

Ирумамицин, образуемый *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278

О. А. ЛАПЧИНСКАЯ, Г. С. КАТРУХА, Л. П. ТЕРЕХОВА, Е. Г. ГЛАДКИХ, В. В. КУЛЯЕВА,
В. В. ПОГОЖЕВА, Г. И. ОРЛОВА, А. С. ТРЕНИН, Г. Б. ФЕДОРОВА

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Irumamicin Produced by *Streptomyces roseoflavus* INA-1278

O. A. LAPCHINSKAYA, G. S. KATRUKHA, L. P. TEREKHOVA, E. G. GLADKIKH, V. V. KULYAEVA,
V. V. POGOZHEVA, G. I. ORLOVA, A. S. TRENIN, G. B. FEDOROVA

G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Представлено микробиологическое описание штамма *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278 — нового продуцента макролидного противогрибкового антибиотика ирумамицина. Ирумамицин 1278, образуемый новым продуцентом, по противогрибковой активности отличается от ирумамицина, образуемого известным мировым продуцентом *Streptomyces subflavus* subsp. *irumaensis* subsp. nov. AM-3603.

Ключевые слова: макролидный антибиотик, штамм-продуцент, противогрибковая активность.

The strain *Streptomyces roseoflavus* INA-1278 is described as a new irumamicin producer. Irumamicin 1278 is different by the antifungal activity from irumamicin produced by the world-known strain *Streptomyces subflavus* subsp. *irumaensis* subsp. nov. AM-3603.

Key words: macrolide, producer, antifungal activity.

Введение

Согласно программе систематического скрининга новых продуцентов среди актиномицетов как основного источника практически значимых биологически активных соединений и селекции на повышение биосинтетической активности почвенных культур, в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе был получен штамм *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278, образующий антибиотик с выраженной антифунгальной активностью *in vitro* [1].

На основании совокупности изученных методами масс-спектрометрии и спектроскопии ^1H , ^{13}C , ЯМР, MS, IR физико-химических свойств и при использовании базы данных природных биологически активных веществ (BNPD), разработанной Я. Берди (Венгрия), антибиотик ИНА-1278 был отнесен к 20-членным макролидам группы ирумамицина [2, 3] и практически оказался идентичен ирумамицину.

В настоящей статье представлены результаты микробиологического изучения штамма-продуцента *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278, а также данные по биосинтезу и анализу некоторых свойств ирумамицина 1278 в сравнении с проти-

вогрибковым антибиотиком ирумамицином, образуемым известным мировым продуцентом *Streptomyces roseoflavus*.

Материал и методы

Штамм-продуцент *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278 получен из почвенной культуры ступенчатой селекцией на повышение биосинтетической активности с применением N-метил-N¹-нитро-N-нитрозогуанидина с последующим высевом мутагенизированной популяции спор на агаровые среды, содержащие антибиотики (эритромицин, блеомицин, стрептомицин, фузидин) в качестве селективных агентов.

Микробиологическое изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамма ИНА-1278 проводили на диагностических средах, принятых в лабораторной практике для описания актиномицетов [4].

Биосинтез ирумамицина осуществляли при двухстадийной ферментации в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в 100 мл питательной среды на круговой качалке, 220 об/мин при 28°C.

Культуру продуцента выращивали на агаровой среде № 2 Гаузе при 37°C в течение 5–7 сут. Полученными агаровыми блоками 0,5 см² засеивали колбы с посевной средой № 2 Гаузе (с бульоном Хоттингера). В колбы с ферментационной средой вносили 7–10% 48-часового посевного материала. Длительность культивирования составила 96–120 ч.

Содержание ирумамицина в ферментационной жидкости определяли после экстракции бутанолом (1:1) с использованием метода ТСХ на пластинках Kieselgel 60 «Merck» в системе органических растворителей гексан–ацетон (1:1) с биоавтографическим проявлением по тест-культуре *Aspergillus niger* INA 00760, инокулированной в агар № 2 Гаузе после 18 ч инкубирования при 37°C.

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, Б.Пироговская, д. 11, стр. 1. НИИНА им. Г. Ф. Гаузе

Таблица 1. Культурально-морфологические признаки штамма ИНА-1278

Агаровая среда	Рост воздушного мицелия	Цвет мицелия		Растворимый пигмент
		воздушного	субстратного	
№ 1 Гаузе	+++	Серовато-белый до розоватого (Д-3, Р-2)	Бледно-буроватый (Б-4)	Слабый светло-желтый (Д-4)
Овсяная	++	Бледно-буроватый (Б-6)	Серовато-желтый (Д-3, Ж-1)	нет
Чапека	+++	Беловатый (Д-3)	Буровато-желтоватый (Д-4)	нет
Глюкозо-аспарагиновая	+	Желтоватый (Ж-1)	Бледно-буроватый (Б-4)	нет
Линденбайна (глицерин-нитратная)	+++	Беловато-кремовый (Д-3, Сооб)	Желтовато-кремовый (Б-6)	нет
Красильникова СР-1		Нет роста		
№ 2 Гаузе	++	Беловато-розоватый (Д-3, Г-3)	Беловато-кремоватый (Д-3, Б-6)	нет
Треснера (с пептоном и лимоннокислым железом)		Меланоидные пигменты не образует		

Примечание. * / (+++) – хороший; (++) – умеренный; (+) – слабый.

Выделение и химическую очистку субстанции ирумамицина 1278 проводили по специально разработанной схеме многостадийного процесса экстракции и колоночной хроматографии, а также аналитических методов характеристики физико-химических свойств биосинтетического продукта, подробно описанных ранее [1].

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) (мкг/мл) в отношении различных микробных культур определяли добавлением полученного ирумамицина в убывающих концентрациях к среде № 2 Гаузе.

Использовались тест-культуры *Aspergillus niger* INA 00760, ки INA 00760, *Candida albicans* Ки INA 00763 — из шток-образцов коллекции НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Результаты и обсуждение

Микробиологическое описание штамма ИНА-1278 проводили на следующих диагностических средах: минеральном агаре № 1 Гаузе, органическом агаре № 2 Гаузе, глюкозо-аспарагиновом агаре и сахарозо-нитратном агаре (среда Чапека), глюкозо-нитратном агаре (среда Красильникова), глицерин-нитратном агаре (среда Линденбайна). На диагностических средах определяли цвет воздушного и субстратного мицелия, наличие растворимых пигментов — на среде Треснера с пептоном и лимоннокислым железом. Для оценки цветов мицелия использовали шкалы Бондарцева и Праузера. Споровый посевной материал 10-дневной культуры штамма, выращенной на глицерин-нитратной агаровой среде Линденбайна, высевали на скошенный агар; инкубировали при 28°C в течение 7–21 сут.

Штамм ИНА-1278 характеризуется следующими культурально-морфологическими признаками (табл. 1).

Морфологические признаки. Цепочки спор прямые, извилистые, поверхность спор гладкая.

Антагонистические свойства. При испытании методом штриха на агаре № 2 Гаузе штамм подав-

ляет рост грамположительных бактерий и дрожжеподобных грибов.

По культурально-морфологическим характеристикам штамм-продуцент ИНА-1278 соответствует типовой культуре *Streptomyces roseoflavus* Arai1951 (одобренный список, 1980), для которой известно образование флавомицина и ряда структурно связанных с ним аминогликозидных антибиотиков. Известным мировым продуцентом ирумамицина является таксономически другая культура актиномицета *S.subflavus* subsp. *Irumaensis* subsp. nov. AM-3603 [2].

Физиолого-биохимические свойства штамма ИНА-1278. Типичный аэроб. Растёт при (24–45)°С, оптимум роста 28°C и в диапазонах значений pH (5,0-10,0) с оптимумом роста при pH 7,0. Желатину разжижает. Молоко пептонизирует. Сахарозу инвертирует. Крахмал гидролизует. На клетчатке не растет. Восстанавливает нитраты до нитритов. Меланоидные пигменты не образует при росте на среде Треснера с пептоном и лимоннокислым железом. Устойчив к NaCl (3,5 %) при росте на среде № 2 Гаузе.

Отношение к углеводам: хорошо использует фруктозу, мальтозу, рамнозу; умеренно глюкозу, арабинозу, лактозу, слабо использует сахарозу, сорбит, маннит, не использует раффинозу и целлюлозу при росте на средах с неорганическим источником азота.

Биосинтез ирумамицина: осуществлялся в жидкой питательной среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода (%: глюкоза — 3,0; соевая мука 3,0; MgSO₄ — 0,4; NaCl — 0,5; CaCO₃ — 0,3) с максимальным накоплением антибиотика в мицелии продуцента к 96 ч ферментационного процесса при завершении роста культуры и сохраняющимся до 120 ч культивирования (pH 7,6–7,8).

Таблица 2. Физико-химические свойства ирумамина 1278 и антибиотика ирумамина

Свойства	Ирумамин 1278	Антибиотик ирумамин [2]
Брутто-формула (Мол. масса)	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₂ (763)	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₂ (763) C 65,7; H 8,54, N 1,95%
Мол. масса. Метод MALDI-TOF (m/z)	786,4 (M+Na) ⁺ 802,4 (M+K) ⁺	—
UV-VIS спектр (EtOH), λ _{max} , нм	232	232
ИК-спектр (KBr), ν _{max} , см ⁻¹	3456; 2968–2856; 1720; 1603; 1381; 1075; 973	3400; 2960–2920; 1700; 1590; 1330; 1073
[α] _D ²⁰	+40° (с 1,0, CHCl ₃)	+12° (с 1,0, CHCl ₃)
ТСХ (SiO ₂), R _f в системе:		
гексан–хлороформ–метанол (5:1:1)	0,3	0,4
этилацетат–гексан (1:1)	0,87	0,87
бензол–ацетон (1:1)	0,63	0,84
Качественная реакция:		
нингидрин	—	—
анисовый альдегид + H ₂ SO ₄	+	+
(NH ₄)SO ₄ + NH ₄ HSO ₄ + нагревание	+	+
Растворимость:		
легко растворим	Ацетон, этилацетат, низшие спирты, толуол, диэтиловый эфир	Ацетон, этилацетат, метанол, этанол, бензол, DMSO, диэтиловый эфир
нерастворим	Гексан, вода	Гексан, вода

Таблица 3. Сравнительная антимикробная активность ирумамина 1278 *in vitro*

Тест-микроорганизм	МПК, мкг/мл	
	ирумамин 1278	ирумамин [2]
<i>Candida albicans</i> Ки INA 00763	4,2	100
<i>Aspergillus niger</i> INA 00760 Ки INA 00760	0,2 0,3	100
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	12,5	н/а

Ирумамин 1278, полученный из мицелия продуцента в виде хроматографически очищенного белого кристаллического порошка, по основным физико-химическим свойствам идентичен известному антибиотику ирумамину (табл. 2).

При этом существуют незначительные различия в хроматографическом поведении (значения R_f) в двух из трёх использованных системах растворителей (гексан–хлороформ–метанол; бензол–ацетон), а также в показателях угла вращения.

В противоположность этому, весьма существенны различия ирумаминов по противомикробной активности *in vitro* (табл. 3).

Превосходство ирумамина 1278 по противогрибковой активности выражается в более чем десятикратно меньших значениях МПК для *A.niger* и для *Candida albicans*. Отличительным признаком ирумамина 1278 является также наличие умеренной антибиотической активности в отношении грамположительной тест-культуры *B.subtilis*.

Полученные результаты указывают на целесообразность развития исследований по уточнению и детализации пространственной структуры ирумамина 1278, не выявленные возможные отличия которой определяют существенный сдвиг в биологической активности природного макролидного соединения, образуемого новым продуцентом. Одновременно с этим, обоснованно изучение его лечебных свойств *in vivo*, перспективность которых при грибковых инфекциях подтверждается

данными о сопоставимости *in vitro* противогрибкового эффекта ирумамина 1278 в отношении *A.niger* с амфотерицином В [6].

Ирумамин 1278, являясь типичным макролидным соединением, представляет также исследовательский интерес с точки зрения новых тест-моделей для обнаружения возможных фармакологических свойств, многообразие и медицинская значимость которых характерны для макролидных антибиотиков.

Заключение

Проведено микробиологическое описание культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамма *S.roseoflavus* ИНА-1278 — продуцента противогрибкового макролидного антибиотика ирумамина, известным продуцентом которого является культура актиномицета *S.subflavus*.

При идентичности химических структур ирумаминов, образуемых двумя таксономически различными актиномицетами, ирумамин нового продуцента существенно отличается по показателям противомикробной активности *in vitro*.

Полученные данные указывают на необходимость развития исследований по уточнению и детализации пространственной ориентации структуры ирумамина 1278 и по определению возможной медицинской значимости его противогрибкового эффекта *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shashkov A.S., Tsvetkov D.E., Lapchinskaya O.A., Kulyaeva V.V. et al.* Structure, ¹H and ¹³C NMR spectra, and biological activity of the antibiotic INA-1278 related to irumamicin and produced by the experimental *Streptomyces* sp. strain No. 1278. *Chem Bull Int Ed* 2011; 60: 11: 2412–2417.
2. *Omura S., Tanaka Y., Takahashi Y. et al.* Irumamicin, an antifungal 20-membered macrolide produced by *Streptomyces*. Taxonomy, fermentation and biological properties. *J Antibiot* 1984; 37:12: 1572–1578.
3. *Omura S., Tanaka Y., Nakagawa A. et al.* Irumamicin, a new antibiotic active against phytopathogenic fungi. *J Antibiot* 1982; 82: 2: 256–257.
4. *Chirling E.B., Gottlieb D.* Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 1966; 16: 313–340.
5. *Гаузе Г.Ф., Преображенская М.Н., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С.* Определитель актиномицетов. М.:1984; Наука, 130. / *Gauze G.F., Preobrazhenskaja M.N., Sveshnikova M.A., Terehova L.P., Maksimova T.S.* *Opredelitel' aktinomicetov.* М.:1984; Nauka, 130. [in Russian]
6. *Тренин А.С., Лапчинская О.А., Куляева В.В. и др.* ИНА-1278 — антибиотик из группы ирумацицинов, обладающий высокой противогрибковой активностью. Современная микология в России. Том 3. Материалы III Съезда микологов России. М.: 2012; 355. / *Trenin A.S., Lapchinskaja O.A., Kuljaeva V.V. i dr.* ИНА-1278 — антибиотик из группы ирумацицинов, обладающий высокой противогрибковой активностью. *Sovremennaja mikologija v Rossii.* Том 3. *Materialy III S#ezda mikologov Rossii.* М.: 2012; 355. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лапчинская О.А. — д. б. н., зав. лабораторией; НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Катруха Г.С. — д. х. н., профессор, сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Терехова Л.П. — д. б. н., профессор, зав. лабораторией, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Гладких Е.Г. — к. б. н., старший научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Куляева В.В. — к. б. н., старший научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Погожева В.В. — научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Орлова Г.И. — к. б. н., научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Тренин А.С. — д. б. н., руководитель сектора НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Федорова Г.Б. — к. б. н., старший научный сотрудник НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва