

Г.И. Горбацевич
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ
ВОДНО-СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТА ТРУТОВИКА БЕРЕЗОВОГО

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь,
каф.радиационной химии и химико-фармацевтических технологий*

Резюме. В работе изучена антимикробная активность фракций водно-спиртового экстракта трутовика березового. Малополярные фракции, полученные с использованием хлороформа в качестве экстрагента продемонстрировали наибольшую антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* (6,7±0,8 мм), *Serratia marcescens* (14,9±0,4 мм) и *Bacillus subtilis* (9,8±0,5 мм), сопоставимую с действием используемых в медицине антибиотиков. В соответствии с литературными данными, антимикробный эффект может быть обусловлен тритерпеновыми кислотами ланостанового ряда (полипореновые кислоты А и С, 3β-ацетокси-16α-гидрокси-24-оксо-5α-ланоста-8-ен-21-овая кислота) и антибиотика пиптамина. Полученные результаты полезны для разработки технологии получения очищенных экстрактов трутовика березового, перспективных в качестве потенциальных антимикробных средств.

Ключевые слова: трутовик березовый, водно-спиртовой экстракт, антимикробная активность.

Актуальность. Трутовик берёзовый (*Piptoporus betulinus*) широко используется в народной медицине, самые ранние свидетельства его использования человеком датируются 5300 годами назад [1]. Считалось, что чай из трутовика берёзового обладает успокаивающими и укрепляющими иммунитет свойствами. В Чехии чай из трутовика берёзового использовали для лечения рака прямой кишки и заболеваний желудка, в Северной Америке и Сибири – в качестве антисептического и обезболивающего средства. Трутовик берёзовый традиционно применялся в качестве противопаразитарного и противомикробного, а также кровоостанавливающего средства [1, 2].

Плодовые тела трутовика берёзового содержат широкий спектр БАВ: стероиды (эргостерол, перекись эргостерола, холекальциферол), тритерпеновые кислоты ланостанового ряда (полипореновые кислоты А и С, (25S)-(+)-12α-гидрокси-3α-малонилокси-24-метилланоста-8,24(31)-диен-26-овая кислота), тритерпеноиды (бетулиновая кислота, бетулин), полисахариды, фенольные кислоты (сирингиновая, 3,4-дигидрофенилуксусная), индольные соединения (L-триптофан, 5-гидрокси-L-триптофан, 5-метилтриптамин), высшие жирные кислоты (насыщенные: каприновая кислота, лауриновая кислота, миристиновая кислота, пентадекановая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота; ненасыщенные: миристолеиновая кислота, пальмитолеиновая кислота, олеиновая кислота, линолевая кислота), антибиотики (пиптамин) [1, 3].

Современные фармакологические исследования подтвердили антибактериальную, противопаразитарную, противовирусную, противовоспалительную, противоопухолевую, нейропротекторную и иммуномодулирующую активность экстрактов *P. betulina* [4]. В связи со стремительным развитием резистентности

микроорганизмов к известным классам антибиотиков, поиск потенциальных антимикробных агентов и препаратов природного происхождения является актуальной задачей, а учитывая широкий спектр фармакологической активности *P. betulina* с одновременно низким уровнем токсичности его экстрактов [5], фитохимическое и фармакологическое изучение этого гриба весьма перспективно.

Целью работы является получение фракций водно-спиртового экстракта *Piptoporusbetulinus* разной полярности и изучение их антимикробной активности.

Материалы и методы исследования. Плодовые тела трутовика березового были заготовлены с березы в ноябре 2021 г. в окрестностях д. Дукора, Пуховичского района, Минской области Республики Беларусь. Сырье заготавливали в сухую солнечную погоду, сушили при температуре 40 °С.

Сырой водно-спиртовой экстракт получали в аппарате Сокслета с использованием измельченного (2000) сырья и 70% (об/об) этанола в течение 24 часов. Полученный экстракт упаривали в вакууме (40-50°С) на роторном испарителе и высушивали в вакуумном эксикаторе до содержания влаги не более 5%. Готовый продукт хранили в герметично закрытой таре в холодильнике при температуре не выше 4 °С.

Для изучения антимикробной активности экстракт подвергали фракционированию. Для этого 1,0 г сухого экстракта диспергировали в 5 мл этилового спирта и полученный раствор медленно приливали к 50 мл воды при перемешивании, а затем образовавшуюся суспензию последовательно взбалтывали 3 порциями по 20 мл петролейного эфира (ПЭ), хлороформа (Хл) и этилацетата (ЭА). Органические фракции отделяли, обезвоживали безводным натрия сульфатом и отгоняли растворитель под вакуумом.

Антимикробную активность изучали диффузно-луночным методом [6]. В качестве тест-микроорганизмов были выбраны грамположительные (*Staphylococcus aureus* ATCC 15442, *Bacillus subtilis* 26 D, *Enterococcus faecium* SF68), грамотрицательные (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella Paratyphi A* ATCC 9150, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6538) бактерии, дрожжевые (*Candida albicans* ATCC 14053, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642) и плесневые (*Trichoderma harzianum* ВИЗР-18) грибы. Уровень антимикробной активности оценивали по радиусу зон ингибирования. В качестве стандартов использовали диски с антибиотиками (левомецетин, 20 мкг, азитромицин, 20 мкг, доксициклин, 20 мкг).

Полученные результаты и их обсуждение. Радиусы зон ингибирования роста тест-штаммов микроорганизмов полученными фракциями экстракта трутовика березового приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Радиусы (мм) зон ингибирования роста тест-штаммов микроорганизмов фракциями экстракта трутовика березового (ПЭ – петролейный эфир, Хл – хлороформ, ЭА – этилацетат, В – вода, Л – левомицетин, А – азитромицин, Д – доксициклин)

Фракция / микроорганизм	ПЭ	Хл	ЭА	В	Л	А	Д
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 15442	6,7±0,8	7,8±0,5	2,1±0,4	–	5,1±0,5	3,2± 0,3	12,0±0,8
<i>Bacillus subtilis</i> 26 D	1,2±0,4	–	2,7±0,7	–	4,2±0,6	2,1± 0,1	9,3±0,4
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	–	–	–	–	5,3±0,1	2,4± 0,2	4,3±0,2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	–	–	–	–	6,0± 0,1	2,1± 0,2	5,1± 0,2
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	–	–	–	–	7,0± 0,2	2,3± 0,5	5,4± 0,3
<i>Salmonella Paratyphi</i> A ATCC 9150	–	–	–	–	4,5± 0,7	4,1± 0,7	6,1± 0,2
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	–	–	–	–	6,7± 0,7	3,1± 0,6	6,1± 0,5
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	–	–	–	–	6,5± 0,1	2,5± 0,6	5,8± 0,2
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	–	–	–	–	7,0± 0,1	4,1± 0,9	4,9± 0,6
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	–	–	–	–	6,0± 0,5	2,7± 0,8	5,8± 0,2
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	–	–	–	–	5,0± 0,1	4,1± 0,5	6,1± 0,7
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	0,9±0,1	3,6±0,3	4,2±0,6	–	4,0± 0,6	1,6± 0,3	4,5± 0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 6538	–	–	–	–	12,0± 0,6	11,5± 0,5	11,3± 0,9
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642	–	–	–	–	–	–	–
<i>Trichoderma harzianum</i> ВИЗР-18	–	–	–	–	–	–	–

Трутовик берёзовый обладает высокой антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 15442 и *Bacillus subtilis* 26 D, а также грамотрицательной бактерии *Serratia marcescens*. При этом наибольшие зоны ингибирования наблюдаются для неполярных фракций, полученных с использованием хлороформа и петролейного эфира (таблица 1): так, диаметр зон ингибирования *Staphylococcus aureus* фракциями ПЭ и Хл составляют 6,7±0,8 мм и 7,8±0,5 мм соответственно. Это связано с содержанием в фракциях ПЭ и Хл антимикробных агентов, таких как тритерпеновые кислоты ланостанового ряда (полипореновые кислоты А и С, 3β-ацетокси-16α-гидрокси-24-оксо-5α-ланоста-8-ен-21-овая кислота [1, 5, 7]) и антибиотик пиптамин [1, 2]. Средний уровень активности проявляют также ЭА фракции экстракта трутовика березового, который может определяться присутствием в их составе фенольных соединений ((*E*)-2-(4-гидрокси-3-метил-2-бутенил)-гидрохинон, сиригиновая кислота, 3,4-дигидрофенилуксусная кислота) и смолистых веществ [3]. Водный остаток, полученный после последовательного фракционирования органическими растворителями и содержащий преимущественно полисахариды [8] не проявляет заметной антимикробной активности.

Отметим, что все исследуемые фракции экстракта *Piptoporusbetulinus* не продемонстрировали значимой ингибирующей активности в отношении бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (за исключением *Serratiamarcescens* ATCC 14756), дрожжевых (*Candidaalbicans* ATCC 14053) и плесневых (*Aspergillusbrasiliensis* ATCC 9642, *Trichodermaharzianum* ВИЗР-18) грибов.

Выводы. Высокий уровень антимикробной активности малополярных фракций экстракта *Piptoporusbetulinus* в отношении *Staphylococcus aureus* ($6,7 \pm 0,8$ мм), *Serratia marcescens* ($14,9 \pm 0,4$ мм) и *Bacillus subtilis* ($9,8 \pm 0,5$ мм) открывает перспективы для разработки очищенных лекарственных препаратов этого гриба с высоким содержанием действующих веществ, а также целенаправленной разработки технологии их выделения.

Литература.

1. Alresly, Zeyad. Chemical and Pharmacological Investigations of Fomitopsis betulina (formerly: Piptoporus betulinus) and Calvatia gigantea / Zeyad Alresly. – Inauguraldissertation. – Greifswald, 2019. – 241 p.
2. Grienke, Ulrike. European medicinal polypores – A modern view on traditional uses / Ulrike Grienke, Margit Zöll [et al.] // Journal of Ethnopharmacology. – 2014. – Vol. 154, № 3. – P. 564 – 583.
3. Sułkowska-Ziaja, Katarzyna. Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of Fomitopsis betulina / Katarzyna Sułkowska-Ziaja, Agnieszka Szewczyk [et al.] // Molecular Biology Reports. – 2018. – Vol. 45. – P. 2535 – 2544.
4. Pleszczyńska, Małgorzata. Fomitopsis betulina (formerly Piptoporus betulinus): the Iceman's polypore fungus with modern biotechnological potential / Małgorzata Pleszczyńska [et al.] // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 2017. – Vol. 33. – P. 83 – 94.
5. Alresly, Zeyad. Bioactive Triterpenes from the Fungus Piptoporus betulinus / Zeyad Alresly, Ulrike Lindequist [et al.] // Records of natural products. – 2016. – Vol. 10, № 1. – P. 103 – 108.
6. Balouiri M. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review / M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibsouda // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – P. 71.
7. Kawagishi, Hirokazu. Novel Hydroquinone as a Matrix Metallo-proteinase Inhibitor from the Mushroom, Piptoporus betulinus / Hirokazu Kawagishi // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2002. – Vol. 66, № 12. – P. 2748 – 2750.
8. Chemical characterization and wound healing property of a β -D-glucan from edible mushroom Piptoporus betulinus / L.I. de Jesus [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – Vol. 117. – P. 1361–1366.

Abstract.

H.I. Harbatsevich

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE PIPTOPORUS BETULINUS WATER-ALCOHOL EXTRACT Belarusian State University, Minsk, Belarus

In this work, the antimicrobial activity of the Piptoporus betulinus water-alcohol extract fractions has been studied. The low-polarity fractions obtained using chloroform as an extractant demonstrated the highest antimicrobial activity against Staphylococcus aureus (6.7 ± 0.8 mm), Serratia marcescens (14.9 ± 0.4 mm) and Bacillus subtilis (9.8 ± 0.5 mm), comparable to the action of antibiotics used in medicine. In accordance with the literature data, the antimicrobial effect can be related to the triterpene acids of the lanostane series (polyporenic acids A and C, 3β -acetoxy- 16α -hydroxy- 24 -oxo- 5α -lanosta- 8 -en- 21 -oic acid) and the antibiotic piptamine. The results are useful for developing a technology for obtaining purified extracts of Piptoporus betulinus, as potential antimicrobial agents.

Keywords: Piptoporus betulinus, water-alcohol extract, antimicrobial activity.

References.

1. Alresly, Zeyad. Chemical and Pharmacological Investigations of Fomitopsis betulina (formerly:

Piptoporus betulinus) and Calvatia gigantea / Zeyad Alresly. – Inauguralsdissertation. – Greifswald, 2019. – 241 p.

2. Grienke, Ulrike. European medicinal polypores – A modern view on traditional uses / Ulrike Grienke, Margit Zöll [et al.] // Journal of Ethnopharmacology. – 2014. – Vol. 154, № 3. – P. 564 – 583.

3. Sułkowska-Ziaja, Katarzyna. Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of Fomitopsis betulina / Katarzyna Sułkowska-Ziaja, Agnieszka Szewczyk [et al.] // Molecular Biology Reports. – 2018. – Vol. 45. – P. 2535 – 2544.

4. Pleszczyńska, Małgorzata. Fomitopsis betulina (formerly Piptoporus betulinus): the Iceman's polypore fungus with modern biotechnological potential / Małgorzata Pleszczyńska [et al.] // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 2017. – Vol. 33. – P. 83 – 94.

5. Alresly, Zeyad. Bioactive Triterpenes from the Fungus Piptoporus betulinus / Zeyad Alresly, Ulrike Lindequist [et al.] // Records of natural products. – 2016. – Vol. 10, № 1. – P. 103 – 108.

6. Balouiri M. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review / M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibsouda // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – P. 71.

7. Kawagishi, Hirokazu. Novel Hydroquinone as a Matrix Metallo-proteinase Inhibitor from the Mushroom, Piptoporus betulinus / Hirokazu Kawagishi // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2002. – Vol. 66, № 12. – P. 2748 – 2750.

8. Chemical characterization and wound healing property of a β -D-glucan from edible mushroom Piptoporus betulinus / L.I. de Jesus [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – Vol. 117. – P. 1361–1366.

Сведения об авторах: Глеб Иванович Горбацевич – к. х. н., доцент кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь