

wyniku hodowli na podłożu standardowym, jakim był agar maltozowy o składzie: 20 g ekstraktu „Malto”, 25 g agaru, 1000 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Hodowlę szczepów prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 250 cm<sup>3</sup>, w objętości 100 cm<sup>3</sup> płynnej pożywki zawierającej 2 g wyciągu słodowego „Malto” firmy Warta w Śremie, w 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Po trzech dniach wzrostu prowadzonego metodą wstrząsania (70 wahań/min) dodawano do kultury 10 mg cholesterolu rozpuszczonego w 1 cm<sup>3</sup> acetonu. Wszystkie próby wykonywano w trzech powtórzeniach wobec próby kontrolnej – kultury bez cholesterolu. Czas transformacji w temperaturze 24°C i przy wyjściowym pH pożywki ok. 4,6 trwał 7 dni. Po tym okresie ekstrahowano produkty reakcji chloroformem, a otrzymane wyciągi po osuszeniu siarczanem sodu zagęszczano do objętości ok. 1 cm<sup>3</sup> i badano metodą chromatografii cienkowsarstwowej. Tą drogą spośród 20 badanych szczepów wyselekcjonowano 4, w przypadku których stwierdzono na chromatogramach występowanie dodatkowych plam, nieobecnych w kontroli:

*Botrytis cinerea* Persoon, a – szczep wyizolowany ze ściółki leśnej lasu liściastego typu grądu (nr 92 w kolekcji Zakładu), b – szczep wyizolowany z przewodu pokarmowego pluskwiaka *Pyrrhocoris apterus* (nr 441 w kolekcji Zakładu), c – szczep pochodzący z pędów słonecznika (nr 443 w kolekcji Zakładu),

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, szczep pochodzący z nasion słonecznika (nr 442 w kolekcji Zakładu).

### Chromatografia cienkowsarstwowa

Chromatogramy rozwijano na płytkach powleczonych żelazem krzemionkowym firmy Merck (DC-Fertigplatten-Kieselgel) w eksperymentalnie dobranym układzie eter naftowy: aceton 5:1 w czasie ok. 1 godziny, wobec prób kontrolnych oraz roztworu wzorcowego cholesterolu. Chromatogramy wywoływano stężonym kwasem siarkowym z 5% dodatkiem metanolu i oglądano w świetle UV.

W toku dalszych prac wykonano również chromatografię cienkowsarstwową w układzie benzen:octan etylu 9:1 (Clau de 1966) oraz bibulową w układzie kwas octowy: woda 84:16 (Copius Peereboom i in. 1961).

### Pasażowanie szczepów

Próby zwiększenia aktywności grzybów względem cholesterolu przeprowadzono drogą wielokrotnego pasażowania szczepów na pożywkę maltozowo-agarową z dodatkiem dobrego eksperymentalnie stężenia cholesterolu, wynoszącego 0,5% oraz czasu trwania jednego pasażu ustalonego na 16 dni przy

temperaturze 24°C. Oznaczenia suchej masy grzybni dokonano na 10-dniowych kulturach.

### Analiza kolorymetryczna

Przebieg reakcji kontrolowano oznaczając kolorymetrycznie ilość cholesterolu w wyciągach ekstrakcyjnych metodą opartą na reakcji Liebermanna-Burcharda (Jerzmanowska 1967), w której chloroformowy (2 cm<sup>3</sup>) roztwór cholesterolu w obecności bezwodnika kwasu octowego (2 cm<sup>3</sup>) i stężonego kwasu siarkowego (0,1 cm<sup>3</sup>) daje różowoczerwone zabarwienie, przechodzące poprzez błękitne w zielone. Ekstynkcję mierzono po 10 minutach od chwili wkroplenia kwasu siarkowego, na kolorymetrze „Spekol”, przy długości fali  $\lambda = 550$  nm, używając jako odnośnika wyciągu chloroformowego z hodowli bez cholesterolu. Wyniki odczytywano z krzywej wzorcowej. Łączną masę metabolitów w poszczególnych wyciągach chloroformowych oznaczano metodą analizy wagowej wg F.P.IV.

### Chromatografia kolumnowa

Chromatografię kolumnową wykonano nanosząc zagęszczone wyciągi chloroformowe ekstraktów pochodzących na kolumnę wysokości 23 cm, o średnicy 2,5 cm, wypełnioną żelazem krzemionkowym firmy Merck do chromatografii kolumnowej o średnicy oczek 100/200. Fazą ruchomą był układ eter naftowy: aceton 5:1. Frakcje objętości ok. 2 cm<sup>3</sup> odbierano do momentu stwierdzenia braku steroidów w wycieku.

### Analiza spektralna

Wyizolowany produkt biotransformacji poddano analizie widma w podczerwieni (Pye Unicam SP 1000) i ultrafiolecie (Specord UV/VIS), porównując otrzymane wykresy z analogicznymi wykresami wzorcowego cholesterolu.

### DYSKUSJA WYNIKÓW

Na podstawie identyfikacji morfologicznej i fizjologicznej zaklasyfikowano wykorzystane do badań szczepy do rodzajów *Fusarium*, *Curvularia*, *Neurospora*, *Botrytis* i *Sclerotinia*. Wstępne badania screeningowe wyłoniły spośród 20 trzy szczepy *Botrytis cinerea* Persoon (nr 92, 441, 443) oraz szczep *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Nr 442), w przypadku których chromatografia cienkowarstwowa w układzie eter naftowy:aceton 5:1 wykazała obecność dodatkowej plamy metabolitu o  $R_f = 0,46$  ( $R_f$  cholesterolu = 0,5). Plamy takiej

Tabela 1 - Table 1

Wzrost badanych szczepów grzybów rodzaju Botrytis i Sclerotinia  
na podłożach o różnej zawartości cholesterolu  
Growth of the tested fungal from the Genera Botrytis and Sclerotinia  
on medium with different cholesterol contents

Numer szczepu Number of strain	92				441				442				443			
	3	5	10	15	3	5	10	15	3	5	10	15	3	5	10	15
0	+++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++	+++	++++	++++	++	+++	++++	++++
0,1	-	+++	++++	++++	-	++	+++	++++	+	++	+++	++++	++	++	+++	++++
0,2	-	++	+++	++++	-	++	+++	++++	+	++	+++	++++	+	+	++	++
0,5	-	++	++	+++	-	-	+	++	+	+	++	+++	+	+	++	+++
0,6; 0,7;	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,8; 0,9;	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stopień wzrostu kultur określano przyjmując średnią z trzech powtórzeń, według następującej skali:  
Growth of cultures was determined as mean values of three experiments, using the following scale:

++++ wzrost bardzo dobry - very good growth  
+++ wzrost dobry - good growth  
++ słaby wzrost - weak growth  
+ ślady wzrostu - traces of growth  
- brak wzrostu - no growth

nie uzyskaliśmy na chromatogramach kontrolnych z hodowli wymienionych szczepów bez cholesterolu.

Przeprowadzona analiza kolorymetryczna wykazała rosnące w czasie ubytki cholesterolu w mieszaninach poreakcyjnych, utrzymujące się na poziomie ok. 2-3% dla szczepów nr 441, 442, 443, a wyższe, ok. 12% dla szczepu nr 92.

Analiza wagowa wykazała istnienie w mieszaninach poreakcyjnych związków nie dających reakcji Liebermanna-Burcharda. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że użyty jako substrat cholesterol w toku reakcji mógł ulec przemianie do pochodnej nie spełniającej warunków reakcji Liebermanna-Burcharda.

Małą wydajność biotransformacji uzyskaną w efekcie badań screeningowych starano się zwiększyć poprzez wielokrotne pasażowanie wyselekcjonowanych szczepów na pożywce o dużej zawartości cholesterolu. W pierwszej fazie doświadczenia określono graniczną dawkę, na której badane szczepy jeszcze rosną. Hodując szczepy na pożywce z dodatkiem rosnących stężeń cholesterolu (0, 0,1, 0,2, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0%) stwierdzono, że stężenie 0,5% było graniczne do uzyskania normalnego, chociaż mocno opóźnionego wzrostu grzybni wszystkich 4 szczepów (tab. 1). Przyjmując to stężenie jako dawkę stałą, przeprowadzono w podanych uprzednio warunkach dziewięć pasażów, otrzymując w efekcie kultury grzybów, które rosły ciągle na podłożu zawierającym 0,5% cholesterolu przez 128 dni. Najlepsze efekty uzyskano w wypadku szczepu *Botrytis cinerea* nr 92, u którego w wyniku pasażowania stwierdzono zwiększenie wydajności procesu transformacji cholesterolu do ok. 22%.

Ponieważ pozostałe 3 szczepy pracowały w dalszym ciągu ze śladową wydajnością, sprawdzono jak wpływa cholesterol na wzrost badanych szczepów,

Tabela 2 - Table 2

Wpływ cholesterolu na suchą masę grzybni badanych szczepów z rodzaju *Botrytis* i *Sclerotinia* /wartości średnie z trzech powtórzeń/  
The influence of cholesterol on dry weight of tested fungal strains from the genera *Botrytis* and *Sclerotinia* /mean value of three experiments/

Numer szczepu Number of strain		92		441		442		443	
Sucha masa Dry weight		mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
% cholesterolu % of cholesterol	0	559,4	100,0	174,7	100,0	550,7	100,0	314,5	100,0
	0,01	198,6	35,5	105,3	60,3	127,1	23,0	161,7	51,4
	0,015	156,8	28,0	79,2	45,3	106,7	19,4	95,3	30,3
	0,02	108,2	19,3	77,0	44,3	62,6	11,4	81,7	25,9

określając suchą masę grzybni. Wyeliminowano w ten sposób przypadek, w którym szczep pracowałby z wydajnością większą niż *Botrytis cinerea* nr 92, a niższe wyniki byłyby spowodowane znacznym zahamowaniem wzrostu grzybni przez cholesterol. W tym celu do płynnej pożywki dodawano 0,01%, 0,015%, 0,02% dawki cholesterolu jako nie powodujące wydłużenia czasu hodowli (tab. 2). Najwrażliwszy okazał się szczep *Sclerotinia sclerotiorum* nr 442, a najlepiej znosił cholesterol w pożywce szczep *Botrytis cinerea* nr 441. Stwierdzono, że wrażliwość badanych szczepów na cholesterol wyrażona przyrostem suchej masy nie wiąże się u badanych szczepów z wydajnością reakcji. W toku dalszej pracy skoncentrowano się więc na badaniach nad szczepem nr 92, przy pomocy którego otrzymano taką ilość produktów biotransformacji, jaka pozwoliła na określenie jego właściwości chemicznych.

Chromatografia cienkowarstwowa (C l o u d e 1966) wykazała obecność w mieszaninie poreakcyjnej związku, którego plama maskowania była przez plamę cholesterolu. Chromatografia bibułowa (C o p i u s P e e r e b o m i n. 1961) w układzie umożliwiającym rozdział ponad 30 naturalnych steroli i niektórych ich estrów, wykazała istnienie metabolitu o  $R_f = 0,75$  ( $R_f$  cholesterolu = 0,33). W obu przypadkach prowadzenie hodowli w obecności cholesterolu powodowało zmniejszenie liczby metabolitów własnych szczepu, co sugeruje stymulujące działanie steroidu.

W wyniku chromatografii kolumnowej zebrano 30 frakcji po ok. 2 cm<sup>3</sup>, z których — jak wykazała chromatografia cienkowarstwowa — frakcje od nr 20 do 25 zawierały interesujący nas produkt biotransformacji. Z połączonych wyciągów usunięto rozpuszczalnik organiczny, otrzymując żółtą, nieco mazistą substancję ze śladami kryształów, rozpuszczalną w eterze naftowym, acetonie i chloroformie, nierozpuszczalną w wodzie.

Analiza IR otrzymanej substancji wykazała obecność grupy ketonowej (1750 cm<sup>-1</sup>, 1310 cm<sup>-1</sup>) przy równoczesnym zaniku pasma odpowiadającego grupie hydroksylowej (1050 cm<sup>-1</sup>). Analiza UV/VIS wykazała maksimum absorpcji produktu  $\lambda = 261$ .

#### WNIOSKI

Stwierdzono, że wyselekcjonowane w toku badań screeningowych trzy szczepy grzybów rodzaju *Botrytis* i jeden szczep rodzaju *Sclerotinia* zdolne są do biotransformacji cholesterolu z wydajnością rzędu 2-12%. Wydajność procesu zależy od indywidualnych właściwości szczepów stosowanych w badaniach, nie wiąże się natomiast z przyrostem masy grzybni. Możliwe jest zwiększenie wydajności biotransformacji cholesterolu drogą wielokrotnego pasażowania szczepu na pożywce o dużym stężeniu tego związku, jak wykazuje przykład

szczepu *Botrytis cinerea* nr 92. Wyniki analizy spektralnej pozwalają twierdzić, że efektem biotransformacji jest utlenienie grupy hydroksylowej przy pierścieniu A do grupy ketonowej, prawdopodobnie prowadzące do przekształcenia cholesterolu w cholest-4-en-3 $\beta$ -on. |

Praca wykonana na zlecenie Wielkiego Programu Badawczego Ochrona Środowiska Polit. Wrocław i sfinansowana z Międzyresortowego Problemu Podprogramu: Systemy biodegradowujące ich molekularne podstawy i technologia. Symbol podprogramu MR-II-15, grupa tematyczna 0401.

#### SUMMARY

Three *Botrytis* spp. and one *Sclerotinia* sp. strains were able to transform cholesterol with productivity range 2 - 12%. The activity varied depending on the used strain of the species and was not connected with an increment of dry weight. The repeated passaging of *Botrytis cinera* strain 92 on medium with a high cholesterol content increased the yield of biotransformation. The obtained product has a keto group lacks a hydroxy group, and appears to be cholest-4-en-3 $\beta$  one.

#### LITERATURA

- Achremz A. A., Titov J. A., 1970, Steroidy i mikroorganizmy, Izd. Nauka, Moskwa.  
Capek A., Hanč O., Tadra M., 1966, Microbial Transformations of Steroids, Academia, Praga.  
Claude J. R., Beaumont J. L., 1966, J. Chromat. 21, 191.  
Copius Peereboom J.W., Ross J.B., Beckes H. W., 1961, J. Chromat. 5, 500.  
Jerzmanowska Z., 1967, Substancje roślinne – metody wyodrębniania, PWN, Warszawa.