Союз Советских Социалистических Республик

Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(11) 938746

(61) Дополнительный к патенту -

(22) Заявлено 07.10.77 (21) 2533351/28-13

(51) М. Кл.[3] C 12 P 1/04// A 61 K 31/00 C 12 P 1/04; C 12 R 1/365

(23) Приоритет - (32) 31.03.77

(31) 37167/77 (33) Япония

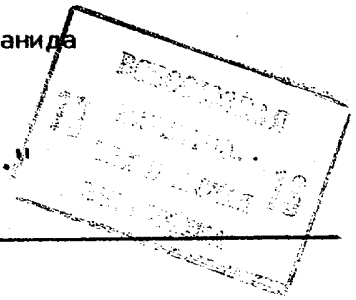
(53) УДК 678.044.29(088.8)

Опубликовано 23.06.82. Бюллетень № 23

Дата опубликования описания 25.06.82

(72) Авторы изобретения: Иностранцы Эйдзи Хигасиде, Мицуко Асаи и Сеиити Танида (Япония)

(71) Заявитель: Иностранная фирма "Такеда Кемикал Индастриз, Лтд." (Япония)



(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ МЕТАНЗИНОЛА, МЕТАНАЦИНА И ПРОПИОНАТА МЕТАНЗИНОЛА

1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения алкалоидов.

Известен способ получения алкалоидов метанзинола, метанацина и пропионата метанзинола путем экстракции целевого продукта органическим растворителем [1].

Однако известный способ дает недостаточно высокий выход алкалоидов, а именно 0,025 мг метанзинола и 0,36 мг метанацина из 1 кг высушенного сырья.

Целью изобретения является повышение выхода алкалоидов.

Эта цель достигается тем, что штамм Nocardia C-15003 выращивают в питательной среде, содержащей источники углерода и азота, минеральные соли и стимуляторы роста, затем отделяют культуральную жидкость от биомассы, подвергают их порознь экстракции и целевой продукт очищают и концентрируют.

2

Кроме того, экстракцию проводят с помощью несмешивающегося с водой органического растворителя.

Целевой продукт очищают методом хроматографии или осаждения.

Штамм Nocardia C-15003 выделен из почвы.

Штамм Nocardia C-15003 депонирован в научно-исследовательском институте ферментов, агентства индустриальной науки и технологии (FERM) под номером 3992, в институте ферментов Осака (IFO) под номером 13726 и в американской коллекции культур (ATCC) под номером 31281.

Культурально-морфологические признаки.

Вегетативный мицелий хорошо растет и ветвится на агаре и в жидкой среде. Гифы имеют 0,8-1,2 мм в диаметре.

Воздушный мицелий представляет собой извилистые, прямые или свободные спирали.

Конидии собраны в цепочки, тогда, как ячеистые суспензии, полученные с поверхностей таких культур, наблюдаемые под микроскопом, содержат много вытянутых элипсоидальных (0,8-1,2 х х 4,8-6,8 мм) и элипсоидальных 0,8-1,2 х 1,0-2,0 мм) тел, похожих на артроспоры.

Штамм хорошо растет в различных средах, причем вегетативный мицелий бесцветный, бледно-желтый в начальных стадиях и светло-желтоватый до желтоватого цвета дубовой коры в последних стадиях. Штамм дает растворимые пигменты от желтых до желтоватых тонов дубовой коры в различных таксономических средах.

Агар нитрата сахарозы.

Рост буйный. Субстратный мицелий от цвета желтой дыни до цвета янтаря. Воздушный мицелий скудный, белый. Растворимый пигмент отсутствует или он бледно-желтый, рыжевато-коричневый.

Глюкозо-аспарагиновый агар.

Рост средний. Субстратный мицелий от цвета ноготков до желтого. Воздушный мицелий скудный, белый. Растворимый пигмент - желтый.

Крахмальный агар.

Рост средний. Субстратный мицелий цвета слоновой кости. Воздушный мицелий изобильный, цвета слоновой кости. Растворимый пигмент отсутствует.

Питательный агар.

Рост средний. Субстратный мицелий от цвета слоновой кости до желтого. Воздушный мицелий скудный, белый. Растворимый пигмент отсутствует.

Агар с малатом кальция.

Рост средний. Субстратный мицелий от цвета слоновой кости до цвета пшеницы. Воздушный мицелий средний, белого цвета до цвета слоновой кости. Растворимый пигмент отсутствует.

Дрожжевой агар с солодом.

Рост средний. Субстратный мицелий от янтарного до желтого. Воздушный мицелий средний, белый до цвета слоновой кости. Растворимый пигмент отсутствует.

Агар с нитратом глицерина.

Рост средний. Субстратный мицелий цвета слоновой кости, коремия подобна образованным телам. Воздушный мицелий средний, белый. Растворимый пигмент отсутствует.

Агар аспарагина с глицерином.

Рост средний, субстратный мицелий цвета слоновой кости, коремия подобна образованным телам. Воздушный мицелий скудный, белый. Растворимый пигмент отсутствует.

Агар с овсянкой.

Рост средний. Субстратный мицелий от цвета слоновой кости до желтого, коремия подобна образованным телам. Воздушный мицелий скудный, белый до светло-желтого. Растворимый пигмент отсутствует.

Экстракт пептонных дрожжей в крепком агаре.

Рост средний. Субстратный мицелий желтый. Воздушный мицелий отсутствует. Растворимый пигмент желтый.

Тирозиновый агар.

Рост средний. Субстратный мицелий от цвета слоновой кости до цвета желтой дыни. Воздушный мицелий средний, от белого цвета до цвета слоновой кости. Растворимый пигмент - цвет верблюда.

Физиологические характеристики.

Растет при 12-38°С. Оптимальная температура для роста 20-35 С.

Желатину разжижает, крахмал гидролизует.

Молоко пентонизирует, но не коагулирует.

Казеин разлагает.

Нитраты сжижает.

Меланоидных пигментов не образует.

Тирозин разлагает.

Ксантин и гипоксантин не разлагает.

Толерантность лизима положительная. Толерантность хлорида натрия - 2%.

Очень хорошо усваивает ксилозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, хорошо усваивает арабинозу, галактозу, рамнозу, трегалозу, мелибиозу, маннитин, крахмал.

Слабо усваивает лактозу, инозитин, сорбитин, глицерин.

Окрашивание по Граму вегетативного мицелия штамма - положительное.

Среда, употребляемая для культивирования штамма, способного производить метанзинол, метанацин или пропионат метанзинола может быть жидкой и твердой. В последнем случае она должна содержать питательную среду, которую штамм может утилизировать, хотя жидкая среда предпочтительна для высокопродуктивных процессов, и, как

было найдено, среда является мезоформой, тогда как обнаруженные пятна соответствовали галактозе и арабинозе.

Среда содержит источники углерода и азота, которые штаммом № С-15003 могут ассимилироваться и дигестироваться, неорганический материал, следы питательной среды и т.д. В качестве источников углерода могут быть глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, декстрин, крахмал, глицерин, маннитин, сорбитин и т.д., жиры и масла (например, соевое масло, свиное сало, куриный жир и т.д.) и другие. Источниками азота могут быть, например, экстракт мяса, экстракт крахмала, сухой крахмал, соевая мука, злаки, погруженные в жидкость, пептон, казеин, мука из семян хлопка, меласса, мочевина, соли аммония (например, сульфат, хлорид, нитрат, ацетат аммония и т.д.) и другие.

Среда может также содержать соли натрия, калия, кальция, магния и т.д., соли железа, марганца, цинка, кобальта, никеля и т.д., соли фосфорной борной кислот и т.д., соли органических кислот, такие, как ацетаты и пропионаты.

Среда может также содержать как добавки различные аминокислоты (например, глутаминовую, аспарагиновую кислоты, аланин, глицин, лизин, метионин, пролин, и т.п.) пептиды например, дипептиды, трипептиды и т.д.) витамины например, B_1-B_2, никотиновую кислоту, B_{12}, С, Е и т.д.), нуклеиновые кислоты (например, пурин, пирамидин и их производные и т.д.). Для создания определенной величины pH среды добавляют органические или неорганические кислоты, щелочи, буферы и т.п. Растворимые количества масел, жиров, поверхностно-активных веществ и т.д. могут также добавляться в качестве антивспенивателей.

Культивирование проводят при стационарных, колебательных, погружных, аэробных и других условиях.

Для высокопродуктивных процессов погружное аэробное культивирование является предпочтительным. Культивирование зависит от условий и состава среды, штамма, способа культивирования и других факторов, причем предпочтительно проводят инкубирование при 25-30°С с начальной величиной pH в области 7. В промежуточной стадии культивирования желательна температура 23-30°С с начальным pH 6,5-7,5. Так как время инкубирования меняется в зависимости от упомянутых факторов, желательно продолжать инкубирование до тех пор, пока титр предлагаемого антибиотика не станет максимальным. При культивировании в условиях аэробного погружения в жидкую среду необходимый интервал времени обычно составляет 48-144 ч.

Метанацин, пропионат метанзинола или метанзинол получается и аккумулируется в равнодействующем культивированном бульоне как внеклеточно, так и внутриклеточно.

Ни одно из этих веществ не показывает ясную антибиотическую активность, поэтому они были обнаружены с помощью тонкослойной хроматографии. Ферментный бульон разлагается в клетках и фильтре с помощью фильтрации или центрифугирования и фильтрат экстрагируют тем же объемом этилацетата. К клеткам добавляют такое же количество 70%-ного раствора ацетона в воде, как к фильтрату, и после перемешивания в течение часа при 20°С суспензию фильтруют. Ацетон удаляют из фильтрата и водный фильтрат экстрагируют этилацетатом. Каждый из экстрактов концентрируют до 1/100 по объему и анализируют с помощью тонкослойной хроматографии на силикатной гелево-стеклянной пластине (растворитель хлороформ - метанол 9:1). Об активности судят по интенсивности пятен, определяемых иррадиацией с ультрафиолетовым светом при 2537 А.

Метанацин, пропионат метанзинола или метанзинол, которые, таким образом получают в культивированном бульоне, дипофильны и нейтральны, они могут быть легко регенерированы путем сепарации и очистки, которые осуществляют обычно для получения таких микробиологических метаболитов. Например, может быть осуществлена операция, которая использует разницу в растворимости между антибиотиком и примесями, способы, которые используют фракционную абсорбционную эффективность различных абсорбентов, таких, как активизированный уголь, микропористые неионные смолы, силикагель, алюминий и т.д., процесс удаления примесей посредством ионообменных смол и т.д. Эти способы могут применяться по отдельности, в комбинации друг с другом, однократно или многократно.

Метанацин, метанзинол или пропионат метанзинола получают в фильтрате, антибиотики отделяют и очищают посредством абсорбентов. Антибиотик получают или непосредственно, или после экстракции растворителем в случае фильтрата, или после экстракции растворителем в случае микробных клеток. Экстракция растворителем может быть осуществлена из культивированного бульона для отделения клеток и из фильтрата, полученного после фильтрации, центрифугирования или других процессов.

Чтобы экстрагировать фильтрат и клетки независимо друг от друга могут быть использованы растворители для экстракции фильтрата - водоэмульсионные органические растворители такие, как эфиры жирных кислот, например этилацетат и амилацетат, спирты, например бутанол, галогенированные гидрокарбонаты, например хлороформ, кетоны, например метил-изобутилкетон.

Экстракцию производят при pH, близком к нейтральному. Предпочтительно культивированную жидкость, доведенную до pH 7, экстрагировать этилацетатом. Экстракт промывают водой и концентрируют под пониженным давлением. Затем неполярный растворитель такой, как петролейный эфир или гексан добавляют к концентрату, и сырой продукт 1, содержащий активные соединения, регенерируется. Так как на тонкослойной хроматограмме обнаруживается ряд других пятен, кроме метанацина, метанзинола, пропионата метазинола, то продукт 1 подвергают очистке.

Для очистки используют ряд методов, например абсорбционную хроматографию, с применением одного из общепринятых абсорбентов таких, как силикагель, алюминий, макропористая неионная смола. Для очистки сырого продукта 1 особенно подходит силикагель. Затем петролейный эфир и гексан используют с добавлением полярных растворителей таких, как этилацетат, ацетон, этанол или метанол. Силикагель используют как носитель, хроматографическую колонку заполняют последовательно возрастающими отношениями гексана к этилацетату. Пробу исследуют с помощью тонкослойной хроматографии, и фракции, содержащие активные ингредиенты, собирают и концентрируют под пониженным давлением. Затем петролейный эфир или гексан добавляют к концентрату, при этом получают сырой продукт П. Так как этот продукт содержит еще примеси, его очищают. На пример, продукт 11 может быть очищен с помощью второй колонки с силикагелем, с использованием дифференциальной системы растворителей. Система растворителей для этой цели может состоять из галогенированного углеводорода такого, как дихлорметан или хлороформ, с добавлением полярного растворителя такого, как спирт, например этанол или метанол, кетон, например ацетон или метилэтилкетон и т.п.

Таким образом выделяют метанацин, метанзинол или пропионат метанзинола. Чтобы система растворителей для первой и второй колонок с силикагелем могла быть регенерирована, обычные органические растворители при необходимости могут использоваться совместно с упомянутыми.

Когда макропористая абсорбционная смола используется как средство для очистки сырого продукта 11, то очистку метанацина, метанзинола или пропионата метанзинола выполняют в смеси воды с низшим спиртом, низшим кетоном или эфиром. Низшим спиртом может, например, быть метанол, этанол, пропанол или бутанол и низшими кетонами могут быть, например ацетон или метилэтилкетон. Эфиром может, например, быть этилацетат. В типичной операции сырой продукт 11 растворяют в 60%-ном растворе метанола в воде и абсорбируют на колонке Diaion-HR10. Колонку промывают 70%-ным, а затем 90%-ным раствором метанола в воде.

Таким образом метанацин, пропионат метанзинола или метанзинол выделяют из колонки.

Фракции, содержащие указанные компоненты, объединяют и концентрируют под пониженным давлением. К сухому продукту добавляют 5-8 объемов этилацетата, и смесь отстаивают. Затем кристаллы метанацина, пропионата метанзинола и метанзинола отделяют с помощью абсорбентов. Так, используя силикагель или макропористую неионную смолу, а в качестве абсорбента - растворители, выделяют описанные соединения. Когда, например, используют силикагель, то применяют гексан, этил-

ацетат или смесь хлороформ-метанол, при этом выделяют пропионат метанзинола и метанацин. После обнаружения с помощью тонкослойной хроматографии фракции концентрируют под пониженным давлением, и этилацетат добавляют к концентрату. Таким образом, соответствующее соединение может быть получено в виде кристаллов.

Когда применяют макропористую неионную абсорбентную смолу, то может быть использован растворитель с различным соотношением спирта, кетона или эфира и воды. Например, при использовании 60% метанол-вода и 95% метанол-вода с добавкой 5% хлорида натрия метанацин и пропионат метанзинола появляются в упомянутом порядке. После взятия пробы и определения с помощью тонкослойной хроматографии каждую группу активных фракций концентрируют под пониженным давлением и кристаллизуют из этилацетата. Выделенные кристаллы включают этилацетат как растворитель кристаллизации и после сушки над пятиокисью фосфора при 70°С в течение 8 ч имеют физические и химические свойства, представленные в таблице.

Показатели	Метанацин	Пропионат метанзинола	Метанзинол
1	2	3	4
Точка плавления, °С	235-236	188-190	172,5-174
Специфическое вращение	$(\alpha)^{22^\circ}$ =121 + +10° (C=0,25; $CHCl_3$)	$(\alpha)^{22^\circ}$ = 127-10° (C=0,35; $CHCl_3$)	$(\alpha)^{22^\circ}$ = 313-10° (C=0,22; $CHCl_3$)
Найдено, %	C 59,62	59,93	59,28
	H 6,93	6,82	6,38
	4,28	4,32	5,02
	Cl 5,74	5,57	6,15
Вычислено, %	C 59,85	59,95	59,52
	H 6,48	6,65	6,60
	N 4,61	4,51	4,96
	Cl 5,84	5,71	6,27
Ультрафиолетовый абсорбционный спектр $U_m(\varepsilon)$	233 (30330)	233 (30240)	233 (32750)
	240 (Sh 28240)	240 (Sh 28400)	244 (Sh 30850)
	252 27850	252 27650	252 (31650)
	280 5680	280 5740	281 (5750)
	288 5660	288 5710	288 (5700)
Инфракрасный абсорбционный спектр, $см^{-1}$	1740; 1730; 1670; 1580	1740; 1730; 1670; 1580	1715; 1670; 1580

Продолжение таблицы

1	2	3	4
Масс-спектр, ш/е	545; 485; 470; 450	559; 485; 470; 450	503; 485; 470; 450
Кислота, нейтральная или основная	Липофил и нейтральное вещество	Липофил и нейтральное вещество	Липофил и нейтральное вещество
Цветные реакции (р-ция Драгендорфа)	Положительная	Положительная	Положительная
Реакция Бельштейна	Положительная	Положительная	Положительная

Приведенные данные элементного анализа, специфического вращения, УФ-, ИК- и масс-спектров находятся в хорошем соответствии с данными для метанацина.

Пример 1. Метанзинол, метанацин и пропионат метанзинола - производные Нокардиа С-15003 (IFO 13726; FERM 3992; ATCC 31281), выращенные на дрожжевом экстракте солода в агаре, используют для прививки 200 ч (по объему) ферментов, содержащих 40 об.ч семян, культивированных в среде (2% глюкозы, 3% раствора крахмала, 1% муки сырых соевых бобов, 1% погруженных в жидкость злаков, 0,5% полипентона, 0,3% NaCl, 0,5% $CaCO_3$, pH 7,0).

Культивированную среду инкубируют при 28°С в течение 48 ч до введения в колонку 0,5 об.ч. раствора, полученного таким образом: из колонки помещают в 200 об.ч. фермента, содержащего 40 об.ч. ферментной среды, состоящей из 5% декстрина, 3% зерна, погруженного в жидкость, 0,1% полипептона и 0,5% $CaCO_3$ при pH 7,0, и культивируют при 28°С в течение 90 ч, чтобы получить культуру семян.

Методом последовательного разбавления, используя в качестве исследуемого организма Тетрахимену пириформис Wи метанзинолпропионат как стандартный продукт, найдено, что названная культура имеет титр 25 мг/мл.

Пример 2. 10 об.ч. культуры семян, полученных в примере 1, помещают в 2000 об.ч. фермента, содержащего 50 об.ч. семян, культивированных в среде (такой же, как упомянутая), и инкубируют при 28°С в течение 48 ч. 500 об.ч. культуры переносят в сосуд из стали емкостью 50000 об.ч., содержащий 30000 об.ч. семян, культивированных в среде, и культивируют при 28°С, аэрации (30000 об.ч./мин), перемешивании [280 г.р. m. (1/2ДТ) и внутреннем давлении (1 кг/см^2) для получения культуры семян. Эту культуру используют для посева 200000 об.ч. в сосуде из стали, содержащем 100000 об.ч. ферментативной среды, подобной среде, использованной в примере 1, при скорости инокуляции 10%. Инокуляционную среду инкубируют при 28°С, аэрации (100000 об.ч. /мин), перемешивании [200 г.р. m .(1/2ДТ)] и внутреннем давлении (1 кг/см^2) в течение 90 ч. Проводят ту же операцию, что и в примере 1. Полученная культура имеет титр 25 мг/мл.

К 90000 об.ч. полученной культуры добавляют 2000 ч. Гифло-суперцела Р и, после перемешивания, смесь фильтруют на фильтр-прессе, чтобы получить 85000 об.ч. фильтрата и 32000 ч. влажных клеток. Фильтрат 85000 об.ч. перемешивают и экстрагируют 30000 об.ч. этилацетата. Эту операцию повторяют снова. Осадки этилацетата объединяют, промывают дважды 30000 об.ч. воды, сушат путем добавления 500 ч. обезвоженного сульфата натрия и концентрируют под пониженным давлением до 200 об.ч. Петролейный эфир добавляют к концентрату и проводят осаждение и фильтрование. Полученный сырой продукт 1 перемешивают со 100 об.ч. этилацетата, и раствор фильтруют. Фильтрат смешивают с 10 ч. силикагеля и этилацетат удаляют под пониженным давлением. Остаток помещают на верх колонки с силикагелем (400 об.ч.) Раствор удаляют 500 об.ч. гексана, 500 об.ч. смеси гексанэтилацетат (3:1),

500 об.ч. смеси гексан-этилацетат (1:1), 500 об.ч. смеси гексан-этилацетат (1:3), 500 об.ч. этилацетат, 1000 об.ч. смеси этилацетат-метанол (50:1) и 1000 об.ч. смеси этилацетат-метанол (25:1), собранными во фракции по 100 об.ч.

Одну часть объема каждой фракции концентрируют сушкой, и 0,1 об.ч. этилацетата добавляют в концентрат. Смесь дает пятно на расстоянии 2,5 см от дна острия силикагелевой стеклянной пластины и растет, примерно, до 17 см с растворимой системой этилацетат-метанол (19:1). После этого производят определение в ультрафиолетовом свете (2537 Å).

Активные фракции № 25-30 Rf 0,58-0,63 и фракции № 38-40 Rf 0,25-0,30 собирают и концентрируют под пониженным давлением, примерно до 20 об.ч. К этим концентратам добавляют 150 об.ч. петролейного эфира для получения 5 ч. сырого продукта 11 и 2 ч. сырого метанзинола.

В 10 об.ч. этилацетата растворяют 0,5 ч. полученного сырого продукта 11, и раствор хорошо перемешивают с 4 ч. силикагеля. Этилацетат удаляют под пониженным давлением. Осадок помещают на верх колонки с 300 об.ч. силикагеля, и колонку вначале промывают 500 об.ч. хлороформа и затем обрабатывают 500 об.ч. смеси хлороформ-метанол (50:1), 500 об.ч. смеси хлороформ - метанол (20:1) и 500 об.ч. смеси хлороформ - метанол (10:1). Раствор собирают фракциями по 25 об.ч.

0,5 об.ч. каждой фракции концентрируют при пониженном давлении. К концентрату добавляют 0,05 об.ч. этилацетата, и смесь в виде образца подвергают анализу методом тонкослойной хроматографии (система хлороформ - метанол 9:1).

Фракцию № 40, абсорбированную при 2537 Å в зоне R_f 0,48-0,50, собирают и концентрируют сушкой под пониженным давлением. К осадку добавляют 0,5 об.ч. этилацетата, и смесь отстаивают, затем получают 0,05 ч. смешанных кристаллов метанацина и пропионата метанзинола.

0,05 ч. смешанных кристаллов метанацина растворяют в 5 об.ч. метанола, следовавшего за добавлением 0,1 ч. хлорида натрия и 5 об.ч. воды. Колонку заполняют 200 об.ч. Diaion HP-10 и промывают 600 об.ч. 50% метанол-воды, содержащих 5% NaCl. Пробу раствора, приготовленного указанным способом, пропускают через колонку и растворение доводят до конца с использованием 1500 об.ч. 60% метанола - воды, содержащих 5% NaCl и 1500 об.ч..95% метанола - воды. Раствор собирают в фракции по 15 об.ч., и каждую фракцию исследуют тонкослойной хроматографией. Фракции 130-135 содержат метаноцин, и фракции 138-142 содержат пропионат метанзинола.

Каждую группу фракций концентрируют и растворяют добавлением 30 мл воды и 50 мл этилацетата. Раствор перемешивают в разделительной воронке, водный слой отделяют, и после двухкратной промывки 30 мл воды осадок этилацетата высушивают над безводным сульфатом натрия, концентрируют и отстаивают. Описанным способом получают кристаллы из каждой группы фракций. Кристаллы собирают с помощью фильтрации и сушки. Содержание метанацина 0,013 ч., пропионата метанзинола - 0,025 ч.

В 3 об.ч. этилацетата растворяют 0,2 ч. сырого метанзинола, полученного описанным способом, и раствор хорошо перемешивают с 0,5 ч. силикагеля.

Этилацетат удаляют под пониженным давлением. Осадок помещают на верх колонки с 80 об.ч. силикагеля, и колонку сначала промывают 150 об.ч. хлороформа и затем 150 об.ч. смеси хлороформ-метанол (50:1), 150 об.ч. смеси хлороформ-метанол (20:1) и 300 об.ч. смеси хлороформ-метанол (10:1). Раствор собирают во фракции по 10 об.ч.

0,5 об.ч. каждой фракции концентрируют под пониженным давлением. К концентрату добавляют 0,05 об.ч. этилацетата, и смесь подвергают анализу с тонкослойной хроматографии (растворяющая система хлороформ - метанол 9:1).

Фракции № 50-52 абсорбируют при 2537 Å в зоне 0,33-0,38, собирают и концентрируют путем сушки под пониженным давлением. К осадку добавляют 0,5 об.ч. этилацетата, и смесь отстаивают, в результате чего получают 20 ч. кристаллов метанзинола.

Пример 3. Путем перемешивания 32000 ч. клеток, полученных в примере 2, экстрагируют 50000 об.ч.

70% ацетона - воды в течение 3 ч и затем фильтруют на фильтр-прессе. Экстракцию проводят 50000 об.ч. 70% ацетона - воды, и снова повторяют фильтрацию. Фильтрат соединяют и ацетон удаляют концентрированием под пониженным давлением. Водную систему пропускают через колонку с 5000 об.ч. Diaion HP-10. Колонку промывают 20000 об.ч. воды и 50%-ным водным раствором метанола, затем 15000 об.ч. 90%-ного раствора метанола в воде. Раствор концентрируют под пониженным давлением до 3000 об.ч., встряхивают с 3000 об.ч. воды и 3000 об.ч. этилацетата. Эту же операцию повторяют снова. Слои этилацетата соединяют, промывают водой, сушат путем добавления обезвоженного сульфата натрия и концентрируют под пониженным давлением до 200 об.ч. Последующим добавлением петролейного эфира осадок отделяют фильтрованием (280 ч.). Упомянутый сырой продукт 1 очищают с помощью колонки силикагеля так же, как в примере 1, с выделением 1,0 ч. сырого продукта 11 и 0,5 ч. сырого метанзинола.

Пример 4. 1000 об.ч. культуры примера 2 помещают в стальной сосуд емкостью 200000 об.ч., содержащий 100000 об.ч. культуры семян в среде. Среду инкубируют при 28°С при аэрации (100000 об.ч./мин) и перемешивании (200 г.р.т.) в течение 48 ч до получения культуры семян. Эту культуру семян помещают в стальной сосуд емкостью 2000000 об.ч., содержащий 1000000 об.ч. ферментативной среды, так же, как в примере 1, при скорости трансплантации 10%. Культивирование проводят при 28°С в условиях аэрации (1000000 об.ч./мин), перемешивания [120 г.р. т 1/3ДТ] и внутреннего давления (1 кг/см^2)в течение 90 часов. Культура имеет титр 20 мг/мл. Далее проводят те же операции, что и в примере 1. К 900000 об.ч. упомянутой культуры добавляют 900000 об.ч. ацетона и после часа перемешивания 20000 ч. Hyflosupersel Johnes. Смесь затем перемешивают и фильтруют на прессфильтре. К 1700000 об.ч. результирующего фильтрата добавляют 500000 об.ч. воды и в Podbielniak смесь экстрагируют с 1000000 об.ч. этилацетата. Слой этилацетата промывают водой, сушат путем добавления обезвоженного сульфата натрия и концентрируют при пониженном давлении. К концентрату добавляют петролейный эфир, и осадок выделяют фильтрованием и сушкой. В результате этой операции получают 680 ч. сырого продукта 1. Затем, как в примерах 2 и 3, этот сырой продукт очищают до получения 1,1 ч. метанацина, 2,2 ч. пропионата метанзинола и 0,1 ч. метанзинола.

Предлагаемый способ позволяет увеличить выход алкалоидов.

Формула изобретения

1. Способ получения алкалоидов метанзинола, метанацина и пропионата метанзинола путем экстракции целевого продукта органическим растворителем, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода алкалоидов, штамм Nocardia C-15003 выращивают в питательной среде, содержащей источники углерода и азота, минеральные соли и стимуляторы роста, затем отделяют культуральную жидкость от биомассы, подвергают их порознь экстракции и целевой продукт очищают и концентрируют.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что экстракцию проводят с помощью несмешивающегося с водой органического растворителя.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что целевой продукт очищают методом хроматографии или осаждения.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе

1. Kipchan et al. - Journal of the American Chemistry Society, 1975,97, 5294.

Составитель С. Малютина
Редактор Н. Егорова Техред З. Палий Корректор В. Бутяга
Заказ 4495/81 Тираж 505 Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5
Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4