



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149964 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 3413/80

(51) Int.Cl.⁴: C 12 P 21/00

(22) Indleveringsdag: 08 aug 1980

C 07 G 11/00

(41) Alm. tilgængelig: 10 feb 1981

(44) Fremlagt: 03 nov 1986

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: 09 aug 1979 JP 54/101548 12 maj 1980 JP 55/63264

(71) Ansøger: *TOYO JOZO KABUSHIKI KAISHA; Shizuoka-ken, JP.

(72) Opfinder: Tadashi *Fujii; JP, Mitsuo *Hayashi; JP, Naoki *Muto; JP, Satoshi *Yaginuma; JP.

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Magnus Jensens Eftf.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af en blanding af
antibiotiske stoffer betegnet planothiociner

(57) Sammendrag:

3413-80

Hidtil ukendte antibiotica, planothiocin-A, -B, -C,
-D, -E, -F og -G fremstilles ved dyrkning af mikroorganismen
Actinomycetales hørende til slægten Actinoplanes og betegnet
Actinoplanes sp. A12526, deponeret under nr. FERM-P nr. 5063.

Planothiocinerne har følgende karakteristika:

	A	B	C	D	E	F	G
smpt. °C	266-69	259-62	247-51	254-58	245-47	258-60	262-64
C%	49,47	49,37	47,81	48,18	48,31	49,83	49,26
N%	13,25	13,30	13,62	13,26	13,41	14,70	13,70
H%	3,53	3,45	3,42	3,58	3,36	3,54	3,42
S%	13,73	14,19	13,85	15,61	13,92	15,29	15,96
molvægt	1438	1350	12-1500	12-1500	12-1500	12-1500	12-1500
farve	hvid kryst.	hvid kryst.	hvid kryst.	hvid kryst.	hvid kryst.	hvid kryst.	hvid kryst.
pH	svagt sur	svagt sur	svagt sur	svagt sur	svagt sur	svagt sur	svagt sur
amino- syre	threonin	threonin	threo- nin	threo- nin	threo- nin	threo- nin	threonin

DK 149964 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af en blanding af hidtil ukendte antibiotiske stoffer betegnet planothiociner eller en eller flere af de enkelte komponenter betegnet planothiocin -A, -B, -C, -D, -E, -F og -G, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved det i kravet anførte.

Fysisk-kemiske egenskaber af planothiocinerne fremgår af tabel 1 i det følgende. Biologiske egenskaber af planothiocinerne fremgår af tabel 2.

Som vist er planothiocinerne svovlholdige antibiotica. Blandt svovlholdige antibiotica kendes thioestrepton, thiopeptiner, sulfomyciner, siomyciner, A-59, peptiomyciner, thermothiocin, sporangiomyciner, althiomycin, A-7413, nosiheptid, L-13365, actinothiocin, A-10947 og 35665RP.

Nosiheptid har en aminosyresammensætning, som er identisk med den hos planothiocin-A. Der kendes ingen antibiotica med samme aminosyresammensætning som planothiocin-B. Nosiheptid har maksimumabsorptionstop ved 416 mμ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 124$) og 440 mμ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 104,8$), men planothiocin-A har ingen absorptionstoppe. Nosiheptid er bleggullige krystaller, medens planothiocin-A er farveløst eller danner hvide krystaller.

Planothiocin-C, -D og -E har samme aminosyresammensætning som nosiheptid og planothiocin-A. Planothiocin-F og -G har samme aminosyresammensætning som planothiocin-B.

Tabel 1.

	Planothiocin-A		Planothiocin-B	
	(1) smp.	266 ~ 269 °C (sønderdeling)	259 ~ 262 °C (sønderdeling)	
(2) elementæranalyse		C = 49,47% , H = 3,53% N = 13,25% , S = 13,73%	C = 49,37% , H = 3,45% N = 13,30% , S = 14,19%	
(3) molekylvægt		1438 (minimummolekylvægt ved amino- syreanalyse; ét molekyle threonin pr. molekyle af for- bindelsen)	1350 (minimummolekylvægt ved amino- syreanalyse; ét molekyle threo- nin pr. molekyle af forbindel- sen)	
(4) optisk rotation		(α) $\frac{23}{D} = + 19,6$ (C = 0,7, pyridin)	(α) $\frac{23}{D} = + 95,4$ (C = 0,5, pyridin)	
(5) ultraviolet ab- sorptions- spektrum		Fig. 1, i methanol, maximumabsorp- tiontop ved 217 m μ (629,5), 239 m μ (sk) (487,7), 260 m μ (sk) (347,4), 330 m μ (317,9)	Fig. 5 i methanol, maximumabsorption- top ved 218 m μ (540,4), 239 m μ (sk) (423,8), 260 m μ (sk) (294,5), 330 m μ (276,6)	
(sk) skulder () : E _{1cm} ^{1%}		Fig. 2 i surt methanol (1 dråbe O,1 N HCl), maximumabsorptiontop ved 219 m μ (sk) (644,9), 240 m μ (sk) (508,8), 259 m μ (sk) (371,9), 330 m μ (323,5)	Fig. 6 i surt methanol (1 dråbe O,1 N HCl), maximumabsorptiontop ved 219 m μ (566,0), 239 m μ (sk) (468,1), 259 m μ (sk) (335,3), 331 m μ (302,1).	
		Fig. 3 i alkalisk methanol (1 drå- be O,1 N NaOH), maximumabsorp- tiontop ved 234 m μ (sk) (589,5), 299 m μ (sk) (284,2), 328 m μ (sk) (231,6)	Fig. 7, i alkalisk methanol (1 dråbe O,1 N NaOH), maximumabsorptiontop ved 239 m μ (sk), (514,0), 297 m μ (263,8), 329 m μ (262,1).	

Tabel 1 (fortsat)

(6) infrarødt absorptions- spektrum (KBr tablet)	Fig. 4: 3380, 3110, 2980, 1730, 1650, 1520, 1480, 1410, 1380, 1330, 1300, 1230, 1160, 1150, 1100, 1060, 1020, 990, 930, 910, 830, 780, 750, 700 cm^{-1}	Fig. 8 3380, 3110, 2980, 1720, 1650, 1520, 1480, 1410, 1370, 1330, 1300, 1230, 1160, 1145, 1060, 1020, 990, 930, 910, 830, 780, 740, 700 cm^{-1}
(7) farvereaktion	positiv: affarvning af kalium- permanganat, iod negativ: ferrichlorid, ninhydrin Molisch	positiv: affarvning af kaliumperman- ganat, iod negativ: ferrichlorid, ninhydrin Molisch
(8) opløselighed	opløselig: CHCl_3 - methanol, py- din, DMSO, iseddike uopløselig: benzen, acetone, petroleumsether, hexan	opløselig: CHCl_3 - methanol, pyri- din, DMSO, iseddike uopløselig: benzen, acetone, petro- leumsether, hexan
(9) karakter	svagt sur	svagt sur
(10) farve	hvide krystaller (nålekry- staller)	hvide krystaller (nålekrystaller)
(11) aminosyreanalyse (bestemt ved aminosyre- autoanalysator, ninhydrin- positive fraktioner af 6 N HCl, ved 105°C, til 20 timer hydrolysat)	threonin og 2 komponenter af "ninhydrinpositiv"	threonin og 1 komponent af "ninhydrin- positiv"

Tabel 1 (fortsat)

(11) Rf-værdi (silicagel-f, produkt fra Tokyo Kasei Co.)

CHCl₃ : methanol : eddikesyre
(10 : 1 : 0,1)

CHCl₃ : methanol (3 : 1)

ethylacetat : methanol : vand
(10 : 2 : 11)

acetonitril : vand (10 : 2)

butanol : eddikesyre : vand
(3 : 1 : 1)

(12) stabilitet

Rf = 0,26

Rf = 0,20

Rf = 0,15

Rf = 0,43

Rf = 0,80

stabil ved sure og neutrale betingelser

ustabil ved alkaliske betingelser

Rf = 0,42

Rf = 0,27

Rf = 0,15

Rf = 0,55

Rf = 0,83

stabil ved sure og neutrale betingelser

ustabil ved alkaliske betingelser

Tabel 1 (fortsat)

	Planothiocien-C	Planothiocien-D	Planothiocien-E	Planithiocien-F	Planothiocien-G
(1) smp.	247~251°C (sønderdeling)	254~258°C (sønderdeling)	245~247°C (sønderdeling)	258~260°C (sønderdeling)	262~264°C (sønderdeling)
(2) elementæranalyse	C: 47,81% H: 3,42% N: 13,62% S: 13,85%	48,18% 3,58% 13,26% 15,61%	48,31% 3,36% 13,41% 13,92%	49,83% 3,54% 14,70% 15,29%	49,26% 3,42% 13,70% 15,96%
(3) molekylvægt (aminosyreanalyse)	1200 ~ 1500	1200 ~ 1500	1200 ~ 1500	1200 ~ 1500	1200 ~ 1500
(4) optisk rotation (α) _D ²³ (pyridin)	+28,4 (C=0,9)	+31,4 (C=0,7)	+45,5 (C=0,7)	+107,8 (C=0,8)	+122,4 (C=0,4)
(5) ultraviolet absorptionspektrum	Fig. 9, maximumabsorption ved 218 mμ (721) 240 mμ (sk) (499), 260 mμ (sk) (322), 330 mμ (327), (i alkalisk methanol: én dråbe 0,1 N NaOH i methanol)	Fig. 13, i methanol, maximumabsorption ved 217 mμ (764), 240 mμ (sk) (502), 260 mμ (sk) (276), 330 mμ (343)	Fig. 17, i methanol, maximumabsorption ved 217 mμ (756), 240 mμ (sk) (534), 260 mμ (sk) (308), 329 mμ (309)	Fig. 21, i methanol, maximumabsorption ved 217 mμ (744), 240 mμ (sk) (515), 260 mμ (sk) (333), 330 mμ (333)	Fig. 25, i methanol, maximumabsorption ved 217 mμ (770), 240 mμ (sk) (522), 330 mμ (350)
surt methanol: én dråbe 0,1 N HCl i methanol	Fig. 11, i alkalisk methanol, maximumabsorption ved 233 mμ (sk) (611), 299 mμ (271), 329 mμ (241)	Fig. 15, i alkalisk methanol, maximumabsorption ved 232 mμ (sk) (676), 300 mμ (282), 329 mμ (248)	Fig. 19, i alkalisk methanol, maximumabsorption ved 233 mμ (sk) (662), 299 mμ (272), 329 mμ (207)	Fig. 23, i alkalisk methanol, maximumabsorption ved 240 mμ (519), 299 mμ (247), 329 mμ (284)	Fig. 27, i alkalisk methanol, maximumabsorption ved 240 mμ (519), 299 mμ (247), 329 mμ (284)
	Fig. 10, i surt methanol, det samme som i methanol	Fig. 14, i surt methanol, det samme som i methanol	Fig. 18, i surt methanol, det samme som i methanol	Fig. 22, i surt methanol, det samme som i methanol	Fig. 26, i surt methanol, det samme som i methanol

Tabel 1 (fortsat)

	Fig. 12	Fig. 16	Fig. 20	Fig. 24	Fig. 28
(6) infrarødt absorptionspektrum (KBr tablet)	3360, 3100, 1730, 1650, 1520, 1470, 1410, 1375, 1330, 1300, 1230, 1160, 1140, 1100, 1050, 1010, 980, 930, 910, 830, 780, 740 cm^{-1}	3380, 3100, 1730, 1650, 1570, 1530, 1480, 1420, 1380, 1340, 1300, 1240, 1160, 1140, 1100, 1060, 1020, 990, 940, 910, 840, 780, 750 cm^{-1}	3380, 3100, 1730, 1650, 1520, 1470, 1410, 1360, 1330, 1300, 1230, 1160, 1140, 1090, 1010, 980, 960, 940, 910, 830, 780, 750 cm^{-1}	3380, 3100, 1720, 1650, 1520, 1470, 1410, 1370, 1330, 1300, 1230, 1160, 1140, 1060, 1020, 980, 960, 930, 900, 830, 780, 750 cm^{-1}	3380, 3100, 1710, 1650, 1570, 1520, 1470, 1410, 1360, 1330, 1230, 1150, 1140, 1060, 1010, 980, 940, 910, 820, 780, 740, cm^{-1}
(7) farverektion	positiv: af-farvning af kaliumpermanganat negativ: ferri-chlorid, ninhydrin, Molisch opløselig: CHCl_3 , pyridin, DMF, DMSO	ditto	ditto	ditto	ditto
(8) opløselighed	uopløselig: benzen, acetone, petroleumsether, vand	ditto	ditto	ditto	ditto
(9) karakter	svagt sur	ditto	ditto	ditto	ditto
(10) farve	hvid	ditto	ditto	ditto	ditto
(11) aminosyreanalyse (bestemt ved aminonysyreautoanalyse-tor, ninhydrin-positive fraktioner af 6 N HCl, ved 105°C, til 20 timers hydrolysat)	threonin og to komponenter af "ninhhydrinpositiv" nenter	threonin og "ninhhydrinpositiv" to komponenter	threonin og "ninhhydrinpositiv" to komponenter	threonin og "ninhhydrinpositiv" én komponent	threonin og "ninhhydrinpositiv" én komponent

Tabel 2 (fortsat)

Minimal inhiberende koncentration	plano- thiocin -A	plano- thiocin -B	plano- thiocin -C	plano- thiocin -D	plano- thiocin -E	plano- thiocin -F	plano- thiocin -G
M I C (γ / ml)							
Staphylococcus aureus ATCC 6538p	0,008	0,016	0,008	0,004	0,016	0,031	0,016
Staphylococcus aureus MS353	0,016	0,031	0,008	0,004	0,016	0,031	0,016
Staphylococcus aureus MS353 C36	0,016	0,031	0,008	0,004	0,016	0,031	0,016
Staphylococcus aureus MS 353 A0	0,008	0,031	0,008	0,004	0,016	0,031	0,016
Staphylococcus aureus 0116	0,008	0,031	0,008	0,008	0,016	0,031	0,016
Staphylococcus aureus 0119	0,008	0,016	0,008	0,004	0,016	0,031	0,016
Staphylococcus aureus 0126	0,016	0,031	0,008	0,004	0,016	0,031	0,016
Staphylococcus aureus 0127	0,016	0,031	0,008	0,008	0,016	0,031	0,016
Staphylococcus epidermidis sp-al-1	0,031	0,063	0,016	0,016	0,063	0,125	0,016
Streptococcus pyogenes N.Y.5	< 0,002	0,004	< 0,002	< 0,002	0,004	< 0,002	< 0,002 ∞
Streptococcus pyogenes 1022	0,004	0,008	0,004	0,004	0,008	0,004	0,004
Streptococcus faecalis 1501	0,25	> 1	0,5	1	> 1	> 1	> 1
Streptococcus agalactiae 1020	0,063	1	0,25	1	1	> 1	0,5
Sarcina lutea ATCC 9341	0,004	0,008	< 0,002	< 0,002	0,008	0,008	0,002
Micrococcus flavus ATCC 10240	0,004	0,008	< 0,002	< 0,002	0,008	0,008	0,002
Corynebacterium diphtheriae P.W.8	0,004	< 0,002	< 0,002	< 0,002	0,004	0,004	0,002
Bacillus subtilis ATCC 6633	0,031	0,063	0,031	0,016	0,031	> 1	0,063
Escherichia coli NIHJ-JC2	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
Escherichia coli B	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
Salmonella typhosa H901	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1

Når man sammenligner nosiheptid med planothiocin-C, -D og -E, har nosiheptid de ovenfor anførte egenskaber, medens planothiocin-C, -D og -E ikke har nogen absorptionstoppe i det synlige område og er hvide krystaller. 35665RP-stoffet er et derivat af nosipeptid og har absorptionstop ved 405 mμ ($E^{1\%}_{1\text{cm}} = 107$).

Rf-værdierne ved tyndtlagschromatografi på silicagel er for planothiocin-C, -D, -E, -F og -G anført ovenfor og er forskellige fra værdierne for nosiheptid, planothiocin-A og B, som er som følger:

Nosiheptid: (1)* Rf = 0,35, (2)**Rf = 0,27, (3)***
Rf = 0,29, (4)****Rf = 0,62

Planothiocin-A: (1)* Rf = 0,25, (2)**Rf = 0,13
(3)***Rf = 0,19, (4)**** Rf = 0,05

Planothiocin-B: (1)* Rf = 0,43, (2)** Rf = 0,22
(3)*** Rf = 0,18, (4)**** Rf = 0,05,

Opløsningsmiddelsystemer:

* CHCl₃: methanol: eddikesyre =
20:1:0,1

**ethylacetat: methanol: eddikesyre
= 10:1:0,2

***acetonitril: vand = 10:1

**** CHCl₃: methanol = 10:1

Andre fysisk-kemiske egenskaber såsom optisk rotation er forskellige fra dem af kendte svovlholdige antibiotica.

Den planothiocindannende mikroorganisme er isoleret fra en jordprøve fra en paprikamark i Mihama-cho, Mikatagun, Fukui-ken, Japan, og den henføres til slægten Actinoplanes og betegnes Actinoplanes sp. Al2526. Den nævnte stamme er deponeret i Institute for Microbiological Industry and Technology, M.I.T.I., Japan under nr. FERM-P nr. 5063.

De taksonomiske egenskaber af denne stamme er som følger:

(I) Morphologiske egenskaber:

Observationer på agarmedium af stivelse og uorganiske salte dyrket ved 30°C i 10-14 dage er som følger:

Substratmyceliet er bølgende og forgrenet, 0,8-1,0 μ i diameter uden dannelse af lufthyfer.

Sporangier dannes på den korte sporangiofor, som dukker op af substratmyceliet. Formerne af sporangier er kugleformet eller elliptisk, 5-10 x 5-15 μ i størrelse og indeholdende mange sporangiosporer. Sporangiosporer er mest kugleformede eller subkugleformede, 1-1,5 μ i diameter og bevægelige ved polytrikøse flagella.

(II) Sammensætning af diaminopimelinsyre:

Diaminopimelinsyre detekteret ved helcelleanalyse er af mesotypen for størstepartens vedkommende og af hydroxytypen for den mindre parts vedkommende.

(III) Dyrkningsegenskaber i forskellige medier:

Observationerne resulterer i dyrkningskarakteristikker i forskellige medier ved 30°C i 14 dage som vist i tabel 3. Der iagttages en smule dannelse af umødent luftmycelium på mange medier.

Angivelsen af farver er baseret på "Color Harmony Manual", 4. udgave, 1958 fra Container Corporation of America.

Tabel 3.

Dyrkningssegenskaber på forskellige medier.

Medium	Vækst	Sporangium	Farve af substrat- mycelium	opløseligt pigment
Saccharose-nitrat agar	god	dårlig	lys melongul (3ea)	intet
Glucose-asparagin agar	dårlig	få	lys hvæde (2ea)	intet
Glycerol-asparagin agar	få	få	farveløs	intet
Uorganiske salt- stivelse -agar	god	middel	rav (3le) - lyst rav (3ic)	intet
Tyrosinagar	dårlig til få	få	farveløs - lyst el- fenben (2ca)	intet
Havremelagar	god	dårlig	rav (3nc - 3lc)	intet
gær-malt-agar	god	dårlig	topas (3ne) - kanel (3le)	intet
Bennet's agar	god	få	topas (3ne)	intet
Emerson's agar	god	dårlig	rav (3pc - 3nc)	intet
Næringsagar	dårlig	ingen	farveløs	intet
Hickey og Tresner's agar	middel	middel til dårlig	korkbrun (4ie)	korkbrun (4ie)
Pepton-Czapeck's agar	god	middel	rødbrun-orange (4nc)	intet

(IV) Fysiologiske egenskaber:

Fysiologiske egenskaber illustreres som følger:

1) Udnyttelse af carbonkilde.

<u>Carbonkilde</u>	<u>udnyttelse</u>	<u>Carbonkilde</u>	<u>udnyttelse</u>
<u>L</u> -arabinose	+	salicin	+
<u>D</u> -xylose	+	<u>D</u> -galactose	+
<u>D</u> -glucose	+	glycerol	+
<u>D</u> -fructose	+	<u>L</u> -sorbose	-
<u>D</u> -mannose	+	trehalose	+
<u>D</u> -mannitol	+	α -melibiose	+
inositol	+	<u>D</u> -ribose	+
<u>L</u> -rhamnose	+	maltose	+
sucrose	+	melezitose	<u>+</u>
β -lactose	+	<u>D</u> -cellobiose	+
raffinose	-	<u>D</u> -sorbitol	-
cellulose	-	dulcitol	-
stivelse	+		

(+ = positiv - = negativ)

+ = svagt positiv

- 2) Væksttemperatur: 7-40°C.
- 3) Peptonisering og koagulation af skummet mælk: positiv.
- 4) Melanindannelse: Tyrosin-agar-medium: negativ.
Pepton-gær-jern-agarmedium: positiv.
- 5) Stivelsehydrolyse: Positiv.
- 6) Cellulosesønderdeling: negativ.
- 7) Caseinhydrolyse: positiv.
- 8) Tyrosinsønderdeling: positiv.
- 9) Flydendegørelse af gelatine: positiv.
- 10) Xanthinsønderdeling: negativ.
- 11) Hypoxanthinsønderdeling: negativ.
- 12) Hydrogensulfiddannelse: positiv.
- 13) nitratreduktion: positiv.

Ifølge ovenstående taksonomiske data, hvor stammen Al2526 har sporangiebærende sporangioforer båret på forgrenende substratmycelium, sfærisk eller elliptisk sporangium, sfæriske eller subsfæriske sporangiosporer med bevægelige polare flagella og meso-diaminopimelinsyre, tilhører denne stamme slægten *Actinoplanes*.

Planothiociner fremstilles ved aerob dyrkning af nævnte planothiocindannende stammer tilhørende slægten *Actinoplanes* i et gængs antibioticumproduktionsmedium. Faste eller flydende medier kan benyttes, og til fremstilling i industriel målestok foretrækkes submers luftningskultur.

Gængse næringsmedier til mikroorganismer indeholdende assimilerbare carbonkilder såsom glucose, saccharose, lactose, maltose, stivelse, melasse eller glycerol og assimilerbare nitrogenkilder såsom majsstøbevæske, sojabønnepulver, bomuldsfrøpulver, hvedegluten, pepton, kødekstrakt, gær-ekstrakt, tørgær, caseinhydrolysat, ammoniumsalt eller nitrat kan benyttes. Phosphat, carbonat, sulfat og salte af

magnesium, calcium, kalium, natrium, cobalt, jern eller mangan kan tilsættes mediet efter behov.

Dyrkningstemperaturen afhænger af væksten af mikroorganismen og produktionen af planothiociner. Fortrinsvis ligger temperaturen på 25-30°C.

Dyrkningstiden afhænger af betingelserne og er normalt 2-4 dage. Dyrkningen afsluttes, når den maksimale styrke af planothiociner i mediet er nået.

Planothiociner produceres i hovedsagen i myceliet og delvis i kulturfiltratet.

En teknik til isolering og rensning af planothiocin-A, -B, -C, -D, -E, -F -G-komponenter er som følger:

Dyrket vådt mycelium og filtrat fås ved filtrering eller centrifugering af dyrkningsvæsken af ovennævnte planothiocinproducerende stamme.

Dyrkningsfiltratet indeholder små mængder af planothiociner, og fortrinsvis kan antibiotica isoleres fra dyrkede mycelier. Planothiociner kan ekstraheres fra vådt mycelium ved tilsætning af acetone. Acetoneekstrakten inddampes i vakuum og genekstraheres ved tilsætning af ethylacetat. Ethylacetatekstrakten inddampes i vakuum til opnåelse af en brunlig olieagtig sirup. Der fås en brunlig udfældning ved tilsætning af hexan. Udfældningen opløses i en blanding af chloroform og methanol og inddampes i vakuum til opnåelse af en blegbrunlig udfældning efter fjernelse af chloroform. Denne operation gentages til opnåelse af en gråligvid udfældning, som er rå planothiociner indeholdende planothiocin-A, -B, -C, -D, -E, -F og -G.

Råproduktet opløses i en blanding af chloroform og methanol (3:1) og tørres ved tilsætning af silicagelpulver. Denne blanding benyttes til silicagelsøjlechromatografi med chloroform : methanol : eddikesyre (20 : 1 : 0,1) som elueringsmiddel.

Der kan fås en gruppe af aktive fraktioner, som i hovedsagen indeholder planothiocin-F og -G, planothiocin-D og -E, planothiocin-B og -C samt planothiocin-A.

En aktiv fraktion indeholdende planothiocin-F og -G inddampes i vakuum til opnåelse af et hvidt pulver, som renses ved chromatografi på silicagelsøjle under eluering med en blanding af chloroform og methanol (25 : 1).

En aktiv fraktion indeholdende planothiocin-E og -D kan renses ved indampning og chromatografi på silicagelsøjle under eluering med en blanding af ethylacetat : methanol : eddikesyre (20 : 1 : 0,2).

Ligeledes kan en aktiv fraktion indeholdende planothiocin-B og -C renses ved ovennævnte fremgangsmåde.

Hvide krystaller af planothiocin-A kan fås ved opløsning af koncentratet af aktiv fraktion indeholdende planothiocin-A i en blanding af chloroform : methanol (2 : 1) og fjernelse af chloroformet til krystallisation.

De således opnåede planothiociner kan benyttes til terapeutiske eller profylaktiske antibakterielle præparater eller fodertilsætningsstoffer til kvæg, fjerkræ eller fisk.

Fodertilsætningsstoffer til fremme af væksten f.eks. af grise indeholder fortrinsvis 1-20 dele pr. million planothiociner. Den vækstfremmende virkning på fjerkræ kan opnås ved tilsætning af 1-10 dele pr. million af fodertilsætningsstofferne. Til fisk tilsættes 0,1 - 100 dele pr. million i foderet.

I handelen gående foderstoffer kan benyttes til tilsætning af planothiociner. Til antibakteriel terapeutisk eller profylaktisk brug kan der benyttes 1-500 dele pr. million. Foder indeholdende planothiociner kan oparbejdes til foretrukne typer såsom blandinger, pasta, tabletter, granulat eller sirup.

Antibakteriel terapeutisk eller profylaktisk virkning og vækstfremmende virkning opnås ved fodring af besætning, fjerkræ eller fisk med præparaterne. I det sidste tilfælde iagttages en forøget gydning.

Planothiocinerne forbliver ikke i organerne og vævene på kvæg, fjerkræ og fisk. Der iagttages ingen akutte forgiftningssymptomer eller nogen teratogen virkning.

Nedenstående eksempler illustrerer opfindelsen. Procentangivelser gælder vægt/rumfang, med mindre andet angives.

Eksempel 1.

Et medium (pH 6,5, 100 ml) indeholdende glucose 2%, opløselig stivelse 2%, caseinhydrolysat 1%, gærekstrakt 1% og calciumcarbonat 0,2% i en 500 ml erlenmeyerkolbe steriliseres ved 120°C i 20 minutter. En podenålfuld af *Actinoplanes* sp. Al2526 i agarskråkulturmedium podes i dette steriliserede medium og rystedyrkes ved 250 omdrejninger pr. minut ved 30°C i 4 dage. Samme kulturmedium fremstilles og dyrkes under de samme betingelser. Denne podekultur (200 ml i kombination) podes i et sterilt medium af samme sammensætning (20 liter) i en 30 liter fermenteringsbeholder og dyrkes ved 30°C i 2 dage ved 300 omdrejninger pr. minut med en luftning på 20 liter pr. minut. Samme kulturmedium (10 liter) podes i et steriliseret medium indeholdende saccharose 3%, sojabønnepulver 2%, CaCO_3 0,3%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,001% og $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001% (pH ca. 6,5 200 liter) i 250 liter beholder og dyrkes ved 30°C i 3 dage ved 200 omdrejninger pr. minut, luftningshastighed 200 liter pr. minut.

Det således opnåede dyrkede medium filtreres efter tilsætning af filterhjälpemiddel (5 kg) til adskillelse af vådt mycelium og filtrat. Der findes antibiotika både i mycelium og filtrat, især mycelium.

Acetone (80 liter) sættes til det våde mycelium, og man omrører kraftigt i 3 timer og filtrerer. Acetoneekstrakten indampes i vakuum til 20 liter. Der tilsættes ethylacetat (20 liter), og man indstiller det vandige lag til pH 3,0. Efter kraftig omrøring fraskilles ethylacetatlaget. Ethylacetat (10 liter) sættes yderligere til det resterende vandige lag, og man omrører kraftigt og fraskiller ethylacetatlaget. Ethylacetatlagene slås sammen. Den samlede organiske fase (30 liter) indampes i vakuum til opnåelse af en brunlig olieagtig sirup. Hexan (2 liter) sættes til denne sirup til fældning af det brunlige stof, som samles ved centrifugering. Udfældningen opløses i en blanding (500 ml) af chloroform og methanol (5 : 2) og indampes til udfældning af en blegbrun substans, som samles ved centrifugering. Udfældningen opløses igen i en blanding af chloroform og methanol (5 : 2) og indampes i vakuum til udfældning af en grå sub-

stans.

Efter filtrering tørres denne substans i vakuum til opnåelse af en blanding af planothiocin-A, -B, -C, -D, -E, -F og -G.
Eksempel 2.

Et råt pulver (15 g) fra eksempel 1 opløses i en blanding (2 liter) af chloroform og methanol (3 : 1). Silicagelpulver (300 g) sættes til opløsningen og tørres i vakuum til opnåelse af silicagelblandingen. Denne silicagelblanding anbringes øverst i en silicagelsøjle (1500 ml) pakket med en blandet opløsning af chloroform : methanol : eddikesyre (20 : 1 : 0,1). Eluering udføres med samme opløsningsmiddelblanding.

Aktive fraktioner indeholdende planothiocinforbindelser elueres som følger:

Fraktion nr. 11-13: planothiocin-F og -G.

Fraktion nr. 14-16: planothiocin-D og -E.

Fraktion nr. 17-24: planothiocin-B og -C.

Fraktion nr. 46-60: planothiocin-A.

Aktive fraktioner nr. 46-60 samles og inddampes i vakuum til udfældning af planothiocin-A. Udfældningerne samles ved centrifugering, opløses i en blanding af chloroform : methanol (2 : 1) og henstår ved stuetemperatur til fjernelse af chloroform og til opnåelse af renset planothiocin-A som hvide krystaller (6,9 g).

Aktive fraktioner nr. 11-13 indeholdende planothiocin-F og -G samles og inddampes i vakuum til opnåelse af et hvidt pulver (80mg). Pulveret opløses i et blandet opløsningsmiddel af chloroform og methanol (25 : 1) og anbringes på en silicagelsøjle (150 ml) pakket med samme opløsningsmiddelblanding og elueres med samme opløsningsmiddel. Eluatet fraktioneres for hver 7 g fraktioner. Planothiocin-G findes i de aktive fraktioner nr. 23-27. Planothiocin-F findes i de aktive fraktioner nr. 30-37. De aktive fraktioner samles og inddampes i vakuum til opnåelse af fine hvide nålekrystaller. Filtrererede krystaller opløses i chloroform og henstår ved stuetemperatur til udkrystallisation af fine hvide

krystaller af planothiocin-G og -F. Hver krystallisation filtreres og tørres til opnåelse af renset planothiocin-G (6 mg) og planothiocin-F (22 mg).

Aktive fraktioner nr. 14-16 indeholdende planothiocin-D og -E samles, inddampes i vakuum og anbringes på en søjle af silicagel (150 ml), som i forvejen er pakket med ethylacetat : methanol : eddikesyre (20 : 1 : 0,2). Eluering foretages med samme opløsningsmiddelblanding (11 g/l fraktion). Fraktionerne nr. 23-29 samles som en aktiv fraktion indeholdende planothiocin-E. Planothiocin-D findes i fraktionerne nr. 35-49. Hver aktiv fraktion inddampes i vakuum, og der tilsættes hexan til fældning af planothiocin-E og -D. Hver udfældning opløses i en blanding af chloroform : methanol (5 : 3), og chloroformet fjernes ved indampning til udfældning af planothiocin-E og -D som fine hvide nåleformede krystaller. Krystallerne frafiltreres og tørres og giver rent planothiocin-E (83 mg) og planothiocin-D (74 mg).

De aktive fraktioner nr. 17-24 indeholdende planothiocin-B og -C samles, inddampes i vakuum og anbringes på en søjle af silicagel (200 ml), som i forvejen er pakket med ethylacetat : methanol : eddikesyre (20 : 1 : 0,2). Elueringen foretages med samme opløsningsmiddelblanding (15 g pr. fraktion). Planothiocin-C findes i fraktionerne nr. 30-47, og planothiocin-B findes i fraktionerne nr. 70-88. Hver af de aktive fraktioner inddampes i vakuum, og man tilsætter hexan til fældning af planothiocin-C og -B. Hver udfældning opløses i en blanding af chloroform : methanol (5:3) og inddampes til fjernelse af chloroform og til udfældning af hvidt krystallinsk planothiocin-C og -B. Krystallerne filtreres fra og tørres, og man får renset planothiocin-C (137 mg) og planothiocin-B (160 mg) som fine hvide nåleformede krystaller.

Eksempel 3.

Et medium (pH 7,0 100 ml) indeholdende dextrin 1%, glyucose 2%, opløselig stivelse 2%, caseinhydrolysat 1%, gær-ekstrakt 1% og CaCO_3 0,2% i en 500 ml erlenmeyerkolbe steriliseres ved 120°C i 20 minutter. En podenålfuld af Actinopla-

nes sp. Al2526 i agarskråflademedium podes i dette steriliserede medium og dyrkes under omrystning ved 250 omdrejninger pr. minut ved 30°C i fire dage. Denne podekultur (200 ml) podes i et sterilt medium indeholdende saccharose 3%, sojabønnepulver 2%, CaCO_3 0,3%, CoCl_2 , 6 H_2O 0,001% og MgSO_4 , 7 H_2O 0,001% (20 liter) i en 30 liter forgæringsbeholder og dyrkes ved 30°C i 4 dage ved 200 omdrejninger pr. minut og med 20 liter/minut gennemluftning.

Den således opnåede dyrkningsvæske centrifugeres til adskillelse mellem mycelium og supernatant. Man sætter acetone (10 liter) til det våde mycelium, og man omrører i 3 timer og filtrerer. Acetoneekstrakten inddampes til 2 liter og indstilles til en pH-værdi på 6,5, og man tilsætter ethylacetat (2 liter) og omrører kraftigt. Ethylacetatlaget inddampes til opnåelse af en brunlig olieagtig sirup. Man sætter hexan (200 ml) til siruppen. Den udfældede brunlige substans centrifugeres og opløses i en blanding af chloroform : methanol (5 : 1) (200 ml). Opløsningen inddampes til afdestillation af chloroformet. Den gråhvide udfældning samles ved centrifugering og tørres, hvorved man får en blanding (240 mg, renhed 60%) indeholdende planothiocin-A og -B.

Blandingen (170 mg) opløses i chloroform : methanol : eddikesyre (13 : 1 : 0,1) og hældes på en søjle af silicagel (120 ml), som i forvejen er pakket med samme opløsningsmiddelblanding. Eluering foretages med samme opløsningsmiddelblanding for hver 18 g pr. fraktion. De aktive fraktioner indeholdende planothiocin-B findes i fraktionerne nr. 9-15. Planothiocin-A findes i de aktive fraktioner ved fraktionerne nr. 16-46. Hver fraktion samles, inddampes til udfældning af hvide krystaller, som samles ved centrifugering, og krystallerne opløses i en blanding af chloroform : methanol (2 : 1) (20 ml) og henstår ved stuetemperatur til fjernelse af chloroformet, hvorved planothiocin-A og -B omkrystalliseres som hvide nåleformede krystaller.

De således dannede krystaller samles ved filtrering og tørres til opnåelse af planothiocin-A (59mg) og planothiocin-B (23 mg).

Hvide nåleformede krystaller af planothiocin-A (50 mg) opnået ved ovenstående proces opløses i en blandet opløsning (10 ml) af eddikesyre : chloroform : methanol (3 : 1 : 1).

De således udfældede farveløse prismekrystaller samles ved filtrering og tørres til opnåelse af planothiocin-A som farveløse prismeformede krystaller (29 mg).

Referenceeksempel 1.

Blandingen af planothiocin-A og planothiocin-B (planothiocin-A : planothiocin-B = 93 : 7) blandes med foder (kunstig mælk til smågrise) omfattende råprotein 22,44%, råfedt 5,14%, rå cellulose 0,74%, rå aske 6,16%, calcium 1,25% og phosphor 0,95%; DCP (Digestive Crude Protein) 21,38%, TDN (Total Digestible Nutrient) 87,41% (alle procentsatser undtagen for DCP og TDN er angivet ved vægt/vægt).

To grupper af smågrise med 10 grise i hver gruppe og 25 dage gamle fodres i 4 uger, idet den ene gruppe modtager kontrolfoder uden tilsætning af antibioticum, 0,5 ppm tilsat foder (foder indeholdende 0,5 ppm antibiotica) og 5 ppm tilsat foder, og i den anden gruppe med kontrolfoder (intet antibioticumfoder), 10 ppm tilsat foder (foder indeholdende 10 ppm antibiotica) og 20 ppm tilsat foder.

Resultaterne af middellegemsvægt, forøget middellegemsvægt og forholdet for den forøgede legemsvægt fremgår af tabel 4. Som vist i tabellen iagttages der en god vækstfremmende virkning.

Tabel 4.

gruppe 1	<u>legemsvægt</u>	<u>kontrol</u>	<u>0,5 ppm tilsat</u>	<u>5 ppm tilsat</u>
	begyndelses- vægt ¹⁾	5,5 ± 1,08	5,6 ± 1,26	5,4 ± 1,39
	slutvægt ¹⁾	15,1 ± 2,76	16,2 ± 2,32	16,6 ± 2,15
	vægtforøgelse ²⁾	9,5 ± 1,97	10,6 ± 1,32	[*] 11,2 ± 1,21
	forøgelses- forhold	100	110	118
gruppe 2	<u>legemsvægt</u>	<u>Kontrol</u>	<u>10 ppm tilsat</u>	<u>20 ppm tilsat</u>
	begyndelses- vægt ¹⁾	5,8 ± 1,07	5,8 ± 0,87	5,7 ± 1,15
	slutvægt ¹⁾	15,4 ± 2,14	17,2 ± 1,95	16,8 ± 2,33
	vægtforøgelse ²⁾	9,7 ± 1,33	^{**} 11,5 ± 1,27	^{**} 11,1 ± 1,27
	forøgelsesforhold	100	119	114

- 1) Gennemsnitlig legemsvægt $\pm$ standardafvigelse (kg)
 - 2) Gennemsnitlig legemsvægtforøgelse $\pm$ standardforøgelse (kg).
- ## Significant forskel med 1% risiko.
 * Significant forskel med 5% risiko.

Referenceeksempel 2.

Blandingen af planothiocin-A og -B (forhold = 93 : 7) blandes med fjerkræfoder omfattende rå protein 20,0%, rå fedt 3,4%, råcellulose 3,4%, rå aske 5,5%, calcium 1,03%, phosphor 0,83% og uorganisk phosphat 0,43%; TDN 73,3% og totalenergi 34 Cal/1000 g.

To grupper kyllinger, hver hangruppe og hungrube, 25 kyllinger i en gruppe, fodres i 4 uger med kontrolfoderet (ingen tilsætning af antibiotica), 0,5 ppm tilsat foder (foder indeholdende 0,5 ppm antibiotica), 5 ppm tilsat foder, 10 ppm tilsat foder og 20 ppm tilsat foder.

Som vist i tabel 5 iagttages der en god væksthæmmende virkning.

I tabellen iagttages der i hangruppen significant forskel, men små karakteristiske spredningsværdier iagttages i hungruppen.

Tabel 5.

legemsvægt	kontrol	0,5 ppm tilsat	5 ppm tilsat	10 ppm tilsat	20 ppm tilsat
begyndelsesvægt ¹⁾	44,32 ± 2,94	44,12 ± 2,65	44,32 ± 2,48	44,0 ± 2,47	44,16 ± 2,67
slutvægt ¹⁾	720,5 ± 60,3	769,6 ± 55,0	759,0 ± 63,2	787,8 ± 69,2	806,0 ± 53,1
middelforøgelse ²⁾	676,2 ± 60,0	725,4 ± 54,5	714,7 ± 62,4	743,7 ± 68,5	761,8 ± 52,9
legemsvægt	kontrol	0,5 ppm tilsat	5 ppm tilsat	10 ppm tilsat	20 ppm tilsat
begyndelsesvægt ¹⁾	44,20 ± 2,96	44,20 ± 3,21	44,48 ± 2,52	44,32 ± 3,16	44,48 ± 2,97
slutvægt ¹⁾	784,4 ± 70,9	823,1 ± 45,6	839,2 ± 62,7	868,7 ± 61,6	863,2 ± 47,7
middelforøgelse ²⁾	742,2 ± 71,1	778,9 ± 45,0	794,7 ± 63,3	824,4 ± 61,9	818,8 ± 48,6

1) middelleghemsvægt ± standardafvigelse (g).

2) forøget middelleghemsvægt ± standardafvigelse (g)

*) signifikant forskel med risiko 1%

**) signifikant forskel med risiko 5%

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåde til fremstilling af en blanding af antibiotiske stoffer betegnet planothiociner eller en eller flere af de enkelte komponenter betegnet planothiocin-A, planothiocin-B, planothiocin-C, planothiocin-D, planothiocin-E, planothiocin-F og planothiocin-G, k e n- d e t e g n e t ved, at mikroorganismen betegnet Actinoplanes sp. Al2526, deponeret i Institute for Microbiological Industry and Technology, M.I.T.I. Japan, under nr. FERM-P nr. 5063 eller en mutant deraf med væsentlig samme egenskaber dyrkes i et næringsmedium, hvorefter de dannede planothiociner isoleres i form af en blanding eller i form af en eller flere af de enkelte komponenter.

Fremdragne publikationer:

FIG. 1

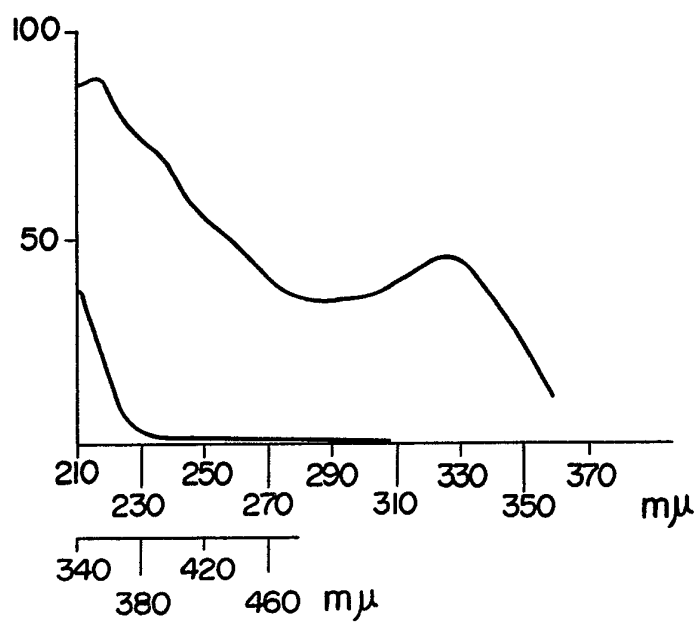


FIG. 2

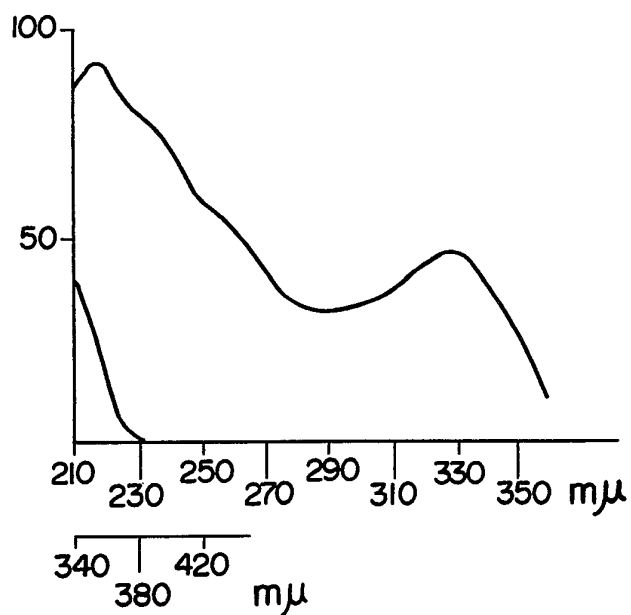


FIG. 3

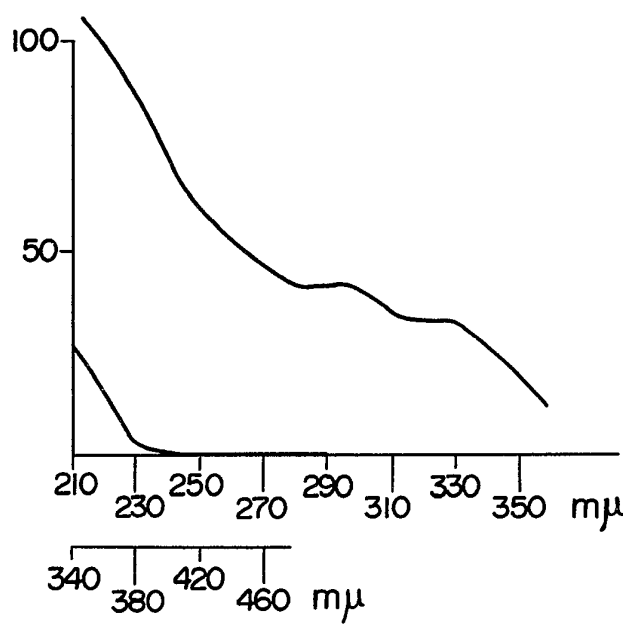
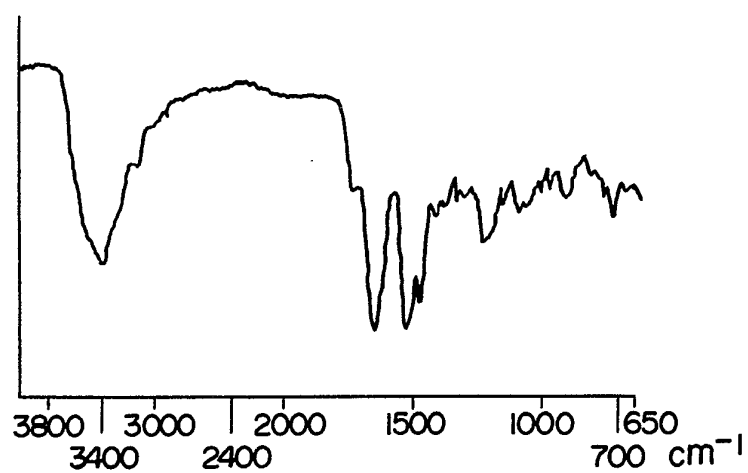


FIG. 4



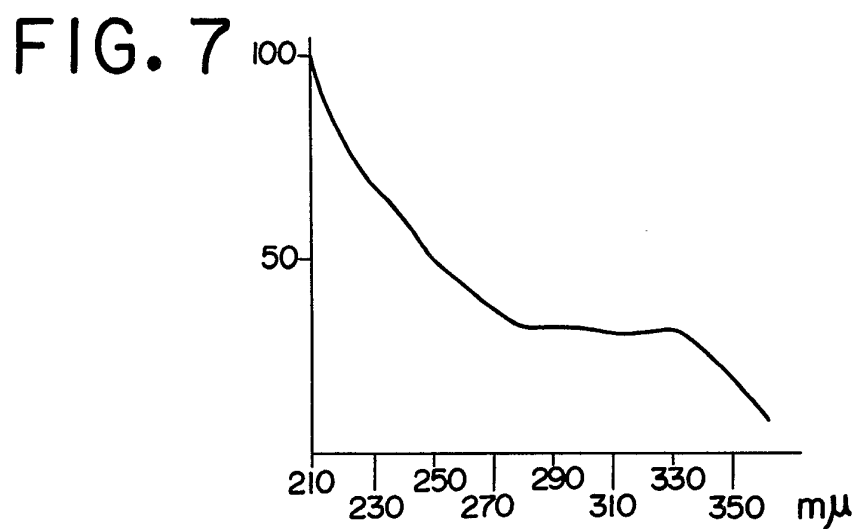
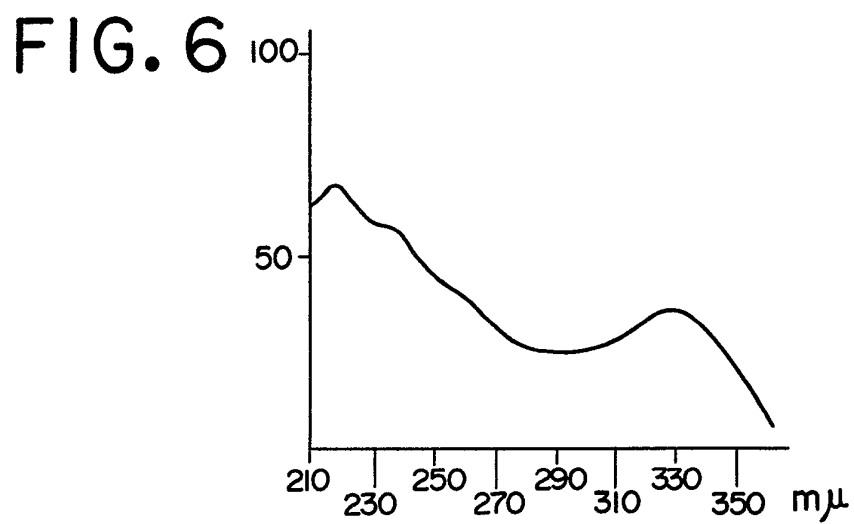
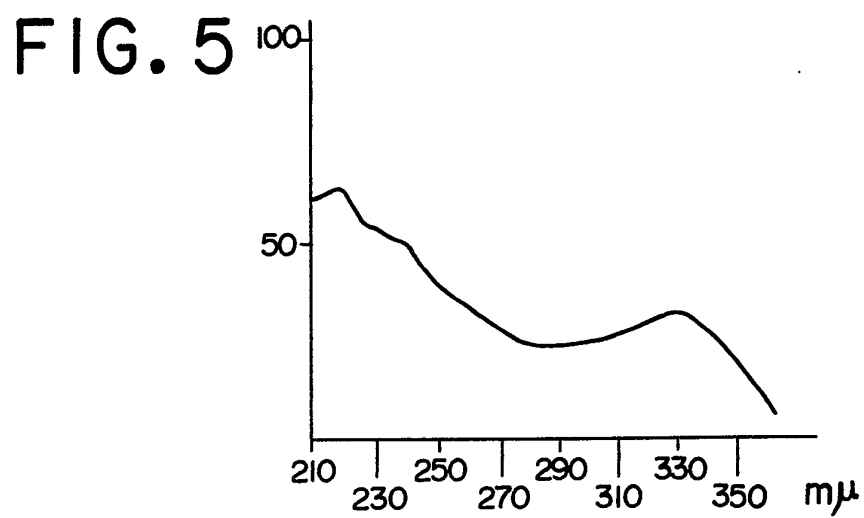


FIG. 8

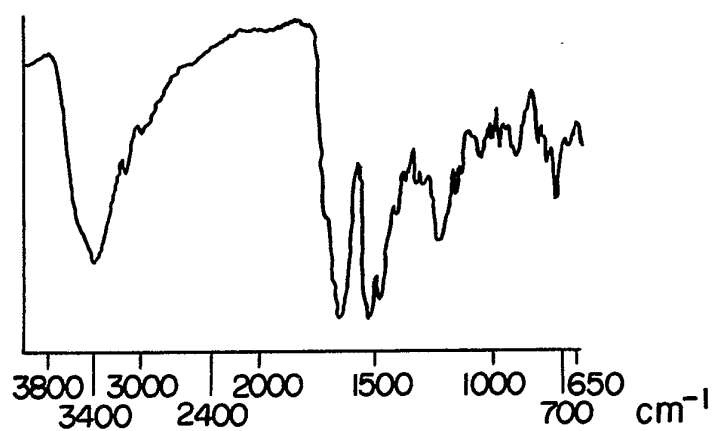


FIG. 9

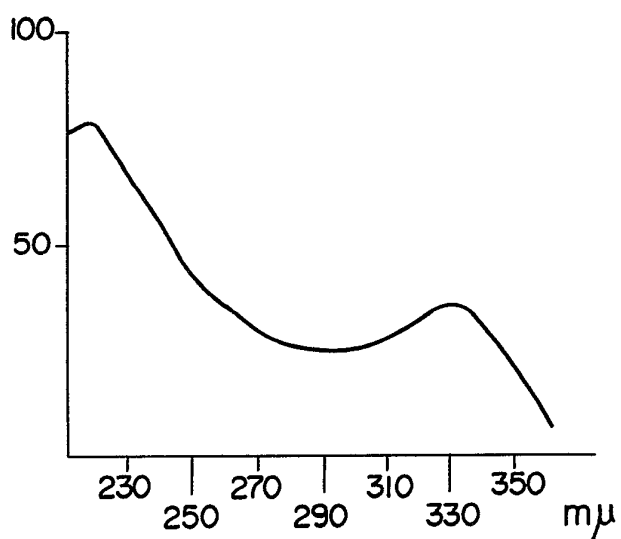


FIG. 10

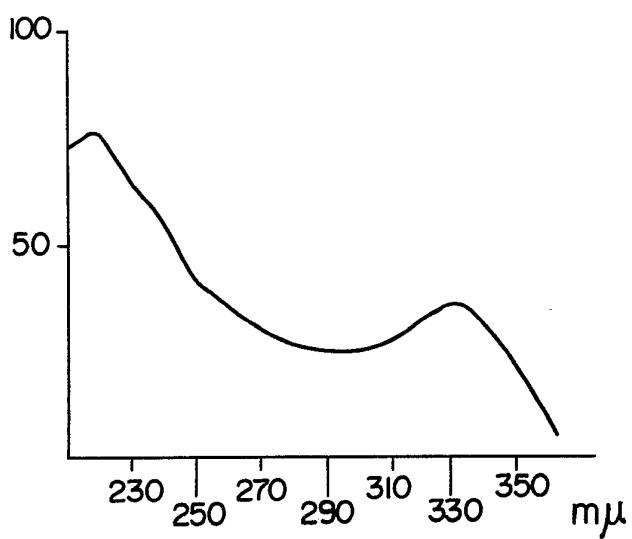


FIG. 11

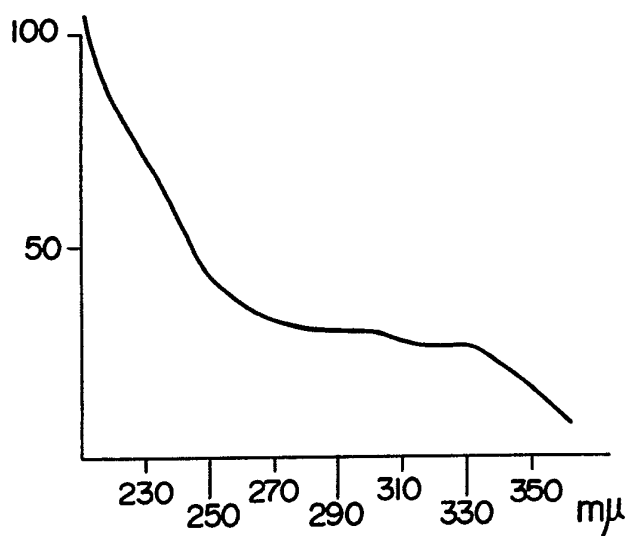


FIG. 12

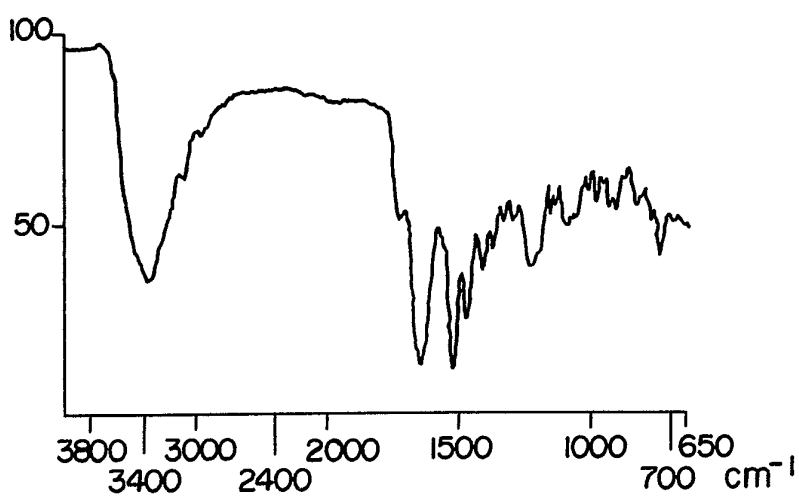
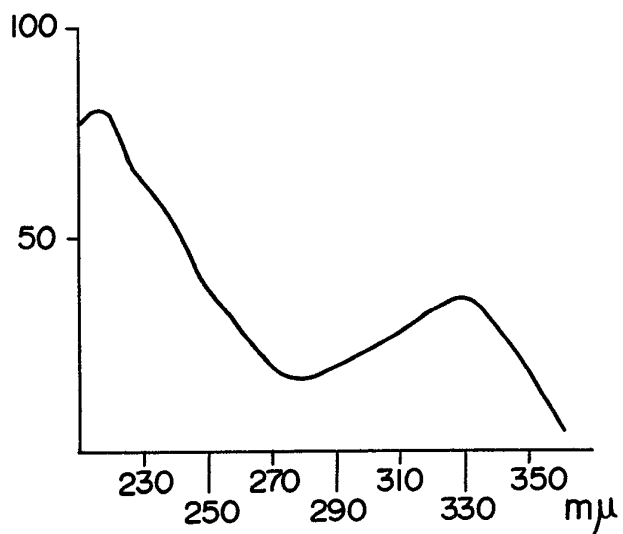


FIG. 13



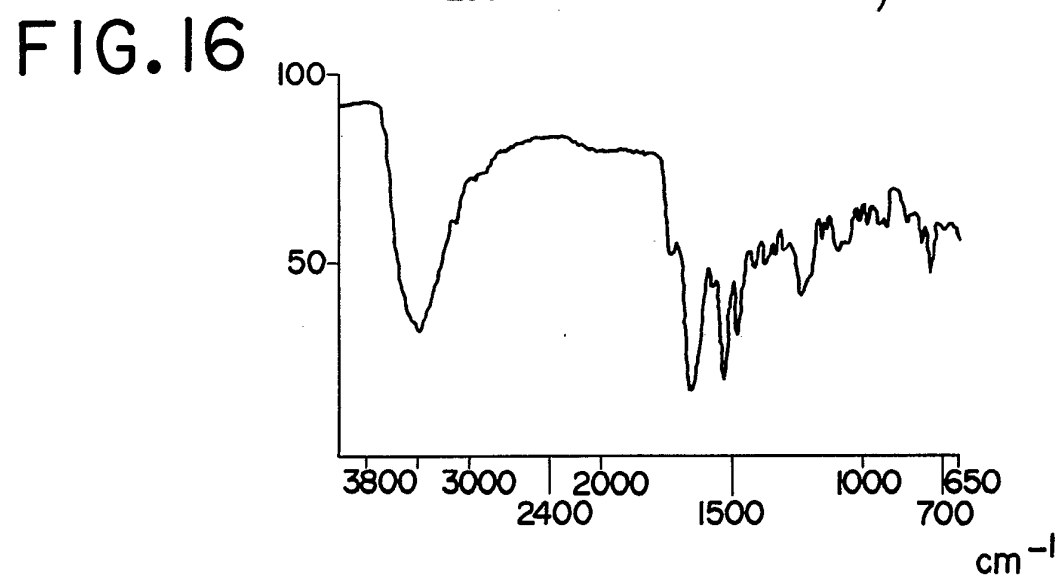
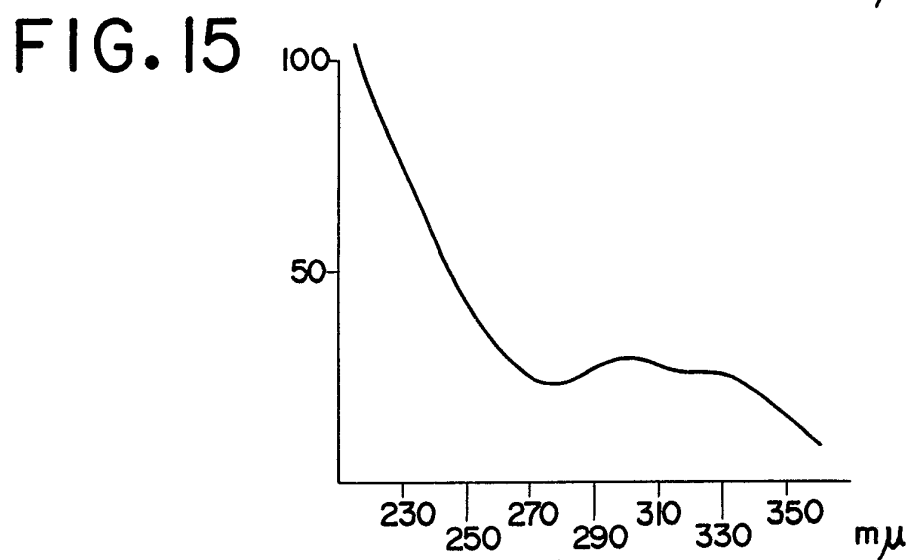
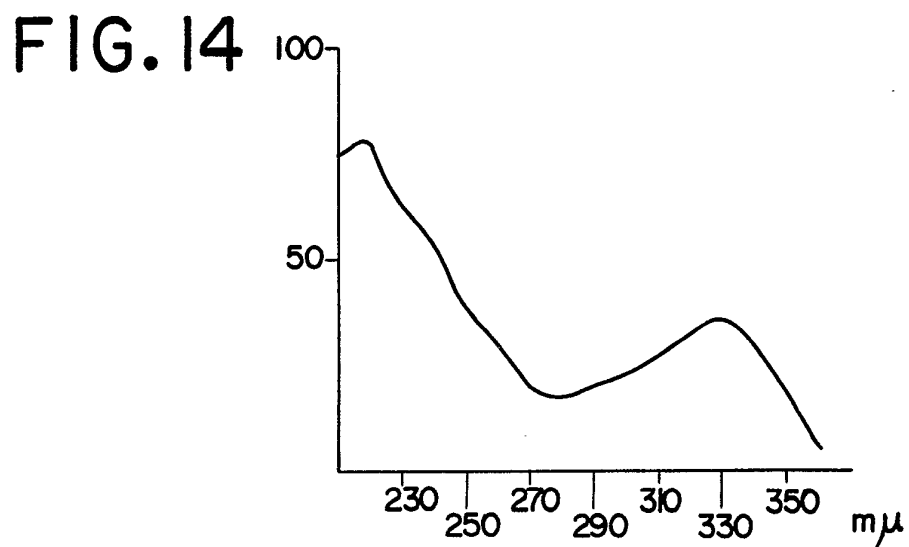


FIG. 17

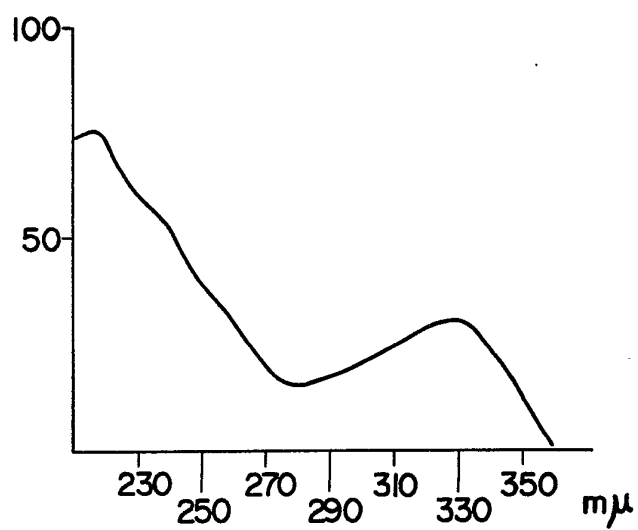


FIG. 18

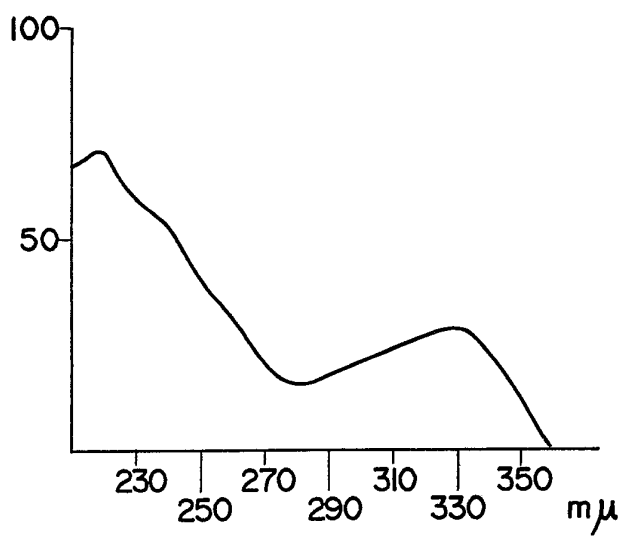


FIG. 19

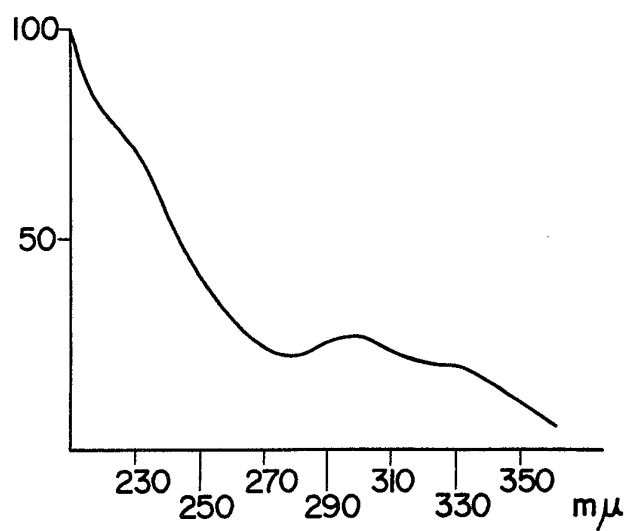


FIG. 20

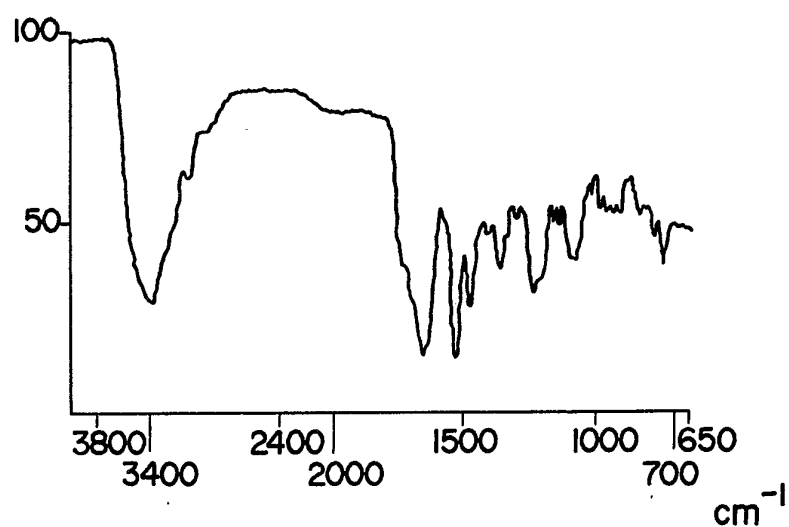


FIG. 21

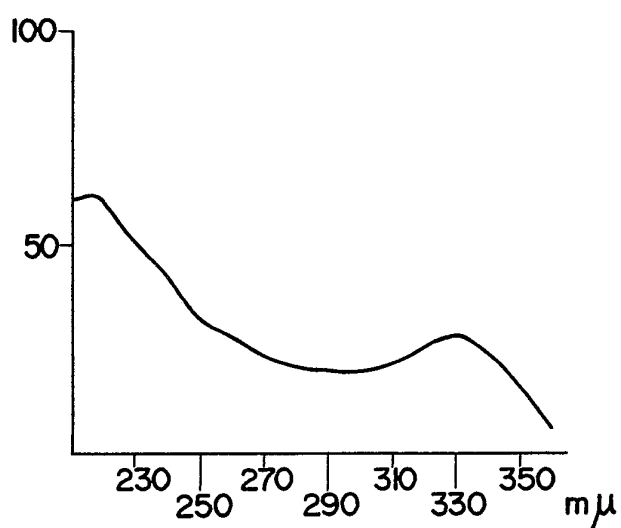


FIG. 22

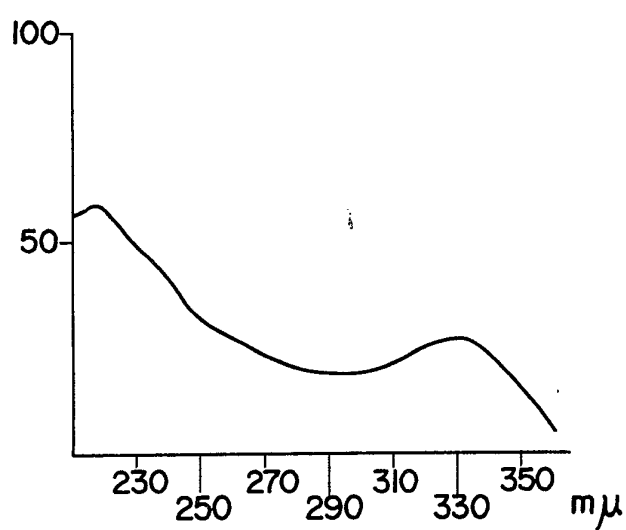


FIG. 23

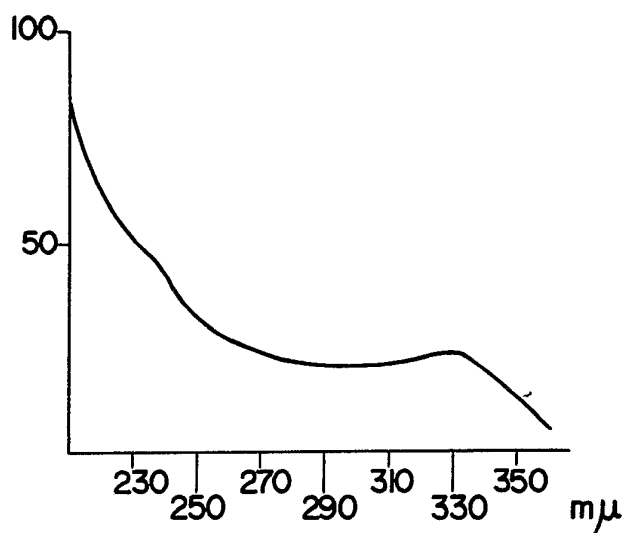


FIG. 24

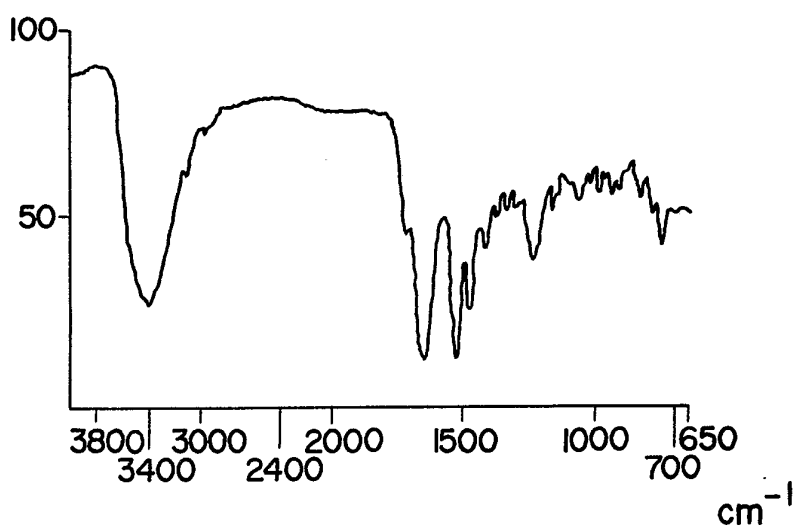


FIG. 25

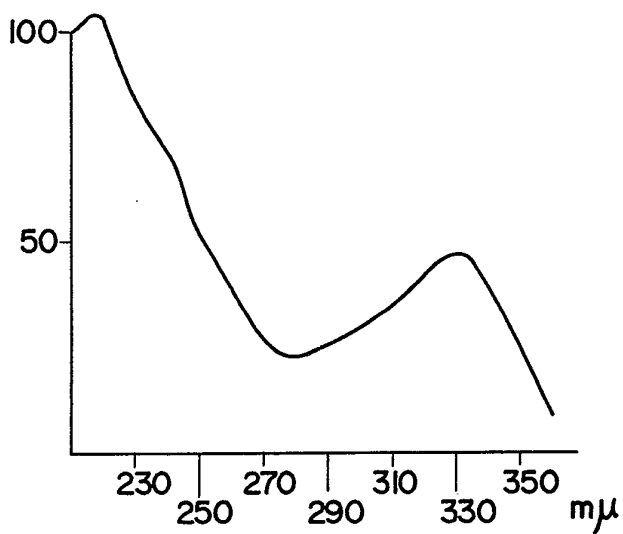


FIG. 26

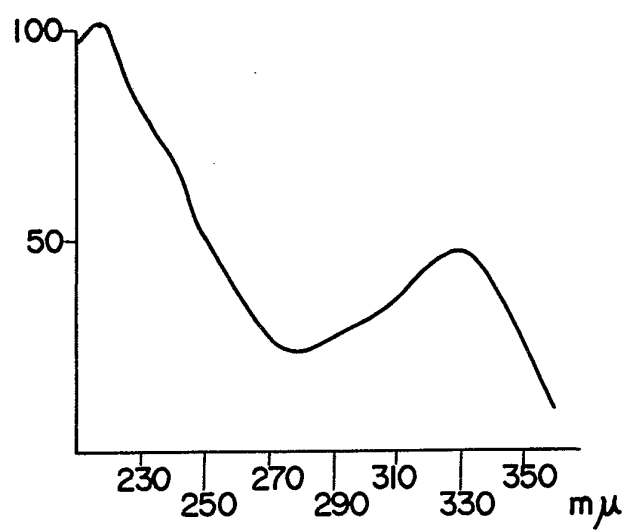


FIG. 27

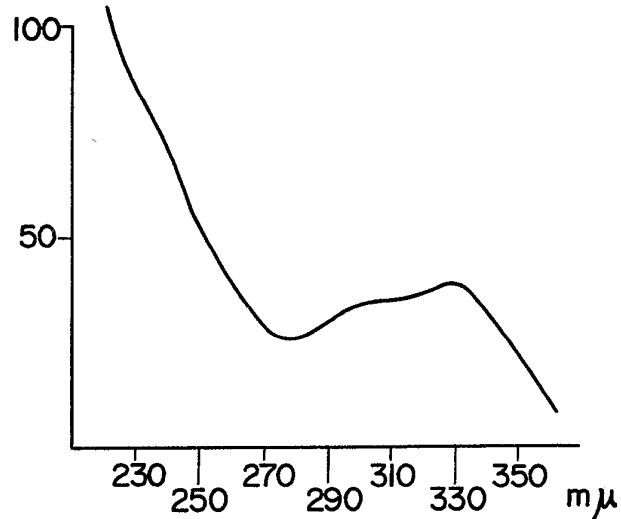


FIG. 28

