

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

84914

Patent dodatkowy

do patentu nr _____

Zgłoszono: 29.12.72 (P. 159969)

Pierwszeństwo: 03.01.72 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 30.10.73

Opis patentowy opublikowano: 25.02.1977

MKP C12d 9/14

Int. Cl.² C12D 9/14

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: The Upjohn Company Kalamazoo, St. Michigan
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowego β -hydroksyetyliolinkosaminidu

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób nowego β -hydroksyetyliolinkosaminidu o wzorze 1.

Sposób według wynalazku polega na tym, że szczep *Streptomyces caelestis* 22227a o charakterystycznych cechach hodowli, zdeponowanej pod numerem NRRL 5320, hoduje się w wodnym środowisku odżywczym, w warunkach aerobowych i otrzymaną 7-0-demetylocelestycetynę o wzorze 2 poddaje się hydrazynolizie z wodzianem hydrazyny pod chłodnicą zwrotną.

β -hydroksyetyliolinkosaminid o wzorze 1 można przeprowadzić w różne analogi, które można przedstawić wzorem strukturalnym 3.

Związki o wzorze 3 można przeprowadzić w związki bakteriobójcze przez sprzęganie z kwasem pirodylidynokarboksylowym według opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki Nr 3514440. Zarówno związki, jak i sposób opisane są w wymienionym opisie patentowym.

W związkach o wzorze 3, X oznacza grupę -OH w konfiguracji /R/ i /S/; grupę alkoksy o najwyżej 20 atomach węgla w konfiguracji /R/ i /S/ za wyjątkiem, gdy X oznacza /R/ -OCH₃ i R oznacza wodór; i R oznacza wodór lub acyl kwasu węglowodorkarboksylowego o najwyżej 18 atomach węgla, albo acyl kwasu chlorowco-, nitro-, hydroksy-, amino-, tiocyjano- lub niższego alkoksylowego o najwyżej 18 atomach węgla, albo R oznacza grupę O=P=OH/2, a R₁ oznacza wodór lub acyl kwasu węglodoro-

2

karboksylowego o najwyżej 18 atomach węgla, albo acyl kwasu chlorowco-, nitro-, hydroksy-, amino-, tiocyjano- lub niższego alkoksylowego o najwyżej 18 atomach węgla, przy czym, jeżeli X oznacza /R/-OCH₃ i R oznacza wodór, wówczas R₁ nie oznacza części kwasu salicylowego.

Przykładami wyżej wymienionych grup alkoksylowych o najwyżej 20 atomach węgla są grupy metoksy, etoksy, propoksy, butoksy, pentyloksy, heksyloksy, heptyloksy, oktyloksy, nonyloksy, decyloksy, undecyloksy, dodecyloksy, triodecyloksy, tetradecyloksy, pentadecyloksy, heksadecyloksy, heptadecyloksy, oktadecyloksy, nonadecyloksy i eikozyloksy oraz ich postaci izomeryczne. Przykładami chlorowca w grupie R₁ są chlor, brom i jod. Przykłady acylu kwasu węglowodorkarboksylowego o najwyżej 18 atomach węgla i acylu kwasu chlorowco-, nitro-, hydroksy-, amino-, tiocyjano- i niższego alkoksylowego o najwyżej 18 atomach węgla, podane są w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3424012, kolumna 5, wiersz 64 do kolumny 6, wiersz 47.

Własności chemiczne i fizyczne nowego chlorowodoru 7-0-demetylocelestycetyny stanowiącego produkt pośredni w sposobie według wynalazku podano poniżej.

Analiza elementarna:

Obliczono dla $C_{23}H_{24}N_2O_9S \cdot HCl$:

C-50,22%; H-6,41%; N-5,09%; S-5,83%;
Cl-6,45%

Obliczono dla $C_{23}H_{24}N_2O_9S \cdot HCl \cdot H_2O$:

C-48,63%; H-6,57%; N-4,93%; S-5,68%;
Cl-6,24%

Znaleziono: C-46,57%; H-6,21%; N-5,72%; S-5,13%;
Cl-7,35%

Ciężar cząsteczkowy:

Obliczony ciężar cząsteczkowy chlorowodorku wynosi 550. Jednowodnian chlorowodorku 7-0-demetylocelestycetyny ma ciężar cząsteczkowy 568. Miareczkowanie potencjometryczne wykazało ciężar cząsteczkowy 534.

Grupy dające się oznaczyć miareczkowo:

Miareczkowanie potencjometryczne w wodzie przy użyciu wodnego roztworu KOH wykazało obecność grupy zasadowej o wartości $pK_s=7,5$ i słabo kwaśnej grupy o wartości $pK_a=9,6$.

Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{25} = +115^\circ$ $c=0,85$ w wodzie/.

Widma absorpcyjne w nadfiolecie:

w absolutnym metanolu: λ max przy $238m\mu/\lambda=18/$
 λ max przy $304m\mu/\lambda=7,3/$

w zasadowym metanolu: λ max przy $242m\mu/\lambda=13,4/$
 λ max przy $335m\mu/\lambda=8,7/$

Widma absorpcyjne w podczerwieni:

Poniżej zestawiono długości fal widma absorpcyjnego w podczerwieni wyrażone w odwrotności centymetrów, /oznaczenie wykonano na próbce zawieszony w oleju mineralnym/.

Częstotliwość pasma (cm^{-1})	Częstotliwość pasma (cm^{-1})	Częstotliwość pasma (cm^{-1})
3340 (S)	1379 sh (S)	1030 sh (M)
3070 (M)	1374 (S)	1010 (M)
2940 (olej) (S)	63 (S)	985 (M)
2860 (olej) (S)	1321 (S)	970 sh (M)
1715 sh (M)	1298 (S)	950 sh (M)
1680 sh (S)	1246 (S)	900 (W)
1670 (S)	1233 sh (S)	865 (M)
1650 sh (S)	1214 (S)	850 sh (W)
1609 (M)	1200 sh (S)	810 (M)
1578 (M)	1155 (S)	799 (M)
1565 (M)	1133 (S)	757 (M)
1535 sh (M)	1085 (S)	720 (M)
1482 (S)	1047 (S)	700 (M)
1455 (S)		

Poniżej zestawiono długości fal widma absorpcyjnego w podczerwieni wyrażone w odwrotności centymetrów, gdy oznaczenie wykonano na związku, sprasowanym z KBr w pastylkę.

Częstotliwość pasma (cm^{-1})	Częstotliwość pasma (cm^{-1})	Częstotliwość pasma (cm^{-1})
3360 (S)	1560 (M)	1048 (S)
3070 (M)	1483 (S)	1010 (M)
2975 (M)	1455 (M)	986 (M)
2940 (M)	1385 (S)	970 (M)
2900 sh (M)	1323 (S)	900 (M)
2840 sh (M)	1298 (S)	865 (M)
2700 sh (M)	1248 (S)	850 sh (W)
1717 sh (M)	1212 (S)	813 sh (W)
1673 (S)	1156 (S)	800 (M)
1610 (M)	1135 (S)	759 (M)
1580 (M)	1085 (S)	702 (M)

Intensywność pasm w podczerwieni określono odpowiednio literami „S”, „A” i „W”, przy czym pasmo „S” jest pasmem najsilniejszym w widmie. Pasma „M” mają intensywność od 1/3 do 2/3 intensywności pasma najsilniejszego, a intensywność pasma „W” jest mniejsza od 1/3 intensywności pasma najsilniejszego. Ocenę tę przeprowadzono na podstawie skali transmisji wyrażonej w procentach.

Mikroorganizm. Mikroorganizmem zastosowanym do wytwarzania 7-0-demetylocelestycetyny stanowiącej produkt pośredni w sposobie według wynalazku jest mutant szczepu *Streptomyces caelestis* NRRL 2418, który został nazwany szczepem *Streptomyces caelestis* 22227a. Mutant ten odróżnia się od *Streptomyces caelestis* taksonomicznie, jak wykazano poniżej i przez zdolność wytwarzania 7-0-demetylocelestycetyny. Przyszczep żywego organizmu można otrzymać ze stałej kolekcji Northern Utilization and Research Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, U.S.A. gdzie jest do dyspozycji pod numerem NRRL 5320.

Ten mikroorganizm został zbadany i scharakteryzowany przez Alma Dietz z The Upjohn Research Laboratory.

Opis mikroorganizmu. Szczep *Streptomyces caelestis* 22227a.

Opis hodowli: Szczep *Streptomyces caelestis* 22227a porównywano z hodowlą macierzystą (także tego typu) *Streptomyces caelestis* De Boer et al. NRRL 2418 [De Boer, C., A. Dietz, J. R. Wilkins, C. N. Lewis and G. M. Savage. 1954—1955. Celesticetin — A New Crystalline Antibiotic. I. Biologic Studies of Celesticetin. Antibiotics Annual. New York, Medical Encyclopedia, Inc., 1955, pp. 831—836].

Obydwie hodowle mają porost napowietrzny błękitny, są pozytywne wobec melaniny i mają sporofory tworzące otwarte spirale, noszące prostokątne gładkie spory o prążkowanym elemencie powierzchniowym.

W pożywce syntetycznej podanej przez Shirling'a i Gottlieb'a [Shirling, E. B. i D. Gottlieb. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. Int. J. System, Bacteriol. 16: 313—340] hodowle rozwijają się nieznacznie przy negatywnej regulacji (bez dodawania związków węgla) i rozwijają się dobrze przy regulacji — d-glukozą. Wykorzystanie węgla było silne w syntetycznej pożywce z sacharozą, D-ksylozą, inozytem, D-fruktozą, ramnozą i rafinozą; w pożywce z l-arabinozą było dodatnie, z celulozą wątpliwe i ujemne z d-manitem.

Obydwie hodowle rozтворяją tyrozynę i hydrolizują skrobię. Kazeina i ksantyna nie ulegają rozwarzaniu. Szczep 22227a różni się od hodowli macierzystej cechami podanymi w tabeli 1.

Szczep *Streptomyces caelestis* 22227a, mutant szczepu *Streptomyces caelestis* NRRL 2418 łatwo odróżnia się od hodowli macierzystej swą zdolnością wytwarzania 7-0-demetylocelestycetyny i mniejszymi szczegółami, podanymi w tabeli 1. Nie łatwo go odróżnić od hodowli macierzystej, jeśli chodzi o cechy hodowli — zabarwienie, sporofory i typy zarodników (sporów).

Szczep 22227a stosowany jest w sensie zalecenia Międzynarodowego Kodu Nazewnictwa Bakterii — Recommendation 8e(1) of the International Code of Nomenclature of Bacteria [International Code of Nomenclature of Bacteria. 1966, edited by the Editorial Board of the Judicial Commission of the International Committee on Nomenclature of Bacteria. Intern. J. System. Bacteriol. 16: 459—490], gdzie liczba będąca wyróżniającym znakiem laboratoryjnym może być stosowana do oznaczenia pochodnych z pojedynczej izolacji czystej hodowli.

Cechy charakterystyczne szczepu *Streptomyces caelestis* 22227a i NRRL 2418 zestawiono w przytoczonej tablicy 1.

Tablica 1
Różnice hodowlane szczepu *S. caelestis* 22227a i NRRL 2418

Pożywka hodowlana	<i>S. caelestis</i> szczep 22227a	<i>S. caelestis</i> (macierzysty) NRRL 2418
mleczko iakmusowe	pH=6,3	pH=4,9
bulion z azotem syntetyczny	azotan nie redukuje się do azotynu	azotan zredukowany do azotynu
pożywka*	azotan nie redukuje się do azotynu	azotan zredukowany do azotynu
wytworzony antybiotyk	7-0-demetylocelestycetyna	Celestycetyna

Nowy związek w sposobie (według wynalazku) powstaje, gdy opisany organizm hoduje się w wodnym środowisku odżywczym, w warunkach aerobowych. W celu wytworzenia ograniczonych ilości można stosować hodowle powierzchniowe i butelki. Hoduje się organizm w środowisku odżywczym, zawierającym źródło węgla, np. przyswajalny węglowodan i źródło azotu, np. przyswajalny związek azotowy lub materiał białkowy. Korzystnym źródłem węgla jest glukoza, cukier surowy (zółty), sacharoza, gliceryna, skrobia, skrobia kukurydziana, laktoza, dekstryna, melas itp. Korzystnym źródłem azotu jest namok kukurydziany, drożdże, autolizowane drożdże browarniane z suchą masą mleka, mąka sojowa, mączka z nasienia bawełny, mąka kukurydziana, sucha masa mleka, wyciąg trzuskowy z kazeiny, stałe produkty podestylacyjne, roztwory peptonu zwierzęcego, odpadki mięsa i kości i tym podobne. Korzystnie stosuje się połączenie tych źródeł węgla i azotu. Nie potrzeba dodawać do środowiska fermentacyjnego metali śladowych, np. cynku, magnezu, manganu, kobaltu, żelaza itp. skoro stosuje się wodę wodociągową i nie oczyszczone składniki.

Fermentację według wynalazku można prowadzić w każdej temperaturze, zapewniającej zadowalający rozwój mikroorganizmu, np. w zakresie 18°—40°C, korzystnie 20°—32°C. Zwykle optymalną wydajność uzyskuje się w ciągu 2—10 dni. W czasie fermentacji środowisko pozostaje zasadowe. Końcowa wartość pH zależy częściowo od obecnej substancji buforowej, o ile jest i częściowo od początkowej wartości pH środowiska hodowlanego.

Jeżeli hodowlę prowadzi się w dużych naczyniach i zbiornikach, korzystniej jest stosować postać wegetatywną, aniżeli postać zarodników mikroorganizmu do posiewu w celu uniknięcia wyraźnego opóźnienia w produkcji nowego związku i związanego z tym niepełnego wykorzystania sprzętu. Pożądane jest więc, aby wytworzyć wegetatywny organizm inokulujący w hodowli na bulionie — pożywce przez obsiew tej hodowli podwielokrotną częścią kultury na glebie lub kultury ze skosu. Jeżeli w ten sposób zabezpieczy się młody, aktywny wegetatywny organizm inokulujący, to można go przenieść aseptycznie do większych naczyń lub zbiorników. Środowisko, w którym wytwarza się wegetatywny organizm inokulujący może być takie samo lub inne niż zastosowane do produkcji nowego związku, byle tylko można było uzyskać dobry rozwój mikroorganizmu.

Nowa 7-0-demetylocelestycetyna o wzorze 2 występuje bądź w postaci, nie zawierającej protonów (wolna zasada), bądź w postaci, zawierającej protony (sól) zależnie od wartości pH otoczenia. Tworzy ona trwałe związki, zawierające protony, (sole addycyjne z kwasem) przez zobojętnienie wolnej zasady kwasem lub przez reakcję podwójnej wymiany (metatezę) między postacią 7-0-demetylocelestycetyny, zawierającą protony, a anionem kwasu. Odpowiednimi kwasami stosowanymi do tego celu są: kwas solny, siarkowy, fosforowy, octowy, bursztynowy, cytrynowy, mlekowy, maleinowy, fumarowy, pamowy, cholowy, palmitynowy, słuzowy, kamforowy, glutarowy, ftalowy, winowy, laurynowy, stearynowy, salicylowy, 3-fenylsalicylowy, 6-fenylsalicylowy, 3-metyloglutarowy, ortosulfobenzoesowy, cykloheksanosulfaminowy, cyklopentanopropionowy, 1,2-cykloheksandwukarboksylowy, 4-cykloheksenokarboksylowy, oktaadecenylbursztynowy, oktenylbursztynowy, metanosulfonowy, benzenosulfonowy, słonecznikowy, kwas Reinecke'a, kwas azobenzenosulfonowy, oktaadecylsiarkowy, pikrynowy i tym podobne kwasy. Te sole addycyjne z kwasami są pomocne do poprawienia wolnej zasady.

Związek o wzorze 2 z powodu obecności części kwasu salicylowego, tworzy sole z metalami alkalicznymi i z metalami ziem alkalicznych przy zastosowaniu sposobów znanych w tej dziedzinie. Można wytworzyć sól sodową, potasową, wapniową, litową i tym podobne. Sole te mają zastosowanie podane dla soli addycyjnych z kwasem.

7-0-demetylocelestycetyna o wzorze 2 jest rozpuszczalna w niższych alkoholach o 1—4 atomach węgla łącznie i w ketonach, trudniej rozpuszcza się w wodzie i w chlorowanych rozpuszczalnikach węglowodorowych, a zasadniczo jest nierozpuszczalna w eterze i nasyconych rozpuszczalnikach węglowodorowych.

Można stosować różne metody wydzielania i oczyszczania 7-0-demetylocelestycetyny o wzorze 2, na przykład ekstrakcję za pomocą rozpuszczalników, chromatografię rozdzielczą, chromatografię na żelu krzemionkowym, rozdział między cieczą — cieczą w aparacie Craig'a i krystalizację z rozpuszczalników.

Korzystny sposób odzyskiwania 7-0-demetyloce-

Iestycetyny o wzorze 2 polega na tym, że odzyskuje się ją z jej pożywki hodowlanej przez oddzielenie grzybni i nierozpuszczalnych części stałych za pomocą konwencjonalnych środków takich, jak odsączenie lub odwirowanie. Następnie z przesączonego lub odwirowanego bulionu usuwa się antybiotyki za pomocą sorpcji na żywicy, zawierającej niejonowy makroporowaty kopolimer styrenu usieciowanego dwuwinylobenzenem.

Odpowiednimi żywicami są Amberlite XAD-1 i XAD-2, podane w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3515717. Żywicę eluuje się organicznym lub nieorganicznym rozpuszczalnikiem, w którym zaadsorbowany antybiotyk rozpущa się. Najlepszym rozpuszczalnikiem stosowanym do eluowania jest 95% wodny roztwór metanolu. Z eluatów metanолоwych odzyskuje się antybiotyk przez zagęszczenie tych eluatów do sucha i następnie poddanie ich chromatografii na żelu krzemionkowym G (E. Merck AG., Darmstadt, ART. 7734) przy użyciu odpowiedniego układu rozpuszczalników na przykład chloroformu i metanolu w stosunku 6:1 (objętość/objętość). Frakcje otrzymane z chromatografii na żelu krzemionkowym G łączy się i zagęszcza do sucha. Otrzymaną pozostałość rozpuszcza się w odpowiedniej mieszaninie rozpuszczalników, np. eter-metanol (50:1) i roztwór miesza się z metanолоwym roztworem chlorowodoru w celu wytrącenia chlorowodoru 7-0-demetylocelestycetyny.

Hydrazynoliza 7-0-demetylocelestycetyny o wzorze 2 działaniem wodzianu hydrazyny w temperaturze wrzenia w ciągu około 23 godzin daje hydrazynę kwasu higrynowego, który można przeprowadzić w chlorowodorek kwasu higrynowego przez ogrzewanie z wodnym roztworem kwasu solnego. Drugim produktem powyższej reakcji hydrazynolizy jest β -hydroksyetylotiolinkosaminid (β -HETL) o wzorze 1.

7-0-demetylodesalicetyna i β -HETL występują bądź w postaci, nie zawierającej protonów (wolna zasada), bądź w postaci, zawierającej protony (sól) zależnie od wartości pH otoczenia. Sole addycyjne z kwasami tych związków można wytworzyć, jak to podano dla 7-0-demetylocelestycetyny.

β -hydroksyetylotiolinkosaminid (β -HETL) o wzorze 1 może być stosowany do rozdzielania kwasów racemicznych, na przykład β -HETL można poddać reakcji z kwasami racemicznymi wytwarzając diastereoizomeryczne sole addycyjne z kwasem, które można rozdzielić przez frakcjonowaną krystalizację na diastereoizomeryczne, z których można wytworzyć kwasy optycznie czynne. β -HETL stosuje się także jako półprodukt (związek pośredni). Działa on, z izocyjanianami, tworząc uretany i moczniki i może być stosowany do modyfikowania żywic poliuretanowych. Na przykład związek o wzorze 1 można poddać reakcji z toluenodwuiizocyjanianem w nadmiarze, wytwarzając wstępny polimer, który następnie można poddać reakcji z poliiolem i estrami polioliowymi, powszechnie stosowanymi do wytwarzania poliuretanów. Albo też można β -HETL zmieszać ze związkiem polioliowym i następnie mieszaninę poddać reakcji z toluenodwuiizocyjanianem. β -HETL można też poddać reakcji z tlenkiem

etylenu, tlenkiem propylenu i podobnymi tlenkami alkilenu, wytwarzając polioksyalikileno- β -HETL, który poddaje się reakcji z tolueno-dwuiizocyjanianem, wytwarzając poliuretan. β -HETL jest zwłaszcza użyteczny przy produkcji sztywnej pianki poliuretanowej. Kondensuje on także z formaldehydem zwłaszcza, gdy stosuje się sól addycyjną z kwasem tiocyjanowym do wytworzenia polimerów według opisów patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2425320 i 2606155, które to polimery stosowane są jako inhibitory trawienia. Jego sól addycyjna z kwasem fluoro-krzemowym jest stosowana także jako środek molooodporny zgodnie z opisami patentowymi Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 1915334 i 2075359. Można też poddać sprzęganiu β -HETL z kwasem pirolidynokarboksylowym, otrzymując związki o działaniu bakteriobójczym, podane w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3514440.

Związek β -HETL o wzorze 1 można przeprowadzić w różne analogi, przedstawione wzorem strukturalnym 3. Na przykład 7-epi-HETL można wytworzyć przez hydrazynolizę 7-epi-7-0-demetylocelestycetyny lub 7-epi-7-0-demetylodesalicetyny metodami, podanymi w opisach patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2928944 i 2851463; 7(S)-chlorowco-7-dezoksy-HETL można wytworzyć przez reakcję HETL o wzorze 1 z chlokiem karbobenzoksy według znanych metod w tej dziedzinie, otrzymując N-karbobenzoksy-HETL, który następnie poddany reakcji z 1 molem bezwodnika octowego według znanych metod daje związek β -jodocetanowy. Związek ten poddaje się następnie hydrogenolizie, na przykład metodą, podaną w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3380992, kolumna 18, część E-1, powstały produkt można wprowadzić w reakcję ze zmodyfikowanym reagentem Rydona według sposobu, podanego w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3496163, otrzymując 7(S)-chlorowco-analog. Związek ten można potraktować zasadą sposobem, podanym w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2851463, otrzymując 7(S)-chlorowco-7-dezoksy-HETL.

[7(R)-chlorowco-analog wytwarza się w ten sam sposób, z tym, że wytworzony, jak wyżej, 7-epi-HETL jest materiałem wyjściowym]. 7(R)-0-alkilo-HETL wytwarza się, stosując HETL o wzorze 1 zamiast MTL w sposobie, podanym w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3574187; 7(S)-0-alkilo-HETL można wytworzyć przez początkowe przeprowadzenie β -0-octanu 7(S)-chlorowco-7-0-demetylo-HETL w pochodną 6,7-azyrydynową metodą, podaną w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3544551, zwłaszcza w kolumnie 8, wiersz 36 i następne, i w przykładzie I, część A-1.

Następnie pochodną azyrydynową przeprowadza się w 7(S)-0-alkilo-HETL sposobem podanym w zgłoszeniu patentowym USA Seria No 26119 z 6.IV. 1970; zaś β -0-acylany można wytworzyć metodą, podaną w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2851463, zwłaszcza w kolumnie 2, wiersz 70 i następne, stosując 1 mol środka acylującego na 1 mol związku HETL o wzorze 1.

Poniższy przykład wyjaśnia sposób według wynalazku, nie ograniczając jego zakresu. Podane procenty są procentami wagowymi, a stosunki mieszanin rozpuszczalników wyrażone są objętościowo, o ile nie zaznaczono inaczej.

Przykład. Fermentacja.

Grzybnie i/lub spory ze skosu szczepu *Streptomyces caelestis* 22227a, NRRL 5320, stosuje się do obsiewu serii 500 ml kolb Erlenmeyera, z których każda zawiera 100 ml podłoża posiewu, składającego się z następujących składników:

Jednowodzian glukozy 25 g/l

Pharmamedis (x) 25 g/l

Woda wodociągowa q.s. 1 l

(x) Pharmamedia jest to przemysłowy gatunek maki z ziarna bawełnianego produkcji Trader's Oil Company, Ft. Worth, Texas.

Wartość pH przy wstępnej sterylizacji podłoża posiewu wynosi 7,2. Posiew inkubuje się w ciągu 3 dni w temperaturze 28°C na wstrząsaczu obrotowym Gump'a o szybkości obrotów 250/min.

5 ml 5% organizmu inokulującego powyższego posiewu dodaje się do każdej 500 ml kolby zawierającej następujące podłoże fermentacyjne:

Skrobia kukurydziana U.S.P. 30 g/l

jednowodzian glukozy 10 g/l

namok kukurydziany 10 g/l

(NH₄)₂SO₄ 3 g/l

chlorek sodowy 2 g/l

woda wodociągowa q.s. 1 l

Wartość pH doprowadza się 50% wodonotlenkiem sodowym do około 7,2–7,4, po czym dodaje się 5 g węglanu wapniowego i sterylizuje kolby w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut.

Kolby z posiewem inkubuje się w temperaturze 28°C na wstrząsaczu obrotowym Gump'a o szybkości obrotów 250/min. Optymalną produkcję 7-0-demetylocelestycetyny o wzorze 4 otrzymuje się po około 4 dniach fermentacji. Miano 7-0-demetylocelestycetyny w piwie fermentacyjnym określa się testem biologicznym w stosunku do mikroorganizmu *S. lutea* za pomocą standardowej mikrobiologicznej próby na płytach z krążkami 12,5 mm.

Odzyskiwanie związku o wzorze 2. Całe piwo fermentacyjne (około 8,5 litrów) uzyskane w powyżej opisanym procesie fermentacyjnym przesącza się przy użyciu ziemi okrzemkowej jako pomocniczego materiału filtracyjnego. Placek filtracyjny przemywa się dwoma litrami wody i płuczyną łączy się z klarownym piwem. Otrzymany roztwór przepuszcza się przez kolumnę, przygotowaną z 500 ml żywicy Amberlite XAD-2 umieszczonej w wodzie. Wyczerpane piwo zbiera się jako jedną frakcję. Kolumnę przemywa się dwoma litrami wody i wodę z przemycia zbiera się także w postaci jednej frakcji. Następnie ko-

lumnę eluuje się 95% wodnym metanolem. Zbiera się trzy frakcje i oznacza jako metanol —1 (630 ml) metanol —2 (600 ml) i metanol —3 (380 ml). Wszystkie wyżej podane frakcje bada się na bioaktywność w stosunku do mikroorganizmu *Sarcina lutea* za pomocą opisanej próby, przy czym otrzymano następujące wyniki:

Frakcja	Strefa zahamowania mm/0,1 ml
Piwo klarowane	28
Piwo wyczerpane	0
Roztwór z przemycia	0
Metanol — 1	35
Metanol — 2	27
Metanol — 3	17

Metanolowe eluaty 1, 2 i 3 łączy się i zagęszcza do otrzymania suchego preparatu (prep. A).

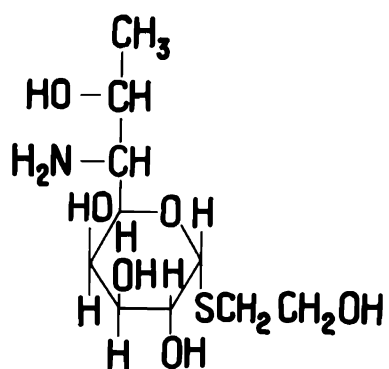
Następnie cały bulion fermentacyjny (około 4 litrów) traktuje się powyżej opisanym sposobem, otrzymując suchy preparat (Prep. B).

Wyżej opisane preparaty A i B łączy się otrzymując 3,3 g (Prep. C). Stwierdzono, że preparat ten zawiera 7-0-demetylocelestycetynę o wzorze 2, co oznaczono za pomocą cienkowarstwowej chromatografii na żelu krzemionkowym G przy użyciu chloroformu — metanolu (6:1 objętość/objętość) lub mieszaniny metyloetyloketon — aceton — woda (196:52:20) albo mieszaniny 2-pentanon — metyloetyloketon — metanol — woda (2:2:1:1) jako układu rozpuszczalników.

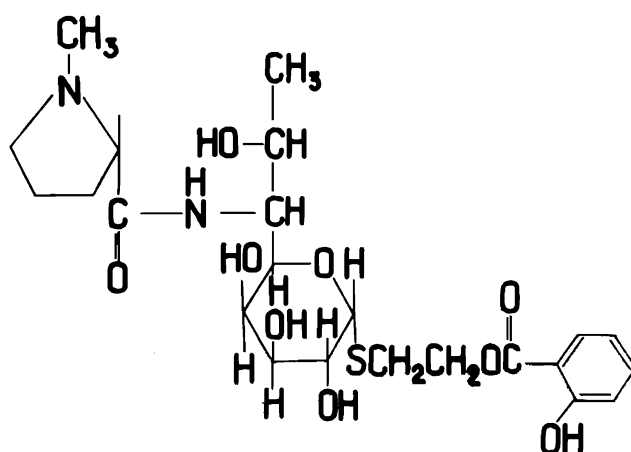
Otrzymywanie β-hydroksyetylotiolinkosaminidu (β-HETL). Przez hydrazynolizę 7-0-demetylocelestycetyny o wzorze 2 wodnianem hydrazyny pod chłodnicą zwrotną w ciągu około 23 godzin wytwarza się β-HETL, hydrazyd kwasu higrynowego i hydrazyd kwasu salicylowego. Z mieszaniny reakcyjnej przez rozdział w przeciwnie w układzie rozpuszczalników równych objętości 1-butanolu i wody odzyskuje się β-HETL. W ten sposób oddziela się β-HETL od hydrazidu kwasu higrynowego i hydrazidu kwasu salicylowego.

Zastrzeżenie patentowe

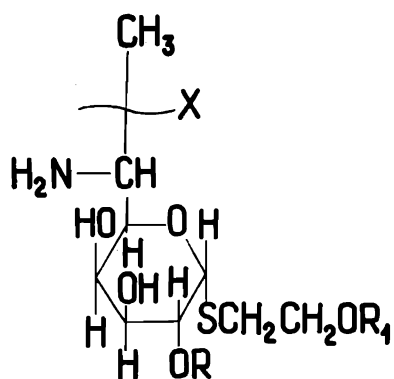
Sposób wytwarzania nowego β-hydroksyetylotiolinkosaminidu o wzorze 1, znamienny tym, że szczep *Streptomyces caelestis* 22227a o charakterystycznych cechach hodowli, zdeponowanej pod numerem NRRL 5320, hoduje się w wodnym środowisku odżywczym, w warunkach aerobowych i otrzymaną 7-0-demetylocelestycetynę o wzorze 2 poddaje się hydrazynolizie z wodnianem hydrazyny pod chłodnicą zwrotną.



Wzór 1



Wzór 2



Wzór 3

