



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11) 207 222

Int.Cl.³ 3(51) C 12 P 1/06

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P/ 2377 258
(31) 51192

(22) 26.02.82
(32) 11.03.81

(44) 22.02.84
(33) BG

- (71) ADW DER DDR, BERLIN, DD
(72) SCHLEGEL, ROLF, DR.RER.NAT. DIPL.-CHEM., DD; THRUM, HEINZ, DR.RER.NAT. DIPL.-CHEM., DD;
KLEINWAECHTER, WALTER, DR.RER.NAT. DIPL.-CHEM., DD; SCHADE, WOLFGANG,
DR.RER.NAT. DIPL.-CHEM., DD; LEONOWA GESCHEWA, RASCHEL, DR.MED., BG; BOJANOWA
IWANOWA, VENETA, DIPL.-CHEM., BG; ATANASOWA ZACHARIEWA, MARA, BG; CHARALANOW
RATSCHEW, ROSEN, DIPL.-CHEM., BG; PANAJOTOW RUSEW, PANTSCHO, PROF. DR.MED.VET., BG;
BORISOW POPOW, KIRIL, DR.MED.VET., BG; CHRISTOWA ZWETKOWA, RUSHA, BG; WESELINOWA
BELOMUSCHOWA, DOLORES, BG; STANISLAWONA SEWRIEWA, WESELA, BG; GEORGIEWA
GUSCHTSCHEROWA, ADRIANA, BG
(73) siehe (72)
(74) HULTSCH, ERICH PATENTBUERO D. INST. U. EINRICHTUNGEN D. ADW 6900 JENA
BEUTENBERGSTR. 11

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES POLYETHER-ANTIBIOTIKA-KOMPLEXES

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines neuen Antibiotika-Komplexes, der gegen grampositive Bakterien sowie einige Pilze und Protozoen aktiv ist und potentiell geeignet ist zur Verwendung als Coccidiostatikum und/oder Ergotropikum bei der Nutztierhaltung. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung des Polyether-Antibiotika-Komplexes A-111 unter Verwendung des Mikroorganismus *Actinomyces hygroscopicus*, Stamm 111. Ziel der Erfindung ist die Herstellung eines potentiell coccidiostatisch und/oder ergotrop wirksamen Antibiotika-Komplexes, der aus 4 Komponenten bisher nicht beschriebener Polyether-Antibiotika besteht. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch aerobe Submersfermentation des Stammes 111 in Medien mit geeigneten Einsatzstoffen der Polyether-Antibiotika-Komplex A-111 gebildet, mit geeigneten Methoden aus dem Mycel isoliert, gereinigt und nötigenfalls nachfolgend in die Komponenten A-111-1, A-111-2, A-111-3 und A-111-4 getrennt wird.

237725 8

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung eines Polyether-Antibiotika-Komplexes

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Antibiotika-Komplexes, der zur Gruppe der Polyether-Antibiotika gehört, die vorwiegend gegen grampositive Bakterien und Protozoen aktiv sind und auf Grund ihrer coccidiostatischen, ergotropen sowie herzstimulierenden Wirkung in der Nutztierhaltung und für die Veterinärmedizin von Nutzen sind. (Westley, Adv. Appl. Microbiol. 22, 177-223 (1977)).

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Polyether-Antibiotika gehören zu einer Verbindungsklasse, die Ionophore genannt werden wegen ihrer Fähigkeit, mit Alkali- bzw. Erdalkalitionen lipidlösliche Komplexe zu bilden, die das Durchdringen der Ionen durch die Lipidschranke der Zellmembran ermöglichen.

In der Literatur sind etwa 40 Polyether-Antibiotika bekannt, darunter Monensin (J. Amer. Chem. Soc. 89, 5737, 1967), Nigericin (Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 29, 1968), Dianemycin (J. Antibiot. 27, 814, 1974), X-537A (J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1971, 927), A 204A (J. Amer. Chem. Soc. 95, 3399, 1973), Salinomycin (Tetrahedron Lett. 49, 4955, 1973).

Bisher wurden die Polyether-Antibiotika aus verschiedenen Vertretern der Gattung Streptomyces (Actinomyces) isoliert, z. B. aus Str. hygrosopicus, Str. albus, Str. griseus, Str. aureofaciens, Str. cinnamomensis u. a..

Aus der Palette der oben angeführten Polyether-Antibiotika befinden sich zur Zeit Monensin, Lasalocid (X-537a) und Salinomycin als Coccidiostatika in Anwendung und sind wichtige Agentien in der industriellen Geflügelhaltung. Darüber hinaus werden Monensin bei Polygastrischen Tieren und neuerdings Salinomycin bei monogastrischen Tieren (besonders Schweinen) als Ergotropika eingesetzt. Der weltweite Einsatz dieser in die Tierernährung eingeführten Antibiotika birgt die Gefahr des Nachlassens der Wirkung infolge Resistentwerden von Mikroorganismen der Darm- bzw. Pansenflora. Daher ist es notwendig, neue Vertreter dieser sehr wirksamen Substanzklasse zu suchen, die chemisch neue Strukturen oder Derivate bekannter Verbindungen darstellen.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist die Herstellung eines antibiotischen Komplexes, der aus 4 Komponenten, die der Gruppe der Polyether-Antibiotika zuzuordnen sind, besteht. Durch diesen neuen Antibiotika-Komplex soll die Palette dieser Wirkstoffgruppe erweitert und ergänzt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu beschreiben, mit dem ein neuer Polyether-Antibiotika-Komplex mit Hilfe eines bisher nicht bekannten Mikroorganismus aus leicht zugänglichen und billigen Einsatzstoffen gewonnen werden kann.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen in einem flüssigen Nährmedium mit entsprechenden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Mineralsalzen ein Mikroorganismus der Art *Actinomyces hygroscopicus* bzw. seine Mutanten oder Varianten gezüchtet werden. Die Fermentation wird bei einer Temperatur von 25 °C bis 32 °C, vorzugsweise 28 °C, während eines Zeitraumes von 2 bis 8, vorzugsweise 6 Tagen durchgeführt. Der dabei gebildete neue Polyether-Antibiotika-Komplex mit der Bezeichnung

A-111 wird aus dem feuchten Mycel extrahiert sowie anschließend mit bekannten Methoden konzentriert und ausgefällt. Gegebenenfalls wird dieser Komplex durch fraktionierte Sedimentation mit Aceton und/oder anschließender Chromatographie endlich in die 4 Einzelkomponenten A-111-1, A-111-2, A-111-3, A-111-4 getrennt. Der Mikroorganismus, der in dem erfindungsgemäßen Verfahren Anwendung findet und der nachfolgend ausführlich charakterisiert wird, wurde aus Erde im Norden der VR Bulgarien isoliert und ist in der Bulgarischen Mikrobensammlung im Staatlichen Institut für Arzneimittelkontrolle (DIKLS) Sofia unter der Nr. 111 hinterlegt.

Morphologische Eigenschaften des Stammes 111: Der Stamm hat spiralförmige Sporenträger, die in Form von Trauben mit drei und mehr Windungen dicht angeordnet sind. Die Sporen haben eine rauhe Oberfläche.

Kulturcharakteristiken des Stammes 111 auf verschiedenen Medien: Der Actinomycetenstamm wächst gut auf synthetischen und organischen Nährböden. Abhängig von den Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und der Zusammensetzung der Salze variiert die Farbe des Luftmycels von weiß bis hellgrau, dunkelgrau und dunkelgrau-violett und bei Lyse bis schwarz. Das Substratmycel wechselt von cremefarben, blaß-gelb bis braun-gelb. Die Farbe des Luft- und Substratmycels wurde nach der Farbskala von A. S. Bondarzew (Verlag der Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Moskau, 1954) bestimmt.

Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar (ISP Nr. 2): Gutes Wachstum. Das Luftmycel bei jungen Kulturen ist weiß (d3). Später wird es blaß-grau (a6). Das Substratmycel ist blaß-gelb (j5) bis kaffeebraun (d4). Kein lösliches Pigment.

Hafermehl-Agar (ISP Nr. 3): Wachstum sehr gut. Das Luftmycel ist blaß-grau (a6) bis dunkelgrau und dunkelgrau-violett (a2-n2). Das Substratmycel gelb bis blaß-braun (p5-b4). Kein lösliches Pigment.

Stärke-Salz-Agar (ISP Nr. 4): Wachstum sehr gut. Luftmycel grau, von dunkelgrau bis dunkelgrau-violett (w4-a2-n2). Substratmy-

cel gelb bis blaß-braun (p5-w4). Kein lösliches Pigment.

Glycerin-Asparagin-Agar (ISP Nr. 5): Wachstum sehr gut. Luftmycel blaß-grau, aschgrau bis dunkelgrau (a6-k2-a2). Substratmycel gelb-grün bis gelb-braun (b3-d4). Kein lösliches Pigment.

Pepton-Hefeextrakt-Eisen-Agar (ISP Nr. 6): Wachstum mittel-mäßig. Luftmycel weiß bis blaß-grau (d1-a6). Substratmycel gelb-braun (d4). Lösliches Pigment blaß-braun (b4).

Tyrosin-Agar (ISP Nr. 7): Wachstum mittelmäßig. Spärliches Luftmycel - blaß-grau (a6). Substratmycel gelb-braun bis dunkelbraun (b7-15). Bildet lösliches Pigment, das am 7. Tag der Kultivierung rosafarben ist und später dunkelbraun bis schwarz wird.

SRI-Glukose-Agar (Krassilnikov N. A., 1950): Wachstum sehr gut. Luftmycel abhängig von Alter grau, dunkelgrau bis schwarz (w4-a4-a1). Substratmycel gelb, gelb-braun bis braun (p5-d4-w7). Kein lösliches Pigment.

Mineralagar Nr. 1 (Gause, G. F. und Mitarb., 1957): Wachstum sehr gut. Luftmycel bei jungen Kulturen blaß-grau und bei länger kultivierten dunkelgrau und schwarz (a6-a2-a1). Substratmycel blaß-gelb bis hellbraun (j6-b4). Kein lösliches Pigment.

Maisextrakt-Agar: Wachstum sehr gut. Luftmycel grau, aschgrau (w4-k2). Substratmycel gelb-braun (d4). Kein lösliches Pigment.

Capek-Agar (Saccharose): Wachstum spärlich. Luftmycel weiß bis weiß-grau (d1-a6). Substratmycel farblos bis cremefarben (b6). Kein lösliches Pigment.

Glukose-Asparagin-Agar: Wachstum sehr gut. Luftmycel aschgrau, grau, dunkelgrau (k2-w4-a2). Substratmycel gelb-braun (d4). Kein lösliches Pigment.

Maltose-Trypton-Agar: Wachstum gut. Luftmycel weiß bis hellgrau (d1-a6). Substratmycel cremefarben bis gelb (b6-p5). Kein lösliches Pigment.

Kasein-Stärke-Agar: Wachstum sehr gut. Luftmycel grau, dunkelgrau, dunkelgrau-violett (w4-a2-n2). Substratmycel gelb-braun (d4). Kein lösliches Pigment.

Benett-Agar: Wachstum gut. Luftmycel blaß-grau bis dunkelgrau

(a6-a2). Substratmycel cremefarben bis blaß-sandfarben (b6-k3). Kein lösliches Pigment.

SR II (Krasnikov N. A., 1950): Wachstum schwach. Luftmycel weiß (d3). Substratmycel cremefarben (b6). Kein lösliches Pigment.

Kartoffel-Agar mit 1 % Glukose; Wachstum gut. Luftmycel grau bis dunkelgrau (w4-a2). Substratmycel, gelb-braun (d4). Kein lösliches Pigment.

Fleischpepton-Agar: Wachstum gut. Kein Luftmycel. Substratmycel gelb bis blaß-braun (p5-d4). Kein lösliches Pigment.

Physiologisch-biochemische Eigenschaften: Der Actinomycetenstamm 111 verflüssigt Gelatine und peptonisiert Milch unter Bildung von braunem Pigment. Er hydrolysiert gut Stärke, zersetzt aber keine Zellulose. Er reduziert Nitrat zu Nitrit und bildet Melanin. Der Stamm verwertet gut Glukose, Galaktose, Fruktose, Xylose, Mannose, Ramnose, Arabinose, Mannit, Maltose, Laktose, Raffinose, Sorbit, Glycerin. Die Verwertung von Saccharose, Dulcitol, Inositol, Inulin und Exulin ist gering oder fehlt ganz.

Antibiotische Aktivität: Das antimikrobielle Spektrum wird gegen eine bestimmte Zahl von Mikroorganismen mit Hilfe der Agar-Diffusionsmethode nach 6tägiger Kultivierung des Bildners auf drei Nährböden bestimmt - Sojanährboden, Mineralnährboden und SRI mit Glukose. Actinomyces 111 hemmt die Entwicklung folgender Test-Kulturen: Staphylococcus aureus 209, Bacillus subtilis L-2, Bacillus idosus, Bacillus mycoides, Bacillus pseudoanthracis, Micrococcus luteus 9341 (früher sarcina lutea 9341), Mycobacterium B-5, Candida albicans, Penicillium chrysogenum, Botrytis cinerea, Fusarium graminearum. Einen Vergleich der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von Polyether-Antibiotika-Komplex A-111 mit Monensin und Salinomycin (Tab. 3) ergibt, daß A-111 durch bedeutend höhere Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien als die Vergleichspräparate charakterisiert ist. Der Stamm 111 ist mesophil und aerophil. Die optimale Temperatur für seine Entwicklung ist 25 bis 32 °C. Der Stamm wird auf dem Nährboden SRI und Maisnährboden gehalten. Der Actinomyces 111 ist einigen morphologischen und physiologisch-biochemischen Eigenschaften der Art Streptomyces hygrosopicus ähnlich. In den letzten Jahren sind in der Literatur unter der Artbezeichnung Streptomyces

hygroscopicus viele Stämme beschrieben worden, die sich in den morphologischen, Kultur- und besonders physiologisch-biochemischen Eigenschaften, speziell aber in der Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen und ihrem antibiotischem Spektrum, von dem zuerst beschriebenen Actinomycetenstamm Actinomyces hygroscopicus, Jensen, 1931 sehr wesentlich unterscheiden. Dies trifft auch für Actinomyces 111 zu. Beim Vergleich der gewonnenen Daten steht der Actinomyces 111 dem Streptomyces hygroscopicus Shogi et al., 1968, Syn. Actinomyces polyetherinus (Krasnitsnikov N. A., 1970) am nächsten. Er unterscheidet sich jedoch in einigen morphologischen, Kultur- und physiologisch-biochemischen Eigenschaften. Im Gegensatz zum Actinomyces polyetherinus hat er Sporen mit rauher Oberfläche. Er bildet Melanin, verwertet Sorbit und produziert verschiedene antibiotische Substanzen. Der Stamm 111 ist ebenso variabel wie die in der Literatur beschriebenen Stämme der Art Streptomyces hygroscopicus. Auf einigen Nährböden gewinnt man bis zu 5 und mehr Varianten. Bei einigen Varianten ist das Luftmycel sehr gut entwickelt und typisch für die Art hygroscopicus; ~~ist~~es grau, dunkelgrau bis schwarz infolge der eintretenden Lyse. Bei den anderen Varianten ist es weiß oder hellgrau. Es wurden asporogene Varianten oder solche mit schwach entwickeltem Luftmycel gefunden.

Aufgrund der gewonnenen morphologischen, Kultur- und physiologisch-biochemischen Daten rechnen wir den Actinomyces 111 zu der Sammelart Actinomyces hygroscopicus.

Actinomyces 111 produziert insgesamt folgende antibiotische Substanzen:

1. Polyether-Komplex, der aus 4 einzelnen Komponenten besteht.
2. Azalomycin B: identisch mit der Beschreibung in der Literatur (Arai, M., J. Antibiotics 13 (1960), 46-50, 51-56)).
3. Fungistatisches Antibiotikum: Hexaen-Antibiotikum nach Daten der UV-Spektrometrie.
4. Komplex mit antibakterieller und fungistatischer Wirkung, der aus 5 Komponenten besteht.

Im weiteren Ausbau besteht das Verfahren zur Herstellung des Polyether-Komplexes aus folgenden Schritten: In 300 ml-Erlenmeyer-Kolben werden je 50 ml flüssiger Nährboden eingefüllt und nach der Sterilisation mit einer Sporensuspension von 10- bis 20tägigen Kulturen des Actinomyceten-Stammes 111 beimpft. Die Kultivierung wird auf einem Schüttelapparat bei 180 bis 200 U/min und einer Temperatur von 27 bis 32 °C im Verlauf von 36 bis 40 h durchgeführt. Das gewonnene vegetative Material wird in 250 ml-Erlenmeyer-Kolben, die mit 500 ml Nährboden gefüllt sind, übertragen. Die Kultivierung wird unter den oben genannten Bedingungen 6 Tage lang durchgeführt. Der Fermentationsprozeß wird nach Erreichen der maximalen antibiotischen Aktivität beendet, die nach der Agar-Diffusionsmethode mit den Test-Kulturen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* bestimmt wird. Zur Gewinnung des Feuchtmycels, das den Antibiotika-Komplex enthält, wird der pH-Wert der Kulturflüssigkeit mit anorganischer Säure auf pH 2,0 bis 3,0 eingestellt, wonach filtriert, zentrifugiert oder separiert wird. Das frische Mycel wird in Aceton suspendiert und die Suspension mit 1 n NaOH auf pH 8,5 bis 9,5 eingestellt. Die antibiotischen Substanzen, die in Form von Natriumsalzen vorliegen, werden aus dem Mycel dreimal mit Aceton extrahiert. Der vereinigte Extrakt wird im Vakuum bis zur völligen Beseitigung des Acetons konzentriert. Die resultierende wäßrige Phase wird mit Butanol oder Chloroform extrahiert. Der Butanol- bzw. Chloroformextrakt wird unter Vakuum zu einem gelb-braunen Sirup konzentriert. Aus diesem Extraktkonzentrat kann der Polyether-Antibiotika-Komplex A-111 durch Fällung mit Petrolether und gegebenenfalls durch Säulenchromatographie gewonnen werden. Zur Trennung der einzelnen Komponenten des Komplexes wird dem gelb-braunen Sirup eine bestimmte Menge Aceton zugesetzt, wodurch ein gelb-grüner Niederschlag gewonnen wird, der zwei von den antibiotischen Substanzen des Komplexes enthält, die Komponenten A-111-3 und A-111-4. Die Komponenten A-111-1 und A-111-2 verbleiben in der Acetonlösung. Der gelb-grüne Bodensatz wird anschließend dreimal mit

Kohlenwasserstoffen (Pentan, Hexan oder Petrolether) extrahiert, wobei die Komponenten A-111-3 und A-111-4 in Lösung gehen. Sowohl der Acetonextrakt, der die Komponenten A-111-1 und A-111-2 enthält, als auch der Kohlenwasserstoffextrakt, der die Komponenten A-111-3 und A-111-4 enthält, werden einer weiteren Reinigung und Trennung mit Hilfe der Säulenchromatographie unterzogen (s. Schema 1).

Der Komplex A-111 ist eine farblose Substanz, die in niederen Alkoholen und Ethern, in Chloroform, in niederen Kohlenwasserstoffen, in Dimethylformamid, in Acetonitril sowie in Cyclohexanol u. a. löslich ist. Der Komplex ist nicht löslich in Wasser, weder als freie Säure noch als Natriumsalz. Das UV-Spektrum zeigt nur Endabsorption. Die dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Komponenten des Komplexes A-111 durch verschiedene Lösungsmittelsysteme ist in Tabelle 1 und 2 wiedergegeben. Die Zusammenfassung dieser Daten gibt den Anlaß, den Komplex zur Untergruppe der monovalenten Polyether-Antibiotika, die mit Alkali-Ionen Komplexe bilden, zu rechnen. Die Molekulargewichte und die empirischen Formeln der einzelnen Komponenten, die den Polyether-Komplex bilden, wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie ermittelt.

Charakterisierung der Komponenten des Komplexes:

Komponente A-111-1

Äußere Form: farblose, amorphe Substanz

Löslichkeit: löslich in niederen Alkoholen, Dimethylformamid, Chloroform, Aceton, Ether, Pentan, Heptan;
nicht löslich in Wasser, weder in Form von Säure noch als Natriumsalz.

UV-Spektrum: nur End-Absorption

Elementare Zusammensetzung: Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Natrium; Halogen und Stickstoff sind nicht enthalten.

Das Molekulargewicht ist nach den Daten der Massenspektrometrie 746. Entsprechend der elementaren Zusammensetzung ergibt sich

aus dem hochaufgelösten Massenspektrum die empirische Formel $C_{40}H_{67}O_{11}Na$. Die Komponente A-111-1 unterscheidet sich von der Komponente A-111-2 nur nach ihrem R_f -Wert in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen (s. Tab. 1). Die Komponente A-111-1 besitzt eine höhere Polarität als die Komponente A-111-2. Die identischen Molekulargewichte, empirischen Formeln und Daten der Spektrometrie geben die Grundlage für die Annahme, daß die Komponente A-111-1 ein Isomeres der Komponente A-111-2 ist.

Komponente A-111-2

Äußere Form: farblose, amorphe Substanz

Löslichkeit: löslich in niederen Alkoholen, Aceton, Estern der Essigsäure, Chloroform, Ether u. a.; nicht löslich in Wasser, weder in Form von Säure noch als Natriumsalz.

UV-Spektrum: nur End-Absorption

Elementare Zusammensetzung: Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Natrium; Stickstoff, Schwefel und Halogene sind nicht enthalten.

Molekulargewicht: 746; empirische Formel $C_{40}H_{67}O_{11}Na$, entsprechend den Ergebnissen der hochauflösenden Massenspektrometrie. Dünnschichtchromatographie der Komponente A-111-2: s. Tab. 1.

Diese Daten sprechen für die Identität mit dem Polyether-Antibiotikum Nigericin. Aber beim Vergleich zwischen der Komponente A-111-2 und Standard-Nigericin zeigten sich bestimmte Unterschiede, die sich u. a. darin äußern, daß im Massenspektrum der Komponente A-111-2 das Fragment-Ion m/e 728 auftritt, das durch Abspaltung eines Wassermoleküls bedingt ist. Im Massenspektrum des oben genannten Standard-Nigericins tritt ein solcher Massenpeak nicht auf.

Komponente A-111-3

Äußere Form: farblose, amorphe Substanz

Löslichkeit: löslich in Chloroform, Aceton, Petrolether, Ether, Pentan, Hexan, niederen Alkoholen; nicht löslich

in Wasser, weder als freie Säure noch als Natriumsalz.

UV-Spektrum: End-Absorption

Elementare Zusammensetzung: Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Natrium; Stickstoff, Schwefel und Halogene fehlen.

Molekulargewicht: 788, empirische Formel $C_{42}H_{69}O_{12}Na$, entsprechend den Ergebnissen der hochauflösenden Massenspektrometrie. Die Untersuchung der Fragmentation im Massenspektrum weist auf ein Acetylderivat von Komponente A-111-2 hin.

Bisher ist kein Antibiotikum der Polyethergruppe mit diesem Molekulargewicht bekannt geworden. Das zeigt, daß die Komponente A-111-3 ein neues Antibiotikum ist. Damit wurde zum ersten Mal ein acetyliertes Polyether-Antibiotikum beobachtet, das von Mikroorganismen synthetisiert wird.

Komponente A-111-4

Äußere Form: farblose, amorphe Substanz

Löslichkeit: löslich in Chloroform, Aceton, Petrolether, Pentan, Hexan, niederen Alkoholen; nicht löslich in Wasser, weder als freie Säure noch als Natriumsalz.

UV-Spektrum: End-Absorption

Elementare Zusammensetzung: Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Natrium; Stickstoff, Schwefel und Halogene fehlen.

Molekulargewicht: 728; empirische Formel $C_{40}H_{65}O_{10}Na$, entsprechend den Daten der hochauflösenden Massenspektrometrie.

R_f -Werte in verschiedenen Lösungsmittelsystemen (s. Tab. 1).

Die Komponente A-111-4 ist ein Derivat der Komponente A-111-2, das sich aus dieser durch Abspaltung eines Wassermoleküls ableitet. Diese Verbindung kann aus der Komponente A-111-2 auch durch Erhitzen auf 200 °C unter Vakuum gewonnen werden, sie kann aber nicht aus Nigericin gewonnen werden. Die biologische

Aktivität der Komponente A-111-4 ist im Vergleich zu der der übrigen Komponenten des antibiotischen Polyether-Komplexes niedriger.

Ausführungsbeispiel

Die nachstehenden Ausführungsbeispiele sollen das Verfahren näher erläutern.

1. Der Actinomyceten-Stamm 111 wird auf Maisnährboden oder SRI-Nährboden mit Glucose 10 Tage lang bei einer Temperatur von 28 °C kultiviert. Mit der Sporensuspension werden 1000 ml-Erlenmeyer-Kolben beimpft, die 500 ml Nährboden folgender Zusammensetzung (g/l) enthalten: Sojamehl 10,0, Glucose 10,0, NaCl 5,0, CaCO₃ 1,0. Der pH-Wert nach der Sterilisation bei 115 °C liegt bei 6,8 bis 7,2. Die Kultivierung wird auf einem Schüttelapparat mit 200 U/min bei 28 °C im Verlauf von 6 bis 7 Tagen bis zur maximalen Ausbeute des Polyether-Komplexes durchgeführt. Die antibiotische Aktivität wird mit dem Test-Keim *Bacillus subtilis* L-2 bestimmt.
2. Der Stamm 111 wird in zwei Stadien kultiviert.
 1. Stadium: Mit einer Sporensuspension werden 2000 ml-Erlenmeyer-Kolben, die 500 ml Nährboden der im Beispiel 1 genannten Zusammensetzung enthalten, beimpft. Die Kultivierung unter Schütteln dauert 36 bis 48 h bei 28 °C.
 2. Stadium: Das gewonnene vegetative Mycel wird zum Beimpfen eines 10l-Fermentors verwendet, der 6 l Nährboden derselben Zusammensetzung enthält. Der Prozeß verläuft bei 28 °C, bei einer Rührgeschwindigkeit von 325 U/min und einer Belüftung von 1 l Luft/l Nährboden/min. Nach 6- bis 7tägiger Kultivierung wird die maximale Aktivität erreicht.
3. Die Kultivierung wird in der Art wie in Beispiel 2 in zwei Stadien durchgeführt. Im 1. Stadium wird der gleiche Nährboden zur Herstellung des Impfmateri als verwendet. Für das 2. Stadium wird ein Nährboden folgender Zusammensetzung

verwendet (in g/l): Glukose 20,0; Sojamehl 10,0; Maisextrakt 5,0; NaCl 5,0; CaCO₃ 3,0.

4. Wie in der Prinzipdarstellung bereits ausgeführt, wird nach Beendigung der Fermentation bei maximaler antibiotischer Aktivität der pH-Wert der Kulturflüssigkeit mit 1n HCl auf 2,0 bis 3,0 eingestellt, danach wird das Mycel abzentrifugiert. Das feuchte Mycel wird in Aceton suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wird auf 8,5 bis 9,5 mit 1n NaOH eingestellt, dann zentrifugiert. Das Mycel wird noch zweimal mit Aceton im Verhältnis 1:3 (v/v) extrahiert. Die vereinigten Acetonextrakte werden im Vakuum bis zum wäßrigen Rückstand konzentriert, der anschließend mit Butanol reextrahiert wird. Der Lösungsmittel-extrakt wird im Vakuum zu einem gelb-braunen Sirup konzentriert, der durch Zusatz der fünffachen Menge Aceton (v/v) in einen festen Niederschlag umgewandelt wird. Durch Zentrifugieren wird ein gelb-grünes Sediment gewonnen, welches die Komponenten A-111-3 und A-111-4 enthält. In der Acetonlösung verbleiben die Komponenten A-111-1 und A-111-2. Wenn die Fällung jedoch mit einem größeren Acetonvolumen erfolgt, gehen alle 4 Komponenten in Lösung und das Sediment ist inaktiv.
5. Das gelb-grüne Sediment, das nach Beispiel 4 gewonnen wurde, wird dreimal mit dem Kohlenwasserstoff Hexan behandelt. Der Kohlenwasserstoffextrakt wird filtriert, im Vakuum auf ein kleines Volumen konzentriert, dann der Säulenchromatographie mit einem Magnesiumtrisilicat (60 bis 100 mesh) als Adsorbens unterzogen, wobei Aceton-Heptan im Verhältnis 10:4 als bewegliche Phase Verwendung findet. Die aktiven Fraktionen der Säule werden vereinigt und mittels präparativer Dünnschichtchromatographie mit Ethylacetat als Laufmittel getrennt.
6. Den Acetonextrakt, der, wie in Beispiel 4 ausgeführt, durch Zentrifugieren von dem gelb-grünen Sediment abgetrennt wird, behandelt man mit Aktivkohle und konzentriert im Vakuum auf ein kleines Volumen. Das Konzentrat wird der Säulenchroma-

tographie an Kieselgel (Korngröße 0,063 bis 0,2 mm) unterworfen. Die Elution erfolgt stufenweise mit Chloroform-Methanol-Gemischen. Die aktiven Fraktionen aus der Säule werden vereinigt und an einer zweiten Säule mit Magnesiumtrisilicat als Adsorbens mit der beweglichen Phase Aceton-Heptan (10:4) chromatographiert. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum konzentriert, wobei die Komponenten A-111-1 und A-111-2 gewonnen werden.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines Polyether-Antibiotika-Komplexes auf mikrobiologischem Wege, gekennzeichnet dadurch, daß der Mikroorganismus Actinomyces hygrosopicus, Stamm 111, unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen sowie Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur zwischen 25 und 32 °C während eines Zeitraumes von 2 bis 7 Tagen kultiviert wird und der dabei gebildete Polyether-Antibiotika-Komplex A-111 aus dem feuchten Mycel extrahiert, nachfolgend mit bekannten Methoden konzentriert und ausgefällt sowie gegebenenfalls weiter durch fraktionierte Sedimentation mit Aceton und/oder anschließender Chromatographie in die Einzelkomponenten A-111-1, A-111-2, A-111-3 sowie A-111-4 getrennt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Feuchtmycel mit dem Komplex A-111 aus der Kulturlösung nach Ansäuern mit anorganischen Säuren auf pH 2,0 bis 3,0 in an sich bekannter Weise durch Zentrifugieren oder Separieren abgetrennt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß der Komplex A-111 aus dem Mycel nach Einstellen des pH-Wertes auf 8,5 bis 9,5 durch Zugabe von Alkalilaugen in Form des Alkalisalzes mit organischen Lösungsmitteln extrahiert wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß die fraktionierte Sedimentation durch Aceton-Zusatz in der Weise durchgeführt wird, daß im Sediment die Komponenten A-111-3 sowie A-111-4, in der Lösung hingegen die Komponenten A-111-1 sowie A-111-2 enthalten sind.

Schema 1

Schema zur Extraktion, Reinigung und Trennung eines Antibiotika-Komplexes aus Actinomyces 111

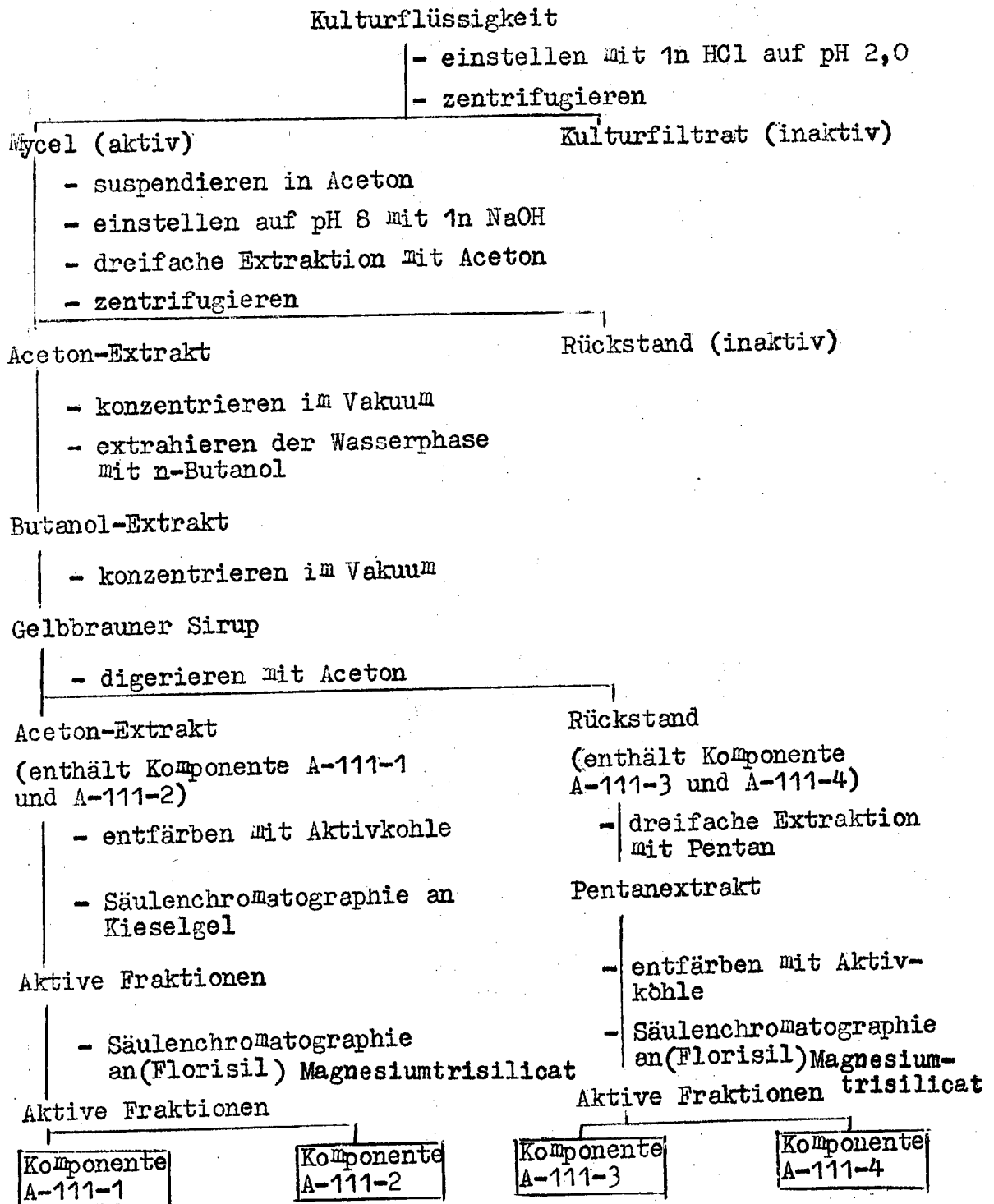


Tabelle 1

Lösungsmittelsystem	Rf-Wert der Komponente				
	A- 111-1	A- 111-2	A- 111-3	A- 111-4	Nigeri- cin
1. Benzen-Ethylacetat = 1:1	0,07	0,10	0,20	0,38	0,10
2. Chloroform-Ethylacetat = 2:3	0,08	0,34	0,48	0,55	0,34
3. Benzen-Aceton = 9:1	0	0	0	0	0
4. Benzen-Aceton = 1:1	0,43	0,64	0,82	0,86	0,64
5. Ethylacetat	0,23	0,42	0,52	0,59	0,42
6. Heptan-Ethylacetat = 4:10	0,18	0,33	0,56	0,57	0,33
7. Petrolether-Chloroform- Methanol = 10:10:2	0,43	0,60	0,72	0,85	0,60
8. Heptan-Chloroform- Methanol = 20:20:1	0,17	0,26	0,38	0,52	0,26

Die Farbreaktionen der 4 Komponenten auf Kieselgel sind in Tab. 2 angegeben.

Tabelle 2

Farbreaktionen auf Kieselgel

Reagenz	Farbe
1. Vanillin-Schwefelsäure	braune Flecken, weißer Untergrund
2. Anisaldehyd	rötlich braune Flecken, weißer Untergrund
3. p-Dimethylaminobenzaldehyd	gelbe Flecken, weißer Untergrund
4. Phosphorsäure	gelbe Flecken, weißer Untergrund
5. Antimontrichlorid	braungelbe Flecken, hellgelber Untergrund
6. 2,4-Dinitrophenylhydrazin	negativ
7. Ninhydrin	negativ
8. Ferrichlorid	negativ
9. Kaliumpermanganat	negativ
10. Dragendorff	negativ

Tabelle 3

Vergleichende Daten für die minimale Hemmkonzentration (MHK) des Polyether-Antibiotika-Komplexes A-111 mit Monensin und Salinomycin im Agar-Diffusionsplattentest

Testkultur	MHK ($\mu\text{g/ml}$)		
	A-111	Monensin	Salinomycin
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	1,0	15,0	12,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC	0,5	7,0	10,0
<i>Bacillus subtilis</i> L-2	0,5	2,0	7,0
<i>Bacillus mycoides</i> †)	1,0	17,0	10,0
<i>Sarcina citrina</i> †)	1,5	17,0	15,0
<i>Escherichia coli</i> BTCC 0111	100,0	100,0	100,0
<i>Candida albicans</i> 562	50,0	50,0	50,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> †)	50,0	50,0	50,0
<i>Penicillium chrysogenum</i> †)	50,0	50,0	50,0
<i>Alternaria tenuis</i> †)	50,0	50,0	50,0
<i>Botrytis cinerea</i> †)	50,0	50,0	50,0
<i>Fusarium lini</i> †)	50,0	50,0	50,0

†) Diese Stämme wurden aus der Bulgarian Type Culture Collection (BTCC) ohne Nummer entnommen