



УДК 576.852.1 + 577.11

МАКРОТЕТРОЛИДЫ, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ КУЛЬТУРОЙ  
МУТАНТНОГО ШТАММА *ACTINOMYCES CHRYSOMALLUS*  
VAR. *CAROTENOIDES*

Свзрдова А. Н., Нефелова М. В., Силаев А. Б.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Из культуры мутантного штамма *Actinomyces chrysomallus var. carotenoides* была выделена смесь антибиотиков с общим выходом 0,25 мг/г сухого мицелия. С помощью данных УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектрометрии компоненты смеси идентифицированы как нонактин, монактин, динактин и тринактин в процентном соотношении 71,7; 25,6; 1,74; 0,25. Изучено хроматографическое поведение антибиотиков в тонком слое в сравнении с образцами понактина и тетранактина.

Ранее, при действии рентгеновского облучения на споры неактивного варианта штамма *Act. chrysomallus*, продуцента антибиотика аурантина, был получен мутант, обладающий антибиотической активностью и оранжевой окраской мицелия [1].

Спиртовой экстракт мицелия этой культуры имел сходный с аурантином антимикробный спектр действия и максимум поглощения света при 440—450 нм, но отличался от него условиями выделения из мицелия и хроматографическим поведением [2].

Антибиотики изучаемого штамма при росте культуры как на агаризованных, так и на жидких средах содержатся в мицелии.

Целью настоящей работы явилось выделение и идентификация антибиотических веществ из культуры мутантного штамма *Actinomyces chrysomallus var. carotenoides* [3].

Выделение антибиотиков из мутантного штамма потребовало прежде всего усовершенствования применявшегося ранее [2] метода извлечения, основанного на экстрагировании его из высушенного и растертого в порошок мицелия. Наиболее удобной и специфической оказалась экстракция мицелия смесями органических растворителей с водой. При этом значительно снижалось количество извлеченных липофильных продуктов биосинтеза.

Для выделения антибиотиков их экстрагировали из водно-спиртовой вытяжки мицелия этилацетатом или петролейным эфиром и далее очищали перекристаллизацией из *n*-гексана. Был получен бесцветный кристаллический продукт с т. пл. 136—138°, совершенно нерастворимый в воде и водных растворах кислот и щелочей и растворимый во многих органических растворителях.

При хроматографировании мицелиальных экстрактов на колонке с биогелем Р-2 в линейном градиенте растворителей вода → этанол неокрашенные продукты с антибиотической активностью элюируются с колон-

ки в интервале концентраций этанола от 20 до 70%, в то время как элюция окрашенных веществ начинается при концентрации этанола 80%. Следовательно, эти антибиотики не принадлежат к группе актиномицинов [4].

Проверка антибиотического действия веществ методом серийных разведений показала, что антибиотик подавляет рост грамположительных бактерий, микобактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, актиномицетов, но не действует на грамотрицательные бактерии.

Методом разведений и диффузии в агар были определены минимальные концентрации вещества, подавляющие рост следующих микроорганизмов (мкг/мл): *Sarcina phlava* — 0,02, *Bacillus subtilis* — 0,03, *Micrococcus aurantiacus* — 0,1, *Micobacterium lacticolum* — 0,35.

ТСХ на силикагеле ИСЛ<sub>254</sub> в ряде систем показала, что кристаллический продукт представляет собой смесь веществ, трудно поддающуюся разделению. Были получены три биологически активные фракции с  $R_f$  0,30; 0,46; 0,55 и неактивные — с  $R_f$  0,67; 0,76; 0,87; 0,91 и 1,00. Однако попытки получить чистые продукты путем хроматографии не привели к положительным результатам. Из этого следовало, что антибиотики — семейство очень близких по химическим свойствам веществ.

Согласно результатам микроанализа, продукты биосинтеза, обладающие антибиотическими свойствами, не содержат азота, фосфора и серы. В состав антибиотиков входят (%): углерод — 62,12, водород — 8,72 и кислород — 26,16.

В ИК-спектре антибиотиков наблюдается интенсивная полоса поглощения, характерная для сложноэфирной группы  $1726\text{ см}^{-1}$ , а также полосы в области  $1050\text{—}1120\text{ см}^{-1}$ , указывающие на наличие простых эфирных связей. Полосы, свойственные амидным группам, отсутствуют. В УФ-спектре при  $200\text{—}600\text{ нм}$  наблюдается одна полоса поглощения с  $\lambda_{\text{макс}}$   $212\text{ нм}$ .

В ЯМР-спектре присутствуют пять групп хорошо выраженных сигналов  $\delta$  1,02—1,30; 1,30—2,10; 2,4; 3,8; 4,9 м. д., которые по положению, характеру расщепления и относительной интенсивности сигналов полностью совпадают с описанными для антибиотика-макротетролида нонактина [5—7]. Анализ масс-спектров исследуемой смеси антибиотиков позволил определять величины  $m/e$  молекулярных ионов индивидуальных компонентов смеси — 736, 750, 764 и 778, а также проследить за характером фрагментации основного компонента смеси с  $m/e$  736. В спектре наблюдались интенсивные массовые пики с  $m/e$  721 ( $M^+ - 15$ ), 718 ( $M^+ - 18$ ) и 708 ( $M^+ - 28$ ), что характерно для масс-спектра нонактина [7].

Спектральные характеристики, антимикробные свойства и элементный состав выделенных антибиотиков полностью совпадают с приведенными в литературе данными для антибиотиков группы нонактина [8—10]. Вещество с  $M$  736 — нонактин, а минорные составляющие с  $M$  750, 764 и 778, очевидно, гомологи нонактина — монактин, динактин и тринактин соответственно [7]. Это подтверждается появлением в спектре ЯМР характерного для этих соединений триплета с  $\delta$  0,88—0,91, преобразованием специфического для нонактина триплета с  $\delta$  3,8 м. д. в квинтет [11], а также наличием массовых пиков с  $m/e$  190, 383, 567 и 581 в масс-спектре исследуемой смеси [7].

Отношение интенсивности молекулярных пиков дает следующий процентный состав гомологов в смеси: нонактин — 71,7, монактин — 25,6 и следовые количества динактина — 1,74 и тринактина — 0,25.

Было проведено сравнительное изучение хроматографического поведения антибиотического комплекса, выделенного из мутантного штамма *Act. chrysomallus var. carotenoides* и образцов нонактина и тетрактина с содержанием основного вещества 70 и 80% соответственно. Результаты этих исследований приведены в таблице, из которой видно, что пятно, соответствующее нонактину, всегда присутствует в исследуемой смеси. Однако на основании хроматографических данных не удается однозначно определить наличие тетрактина в антибиотическом комплексе.

**Сравнение хроматографической подвижности антибиотического продукта *Act. chrysomallus var. carotenoides* со стандартными образцами нонактина и тетранактина в тонком слое**

Носитель	Система растворителей	Значение $R_f$		
		исследуемое вещество	нонактин	тетранактин
Силикагель G	Хлороформ — этилацетат, 2 : 1	0,0+	0,0—	0,0—0,62+
		0,32+	0,35+	
		0,96—	0,96—	
Силикагель L	То же	0,0+	0,0+	0,0—0,47+
		0,0—1,0—	0,0—1,0—	
»	Хлороформ — этилацетат, 1 : 1	0,0—	0,0—	0,0—
		0,22+	0,26+	0,37+
		1,0—		0,77+
Силикагель G	Этилацетат	0,0—	0,0—	0,79+
		0,77+	0,80+	0,97—
Кизельгель	Хлороформ — этилацетат, 1 : 1	0,37+		
		0,50+		
		0,54+	0,68+	0,0—0,76+
Силикагель L	Метанол	0,67—1,00—	0,88—	0,82—1,00—
		0,0—		0,0+
		0,35+	0,30+	0,54+
Кизельгель	»	0,97—	1,0—	0,84+
		0,68+	0,73+	0,2—0,88+
Силикагель G	Гексан — диэтиловый эфир, 1 : 2	0,0—0,2+	0,0—0,19+	0,0—0,43+
»	Гексан — этилацетат, 1 : 6	0,79+	0,75+	0,12—0,78+
Силикагель L	То же	0,0—		0,0—0,66+
		0,27+	0,31+	0,90—
		0,62—		1,0—
Кизельгель	»	0,80+	0,85+	0,0—0,31+
		1,0—	1,0—	0,80+ (осн.)
				1,0—
»	Этанол — гексан, 1 : 1	0,67+	0,0—0,23+	0,0—0,5+
		0,32+	0,67+ (осн.)	0,5—0,73+
»	Метанол — хлороформ, 1 : 1	0,84—	0,84—	0,5+
		0,93+ (осн.)	0,93+ (осн.)	0,84+
				0,93+ (осн.)

Примечание: «+» и «—» означают биологическую активность веществ на *Vac. subtilis*, «осн.» — наиболее интенсивное пятно на хроматограмме.

Наличие четырех близких гомологов в выделенной смеси объясняет результаты хроматографического поведения кристаллического продукта, так как известно [12], что гомологи макротетролидных антибиотиков плохо разделяются при хроматографии. Кроме того, становится понятной причина значительного понижения температуры плавления полученного нами продукта в сравнении с температурой плавления чистого нонактина (148°, [7]).

Таким образом, при использованном методе выделения получается смесь, состоящая из четырех основных компонентов. Дополнительные продукты, обнаруживаемые при хроматографии, по-видимому, присутствуют в весьма малых количествах, не фиксируемых другими методами анализа.

В нашей работе нонактин и его гомологи впервые выделены из мутантного варианта штамма *Act. chrysomallus*. Синтез антибиотиков макротетролидов наряду с красно-оранжевыми пигментами, принадлежащими к каротиноидам, отличает *Actinomyces chrysomallus var. carotenoides* от других актиномицетов, продуцирующих эти антибиотики.

### Экспериментальная часть

*Actinomyces chrysomallus var. carotenoides* выращивали на синтетической среде, содержащей крахмал (3%), азотнокислый калий (0,5%), двухзамещенный фосфат калия (0,08%), пептон (0,5%), хлористый натрий (0,1%),

сульфат магния (0,05%). Культуру выращивали при перемешивании на качалке и температуре 28° в течение 72 ч.

Для извлечения суммы антибиотиков 200 г промытого и отцентрифугированного мицелия экстрагировали 3 раза по 250 мл 60—70%-ным водным изопропанолом в течение 4—6 ч при температуре 40°. Изопропанольный раствор отделяли от мицелия фильтрацией на воронке Бюхнера, маточники объединяли и экстрагировали смесью этилацетата и *n*-гексана (5 : 1) в делительной воронке. Нижний слой отбрасывали, верхний дважды отмывали от изопропилового спирта водой, фильтровали через безводный сульфат натрия и упаривали в вакууме почти досуха. Остаток перекристаллизовывали из *n*-гексана и подвергали хроматографическому анализу в тонком слое на силикагеле ЛСЛ<sub>254</sub> (диаметр зерен  $\frac{5}{40}$  мм), силикагеле G и L, кизельгеле DC «Firtigplatten» («Merck», ФРГ). Хроматограммы проявляли йодом.

Колоночную хроматографию на биоэле P-2 («Bio-Rad», США) проводили с использованием линейного градиента вода → 80%-ный этиловый спирт, колонка 2 × 30 см, общий объем элюата 1350 мл, скорость элюции 1 мл/мин, собирали фракции по 5 мл.

ИК-спектры снимали в *n*-гексане и вазелиновом масле на спектрофотометре UR-20 (Karl Zeiss, ГДР), УФ-спектры — на саморегистрирующем спектрофотометре «Specord UV VIS» (Karl Zeiss, ГДР), масс-спектры — на масс-спектрометре ЛКВ 9000 (Швеция). Энергия ионизирующих электронов 70 эВ, температура ионизационной камеры 270°, температура испарения образца 120°.

Спектры ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре XL-100-15 («Varian», США) с внутренним стандартом тетраметилсиланом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Саруханова Л. Е., Нефелова М. В. (1971) Вестн. моск. ун-та, биол., почвовед., 5, 113—115.
2. Нефелова М. В., Саруханова Л. Е., Силаев А. Б. (1972) Антибиотики, 10, 878—882.
3. Нефелова М. В., Филиппова М. С. (1968) Микробиология, 37, 814—817.
4. Brockman H. (1960) Fortschritte der Chemie organic Naturstoffe, 18, 1—48.
5. Dominguez J., Dunitz J. D., Gerlach H., Prelog V. (1962) Helv. chim. acta, 45, 128—138.
6. Haneda M., Nowata Y., Hayashi T., Ando K. (1974) J. Antibiot., 27, 555—557.
7. Keller-Schierlein W., Gerlach H. (1968) Fortschritte der Chemie organic Naturstoffe, 26, 177—181.
8. Nishimura H., Mayama T., Kimura T., Kimura A., Kawamura Y., Tawara K., Tanaka Y., Okamoto S., Kyotani H. (1964) J. Antibiot., A17, 11—22.
9. Wallhäuer K. H., Huber G., Neemann D., Präve P., Zepf K. (1964) Arzneimittelforschung, 14, 356—360.
10. Meyers E., Pansy F. E., Perlman D., Smith D. A., Weisenborn F. J. (1965) J. Antibiot., 18, 128—129.
11. Beck J., Gerlach H., Prelog V., Vosser W. (1962) Helv. chim. acta, 45, 620—630.
12. Gerlach H., Hütter R., Keller-Schierlein W., Seibl J., Zähler H. (1967) Helv. chim. acta, 50, 1782—1793.

Поступила в редакцию  
22.VII.1975

После переработки  
5.XI.1975

#### MACROTETROLIDES PRODUCED BY THE CULTURE OF MUTANT STRAIN *ACTINOMYCES CHRYSOMALLUS VAR. CAROTENOIDES*

SVERDLOVA A. N., NEFELOVA M. V., SILAEV A. B.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Macrotetrolide antibiotics nonactin, monactin, dinactin and trinactin have been isolated from the culture mutant strain *Actinomyces chrysomallus var. carotenoides*. The total yield of antibiotics amounted up to 0.25 mg per g of dry mycelium. Mass-spectral determination of nonactin, monactin, dinactin, and trinactin content in total antibiotic gave 71.7, 25.6, 1.74 and 0.25 per cent, respectively.