



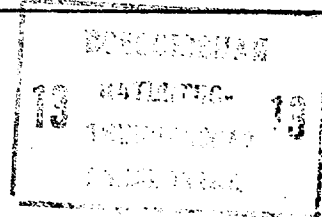
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1069631 A

3(5D) С 12 P 1/06// (С 12 P 1/06;
С 12 R 1/54)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

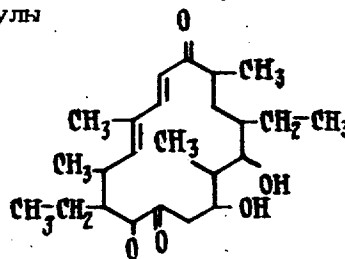
ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



- (21) 3302650/28-13
- (22) 30.06.81
- (31) 162977
- (32) 02.07.80
- (33) США
- (46) 23.01.84. Бюл. № 3
- (72) Ричард Генри Балтз и Юджин Томас Сено (США)
- (71) Эли Лилли энд Компани (США)
- (53) 615.779.931(088.8)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТИЛАКТОНА И ШТАММ STREPTOMYCES FRADIAE NRRL 12188 ДЛЯ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ.

(57) 1. Способ получения тилактона формулы



закрывающийся в том, что штамм Streptomyces fradiae NRRL 12188 выращивают в питательной среде, содержащей источник углерода, азота и неорганические соли, в аэробных глубинных условиях ферментации с последующим выделением целевого продукта и при необходимости этерификацией его.

2. Штамм Streptomyces fradiae NRRL 12188 (Agricultural Research Culture Collectin NRRL), используемый для получения тилактона.

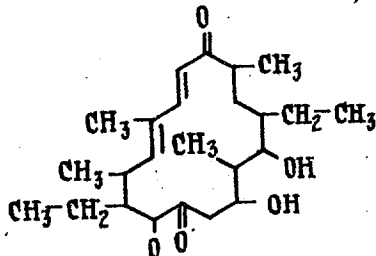
(19) SU (11) 1069631 A

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения антибиотиков.

Целью изобретения является получение антибиотика тилактона.

Для получения тилактона используют штамм *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 (Agricultural Research Culture Collectin NRRL).

Способ получения тилактона формулы



заключается в том, что штамм *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 выращивают в питательной среде, содержащей источник углерода, азота и неорганические соли, в аэробных условиях ферментации с последующим выделением целевого продукта и при необходимости этерификацией его.

В качестве ацилирующих средств при получении тилактона применяют ангидриды, хлорангидриды (в сочетании с основанием или другим соединением, связывающим кислоту и активные эфиры органических кислот). Ацилирование может быть также осуществлено применением смеси органической кислоты и обезвоживающего средства, например N,N'-дициклогексилкарбодимида. Ацилирование может быть также осуществлено энзиматически. Полученные ацильные производные могут быть разделены и очищены известными способами.

Эти производные могут быть получены известными методами этерификации, например обработкой соединения стехиометрическим количеством (или небольшим избытком) ацилирующего средства, например ангидридом органической кислоты в органическом растворителе, например пиридине, при 0-24°C в течение 1-24 ч до полного завершения этерификации.

Полученные эфиры могут быть выделены из реакционной смеси известными способами, например экстракцией, хроматографией и кристаллизацией.

К эфирам, имеющим практическое значение, относятся эфиры органических кислот, в том числе алифатических циклоалифатических, ариловых, аралкиловых, гетероциклических карбоновых, сульфоновых и алкоксикарбоновых с 1-18 углеродными атомами, и неорганических кислот, например серной и фосфорной.

К числу применяемых эфиров относятся эфиры, полученные на основе таких кислот, как муравьиная, уксусная, хлоруксусная, пропионовая, масляная, изовалериановая, глюкуроновая, алкоксикарбоновая, стеариновая, циклопропанкарбоновая, циклогексанкарбоновая, β-циклогексилпропионовая, 1-адамantanкарбоновая, бензойная, фенилуксусная, феноксиуксусная, миндальная, 2-тиенилуксусная и алкил-, арил- и аралкилсульфокислоты, которые могут быть замещены в ароматической части галогеном, нитрогруппой, нижней алкоксигруппой, а также эфиры, полученные на основе таких дикарбоновых кислот, как янтарная, малиновая, фумаровая, малоновая и фталевая.

Тилактон получают культивированием штамма *Streptomyces fradiae*.

Штамм *Streptomyces fradiae* получен химическим мутагенезом штамма *Streptomyces fradiae*, продуцирующего тилозин. Штамм хранится в коллекции штаммов микроорганизмов Северного регионального исследовательского центра Agricultural Research North Central Region 1815 North University Street Peoria Illionis 61604 под регистрационным номером NRRL 12188.

Штамм *Streptomyces fradiae* растет при 10-40°C. Оптимальное продуцирование тилактона происходит при 28°C.

В качестве питательной среды для выращивания *Streptomyces fradiae* используют различные питательные среды, содержащие в качестве источника углерода такие углеводы, как декстрин, глюкоза, крахмал, зерновую муку и масла, например соевое. В качестве источника азота используют зерновую муку, соевую муку, рыбью муку, аминокислоты.

В питательную среду могут быть введены растворимые соли, способные образовывать ионы железа, калия, натрия, магния, кальция аммония, хлор-, карбонат-, сульфат- и нитрат-ионы.

Питательная среда может также содержать микроэлементы, необходимые для роста и развития организма. Эти микроэлементы входят в виде примесей в состав других компонентов среды в количестве, необходимом для роста организма. При необходимости добавляют противопенное средство, например полипропиленгликоль с молекулярным весом около 2000.

Для получения значительных количеств тилактона проводят аэробное глубинное брожение в цистернах. В небольших количествах тилактон получают в сосуде для выращивания микроорганизмов со встряхиванием. Для выращивания применяют вегетативный инокулят. Вегетативный инокулят

получают засевом небольшого объема питательной среды споровой формой организма или мицелием с получением свежей, активно растущей культуры организма. Вегетативный инокулят затем переносят в резервуар большего размера.

Для вегетативного инокулята применяют ту же среду и при ферментации в больших масштабах, но могут быть использованы и другие питательные среды.

При аэробном глубинном выращивании пропускают стерильный воздух. Для эффективного продуцирования антибиотика процент насыщения воздухом должен быть около 30% или выше при 28°C и давлении 1 атм.

Полученный тилактон может быть выделен из среды известными способами (экстрагированием или фильтрованием ферментативного бульона).

При экстрагировании могут быть использованы различные способы. Для очистки отфильтрованного бульона используют способ, согласно которому бульон экстрагируют без установления определенного pH подходящим растворителем, например, амилацетатом, или петролейным эфиром, концентрированием под вакуумом органической фазы с получением кристаллов или масла. В случае получения масла, оно может быть очищено адсорбционной хроматографией.

Пример 1. Лиофилизованную таблетку *Streptomyces fradiae* диспергируют в 1-2 мл стерилизованной воды. Часть этого раствора (0,5 мл) используют для инокуляции вегетативной среды (150 мл), имеющей следующий состав, вес. %: настой пропитанного водой зерна 1,0; экстракт дрожжей 0,5; соевая крупа 0,5; CaCO₃ 0,3; соевое масло 0,45 и деионизированная вода 97,25.

Или же вегетативную культуру *Streptomyces fradiae* NRRL 12188, хранящуюся по 1 мл в жидком азоте, быстро оттаивают и применяют для инокуляции вегетативной среды. Инокулированную вегетативную среду инкубируют в колбе Эрленмейера на 500 мл при 29°C 48 ч в качалке со скоростью вращения 300 об/мин.

Полученную инкубированную вегетативную среду в количестве 0,5 мл применяют для инокулирования 7 мл питательной среды следующего состава, вес. %: свекольная меласса 2,0; зернофая мука 1,5; рыба мука 0,9; клейковина зерна 0,9; NaCl 0,1; (NH₄)₂HPO₄ 0,04; CaCO₃ 0,2; соевое масло 3,0 и деионизированная вода 91,36.

Инокулированную питательную среду инкубируют в сосуде на 50 мл при 28°C 6 дней в качалке при 300 об/мин,

Для получения инокулята в большом объеме 60 мл инкубированной вегетативной среды, приготовленной описанным способом, применяют для инокулирования 38 л вегетативной среды роста второй стадии, имеющей следующий состав, вес. %: настой пропитанного водой зерна 2,0; соевая мука 0,5; экстракт дрожжей 0,5; CaCO₃ 0,3; соевое масло 0,5; лецитин 0,015 и вода 97,185.

Добавлением 50%-ного раствора NaOH pH приводят к значению 8,5.

Вегетативную среду второй стадии инкубируют в цистерне на 68 л 47 ч при 29°C. 4 л полученной инкубированной среды второй стадии применяют для инокулирования 40 л стерильной среды следующего состава, вес. %: рыба мука 0,92; зерновая мука 1,57; клейковина зерна 0,92; CaCO₃ 0,21; NaCl 0,1; (NH₄)₂HPO₄ 0,04; свекольная меласса 2,1; соевое масло 3,15; лецитин 0,09 и вода 90,9.

Добавлением 50%-ного раствора NaOH pH доводят до 7,2. Инокулированную питательную среду помещают для брожения в цистерну на 68 л на 5 дней при 28°C. Питательную среду аэрируют воздухом таким образом, что уровень растворенного воздуха составлял 30-50%, перемешивание осуществляют мешалками со скоростью 300 об/мин.

Пример 2. Ферментированный бульон (1600 л), полученный способом по примеру 1, фильтруют через фильтрующее устройство. pH фильтра доводят до 9 добавлением 2%-ного раствора едкого натра.

Фильтрат экстрагируют 400 л амилацетата. Амилацетатный экстракт, имеющий высокую оптическую плотность, но не проявляющий противомикробной активности, концентрируют в вакууме с получением масла.

Масло растворяют в 5 л бензола, бензолный раствор хроматографируют на колонке, заполненной силикагелем и промытой бензолом. Элюирование контролируют тонкослойной хроматографией, применяя смесь бензол-этилацетат (3:2) в качестве системы растворителей и распыленную серную кислоту для проявления. Сначала колонку промывают бензолом для удаления метедных соединений, а затем смесью бензол-этилацетат (9:1) для удаления и выделения тилактона. Фракции, содержащие тилактон, объединяют и испаряют под вакуумом. Тилактон кристаллизуют из смеси бензол-гексан или горячего гексана с выходом 2 г.

Тилактон представляет собой белое твердое вещество, кристаллизующееся из гексана или смеси гексана

с этилацетатом, плавящееся при 162-163°C.

Элементный состав, %: углерод 70, водород 9,7 и кислород 20,3. Эмпирическая формула тилактона $C_{23}H_{38}O_5$, молекулярный вес 394.

Инфракрасный спектр тилактона в хлороформе. Отмечены частоты, при которых обнаруживаются заметные абсорбционные максимумы: 3534 (средний) 2924 (сильный), 2398 (слабый), 2353 (слабый), 1709 (очень сильный), 1678 (очень сильный): 1626 (небольшой), 1592 (очень сильный), 1458 (сильный), 1441 (плечо), 1379 (небольшой), 1404 (сильный), 1316 (сильный), 1284 (средний), 1181 (очень сильный), 1143 (сильный), 1103 (средний), 1078 (средний), 1049 (очень небольшой), 1025 (средний), 984 (очень сильный), 958 (сильный), 923 (средний), 911 (плечо), 859 (небольшой), 868 (средний), 840 (средний), 820 (очень небольшой) и 661 cm^{-1} (небольшой).

Абсорбционный спектр в ультрафиолетовой области в нейтральном этаноле имеет абсорбционный максимум при 282 нм ($\epsilon_{1\%}^{1\text{см}} = 560$).

$[\alpha]_D^{25} = -55,23^\circ$ (C_1 CH_3OH).

Электрометрическое титрование тилактона в 66%-ном водном растворе диметилформаида показывает, что в нем нет титруемых групп.

Тилактон почти не растворим в воде, но растворим в органических растворителях (ацетон, метанол, этанол диметилформаид, хлороформ, диэтиловый эфир, бензол и диметилсульфоксид).

Тилактон может быть разделен с тилозином с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле. Для

проявления применяют распыленную серную кислоту, концентрированную или разбавленную (50%). В этом случае тилактон проявляется вначале в виде пятна с желтой, переходящей в коричневую окраской.

Пример 3. 3,5-Ди-0-ацетил-тилактон.

200 мг тилактона, полученного по примеру 2, растворяют в 4 мл пиридина, добавляют 4 мл уксусного ангидрида, смесь оставляют на 16 ч при комнатной температуре, после чего упаривают досуха в вакууме. К полученному остатку прибавляют 5 мл метанола, раствор нагревают при 60°C 30 мин, после чего концентрируют в вакууме с получением 3,5-ди-0-ацетилтилактона, имеющего значение R_f в тонкослойной хроматографии с системой растворителей бензол-этилацетат (4:1) на силикагеле 0,59. Тилактон в той же системе растворителей имеет значение R_f 0,3.

Примеры 4-7. Получают 3,5-ди-0-пропионилтилактон согласно примеру 3, но с применением протонового ангидрида.

Получают 3,5-ди-0-изовалерилтилактон согласно примеру 3, но с применением изовалерианового ангидрида.

Получают 3,5-ди-0-н-бутирилтилактон согласно примеру 3, но с применением масляного ангидрида.

Получают 3,5-ди-0-н-бутирилтилактон согласно способу, приведенному в примере 3, но с применением масляного ангидрида.

Следовательно, предлагаемый способ и штамм *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 позволяют получить новый антибиотик тилактон.

Составитель С.Малютина

Редактор Г.Безвершенко Техред М.Тепер Корректор В.Бутяга

Заказ 11512/60

Тираж 525

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