



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР
(ГОСПАТЕНТ СССР)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4882787/13

(22) 15.11.90

(46)23.01.93. Бюл. № 3

(71) МГУ им. М.В.Ломоносова

(72) И.А.Паршиков, Л.И.Воробьева, Л.В.Модянова, Е.В.Довгилевич, П.Б.Терентьев (SU) и Хольгер Хофман (DE)

(56) Archelas A., Furstess R., Scari D., Maury G. Hydroxylation microbiologique des lactames, des amides et d'imides monocycliques par le champignon *Beauveria sulfurescens*. Bull. Soc. Chim. Fr., 1986, № 2, p. 234-238.

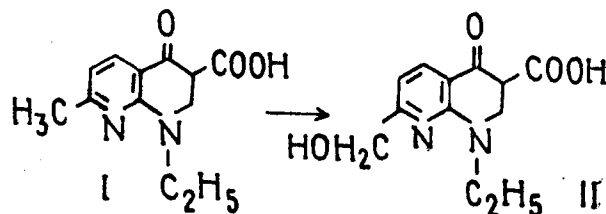
Изобретение относится к биотехнологии и касается получения нового штамма *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430, который может найти применение в микробиологическом синтезе полупродуктов лекарственных препаратов, таких как (-)-1-бензоил-3-гидроксипирролидин – ценный синтон в синтезе целой серии лекарственных препаратов и 1-бензоиламино-5-гидрокси-3, 7-диметилпиперидин-2, 6 (гидроксицитральбензамид) – феромон насекомых.

Ближайшим аналогом изобретения является культура микроскопических грибов – *Cunninghamella verticillata* ATCC 8983. Данная культура способна трансформировать бициклическое азотсодержащее гетероциклическое соединение (I), вводя гидроксильную группу в метильный заместитель конденсированного пиридинового кольца (II), выход продукта трансформации определен не был (I):

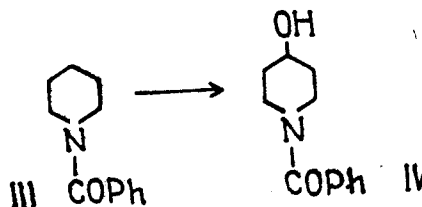
2

(54) ШТАММ ГРИБА *CUNNINGHAMELLA VERTICILLATA* ТРАНСФОРМАТОР ДЛЯ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ 1-БЕНЗОИЛПИРРОЛИДИНА И 1-БЕНЗОИАМИНО-3, 7-ДИМЕТИЛОКТАДИЕНА-2,6

(57) Использование: микробиология, биотехнология. Сущность изобретения: штамм *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 гриба способен при 26–28° С стереоселективно гидроксировать 1-бензоилпирролидин с образованием (-)-1-бензоил-3-гидроксипирролидина и 1-бензоиламино-3, 7-диметилпиперидин-2, 6 с выходом соответственно 38 и 20 %. 7 табл.

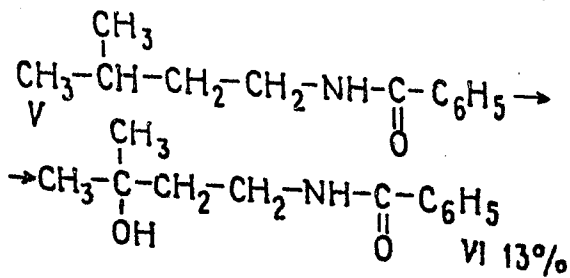


Известна трансформация насыщенных гетероциклических соединений культурами микроорганизмов, например, гриб *Beauveria bassiana* ATCC 7159 превращает 1-бензоилпиперидин (III) в 4-гидроксипроизводное (IV) с выходом 18 %:

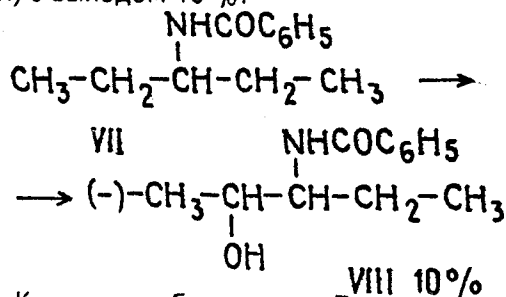


Кроме того, данная культура способна окислять аналоги цитральбензамида-ациклические амиды. Например, при росте на

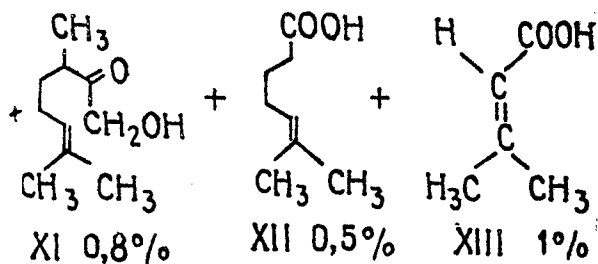
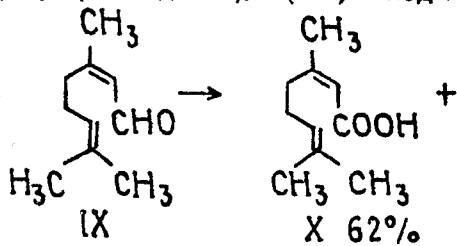
среде с глюкозой и кукурузным экстрактом культура гидроксилирует 1-(3-метилбутил)бензамид (V) в положение 3 алкильного заместителя с выходом продукта (VI) 13 %:



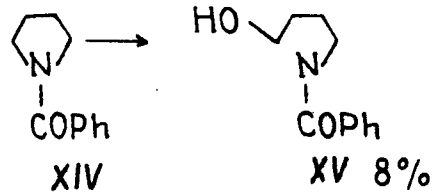
Гидроксилирование в тех же условиях 1-(1-пентил-3)-бензамида (VII) культурой *Beauveria bassiana* ATCC 7159 приводит к образованию оптически активного спирта (VIII) с выходом 10 %:



Культура бактерии *Pseudomonas aeruginosa* способна окислять аналог цитральбензамида-цитраль (IX) с образованием трех продуктов: (XI) выход 0,8 %, (XII) выход 0,5 % и (XIII) выход 1 % (I):



Наиболее близкой к изобретению является культура гриба *Beauveria bassiana* ATCC 7159, которая способна при росте на среде с осевым и дрожжевым экстрактами гидроксилировать 2-й углеродный атом 1-бензоилпирролидина (XIV) с раскрытием гетероциклического кольца и образованием N-(4-гидоксибутил)бензамид (XV), выход 8 %:



В литературе неизвестно примеров трансформации цитральбензамида ни культурой *Beauveria bassiana* ATCC 7159, ни какими-либо другими культурами.

К недостаткам культуры *Beauveria bassiana* ATCC 7159 относятся:

1. Гидроксилирование 1-бензоилпирролидина приводит не к образованию циклического оптически активного продукта, а к гидроксилированию второго углеродного атома пирролидина и раскрытию гетероциклического кольца; при этом образование продукта происходит с маленьким выходом, всего 8 %.

2. Культура не гидроксилирует цитральбензамид и при гидроксилировании его аналогов: 1-(3-метилбутил)бензамида и 1-(1-пентил-3)-бензамида выходы продуктов реакции также малы и составляют 13 и 10 % соответственно.

Целью изобретения является выделение нового более продуктивного штамма грибов, эффективно осуществляющего трансформацию 1-бензоилпирролидина и цитральбензамида. Продукты гидроксилирования этих соединений могут быть использованы: (-)-1-бензоил-3-гидрокси-пирролидин как синтон в синтезе серии лекарственных препаратов, а гидроксипроизводные цитральбензамида – как феромоны насекомых

Цель достигается выделением нового штамма гриба *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 из почвы, загрязненной отходами завода "Стеклопластик", г. Ступино Московской области.

Штамм *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 является природным сапрофитом и был выделен авторами из почвы, загрязненной отходами завода "Стеклопластик", г. Ступино Московской области.

Культура высевалась на 4° Б сусло-агар pH 5,0. После нескольких последовательных пересевов на указанной среде была выделена чистая культура гриба, определенная как *Cunninghamella verticillata* Paine (7). Данный штамм депонирован во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов ВНИИ Генетики АН СССР под номером F-430, непатогенен.

Морфологические и культурные признаки.

Для изучения морфологии культуры использовали агаризованную среду Чапека.

Колонии растут быстро – на 4-й день наблюдается сплошной рост на чашке Петри; колонии войлочные, однородные, окраска наружной и обратной стороны белая, форма круглая, край ровный, эксудата не образует.

Воздушный мицелий несептированный, белый. Хламидоспоры немногочисленные, продолговатые 10–20 x 6–10 мкм, с тонкой оболочкой, одиночные. Зигоспоры шаровидные или с боков слегка сжатые, 40–70 мкм в диаметре. Копулярные отроги противоположные.

Конидиеносцы до 1,5 см высотой, 10–20 мкм в диаметре, булавовидные, с 1–3 ярусами неправильных мутовок веточек ниже верхушечного вздутия до 30 мкм длины. Плодящие вздутия обратногрушевидные, верхушечное вздутие 30–70 мкм в диаметре, боковые 20–30 мкм. Конидии размерами 10–13 мкм на главных головках и 9–12 мкм на боковых, белые. Образуются по всей поверхности плодущих вздутий. Форма эллиптическая, покрыты шипиками 1,5–3,0 мкм, но встречаются гладкие и шаровидные.

Физиолого-биохимические признаки.

Рост в анаэробных условиях отсутствует. Гриб способен расти при температуре 8–34° С. Оптимум pH 5,0–6,0. Рост при 55° С отсутствует, имеются споры, выдерживающие прогревание при 80° С в течение 10 мин. Культура способна использовать в качестве единственного источника углерода (минеральный фон среды Чапека): глюкозу, ксилозу, раффинозу, Д-маннит, Л-арабинозу, сахарозу. Не используют инозит, Л-рамнозу, Д-фруктозу.

Для поддержания культуры используют среду следующего состава, г/л: глюкоза 20,0; пептон 10,0; агар 20,0; вода водопроводная; pH 5,0; t = 28° С. Для длительного хранения культуру *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 выращивают в течение 10 сут на среде следующего состава, г/л: глюкоза 20,0; пептон 10,0; агар 50,0; вода водопроводная pH 5,0, приготавливают агаровые диски 4 мм в диаметре и подвергают криоконсервации в жидком азоте, используя в качестве криопротектора 20 %-ный раствор глицерина в дистиллированной воде.

В табл. 1 приведены существенные отличия изобретения от прототипа.

Поставленная цель достигается выращиванием культуры *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 на модифицирован-

ной среде Чапека, указанной ниже, в течение 4 сут при температуре 20–34° С, pH среды 5,0–7,0. Предпочтительной температурой процесса является 26–28° С и pH 5,0.

Пример 1. Культуру *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 выращивают на качалке при 26–28° С в конических колбах на 750 мл по 100 мл среды следующего состава, г/л: сахароза 20,0; NaNO₃ 2,0; KH₂PO₄ 1,0; MgSO₄ · 7H₂O 0,5; KCl 0,5; FeSO₄ 0,01; пептон 5,0; вода дистиллированная, pH 5,0. Среду стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Данную среду используют для выращивания посевного материала и ферментационную для проведения трансформации. Посевной материал выращивают 2 сут и вносят 5 мл на 100 мл ферментационной среды. Через сутки культивирования вносят субстрат для трансформации – 1-бензоилпирролидин в количестве 100 м/г и культивируют на качалке еще 1–3 сут. Биомассу отделяют фильтрованием через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Фильтрат упаривают в вакууме при 50° С. Упаренную культуральную жидкость доводят до pH 7,0, добавляя 40 %-ный раствор NaOH и экстрагируют в жидкостном экстракторе хлороформом в течение 30 ч (экстрагировать можно неупаренную культуральную жидкость). Хлороформенный экстракт упаривают в вакууме досуха и остаток растворяют в небольшом количестве этанола.

Выделение продуктов трансформации осуществляли с помощью флешхроматографии на колонке с силикагелем (SilicaGel 40/100, Chemapol, ЧССР), используя систему растворителей гексанэтилацетат-метанол 10 : 10 : 2. Полученные соединения идентифицировали на основании их физико-химических и спектральных свойств: хроматографической подвижности, ВЭЖХ и масс-спектров. Масс-спектральный анализ проводили на приборе Varian MAT-112S при энергии ионизации 80 эВ с прямым вводом вещества в ионный источник. Оценку чистоты веществ и количественное определение осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе "Милихром" с использованием ультрафиолетового детектора (λ = 220 нм); скорость подачи элюэнта 100 мл/мин; объем пробы 2 мл; чувствительность 0,4; время измерения 720 мм/ч. Углы вращения измеряли на приборе ЕПО-1, ВНИИПродмаш. Из 100 мг 1-бензоилпирролидина получают 41,7 мг (38,0 %) 1-бензоил-3-гидрокси-пирролидина (табл. 2).

(-)-1-бензоил-3-гидрокси-пирролидин: время удержания (ВЭЖХ) 235 с, масс-

спектр: M^+ 191 (30), 190 (8), 174 (3), 173 (2,5), 162 (2,5), 146 (9), 114 (5), 105 (100), 99 (20), 86 (7,5), 85 (10), 77 (50), 70 (70), 57 (15), 56 (25), 55(15); спектр ПМР: 1.76–2.16 (3H, м, 3-H и 4-H), 3.40–3.83 (4H, м, 2-H и 5-H), $1 \alpha \text{Ip}^{20} = -46.56^\circ$ (С 1.89, этанол). Хроматографическая подвижность на силикагеле "Merk" Kieselgel 60 F254 Art. 5554 – $R_f = 0,26$.

Выход продукта трансформации 1-бензоилпирролидина в зависимости от времени инкубации при pH 5,0 и $t = 26-28^\circ \text{C}$.

Из табл. 2 видно, что реакция полностью проходит за 3 сут и увеличение времени трансформации до 4 сут не приводит к увеличению выхода продуктов трансформации.

Пример 2. Реакцию с 1-бензоилпирролидином проводят аналогично примеру 1 при $t = 26-28^\circ \text{C}$ в течение 3 сут, но при разных значениях pH, как показано в табл. 3

Из табл. 3 видно, что увеличение или уменьшение pH приводит к увеличению выхода продуктов, и наилучший выход мы имеем при pH 5,0.

Пример 3. Реакцию с 1-бензоилпирролидином проводят аналогично примеру 1 при pH 0,5 в течение 3 сут, но при разных температурах, как показано в табл. 4.

Из табл. 4 видно, что процесс микробиологического окисления протекает при температуре $20-34^\circ \text{C}$, но оптимальным является интервал $26-28^\circ \text{C}$, наиболее благоприятный для роста гриба и работы ферментных систем.

Пример 4. Реакцию с цитральбензамидом проводят аналогично примеру 1 при pH 5,0 и $t = 26-28^\circ \text{C}$, но при разном времени трансформации, как показано в табл. 5.

Из табл. 5 видно, что из 100 мг цитральбензамида за 3 сут трансформации получают 21,2 мг (19,8 %) гидроксицитральбензамида и увеличение времени трансформации до 4 сут не приводит к увеличению выхода продукта. Хроматографическая подвижность гидроксицитральбензамида на силикагеле "Merk", Kieselgel 60 F254, Art. 5554 – $R_f = 0,40$

Масс-спектр: M^+ 273 (25), 232 (40), 214 (15), 187 (100), 152 (55), 134 (9), 77 (50).

Пример 5. Реакцию с цитральбензамидом проводят аналогично примеру 1 при $t = 26-28^\circ \text{C}$ в течение 3 сут, но при разных значениях pH, как показано в табл. 6.

Из табл. 6 видно, что увеличение или уменьшение pH не приводит к увеличению выхода продукта, и наибольший выход мы имеем при pH 5,0.

Пример 6. Реакцию с цитральбензамидом проводят аналогично примеру 1 при pH 5,0, в течение 3 сут, но при разных значениях температуры, как показано в табл. 7.

Из табл. 7 видно, что процесс микробиологического окисления протекает от 20 до 34°C , но оптимальным является интервал $26-28^\circ \text{C}$, наиболее благоприятный для роста гриба и работы ферментных систем.

Выделен новый гриб *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430. Штамм способен стереоселективно гидроксировать 1-бензоилпирролидин, что ранее не было отмечено у других грибов; кроме того, он способен трансформировать соединения терпенового ряда, в частности цитральбензамид, что расширяет область его применения.

лирования 1-бензоилпирролидина и 1-бензоиламино-3, 7-диметилпектадиена-2, 6.

Формула изобретения

Штамм гриба *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 – трансформатор для гидроксиро-

Таблица 1

Существенные отличия изобретения от прототипа

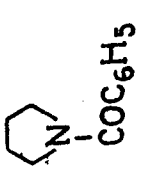
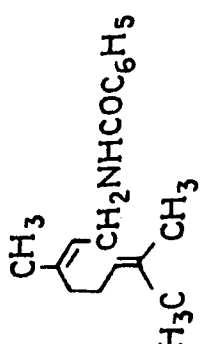
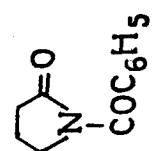
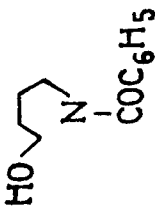
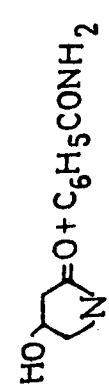
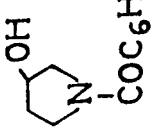
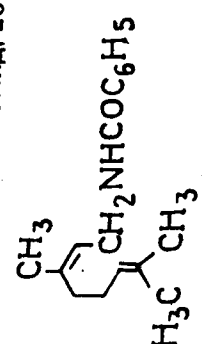
Микроорганизм субстрат для трансформации	Прототип Beauveria bassiana АГСС 7159 продукт. выход	Изобретение Cunninghamella verticillata ВКПМ F-430 продукт. выход
<p>1. 1-бензоилпирролидин</p>  <p>2. цитральбензамид</p>  <p>3. 1-бензоилпирролидон-2</p> 	<p>N-(4-гидроксибутил) бензамид, 8%</p>  <p>продукты отсутствуют</p> <p>смесь 1-бензоил-4-гидроксипирролидона-2 и бензамида выход смеси 17%</p> 	<p>(-)-1-бензоил-3-гидроксипирролидин (α)-β-46.56 (с 1.89, этанол), 38.2%</p>  <p>гидроксицитральбензамид, 20%</p>  <p>бензамид и несколько неидентифицированных продуктов, общий выход 25%</p> <p>$C_6H_5CONH_2$</p>

Таблица 2

Выход продукта трансформации 1-бензоилпирролидина в зависимости от времени инкубации при pH 5.0 и $t = 26-28^{\circ}\text{C}$

Продукт трансформации	Время, ч			
	24	48	72	96
(-)-1-бензоил-3-гидроксипирролидин, мг (%)	23,2 (21,1)	30,4 (27,6)	41,7 (38,0)	41,7 (38,0)

Таблица 3

Выход продукта трансформации 1-бензоилпирролидина в зависимости от pH среды

Продукт трансформации	Значения pH среды				
	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
(-)-1-бензоил-3-гидроксипирролидин, мг (%)	32,9 (30,0)	38,5 (35,0)	41,7 (38,0)	39,2 (35,6)	37,8 (34,3)

Таблица 4

Выход продукта трансформации 1-бензоилпирролидина в зависимости от температуры проведения процесса

Продукт трансформации	Температура, $^{\circ}\text{C}$			
	20 - 22	24 - 25	26 - 28	32 - 34
(-)-1-бензоил-3-гидроксипирролидин, мг (%)	8,1 (7,3)	39,8 (36,2)	41,7 (38,0)	32,5 (29,5)

Таблица 5

Выход продукта трансформации цитральбензамида в зависимости от длительности процесса

Продукт трансформации	Время трансформации, ч			
	24	48	72	96
Гидроксцитральбензамид, мг (%)	15,4 (14,5)	16,9 (15,8)	21,2 (19,8)	21,2 (19,8)

5

Таблица 6

Выход продукта трансформации цитральбензамида в зависимости от pH среды

Продукт трансформации	Значения pH				
	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
Гидроксцитральбензамид, мг (%)	14,0 (13,1)	15,8 (14,8)	21,2 (19,8)	18,5 (17,5)	17,5 (16,7)

Т а б л и ц а 7

Выход продукта трансформации цитральбензамида в зависимости от температуры

Продукт трансформации	Значения температуры °С			
	20 - 22	24 - 25	26 - 28	32 - 34
Гидроксицитральбензамид, мг (%)	12,5 (11,7)	19,1 (17,8)	21,2 (19,8)	15,7 (14,6)

Редактор

Составитель Ю. Попов
Техред М. Моргентал

Корректор Н. Слободяник

Заказ 329

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101