



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

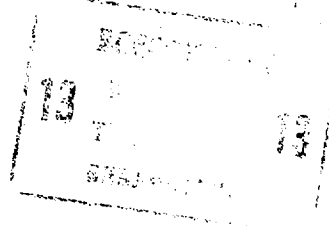
(19) **SU** (11) **1276248 A3**

(5D) 4 C 12 N 1/10

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ



(21) 3478751/30-15

(22) 03.08.82

(31) 122210/1981

(32) 04.08.81

(33) (JP)

(46) 07.12.86. Бюл. № 45

(71) Рикагаку Кенкюсё, Какен Кемикал
Ко, Лтд (JP)

(72) Киоси Исоно, Гото Накамура
и Сигео Фудзита (JP)

(53) 615.779.931(088.8)

(56) Diagnosis and treatment of
fungal infection. Ed. by H. Robin-
son. - Springfield: Thomas, 1974.

(54)(57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИБИОТИ-
КА 76-11, предусматривающий культи-
вирование штамма *Actinomadura* Sp
76-11 FERM BP 83 при аэрации на вод-
ной питательной среде, содержащей
3% овсяной муки, 1,5% глицерина и
0,5% мясного экстракта, удаление вы-
ращенных клеток, выделение антибиоти-
ка из культуральной жидкости этилаце-
татом с последующей очисткой его ме-
тодом хроматографии на силикагеле
с элюцией антибиотика смесью, состоя-
щей из 50% бензола и 50% этилацетата.

(19) **SU** (11) **1276248 A3**

Изобретение относится к способам получения антибиотиков.

Целью изобретения является способ создания высокоэффективного антикоксидиоидозного препарата.

Используемый микроорганизм принадлежит к роду *Actinomyces*, штамм Sp. 76-11 и способен продуцировать антибиотик 76-11. Штамм Sp 76-11 хранится в Институте ферментационных исследований Ведомства по промышленной науке и технике Министерства международной торговли и промышленности (FERM). Штамму присвоен номер FERM BP-83.

Характеристики штамма Sp 76-11 на различных культуральных средах наблюдаются через 20-30 дней после инокуляции:

α-Арабиноза	хороший рост
D-Ксилоза	—"
D-Глюкоза	—"
D-Фруктоза	—"
Сахароза	—"
ℓ-Инозит	рост есть
α-Рамноза	хороший рост
Рафиноза	рост есть
Маннит	очень хороший рост

Штамм Sp 76-11 может быть охарактеризован следующими признаками.

Морфологические признаки.

Sp 76-11, как правило, не образует воздушный мицелий, но иногда образует его по прошествии длительного периода культивации. Субстратный мицелий является изогнутым, и в последний период культивации делится с образованием эллиптических спор. Мицелий грамположительный и кислотостойкий.

Рост на различных средах.

Sp. 76-11 не растет или плохо растет на различных агарах, но агар с овсяной мукой и агар с дрожжевым экстрактом и солодовым экстрактом являются для него хорошей культуральной средой.

Штамм лучше растет на агаре с овсяной мукой и образует голубовато-индигоидный, нерастворимый в воде пигмент в клетках по прошествии 3-4 недель культивации.

Физиологические характеристики.

Штамм хорошо растет при 33-37°C, слегка разжижает желатин, свертывает и пептонизирует снятое молоко и не образует меланинового пигмента.

Использование сахаров.

Штамм хорошо использует α-арабинозу, D-ксилозу, D-глюкозу, D-фруктозу, сахарозу, ℓ-инозит, α-рамнозу, рафинозу и маннит на агаре Придхэма и Готлиба в качестве культуральной среды, к которому добавлено 0,1% дрожжевого экстракта.

После проведения культивирования на жидкой среде культуральный бульон центрифугируют для отделения клеток от бульона. Полученный таким путем антибиотик 76-11 может быть выделен из культуральной среды любым общепринятым методом, который обычно используется для выделения метаболита. Например, можно применить метод, использующий различие в растворимости между антибиотиком 76-11 и при-
20 месью, или метод, использующий адсорбционное сродство между ними, или их комбинации.

Выработанный антибиотик 76-11 присутствует как в культуральном бульоне, так и в клетках, и может быть экстрагирован из культурального бульона с использованием этил- или бутилацетатов, хлороформа, бутанола и т.п., в зависимости от их растворимости. Клетки экстрагируют водным ацетоном или водным метанолом, органический растворитель отгоняют при пониженном давлении, и полученный таким путем водный раствор экстрагируют этилацетатом и т.п. Экстрагированные растворы комбинируют и концентрируют с получением сырого экстракта антибиотика 76-11. Поскольку сырой экстракт содержит большое количество примесей, его подвергают адсорбционной хроматографии с использованием силикагеля, окиси алюминия и т.п., а затем очищают. Например, сырой экстракт, растворенный в небольшом количестве бензола, вводят в колонку с силикагелем, предварительно кондиционированную бензолом.

Элюирование проводят с использованием бензола, а затем смесью растворителей бензол - этилацетат, в которой содержание этилацетата постепенно возрастает. Элюат фракционируют с применением коллектора фракций. Собирают фракции, проявляющие биологическую активность, и концентрируют их с получением очищенного порошка. Для дальнейшей очистки повторяют аналогичную процедуру хроматографии на

силикагеле. Последующую очистку проводят с применением преперативной тонкослойной хроматографии, если это необходимо. Концентрирование при пониженном давлении дает очищенный продукт, который затем растворяют в небольшом количестве метанола и охлаждают, причем антибиотик 76-11 выделяется в виде бесцветных кристаллов. Кристаллы отделяют фильтрованием и сушат с получением чистого антибиотика 76-11.

Полученный таким путем антибиотик 76-11 характеризуется следующими физико-химическими и биологическими свойствами.

Элементный анализ.

Свободная кислота, %: С 62,61; Н 8,27; N 0.

Натриевая соль, %: С 60,57; Н 8,04; N 0.

Мол. масса: 843 (измерено методом титрования); 873 (измерено FD-масс-спектральным методом).

Т. пл.: свободная кислота 108-112°C; натриевая соль 210-212°C (с разл.).

Удельное вращение: $[\alpha]_D^{25} +36,6^\circ$ (C=0,382 в хлороформном растворе).

Спектр УФ-поглощения. Полосы максимального поглощения в MeOH и HCl-MeOH: $\lambda_{\max} = 217$ мкм ($E_{1\%}^{1\text{см}}$ 303); 262 мкм ($E_{1\%}^{1\text{см}}$ 182); 301 мкм ($E_{1\%}^{1\text{см}}$ 68).

В щелочном MeOH: $\lambda_{\max} = 260$ мкм ($E_{1\%}^{1\text{см}}$ 87); 308 мкм ($E_{1\%}^{1\text{см}}$ 50).

Основные специфические полосы ИК-поглощения (таблетка KBr).

Свободная кислота: 3450, 2960, 1720, 1640, 1610, 1578, 1446, 1380, 1315, 1292, 1250, 1209, 1151, 1100, 1035, 975, 940.

Натриевая соль: 3390, 2960, 1718, 1640, 1609, 1578, 1450, 1380, 1340, 1316, 1250, 1197, 1152, 1108, 1092, 1060, 1040, 1002, 980, 930.

Растворимость в растворителях.

Легкорастворим в бензоле, хлороформе, этилацетате и ацетоне, растворим в метаноле, этаноле и диметилформамиде, слабо растворим в воде и гексане.

Реакции окрашивания.

Положительно - на калийперманганатную реакцию, но отрицательно на периодатнокислотно-бензидиновую реакцию.

Щелочность, кислотность или нейтральность: кислотное вещество, pKa 4,6 (в 66,7%-ном диоксане).

Цвет: бесцветные кристаллы.

Антимикробная активность в виде минимальной концентрации для подавления роста различных микроорганизмов на бульоно-агаровой культуральной среде приведена в таблице.

	Подопытные микроорганизмы	Минимальная концентрация для подавления роста, мкг/мл
10	Staphylococcus aureus 209 P	0,4
20	Staphylococcus aureus (multi resistant)	0,4
25	Bacillus subtilis PC 1219	0,4
30	Bacillus subtilis H 17	0,4
35	Bacillus subtilis m 45 (rec-)	0,4
40	Mycobacterium Sp 607	0,4
45	Mycobacterium phlei	0,4
	Mycobacterium avium	0,4
	Escherichia coli	100
	Salmonella typhimurium	100

Действие на опухолевые клетки.

Антибиотик 76-11 проявляет индукцию дифференцирования в отношении клеток лейкемии Френда и клеток миелоидной лейкемии в концентрации 1-100 мкг/мл.

Токсичность для мышей.

Абдоминальное введение 50, 100 и 200 мг/кг антибиотика 76-11 в виде КМЦ-суспензии показало отсутствие токсичности для мышей.

При сравнении физико-химических и биологических свойств антибиотика 76-II со свойствами известных антибиотиков, антибиотик 76-II может быть классифицирован как так называемый полиэфир-ионофорный антибиотик на том основании, что он является кислым веществом, его натриевая соль растворима в масле, он проявляет сильную активность в отношении грамположительных и кислотоустойчивых бактерий, не содержит в своей молекулярной структуре азота и т.п. Известные вещества не проявляют таких физико-химических свойств, особенно специфических полос УФ-спектра поглощения, как антибиотик 76-II, поэтому последний является новым антибиотиком.

Антибиотик 76-II получают следующим образом.

Микроорганизм Sp 76-II (FERM BP-83), предварительно культивированный в скошенной культуре, инокулируют в жидкую культуральную среду, содержащую 3% овсяной муки, 1,5% глицерина и 0,5% мясного экстракта (рН около 6,5), и культивируют при 28°C в течение 11 суток при встряхивании. Каждые 3 мл культурального раствора инокулируют в свежую культуральную среду, содержащую те же составляющие, и культивируют еще в течение 7 суток.

140 мл культурального раствора, полученного таким путем, инокулируют в 18 л культуральной среды, содержащей те же составляющие в баковом ферментаторе, и культивируют при 28°C в течение 210 ч с аэрацией 18 л/мин и перемешиванием со скоростью 330 об/мин.

После культивации в культуральный раствор добавляют 400 г диатомита (Радиолит 700), после чего раствор подвергают центробежной фильтрации. Полученную надосадочную жидкость (14 л, рН 7,8) дважды экстрагируют 8 и 5 л этилацетата соответственно, а клетки экстрагируют дважды соответственно 9 и 6 л ацетона. Экстрагированный раствор концентрируют в вакууме с получением 2 л водного раствора (рН 8), который затем дважды экстра-

гируют в 1 л этилацетата. Последний проэкстрагированный этилацетатом раствор смешивают с первым раствором, полученным из надосадочной жидкости, и концентрируют в вакууме. Полученный таким путем осадок растворяют в небольшом количестве бензола, который вводят в колонку с силикагелем ($\varnothing$ 3 x 50 см), предварительно кондиционированную бензолом. Элюирование проводят с использованием 2 л бензола, а затем 1 л смеси бензол-этилацетат (5:1 по объему), 1 л смеси бензол-этилацетат (1:1 по объему).

Активные фракции элюируют смесью бензол-этилацетат (1:1 по объему), собирают, концентрируют в вакууме и обрабатывают метанолом с получением 1 г сырого кристаллического вещества. Несколько перекристаллизаций из метанола дают 400 мг чистого кристаллического вещества натриевой соли антибиотика 76-II.

Далее антибиотик испытывают в качестве антикокцидиозного препарата.

Установлено, что цыплята, которым вводят антибиотик 76-II, не проявляют каких-либо симптомов кокцидиоза даже после инфицирования, т.е. рост ооцист *Eimeria tenella* существенно подавляется, следовательно, антибиотик 76-II исключительно эффективен как антикокцидиозный препарат.

Введение антибиотика 76-II в концентрации 25 и 50 млн⁻¹, ускоряет рост на 6,1 и 7,1% соответственно, и повышает эффективность усвоения кормов на 5,9 и 7,4% соответственно.

Введение антибиотика 76-II, полученного согласно предлагаемому способу, травоядным животным ускоряет их рост и повышает эффективность усвоения ими кормов. Кроме того, введение антибиотика 76-II не только предотвращает раздувание живота или кетоз, часто наблюдающиеся у крупного рогатого скота, которому скармливают большие количества концентрированных кормов, но и излечивает животных, которые уже страдают от подобных заболеваний.