

**IZOLOWANIE WTÓRNYCH METABOLITÓW POROSTOWYCH
Z PLECHY PUSTUŁKI PĘCHERZYKOWATEJ
HYPOGYMNIA PHYSODES (L.) NYL.**

**ISOLATION OF SECONDARY METABOLITES FROM THALLUS
OF *HYPOGYMNIA PHYSODES***

Grzegorz Kuropatwa

ABSTRACT

Secondary metabolites called lichen acids which are products of complex metabolic transitions occurring in lichens. Their formation is the result of symbiosis between a mycobiont and phycobiont. Cells produce carbohydrates such as ribitol, erythrol and sorbitol, which are transported to fungus cells. Secondary metabolites of lichens are classified into three groups: mevalonate group, acetate-polymalonate group and shikimate group. Thallus of *Hypogymnia Physodes* contain physodic acid and physodalic acid. Physodic acid is the depsidone occurring relatively rare in lichens, its biological activity is not well known. This acid exhibits antibiotic activity against the bacteria. Physodic acid possess properties, which inhibits enzyme activity as well, for example blocking integrase hiV-1. The aim of the research was to extract mentioned compounds and to analyze the structure of crystals of the acids in microscopic image. The method applied in the studies allowed only to isolate acids without opportunity to indicate them. Microscopic analyze of crystalline structure enabled to group them together which allowed to define precisely the chemical structure of the crystals. the type of extracted acid, its chemical structure requires further research using specialized laboratory equipment.

Słowa kluczowe: porosty, wyciągi, izolacja związków, identyfikacja, aktywność biologiczna

Key words: lichens, extracts, isolation of lichen substances, identification, biological activity

Grzegorz Kuropatwa, I Ogólnokształcące Liceum Akademickie im Janiny Kossakowskiej-Dębickiej w Kielcach, e-mail: grzesk42@gmail.com

Opiekun merytoryczny/*Guardian substantive*: dr hab. Małgorzata Anna Józwiak

Wprowadzenie

Allelopatia to jeden z typów oddziaływań międzygatunkowych. Wynika ona z możliwości wpływu związków chemicznych wytwarzanych przez organizmy na inne, niespokrewnione grupy taksonomiczne. Typy interakcji allelopatycznych mają różny charakter. Mogą to być oddziaływania bezpośrednie (wpływ kwasów porostowych na bakterie pasożytnicze rozwijające się na powierzchni plech) lub pośrednie, zachodzące w wyniku zmian chemicznych w biotopie. Różna też

jest reakcja organizmów na oddziałujące na nie związki chemiczne. Może mieć ona charakter stymulujący lub hamujący i określana jest jako allelopatia dodatnia lub ujemna (Opanowicz 2002; Latkowska i in. 2015).

Organizmami, które reagują na substancje chemiczne (alkaloidy, kwasy porostowe) wytwarzane przez inne organizmy, są mszaki, grzyby, rośliny naczyniowe, ale najbardziej liczną grupą są bakterie.

Związki chemiczne, zwane popularnie kwasami porostowymi, będące wtórnymi metabolitami, wytwarzane są przez grzyby lichenizujące, czyli porosty (Ma-

twiejuk 2007; Correche i in. 2002).

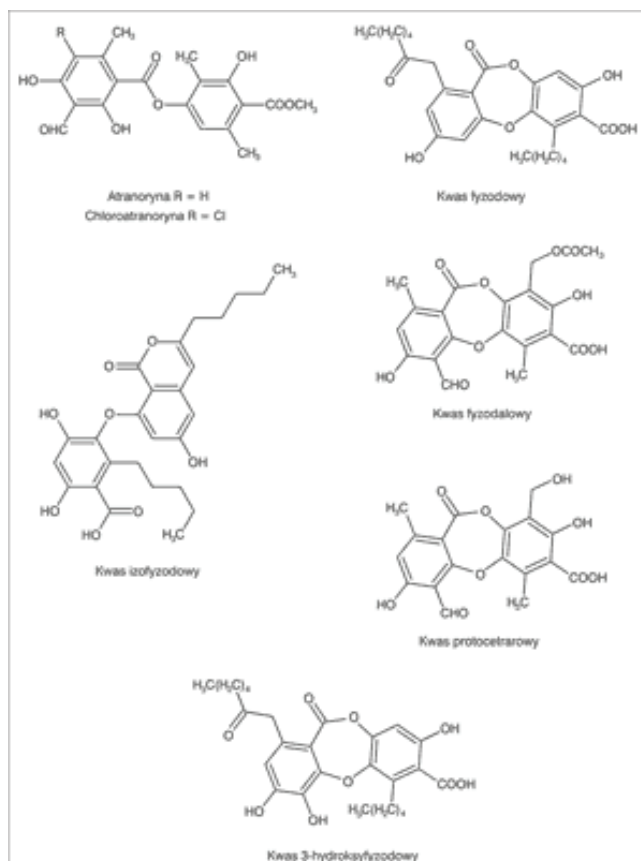
Zidentyfikowano ponad 630 tych związków, a około 60 można zobaczyć u roślin i grzybów nielichenizujących. Kwasy porostowe są wynikiem procesów metabolicznych zachodzących dzięki symbiozie między mikobiontem (grzybem) i fykobiontem (glonem). Komórki fykobionta produkują węglowodany, takie jak: rybitol, erytrytol oraz sorbitol, które następnie transportowane są do komórek grzyba (Nash 2004). Wytworzone przez porosty wtórne metabolity krystalizują na powierzchni plech. Ze względu na właściwości, budowę chemiczną i strukturę kryształów kwasy porostowe stanowią dość zróżnicowaną grupę. Wtórne metabolity porostowe nie tylko wykazują różnorodną budowę chemiczną, ale także zróżnicowane są funkcjonalnie. Proces ich powstawania zapoczątkowują komórki autotroficznego fotobionta, produkując węglowodany (cyjanobakterie glukozę, zielenice erytrytol, ribitol lub sorbitol), dopiero strzępki grzyba w wyniku złożonych procesów metabolicznych przekształcają je we wtórne metabolity porostowe (Nash 2004; Józwiak 2014).

Metabolity te nie są nierozpuszczalne w wodzie, lecz mogą być wymywane z plech porostów przez wodę, dostając się do środowiska. Wyróżniono trzy grupy tych związków. Są to kwasy porostowe należące do grupy mewalonianowej, octanowo-polimalonianowej oraz szikimianowej. Związki należące do grupy octanowo-polimalonianowej to związki aromatyczne, zbudowane z jednego, dwóch lub trzech pierścieni fenolowych, np.: depsydy, tridepsydy oraz depsydony, pochodne kwasu pikrolichenowego. Do tej grupy klasyfikowane są m.in. kwasy: lekanorowy, usniniowy i gyroforowy oraz wyższe kwasy tłuszczowe, takie jak kwas protolichechesterynowy i roceliowy. Na grupę mewalonianową składają się związki chemiczne, które powszechnie występują u roślin i grzybów. Są to seskwiterpeny, diterpeny, triterpeny, steroidy oraz karoteny. Grupę szikimianową reprezentują związki aromatyczne złożone z dwóch pierścieni fenolowych. Te substancje to kwas wulpinowy i kalicyna. W plesze pustułki pęcherzykowatej (*Hypogymnia physodes*) zidentyfikowano kwas fizodowy oraz fizodaliowy. Kora górna zawiera atranorin i chloroatranorin, rdzeń, kwas physodiowy, niewielkie ilości kwasu metylphysodiowego i kwasu trójhdroxyphysodiowego, physodaliowego i protocetrariowego (ryc. 1). Analizy określające zawartość związków w plesze *H. physodes*, zebranej na terenie Norwegii, wykazały najwyższe stężenie, które charakteryzowało kwas fizodaliowy (2,7–8,4% suchej masy) i fizodowy (3,3–5,0%), natomiast kwas protocetrarowy, a także substancje zawarte w części korowej: atranoryna i chloroatranoryna, były obecne

w znacznie mniejszej ilości (odpowiednio 0,26–0,52%; 0,14–0,43%; 0,03–0,18%) (Studzińska-Sroka, Zarabska-Bożejewicz 2016; Solhaug i in. 2009).

Kwas fizodowy stosunkowo rzadko występuje w porostach, a o jego aktywności biologicznej wiadomo niewiele. Stwierdzono jednak jego aktywność antybiotyczną. Posiada on także właściwości hamujące działanie enzymów, na przykład blokowanie integrazy hIV-1 (Boustie, Grube 2005). Testowanie właściwości kwasów porostowych bada się, działając ich ekstraktami na bakterie chorobotwórcze oraz grzyby. Bakterie wrażliwe na te związki to *Bacillus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* i *Listeria monocytogenes* oraz grzyba *Aspergillus niger* (Studzińska-Sroka, Zarabska-Bożejewicz 2016; Türk i in. 2006).

Znane są liczne źródła historyczne opisujące antywirusowe właściwościach porostowych metabolitów. Informacje te pochodzą już z ery cywilizacji egipskiej oraz chińskiej. Plechy porostów znaleziono w Egipcie



Ryc. 1 Wzory związków obecnych w plechach *Hypogymnia physodes*

Fig. 1 Chemical formula of the compounds existing in the thallus of *Hypogymnia physodes*

w wielu mumiach. Kwasy porostowe były stosowane do balsamowania zwłok z powodu swoich właściwości antybakteryjnych i przeciwgrzybiczych. Metabolity porostowe były wykorzystywane również w truciznach stosowanych na wilki oraz lisy. Dziś używa się ich do produkcji środków przeciw owadom i ślimakom. Ich antybiotyczne właściwości pierwszy raz zostały wykazane w 1944 r. (Opanowicz 2002).

Rzeczony badań nad metabolitami porostowymi spowodował wzrost zainteresowania porostami we współczesnej farmakoterapii (Vijayakumar i in. 2000; Ingólfssdóttir 2002; Müller 2001).

Celem niniejszej pracy jest skuteczne wyizolowanie kwasów porostowych z plech pustułki pęcherzykowatej, aby w toku dalszych planowanych badań wykorzystać ich właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze.

Materiały i metody

W kolbie okrągłodennej o pojemności 100 ml, zanurzonej w łaźni wodnej, umieszczono 2 g utartej w moździerzu plechy pustułki pęcherzykowatej (fot. 1), do której dodano 50 ml acetonu.

Temperatura utrzymywana w łaźni wodnej wynosiła 50–60°C (temperatura wrzenia acetonu 56,05°C). Roztwór plechy w acetonie utrzymywano w łaźni przez około 120 minut. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono do ostygnięcia, a następnie przesączono do zlewki przy pomocy szklanego lejka przez sączonej filtracyjny. Surowy produkt pozostawiono w zlewie w przewiewnym pomieszczeniu do momentu odparowania acetonu. Wtórne metabolity porostowe wykrystalizowały w postaci osadu na ścianach zlewki.

Próbki wtórnych metabolitów naniesiono na szkiełka podstawowe i obserwowano przy użyciu mikroskopu świetlnego NIKON AZ100 i zapisano obraz cyfrowo.



Fot. 1. Utarta plecha porostu (Fot. G. Kuropatwa)

Photo 1. Creamed lichen's thallus (Photo. G. Kuropatwa)

Charakterystyka obiektu badań

Porost *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. – pustułka pęcherzykowata jest to porost epifityczny, umocowany do podłoża kory pni drzew zmarszczkami kory dolnej (fot. 2). Jego pozycja systematyczna przedstawia się następująco:

Królestwo: *Fungi* – grzyby

Typ: *Ascomycetes* – workowce

Klasa: *Euascomycetes*

Podklasa: *Lecanorales*

Rząd: *Telooshistales*

Rodzina: *Parmeliaceae* – tarczownicowate

Rodzaj: *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.

Plecha tego porostu jest listkowato-rozetkowata z dychotomicznie rozgałęzionymi płatkami. W budowie wewnętrznej przewarstwiona, heteromeryczna. Układające się warstwy tworzą korę górną (strzępki grzybni), warstwę gonidialną (komórki glonów), warstwę miąższową, utworzoną z luźnie ułożonych strzępek grzybni, i warstwę kory dolnej (strzępki zwarte) tworzące chwytники. Listkowate odcinki plechy są zakończone wywiniętymi soraliami wargowymi. Znajdują się tu skupienia sorediów, ziarenkowatych lub proszkowatych organów rozmnażania wegetatywnego, złożonych z jednej lub większej liczby komórek glonów oplecionych strzępkami grzybni. Kolor plechy najczęściej jest zielonkawy lub sinzielony. Często zauważalna jest wyraźna zmiana koloru plechy od szarzielonej do intensywnie zielonej spowodowana wzrostem wilgotności otoczenia. Na powierzchni plechy występują liczne szczelinowate pęknięcia, pseudocyfele. Są to rozluźnienia górnej warstwy korowej, które ułatwiają wymianę gazową (fot. 3). W heteromerycznej budowie plechy warstwa kory górnej złożona jest z gęsto splecionych grubościennych strzępek grzyba, posiadających strukturę nibytkankową – paraplektenchymatyczną w kolorze jasnym lub bezbarwnym. Struktura grzybni kory dolnej jest rozluźniona, pojedyncze komórki otoczone są wielowarstwową grubą ścianą komórkową (Wójciak 2003).

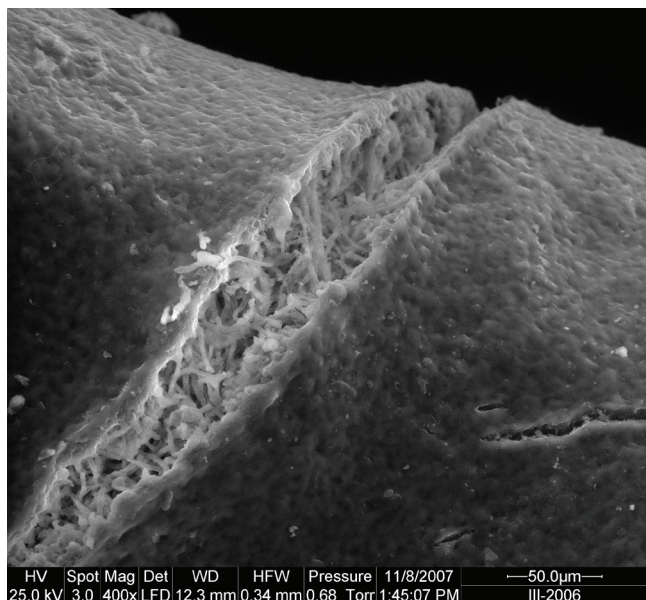
Na jej powierzchni tworzą się kompleksy polisacharydowe, precypitują kwasy organiczne oraz inne substancje porostowe (kwasy alifatyczne, depsydy, chinony, pochodne dwubenzofuranu), które osadzają się w postaci kryształków (Kranner 2002). Warstwa korowa jest wytworzona również na dolnej stronie plechy. Ma kolor brunatny. Posiada liczne zmarszczki ściśle przylegające do podłoża. Paraplektenchyma zbudowana jest z krótkich strzępek grzyba stykających się ściankami. W przekroju poprzecznym komórki grzybowe są równowymiarowe – izodiametryczne. Partne-

rem mykobiontycznym w budowie porostu jest grzybnia *Ascomycetes* (workowców), glonowym – zielenica z rodzaju *Trebouxia* sp.



Fot. 2. Pokrój zewnętrzny plechy *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. Fotografia z mikroskopu stereoskopowego (fot. M.A. Józwiak)

Photo. 2. *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. thallus photo from stereoscopic binocular microscope (Photo. M.A. Józwiak)

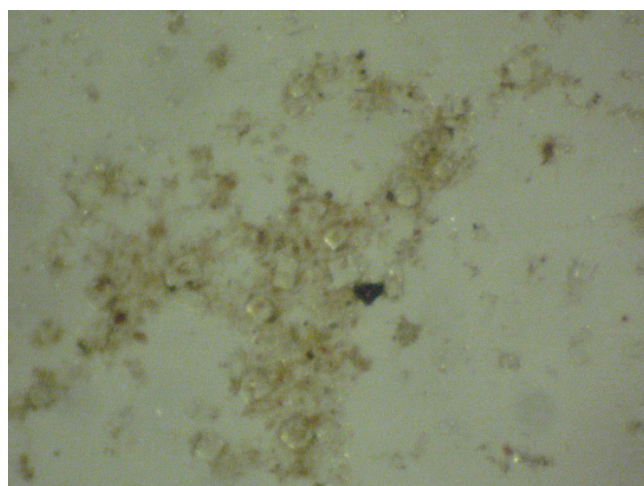
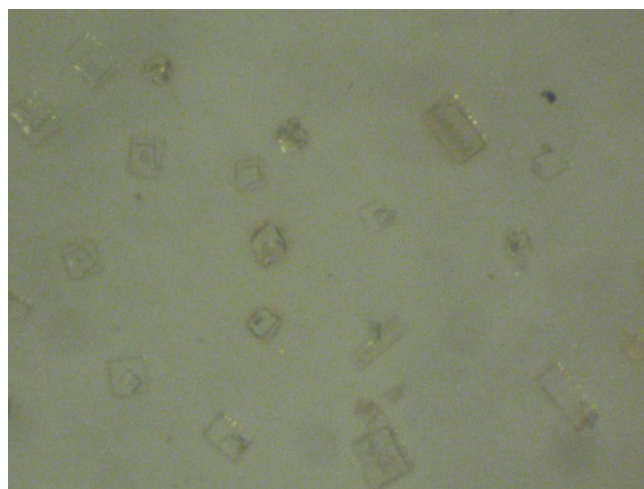
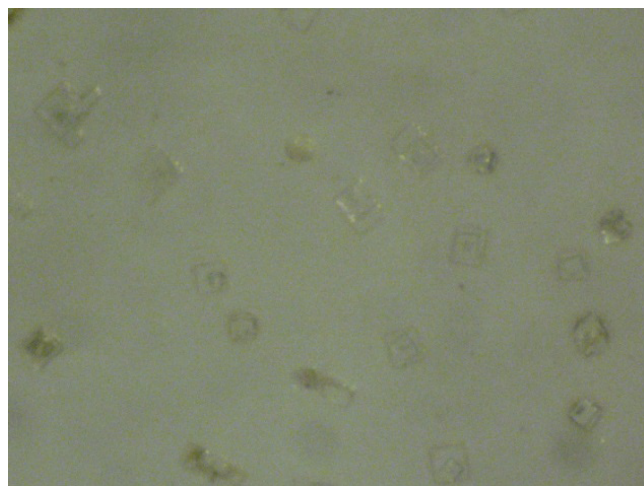


Fot. 3. Pseudocyfele w korze górnej plechy *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., pow. 400x (fot. M. A. Józwiak)

Photo 3. *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. pseudocyphelles in upside rind of thallus, zoom 400x (Photo. M.A. Józwiak)

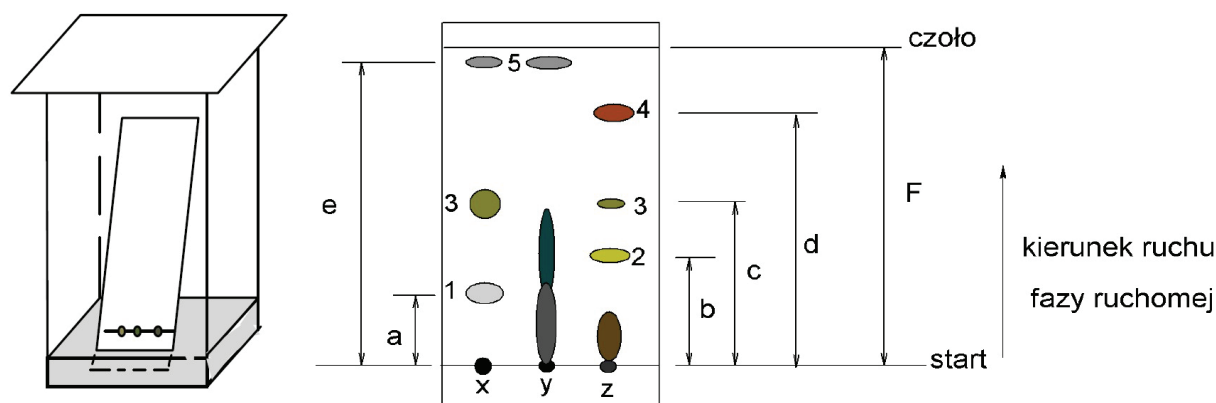
Wyniki

Po procesie ekstrahowania wtórnych metabolitów z plechy porostu *Hypogymnia physodes*, wykonanej zgodnie z założoną metodyką, otrzymane metabolity obserwowano w mikroskopie stereoskopowym, zapisując obraz cyfrowo (fot. 4, 5, 6). Na podstawie wykonanych fotografii oraz doniesień literatury wskazano przypuszczalny, wyekstrahowany kwas poro-



Fot. 4, 5, 6. Kryształy kwasów porostowych w obrazie mikroskopowym (fot. G. Kuropatwa)

Photos 4, 5, 6. Crystals of lichen acids in microscopic image (Photo. G. Kuropatwa)



Ryc. 2. Komora chromatograficzna z zanurzoną płytką i chromatogram TLC uzyskany dla próbek x, y i z.
 Fig. 2. Chromatographic chamber with immersed plate and TLC chromatogram obtained for specimens x, y and z

Plamy od 1 do 5 odpowiadają prawdopodobnie pojedynczym substancjom 1–5, substancja 1 znajduje się w próbce x, substancja 2 i 4 znajduje się w próbce z, substancja 3 znajduje się w próbce x i z substancja 5 znajduje się w próbce x i y

stowy. Stwierdzono, że jest to kwas fizyodalowy lub/i fizodowy. Kwas rozpoznano na podstawie informacji zawartych w publikacji Rancović (2008), które wskazują, że najwyższy udział suchej masy plechy mają wymienione kwasy (fyzodalowy 2,7–8,4%, fizodowy 3,3–5,0%). Stanowiło to podstawę do wnioskowania o potencjalnej możliwości osadzania się na ściankach kolby wymienionych kwasów. Ponadto analizowano szczegółowo strukturę morfologiczną i kolorystykę wydzielonych związków, zestawiając je z cechami opisanymi w pracy magisterskiej J. N. Precyzyjne określenie otrzymanych związków możliwe będzie po zastosowaniu techniki cienkowarstwowej chromatografii adsorpcyjnej (TLC), która polega na rozdziale substancji w fazie stacjonarnej w postaci płaszczyzny. Schematyczny przebieg analizy przedstawia ryc. 2.

Ze względu na brak możliwości dostępu do chromatografu i koszty wykonania analizy dalsze badania w tym zakresie będą odbywać się w późniejszych terminach.

Podsumowanie

Hypogymnia physodes jest pospolicie występującym gatunkiem porostu epifitycznego. Metabolity wytwarzane w jej plechach cechują się specyficznymi właściwościami biologicznymi. Są to związki chemiczne należące do depsydwów i depsydonów, z których w największych ilościach występują kwas fizodowy i fizyodalowy. Zainteresowanie naukowe tym porostem

wynika z tego, że badania in vitro prowadzone z tym porostem wskazują na jego szerokie oddziaływanie biologiczne dzięki zawartym w nim kwasom porostowym. W dotychczasowych badaniach nie podejmowano prób zastosowania go w lecznictwie. Wyniki badań dowiodły przeciwdrobnoustrojowe, przeciwutleniające i cytotoksyczne właściwości kwasów porostowych zawartych w jego plesze. Właściwości takie stwierdzono zarówno w odniesieniu do samych związków, jak i ich ekstraktów. Zasadne jest więc zwrócenie większej uwagi na ten gatunek porostów.

Wnioski wypływające z przeprowadzonych badań wskazują:

- 1) na dużą dostępność do materiału biologicznego (plech porostu) ze względu na powszechność jego występowania,
- 2) na powszechność występowania – gwarantuje nieograniczone pozyskiwanie metabolitów porostowych,
- 3) na proste metody otrzymywania, możliwe do zastosowania w laboratoriach z wyposażeniem podstawowym,
- 4) precyzyjne określenie rodzaju wyekstrahowanego kwasu wymaga specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego
- 5) ze względu na potwierdzone laboratoryjnie skuteczne biologiczne właściwości kwasów porostowych *Hypogymnia physodes* ich potencjał leczniczy powinien być wykorzystany farmakologicznie.

Literatura

- Boustie J., Grube M., 2005. Lichens, a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Gen Res*; 3: 273-87.
- Correche E., Carrasco M., Giannini F., Piovano M., Garbario J., Enriz D., 2002. Cytotoxic screening activity of secondary metabolites. *Acta Farm Bonaerense*; 21: 273-8.
- Ingólfssdóttir K., 2002. Usnic acid. *Phytochemistry*; 61: 729-736.
- Jóźwiak M.A., 2014, Przyczynek do poznania właściwości przeciwrzybiczych antrachinonów i kwasu usniowego izolowanego z plech *Xantoria parietina* (L.) Th. Fr. i *Evernia prunastri* (L.) Ach. *Rocznik Świętokrzyski. Ser. B Nauki Przyrodnicze* 35; 35-50.
- Latkowska E., Chrapusta E., Bober B. i wsp., 2015. Allelopathic effects of epiphytic lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. colonization on the spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) bark. *Allelopathy J*; 35(1):129-38.
- Matwiejuk A., 2007. Porosty Białegostoku. Analiza florystyczno-ekologiczna. t. 1. Białystok: Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko.
- Müller K., 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Apel Microbiol Biotechnol*; 56: 9-16.
- Nash III T.H., 2004. Lichen biology. Cambridge: Cambridge University Press.
- Nieduziak J., 2012. Reakcje kwasów porostowych i ich związek z typem podłoża, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, praca magisterska.
- Opanowicz M., 2002. Ekologiczna rola wtórnych metabolitów porostowych. *Wiadomości Botaniczne* 46(1/2) 35-44 Wrocław.
- Rancović B., Mišić M., Sukdolak S., 2008: The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipola*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World J Microbiol Biotechnol*; 24: 1239-42.
- Solhaug K.A., Lind M., Nybakken L. i wsp., 2009: Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora*; 204: 40-8.
- Studzińska-Sroka E., Zarabska-Bożejewicz Borgis D., 2016. Pustulka pęcherzykowata (*Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.) – charakterystyka porostu i jego właściwości biologiczne. *Postępy Fitoterapii* 3: 200-207.
- Türk H., Yilmaz M., Tay T., Türk A., Kivanc M., 2006. Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin and olivetoric acid constituents. *Z Naturforsch.*; 61c: 499-507.
- Vijayakumar C.S., Viswanathan S., Kannappa Reddy M.,

Parvathavarthini S., Kundu A.B., Sukumar E., 2000. Antiinflammatory activity of (+)- usnic acid. *Fitoterapia*; 71:564-6.

Wójciak H., 2003. Porosty, mszaki i paprotniki. *Flora Polski*. Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa.

STRESZCZENIE

Produktami złożonych przemian metabolicznych zachodzących w plechach porostów są wtórne metabolity nazywane kwasami porostowymi. Ich powstawanie to wynik symbiozy między mikobiontem i fykobiontem. Komórki fykobionta w procesach asymilacji produkują węglowodany, takie jak: rybitol, erytrytol oraz sorbitol, które transportowane są do komórek grzyba. Wtórne metabolity porostowe klasyfikuje się w trzy grupy: mewalonianową, octanowo-polimalonianową oraz szikimianową. W plesze *Hypogymnia physodes* znajduje się kwas fizodowy oraz fizodaliowy. Kwas fizodowy to stosunkowo rzadko występujący w porostach depsydon, o którego aktywności biologicznej wiadomo niewiele. Ten kwas wykazuje aktywność antybiotyczną w stosunku do bakterii. Kwas fizodowy posiada także właściwości hamujące działanie enzymów, na przykład blokowanie integrazy HIV-1. Celem prowadzonych badań było wyekstrahowanie wymienionych związków i zanalizowanie w obrazie mikroskopowym struktury kryształów otrzymanych kwasów. Metoda przyjęta w badaniach pozwoliła wydzielić kwasy bez możliwości wskazania, który z nich to kwas fizodowy, a który fizodaliowy. Analiza mikroskopowa budowy kryształów tych kwasów umożliwiła ich grupowanie uwzględniające wygląd kryształów, co jest przyczynkiem do precyzyjnego określenia budowy chemicznej stwierdzonych kryształów. Określenie rodzaju wyekstrahowanego kwasu, jego budowy chemicznej, wymaga dalszych badań możliwych do wykonania przy użyciu specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego.