



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР
(ГОСПАТЕНТ СССР)

(51)5 C 12 P 17/12, C 12 N 1/14

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4903326/13

(22) 15.11.90

(46) 23.06.93. Бюл. № 23

(71) Химический факультет 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 (DD)

(56) Johnson R.A. Oxegenation with microorganisms In: Oxidation in arhanic chemistry N-Y: Acod Press 1978, partc, p. 131-210.

Johnson R.A., Murray H.C., Relnekc L.M., Fonken G.S. Stechiometry of microbiolohical hydroxylation. II oxygenation of 1-benzoyl-alkilpiperidins. J. Org. Chem, 1969, v. 34, v. 8, p. 2279-2284.

Johnson R.A., Murray H.C., Relneke L.M. The mecrobioligical oxygenation of acyclic N-alkylbenzamides-J. Am. Chem. Soc., 1q971, v. 93, № 19, 4872-4880.

Kleslich K. Microblol transformations of non - Steroid compounds. Stuttgart: Georg Thleme Publshers, 1976, 1123 p.

Johuson R.A., Herr M.E., Murray H.C., Fonken G.S. The microbiological oxygenations of aracycloalcanes. Structural determnations and some chemical modifications leading to transannular reactions. J. Org. Chem, 1968, v. 33, № 8, p. 3187-3195.

Изобретение относится к биотехнологии и касается получения нового штамма гриба *Beauveria bassiana* Bals VKM F-3111D, который может найти применение в микробиологическом синтезе производных многих лекарственных препаратов, таких как 1-бензоил-4-гидроксипиперидин и (+)-1-бензоил-3-гидроксипиперидин-полупродуктов противовоспалительных препаратов и 1-бензоиламино-5-гидрокси-3,7-диметокта

2

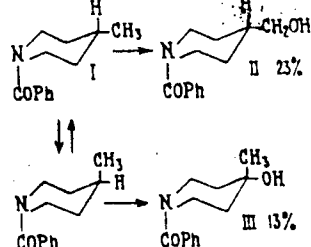
(54) ШТАММ ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA* BAIS В КАЧЕСТВЕ ТРАНСФОРМАТОРА ДЛЯ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ 1-БЕНЗОИЛПИПЕРИДИНА И 1-БЕНЗОИЛАМИНО-3,7-ДИМЕТИЛОКТАДИЕНА-2,6.

(57) Использование: биотехнология. Сущность изобретения: выделен новый штамм грибов рода *Beauveria*, эффективно трансформирующий 1-бензоилпиперидин и цитральбензамид. Штамм идентифицирован как *Beauveria bassiana* Bals VKMF-3111D. Выделенный штамм эффективно гидроксилирует 1-бензоилпиперидин с образованием 1-бензоил-4-гидроксипиперидина (выход 60%, в литературе 18%), кроме того образуется оптически активный 3-гидроксиизомер. В отличие от известных штаммов этого гриба новый штамм трансформирует цитральбензамид. 7 табл.

диен-2,6(гидроксицитральбензамид) -феромон насекомых.

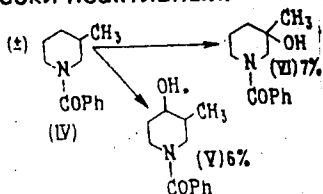
Ближайшим аналогом предлагаемого изобретения является культура микроскопических грибов *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (до 1970 года называлась *Sporotrichum sulfurescens* (1)), которую иногда называют *Beauveria sulfurescens* ATCC 7159. Культура гриба *Beauveria bassiana* ATCC 7159 способна трансформировать производные 1-

бензоилпиперидина-1-бензоилалкилпиперидины при росте на среде с глюкозой и кукурузным экстрактом (2), например гидроксилирование 1-бензоил-4-метилпиперидина (I) приводит к смеси двух продуктов:

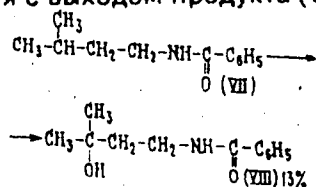


Они были идентифицированы как 1-бензоил-4-гидроксиметилпиперидин (II) и 1-бензоил-4-гидрокси-4-метилпиперидин (III).

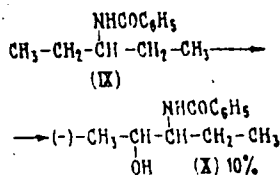
При использовании в качестве субстрата (±)-1-бензоил-3-метилпиперидина (IV) в продуктах реакции наблюдалось два компонента: 1-бензоил-3-метил-4-гидроксипиперидин (V) в оптически активной форме и 1-бензоил-3-гидрокси-3-метилпиперидин (VI), оптически неактивный:



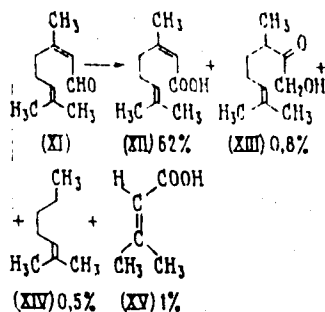
Культура гриба *Beauveria bassiana* ATCC 7159 способна также окислять аналоги цитральбензамида-ациклические амиды (3). При росте на указанной выше среде культура гидроксилирует 1-(3-метилбутил)бензамид (VII) в положение 3 алкильного заместителя с выходом продукта (VIII) 13%:



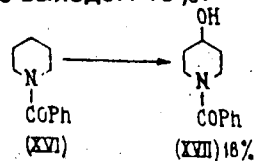
Гидроксилирование в тех же условиях 1-(1-пентил-3-)бензамида (IX) культурой *Beauveria bassiana* ATCC 7159 приводит к образованию оптически активного спирта (X) с выходом 10%:



Культура бактерии *Pseudomonas aeruginosa* способна окислять аналог цитральбензамида - цитраль (XI) с образованием четырех продуктов: (XII) выход 62%, (XIII) выход 0,8%, (XIV) выход 0,5% и (XV) выход 1% (4):



Наиболее близким прототипом предполагаемого изобретения является культура гриба *Beauveria bassiana* ATCC 7159, которая была выделена как лабораторный загрязнитель [1]. Данный микроорганизм осуществляет трансформацию 1-бензоилпиперидина (XVI) в растущей культуре на среде следующего состава, г/л: глюкоза - 10,0; кукурузный экстракт - 20,0; вода водопроводная; pH 5,0; t = 28 С/5, 10. Продуктом реакции является 1-бензоил-4-гидроксипиперидин (XVII) с выходом 18%:



В литературе не встречается примеров трансформации цитральбензамида ни культурой *Beauveria bassiana* ATCC 7159, ни какими-либо другими культурами, поэтому можно ограничиться указанными выше аналогами.

К недостаткам культуры *Beauveria bassiana* ATCC 7159 относятся:

1. Выход продукта трансформации 1-бензоилпиперидина-1-бензоил-4-гидроксипиперидина невысокий и составляет 18%. При трансформации не происходит введения гидроксила в прохиральный центр с образованием оптически активного 3-гидроксиизомера.

2. Культура не гидроксилирует цитральбензамид, а 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 рода *Beauveria*, эффективно осуществляющего трансформацию 1-бензоилпиперидина и цитральбензамида. Продукты гидроксилирования этих соединений могут быть использованы: 1-бензоил-гидроксипиперидины в синтезе противовоспалительных и косметических препаратов (6,7), а гидроксипроизводные цитральбензамида как ферромона насекомых (8).

Цель достигается выделением нового штамма *Beauveria bassiana* Bals VKM F-3111D с личинки колорадского жука.

Штамм *Beauveria bassiana* ВКМ F-3111D является энтомопатогенной культурой и природным паразитом колорадского жука, вредной черепашки, тутового шелкопряда, картофельной коровки и т.д. и был выделен авторами с пораженной грибом личинки колорадского жука, найденной на картофельном поле вблизи г. Ивантеевка Московской области.

Культура высевалась с поверхности личинки на среду следующего состава: 4°Б сусло-агар, pH 5,0, вода водопроводная. После нескольких последовательных пересевов на указанной среде была выделена чистая культура гриба и идентифицирована как *Beauveria bassiana* Bals (9). Данный штамм депонирован во Всесоюзной коллекции микроорганизмов ИБФМ АН СССР под номером F-3111D, непатогенен для человека.

Морфологические и культурные признаки.

Микроорганизм культивировали на агаризованной среде Чапека. Колонии растут сравнительно быстро, на 8-е сутки достигают 6 см в диаметре при 28°C. Колонии бугристые, белые, форма круглая, край ровный. Цвет спорносящего воздушного мицелия белый, цвет обратной стороны колонии — белый. Растворимый пигмент отсутствует. Эксудата не образует. Центральная часть колонии с хохолком. Воздушный мицелий септированный, диаметр гиф 1,0–2,0 мкм. Небольшие скопления конидиогенных клеток образуются на цилиндрических боковых клетках размером 6x15 мкм или располагаются непосредственно на гифе. Бластоспоры развиваются как вздутие конца конидиогенной клетки, обычно цилиндрические с гладкой поверхностью, образуются за счет симподиального роста конидиогенной клетки. Конидии формируются из бластоспор. Конидии бесцветные, одиночные, отшнуровываются поодиночке с образованием коленчатой зубчатой оси конидиогенной клетки. Конидии сферические, поверхность бородавчатая, размер $3,0 \pm 0,2$ мкм, в массе белые

На среде состава, г/л: кукурузный экстракт 20, глюкоза 10,0, агар-агар 15,0, вода водопроводная, pH 5,0, колонии растут относительно быстро и на восьмые сутки достигают 5–6 мм в диаметре. Колонии белые, круглые, край ровный, в центре колонии небольшой бугорок. Поверхность колонии ровная, без бугорков. Цвет спорносящего мицелия белый, обратная сторона колонии белая. Растворимого пигмента не образует. Эксудата не образует. Воздушный мицелий септированный, диаметр гиф 1,0–2,0 мкм. Скопления конидиогенных клеток образуются на цилиндрических боковых клет-

ках размером 6x15 мкм или располагаются непосредственно на гифе. Бластоспоры развиваются как вздутие конца конидиогенной клетки за счет ее последовательного симподиального ветвления. Бластоспоры цилиндрические с гладкой поверхностью. Конидии образуются из бластоспор, отшнуровываются поодиночке с образованием коленчатой зубчатой оси конидиогенной клетки.

10 Конидии сферические, белые, поверхность бородавчатая, размер $3,0 \pm 0,2$ мкм.

На среде состава, г/л: глюкоза 20,0, пептон 10,0, вода водопроводная, pH 5,0, колонии растут довольно медленно и на 14 день достигают 5–7 мм в диаметре. Колонии белые, круглые, край ровный. С обратной стороны колонии слегка складчатые. Цвет спорносящего воздушного мицелия белый. Растворимый пигмент отсутствует, эксудата не образуется, диаметр гиф 1,0–2,0 мкм. На цилиндрических боковых клетках размером 6x15 мкм или непосредственно на гифе образуются скопления конидиогенных клеток. Бластоспоры развиваются как вздутие конца конидиогенной клетки, обычно цилиндрические с гладкой поверхностью, образуются за счет симподиального роста конидиогенной клетки. Конидии формируются из бластоспор, отшнуровываются поодиночке с образованием коленчатой зубчатой оси конидиогенной клетки. Конидии сферические, белые, поверхность бородавчатая, размер $3,0 \pm 0,2$ мкм.

35 Физиолого-биохимические признаки

Рост культуры в анаэробных условиях отсутствует. Возможен рост при температурах 25–35°C, температурный оптимум — 25–30°C. Оптимум pH 4,85–5,0. Рост при 55°C отсутствует, имеются споры, выдерживающие прогревание при 80°C в течение 10 мин. Способна использовать в качестве единственных источников углерода (минеральный фон среды Чапека): глюкозу, Д-ксилозу, Л-арабинозу, Л-рамнозу, Д-фруктозу, рафинозу, Д-маннит, инозит, сахарозу.

45 Для субкультивирования используют среду состава, г/л: кукурузный экстракт 20,0; глюкоза 10,0; агар-агар 15,0; вода водопроводная, pH 5,0.

50 Для длительного хранения культуры *Beauveria bassiana* ВКМ F-3111D выращивают в течение 10 сут на среде состава, г/л: глюкоза 20,0; пептон 10,0; агар-агар 15,0; вода водопроводная; pH 5,0. На чашках Петри приготавливают агаровые диски диаметром 4 мм и подвергают криоконсервации в жидком азоте, используя в качестве криопротектора 20%-ный раствор глицерина в дистиллированной воде.

Поставленная цель достигается выращиванием культуры *Beauveria bassiana* VKVF-3111D на модифицированной среде Чапека, указанной ниже, в течение 96 ч при температуре 20-35°C, pH среды 5,0-7,0. Предпочтительной температурой процесса является 28-30°C и pH 5,0. В табл.1 приведены существенные отличия предполагаемого изобретения от прототипа.

Пример 1. Культуру *Beauveria bassiana* VKMF-3111D выращивают на качалке (200-220 об/мин) при 28-30°C в конических колбах на 750 мл, содержащих 100 мл модифицированной среды Чапека состава, г/л: сахара 20,0; пептон 5,0; NaNO₃ 2,0; KH₂PO₄ 1,0; MgSO₄ · 7H₂O 0,5; KCl 0,5; FeSO₄ 0,01, вода дистиллированная, pH 5,0. Среду стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин. Указанную среду используют как для выращивания посевного материала, так и как ферментационную среду для проведения трансформации. Посевной материал выращивают 48 ч и инокулум вносят в количестве 5 мл на 100 мл среды. Через 24 ч культивирования вносят субстрат для трансформации 1-бензоилпиперидина в количестве 100 мг/л и культивируют на качалке еще 24-96 ч. Биомассу отделяют фильтрованием через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Фильтрат упаривают на роторном вакуумном испарителе при 50°C до 0,1 объема. Упаренную культуральную жидкость доводят до pH 7,0, добавляя 40%-ный раствор NaOH и экстрагируют горячим хлороформом в экстракторе для тяжелых жидкостей в течение 30 ч (экстрагировать можно и неупаренную культуральную жидкость). Хлороформенный экстракт упаривают в вакууме досуха и остаток растворяют в небольшом (0,3-0,5 мл) количестве этанола.

Выделение продуктов трансформации осуществляли с помощью флэшхроматографии на колонке силикагелем (Silicagel 40/100, Chemapol ЧССР), используя систему растворителей гексан:этилацетат:метанол 10:10:2. Полученные соединения идентифицировали на основании физико-механических и спектральных свойств; хроматографической подвижности, ВЭЖХ и масс-спектрального распада.

Масс-спектры регистрировали 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 ВЭЖХ на хроматографе "Милихром" с использованием ультрафиолетового детектора ($\lambda = 220$ нм), скорость подачи элюэнта 100 μ л/мин; объем пробы 2 μ л; чувствительность

0,4; время измерения 0,6 с; скорость движения ленты самописца 720 мм/ч.

Углы вращения измеряли на приборе ЕПО-1, ВНИИПродмаш.

Из 100 мг 1-бензоилпиперидина получают 65,1 мг (60,2%) бензоил-4-гидроксипиперидина и 5,4 мг (4,9%) 1-бензоил-3-гидроксипиперидина (табл.2), 1-бензоил-4-гидроксипиперидин: хроматографическая подвижность на силикагеле "Merk" Kieselgel 60 F₂₅₄, Art 5554 - R_f - 0,37; время удерживания ВЭЖХ - 225 с. Масс-спектр: M⁺ 205/30/, 204/50/, 183/3/, 187/5/, 186/8/, 160/4/, 149/4/, 105/100/, 100/8/, 78/4/, 77/55/. Здесь и далее даны m/z (интенсивность от максимального). +/-1-бензоил-3-гидроксипиперидин: R_f - 0,12, время удерживания ВЭЖХ 87,5 с. Масс-спектр: M⁺ 205/16/, 204/28/, 188/6/, 187/8/, 186/5/, 177/3/, 176/6/, 160/2/, 149/4/, 148/8/, 134/6/, 105/100/, 100/20/, 78/4/, 77/64/. Угол вращения при 300 нм 1 α _D²⁰ + 124,48° (с. 0,45, метанол).

Из табл.2 видно, что реакция полностью проходит за 72 ч и увеличение времени трансформации до 96 ч не приводит к увеличению выхода продуктов трансформации.

Пример 2. Трансформацию 1-бензоилпиперидина проводят аналогично примеру 1, при t = 28-30°C в течение 72 ч, но при разных значениях pH (см. табл.3).

Из данных табл.3 видно, что увеличение или уменьшение pH среды не приводит к увеличению выхода продуктов трансформации. Наилучший выход продуктов наблюдается при pH среды 5,0.

Пример 3. Трансформацию 1-бензоилпиперидина проводят аналогично примеру 1 при pH среды 5,0 в течение 72 ч, но при разных температурах (см. табл.4).

Из данных табл.4 видно, что процесс микробиологического окисления протекает при температуре от 20 до 35°C, но оптимальным является интервал 28-30°C, наиболее благоприятный для роста гриба и работы ферментных систем.

Пример 4. Трансформацию цитральбензамида проводят аналогично примеру 1 при pH 5,0, температуре 28-30°C, но при различной длительности процесса (см. табл.5).

Из данных табл.5 видно, что реакция полностью проходит за 72 ч и увеличение времени трансформации до 96 ч не приводит к увеличению выхода гидроксицитральбензамида. 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. Трансформацию цитральбензамида проводят аналогично примеру 1 при $t = 28-30^{\circ}\text{C}$ в течение 72 ч, но при разных значениях pH (см. табл.6).

Из данных табл.6 видно, что увеличение или уменьшение значения pH не приводит к увеличению выхода продукта; наибольший выход продукта наблюдается при pH 5,0.

Пример 6. Трансформацию цитральбензамида проводят аналогично примеру 1 при pH среды 5,0 в течение 72 ч, но при разных температурах (см. табл.7).

Из данных табл.7 видно, что процесс микробиологического окисления протекает при температуре от 20 до 35°C , но оптимальной является температура $28-30^{\circ}\text{C}$, наиболее благоприятная для роста и работы ферментных систем.

Выделен новый штамм *Beauveria bassiana* (ВКМФ-311D). В отличие от известного хорошо изученного штамма *B. bassiana* ATCC 7159 он более эффективно гидроксигирирует 1-бензоилпиперидин (выход 1-бензоил-4-гидроксипиперидина составляет 60%, для *Beauveria bassiana* ATCC 7159-18%), кроме того образуется еще и оптический активный 3-гидроксиизомер. Штамм позволяет также расширить спектр применения субстратов для трансформации. Впервые показано, что грибы этого рода гидроксигирируют терпены - цитральбензамид.

Формула изобретения

Штамм гриба *Beauveria bassiana* ВКМФ-3111D в качестве трансформатора для гидроксигирирования 1-бензоилпиперидина и 1-бензоиламино-3,7-диметиллоктадиена-2,6.

20

Таблица 1

Существенные отличия предлагаемого изобретения от прототипа


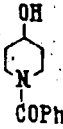

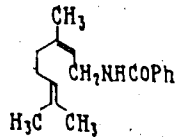
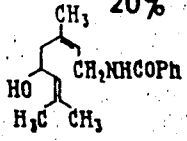
Существенные отличия	Прототип	Предлагаемое изобретение
Микроорганизм	<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7159	<i>Beauveria bassiana</i> ВКМФ-3111D
Трансформация	Продукт, выход	Продукт, выход
1. 1-Бензоилпиперидин 	1-бензоил-4-гидроксипиперидин, 18% 	1-бензоил-4-гидроксипиперидин, 60%; (+)-1-бензоил-3-гидроксипиперидин 5%; $+124,48^{\circ}$ (с 0,45 метанол) 
2. Цитральбензамид 	продукты отсутствуют	гидроксцитральбензамид, 20% 
<u>Другие отличия</u>	глюкоза 10,0; кукурузный экстракт 20,0; вода водопроводная, pH 5,0	сахароза 20,0; пептон 5,0; NaNO_3 -2,0; KH_2PO_4 -1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5; KCl -0,5; FeSO_4 -0,01 вода дист., pH 5,0
1. Оптимальная среда для роста и трансформации, г/л		
2. Поверхность колонии	Складчатая	Бугристая
3. Способ выделения	Лабораторный загрязнитель	Паразит колорадского жука

Таблица 2

Выход продуктов трансформации 1-бензоилпиперидина в зависимости от времени процесса (рН 5,0; $t = 28-30^{\circ}\text{C}$)

Продукты трансформации	Время, ч			
	24	48	72	96
1-бензоил-4-гидрокси-пиперидин, мг (%)	37,6 (34,8)	55,3 (51,2)	65,1 (60,2)	65,1 (60,2)
/+/-1-бензоил-3-гидрокси-пиперидин, мг (%)	2,7 (2,5)	3,9 (3,6)	5,4 (4,9)	5,4 (4,9)

Таблица 3

Выход продуктов трансформации 1-бензоилпиперидина в зависимости от рН среды ($t = 28-30^{\circ}\text{C}$; время 72 ч)

Продукты трансформации	Значения рН среды			
	4,0	4,5	5,0	5,5
1-бензоил-4-гидрокси-пиперидин, мг (%)	49,7 (46,0)	59,4 (55,0)	65,1 (60,2)	63,2 (58,5)
/+/-1-бензоил-3-гидрокси-пиперидин, мг (%)	3,1 (2,8)	4,2 (3,8)	5,4 (4,9)	4,9 (4,5)

Таблица 4

Выход продуктов трансформации 1-бензоилпиперидина в зависимости от температуры проведения процесса (рН 5,0; время 72 ч)

Продукты трансформации	Температура, °С			
	20-22	24-25	28-30	33-35
1-бензоил-4-гидрокси-пиперидин, мг (%)	19,4 (17,9)	47,3 (43,8)	65,1 (60,2)	25,1 (23,2)
/+/-1-бензоил-3-гидрокси-пиперидин, мг (%)	1,2 (1,1)	3,1 (2,8)	5,4 (4,9)	1,4 (1,3)

Таблица 5

Выход продукта трансформации цитральбензамида в зависимости от времени процесса (рН 5,0; t=28-30 °С)

Продукт трансформации	Время, ч			
	24	48	72	96
Гидроксицитральбензамид, мг (%)	16,7 (15,6)	18,4 (17,2)	21,2 (19,8)	21,2

Таблица 6

Выход продукта трансформации цитральбензамида в зависимости от рН среды (t=28-30 °С; время 72 ч)

Продукт трансформации	Время, ч			
	4,0	4,5	5,5	6,0
Гидроксицитральбензамид, мг (%)	13,9(12,9)	16,5 (15,4)	21,2 (19,8)	17,1 (16,0)

Т а б л и ц а 7

Выход продукта трансформации цитральбензамида в зависимости от температуры проведения процесса (рН 5,0; время 72 ч)

Продукт трансформации	Значения температуры, °С			
	20-22	24-25	28-30	33-35
Гидроксицитральбензамид, мг (%)	10,5(9,7)	17,4 (16,2)	21,2 (19,8)	13,8 (12,9)

Редактор М.Кузнецова

Составитель И.Паршикова
Техред М.Моргентал

Корректор М.Ткач

Заказ 2174

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