$$\begin{cases} u_{1t}(x,t) - u_{1xx}(x,t) = f_1(x,t) \ , \\ \{x,t\} \in R_+ \times R_+ \ , \ u_1(x,0) = 0 \ , \\ u_1(0,t) = \lambda u_1(x,t)\big|_{x=\sqrt{t}} \ , \end{cases} \qquad (7)$$

$$\begin{cases} u_{2t}(x,t) - u_{2xx}(x,t) = f_2(x,t) \ , \\ \{x,t\} \in R_+ \times R_+ , \ u_2(x,0) = 0, \\ u_{2x}(0,t) = \lambda u_{2x}(x,t)\big|_{x=\sqrt{t}} \end{cases} \qquad (8)$$

и соответствующие сопряженные граничные задачи для (7) и (8):

$$\begin{cases} -v_{1t}(x,t) - v_{1xx}(x,t) - \bar{\lambda}\delta\left(x-\sqrt{t}\right) \otimes v_{1x}(0,t) = g_1(x,t), \\ v_1(x,\infty) \ \ \theta, v_1(0,t) \ \ v_1(\infty,t) = 0, v_{1x}(\infty,t) = 0; \end{cases} \qquad (9)$$

$$\begin{cases} -v_{2t}(x,t) - v_{2xx}(x,t) - \bar{\lambda}\delta'_x\left(x-\sqrt{t}\right) \otimes v_2(0,t) = g_2(x,t), \\ v_2(x,\infty) \ \ \theta, \ v_{\bar{2}x}(0,t) \ \ v_{2x}(\infty,t) = v_2(\infty,t) = 0; \end{cases} \qquad (10)$$

где $\lambda \in C$ – спектральный параметр, сводятся к изучению интегральных уравнений, которые в точности совпадают с уравнениями (1) и (2).

Следует отметить, что рассматриваемые в работе интегральные уравнения типа Вольтерра возникают при исследовании прикладных задач в областях с подвижными границами [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дженалиев М.Т., Рамазанов М.И., Туймебаева А.Е.* Спектрально-нагруженный оператор теплопроводности. Автомодельный закон движения точки нагрузки. Препринт №6. Алматы, 2006. 40с.

2. *Нахушев А.М.* Уравнения математической биологии. М., 1995.

3. *Дженалиев М.Т.* К теории линейных краевых задач для нагруженных дифференциальных уравнений. Алматы, 1995.

4. *Дженалиев М.Т., Рамазанов М.И.* Об одной граничной задаче для нагруженного параболического уравнения // Материалы международного российско-казахского симпозиума «Уравнения смешанного типа и родственные проблемы современного анализа и информатики». Нальчик, 2004. С. 62–65.

5. *Харин С.Н.* Тепловые процессы в электрических контактах и связанные с ними сингулярные интегральные уравнения: Автореф. дис. …канд.физ.-мат. наук. Алма-Ата, 1968.

6. *Краснов М.Л.* Интегральные уравнения. М., 1975.

Резюме

Ерекше Вольтерра интегралдық теңдеуі үшін оң жақты жарты жазықтық – спектр, ал сол жақты жарты жазықтық – резолвенталық жиын болатыны анықталған.

Summary

There is established, that all right half plane together with an imaginary axis is a spectrum, and left half plane is resolvent set for the special integral equation.

УДК 517.956

Институт математики МОН РК,
г. Алматы

Поступила 04.02.2006 г.

О.Н. ШЕМШУРА, Н.Е. БЕКМАХАНОВА, М.Н. МАЗУНИНА

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ, ИХ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ И ИДЕНТИЧНОСТЬ ИЗВЕСТНЫМ СОЕДИНЕНИЯМ

В последние годы значительно возрос интерес к фундаментальным исследованиям в области экспериментальной микологии, а также использованию продуктов синтеза микроскопических грибов в сельском хозяйстве, медицине, пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

К одному из наиболее интересных классов биологически активных соединений относятся алкалоды.

Алкалоиды – азотсодержащие органические соединения основного характера, преимущественно растительного происхождения. Строение молекул алкалоидов весьма разнообразное и нередко довольно сложное. Азот, как правило, располагается в гетероциклах, но иногда находится в боковой цепи. Чаще всего алкалоиды классифицируют на основе строения этих гетероциклов либо в соответствии с их биогенетическими предшественниками – аминокислотами. Выделяют

следующие основные группы алкалоидов: пирролидиновые, пиридиновые, пиперидиновые, пирролизидиновые, хинолизидиновые, хиназолиновые, хинолиновые, изохинолиновые, индольные, дигидроиндольные (беталаины), имидазоловые, пуриновые, дитерпеновые, стероидные (гликоалкалоиды) и алкалоиды без гетероциклов (протоалкалоиды). Многие из алкалоидов обладают специфическим, часто уникальным физиологическим действием и широко используются в медицине [1–5]. Между тем исследований их в качестве средств защиты растений проводится недостаточно. Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о высокой нематицидной, антибиотической и инсектицидной активности алкалоидов дикетопиперазинового и хинолинового рядов, выделенных из микроскопических грибов родов Penicillium и Aspergillus [6–8]. Целью данной работы явилось определение действующих концентраций полученных веществ в отношении нематод, фитопатогенов и насекомых, а также установление идентичности этих метаболитов известным стандартным соединениям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили 7 метаболитов дикетопиперазинового и хинолинового рядов, выделенных из микроскопических грибов родов Penicillium и Aspergillus.

Культивирование штаммов проводили глубинным и поверхностным способами на питательных средах: АБЕ и Чапека–Докса. Экстракцию культуральной жидкости осуществляли хлороформом при щелочных и кислых значениях pH.

Анализ экстрактов выполняли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках силуфола (ЧССР) с использованием различных подвижных фаз [9–12]. Метаболиты обнаруживали по поглощению или флюоресценции в УФ-свете и окрашивании после опрыскивания реактивами Эрлиха, $FeCl_3$, $CrSO_4$.

В качестве стандартных веществ применяли рокефортин, веррукофертин, пуберулин, хинолин. В работе использовали следующие системы растворителей:

1. Этилацетат/метанол/25% NH_4OH = (85:15:10).
2. Хлороформ/метанол /25% NH_4OH = (80:20:0,2).
3. Хлороформ/метанол /25% NH_4OH = (90:10:1).
4. Хлороформ/ацетон = (9:1).
5. Хлористый метилен/ацетон (4:1).

Элюированные и переведенные в 5% водно-спиртовый раствор фракции, аналогичные хинолиновым и дикетопиперазиновым соединениям, были исследованы в отношении различных тест-объектов. Тестирование проводилось общепринятыми методами, применяемыми в микробиологии [13–15].

В качестве тест-нематод использовали фитопаразитические нематоды Ditylenchus sp., выделенные из пораженных клубней картофеля, а также свободно живущие нематоды Eucephalobus laevis и Mononchus sp.; тест-микроорганизмов – Bacillus subtilis, Erwinia carotovora, Fusarium dimerum, Penicillium casei; тест-насекомых – личинки колорадского жука 3–4 возраста.

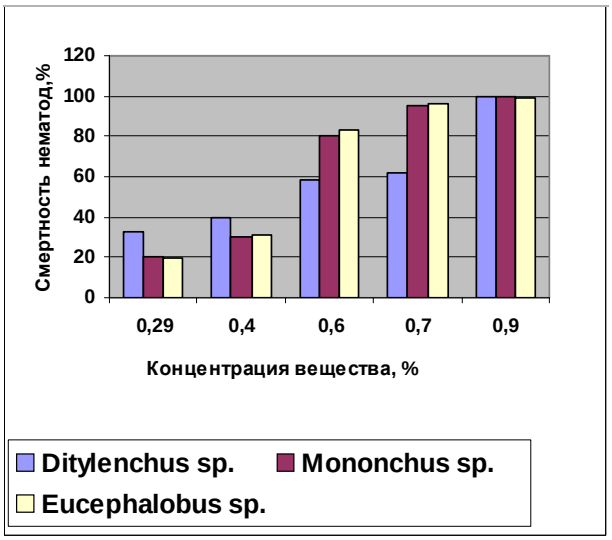
Идентичность выделенных метаболитов с известными стандартными соединениями исследовалась с использованием УФ-спектра и масс-спектра. УФ- спектр получен на приборе (UV-VIS (Carl ZEIS JENA). Масс-спектральный анализ соединений проведен методом матрично активированной лазерной десорбции и ионизации (МАЛДИ) на приборе Vision 2000 с времяпролетным анализатором масс фирмы Thermo Bioanalysis Corp. (England). Образцы на мишени облучали азотным лазером с длиной волны 337 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

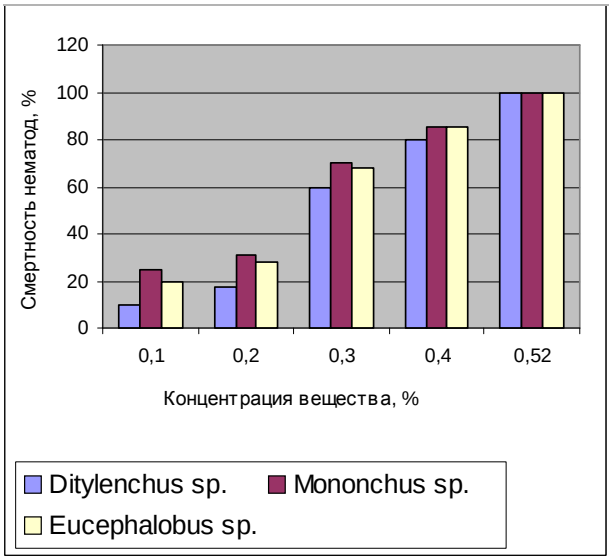
Установлены действующие концентрации для наиболее эффективных соединений хинолинового (747-х, 127-х, Р-2х, 340-1х) и дикетопиперазинового (826-д, 340-д, 747-д) рядов, выделенных из микроскопических грибов рода Penicillium, Aspergillus в отношении тест-объектов: нематод, насекомых, микроорганизмов, растений.

Летальные концентрации (ЛК) метаболитов в отношении нематод Ditylenchus sp., Mononchus sp., Eucephalobus sp. составили: 747-х ($ЛК_{100}$= = 0,57%); 127-х ($ЛК_{100}$= 0,90%); 826-д ($ЛК_{100}$= = 0,52%) (рис. 1).

Летальные концентрации (ЛК) метаболитов в отношении насекомых (личинки колорадского жука 4-го возраста) составили: 747-х ($ЛК_{100}$= =1,2%); 826-д ($ЛК_{100}$= 0,99%) (рис. 2).

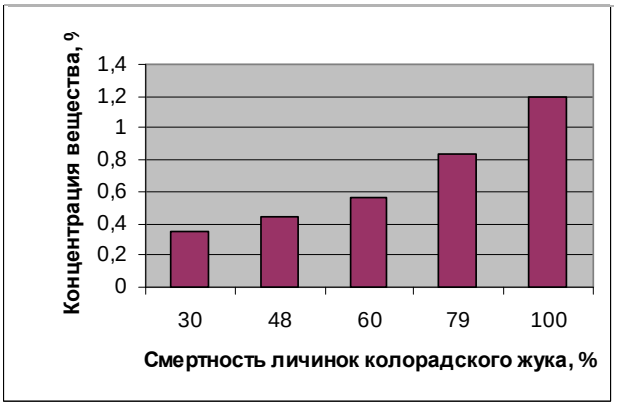


а

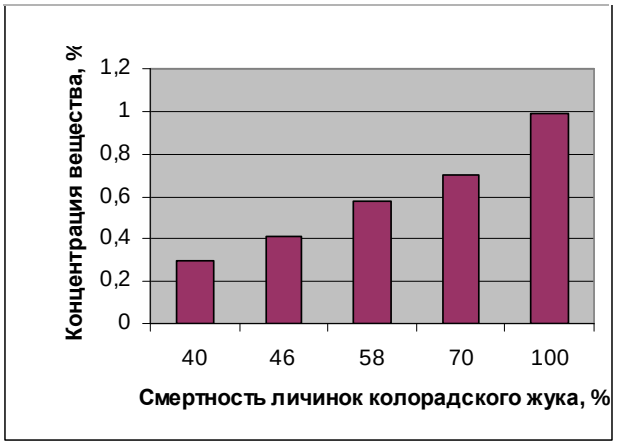


б

Рис. 1. Действующие концентрации метаболитов 127-х (а) и 826-д (б) по отношению к нематодам



а



б

Рис. 2. Действующие концентрации метаболитов 747-х (а) и 826-д (б) по отношению к насекомым

Действующая концентрация веществ, вызывающая полное бактериальное подавление Bacterium carotovorum, для метаболита 340-д составила – 1,3%; для метаболита Р-2х – 2,0%.

Для полного фунгицидного эффекта в отношении Helminthosporium sativae, Fusarium dimerum установлены концентрации для метаболита 340-1х – 1,4%; для метаболита 127-х – 0,91%.

Идентичность выделенных метаболитов с известными соединениями устанавливалась с использованием методов ТСХ, ВЭЖХ, УФ- и масс-спектрометрии. В результате было выявлено, что метаболиты 747-х и 127-х по имеющимся характеристикам: УФ-спектр 747-х (нм): (332, 320, 290, 210); масс-спектр 747-х (отн.инт.,%): (210, 205, 236); УФ-спектр 127-х (нм): (330, 315, 287, 200); масс-спектр 127-х (отн.инт.,%): (203, 208), а также данным хроматографической подвижности являются аналогами виридикатина (рис. 3-6). УФ- спектры этих соединений имеют максимумы поглощения 200–320 нм и минимумы в области 290 – 300 нм.

Масс-спектрометрия оказалась удобным инструментом при структурном изучении изохинолиновых соединений. Структурная масс-спектрометрия основана на разрушении органической молекулы под действием электронного удара и регистрации массы образующихся осколков. Измерение массы образующихся осколков и их относительного количества позволяет получить ценную информацию о строении органических соединений.

Расшифровка масс-спектров хинолинового соединения виридикатина, а также его производ-

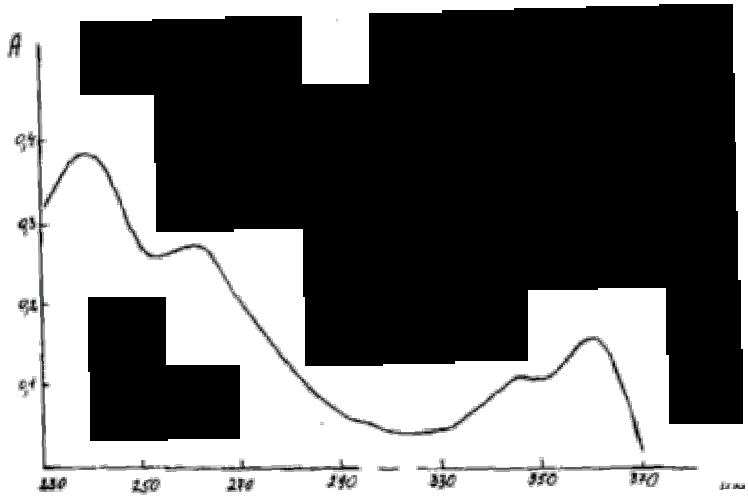


Рис. 3. УФ-спектр метаболита 747-х

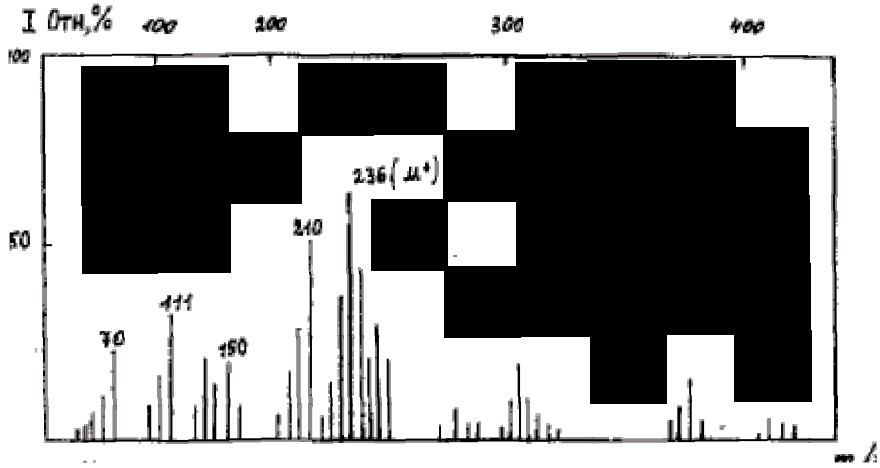


Рис. 4. Масс-спектр метаболита 747-х

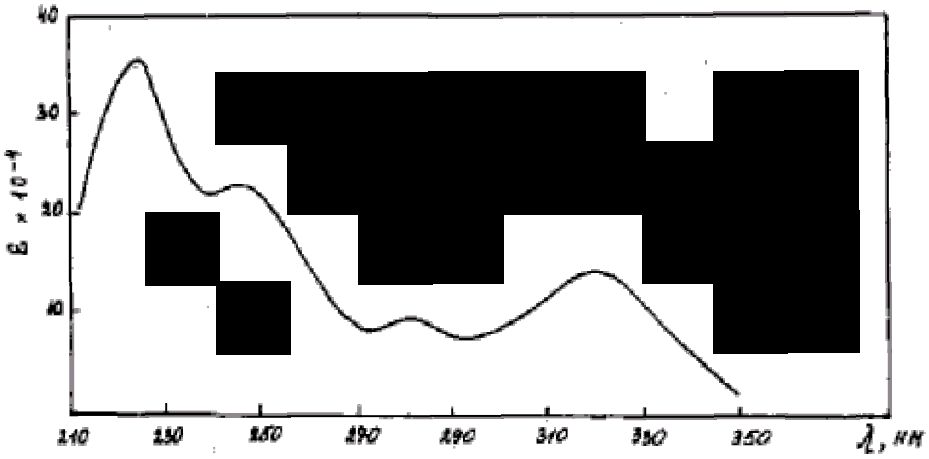


Рис. 5. УФ-спектр виридикатина

ных метаболитов 747-х и 127-х показала, что в них преобладает бета-распад по отношению к атому азота с отрывом бензильной группы и образованием интенсивного пика иона замещенного изохинолина.

Кроме закономерностей, характерных для простых изохинолинов, были также отмечены особенности образования фрагментных ионов низкой интенсивности, связанные со структурными особенностями алкалоидов, позволяющих су-

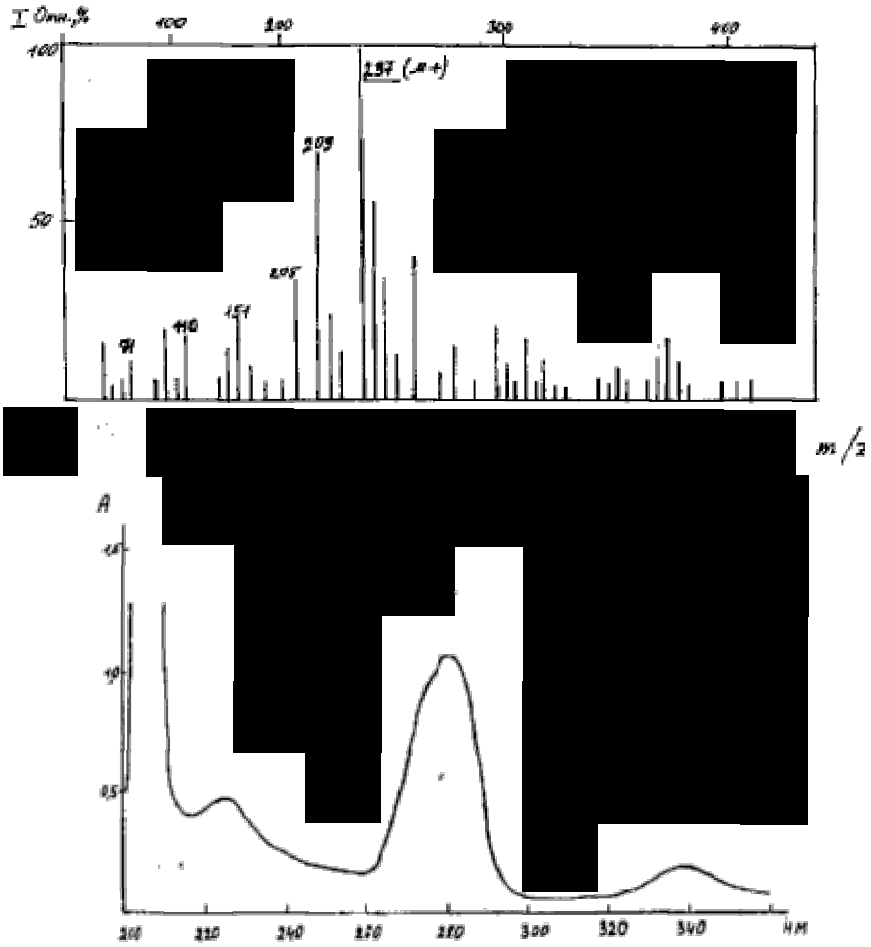


Рис. 7. УФ-спектр метаболита 826-д

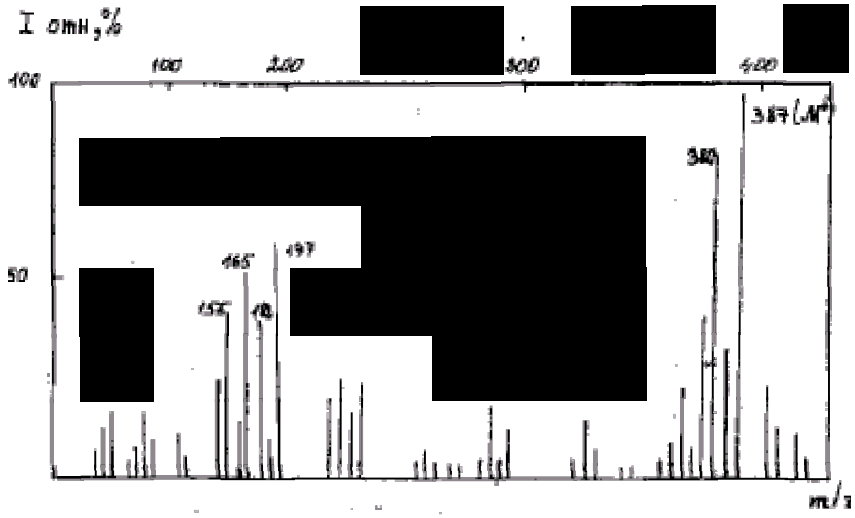


Рис. 8. Масс-спектр метаболита 826-д

дить о типе эфирной связи. Моноэфирные алкалоиды связаны «хвост к хвосту» эфирной связью 3// – 4/// (тип А), из-за наиболее благоприятного бензильного расщепления дают очень слабые молекулярные ионы (0,1%). Наиболее интенсивными являются ионы, образующиеся из колец А – В и С – D (m/e 206 и 192). Дальнейшая фрагментация этих ионов протекает в небольшой степени. Отщепление указанных колец в виде нейтральных фрагментов хотя и наблюдается, но в

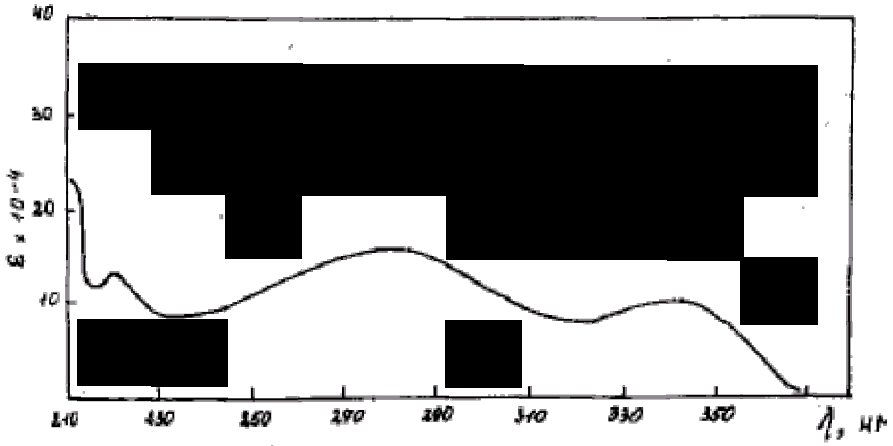


Рис. 9. УФ-спектр мелеагрина

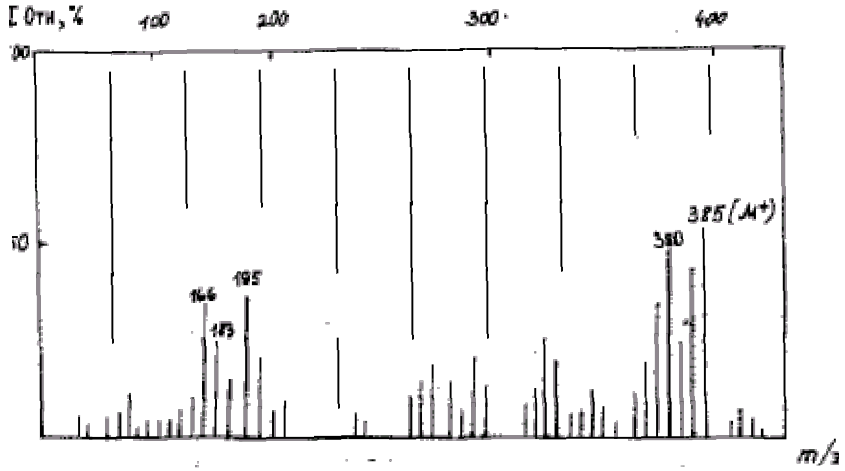


Рис. 10. Масс-спектр мелеагрина

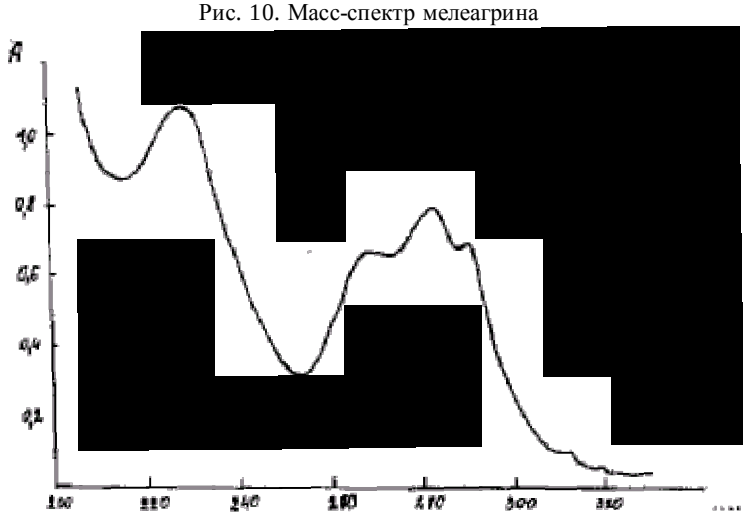


Рис. 11. УФ-спектр метаболита 340-1х

незначительной степени (0,1 – 0,2%). Стереоизомеры имеют практически одинаковые масс-спектры.

Метаболит 826-д имеет следующие характеристики: УФ-спектр (нм): (205, 223, 279, 340); масс-спектр (отн.инт.,%): (387, 380), по которым он может быть отнесен к мелеагрину (рис. 7–11).

Метаболиты 340-1х и Р-2х по данным УФ-спектра 340-1х (нм): (229, 271, 283, 290) и УФ-спектра Р-2х (нм): (229, 271, 283, 290) отнесены к N-ацетилтриптомину, также являющемуся хинолиновым производным (рис.11).

Метаболит 340-д имеет следующие характеристики: УФ-спектр (нм): (225, 310); масс-спектр (отн.инт.,%): (228, 390, 205). По биохимическим характеристикам данный метаболит является комплексным соединением, основное вещество которого отнесено к рокефортину. Данные масс-спектрометрии позволили идентифицировать его как производное соединения 3,12-дигидророкефортина с незамещенным положением 2 индольного кольца. Установлено, что этильная группа находится у атома азота имидазольного кольца, а также триптофанилдегидрогистидилдикетопиперазин. Физико-химическая характеристика этого соединения полностью совпала с данными Козловского, приведенными для продукта кислотного гидролиза рокефортина [16]. Полученный метаболит и стандартное соединение рокефортин, вероятно, связаны единой цепочкой биохимических превращений.

Метаболит 747-д по своим характеристикам: УФ-спектр (нм): (332, 272, 271, 220); масс-спектр (отн.инт.,%): (173, 200) – близок к производным индола, а именно к индолилуксусной кислоте.

Таким образом, на основании результатов изучения масс-спектров хинолиновых и дикетопиперазиновых соединений была выяснена природа слабых ионов, а также определены природа и положение заместителей в ароматических кольцах.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Турова А.Д.* Лекарственные растения СССР и их применение. Изд. 2-е. М.: Медицина, 1974. 425 с.

2. *Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А.* Лекарственные растения (растения-целители). Изд. 4-е. М.: Высшая школа, 1990. 544 с.

3. *Муравьева Д.А.* Тропические и субтропические лекарственные растения. М.: Медицина, 1997. 384 с.

4. *Пожарский А.Ф.* Гетероциклические соединения в биологии и медицине //СОЖ. 1996. №6. С. 25-32.

5. *Пасешниченко В.А.* Растения – продуценты биологически активных веществ // СОЖ. 2001. №8. С. 13-19.

6. *Шемшура О.Н., Бекмаханова Н.Е., Червякова О. В., Мазунина М.Н.* Выявление хитинолитической активности микроскопических грибов, обладающих антагонистическими свойствами // Поиск. 2004. №1(2). С.49-55.

7. *Шемшура О.Н., Бекмаханова Н.Е., Мазунина М.Н.* Антибиотическая и инсектицидная активность метаболитов гриба Aspergillus sp. // Изв. НАН РК. Сер. биол. и мед. 2004. №1. С.90-97.

8. *Шемшура О.Н., Бекмаханова Н.Е., Мазунина М.Н., Жармухаметова Г.Б.* Исследование механизма действия биологически активных веществ, выделенных из микроорганизмов на нематоды // Окружающая среда и здоровье человека. 2005. №3. С.48-50.

9. *Хайсе И.М., Мацек К.* Хроматография на бумаге. М.: ИЛ, 1962. 851 с.

10. *Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч.* Тонкослойная хроматография в клинической биохимии. М.: Мир, 1980. 551 с.

11. *Хефтман Э., Кастер Т., Нидервизер А.* и др. Хроматография. Практическое приложение метода. М.: Мир, 1986. С.130-147.

12. *Красиков В.Д.* Современная планарная хроматография //Журнал аналитической химии. 2003. Т.58, №8. С.792-807.

13. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка, 1973. 240 с.

14. *Егоров Н.С.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Московский Университет, 1983. 220 с.

15. *Мирчинк Т.Г.* Почвенная микология. М.: Московский университет, 1976. 206 с.

16. *Козловский А.Г., Винокурова Т.Ф., Соловьева И.Г.* и др. Азотсодержащие вторичные метаболиты микроскопических грибов //Прикладная биохимия и микробиология. 1996. Т.32, № 1. С.43-52.

Резюме

Саңырауқұлақтардың Penicillium және Aspergillus туыстарынан бөлініп алынған метаболиттердің жәндік Ditylenchus sp., Mononchus sp., Eucephalobus sp. нематодтарын жою концентрациясы анықталды. Bacterium carotovorum, Helminthosporium sativae және Fusarium dimerum микроорганизмдердің өсімін толық тоқтатын концентрациялары, сонымен бірге нематодтар мен жәндіктерге қатысты жою концентрациялары анықталды.

Жүргізілген метаболиттердің анықтамасы бойынша 826-д метаболитінің мегеагринге жуықтығы, 747-д метаболитінің индол туындыларына, 747-х және 127-х – виридикатинге, 340-1х және Р-2х N – ацетилүшптоминге, 340-д метаболитінің рокефортинге жуықтығы дәлел-денді.

Summary

The action concentrations of metabolites, isolated from Penicillium and Aspergillus fungi against nematodes Ditylenchus sp., Mononchus sp., Eucephalobus sp., insects were revealed. The concentrations which a full depression Bacterium carotovorum, Helminthosporium sativae, Fusarium dimerum, alsow letal concentrations against ematicide and insecticide were established.

The conducted identification of isolated metabolites has allowed to refer a metabolite 826-d to analog of meleagrine; a metabolite 747-d to derivative of indole; metabolites 747-x and 127-xto analogs of viridicatine, metabolites 340-1x and P-2x to N-acetiltriptomine and metabolite 340-d to roquefortine.

УДК 635.21:632.3

Институт микробиологии и вирусологии, г. Алматы

Поступила 02.04.2006 г.