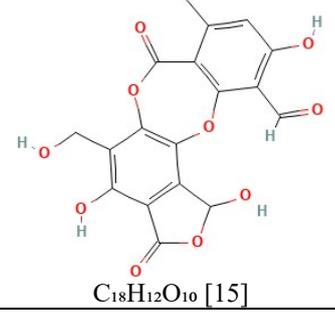
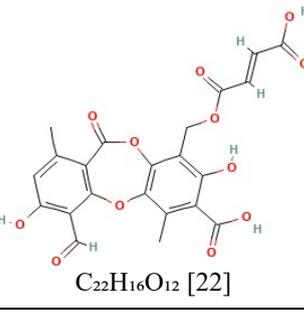
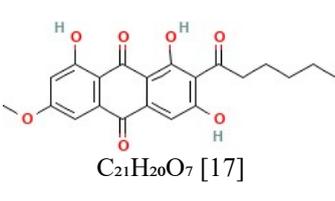
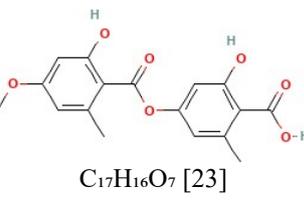
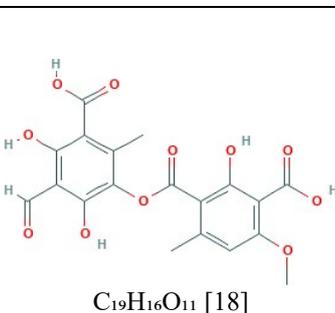
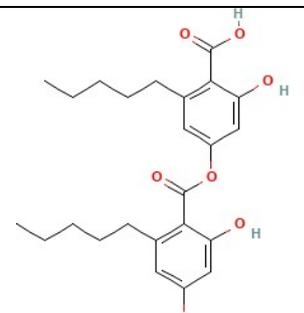


Рисунок 1 – Кристаллы вторичных метаболитов лишайников, полученные из ацетоновых экстрактов:
 А, Б – фумарпротоцеттаровая кислота из *Cladonia phyllophora*; В, Г – эверновая кислота из *Evernia prunastri*;
 Д, Е – усниновая кислота из *Flavocetraria nivalis*; Ж, З – солориновая кислота из *Solorina crocea*;
 И – оливеторовая кислота из *Bryocaulon divergens*; К – перлатоловая кислота из *Cladonia stellaris*;
 Л – физодаловая кислота из *Dactylina ramulosa*; М – салациловая кислота из *Parmelia sulcata*;
 Н – атранорин из *Stereocaulon alpinum*; О – тамноловая кислота из *Thamnolia vermicularis*

Таблица 1 – Характеристика некоторых вторичных метаболитов лишайников

Название	Структурная и молекулярная формулы	Характеристика кристаллов из ацетоновых экстрактов	Температура плавления	Название	Структурная и молекулярная формулы	Характеристика кристаллов из ацетоновых экстрактов	Температура плавления
Атранорин	 <chem>C19H18O8</chem> [13]	Кристаллы звёздчатой формы 17–51 мкм в диаметре	+195°C [13]	Усниновая кислота	 <chem>C18H16O7</chem> [19]	Кристаллы призматические 27–268 × 12–115 мкм	+204°C [20]
Оливеторовая кислота	 <chem>C26H32O8</chem> [14]	Кристаллы перистой формы 52–135 × 35–70 мкм	–	Физодаловая кислота	 <chem>C20H16O10</chem> [21]	Кристаллы игольчатой формы 70–123 × 7–11 мкм	+245°C [16, с. 54]
Салациновая кислота	 <chem>C18H12O10</chem> [15]	Кристаллы звёздчатой формы 11–21 мкм в диаметре	+260...+280°C [16, с. 55]	Фумаритотетраэровая кислота	 <chem>C22H16O12</chem> [22]	Палочковидные разветвлённые кристаллы 35–237 × 5–10 мкм	+250...+260°C [16, с. 55]
Солориновая кислота	 <chem>C21H20O7</chem> [17]	Палочковидные разветвлённые кристаллы 56–168 × 10–20 мкм	–	Эверновая кислота	 <chem>C17H16O7</chem> [23]	Кристаллы звёздчатой формы 12–23 мкм в диаметре	+172...+174°C [16, с. 54]
Тамноловая кислота	 <chem>C19H16O11</chem> [18]	Кристаллы широкооформальной формы 11–33 × 6–27 мкм	–	Перлатоловая кислота	 <chem>C25H32O7</chem> [24]	Кристаллы овальной формы 25–26 × 15–16 мкм	+108...+110°C [25, с. 1027]

Наблюдать кристаллы вторичных метаболитов лишайников удаётся при обычном световом микроскопе под объективом ×40 без иммерсионного масла. Для последующей сравнительной оценки количества веществ необходимо, во-первых, стандартизировать навеску изучаемого таллома лишайника; во-вторых, использовать строго фиксированный объём ацетона как

универсального растворителя химических соединений, образующихся в лишайниках; в-третьих, просматривать не менее четырёх сторон высохшей капли на предметном стекле и в баллах выявлять их суммарное количество; в-четвёртых, отмечать наличие, степень разветвления и агрегации кристаллов в конгломераты.

Выводы

Таким образом, зная внешний вид вторичного метаболита лишайника, можно довольно быстро идентифицировать, накапливает ли в конкретных экологических условиях таллом данное вещество или нет, а по степени агрегации кристаллов и их количеству можно оценить концентрацию данного метаболита, что позволит выявить факторы, влияющие на метаболизм лишайников.

Благодарности

Авторы благодарят к.б.н., старшего научного сотрудника ФИЦ биотехнологии РАН Самылину Ольгу Сергеевну за сбор образцов лишайников с территории Чукотского автономного округа.

Список литературы:

1. Anshakova V.V. Mechanochemical technology for producing of biocomplexes based on lichen material // Russian Journal of Biopharmaceuticals. 2011. Vol. 3, № 5. P. 32–41.
2. Флора лишайников России: биология, экология, разнообразие, распространение и методы изучения лишайников / под ред. М.П. Андреева, Д.Е. Гимельбранта. М.; СПб.: Товарищество науч. изд. КМК, 2014. 400 с.
3. Муравьёва Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: учебник. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2002. 656 с.
4. Brodo I.M., Sharnoff S.D., Sharnoff S. Lichens of North America. New Haven; London: Yale University Press, 2001. 795 p.
5. Прокопьев И.А., Порядина Л.Н., Филиппова Г.В., Шеин А.А. Содержание вторичных метаболитов в лишайниках сосновых лесов Центральной Якутии // Химия растительного сырья. 2016. № 3. С. 73–78.
6. Прокопьев И.А., Шеин А.А., Филиппова Г.В., Филиппов Э.В., Шашурин М.М., Гладкина Н.П. Годовая динамика содержания усниновой кислоты в талломах лишайников родов *Cladonia* и *Flavocetraria*, произрастающих в Центральной Якутии // Химия растительного сырья. 2015. № 4. С. 45–49. DOI: 10.14258/jcrpm.201504767.
7. Гладкина Н.П., Прокопьев И.А., Шеин А.А., Филиппова Г.В. Сезонные изменения содержания усниновой кислоты в талломах некоторых лишайников, произрастающих в условиях Центральной Якутии // Новые материалы и технологии в условиях Арктики: мат-лы междунар. симпозиума. Якутск: Центр научного знания «Логос», 2014. С. 85–89.
8. Слонов Т.Л., Слонов Л.Х. Лишайниковые кислоты и фитомасса избранных видов лишайников // Изве-

стия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2010. № 5. С. 79–82.

9. Protocols in lichenology: culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring / ed. by I.C. Kranner, R.P. Beckett, A.K. Varma. Heidelberg: Springer, 2002. 580 p. DOI: 10.1007/978-3-642-56359-1.
10. Lichen biology. Second edition / ed. by T.H. Nash. New York: Cambridge University Press, 2008. 502 p.
11. Orange A., James P.W., White F.J. Microchemical methods for the identification lichens. London: British Lichen Society, 2010. 104 p.
12. Hale M.E. The biology of lichens. London: Edward Arnold, 1974. 181 p.
13. Atranorin [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68066>.
14. Olivetoric acid [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/591238>.
15. Salazinic acid [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5320418>.
16. Храменкова О.М. Лишайники *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Cladonia arbuscula* и *Xanthoria parietina* как источники веществ с антибактериальной активностью // Бюллетень Брянского отделения Русского ботанического общества. 2017. № 1 (9). С. 50–58.
17. Anthraquinone, 2-hexanoyl-1,3,8-trihydroxy-6-methoxy- [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/99653>.
18. Thamnic acid [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4316933>.
19. Usnic acid [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5646>.
20. Usnic acid [Internet] // Environmental Protection Agency. <https://comptox.epa.gov/dashboard/dtxid0040123>.
21. Physodalic acid [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5489369>.
22. Fumarprotocetraric acid [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5317419>.
23. Evernic acid [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10829>.
24. Perlatolinic acid [Internet] // PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/174857>.
25. Прокопьев И.А., Шаварда А.Л., Филиппова Г.В., Шеин А.А. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения содержания вторичных метаболитов лишайников // Журнал аналитической химии. 2017. Т. 72, № 11. С. 1025–1031. DOI: 10.7868/s004445021711007x.

Информация об авторе(-ах):	Information about the author(-s):
<p>Касьянова Анастасия Павловна, студент биологического факультета; Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва (г. Самара, Российская Федерация). E-mail: anastasiakasyanova22@mail.ru.</p> <p>Корчиков Евгений Сергеевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии, ботаники и охраны природы; Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва (г. Самара, Российская Федерация). E-mail: evkor@inbox.ru.</p>	<p>Kasyanova Anastasia Pavlovna, student of Biological Faculty; Samara National Research University (Samara, Russian Federation). E-mail: anastasiakasyanova22@mail.ru.</p> <p>Korchikov Evgeniy Sergeevich, candidate of biological sciences, associate professor of Ecology, Botany and Nature Protection Department; Samara National Research University (Samara, Russian Federation). E-mail: evkor@inbox.ru.</p>

Для цитирования:

Касьянова А.П., Корчиков Е.С. Использование метода микрокристаллизации для оценки содержания вторичных метаболитов лишайников // Самарский научный вестник. 2022. Т. 11, № 4. С. 47–51. DOI: 10.55355/snv2022114106.