

**VERNONIA ANTHELMINTICA POYASIDAN AJRATILGAN ENDOFIT BAKTERIYA
BACILLUS HALOTOLERANS XJB-35 TOMONIDAN ISHLAB CHIQARILGAN
BIOAKTIV IKKILAMCHI METABOLIT**

**БИОАКТИВНЫЙ ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИТ, ПРОДУКЦИЯ ЭНДОФИТНЫХ
БАКТЕРИЙ BACILLUS HALOTOLERANS XJB-35, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СТЕБЛЯ
VERNONIA ANTHELMINTICA**

**BIOACTIVE SECONDARY METABOLITE PRODUCED BY ENDOPHYTIC
BACTERIA BACILLUS HALOTOLERANS XJB-35 ISOLATED FROM THE STEM OF
VERNONIA ANTHELMINTICA**

Nigora Aktamovna Rustamova, Samarqand davlat universiteti

Biologiya kafedrasi dotsenti, biologiya fanlari bo'yicha falsafa doktori (PhD)

Kahramon Davranovich Davranov, O'zFA, Mikrobiologiya instituti

Enzimologiya laboratoriyasi, biologiya fanlari doktori

Abdulimoli Yili, Xitoy Fanlar akademiyasi Shinjon fizika va kimyo texnika instituti

*Farmakologiya fanlari doktori, Qurg'oqchil hududlarda o'simlik resurslari va kimyosi asosiy
laboratoriyasi*

DOI: <https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol1.iss4.2022.88>

Annotatsiya: Alkaloid metabolit sophoridine, endofitik bakteriya *Bacillus halotolerans* XJB-35 ning etil asetatli ekstraktidan ajratib olindi. Bakteriya shtammi dorivor o'simlik *Vernonia anthelmintica* ning poya qismidan ajratib olindi va 16S rRNA gen ketma ketligi orqali identifikatsiya qilindi. Ajratib olingan metabolit B16 sichqon hujayralarida melanin sintezlanishiga va tirozinaza faolligi o'rganildi.

Аннотация: Алкалоидный метаболит софоридин получали из этилацетатного экстракта эндофитных бактерий *Bacillus halotolerans* XJB-35. Бактериальный штамм был выделен из стебля лекарственного растения *Vernonia anthelmintica* и идентифицирован с помощью методов секвенирования гена 16S rRNA. Чистый выделенный вторичный метаболит оценивали по синтезу меланина и активности тирозиназы в мышиных клетках B16.

Abstract: Alkaloid metabolite sophoridine was obtained from ethyl acetate extract of endophytic bacteria *Bacillus halotolerans* XJB-35. Bacterial strain was isolated from medicinal plant *Vernonia anthelmintica* stem and identified by 16S rRNA gene sequencing techniques. The pure isolated secondary metabolite evaluated for on melanin synthesis and tyrosinase activity in murine B16 cells.

Kalit soʻzlar: *Bacillus halotolerans* XJB-35, *Vernonia anthelmintica*, melanin miqdori, ikkilamchi metabolit, alkaloid.

Ключевые слова: *Bacillus halotolerans* XJB-35, *Vernonia anthelmintica*, содержание меланина, вторичный метаболит, алкалоид.

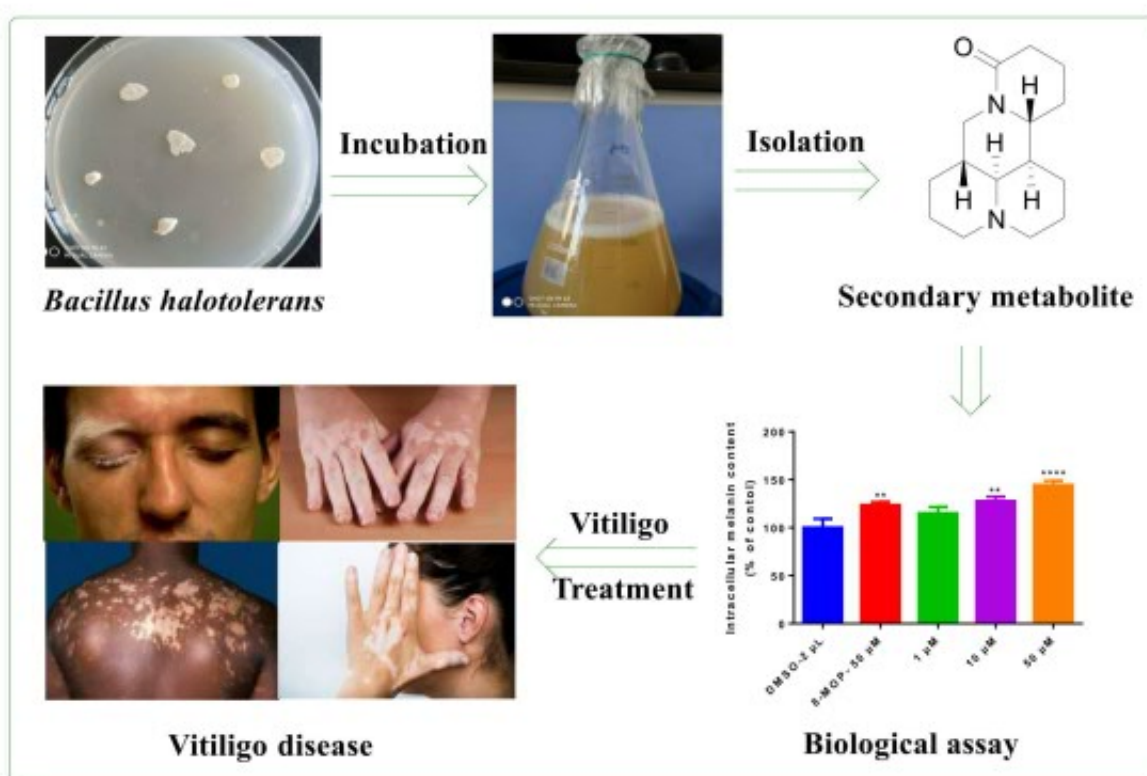
Keywords: *Bacillus halotolerans* XJB-35, *Vernonia anthelmintica*, melanin content, secondary metabolite; alkaloid.

Kirish

O'simlik endofitlari o'simlik to'qimalarida hech qanday kasallik belgilarini namayon qilmasdan simbioz holda, koloniya hosil qilib yashaydi [1]. Biologik faol va tarkibiy jihatdan yangi bakteriyal ikkilamchi metabolitlar dorilarni kashf qilish uchun potentsial manba hisoblanadi

[2, 3]. Endofitik mikroorganizmlar hosil qilgan steroidlar, terpenoidlar, alkaloidlar, xinonlar va fenolik birikmalar [4-7], kabi bioaktiv tabiiy birikmalar farmatsevtika va qishloq xo'jaligida muhim ahamiyat kasb etadi. Ushbu birikmalar orasida endofitlar tomonidan ishlab chiqarilgan alkaloid birikmalar funktsional va o'ziga xos strukturaviy xilma-xillikka ega bo'lgan kimyoviy birikmalarning katta oilasidir [8]. Bundan tashqari alkaloidlar antimikrobial, saraton hujayralariga qarshi va boshqa bir qator farmakologik xususiyatlarni namayon qiladi [9]. Ushbu ish endofit bakteriya *Bacillus halotolerans* XJB-35 dan olingan ikkilamchi metabolit soporidinning ajratib olish va idintifikatsiya qilinish haqida xabar beradi. Bundan tashqari, ikkilamchi metabolitning B16 sichqon hujayralarida melanin sintezi va tirozinaz faolligiga ta'siri o'rganildi.

Graphical abstract



Materiallar va usullar

Endofit bakteriyaning ajratish va identifikatsiya qilish

O'simlik poyasi, o'simlikning tanasidan ajratib olinib 99.9% li etil spirit bilan 2 minut davomida sterilizatsiya qilindi va undan keyin yana NaClO ni 10% eritmasiga va sterillangan va distillangan suv bilan yuvildi. Steril poya (10 g yangi og'irlik) 3-4 sm bo'laklarga bo'linadi va maydalandi [21]. Maydalangan to'qimadan (1 g) olib plastic tubikka ko'childi va 9 ml steril fosfat buferli sho'r suv (PBS) (20 mM natriy fosfat, 150 mM NaCl, pH 7.4) qo'shib suyultirilib Vortex Biosan B-1 yordamida 1 daqiqa davomida chayqatildi. Suyultirilgan eritmalaridan (10^1 - 10^5) (100 mkl) Nutrient Agar plitalari (5 g/l pepton, 3 g/l xamirturush ekstrakti, 15 g/l agar, 5 g/l NaCl) ustiga tarqaldi. 3-4 kun inkubatsiya qilindi. DNK izolyatsiyasi uchun turli o'lchamdagi, shakldagi va rangdagi vizual bir hil koloniyalar ishlatilgan.

Ikkilamchi metabolitning ekstraksiya qilish va ajratib olish

Inkubatsiyadan so'ng bakteriya kulturasi etil acetateda ekstraksiya qilindi [10] va 4.5 g umumiy ekstrakt olindi. Xom ekstrakt CombiFlash (Teledyne ISCO, Inc., USA) yordamida ODS-

A 120c ustuni bilan birlashtirilgan kolonkali xromatografiyaga fraksiyalangan. F1-F14 gacha bo'lgan fraksiyalar olindi. F2 fraksiyasi (49,5 mg) preparativ HPLC SHIMADZU (XSELECT CSHTM Prep C18, 5 mkm) yordamida asetonitril (MeCN) va suvning izogradient erituvchi tizimi bilan (10 mg) alkaloid birikmasi tozalab olindi. Yuqorida aytib o'tilganidik melanin tarkibi va tirozinaz faolligi uchun tahlil o'tkazildi [8, 11].

Ikkilamchi metabolitening melanin sintezi va tirozinaz faolligi

Hujayra madaniyati. Sichqondagi B16 melanoma hujayralari Xitoy Fanlar Akademiyasidan (CAS), olingan. Ushbu hujayralar Dulbecco tomonidan o'zgartirilgan Eagle muhitida (DMEM, Gibco Life Technologies, Waltham, MA, AQSh) 10% issiqlik bilan inaktivlangan homila sigir zardobi (FBS) bilan to'ldirilgan.

Melanin tarkibi va tirozinaz faolligini tahlil qilish. Avval xabar qilingan metodlar asosida, melanin tarkibi va tirozinaz faolligi tahlili o'tkazildi [8, 11].

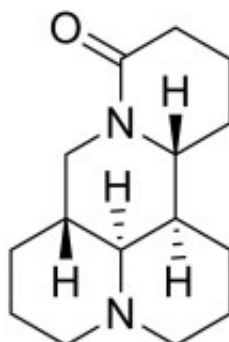
Natijalar va muhokama

Endofitik bakteriya *Bacillus halotolerans* XJB-35 ning ajratib olish va identifikatsiyasi

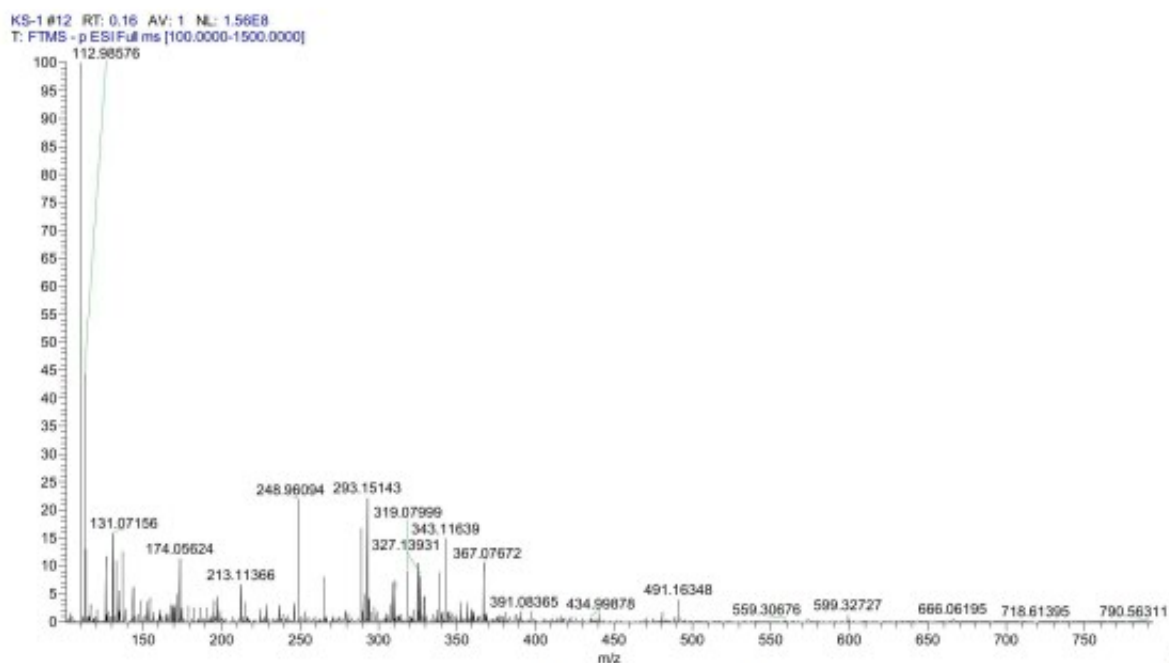
Oldingi ishimizda dorivor o'simlik *V. anthelmintica* ildizi bilan bog'liq bo'lgan endofitik bakteriyalar va zamburug'larning biologik xilma-xilligi va ularning xom ekstrakt komponentlarining sinergik ta'siri hamda individual ikkilamchi metabolitlarning melanin sintezi, saratonga va mikroblarga qarshi ta'siri bo'yicha baholangan xossalari haqida ma'lumot bergan edik [8, 12]. Ushbu ishda bakterial endofit *Bacillus halotolerans* XJB-35 *V. anthelmintica* poyasidan ajratib olingan va 16S rRNK gen ketma-ketligi usuli bilan edintifikatsiya qilindi. Shtamm 98% *Bacillus halotolerans* o'xshash b'olib, MW876143 nomer orqali GenBankda ro'yxatdan o'tkazilgan (www.ncbi.nlm.nih.gov).

```
TGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCT
GTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
GAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACC
TTGACGGTACCTAACAGAAAGCCAGCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGAACTGGGGAACCTTG
AGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGA
CAATCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAG
GTTAAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTGTACACACCGCCGTCACACCCAGAGAGTTGTGAACACCGGAAGTCGGTGAGGTAA
CCTTATGAGGCCAGCGCCGAAGGTGGACAGA
```

Soforidin tetratsiklik xinolizidin alkaloidi bo'lib, hozirgacha bu tabiiy birikmalar ko'plab dorivor o'simliklarning turli qismlaridan olingan. Bu birikma bir qator: saratonga, viruslarga va mikroblarga qarshi biologik faollikni namoyon qiladi [13, 14]. Ushbu tadqiqotda *Bacillus halotolerans* XJB-35 endofit bakteriyasidan ikkilamchi metabolit soforidin alkaloid birikmasi birinchi marta ajratib olindi va sichqonning B16 hujayralarida melanin sintezi va tirozinaz faolligi o'lchandi (2-rasm).



Rasm 2 *Bacillus halotolerans* XJB-35 endofit bakteriyasidan ajratilgan soforidinning kimyoviy tuzilishi.



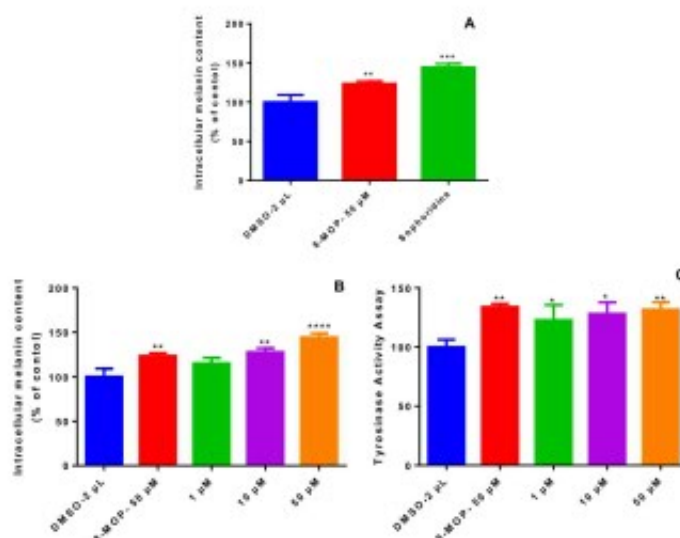
Rasm

3. Soforidin birikmasining MASS spektri

Biologik faollik

Ikkilamchi metabolitning melanin sintezi va tirozinaz faolligi

Endofit bakteriya *Bacillus halotolerans* XJB-35 ning umumiy etil asetat ekstrakti sichqonning B16 hujayralarida melanin sinteziga sinergetik ta'sir ko'rsatdi ($206.13 \pm 50 \mu\text{g/mL}$), natija ijobiy nazorat 8-metoksilpsoralen bilan solishtildi (8-MOP) ($129.99 \pm 7.41\%$ at $50 \mu\text{g/mL}$) (Figure 3.). Etil asetat ekstraktining qaysi birikmalari faolligi oshishini tushunish uchun biz B16 sichqon hujayralarida melanin sinteziga ajratilgan sof ikkilamchi metabolitning ta'sirini ham o'rgandik. Davolash melanin sintezi bo'yicha musbat nazorat 8-MOP ($128,76 \pm 4,45\%$) dan yuqori faollik $143,66 \pm 6,67\%$ ko'rsatdi. Keyinchalik soforidinda melanin sintezi va tirozinaz faolligi xar xil konsentratsiyada (1, 10 va 50 mkg / mL) o'rganildi. Natija shuni ko'rsatdiki dozaga bog'liq holda melanin sintezi va tirozinazni faolligi kuchaydi.



Rasm 4 Ikkilamchi metabolitlarning B16 hujayralarida melanin ishlab chiqarish va tirozinaz faolligiga ta'siri. Melanin tarkibi tahlilini (A, B) va B16 hujayralarining tirozinaz faolligini (C) ikkilamchi metabolit bilan rag'batlantirish (melanin tarkibi va tirozinaza faolligi uchun barcha ****P qiymatlari). DMSO bilan ishlov berilgan nazorat bilan solishtirganda $\leq 0,0001$. Tirozinaza faolligi uchun barcha *P-qiymatlari $< 0,05$, **Tirozinaza faolligi uchun P-qiymatlari esa DMSO bilan ishlov berilgan nazorat bilan solishtirganda $< 0,01$).

Xulosa

Endofit bakteriya *Bacillus halotolerans* XJB-35 dorivor o'simlik *V. anthelmintica* poyasidan ajratib olindi va molekulyar edintifikatsi qilindi. *Bacillus halotolerans* XJB-35 ning etil asetat ekstraktidan soforidin alkaloid birikmasini ajratib olindi. Bundan tashqari, metabolit sichqon B16 hujayralarida melanin sintezi va tirozinaz faolligi bo'yicha tekshiriladi. Alkaloid birikmasi musbat nazorat 8-MOP ($128,76 \pm 4,45$) ga nisbatan IC_{50} qiymatlari $143,66 \pm 6,67\%$ bilan melanin sintezini faolligini oshirdi.

Введение

Эндофиты растений колонизируют ткани живых растений, не вызывая явных симптомов заболевания [1]. Биологически активные и структурно новые бактериальные вторичные метаболиты представляют собой потенциальный ресурс для открытия лекарств [2, 3]. Биоактивные природные соединения, такие как стероиды, терпеноиды, алкалоиды, хиноны и фенольные соединения [4-7], которые продуцируют эндофитные микроорганизмы, пользуются повышенным спросом в фармацевтике и сельском хозяйстве. Среди этих алкалоидов природные соединения, продуцируемые эндофитами, представляют собой большое семейство химических соединений с функциональным и уникальным структурным разнообразием [8]. Кроме того, алкалоиды проявляли несколько биологических активностей, таких как противомикробные, противораковые и фармакологические свойства [9]. В настоящей работе сообщается о выделении, идентификации и оценке вторичных метаболитов софоридина, полученных из эндофитных бактерий *Bacillus halotolerans* XJB-35. Кроме того, измеряли влияние на синтез меланина и активность тирозиназы в мышинных клетках B16.

Графическая аннотация



Материал и методы

Выделение и идентификация эндофитных бактерий

Стебель растения отделяли и стерилизовали 99,9% этанолом в течение 2 минут и 10% NaClO и снова промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильный стебель (10 г сырого веса) разрезали на кусочки размером 3–4 см и мацерировали с помощью стерильной ступки с пестиком [21]. Мацерированную ткань (1 г) переносили в пластиковые пробирки, содержащие 9 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS) (20 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,4), и встряхивали в течение 1 мин с использованием Vortex Biosan B-1. Аликвоты (100 мкл) из разведений (10¹–10⁵) распределяли на чашках с питательным агаром (5 г/л пептона, 3 г/л дрожжевого экстракта, 15 г/л агара, 5 г/л NaCl). После чего выдерживали 3–4 дня. Для выделения ДНК использовали визуально однородные колонии разного размера, формы и цвета.

Экстракция и выделение вторичных метаболитов

Бактериальную культуру экстрагировали EtOAc [10], с получением всего 4,5 г неочищенного экстракта. Экстракт фракционировали для колоночной флэш-хроматографии на CombiFlash (Teledyne ISCO, Inc., США) в сочетании с колонкой: ODS-A 120с. Чтобы получить фракцию F1-F14, фракцию F2 (49,5 мг) дополнительно очищали с использованием препаративной ВЭЖХ SHIMADZU (XSELECT CSHTM Prep C18, 5 мкм) с изогradientной системой растворителей ацетонитрила (MeCN) и воды с получением соединения 1 (10 мг). Анализ содержания меланина и активности тирозиназы проводили, как сообщалось ранее [8, 11].

Содержание меланина и тирозиназная активность вторичного метаболита

Культура клеток. Клетки мышиной меланомы B16, полученные от Китайской академии наук (CAS), Китай. Эти клетки культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM, Gibco Life Technologies, Уолтем, Массачусетс, США), с добавлением 10% термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки (FBS).

Содержание меланина и определение активности тирозиназы. Анализ содержания меланина и активности тирозиназы проводили, как сообщалось ранее [8, 11].

Результаты и обсуждение

Выделение и идентификация эндофитных бактерий *Bacillus halotolerans* XJB-35

В нашей предыдущей работе мы сообщали о биоразнообразии эндофитных бактерий и грибов, связанных с корнем лекарственного растения *V. anthelmintica*, и их синергетическом эффекте композиций неочищенного экстракта, а также о свойствах чистых вторичных метаболитов, оцененных по их синтезу меланина, противомикробным и противораковая активность [8, 12].

В настоящей работе бактериальный эндофит *Bacillus halotolerans* XJB-35 был выделен из стебля *V. anthelmintica* и идентифицирован методом последовательностей генов 16S рРНК. Штамм показал 98% сходство с *Bacillus halotolerans* XJB-35, зарегистрированным в GenBank под регистрационным номером MW876143 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

```
TGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGTCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCT
GTAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCACTTACAGATGGACCGCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGGTAATGGCTCACCAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGAGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
GAGCAACGCGCGTGTGAGTGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACC
TTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTGTGTCGGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGTTCGACGGCGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAGTGGGGAAGTGTG
AGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTG
GTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGGTTTCGCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGA
CAATCCTAGAGATAGGACGTCCTCCCTTCGGGGGACAGTGCAGGTGGTGCATGTTGTCGTACGCTCGTGTGTCGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACAGTGTCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAG
GTTAAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATACACCGCCCGTACACACGAGAGTGTGTAACACCGGAAGTCCGTGAGGTAA
CCTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGACAGA
```

Структурная характеристика выделенного соединения

Софоридин представляет собой тетрациклический хинолизидиновый алкалоид, до сих пор эти природные соединения получали из различных частей многих лекарственных растений. Например, может отображаться несколько видов биологической активности: противораковая, противовирусная и противомикробная [13, 14]. В настоящем исследовании вторичные метаболиты алкалоидного соединения софоридина были выделены из эндофитных бактерий *Bacillus halotolerans* XJB-35 и впервые измерены синтез меланина и активность тирозиназы в клетках B16 (рисунок 2).

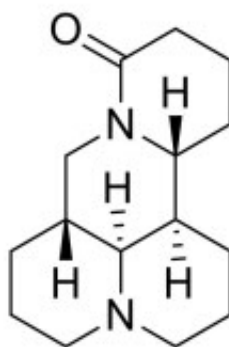


Рисунок 2 Химическая структура софоридина, выделенного из эндофитных бактерий *Bacillus halotolerans* XJB-35.

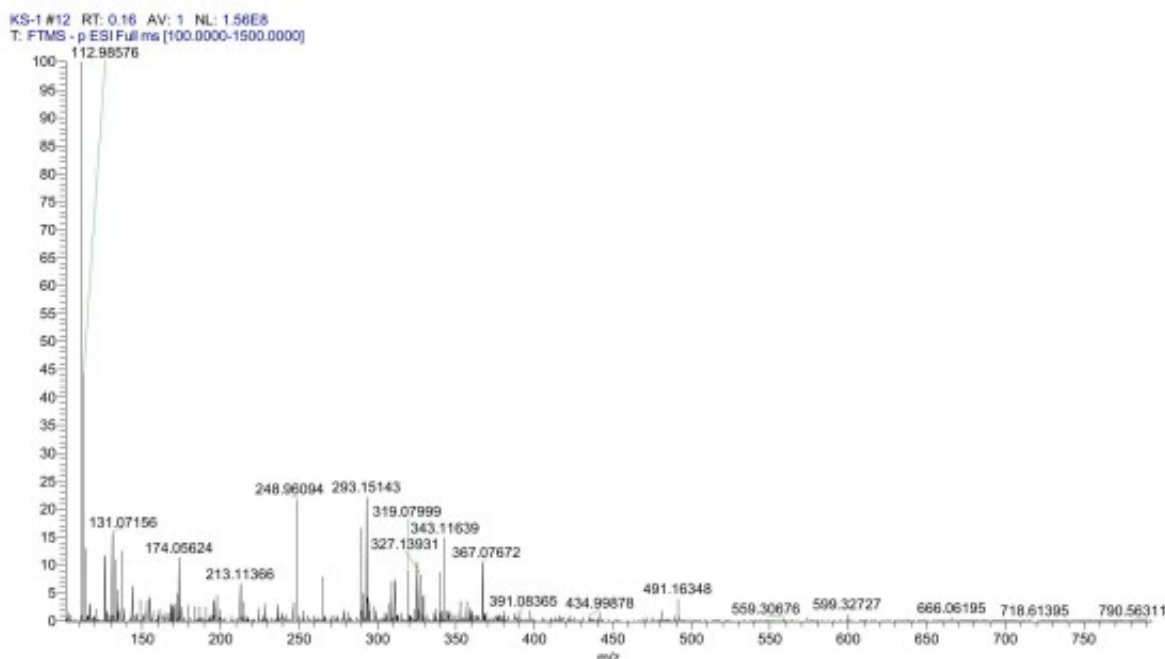


Рисунок 3 MASS-спектр соединения софоридина.

Биологическая оценка

Содержание меланина и тирозиназная активность вторичного метаболита

Общий экстракт этилового ацетата *эндофитной бактерии Bacillus halotolerans* XJB-35 казал синергетическое воздействие на синтез меланина в клетках мыши B16 (206.13 $\pm$ 50 μ g/mL), результат был сопоставлен с положительным контролем 8-метоксилпсоралена (8-MOP) ($129.99 \pm 7.41\%$ at 50 μ g/mL) (Рисунок 3). Чтобы понять, какие соединения из этилацетатного экстракта обладают повышенной активностью, мы также измерили влияние изолированного чистого вторичного метаболита на синтез меланина в мышинных клетках B16. Лечение показало более высокую активность $143.66 \pm 6.67\%$, чем положительный контроль 8-MOP ($128.76 \pm 4.45\%$) в отношении синтеза меланина. В дальнейшем софоридин был исследован на синтез меланина и активность тирозиназы при различных концентрациях (1, 10 и 50 мкг/мл). Соединение также увеличивало синтез меланина и тирозиназы в зависимости от дозы.

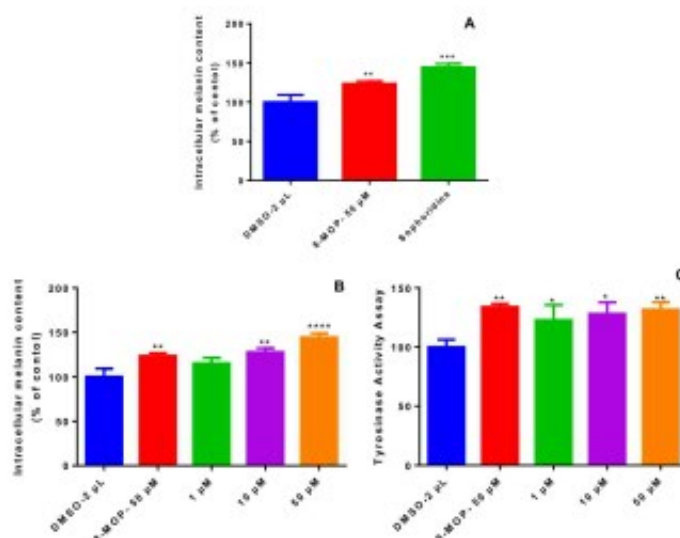


Рисунок 4. Влияние вторичных метаболитов на продукцию меланина и активность тирозиназы в клетках B16, стимуляция анализа содержания меланина (A, B) и активности тирозиназы клеток B16 (C) вторичным метаболитом (все значения ****P для содержания меланина и тирозиназная активность $\leq 0,0001$ по сравнению с контролем, обработанным ДМСО. Все * значения P для тирозиназной активности составляют $< 0,05$, в то время как ** P-значения для тирозиназной активности составляют $< 0,01$ по сравнению с контролем, обработанным ДМСО).

Вывод

Эндофитные бактерии *Bacillus halotolerans* XJB-35 были выделены и идентифицированы из стебля китайского лекарственного растения *V. anthelmintica*. Этилацетатный экстракт *Bacillus halotolerans* XJB-35 давал алкалоидное соединение софоридин. Кроме того, метаболит подвергался скринингу на синтез меланина и активность тирозиназы в мышиных клетках B16. Алкалоидное соединение сильно увеличивало синтез меланина со значениями IC_{50} $143,66 \pm 6,67\%$, чем положительный контроль 8-MOP ($128,76 \pm 4,45$).

Introduction

Plant endophytes are colonizing living plants tissues without causing apparent symptoms of disease [1]. Biologically active and structurally novel bacterial secondary metabolites constitute a potential resource for drugs discovery [2, 3]. Bioactive natural compounds such as steroids, terpenoids, alkaloids, quinones and phenolic compounds [4-7], which produced endophytic microorganisms are in high demand in the pharmaceuticals and agriculture.

Among these alkaloids natural compounds, which produced by endophytes are a large family of chemical compounds with functional and unique structurally diversity [8]. Moreover alkaloids displayed several biological activities as antimicrobial, anticancer and pharmacological properties [9]. The present work reports the isolation and identification and evaluation of secondary metabolites sophoridine was obtained from endophytic bacteria *Bacillus halotolerans* XJB-35. In addition, measured effect of on melanin synthesis and tyrosinase activity in murine B16 cells.

Graphical abstract



Material and methods

Isolation and identification of endophytic bacteria

The stem of the plant was separated and sterilised with 99.9% ethanol for 2 minutes, and 10% NaClO and rinsed with sterile distilled water again. The sterile stem (10 g fresh weight) were cut into 3–4 cm pieces and macerated using a sterile mortar and pestle [21]. The macerated tissue (1 g) was transferred into plastic tubes containing 9 mL sterile phosphate buffered saline (PBS) (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4) and shaken for 1 min using Vortex Biosan B-1. Aliquots (100 μ L) from dilutions (10^1 – 10^5) were spread on Nutrient Agar plates (5 g/L Peptone, 3 g/L yeast extract, 15 g/L agar, 5 g/L NaCl). After than incubated 3–4 days. Visually homogenous colonies of different sizes, shapes, and colours were used for DNA isolation.

Extraction and Isolation of secondary metabolites

The bacterial culture was extracted with EtOAc [10], to give total 4.5 g of a crude extract. The extract was fractionation to flash column chromatography by CombiFlash (Teledyne ISCO, Inc., USA) combined with the column: ODS-A 120c. To get fraction F1–F14. Fraction F2 (49.5 mg) was further purified using preparative HPLC SHIMADZU (XSELECT CSH™ Prep C18, 5 μ m) with isogradient solvent system of acetonitrile (MeCN) and water, to afford compound 1 (10 mg). The assay for melanin content and tyrosinase activity was carried out, as previously reported [8, 11].

Melanin content and tyrosinase activity of secondary metabolite

Cell Culture. Murine B16 melanoma cells obtained from Chinese Academy of Sciences, (CAS), China. These cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Life Technologies, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

Melanin contents and tyrosinase activity assay. The assay for melanin content and tyrosinase activity was carried out, as previously reported [8, 11].

Results and discussion

Isolation and identification of endophytic bacteria *Bacillus halotolerans* XJB-35

In our previous work, we have reported the biodiversity of endophytic bacteria and fungi associated with the medicinal plant *V. anthelmintica* root and their synergetic effect of crude extract compositions, as well as properties of the pure secondary metabolites evaluated on their melanin synthesis, antimicrobial and anticancer activity [8, 12].

In the present work, bacterial endophyte *Bacillus halotolerans* XJB-35 was isolated from the stem of *V. anthelmintica* and identified by 16S rRNA gene sequences method. The strain exhibited 98% similarity to *Bacillus halotolerans* XJB-35, registered in GenBank with accession number MW876143 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

```
TGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCT
GTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCACCTACAGATGGACCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
GAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGCAATAGGGCGGTACC
TTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAACTGGGGAAGTGTG
AGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG
GTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGTTTCGCCCCCTTAGTGCTGACGTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGA
CAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGTGATGTTGTCGTACGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAG
GTTAAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGTAAACCCGGAAGTCGGTGAGGTAA
CCTTATGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGACAGA
```

Structure characterization of the isolated compound

A sophoridine is a tetracyclic quinolizidine alkaloid, until now this natural compounds have been derived from different parts of many medicinal plants. It can be displayed several biological activities for examples: anti-cancer, antiviral and antimicrobial [13, 14]. In the present study secondary metabolites of alkaloid compound sophoridine was isolated from the endophytic bacteria *Bacillus halotolerans* XJB-35 and measured melanin synthesis and tyrosinase activity in B16 cells, for first time (Figure 2).

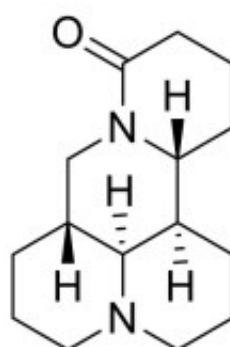


Figure 2 Chemical structure of sophoridine, isolated from the endophytic bacteria *Bacillus halotolerans* XJB-35.

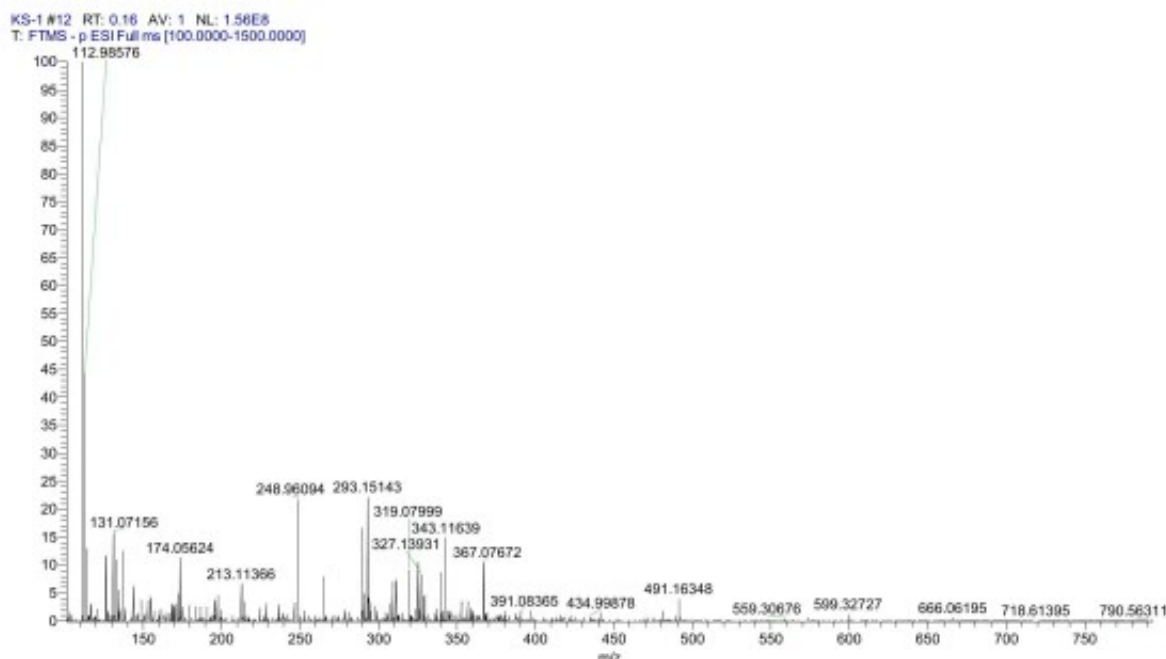


Figure 3 MASS spectrum of compound sophoridine

Biological evaluation

Melanin content and tyrosinase activity of secondary metabolite

The ethyl acetate extract of endophytic bacteria *Bacillus halotolerans* XJB-35 has been showed synergetic effects on melanin synthesis in murine B16 cells ($206.13 \pm 50 \mu\text{g/mL}$), compared with positive control 8-methoxypsoralen (8-MOP) ($129.99 \pm 7.41\%$ at $50 \mu\text{g/mL}$) (Fig.3.). In order to understanding which compounds from the ethyl acetate extract increased on activity, therefore we have also measured isolated pure secondary metabolite effect on melanin synthesis in murine B16 cells. The treatment exhibited higher activity $143.66 \pm 6.67\%$, than positive control 8-MOP (128.76 ± 4.45) on melanin synthesis. In further sophoridine investigated melanin synthesis and tyrosinase activity with deferent concentration (1, 10 and $50 \mu\text{g/mL}$). Compound also increased melanin synthesis and tyrosinase with dose-dependent.

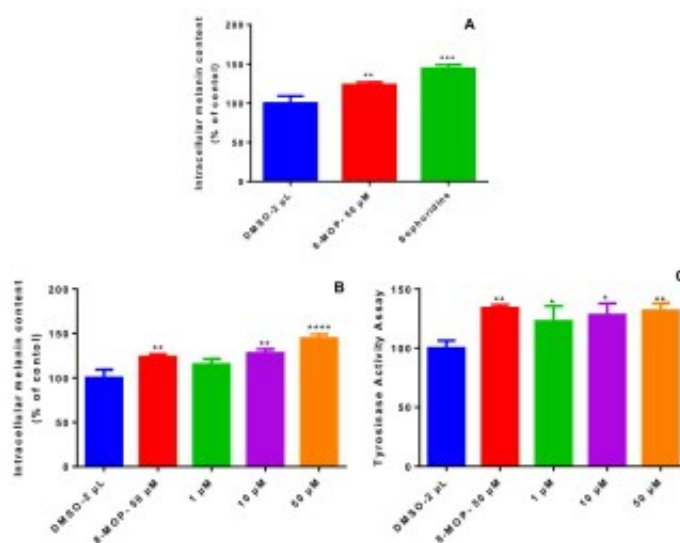


Figure 4 Effect of secondary metabolites on melanin production and tyrosinase activity in B16 cells, Stimulation of melanin content assay (A, B) and tyrosinase activity of B16 cells (C) by secondary metabolite (All ****P values for melanin content and tyrosinase activity are ≤ 0.0001 , compared with the DMSO treated control. All *P-values for tyrosinase activity are < 0.05 , while **P-values for tyrosinase activity are < 0.01 , compared with the DMSO treated control).

Conclusion

The endophytic bacteria *Bacillus halotolerans* XJB-35 was isolated and identified from the stem of Chinese medicinal plant *V. anthelmintica*. An ethyl acetate extract of *Bacillus halotolerans* XJB-35 yielded alkaloid compound sophoridine. Moreover, metabolite screened on melanin synthesis and tyrosinase activity in murine B16 cells. Alkaloid compound strongly increased melanin synthesis with IC_{50} values $143.66 \pm 6.67\%$, than positive control 8-MOP (128.76 ± 4.45).

References

- Deng, M., Liu, Y., Huang, Y., Yin, X., Zhou, Y., Duan, Y., Xie, S., Guo, Y., Qiao, Y., and Shi, Z.J.F. (2020). New bioactive secondary metabolites from the *Anoectochilus roxburghii* endophytic fungus *Aspergillus versicolor*. *143*, 104532.
- Singh, M., Kumar, A., Singh, R., and Pandey, K.D. (2017). Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech* 7, 315.
- Mohamad, O.A.A., Li, L., Ma, J.-B., Hatab, S., Xu, L., Guo, J.-W., Rasulov, B.A., Liu, Y.-H., Hedlund, B.P., and Li, W.-J. (2018). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Endophytic Bacterial Populations From Chinese Traditional Medicinal Plant Licorice and Characterization of the Bioactive Secondary Metabolites Produced by *Bacillus atrophaeus* Against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Li, W.-Y., Liu, Y., Lin, Y.-T., Liu, Y.-C., Guo, K., Li, X.-N., Luo, S.-H., and Li, S.-H.J.P. (2020). Antibacterial harziane diterpenoids from a fungal symbiont *Trichoderma atroviride* isolated from *Colquhounia coccinea* var. *mollis*. *170*, 112198.
- Duan, R.-T., Yang, R.-N., Li, H.-T., Tang, L.-H., Liu, T., Yang, Y.-B., Zhou, H., and Ding, Z.-T.J.F. (2020). Peniterester, a carotane-type antibacterial sesquiterpene from an artificial mutant *Penicillium* sp. T2-M20. *140*, 104422.
- Biasetto, C.R., Somensi, A., Sordi, R., Chapla, V.M., Ebrahimi, S.N., Silva, G.H., Teles, H.L., Bolzani, V.d.S., Young, M.C.M., and Pfenning, L.H.J.P.L. (2020). The new koniginins TU from *Phomopsis stipata*, an endophytic fungus isolated from *Styrax camporum* Pohl. *36*, 106-110.
- Rustamova, N., Bozorov, K., Efferth, T., and Yili, A.J.P.R. (2020). Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. *19*, 425-448.
- Rustamova, N., Bobakulov, K., Begmatov, N., Turak, A., Yili, A., and Aisa, H.A.J.N.p.r. (2019). Secondary metabolites produced by endophytic *Pantoea ananatis* derived from roots of *Baccharoides anthelmintica* and their effect on melanin synthesis in murine B16 cells. *1-6*.
- Cheng, X.-W., Li, J.-Q., Jiang, Y.-J., Liu, H.-Z., and Huo, C.J.J.o.A.N.P.R. (2020). A new indolizinium alkaloid from marine-derived *Streptomyces* sp. HNA39. *1-6*.
- Yang, W., Chen, Y., Cai, R., Zou, G., Wang, B., She, Z.J.C., and Biodiversity (2020). Benzopyran Derivatives and an Aliphatic Compound from a Mangrove Endophytic Fungus *Penicillium citrinum* QJF-22.
- Nie, L.F., Huang, G., Bozorov, K., Zhao, J., Niu, C., Sagdullaev, S.S., and Aisa, H.A.J.H.C. (2018). Diversity-oriented synthesis of amide derivatives of tricyclic thieno [2, 3-d] pyrimidin-4 (3H)-ones and evaluation of their influence on melanin synthesis in murine B16 cells. *24*, 43-50.

12. Rustamova, N., Gao, Y., Zhang, Y., and Yili, A. (2020). Biological Activity of Endophytic Fungi from the Roots of the Medicinal Plant *Vernonia anthelmintica*. *Microorganisms* 8.
13. Zhang, Y., Zhu, H., Ye, G., Huang, C., Yang, Y., Chen, R., Yu, Y., and Cui, X. (2006). Antiviral effects of sophoridine against coxsackievirus B3 and its pharmacokinetics in rats. *Life Sciences* 78, 1998-2005.
14. ur Rashid, H., Rasool, S., Ali, Y., Khan, K., and Martines, M.A.U. (2020). Anti-cancer potential of sophoridine and its derivatives: Recent progress and future perspectives. *Bioorganic Chemistry* 99, 103863.

AUTHOR BIOGRAPHIES

Nigora A. Rustamova, Samarkand State University

Associate Professor of the Department of Biology, Doctor of Philosophy in Biological Sciences (PhD)

Kahramon D. Davranov, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

Doctor of Biological Sciences, Laboratory of Enzymology

Abulimiti Yili, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences

Doctor of Pharmacological Sciences, Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry in Arid Regions