



УДК 615.779.931

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА А-ФАКТОРА

Плинер С. А., Клейнер Е. М., Корнищкая Е. Я.,  
Товарова И. И., Розынов Б. В., Смирнова Г. М.,  
Хохлов А. С.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Из культуральной жидкости мутантного штамма 751 *Actinomyces streptomycini* выделен А-фактор ( $C_{13}H_{22}O_4$ )-регулятор, обеспечивающий как нормальное развитие актиномицета, так и образование стрептомицина. Получены дикарбонилат, ди-*n*-бромкарбонилат, диацетат, ди-3,5-динитробензоат и ди-(триметилсилильное) производные А-фактора ацилированием или алкилированием его с помощью соответствующих агентов в пиридине при комнатной температуре. Данные ИК-, ЯМР-, масс- и УФ-спектров исходного соединения и его производных указывают на то, что оно имеет *M* 242, брутто-формулу  $C_{13}H_{22}O_4$  и содержит гидроксильную, карбонильную и изопропилную группы. Диацетат и ди-3,5-динитробензоат обладают биологической активностью, сопоставимой с активностью исходного А-фактора.

При изучении путей биогенеза стрептомицина было обнаружено, что ряд неактивных и малоактивных мутантов *Actinomyces streptomycini* (751, 751-17, 1211, 453 и др.) продуцируют вещество (А-фактор), которое, будучи прибавлено к культуре (в начальный период развития) некоторых нулевых штаммов (1439, 130, 127, 128, 1200, 751-20 и др.), способно вызывать у них образование антибиотика. Количество полученного стрептомицина при соблюдении соответствующих условий опыта в определенных пределах пропорционально количеству взятого А-фактора. Было установлено, что все активные продуценты стрептомицина, относящиеся к виду *Actinomyces streptomycini*, также содержат в культуральной жидкости это соединение [1, 2]. А-фактор, помимо стимулирования биосинтеза антибиотика, влияет на клеточную дифференциацию, вызывая образование спор у аспорогенных штаммов и изменения в морфологии культур [3]. Эти наблюдения позволяют считать его биорегулятором, обеспечивающим как нормальное развитие актиномицета, так и биосинтез стрептомицина.

В данном сообщении описываются методы выделения и очистки А-фактора и дается его общая характеристика. Он извлекается из культуральной жидкости мутанта 751 [4], выращенного в ферментерах на среде с кукурузным экстрактом. Получение этого вещества сопряжено с большими трудностями, так как содержание его в культуральной жидкости очень низко (~0,4 мг/л, тогда как примеси составляют ~50 г/л). Биологическая активность А-фактора оценивается по количеству стрептомицина, образуемого при ферментации мутантного штамма 1439, не способного синтезировать антибиотик в отсутствие этого вещества.

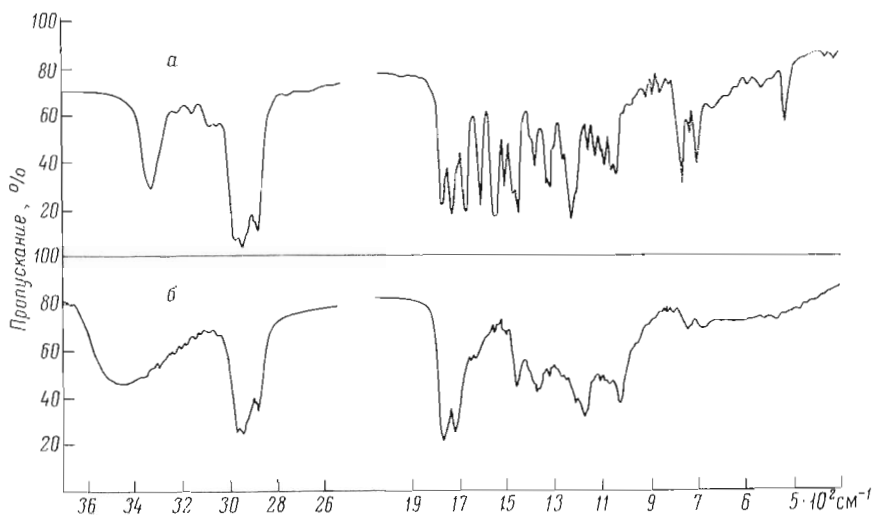
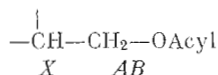


Рис. 1. ИК-спектры: *a* — дикарбанилата А-фактора (в пасте с вазелиновым маслом); *б* — А-фактора (в пленке вещества)

Схема выделения А-фактора приведена в таблице и подробно описана в экспериментальной части. Соединение охарактеризовано в виде дикарбанилата, для которого на основании данных элементного анализа и масс-спектра определена брутто-формула  $C_{27}H_{32}N_2O_6$  ( $M$  480). Наличие карбанилатной группы подтверждается ИК-спектром (амид I для уретана —  $1730\text{ см}^{-1}$ , амид II —  $1550\text{ см}^{-1}$ ,  $\nu_{NH}$  —  $3315\text{ см}^{-1}$ , ароматическое ядро —  $1505, 1605\text{ см}^{-1}$ , рис. 1, *a*). В УФ-спектре имеются  $\lambda_{\text{макс}}$  206 и 238 нм ( $\xi$  69 000 и 22 000, в этаноле), причем максимум поглощения ароматического ядра смещен в коротковолновую область за счет влияния амидной группы. О присутствии двух карбанилатных групп в соединении свидетельствуют данные масс-спектра (рис. 2, *a*), в котором имеются пики ионов с  $m/e$  361 ( $M-C_6H_5N=CO$ )<sup>+</sup> и 242 ( $M-119-119$ )<sup>+</sup>, а также спектра ЯМР ( $\delta_{NH}$  6,71 и 9,49 м.д. и ароматические протоны в области 7,1–7,7 м.д., рис. 3). Возможность присоединения к молекуле А-фактора двух ацильных или алкильных остатков показана также на примере получения ряда его производных: диацетата, ди-3,5-динитробензоата, ди-*n*-бромкарбанилата и ди-(триметилсилильного) производного, в масс-спектрах которых есть пики ионов с  $m/e$  326, 630, 638, 386 ( $M^+$  соответственно), 284, 435, 439 и 314 ( $M\text{-Acyl}$  или  $Alk$ )<sup>+</sup> и 242 ( $M\text{-Acyl-Acyl}$  или  $M\text{-Alk-Alk}$ )<sup>+</sup>. Один из заместителей, очевидно, находится при первичном гидроксиле, что видно из масс-спектра ди-(триметилсилильного) производного, в котором пик иона с  $m/e$  283 ( $M\text{-CH}_2\text{OSiMe}_3$ )<sup>+</sup> является одним из самых интенсивных, а также спектра ЯМР дикарбанилата, имеющего трехспиновую систему *ABX*, принадлежащую фрагменту —



( $\delta_A$  4,41;  $\delta_B$  4,68;  $\delta_X$  3,4 м.д.;  $J_{AX}$  4,6;  $J_{BX}$  5,0;  $J_{AB}$  11,7 гц: определено методом JNDOR).

На основе масс-спектрометрических данных производных А-фактора можно сделать вывод как о количестве заместителей, так и о молекулярном весе исходного соединения, который равен 242 (это согласуется с масс-спектром самого А-фактора, рис. 2, *б*), а также о его брутто-формуле  $C_{13}H_{22}O_4$ . Физико-химическое изучение этого соединения позволяет дать его первичную характеристику. УФ-спектр вещества имеет пик с  $\lambda_{\text{макс}}$

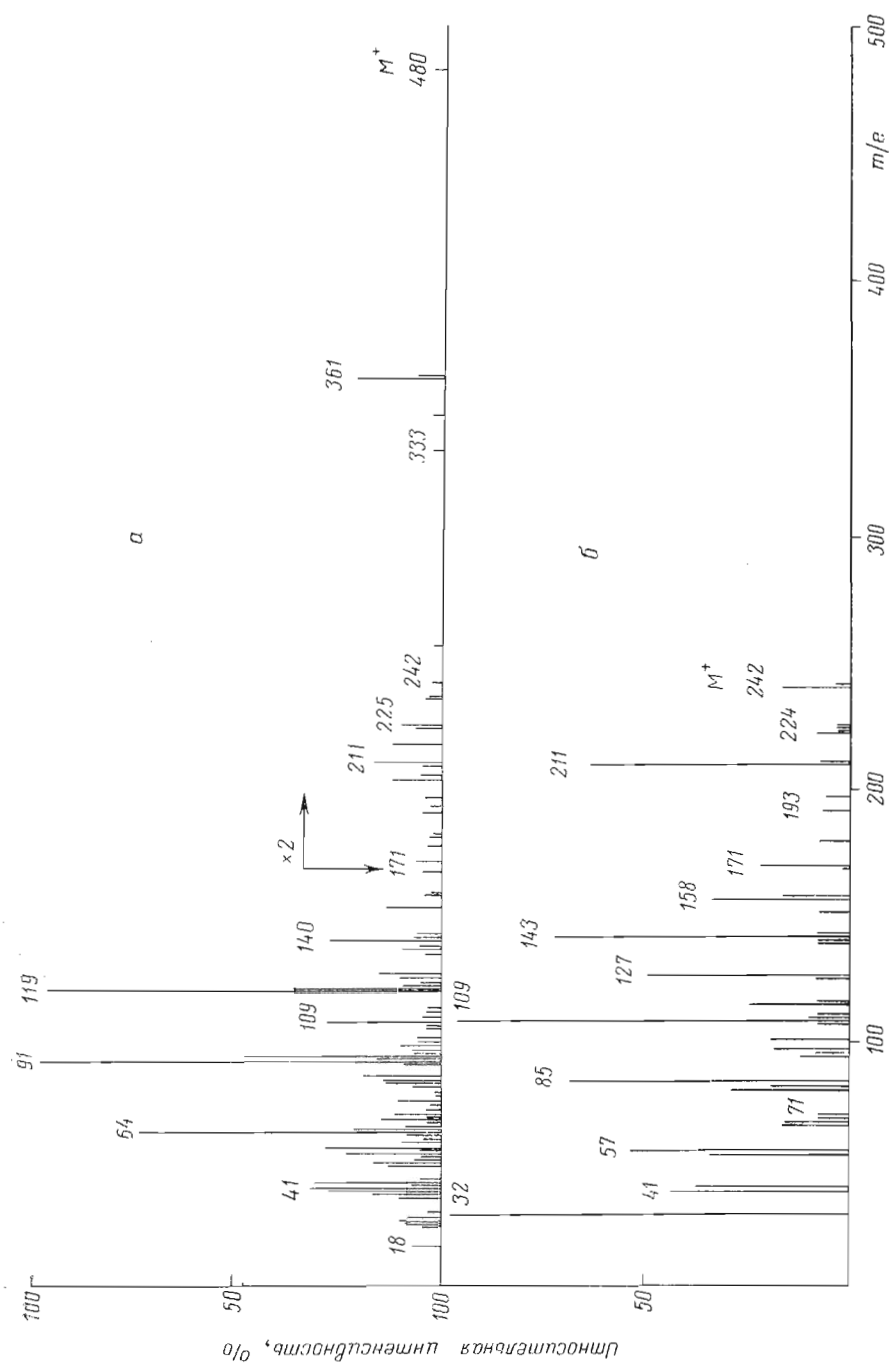


Рис. 2. Масс-спектры: а — дикарбанилата А-фактора, б — А-фактора

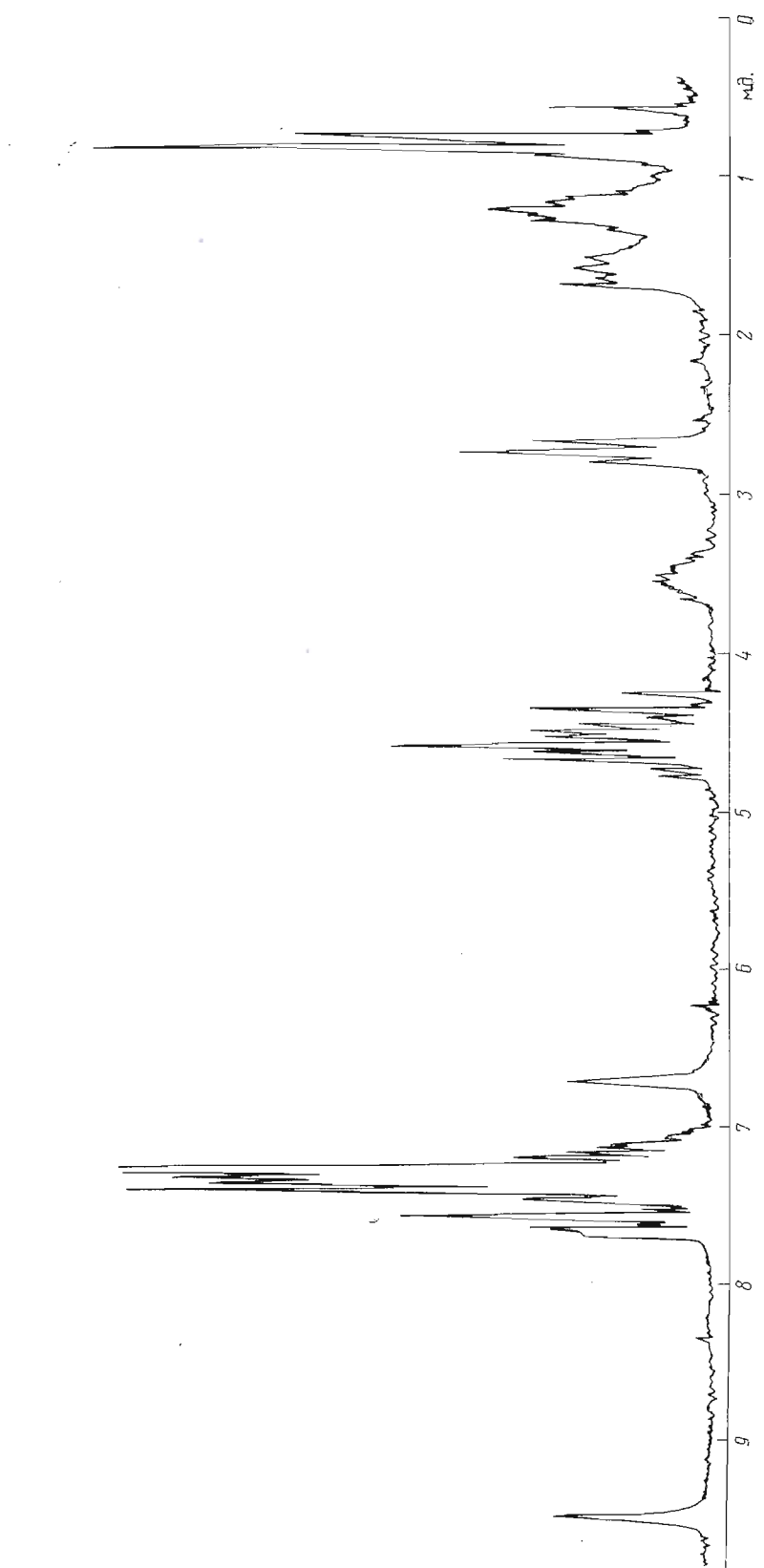


Рис. 3. Спектр ЯМР дикарбанила А-фактора

206 нм ( $\xi$  1620, в гексане) и слабую полосу в области 247 нм. В масс-спектре А-фактора присутствуют пики ионов с  $m/e$  224 ( $M-H_2O$ )<sup>+</sup> и 241 ( $M-CH_2OH$ )<sup>+</sup>, а в ИК-спектре (рис. 1, б) — полосы поглощения в диапазоне 3400—3500  $см^{-1}$ , что говорит о наличии в соединении гидроксила. Это подтверждается получением ранее упомянутых производных (диацетата, дикарбанилата и др.). В ИК-спектре А-фактора имеются также карбонильные полосы поглощения (1720 и 1770  $см^{-1}$ ). О присутствии в соединении С-изопропильной группы свидетельствуют данные ЯМР. В спектре ЯМР А-фактора имеются два дублета метильных групп при 0,76 и 0,77 м.д., которым в спектре дикарбанилатного производного соответствует дублет при 0,8 м.д. с интенсивностью в 6 протонных единиц; взаимодействие последнего с метилом ( $\delta$  1.47 м.д.) показано методом двойного ЯМР. Дикарбанилатное и ди-*n*-бромкарбанилатное производные биологически неактивны, тогда как активность диацетата и ди-3,5-динитробензоата сопоставима с активностью исходного вещества. Возможно, последние два соединения неактивны как таковые, но в культуре *Actinomyces streptomycini* присутствуют соответствующие эстеразы, способные превращать их в А-фактор в процессе испытания активности.

### Экспериментальная часть

Масс-спектры снимали на масс-спектрометре МХ-1309, снабженном системой прямого ввода образца в ионный источник при температуре испарения 70° и ионизирующем напряжении 70 эВ, и на приборе — ЛКВ-9000 при 50° и энергии ионизации 70 эВ, спектр ЯМР на спектрометре «Varian» XL-100 при 100 МГц ( $CDCl_3$ ), химические сдвиги приведены в  $\delta$ -шкале от сигнала тетраметилсилана, принятого за 0; ИК-спектры — на приборе UR-20; УФ-спектры — на спектрометре «Specord» UV Vis и СФ-4.

**Ферментация.** Использовали мутантный штамм 751 *Actinomyces streptomycini*. Среда для приготовления посевного материала содержала, %: соевую муку — 3; кукурузный экстракт — 1,5; глюкозу — 4;  $(NH_4)_2SO_4$  — 0,6; NaCl — 0,25;  $CaCO_3$  — 0,6;  $KH_2PO_4$  — 0,025. Среда для ферментации имела состав, %: кукурузный экстракт — 1,4;  $(NH_4)_2SO_4$  — 0,4; крахмал — 1,5; глюкоза — 1; NaCl — 0,5;  $CaCO_3$  — 0,5.

Посевной материал выращивали в колбах на качалке (48 ч, 28°), передавали в количестве 2% в ферментеры емкостью 50 л (20 л среды), где проводили культивирование в течение 36 ч при 28° и подаче воздуха 1,5 объема на 1 объем среды в минуту. Полученную биомассу использовали для засева ферментеров емкостью 1000 л (500 л среды). Ферментацию вели в течение 42—66 ч при аэрации 1 объемом воздуха на 1 объем среды в минуту. В качестве пеногасителя брали кашалотовый жир.

**Выделение А-фактора из культуральной жидкости мутантного штамма 751 *Actinomyces streptomycini*.** 500 л культуральной жидкости (25 кг сухого веса, активность 0,5 ед/мкг) экстрагировали 50—70 л хлороформа. Органический слой уваривали, остаток эмульгировали в воде (30—50 л), отстоявшееся масло отбрасывали и вновь проводили обработку хлороформом (5—7 л). После отгонки растворителя было получено 10—12 г полупродукта I (активность 1000 ед/мкг), который хроматографировали на колонке с кремневой кислотой (на 1 г вещества — 5 г кремневой кислоты). Примеси элюировали бензолом, а активную фракцию десорбировали эфиром. К полупродукту II (0,5—0,7 г) добавляли смесь воды (300 мл) и петролейного эфира (150 мл) и встряхивали на качалке 3 ч. Активную фракцию, находящуюся, в основном, в водной фазе, экстрагировали хлороформом (2×100 мл) и получали 0,25—0,3 г полупродукта III. Последний растворяли в 4 мл бензола и наносили на колонку (4,1×140 см) с кремневой кислотой (на 0,1 г вещества — 12 г кремневой кислоты). Элюцию проводили в ступенчатом градиенте бензол — эфир 10:0, 10:1, 9:1...

**Схема выделения А-фактора из культуральной жидкости мутантного штамма 751  
*Actinomyces streptomycini***

Стадия выделения	Операции на каждой стадии	Характеристика вещества после каждой стадии			
		название сырья	вес, г	общая биологическая активность в ед. А-фактора *	биологическая активность, ед*/мкг
1	Фильтрование культуральной жидкости		25 000 (500 л)	12,5 · 10 <sup>9</sup>	0,5
2	Двухкратные экстракции водной фазы хлороформом	Полупродукт I	10—12	(10—12) · 10 <sup>9</sup>	1000
3	Адсорбционная хроматография на кремневой кислоте	Полупродукт II	0,5—0,7		
4	Экстракция водного раствора, полупродукта II петролейным эфиром	Полупродукт III	0,25—0,3		
5	Хроматография на кремневой кислоте в градиенте бензол — эфир	Полупродукт IV	0,09—0,12		
5	Хроматография на целлюлозе СС-31 в воде	А-фактор **	0,035—0,045	2,4 · 10 <sup>9</sup>	50 000—70 000

\* За единицу А-фактора принимается такое его количество, при прибавлении которого к растущей культуре штамма 1439, не образующего стрептомицина, получается 1 мкг антибиотика.

\*\* Общий выход 20%.

... 1:1. Контроль за выделением активной фракции вели с помощью ТСХ на пластинках с силуфолом (УФ 254) в системе бензол — эфир (3:1) по поглощению в УФ-свете.  $R_f$  активной фракции — 0,35. Полученный полупродукт IV (0,1 г) хроматографировали на колонке (2,6×150 см); содержащей 15 г целлюлозы СС-31 (фирма «Whatman»). Вещество, сорбированное на сухой целлюлозе, вносили в колонку и элюировали водой. Контроль проводили по поглощению фракций элюата при 275 нм и с помощью бумажной хроматографии в воде по свечению примесей в УФ-свете. А-фактор (35—45 мг) давал одно пятно с  $R_f$  0,35 на силуфоле в системе бензол — эфир (3:1) и на бумажной хроматограмме в воде ( $R_f$  0,9) и имел активность 50 000—70 000 ед/мкг. Общий выход его из культуральной жидкости составлял ~20% (по активности), степень очистки — 100 000 раз.

**Дикарбанилат А-фактора.** Растворили 940 мг (3,9 ммоль) А-фактора в 2 мл абсолютного пиридина, охлаждали до 0°, приливали охлажденный раствор 1,3 мл (11,6 ммоль) фенилизотианата в 1 мл пиридина и выдерживали при комнатной температуре 4 сут. После отгонки пиридина остаток растворяли в хлороформе, отфильтровывали от дифенилмочевины и промывали последовательно водой, фосфатным буфером (рН 7) и водой. Хлороформный раствор высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Полученные продукты реакции (1,5 г) разделяли на колонке (3,2×130 см) с кремневой кислотой (300 г) в ступенчатом градиенте бензол — эфир 15:0, 15:1, 14:1. Контроль вели с помощью ТСХ на силуфоле в системе бензол — эфир (8:5). Дикарбанилат А-фактора (желтое маслянистое вещество с  $R_f$  0,67, выход 374 мг, 20%) растирали с петролейным эфиром и перекристаллизовывали из водного этанола при 50°. Повторная операция дала белое кристаллическое вещество с т.пл. 96—98° (по Кофлеру). Найдено, %: С—67,20; Н—6,24; N—5,98.  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6$ .  $M$  480 (определено масс-спектрометрически). Вычислено, %: С—67,50; Н—6,67; N—5,83.  $M$  480.

По аналогичной методике были получены следующие производные А-фактора: диацетат, ди-3,5-динитробензоат, ди-*n*-бромкарбанилат (выход

соответственно 37, 25 и 6%). Молекулярные веса этих соединений — 326, 630 и 638 определены масс-спектрометрически.

*Ди-(триметилсилильное) производное А-фактора.* К 500 мкг А-фактора, высушенного над щелочью, прибавляли 0,06 мл пиридинового раствора смеси гексаметилдисилазана (0,2 мл) и триметилхлорсилана (0,03 мл) в 0,2 мл пиридина, выдерживали 30 мин при комнатной температуре и использовали для масс-спектрометрического определения.

Выражаем благодарность С. Л. Портновой, Т. А. Балашовой и Л. Б. Сенявиной за снятие спектров ЯМР и ИК-спектров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Хохлов А. С., Товарова И. И., Борисова Л. Н., Плинер С. А., Шевченко Л. А., Корницкая Е. Я., Ивкина Н. С., Рапопорт И. А. (1967) Докл. АН СССР, 177, 232–235.
2. Товарова И. И., Корницкая Е. Я., Плинер С. А., Шевченко Л. А., Анисова Л. Н., Хохлов А. С. (1970) Изв. АН СССР. Сер. биол., 427–434.
3. Khokhlov A. S., Anisova L. N., Tovarova I. I., Kleiner E. M., Kovalenko I. V., Krasilnikova O. I., Kornitskaya E. Ya., Pliner S. A. (1973) Z. Allg. Mikrobiol., 13, 647–655.
4. Борисова Л. Н., Ивкина Н. С., Гоменюк Л. А. (1970) Докл. АН СССР, 192, 199–202.

Поступила в редакцию \*  
10.VII.1974

#### ISOLATION AND PRIMARY CHARACTERISTICS OF A-FACTOR

S. A. PLINER, E. M. KLEINER, E. Ya. KORNITSKAYA, I. I. TOVAROVA,  
B. V. ROSYNOV, G. M. SMIRNOVA, A. S. KHOKHLOV

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

A. biological regulator A-factor ( $C_{13}H_{22}O_4$ ) capable to provide both normal development of actinomycete and biosynthesis of streptomycin was isolated from cultural broth of *Actinomyces streptomycini* (mutant strain 751). Dicarbanilate, di-*p*-bromocarbanilate, diacetate, di-3,5-dinitrobenzoate and di-(trimethylsilyl)derivative of A-factor were prepared by acylation or alkylation with corresponding agents in pyridine at room temperature. The IR, NMR, UV and mass-spectra of parent compound and its derivatives show that A-factor has a molecular weight of 242, formula  $C_{13}H_{22}O_4$  and contains hydroxyl, carbonyl and isopropyl groups. Its diacetate and di-3,5-dinitrobenzoate manifest biological activity comparable with that of parent substance.

\* Статья из портфеля редакции журнала «Химия природных соединений», дата поступления 1.II.1974 г.