

Союз Советских  
Социалистических  
Республик



Государственный комитет  
СССР  
по делам изобретений  
и открытий

О П И С А Н И Е  
ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(61) Дополнительный к патенту -  
(22) Заявлено 16.10.78 (21) 2672704/28-13  
(23) Приоритет - (32) 17.10.77  
(31) Р 842914 (33) США

Опубликовано 15.01.81. Бюллетень № 2

Дата опубликования описания 17.01.81

(11) 797591

(51) М. Кл.<sup>3</sup>

С 12 Р 1/06  
С 12 R 1/465

(53) УДК 615.779.  
.931(088.8)

(72) Авторы  
изобретения

Иностранцы  
Ладислав Джеймс Ханка и Дейвид Гленн Мартин  
(США)

(71) Заявитель

Иностранная фирма  
"Дэ Алджон Компани"  
(США)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИБИОТИКА СС-1065

1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения антибиотиков.

Цель изобретения - получение нового антибиотика.

Эта цель достигается тем, что штамм *Streptomyces Zelensis* NRRh 11,183 выращивают в питательной среде, содержащей источники углерода и азота, в аэробных условиях, отделяют мицелий от культуральной жидкости, далее мицелий экстрагируют ацетоном, полученный экстракт концентрируют, объединяют с отделенной культуральной жидкостью и полученную смесь многократно экстрагируют хлористым метиленом.

Штамм *Streptomyces zelensis* NRRh 11,183 для производства антибиотика СС-1065 выделен из почвы и хранится в коллекции культур Northern Regional Research Laboratory. U.S. Department of agriculture, Peoria, Illinois, U.S.A под номером NRRL 11,183.

Штамм представляет собой культуру серо-зеленого цвета, имеет круглые споры, образующие короткие цепи следующих форм: от прямой до открытой спиральной до спиральной, поверхность колючая или тернистая.

2

Пептонная среда с железом. Поверхность бледно-серо-зеленая, обратная сторона рыжего цвета. Пигмент рыжего цвета, меланин-отрицательная реакция.

Глюкозо-аспарагиновый агар, поверхность бледно-серо-зеленого цвета, обратная сторона бледного цвета. Пигмент не образует.

Тирозиновый агар. Поверхность зелено-серая, обратная сторона - коричневый цвет. Пигмент светло-коричневый. Питательный крахмал. Поверхность зелено-серая, обратная желто-зелено-рыжая. Пигмент светло-рыжий, гидролизует крахмал.

Дрожжевой экстракт с солодом. Поверхность зеленого цвета, обратная сторона рыжая. Образует пигмент рыжего цвета.

Снятое молоко. Поверхность чуть бледная серо-розовая. Обратная сторона оранжево-рыжая. Образует пигмент оранжево-рыжего цвета.

Пептонно-дрожжевой экстракт с железом. Поверхность бледно-серо-белая. Обратная сторона рыжая. Пигмент рыжего цвета.

Физиологические признаки. Штамм хорошо растет на ксиллозе, фруктозе,

5

10

15

20

25

30

галактозе, глюкозе, маннозе, мальтозе, целлобиозе, декстрине, растворимом крахмале, глицерине, манниге и инозите. Слабо растет на арабинозе, оксалате натрия, ацетате натрия и сукцинате натрия. Плохо - на рамнозе, сахарозе, лактозе, рацинозе, инулине, дульците, сорбите, салицине, феноле, цитрате натрия, формиате натрия, тартрате натрия и салицилате натрия.

Культура слабо растет при 4°C, умеренно при 18, 24 и 45°C хорошо растет при 28, 32 и 37°C. При 55°C роста не наблюдается.

Предложенный антибиотик получают путем выращивания организма в водной питательной среде в погруженных азотных условиях. Для выращивания можно использовать поверхностные культуры и колбы-бутылки. Организм выращивают в питательной среде, содержащий источник углерода, например ассимилирующий углекислоту, и источник азота, например ассимилирующее соединение азота или белковое вещество. К предпочтительным углеродным источникам относятся глюкоза, желтый сахар, сахароза, глицерин, крахмал, кукурузный крахмал, лактоза, декстрин, черные патоки и т.п. К предпочтительным источникам азота относятся жидкость от отстоя кукурузы, дрожжи, автолизированные пивные дрожжи с твердыми молочными продуктами, соевую муку, муку семян хлопчатника, кукурузную муку, твердые молочные продукты, панкреатический продукт пищеварения казеина, рыбную муку, твердые продукты от перегонки, животные пептоновые жидкости, мелкие мясные и костные остатки и т.п. Микроколичества металлов, как цинк, магний, марганец, кобальт, железо и т.п., добавлять в ферментационную среду не нужно, поскольку перед стерилизацией последней в качестве компонентов применяют водопроводную воду и неочищенные ингредиенты.

Выращивание осуществляют при любой температуре, обеспечивающей удовлетворительный рост микроорганизма, например в диапазоне примерно 18-40°C, предпочтительно примерно 20-28°C. Обыкновенно оптимального количества антибиотик достигает в течение примерно через 3-15 дней. Среда обычно остается в течение ферментационного процесса щелочной. Конечный pH зависит частично от присутствующего буфера, если таковой применяется, и частично от начального pH культуральной среды.

Если выращивание производят в больших сосудах или баках, целесообразно применять вегетативную, а не спорную форму микроорганизма при инокуляции во избежание заметной задержки при производстве антибиотика и связанного с этим неэффективного

использования оборудования. Желательно получение вегетативного прививочного материала в питательной бульонной культуре путем инокуляции этой бульонной культуры аликвотным количеством почвы, жидкой N-агаровой среды или же разводкой на косой среде.

По обеспечении такого молодого активного вегетативного прививочного материала его стерильно помещают в большие сосуды или баки.

При выделении и очистке антибиотика, получаемого предлагаемым способом из ферментационного пива, может найти применение целый ряд способов. Выделение осуществляют экстрагированием с помощью растворителей, как хлористый метилен, ацетон, бутанол, этилацетат и т.п.; для очистки сырых препаратов антибиотика применяют хроматографию на силикагеле.

Согласно предпочтительному варианту процесса выделения антибиотик выделают из культуральной среды разделением мицелия и нерастворенного твердого продукта обычными способами, например фильтрацией или центрифугированием и экстракцией растворителем мицелиевого жмыха и ставшего прозрачным бульона. Мицелиевый жмых экстрагируют ацетоном, а экстракт выпаривают при пониженном давлении до водного концентрата. Водный концентрат добавляют в фильтрованный бульон, который затем трижды экстрагируют половиной объема хлористого метилена. Соединенные экстракты выпаривают при пониженном давлении, полученное масло разбавляют скеллизольвом В (изомерные гексаны). Полученную взвесь охлаждают в течение ночи, после чего собирают твердый продукт, промывают скеллизольвом В и сушат, получая относительно сырой препарат (желто-коричневый твердый продукт) антибиотика СС-1065.

Полученный сырой препарат антибиотика подвергают очистке, получая существенно чистый кристаллический препарат антибиотика СС-1065. Первой очистной ступенью является экстракция сырого препарата антибиотика СС-1065 ацетоном. После выпарки ацетона полученный остаток растирают с метанолом, получая кристаллический препарат антибиотика СС-1065. Эти кристаллы можно промыть холодным метанолом с целью повышения степени их чистоты. Дальнейшую очистку антибиотика СС-1065 осуществляют путем хроматографии на силикагеле с кристаллизацией активных фракций. Препарат антибиотика СС-1065 целевой степени чистоты получают перекристаллизацией вышеприведенного антибиотика СС-1065-препарата из ацетона метанола.

Активные фракции от хроматографии на силикагеле определяют тонкослойной хроматографией-биоавтографией

Согласно этому способу 1 мк образца-пробы антибиотика помещают в виде капли на силикагель Baker flex silica gel 1В-F и биоавтографируют на организм *Bacillus subtilis* (синтетическая среда) или же *Sarcina lutea* после проявления в растворе, состоящем из 90 ч хлороформа, 10 ч метанола и 0,5ч концентрированной гидроокиси аммония. ТСХ-зона антибиотика СС-1065 от 1мк или более высоких количеств кристаллического образца-пробы также можно визуализировать с помощью УФ-света (254 нм) в виде зоны янтарного света при обычном свете.

Пример. Ферментация.

Для инокуляции колб Эрленмейера емкостью в 500 мл со 100 мл стерильной среды, содержащей вес. %:

Экстракт дрожжевой	0,3
Бакто-триптон	0,5
Декстрин	0,1

используют штамм *Streptococcus Zelen-sis* NRRh 11,183.

Эту среду инкубируют при 28°C в течение 48 ч на ротационном вибраторе типа Gump rotaru shaker при 250 об./мин.

Прививочный материал применяют для инокуляции колб Эрленмейера емкостью 500 мл для ферментации, со 100 мл стерильной ферментационной среды, содержащей вес. %:

Черная патока	1
Декстрин	1
Бакто-триптон	1
СаСО <sub>3</sub>	0,5
Хлористый натрий	0,2.

Значение рН-7,2. Ферментационные колбы инокулируют при концентрации 5 мл прививочного материала на 100мл ферментационной среды. Колбы инкубируют 120 ч при 28°C на ротационном вибраторе типа ВАРИАН при 250 об/мин.

Испытание антибиотика СС-1065 завершается экстракцией истощенной питательной среды с применением двух объемов хлористого метилена. Разные количества метиленхлоридного экстракта (20,10,5, 2 и 1 мкл) наносят на полиграммные силикагельные листы типа Polygram Sil - N-NR и биоавтографируют на *Sarcina lutea* после проявления в системе растворителей, содержащих, мл:

Метиловый спирт	10
Хлороформ	90
Гидроокись аммония	0,5

для этого 125 мл охлажденного до 48°C агара инокулируют оттаянной бульонной культурой *Sarcina lutea* (0,5 мл/л), выливая затем в пластмассовые сосуды и давая отвердеть. Агаровые сосуды инкубируют при 32°C в течение 20-24 ч.

Прививочный материал *Sarcina lutea*, содержащий 10<sup>9</sup> клеток/мл хранят в качестве аликвоты в газовой фазе жидкого азота.

Выделение антибиотика. Полученный ферментационный бульон от 4-ферментационных процессов в баках по 10 л каждый фильтруют через слой Gelaton FW 40 (диатомовая земля). Мицелиевый жмых экстрагируют ацетоном, экстракт выпаривают под пониженным давлением. В прозрачный бульон добавляют водный концентрат, полученный выше, затем трижды экстрагируют половиной объема хлористого метилена. Метиленхлоридные экстракты выпаривают под пониженным давлением до масла, которое разбавляют скеллизольвом В (1,5 л), после чего полученную взвесь охлаждают в течение ночи. Затем твердый продукт собирают, промывают скеллизольвом В и сушат, получая сравнительно сырой препарат антибиотика СС-1065 в виде желто-коричневого твердого продукта. Этот сырой препарат можно подвергнуть биоиспытанию тонкослойной хроматографией-биоавтографией, как описано выше.

Очистка. Сырой препарат антибиотика СС-1065 экстрагируют ацетоном (400-800 мл) в целях удаления небольших количеств нерастворимых в ацетоне продуктов. Ацетон выпаривают, остаток растирают с метанолом (10 мл/мг). Взвесь охлаждают в течение ночи, полученный твердый кристаллический продукт собирают, промывают холодным метанолом и сушат, выход 40-180 мг кристаллического препарата антибиотика СС-1065. Этот кристаллический препарат подвергают биоиспытанию путем ТСХ-биоавтографии на силикагеле.

Дальнейшую очистку осуществляют хроматографией на силикагеле и кристаллизацией активных фракций. Так, например, 470 мг этого кристаллического твердого продукта растворяют в 940 мл ацетона и выпаривают на 10 мл силикагеля Geduran TMS160.

Полученный порошок хроматографируют на 100 мл силикагеля, элюируя растворителем, состоящим из 80 ч хлороформа, 20 ч метанола и 4 ч гидроокиси аммония. 20 фракций (по 20 мл каждая) собирают и выпаривают досуха. Фракции затем подвергают биоиспытанию посредством ТСХ-биоавтографии. Фракции 6-19 помещают в емкость и растирают с метанолом, получая 218мг высококачественного кристаллического антибиотика СС-1065. Целевой степени чистоты можно достичь перекристаллизацией из ацетона-метанола, получая 167 г (77%) в основном чистых кристаллов антибиотика СС-1065.

Молекулярный вес антибиотика СС-1065 приблизительно 700, элементный анализ С 61,06; Н 4,92, N 13,17.

УФ-спектр поглощения. Раствор антибиотика СС-1065 в диоксане показывает сильное концевое поглощение с плечами при 230 нм (способность пог-

лощения  $\lambda = 68,00$ ) и  $258 \text{ нм}$  ( $\lambda = 51,10$ ) и максимум при  $364 \text{ нм}$  ( $\lambda = 66,10$ ).

ИК-спектр поглощения. Антибиотик СС-1065 показывает характерный ИК-спектр поглощения в пасте на основе минерального масла в диапазоне волн  $3800-600 \text{ (см}^{-1}\text{)}$ .

Пики наблюдаются при следующих диапазонах волн,  $\text{см}^{-1}$ : 2960, 2920, 2850, 1465 и 1377, частично они зависят от алифатических С-Н колебаний минерального масла.

Растворимость. Антибиотик СС-1065 растворим в таких растворителях, как диметил-сульфоксид (ДМСО), диметилформамид, ацетон, хлористый метилен, этилацетат, диоксан и хлороформ.

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр антибиотика СС-1065 при  $20 \text{ МГц}$  найден на спектрометре Varian CFT-20 в растворе (около  $1,0 \text{ мл}$ , около  $75 \text{ мг/мл}$ ) образца-пробы антибиотика СС-1065 в дейтеро-диметилсульфоксиде. Спектр калибруют против центральной линии  $\delta 6 \text{ ДМСО}$ , помеченной  $39,6 \text{ ч/мл}$  (частей на миллион) в пересчете на тетраметилсилан, принимаемый за  $0 \text{ ч/мл}$ . Частоты регистрируют вниз от тетраметилсилана.

Протонно-магнитный резонансный спектр ( $^1\text{H}$ -ЯМР) антибиотика СС-1065 при  $100 \text{ МГц}$  наблюдают на спектрометре типа Varian XL 100-15 в растворе (около  $0,5 \text{ мл}$ , около  $150 \text{ мг/мл}$ ) образца-пробы антибиотика СС-1065 в

дейтеро-диметилсульфоксиде ( $\delta 6 \text{ ДМСО}$ ). Спектр калибруют против внутреннего тетраметилсилана, частоты регистрируют в  $\text{ч/млн}$  вниз от тетраметилсилана.

Противомикробный спектр антибиотика СС-1065. Антибиотик СС-1065 действует против различных грамм-положительных и грамм-отрицательных бактерий и грибов, как видно из таблицы.

Опыты проводят следующим образом.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяют стандартными бактерицидными способами с применением двукратно разбавленных растворов антибиотика в бульоне Brain Heart.

15 Прививаемые организмы - полученные за ночь культуры испытуемых организмов, разбавленных таким образом, чтобы конечная популяция содержала приблизительно  $10^5$  клеток/мл. Трубки инкубируют на  $42 \text{ ч}$  при  $28-37^\circ\text{C}$ . МИК определяют переносом  $0,1 \text{ мл}$  бульона из тех трубок, которые не показывают развития в  $10 \text{ мл}$  не содержащего антибиотика бульона, трубки, в которых за  $24 \text{ ч}$  не наблюдается роста культуры, рассматриваются как содержащие бактерицидные концентрации. Бульон для грибов содержит, %:

30	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5
	Декстроза	3,0
	Дрожжевой экстракт	0,7.

Микроорганизм	МИК, мкг/мл
1	2
Грамм-положительные бактерии	
<i>Staphylococcus aureus</i> UC 76	0,0015
<i>Staphylococcus aureus</i> UC 552	0,003
<i>Staphylococcus aureus</i> UC 70	0,0015
<i>Staphylococcus aureus</i> UC 3665	0,003
<i>Bacillus subtilis</i> UC 564	0,025
<i>Streptococcus pyogenes</i> UC 6055	0,0008
<i>Sarcina lutea</i> UC 130	0,012
<i>Streptococcus faecalis</i> UC 157	0,012
<i>Streptococcus faecalis</i> UC 3235	0,003
Грамм-отрицательные бактерии	
<i>Escherichia coli</i> UC 57	0,32
<i>Proteus vulgaris</i> UC 93	0,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UC 95	0,08
<i>Pseudomonas mildenbergii</i> UC 3029	0,3
<i>Salmonella gallinarum</i> UC 265	2,5

Продолжение таблицы	
1	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> UC 57	0,8
<i>Salmonella schottmuelleri</i> UC 126	0,3
<i>Salmonella pullorum</i> UC 267	0,08
Fungi:	
<i>Candida albicans</i> UC 1392	0,3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UC 1337	0,04
<i>Saccharomyces pastorianus</i> UC 1342	0,3
<i>Penicillium oxalicum</i> UC 1268	0,2

Антибиотик СС-1065 также оказывает действие против опухолевых клеток L 1210, развивающихся в культуре (в пробирке). На живом организме мышей антибиотик СС-1065 также ингибирует лейкемию L 1210, лейкемию Р 388 и меланому В 16.

Антибиотик СС-1065 оказывает действие против грамм-положительных бактерий, например против *Proteus vulgaris*, и тем самым может найти применение в качестве маслоконсервирующего средства в целях ингибирования действия этой бактерии, вызывающей порчу масла (растительного). Он также полезен в промывных растворах в области санитарии. Поскольку антибиотик СС-1065 оказывает действие против *Bacillus subtilis* его можно применять для обработки мест размножения тутового шелкопряда в целях предупреждения или же минимализации заражений,

вызываемых, как известно, этой бактерией.

Предложенный способ позволяет получить новый антибиотик, который найдет применение в народном хозяйстве.

#### Формула изобретения

Способ получения антибиотика, отличающийся тем, что штамм *Streptomyces zelensis* NRRh 11,183 выращивают в питательной среде, содержащей источники углерода и азота, в аэробных условиях, отделяют мицелий от культуральной жидкости, далее мицелий экстрагируют ацетоном, полученный экстракт концентрируют, объединяют с отделенной культуральной жидкостью и полученную смесь многократно экстрагируют хлористым метиленом.

Составитель С. Алютина  
 Редактор С. Лыжова      Техред И. Асталаш      Корректор В. Синицкая  
 Заказ 9825/82      Тираж 539      Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР  
 по делам изобретений и открытий  
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5  
 Филиал НПП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4