

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 алкалоиды.

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 нематодцидной, 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 силифола (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-спиртовой 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.

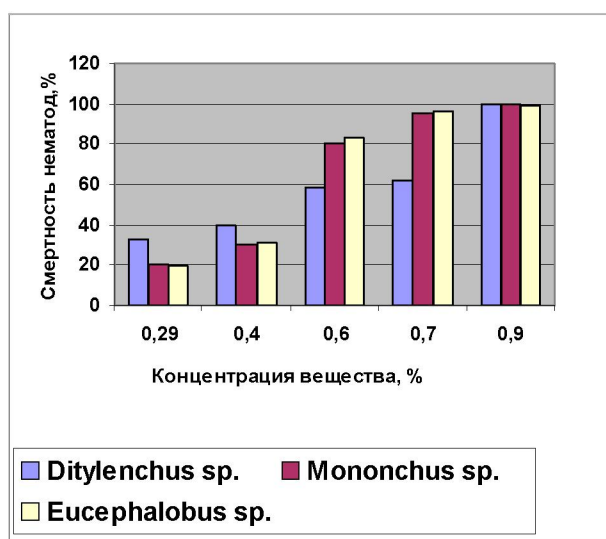
Идентичность выделенных метаболитов с известными стандартными соединениями исследовалась с использованием УФ-спектра и масс-спектра. УФ- спектр получен на приборе (UV-VIS (Carl ZEIS JENA). Масс-спектральный анализ соединений проведен методом матрично активированной лазерной десорбции и ионизации (МАЛДИ) 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

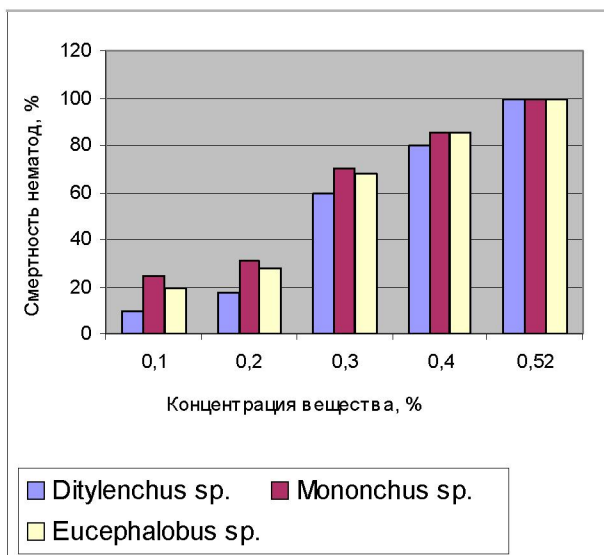
Установлены действующие концентрации для наиболее эффективных соединений хинолинового (747-х, 127-х, Р-2х, 340-1х) и дикетопиперазинового (826-д, 340-д, 747-д) рядов, выделенных из микроскопических грибов рода *Penicillium*, *Aspergillus* в отношении тест-объектов: нематод, насекомых, микроорганизмов,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

Летальные концентрации (ЛК) метаболитов в отношении нематод *Ditylenchus* sp., *Mononchus* sp., *Eucephalobus* sp. составили: 747-х (ЛК₁₀₀ = 0,57%); 127-х (ЛК₁₀₀ = 0,90%); 826-д (ЛК₁₀₀ = 0,52%) (рис. 1).

Летальные концентрации (ЛК) метаболитов в отношении насекомых (личинки колорадского жука 4-го возраста) составили: 747-х (ЛК₁₀₀ = 1,2%); 826-д (ЛК₁₀₀ = 0,99%) (рис. 2).



a



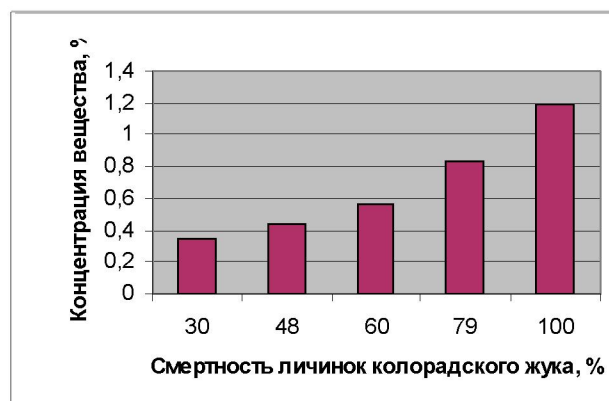
б

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

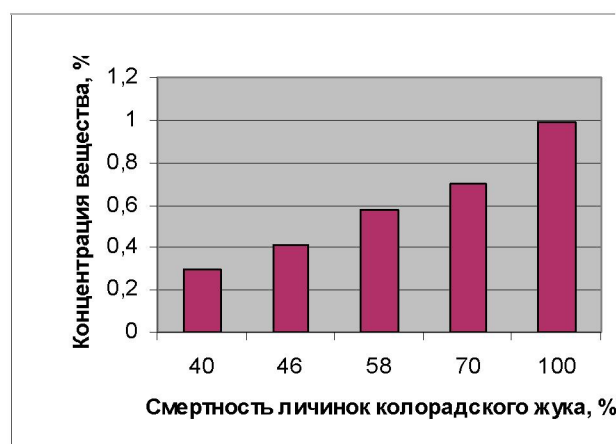
Действующая концентрация веществ, вызывающая полное бактериальное подавление *Bacterium carotovorum*, для метаболита 340-д составила – 1,3%; для метаболита Р-2х – 2,0%.

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 имеющим-



a



б

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

ся 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-

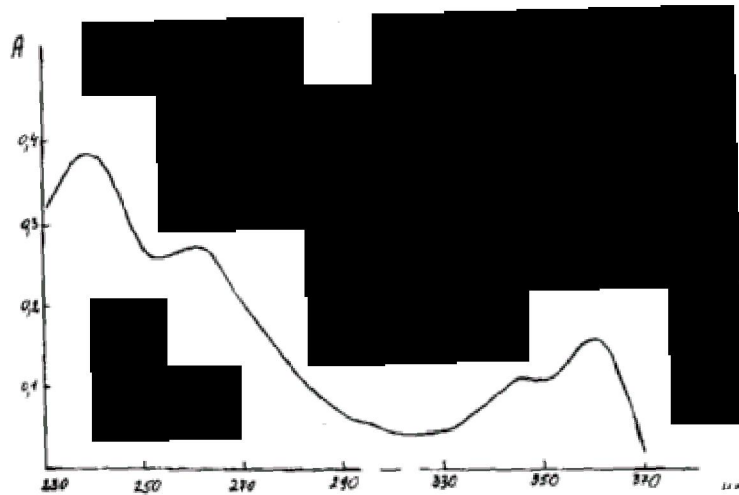


Рис. 3. УФ-спектр метаболита 747-х

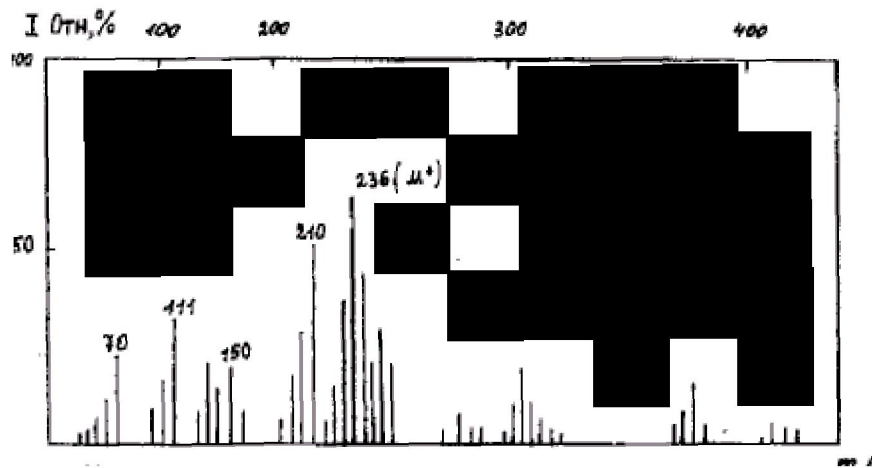


Рис. 4. Масс-спектр метаболита 747-х

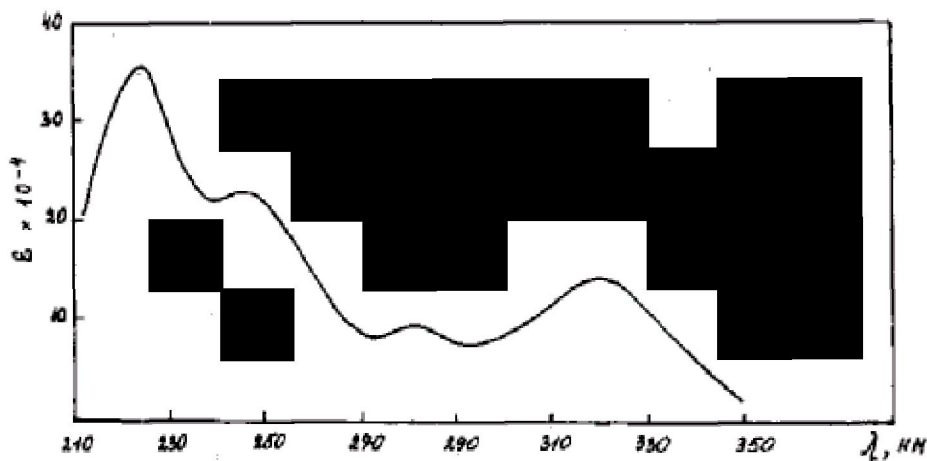


Рис. 5. УФ-спектр виридикатина

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-

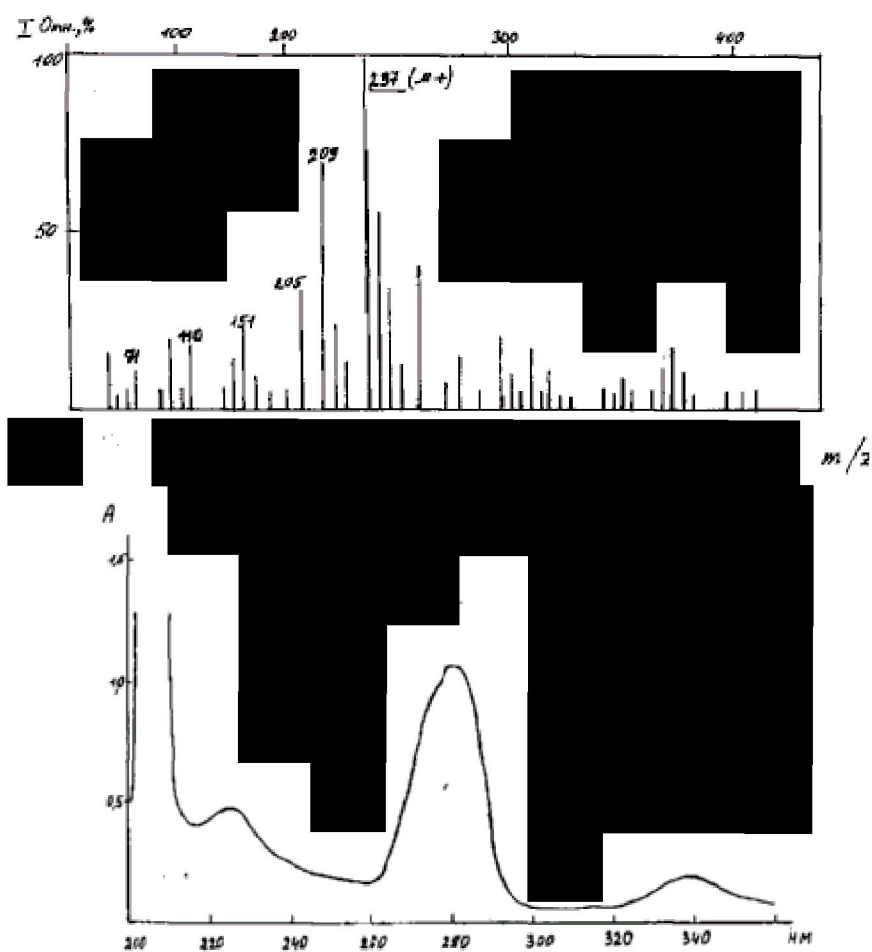


Рис. 7. УФ-спектр метаболита 826-д

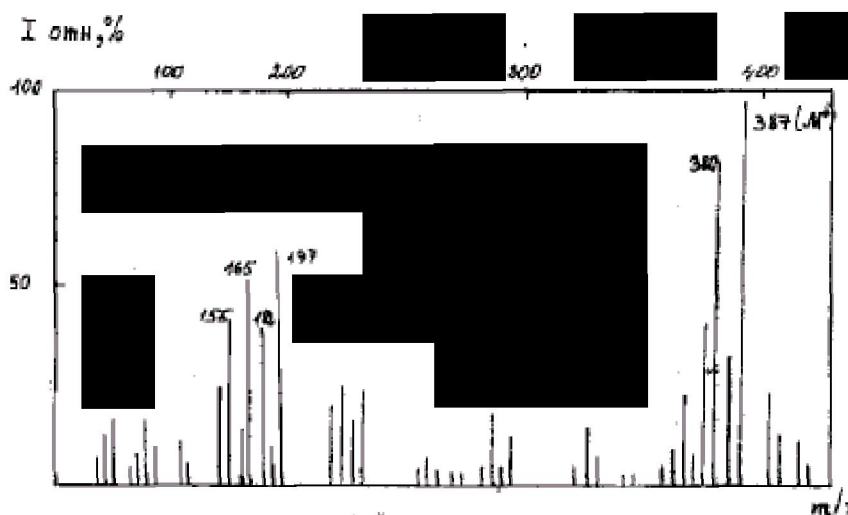


Рис. 8. Масс-спектр метаболита 826-д

дить о типе эфирной связи. Моноэфирные алкалоиды связаны «хвост к хвосту» эфирной связью 3^{II} – 4^{III} (тип А), из-за наиболее благоприятного бензильного расщепления дают очень слабые молекулярные ионы (0,1%). Наиболее интенсив-

ными 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

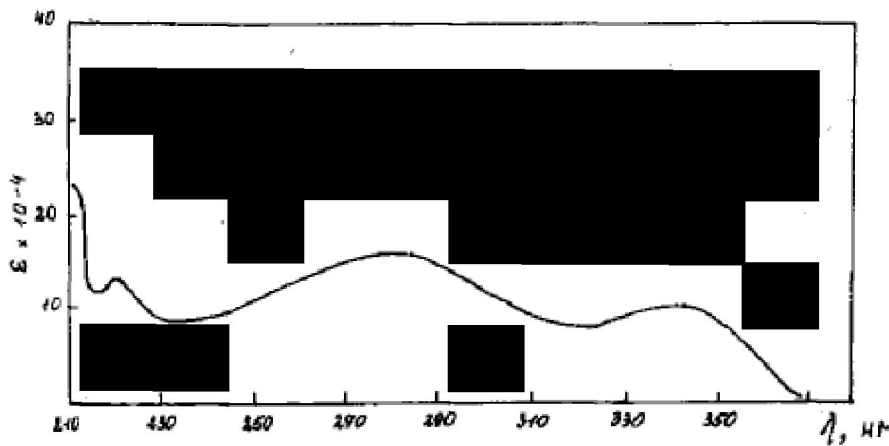


Рис. 9. УФ-спектр мелеагрина

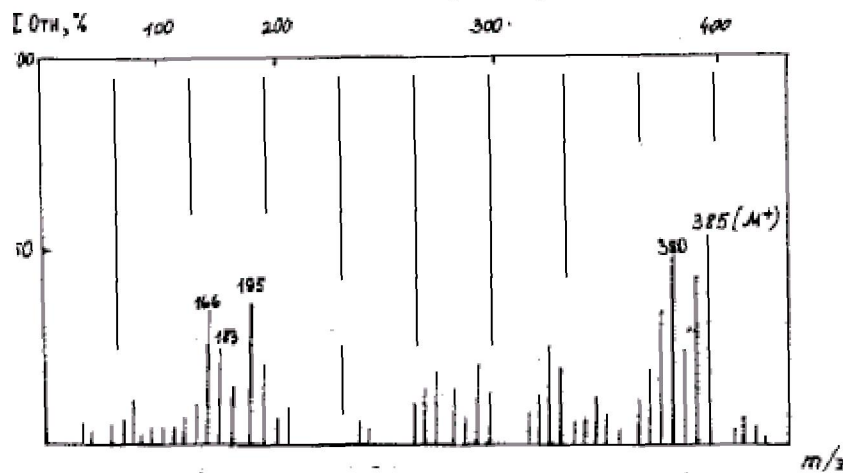


Рис. 10. Масс-спектр мелеагрина

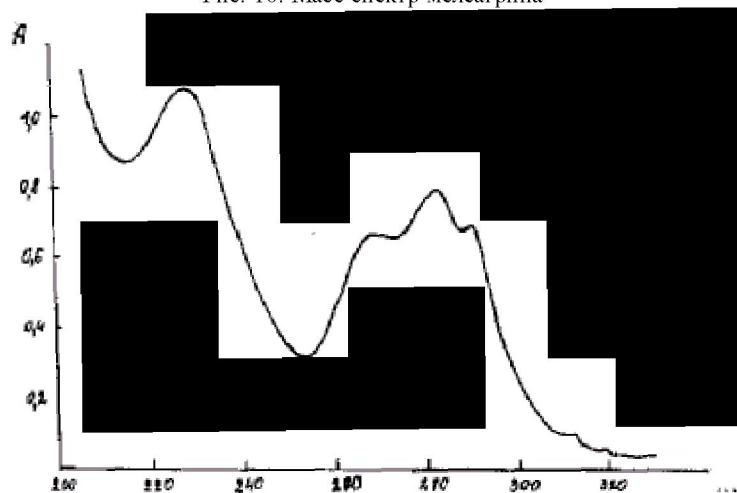


Рис. 11. УФ-спектр метаболита 340-1x

незначительной степени (0,1 – 0,2%). Stereo-изомеры 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 340-1x и P-2x по данным УФ-спектра 340-1x (нм): (229, 271, 283, 290) и УФ-спектра P-2x (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-Хмельевский 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. Пасеиниченко В.А. Растения – продуценты биологически активных веществ // СОЖ. 2001. №8. С. 13-19.
6. Шемшурова О.Н., Бекмаханова Н.Е., Червякова О. В., Мазунина М.Н. Выявление хитиноподобной активности микроскопических грибов, обладающих антагонистическими свойствами // Поиск. 2004. №1(2). С.49-55.
7. Шемшурова 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. Шемшурова О.Н., Бекмаханова Н.Е., Мазунина М.Н., Жармухамбетова Г.Б. Исследование механизма действия биологически активных веществ, выделенных из микроорга-

низмов 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. Шарцинова 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 P-2х N – ацетилүшптоминге, 340-д метаболитінің рокефортинге жуықтығы дәлелденді.

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*, also 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-х and 127-х to analogs of viridicatine, metabolites 340-1х and P-2х to N-acetilriptomine and metabolite 340-d to roquefortine.

УДК 635.21:632.3

Институт микробиологии
и вирусологии, г. Алматы

Поступила 02.04.2006 г.