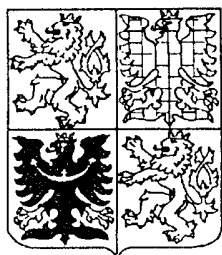


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 16.07.91

(40) 17.02.93

(21) 2198-91.G

(13) A3

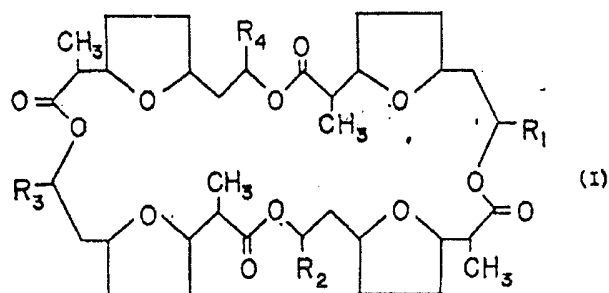
(51) C 07 H 15/24

A 01 N 63/02

A 01 N 43/00

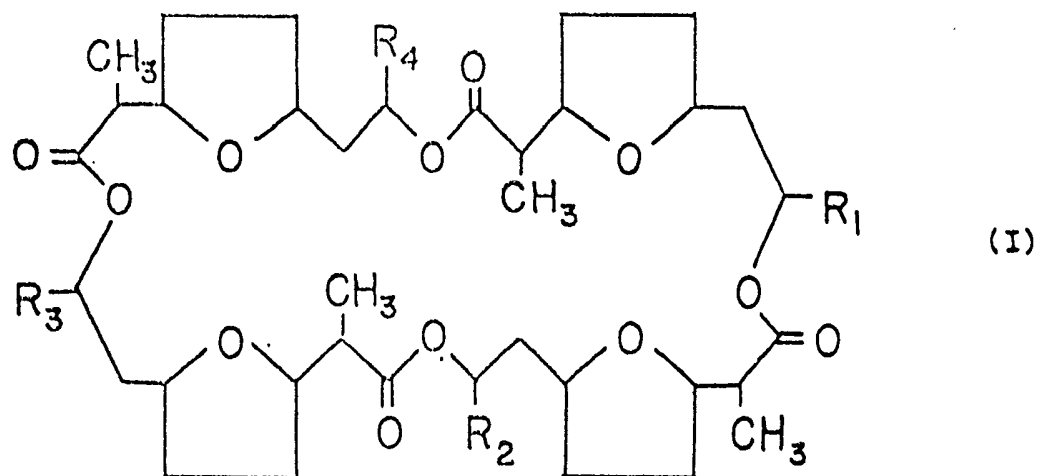
- (71) Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha, CS;
(72) Jizba Josef ing. CSc., Praha, CS;
Skibová Irena ing., Praha, CS;
Blumauerová Margita RNDr. CSc., Praha, CS;
(54) Způsob výroby makrotetrolidových insekticidů

- (57) Makrotetrolidy obecného vzorce I kde R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou methylové nebo ethylové skupiny, jsou přírodní pesticidy s insekticidním, akaricidním, kokcidistatickým a anthelmintickým účinkem, produkované různými druhy streptomycet. Jejich účinnost se zvyšuje s počtem ethylových skupin v molekule. Streptomyces griseus, použitý pro vypracování postupu výroby, produkuje při submersní kultivaci na půdě se škrobem, lihovarskými výpalky a sušenými kvasnicemi směs nonaktinu, monaktinu, dinaktinu a tetranaktinu v poměru 8 : 27 : 57 : 8. Při kultivaci na půdě stejného složení, ke které byl přidán propionan sodný a hydrogenfosforečnan draselný, je produkován dinaktin, trinaktin a tetranaktin v poměru 2 : 26 : 72. Chemickou izolací tohoto komplexu z mycelia produkčních kultur byla získána směs trinaktinu a tetranaktinu v poměru 1 : 3, obsahující jen stopové množství dinaktinu.



Vynález se týká způsobu výroby makrotetrolidových insekticidů trinaktinu a tetranaktinu biosyntetickou cestou.

Ztráty, způsobené škodlivým hmyzem a roztoči při pěstování a skladování zemědělských plodin, představují každoročně až 30 % světové produkce. Účinná ochrana rostlin proti škůdcům je tedy jedním z hlavních faktorů, určujících výši a kvalitu sklizně, a tím i jednou z nejnáze dostupných rezerv v zemědělství. Dlouhodobá aplikace syntetických agrochemikálií má však negativní ekologické důsledky (nahromadění nerozložitelných toxických látek v půdě nebo plodinách, vývoj odolných forem škůdců, uhynutí neškodných organismů, a pod^{obně}), a proto je věnována zvýšená pozornost výzkumu a vývoji přírodních insekticidů, především produktů mikroorganismů. V minulých letech byla objevena celá řada mikrobiálních metabolitů s pesticidními účinky, jen několik z nich však mělo vlastností vhodné pro praktickou aplikaci (Misato a sp., Adv. Appl. Microbiol. 21, 53*^{až}88, 1977; Misato, J. Pesticide Sci. 7, 301*^{až}305, 1982; Deshpande a sp., Enzyme Microb. Technol. 10, 455*^{až}473, 1988). Mezi ně patří látky typu makrotetrolidů (Dominguez a sp., Helv. Chim. Acta 45, 129*^{až}138, 1962; Beck a sp., Helv. Chim. Acta 45, 620*^{až}630, 1962; Keller-Schierlein a sp., Antimicrob. Agents Chemother. 1966, 644*^{až}650, 1967; Ando a sp., J. Antibiot. 24, 418*^{až}422, 1971) obecného vzorce I



kde R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou methylové nebo ethylové skupiny:

	R_1	R_2	R_3	R_4
Ia Nonaktin	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3
Ib Monaktin	CH_3	CH_3	CH_3	CH_2CH_3
Ic Dinaktin	CH_3	CH_3	CH_2CH_3	CH_2CH_3
Id Trinaktin	CH_3	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CH_2CH_3
Ie Tetranaktin	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CH_2CH_3

Makrotetrolidy jsou aktivní proti hmyzu a roztočům (Oishi a sp., J. Antibiot. 23, 105*106, 1970; Ando a sp. J. Antibiot. 24, 347*352, 1971; Sagawa a sp., J. Econ. Entomol. 65, 372*375, 1972) a mají také účinky kokcidiostatické (Sakamoto a sp., Deutsche Patentschrift DE 2802455 C2, 1978) a anthelmintické (Nippon Kayaku Co. Ltd., a Chugai Pharm. Co., Ltd., Japan Kokai Tokkyo Koho 8157,714, 1981). Jsou neškodné pro teplokrevné živočichy (Oishi a sp.,

J. Antibiot. 23, 105^{az}*106, 1970; Sagawa a sp., J. Econ. Entomol. 65, 372^{az}*375, 1972) a pro rostliny (Hirano a sp., J. Econ. Entomol. 66, 349^{az}*352, 1973) a snadno rozložitelné půdní mikroflorou (Sasaki a sp., Appl. Environ. Microbiol. 40, 264^{az}*268, 1980). Jejich aktivita se zvyšuje s počtem ethylových skupin v molekule; nejúčinnější je trinaktin (vzorec Id) a tetranaktin (vzorec Ie).

Nonaktin, monaktin, dinaktin a trinaktin jsou produkovány řadou druhů streptomycet, např. ^{iklad} různými kmeny *Streptomyces griseus*, *S. chrysomallus*, *S. flaveolus*, *S. tsusimaensis* nebo *S. werraensis* (Smith, J. Antibiot. 28, 1000^{az}*1003, 1975). Tetranaktin ve směsi s dinaktinem a trinaktinem byl izolován pouze z kultur *S. aureus* (Ando a sp., J. Antibiot. 24, 347^{az}*352, 1971), kdežto *S. roseochromogenes* tvoří nonaktin, monaktin, dinaktin, trinaktin i tetranaktin v kvantitativním poměru 22 : 33 : 33 : 9 : 3 (Smith, J. Antibiot. 28, 1000^{az}*1003, 1975). Komplex makrotetrolidů (tzv. polynaktin), obsahující dinaktin, trinaktin a tetranaktin v poměru 10 : 40 : 50 (Shichi a sp., U.S. Pat. 4,843,092, 1989) je vyráběn japonskou firmou Chugai Pharm. Co., Ltd., fermentací s použitím *S. aureus* jako produkčního mikroorganismu a úspěšně aplikován v praxi buď samostatně, nebo ve směsi s chemickými pesticidy např. ^{iklad} pro velkoplošnou ochranu čajovníkových nebo pomerančovníkových plantáží (Sagawa a sp., Japan Kokai Tokkyo Koho 7406656, 1974; Chugai Pharm. Co., Ltd., a Hokko Chem. Industry Co., Ltd., Japan Kokai Tokkyo Koho 5846006 a 5846009, 1983).

Patentově chráněný kmen *S. aureus* ani komerční preparát polynaktinu nejsou v ČSFR dostupné. Tetranaktin lze

sice připravit chemickou syntézou (Schmidt a Werner, J. Chem. Soc. Chem. Commun.-1986 /13/, 996^{ax}997), tento postup je však velmi pracný a nákladný a dává jen malé výtěžky požadované látky. Uvedené nevýhody byly odstraněny vypracováním nového postupu podle vynálezu, jehož podstatou je, že k submersní kultuře mikroorganismu *Streptomyces griseus* se na začátku kultivace přidá propionan sodný a hydrogenfosforečnan draselný a po 96 hodinách fermentace se izoluje hotový produkt. Přídavkem propionanu je inhibována biosyntéza nonaktinu, monaktinu a dinaktinu za současné stimulace tvorby trinaktinu a tetra-naktinu. Přídavkem hydrogenfosforečnanu je eliminován inhibiční účinek propionanu na růst produkční kultury, což vede ke značnému zvýšení obou požadovaných makrotetrolidů. Způsob výroby biosyntetickou cestou podle vynálezu je jednodušší než způsob výroby cestou chemickou, protože probíhá od začátku až do konce samovolně ve fermentační nádobě bez zásahu lidské ruky až do doby, kdy je izolován hotový produkt.

Způsob výroby podle předloženého vynálezu je zřejmý z dále uvedených příkladů:

P ř í k l a d 1

a) Příprava inokula

Kmen *Streptomyces griseus* J-249 (odvozený od půdního izolátu *S. griseus* LKS po opakované aplikaci UV světla) byl kultivován 10 dní při teplotě 28 °C na šikmých agarech

se sporulační půdou s kvasinkovým a sladovým výtažkem (Shirling a Gottlieb, Int. J. Syst. Bacteriol. 14, 313^{az'}*340, 1966). Dobře vysporulované kultury byly uchovávány při 4 °C a používány k přípravě vegetativního inokula po dobu nejdéle tří měsíců.

Vegetativní inokulum bylo pěstováno na rotačním třepacím stroji (2,7 Hz) při teplotě 28 °C v 500 mL varných baňkách, plněných 60 mL fermentační půdy, která obsahovala 40 g rozpustného škrobu, 7 g lihovarských výpalků a 5 g sušených kvasnic v 1 L vodovodní vody. Výchozí pH půdy po sterilisaci bylo 6,8 (před sterilisací bylo upraveno na 6,9^{az'}*7,0). Celkový obsah anorganického fosfátu v půdě (stanovený metodou dle Weil-Malherbea a Greena, Biochem. J. 49, 286^{az'}*292, 1951) byl 2,5 mM. Půda byla naočkováána inokulem z agarové kultury, obsahujícím přibližně 6×10^6 spór. Vegetativní inokulum bylo kultivováno 24 hodin.

b) Příprava druhé vegetativní generace

Vlastní submersní kultivace podle vynálezu probíhala ve druhé vegetativní generaci na stejné fermentační půdě a za stejných podmínek jako při přípravě inokula po dobu 96 hodin. Kultury byly očkované 3 ml vegetativního inokula.

c) Analytické stanovení makrotetrolidů

Po skončení kultivace bylo mycelium ze dvou paralelních kultur druhé vegetativní generace (120 mL fermentační tekutiny) odděleno centrifugací, promyto 50 mL destilované vody a extrahováno 2 x 50 mL methanolu a 1 x 50 mL směsí methanolu a chloroformu (1 : 1). Spojené extrakty (150 mL) byly po přidání 1 g křemelinu (Celit No. 545) odpařeny do su-

cha. Odparek byl extrahován 40 mL směsi chloroformu a methanolu (95 : 5) a extrakt přefiltrován. Zbylý sediment na filtru byl extrahován 40 mL téže směsi a extrakt přefiltrován. Oba filtráty byly spojeny a odpařeny do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 10 mL dichlormethanu a 1 mL roztoku byl použit pro kvantitativní spektrofotometrické stanovení (při 380 nm) celkového obsahu makrotetrolidů metodou dle Suzukiho a sp. (J. Antibiot. 24, 675^{az'}679, 1971), založencu na tvorbě komplexu těchto látek s pikranem sodným. Zbylých 9 mL roztoku bylo odpařeno do sucha a odparek byl rozpuštěn v 1 mL směsi methanolu a chloroformu (3 : 2). Roztok (1 * 5 ^{az'}μl, v závislosti na koncentraci makrotetrolidů ve vzorku) byl použit pro tenkovrstevnou chromatografii na deskách Kieselgel₆₀ (0,25 mm, 200 x 200 mm) v systému octan ethylnatý-chloroform-dichlormethan (7 : 3 : 1). Po dvojím vyvíjení byl chromatogram postříkán koncentrovanou kyselinou sírovou a zahřát při 150 °C po dobu 10 minut. Kvantitativní poměr mezi složkami makrotetrolidového komplexu byl stanoven densitometricky na přístroji Shimadzu CS-930 při 590 nm.

Za uvedených kultivačních podmínek dosahoval kmen *S. griseus* J-249 průměrné produkce 626 mg makrotetrolidového komplexu v 1 L fermentační tekutiny. Tento komplex obsahoval nonaktin, monaktin, dinaktin a trinaktin v poměru 8 : 27 : 57 : 8.

~~hmotnost~~
d) Stanovení suché ~~váhy~~ mycelia

Pro zjištění absolutních hodnot nárůstu kultur byla stanovena suchá ~~váha~~ ^{hmotnost} mycelia, promytého destilovanou vo-

dou a zbaveného interferující přítomnosti makrotetroli-
dů opakovanou extrakcí ^{(po} dle postupu, popsaného v odstav-
ci c). Mycelium bylo sušeno na předem zvažovaných papírových
filtrech dva dny při laboratorní teplotě (do dosažení
konstantní ~~hmotnosti~~ ^{hmotnosti} ~~váhy~~).

Průměrná ~~váha~~ ^{hmotnost} suchého mycelia z kultury, vyrostlé
za podmínek, uvedených v odstavci b), byla 6,73 mg/1 mL.

P ř í k l a d 2

Bylo použito stejného postupu jako v příkladu 1
pouze s tím rozdílem, že do kultur druhé vegetativní ge-
nerace byl na počátku kultivace přidán sterilní vodný
roztok hydrogenfosforečnanu draselného (1 mL) v koncen-
traci 46 mg /60 mL půdy. Celkový obsah anorganického
fosfátu se tímto způsobem zvýšil (ve srovnání s údajem
v příkladu 1) z 2,5 mM na 7,0 mM.

Za těchto kultivačních podmínek dosahoval kmen
S. griseus J-249 průměrné produkce 732 mg makrotetroli-
dového komplexu v 1 L fermentační tekutiny, t.j. o 16,9 %
více než za podmínek, uvedených v příkladu 1. Komplex ob-
sahoval nonaktin, monaktin, ~~dinaktin~~ ^{hmotnost} a trinaktin v pomě-
ru 6 : 26 : 58 : 10. Průměrná ~~váha~~ ^{hmotnost} suchého mycelia byla
7,58 mg/1 mL, t.j. o 12,6 % vyšší než u kultur, pěstova-
ných ^{(po} dle postupu v příkladu 1.

P ř í k l a d 3

Bylo použito stejného postupu jako v příkladu 1
pouze s tím rozdílem, že do kultur druhé vegetativní ge-

nerace byl na počátku kultivace přidán sterilní vodný roztok propionanu sodného (2 mL) v koncentraci 500 mg na 60 mL půdy. Ve srovnání s údaji v příkladu 1 se za těchto podmínek sice snížil celkový výtěžek makrotetrolidů na 353 mg na 1 L fermentační tekutiny (tj. o 43,7 %), zároveň se však výrazně změnilo složení komplexu, který obsahoval monaktin, dinaktin, trinaktin a tetranaktin v poměru 3 : 9 : 32 : 56 (spolu se stopovým množstvím množstvím nonaktinu).

Průměrná suchá ~~váha~~^{hmotnost} mycelia byla 5,78 mg/1 mL, tj. o 14,2 % nižší než u kultur, pěstovaných ^{po} dle postupu v příkladu 1.

P ř í k l a d 4

Bylo použito stejného postupu jako v příkladu 1 pouze s tím rozdílem, že do kultur druhé vegetativní generace byly na počátku kultivace přidány sterilní vodné roztoky propionanu sodného (2 mL) v koncentraci 500 mg a hydrogenfosforečnanu draselného (1 mL) v koncentraci 46 mg/ 60 mL fermentační půdy.

Za těchto kultivačních podmínek dosahoval kmen *S. griseus* J-249 průměrné produkce 577 mg makrotetrolidového komplexu v 1 L fermentační tekutiny, tj. jen o 7,3 % méně než při postupu, uvedeném v příkladu 1, a o 35,7 % více než za podmínek, uvedených v příkladu 3. Komplex obsahoval dinaktin, trinaktin a tetranaktin v poměru 2 : 26 : 72.

Průměrná ~~váha~~^{hmotnost} suchého mycelia byla 6,82 mg/1 mL, tj. o 1,3 % vyšší než u kultur, pěstovaných ^{po} dle příkladu 1, a o 17,9 % vyšší než u kultur, získaných za podmínek, popsaných v příkladu 3.

P ř í k l a d 5

Kultivace byla provedena postupem, popsáným v příkladu 4 pouze s tím rozdílem, že fermentační půda byla rozplněna do 130 baněk po 100 mL, a do kultur druhé vegetativní generace, naočkovaných 5 mL inokula, bylo přidáno 833 mg propionanu sodného a 76,7 mg hydrogenfosforečnanu draselného/100 mL půdy.

Po skončení kultivace byla fermentační tekutina (13 L) zcentrifugována a oddělené mycelium bylo promyto destilovanou vodou (3 L) a extrahováno methanolem (4 x 2 L) a směsí chloroformu a methanolu (1 : 1) (4 x 2 L). Extrakty byly spojeny a po přidání Celitu (30 g) odpařeny do sucha. Odparek byl extrahován směsí chloroformu a methanolu (95 : 5) (3 x 300 mL). Přefiltrované extrakty byly spojeny a odpařeny do sucha. Odparek (11,6 g) byl krystalován ze směsi hexanu a acetonu při teplotě -15 °C. Bylo získáno 1,6 g krystalické směsi makrotetrolidů. Matečný louh byl odpařen do sucha. K odparku byl přidán methanol (15 mL) a voda (200 mL). Emulsní směs byla zalkalisována hydrouhličitánem sodným a extrahována chloroformem (4 x 100 mL). Extrakt byl odpařen do sucha a odparek překrystalován z methanolu. Bylo získáno 1,8 g krystalické směsi.

Celkový obsah makrotetrolidů, stanovený postupem ^{po}dle příkladu 1 v hrubém extraktu mycelia, byl 4,5 g. Výtěžek krystalického produktu po izolaci byl 3,4 g, tj. 76 %.

Stajně jako v příkladu 4 nebyl v izolovaném produktu nalezen nonaktin a monaktin. Dinaktin byl přítomen jen ve stopovém množství. Hlavními složkami byly trinaktin a

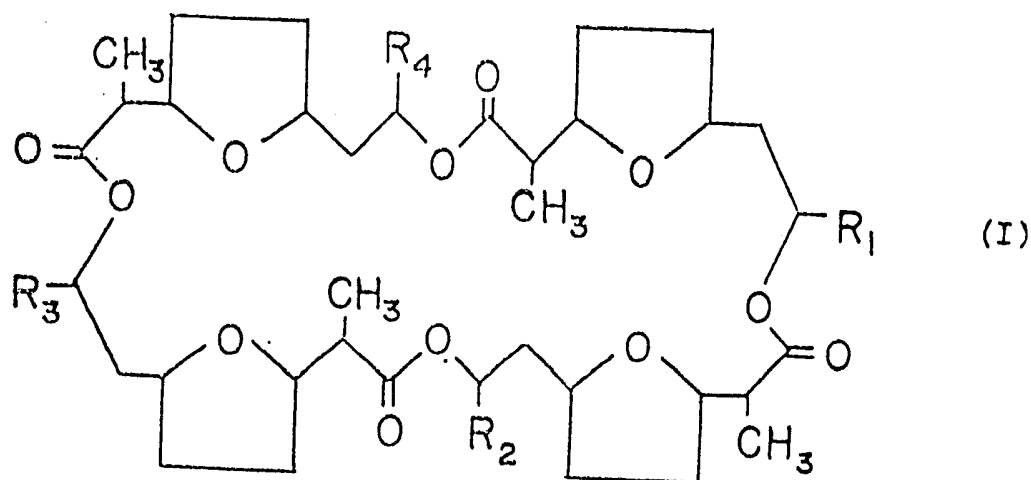
tetranaktin v poměru 1 : 3. Jejich identita byla potvrzena hmotnostní a NMR-spektrometrií ve srovnání s literárními údaji.

Přesto, že *Streptomyces griseus* není podle publikovaných údajů producentem tetranaktinu, způsobem výroby ^{po}dle předloženého vynálezu se podařilo získat tetranaktin ve vysokém výtěžku (za současného potlačení nežádoucích méně aktivních složek makrotetrolidového komplexu) i u tohoto mikroorganismu. Složení výsledného produktu (trinaktin a tetranaktin v poměru 1 : 3, se stopovým množstvím dinaktinu) je dokonce výhodnější než u komerčně vyráběného japonského preparátu polynaktinu, který obsahuje dinaktin, trinaktin a tetranaktin v poměru 1 : 4 : 5.

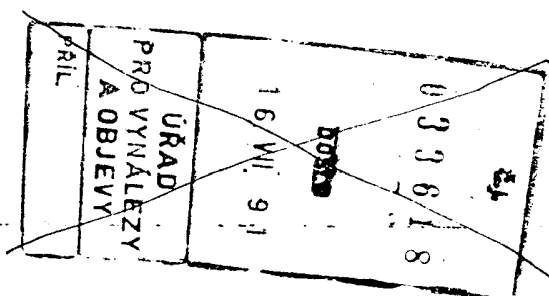
Obecná účinnost a využitelnost postupů, uvedených v příkladech 3 a 4, byla potvrzena také u osmi jiných kmenů *S. griseus*, produkujících makrotetrolidy, uchovávaných v Mikrobiologickém ústavu ČSAV.

PATENTOVÉ NÁROKY ~~PŘEDMĚT VYNÁLEZU~~

Způsob výroby makrotetrolidových insekticidů trinaktinu
a tetranaktinu obecného vzorce I



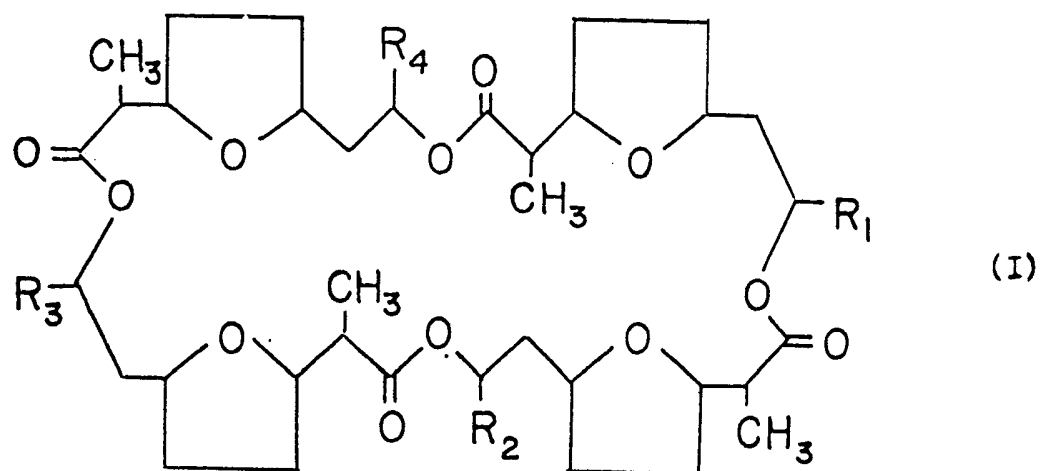
kde $R_1 = CH_3$ ~~(u trinaktinu)~~ nebo CH_2CH_3 ~~(u tetranaktinu)~~ a
 $R_2 = R_3 = R_4 = CH_2CH_3$, biosyntetickou cestou, vyznačující
 se tím, že mikroorganismus *Streptomyces griseus* je pěstován
 za submersních podmínek ve fermentační půdě se škrobem, liho-
 varskými výpalky a sušenými kvasnicemi, ke které bylo v nulté
 hodině kultivace přidáno 8,33 mg propionanu sodného a 0,77 mg
 hydrogenfosforečnanu draselného na 1 ml půdy. ~~Výsledný pro-~~
~~dukt obsahuje trinaktin a tetranaktin v poměru 1 : 3~~



obr. po autoru

č.p. 3361P

228-9.1



AI