

А. Н. КОЗЛОВА, Г. В. КОМАРОВА, Г. И. ЭЛЬ-РЕГИСТАН,
член-корреспондент АН СССР Н. А. КРАСИЛЬНИКОВ

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ПОЛОВУЮ ФУНКЦИЮ *PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS*

Половая активность низших грибов контролируется многими факторами, обладающими либо специфическим «гормоноподобным» действием при формировании гаметангиев и образовании плодовых тел, либо опосредованно влияющими на половую активность, стимулируя общее развитие гриба (^{1, 2}).

Половые факторы гетероталлических грибов могут быть строго специфичными для каждого организма (гамон), являться предшественниками при синтезе специфических гормональных веществ (прогамон), влиять на зиготропную реакцию гетероталлических организмов (хемотропное вещество) или стимулировать созревание полового тела. Среди таких половых стимуляторов низших грибов были обнаружены вещества, в основном относящиеся к липидам (³), пептидам (⁴), терпенам (⁵) и индольным производным (⁶).

В предыдущей работе приводились данные исследований влияния факторов широкого спектра действия (витамины, аминокислоты, микроэлементы, рН среды, различные органические добавки) на половую актив-

ность гетероталлического тест-организма *Phycomyces blakesleeanus*. В настоящем сообщении излагаются результаты аналитического выделения специфических стимуляторов актиномицетного происхождения, влияющих на половое воспроизведение *Phycomyces blakesleeanus*.

Тест-культура инкубировалась на подобранной опытным путем органической среде, обеспечивающей хороший рост и развитие гриба при посеве + и - вариантов встречным ростом. Через 72 часа после посева на контактную полосу шириной 3—6 мм методами луночным, дисковым и блоковым вносились испытуемые вещества. Результаты опыта учитывались на 6 сутки роста тест-культуры путем подсчета количества зигот на 1 см² контрольного и опытных вариантов (табл. 1).

В пределах 95% доверительного интервала количество повторностей в 10 вариантах опыта и 10 вариантах контроля обеспечивает достаточную точность подсчета при средней стандартной ошибке 4,8%.

Актиномицеты — продуценты специфических половых факторов *Actinomyces* sp. штамм № 10, № 217, Ф и *Protoactinomyces* sp. № 14 выращивались на богатых органических средах в жидкой культуре.

В предварительных опытах было найдено, что стимулирующие половую активность вещества сосредоточены в мицелии актиномицетов.

Половые стимуляторы из клеточных гомогенатов наиболее полно извлекаются 60% этиловым спиртом (штамм *Act. sp.* № 10), ацетоном

Таблица 1

Количественная стимуляция половой
воспроизводимости *Phycomyces*
blakesleeanus (концентрация 21 мкг/мл)

№ штамма	R _f пятна	Число зигот на 1 см ²
Контроль		31,3 (6) *
210	0,81	89,5
40	0,30	78,2
217	0,18	91,6

* В скобках — ширина интактной полосы
в миллиметрах.

(штаммы Act. sp. № 217 и Ф) при экстракции в течение 5—6 час. на универсальном встряхивающем аппарате.

Полученные экстракты концентрировались под вакуумом при 30—40° и затем лиофилизировались.

Лиофилизат штамма № 217 обрабатывался абсолютным спиртом до получения аморфного порошка.

Активные фракции подвергались дальнейшей очистке методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое AlO_3 , SiO_2 , ДЭАЕ-целлюлозы и кизельгура. Хроматограммы проявлялись конц. H_2SO_4 , 2% раствором нингидрина в 95% бутаноле с добавлением уксусной кислоты (95:1), в парах иода.

Наилучшее разделение смеси веществ наблюдалось: для штамма Ф в системе бутанол — уксусная кислота — вода (40:5:14) на ДЭАЕ-целлюлозе; для штамма № 10 в системах бензол — этилацетат (2:1) и бензол:петролейный эфир:метанол (5:5:1) на Al_2O_3 и SiO_2 и для штамма № 217 в системе бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:1) на ДЭАЕ-целлюлозе.

Полученные пятна вырезались, элюировались 50% водным спиртом и полученные элюаты испытывались на стимулирующее действие. Результаты тестирования приведены в табл. 1.

Активные вещества получали препаративной тонкослойной хроматографией, рехроматографировали и подвергали дальнейшему химическому изучению.

Стимулятор из штамма № 10 дает положительную реакцию Хагера — Сальковского (Белозерский, Проскуряков, 1951) и сильное окрашивание с концентрированной H_2SO_4 .

По данным элементного анализа, вещество содержит С 84,4%, Н 11,8%, О 3,8%, не содержит азота. При спектрофотометрировании в у.-ф. области установлено, что максимум поглощения находится при λ 240 мк. На основании вышеприведенных характеристик можно предположить, что активное вещество из штамма № 10 имеет терпеноидную природу.

Стимулятор из штамма Ф дает положительную нингидриновую реакцию, на электрофореграмме при $V=1500$ в, $I=10$ ма, $T=40$ мин. в муравьино-уксуснокислом буфере с рН 1,8 движется к катоду. По-видимому, активное вещество является пептидом.

Стимулятор из штамма № 217 дает нингидринположительную реакцию, на электрофореграмме при $V=600$ в, $I=10-15$ ма, $T=120$ мин. в муравьино-уксуснокислом буфере с рН 1,8 движется к катоду. При спектрофотометрировании в у.-ф. области установлено, что максимум поглощения находится при λ 268 мк в этиловом спирте. Стимулятор может быть отнесен к пептидам.

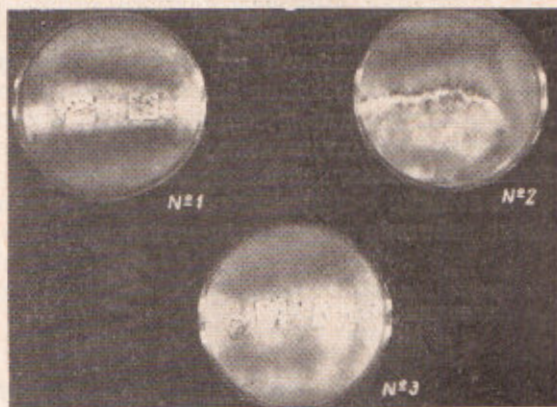


Рис. 1. Действие актиноциетных метаболитов на половую функцию *Phycomyces blakesleeianus* при встречном росте + и — вариантов: № 1 — стимулятора из Act. sp. штамм № 217 (определение методом бумажных дисков на контактную полосу *Phycom. blakesleeianus*); № 2 — ингибитора из *Proactinomyces asteroides* штамм № 443 (определение методом внесения вещества в питательную среду); № 3 — контроль. Зиготообразование у *Phycom. blakesleeianus* при встречном росте + и — вариантов

Факторы, вызывающие полное ингибирование половой функции *Phycomyces blakesleeanus*, были обнаружены в культуральной жидкости Proact. sp. № 14 при экстракции хлороформом. Дальнейшая очистка проводилась фракционированием между 85% метанолом и серным эфиром. При внесении 0,5—1 мг на 50 мл среды для культивирования тест-объекта активное начало вызывает полное угнетение образования половых плодовых тел при нормальном вегетативном росте и развитии *Phycomyces blakesleeanus*.

При спектрофотометрировании в у.-ф. области установлено, что максимум поглощения находится при λ 272—273 м μ в этиловом спирте.

На основании вышеизложенного можно констатировать, что некоторые лучистые грибки продуцируют вещества, повышающие зиготообразование гетероталлической культуры *Phycomyces blakesleeanus* и уменьшающие сроки созревания зигот в 2—2,5 раза, а также обнаружено вещество, полностью ингибирующее половую функцию тест-организма (рис. 1). Предварительные химические исследования позволили отнести их к соединениям терпеноидной и пептидной природы.

Дальнейшая очистка, изучение химического строения и выяснение механизма действия этих соединений продолжаются.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
6 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. K. Raper, Bot. Rev., 18, 447 (1952). ² E. O. Wilson, W. H. Bossert, Recent Progr. Hormone Res., 19, 673 (1963). ³ R. H. Haskins, A. P. Tulloch, R. G. Micetich, Canad. J. Microbiol., 10, 87 (1964). ⁴ R. Schwyzer, B. Iselin et al., Helv. chim. acta, 39, 872 (1956). ⁵ M. Plempel, Planta, 55, 254 (1960). ⁶ J. W. Daniel, H. P. Rusch, J. Bacteriol., 83, 6, 1244 (1962).