

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 151257 B

PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(21) Patentansøgning nr.: 3251/79

(22) Indleveringsdag: 01 aug 1979

(41) Alm. tilgængelig: 04 feb 1980

(44) Fremlagt: 16 nov 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 03 aug 1978 GB 32172/78

(51) Int.Cl.⁴

C 07 D 407/14

C 12 P 17/16

C 12 N 1/20

(71) Ansøger: *IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED; Thames House North; Millbank; London SW1P 4QG, GB

(72) Opfinder: David Huw *Davies; GB, Geoffrey Lightfoot Floyd *Norris; GB

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Polycyklisk furanforbindelse, fremgangsmåde til fremstilling heraf og mikroorganismekultur til anvendelse hertil

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

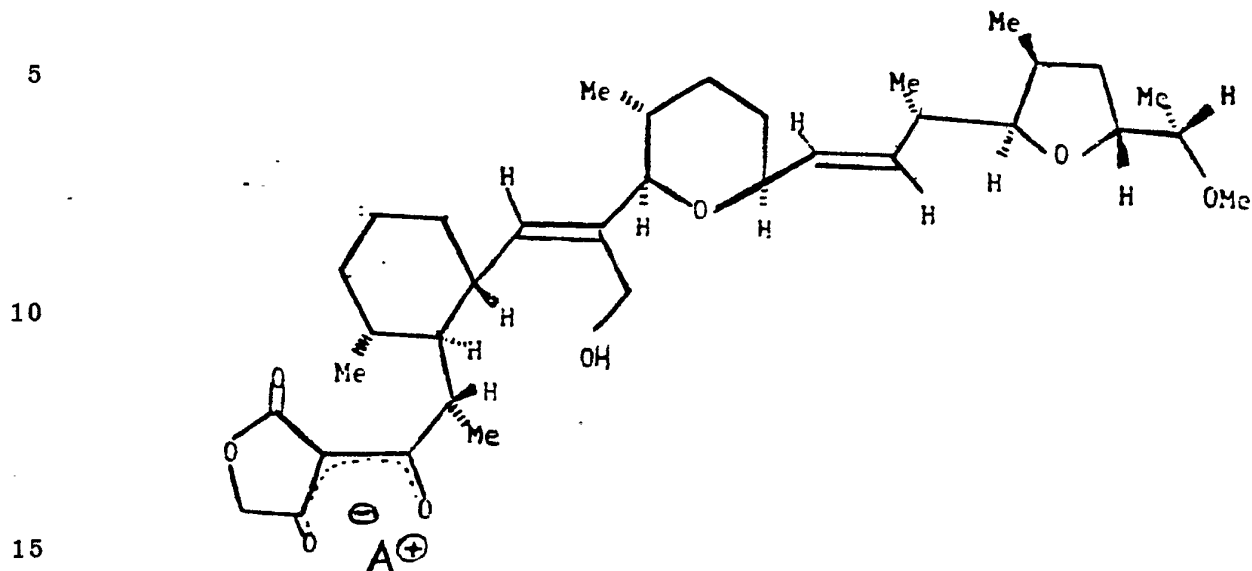
3251-79

Opfindelsen angår en hidtil ukendt metabolit M 139 603, en forbindelse med den empiriske formel $C_{35}H_{53}O_8Na$, og som ved massespektrometri har en molekylær ion M^+ med massen 624 og ved elementaranalyse har C = 67,5% og H = 8,8%, et smeltepunkt på 176-178°C, samt den tilsvarende frie syreform deraf $C_{35}H_{54}O_8$ og andre alkalimetalsalte deraf. Forbindelserne fås ved aerob dyrkning af en stamme af *Streptomyces longisporoflavus*, især den hidtil ukendte *S. longisporoflavus* NCIB 11426 (CBS 312.79).

Forbindelserne reducerer mængden af methan produceret ved fordøjelsen af foder i vommen hos drøvtyggere og forøger mængden af propionat i forhold til acetat i vomindholdet. Forbindelsen er derfor nyttig til at forøge væksthastigheden af drøvtyggende dyr og/eller til at forøge virkningsgraden af deres foderomdannelselse.

Forbindelserne har også virkning overfor grampositive mikroorganismer og overfor coccidia, f.eks. *Eimeria tenella*.

Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt polycyklisk furanforbindelse ejendommelig ved, at den har formelen



hvor A er hydrogen eller et alkalimetal, idet natriumsaltet er forbindelsen betegnet M 139603.

20 Nævnte polycykliske furanforbindelser er effektive til at nedsætte mængden af methan produceret ved drøvtyggerforgøring og forøge mængden af propionsyre i kvægvomvæske og antages derfor at have vækstfremmende egenskaber på drøvtyggere, idet det er velkendt at andre kemiske forbindelser, som forøger

25 mængden af propionsyre i vomvæsken resulterer i forøgede væksthastigheder, når de gives til kvæg eller får. De hidtil ukendte forbindelser ifølge opfindelsen har også antibakteriel virkning over for grampositive organismer og anticoccidial virkning over for Eimeria tenella ved en in vitro prøve.

30 Forbindelsen M 139 603 har følgende egenskaber:

a) Molekylformel $C_{35}H_{53}O_8Na$, som vist ved massespektrometri, der udviser en molekylær ion M^+ med massen 624,361 (beregnet for $C_{35}H_{53}O_8Na = 624,364$) og ved elementæranalyse: C = 67,5, H = 8,8% (beregnet for $C_{35}H_{53}O_8Na$: C = 67,3, H 8,5 %),

35

b) infrarødt spektrum i nujol, som vist på fig. 1, indehol-

dende karakteristiske absorptioner ved 3300, 1725, 1645, 1565 og 915 cm^{-1} ,

5 c) protonmagnetisk resonansspektrum i deuteriumchloroform som vist på fig. 2,

d) ultraviolet spektrum i ethanolopløsning som udviser karakteristiske absorptioner ved 234 nm ($\epsilon = 12900$) og 272 nm
10 ($\epsilon = 10800$),

e) smeltepunkt $176-178^\circ\text{C}$,

f) $[\alpha]_D^{23} - 82^\circ$ ($c = 0,2$ i methanol)

15 Den frie syre med ovennævnte formel, hvor A er hydrogen, har molekylformlen $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_8$, en karakteristisk $R_F = 0,55$ (omtrentligt) på tyndtlagschromatografi på silica gel (Merck's "Kisegel 60F-254" - varemærke), tykkelse $0,25 \text{ mm}$ fremkaldt med
20 en blanding af diethylether, methanol og myresyre i forholdet $95:4:1$ efter rumgang, og UV i ethanol udviser karakteristisk absorption ved 274 nm ($\epsilon = 13900$) bred.

Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling
25 af ovennævnte forbindelser ejendommelig ved dyrkning af en M 139 603 producerende stamme af *Streptomyces longisporoflavus* i et vandigt næringsmedium indeholdende en kilde til assimilerbart kulstof under rystede aerobe betingelser ved en temperatur mellem 22 og 32°C , ekstraktion af den således fremkomne
30 forgæringsblanding med et med vand ublandbart organisk opløsningsmiddel på sædvanlig måde og inddampning af opløsningsmidlet, om ønsket efterfulgt af isolering af M 139 603 i oprenset tilstand i form af den frie syre eller et alkalimetalsalt.

35 En egnet M 139 603 producerende stamme af *Streptomyces longisporoflavus* er den, der identificeres som NCIB 11 426, som uden begrænsning står til rådighed fra the National Collection of Industrial Bacteria, Ministry of Agriculture, Fisheries

and Food, Torry Research Station, 135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Skotland indtil mindst 19. juli 2008, og som har følgende beskrivelse:

- 5 [De anvendte medier fremstilles i overensstemmelse med opskrifterne for "International Streptomyces Project" (ISP) og er som beskrevet af E.G. Shirling og D. Gottlieb (International Journal of Systematic Bacteriology, 16, (3), 313-340, 10 [1966]). Inkubationsbetingelser ca. 25°C - dagslys.
- ISP1 tryptongær (men med tilsat agar).
- 5 dage - tynd, svagt våd, fløjlsagtig, lysebrun.
Bagside ufarvet.
- 15 13 dage - tynd, fløjlsagtig, svagt kornet, lysebrun.
Bagside ufarvet.
- ISP2 gærekstrakt/maltekstrakt agar.
- 20 5 dage - tynd, fløjlsagtig, lysegrå.
Bagside meget bleg gullig brun.
- 25 13 dage - lys, hævet og rynket, fløjlsagtig, lysegul/brun/grå.
Bagside lysebrun.
- ISP3 havremel agar.
- 30 5 dage - sparsom til tynd, fløjlsagtig, lysegul/grå.
Bagside ikke synlig.
- 13 dage - tynd, svagt hævet, fløjlsagtig lysegrå.
Bagside ikke synlig.
- 35 ISP4 uorganiske salte - startagar.
- 5 dage - tynd, lysebrun, svagt kornet.
Bagside ufarvet.
- 13 dage - tynd, svagt våd, lysebrun.
Bagside mere eller mindre ufarvet.

ISP5 glycerin-asparagin agar.

5 5 dage - tynd, svagt kornet, lysebrun.
Bagside ufarvet.

13 dage - tynd, fløjlsagtig, lysegrå.
Bagside ufarvet.

10 ISP7 tyrosin agar.

5 dage - sparsom til tynd, svagt kornet, fløjlsagtig lysebrun/
grå. Bagside ufarvet.

15 13 dage - tynd, fløjlsagtig, svagt hævet, lysebrun.
Bagside lysebrun/grå.

20 På ISP7 bliver kulturen med alderen i almindelighed mere
lyserød-lysebrun men viser nogle områder med mørkere farv-
ning, der står i forbindelse med kraftigere sporedannelse.

ISP9 kulstofudnyttelses agar

		<u>Bedømmelse</u>
25	15 dage - intet kulstof - meget sparsom, neddykket	-
	- glukose - tynd/lys, fløjlsagtig, lysebrun	+
	- arabinose - sparsom	±
30	- fruktose - tynd, fløjlsagtig, lysebrun	+
	- inosit - meget sparsom	-
35	- mannit - tynd, fløjlsagtig	+
	- raffinose - meget sparsom	-
	- rhamnose - sparsom	±
40	- xylose - sparsom	±

Generelt.

Der produceres ingen melaniner.

5

Der produceres ingen bagsidepigmenter.

Der produceres ingen opløselige pigmenter.

10

Sporerne bæres i åbne og tætte spiraler ofte adskilt fra hovedaksen af en mere lige understøttende "hypha" eller måske kæde af sporer. Sporerne selv er vanskelige at se med normal mikroskopi, idet de er meget tæt forbundne. Sporevæggene (E.M. på 4% uranylacetatpræparat) er glatte.

15

Denne stamme af *Streptomyces longisporoflavus* er også uden begrænsning til rådighed fra Centraalbureau voor Schimmelcultures, PO Box 273, Oosterstraat 1, 3740 Ag Baarn, Holland under reference CBS 312.79.

20

Opfindelsen angår endvidere en biologisk ren mikroorganismekultur til anvendelse ved den ovenfor beskrevne fremgangsmåde, ejendommelig ved, at den er en kultur af *Streptomyces longisporoflavus* NCIB 11 426.

25

Den "frie syre" svarende til natriumsaltet M 139 603 kan fås ved at syrne en opløsning af M 139 603 og ekstrahere den sure opløsning med et med vand ublandbart organisk opløsningsmiddel, og andre alkalimetalsalte kan fås ved at behandle en opløsning af den "frie syre" med et passende alkalimetalhydroxyd f.eks. lithiumhydroxyd, kaliumhydroxyd, cæsiumhydroxyd eller rubidiumhydroxyd. Hvis der anvendes natriumhydroxyd regenereres M 139 603, hvilket viser, at der ved disse reaktioner ikke sker nogen strukturelle ændringer.

30

Som ovenfor nævnt har forbindelserne den virkning at forøge mængden af propionsyre i vomvæske og især at forøge mængden af propionsyre på bekostning af methan og/eller eddikesyre. Dette er kendt at være en ønskelig virkning ved ernæring af drøvtyggere, fordi propionsyre er et meget mere effektivt

35

forstadium til glukose, hvoraf dyret afleder sin energi og vækst, end eddikesyre, medens den del af dyrets foderindtagelse, som omdannes til methan simpelthen er tabt for dyret, idet methanen udskilles ved opstød. Den ændring af vommetabolismen, som opnås med forbindelserne ifølge opfindelsen, er således en meget nyttig virkning og antages at forøge væksthastigheden og foderomdannelsesvirkningsgraden af drøvtyggende dyr.

Forbindelserne ifølge opfindelsen kan derfor anvendes til en fremgangsmåde til brug i husdyrbruget med drøvtyggende dyr til forøgelse af deres væksthastighed og/eller til at forøge virkningsgraden af deres foderomdannelse, ved oralt at administrere til dyrene en forbindelse ifølge opfindelsen eventuelt i uren form, som den opnås direkte ved forgæringen eller ved ekstraktion af forgæringsblandingen som ovenfor beskrevet.

Ved fremgangsmåden administreres forbindelserne ifølge opfindelsen fortrinsvis oralt til dyrene som et supplement til deres normale kost, dvs. i blanding med et sædvanligt fast foder, i foderblokke eller saltslikkesten, opløst i drikkevandet eller til unge dyr, såsom lam eller kalve, opløst i sødmælk eller skummetmælk. Forbindelserne ifølge opfindelsen inkorporeres i foderblokke, saltslikkesten, drikkevand, sødmælk eller skummetmælk i et sådant omfang, at hvert behandlet dyr vil indtage fra 0,01 mg/kg legemsvægt til 30 mg/kg legemsvægt per dag, fortrinsvis fra 0,01 mg/kg til 10 mg/kg per dag, af en forbindelse ifølge opfindelsen.

Forbindelserne ifølge opfindelsen kan alternativt administreres oralt til dyr i form af langsomt frigørende vompiller eller kugler, således at dyret vil absorbere en lignende mængde per dag af forbindelserne ifølge opfindelsen.

Dyrene kan modtage forbindelserne ifølge opfindelsen i hovedsagelig hele deres vækstperiode eller i kun en del af deres vækstperiode, f.eks. den tidlige del, og/eller tiden der fører op til slagtning. Forøgelsen i væksthastighed, der opnås ved

0

anvendelse af forbindelserne ifølge opfindelsen, gør det muligt, at dyr der opdrættes til kødproduktion kan bringes til markeds- vægt eller slagtevægt på kortere tid end normalt, eller den gør
5 det muligt at producere tungere dyr efter en normal vækstperiode. Den forbedrede virkningsgrad af foderomdannelsen, der opnås med forbindelserne ifølge opfindelsen, gør det muligt at behandle dyr kan nå en ønsket vægt, medens de forbruger mindre foder end ubehandlede dyr vokset til den samme
10 vægt. Tilsat i de mængder, der fremmer optimal vækst, iagttages ingen tegn på nogen giftige virkninger af forbindelserne ifølge opfindelsen.

15

Forbindelserne anvendes som et middel, der omfatter en forbindelse, et forgæringsprodukt eller en ekstrakt fremstillet ifølge opfindelsen sammen med en fast eller flydende spiselig, ugiftig bærer eller fortyndningsmiddel.

20

Et egnet flydende fortyndningsmiddel eller bærestof er f.eks. drikkevand, sødmælk eller skummetmælk.

25

Et egnet fast, spiseligt, ugiftigt fortyndningsmiddel eller bærestof kan f.eks. være et sædvanligt næringsmæssigt afbalanceret drøvtyggerfoder, f.eks. et typisk kvæg eller fårefoder bestående af kornprodukter såsom bygmel, majsmel eller
30 hvede, nødder og frøprodukter såsom afskallet jordnøddekage eller bomuldsfrøkage eller ekstraheret bomuldsfrøkage sammen med mindre mængder af f.eks. fjermel, tangmel, benmel, kridt, salt, urinstof, melasse, vitaminer og sporstoffer, eller det kan være et indifferent fast fortyndningsmiddel eller bærestof uden energiværdi f.eks. kaolin, talk, calciumcarbonat, fullerjord, attapulgit ler, formalede østersskaller eller formalet kalksten, eller det kan være stivelse eller laktose.

35

Midlet kan have form af et suppléringsfoder til direkte fodring af dyrene, i hvilket tilfælde det vil indeholde fra 5 ppm til 3000 ppm af forbindelsen ifølge opfindelsen, i blanding med et sædvanligt drøvtyggerfoder, eller det kan

0 have form af en koncentreret forblanding til fortynding med
et sædvanligt drøvtyggerfoder til fremstilling af et suppleret
foder egnet til direkte opfodring, og en sådan forblanding
vil indeholde fra 0,3% w/w til 50% w/w af forbindelsen ifølge
5 opfindelsen i blanding med enten et sædvanligt næringsmæssigt
afbalanceret drøvtyggerfoder, et indifferet fast fortyndnings-
middel uden energiværdi f.eks. formalet kalksten eller stivel-
se eller laktose.

10 I alle midlerne, der er beskrevet ovenfor, kan forbindelsen
ifølge opfindelsen naturligvis erstattes af forgæringsblandin-
gen fremstillet ifølge opfindelsen eller en ekstrakt fremstil-
let ifølge opfindelsen indeholdende en ækvivalent mængde M 139603.

15 Forbindelsen af formlen I bliver fortrinsvis seriefortyndet med
med et fortyndingsmiddel eller et bærestof i to eller flere på
hinanden følgende trin for at sikre ensartet blanding.

20 Som ovenfor nævnt har forbindelserne ifølge opfindelsen også
anticoccidial virkning. Dette demonstreres af en vævskultur-
prøve i kyllingenyreceller podet med sporozoiter af Eimeria
tenella i overensstemmelse med standardmetoden beskrevet i
Journal of Parasitology, bind 58, side 664 - 668 (1972). Ved
denne prøve forhindrer M 139 603 vækst af sporozoiterne i en
25 koncentration $\leq 0,001$ del pr. million og udviser kun giftige
virkninger på værtcellerne i en koncentration $\geq 0,33$ dele pr.
million.

30 Forbindelsen M 139 603 har også grampositive antibakterielle
egenskaber og har som eksempel vist sig at forhindre væksten
af Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Clos-
tridium welchii og Corynebacterium acne i en koncentration \leq
10 μg pr. ml og kan derfor anvendes som vækstfremmende mid-
del i ikke-drøvtyggende dyr f.eks. fjerkræ og svin.

35

Opfindelsen illustreres yderligere af følgende eksempler.

Eksempel 1.

5 Streptomyces longisporoflavus NCIB 11 426 blev dyrket i en
500 ml Erlenmayer kolbe på trypton-gær agar indeholdende:

Trypton - "oxid" L42 (varemærke) 0,5% w/v

Gærekstrakt - "oxid" L21 (varemærke) 0,3% w/v

10 som forud var blevet steriliseret ved autoklavering i 20 min.
ved normal tryk. pH-værdien af mediet var ca. 7,0. Kolben
blev rystet ved 25°C i 120 timer på en roterende ryster.

15 Kolbens indhold blev så anvendt til at pøde 10 lignende kolber,
hver indeholdende 200 ml af følgende medium:

	Glucosesirup	3,0% w/v
	Calciumcarbonat	0,25% w/v
	Natriumchlorid	0,5% w/v
20	Magniumsulfatheptahydrat	0,05% w/v
	Koncentrat af sporstoffer	0,1% w/v
	Bakteriologiskpepton "oxid" L37 - varemærke)	0,1% v/v
25	Okseekstraktpulver "oxid" L29 "Lab Lemco"- varemærke)	0,5% w/v
	Afioniseret vand	til 100.

30 pH-værdien blev indstillet til 7,8, og mediet blev forsteri-
liseret ved autoklavering ved 120°C i 20 min. De podede
kolber blev rystet ved 25°C i 120 timer på en roterende rys-
ter, og kolbernes indhold blev så forenet og indstillet til
pH 3 ved forsigtig tilsætning af 0,1 N saltsyre. Mediet blev
35 ekstraheret med ethylacetat (2 x 600 ml), ekstrakterne blev
forenet og tørret over natriumsulfat, og opløsningsmidlet
blev afdampet til dannelse af en olieagtig rest (290 mg).

Ethylacetatekstrakten blev rensset ved preparativ lagkromato-
grafi på to silicaplader (Merck's "Kieselgel" 60F-254 -
varemærke, 20 x 20 cm, 2mm tyk) under anvendelse af ethylace=

0 tat som eluent. Båndet ved $R_F = 0,39$ (omtrentligt) blev af-
skrabet fra pladerne og ekstraheret med ethylacetat, og op-
løsningsmidlet blev afdampet til dannelse af en viscos gummi
(21 mg), som in vitro udviste antibakteriel virkning over-
for *S. aureus*. Denne aktive fraktion blev yderligere rensat
ved preparativ lagkromatografi på en silicagelplade (Merck's
5 kiselgel" 60F-254, 20 x 20 cm, 0,25 mm tyk) under anvendelse
af en blanding af diethylether, methanol og myresyre i for-
holdet 95:4:1 (efter rumfang). Båndet ved $R_F = 0,55$ (omtrent-
ligt) blev skrabet fra pladen og ekstraheret med ethylacetat
til dannelse efter afdampning af opløsningsmidlet af en vis-
10 kos gummi (9 mg). Gummien blev omdannet til et natriumsalt
M 139 603 ved rystning af en chloroformopløsning med en op-
løsning af natriumhydroxyd (0,1M). Chloroformlaget blev fra-
skilt og tørret over natriumsulfat, og opløsningsmidlet blev
afdampet til dannelse af M 139 603 som et hvidt fast stof (8 mg)
15 smeltepunkt 129 til 132°C, hvis infrarøde spektrum (fig. 1)
viste følgende maxima: 3 300, 1 725, 1 645, 1565 og 915 cm^{-1} .
Elementær analyse: fundet C = 67,5, H = 8,8%, beregnet for
 $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$, C = 67,3, H = 8,5. Massespektrum: $M^+ = 624,361$,
beregnet for $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na} = 624,364$. $R_F = 0,39$ (tyndtlags kro-
20 matografi på Merck's 60F-254, 0,25 mm plader fremkaldt med
ethylacetat, gjort synlig som en brun plet efter sprøjtning
med 3N svovlsyre og opvarmning til 100°C). Det proton magne-
tiske resonansspektrum i deuteriumchloroform er reproduceret
som fig. 2.

25

Eksempel 2.

Evnen hos M 139 603 til at hindre produktionen af methan i
vommen hos drøvtyggere og til at forøge mængden af propionat
30 på bekostning af acetat (Ac/Pr) i de producerede flygtige
fedtsyrer (VFA) demonstreres som følger:

Vomvæske opsamles efter regelmæssig rutine fra to stude, som
fodres med samme kost af hør plus koncentrat. Prøveudtagnings-
35 tiden standardiseres så vidt som muligt, og væsken fra de to
dyr samles i forholdet 50:50. Storpartiklet materiale fjernes
ved filtrering af den samlede væske gennem fire lag musselin
klæde. Filtratet fortyndes så i forholdet et rumfang filtrat

til 3 rumfang kunstig vomvæske (fremstillet som beskrevet af G.L. Bales med flere, Journal of Dairy Science, 1976, bind 59, side 1850, men under udeladelse af eddikesyre), og pH-værdien af blandingen indstilles til 6,9 - 7,0 med mættet vandig natriumcarbonatopløsning. 50 ml portioner af denne blanding dipenseres i 100 ml koniske kolber indeholdende tørret, for- malet hør (0,5 g), og hver kolbe anvendes til at undersøge
5 en forsøgsforbindelse i en given koncentration.

Forsøgsforbindelsen sættes til den koniske kolbe som en op- løsnings i ethanol, kolben skylles med kuldioxid, tilproppes med et subalukke og inkuberes ved 39°C i 15 til 16 timer. Efrer en time indføres en nål med snæver boring gennem su-
10 balukket for at frigøre gstrykket, og nålen udtrækkes 30 min. før inkuberingen afsluttes. Forgæringen standses så ved at anbringe kolben i is, og efter 15 min. afkøling analyseres gassen over væsken for methan ved gaskromatografi. Kolbens indhold filtreres så gennem en forud tørret, sintret glastragt.
15 Tre prøver af filtratet analyseres ved gaskromatografi for VFA, og ved sammenligning med de tidligere bestemte mængder af VFA før inkubationen bestemmes nettoproduktionen af VFA (ace- tat og propionat) under inkubationen.

Der fremkom følgende resultater udtrykt som % af kontrolvær-
20 dier, fremkommet når der ikke blev anvendt nogen forsøgsfor- bindelse. Monensin, et kendt vækstfremmende middel, som vir- ker på vommen, er tilføjet som positiv kontrol.

25	Forbindelse	Koncentration µg per ml	Methan - % i forhold til kontrol	Forhold acetat/ propionat - % i forhold til kontrol
	M 139 603	1,0	58	62
		0,3	72	64
		0,1	87	70
30	Monensin	1,0	67	79
		0,3	90	87
		0,1	100	95

Eksempel 3

Streptomyces longisporoflavus NCIB 11 426 blev dyrket som skråkultur på ISP-7 agar (45 ml) i 7 dage ved 30°C. Hver enkelt af tre sådanne skråkulturer blev skrabet i 3 kolber med 100 ml sterilt vand, og de fremkomne suspensioner blev anvendt til at pøde tre 2-liter kolber hver indeholdende 1 liter af følgende medium:

	Glycerin	3,0% w/v
10	Bacteriologisk pepton ("oxoid" L-37-varemærke	2,0% w/v
	KH ₂ PO ₄	0,024% w/v
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,02% w/v
	Koncentrat af sporstoffer	0,1% v/v
	Kridt	0,1% w/v
15	Afioniseret vand	til 1 liter

som var forud steriliseret ved autoklavering ved normal tryk i en halv time, og hvis pH-værdi var ca. 6,7.

De således fremstillede tre 2-liter kolber blev rystet ved 30°C i tre dage på roterende ryster. De tre flaskers indhold blev så forenet og anvendt til at pøde en rustfri stålfor-gæringsbeholder indeholdende 30 liter steriliseret medium:

	Glycerin	3,0% w/v
	Sojamel BSP 70	1,0% w/v
	Kridt	0,25% w/v
25	Cerelose	3,0% w/v
	NaCl	0,5% w/v
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,05% v/v
	Koncentrat af sporstoffer	0,1% w/v
	Destilleret vand	til 30 liter

30 For-gæringsbeholderens indhold blev omrørt ved 30°C i 70 timer

under anvendelse af en turbine med fire flade blade, der roterede med 350 omdrejninger/min. og blev luftet med en hastighed af 15 liter/min. 30 mm l "silcolapse" (varemærke), et silikone antiskummemiddel var blevet sat til blandingen før autoklaveringen. pH-værdien på høsttidspunktet var 7,9 og den fremkomne forgæringsblanding (22 liter) blev blandet og omrørt med et lige så stort rumfang ethylacetat. Efter 30 min. blev blandingen skilt i en centrifugalseparator, og ethylacetatekstrakten (ca. 18 liter) blev tørret over vandfri natriumsulfat og filtreret. Filtratet blev koncentreret under reduceret tryk til dannelselse af en olieagtig rest (10,7 g).

M 139 603 fremkom af ovenstående koncentrat ved følgende fremgangsmåde:

Den olieagtige rest (10,7 g) blev opløst i det minimale rumfang ethylacetat, og den fremkomne opløsning blev påført foroven på en søjle af neutral aluminiumoxid (Woelm N, 200 g, 18 x 4 cm) som en opslemning med ethylacetat. Søjlen blev først elueret med ethylacetat efterfulgt af 50% v/v blanding af ethylacetat og methanol og til sidst med methanol. Følgende fraktioner blev opsamlet, efter at opløsningsmiddelfronten var kommet ud af søjlen:

Fraktion nr.	Rumgang	Eluent	
	1	150 ml	ethylacetat
	2	150 ml	"
25	3	150 ml	"
	4	150 ml	"
	5	150 ml	ethylacetatmethanol 50% v/v
	6	150 ml	"
	7	150 ml	"
30	8	150 ml	"
	9	200 ml	methanol
	10	200 ml	"
	11	200 ml	"

Fraktionerne 7 til 11 inklusive blev ved tyndlags kromatografi på silicagel fremkaldt med 20% v/v acetone i petroleumsether (kogepunkt 60 - 80°C) påvist at indeholde M 139 603 ($R_F \sim 0,22$), og de blev derfor forenet og inddampet til dannelsen af en viskos gummi (840 mg), som blev yderligere rensat ved preparativ lagkromatografi på silica (Merck's "Kieselgel 60F250" - varemærke, 40 x 20 cm, 20 mm tyk) under anvendelse som eluent af en blanding af 20% v/v acetone i petroleumsether (kogepunkt 60 - 80°C). De u.v. synlige bånd ved R_F 0,22 (omtrentligt) blev skrabet fra de to plader og ekstraheret med ethylacetat, og ekstrakten blev inddampet til tørhed til dannelsen af en viskos gummi (240 mg), som krystalliserede ved tilsætning af petroleumsether (kogepunkt 60 - 80°C). Dette materiale blev omkrystalliseret af petroleumsether (kogepunkt 60 - 80°C) til dannelsen af M 139 603 som farveløse krystaller, der blev frafiltreret og tørret (210 mg), smeltepunkt 176 - 178°C. Det ultraviolette spektrum i ethanol viste absorptioner ved 234 nm ($\epsilon=12\ 900$) og 272 nm ($\epsilon=10\ 800$). Det infrarøde spektrum og det kernemagnetiske resonansspektrum var identiske med de, der fremkom af produktet fra eksempel 1.

Eksempel 4.

40 mg M 139 603 blev opløst i en blanding af 10 ml acetone og 2 ml vand, og der blev tilsat 1 ml 2N saltsyre, og blandingen blev omrørt kraftigt i 5 min. 20 ml destilleret vand blev tilsat, og blandingen blev ekstraheret i dichlormethan (2 x 10 ml). Det organiske lag blev fraskilt og vasket med 2N saltsyre, efterfulgt af destilleret vand. Dichlormethanlaget blev så koncentreret til dannelsen af en viskos gummi (33 mg) af den frie syre ækvivalent med M 139 603. Elementæranalyse fundet: C = 69,5, H = 9,1. Beregnet for $C_{35}H_{54}O_8$: C = 69,8, H = 9,0. I.R. spektrum i nujoll, som vist på fig. 3, indeholdende karakteristiske absorptioner ved 3 500, 1 765, 1 685, 1 650, 1 575 cm^{-1} . Det protonmagnetiske resonansspektrum i deuteriumchloroform er vist på fig. 4.

Eksempel 5

- Den frie syre ækvivalent med M 139 603 (30 mg) blev opløst i en blanding af tetrahydrofuran (7 ml) og vand (1 ml). Et alkalimetal hydroxyd XOH (2N, 2ml) blev sat til den vandige tetrahydrofuranblanding, som så blev omrørt kraftigt i 10 min. 10 ml vand blev tilsat, og opløsningen blev ekstraheret i ether (2 x 15 ml). Etherekstrakterne forenes og inddampes til dannelse af alkalimetalsaltene svarende til natriumsaltet M 139 603.
- 10 Når X = kalium, dannes kaliumsaltet, smeltepunkt 146 - 150°C, molekylformel $C_{35}H_{53}O_8K$ som vist ved massespektrometri, der viser en molekylær ion M^+ med massen 640,335 (beregnet for $C_{35}H_{53}O_8K = 640,338$) og ved elementær analyse: Fundet: C=65,7%, H = 8,5% (beregnet for $C_{35}H_{53}O_8K$: C = 65,6%, H = 8,3%).
- 15 Når X = rubidium, dannes rubidiumsaltet, smeltepunkt 95 - 120°C, molekylformel $C_{35}H_{53}O_8Rb$ som påvist ved masse spectrometri, der viser en molekylær ion M^+ med massen 686,279 (beregnet for $C_{35}H_{53}O_8Rb = 686,286$).

Eksempel 6

- 20 Evnen hos M 139 603 til at forøge mængden af propionat på bekostning af acetat i vomvæsken hos får blev vist som følger:
- 23 får blev holdt individuelt og fodret med samme kost af 1 kg tørrede græsterninger pr. dyr pr. dag opdelt på to fodringer pr. dag. Dyrene blev fordelt tilfældigt med 13 som negativ kontrol, 5 som positiv kontrol under anvendelse af monensin, en kendt vommanipulator, og 5 som skulle doseres med M 139 603. De behandlede dyr fik monensin eller M 139 603 oralt i en mængde af 0,5 mg/kg hver af fire på hinanden følgende dage, og prøver af vomvæske blev opsamlet med et maverør 6 timer efter behandlingen på den 4. dag. Vomvæskeprøverne blev så 30 analyseret for acetat og propionat som beskrevet i eksempel 2.

De fremkomne resultater var som følger:

Behandlingsgrupper	Molær% af total VFA	
	Acetat	Propionat
Negativ kontrol	69,9	19,8
5 Positiv kontrol- monensin 0,5 mg/kg	57,1	32,3
M 139 603 - 0,5 mg/kg	54,2	39,9

Acetatreaktionen for M 139 603 er signifikant ved $p < 0,02$ sammenlignet med den positive kontrol monensin, og propionatreaktionen for M 139 603 er signifikant ved $p < 0,001$ sammenlignet med den positive kontrol monensin.

P a t e n t k r a v

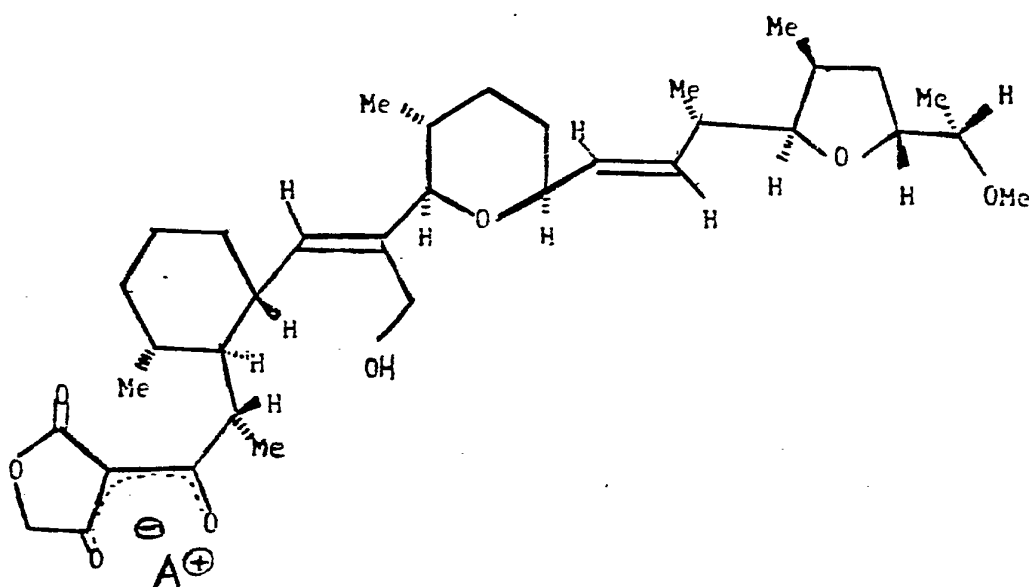
15

1. Polycyklisk furanforbindelse, kendetegnet ved, at den har formelen

20

25

30



hvor A er hydrogen eller et alkalimetall, idet natriumsaltet er forbindelsen betegnet M 139603.

35

- 0 2. Fremgangsmåde til fremstilling af forbindelserne ifølge
krav 1, k e n d e t e g n e t ved, dyrkning af en M 139 603
producerende stamme af *Streptomyces longisporoflavus*, i et
vandigt næringsmedium indeholdende en kilde til assimilerbart
5 kulstof under rystede aerobe betingelser ved en temperatur
mellem 22 og 32°C, ekstraktion af den fremkomne forgærings-
blanding med et med vand ublandbart organisk opløsningsmiddel
på sædvanlig måde og inddampning af opløsningsmidlet, om øn-
sket efterfulgt af isolering af M 139 603 i oprenset tilstand
10 i form af den frie syre eller et alkalimetalsalt.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved,
at den M 139 603 producerende stamme af *Streptomyces longi-*
sporoflavus er den, der identificeres som NCIB 11426.
- 15 4. Biologisk ren mikroorganismekultur til anvendelse ved ud-
øvelse af fremgangsåden ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t
ved, at den er en kultur af *Streptomyces longisporoflavus*
NCIB 11426.

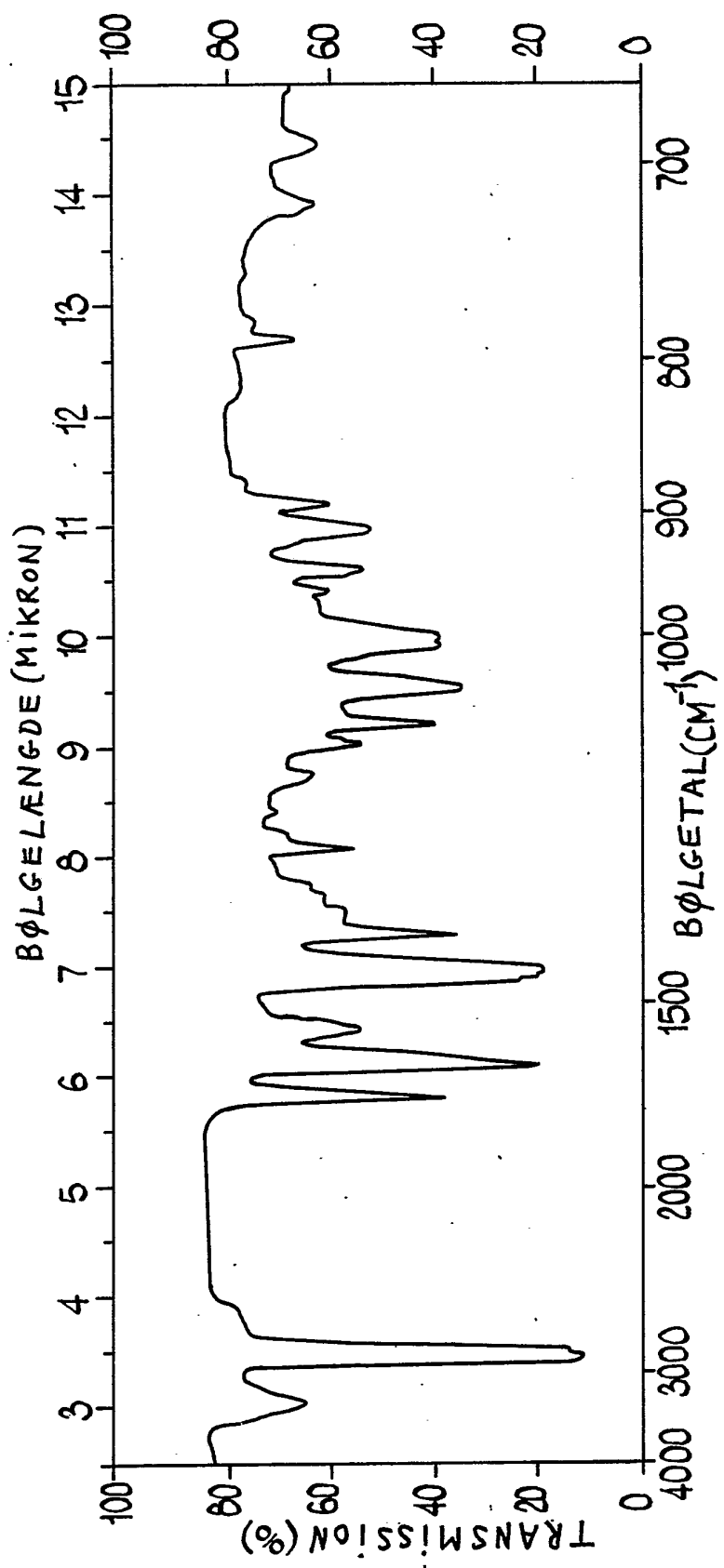


Fig. 1

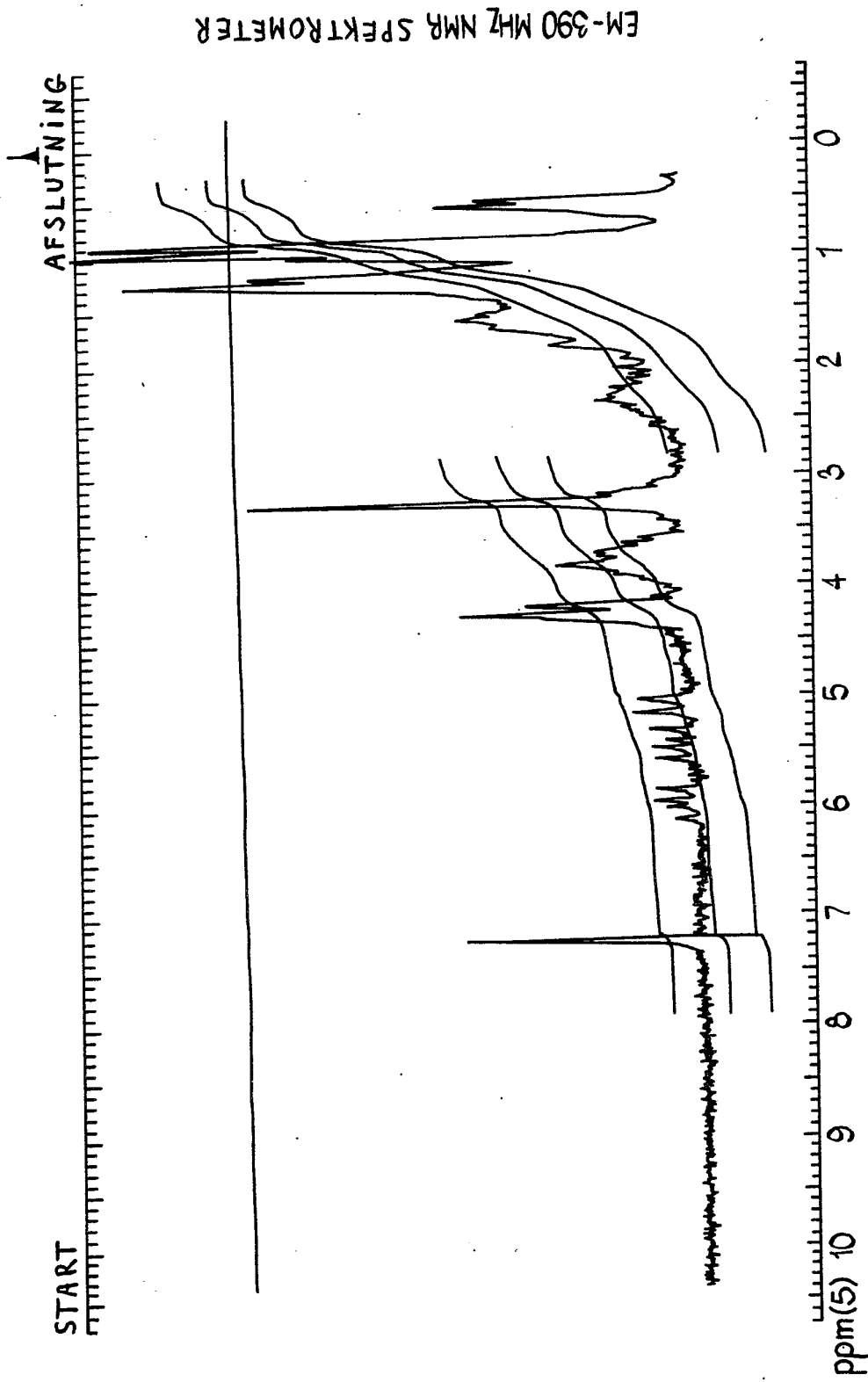


Fig. 2

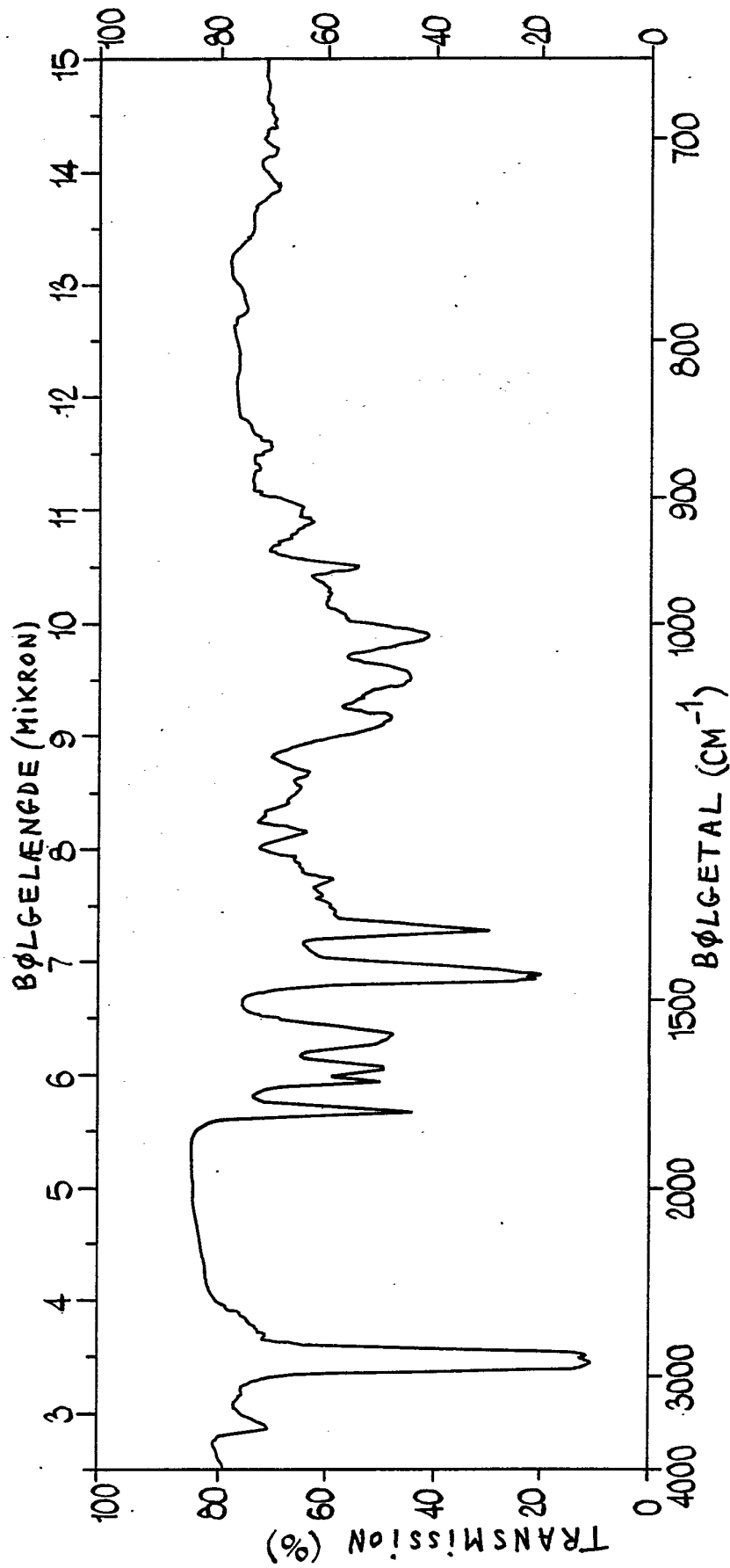


Fig. 3

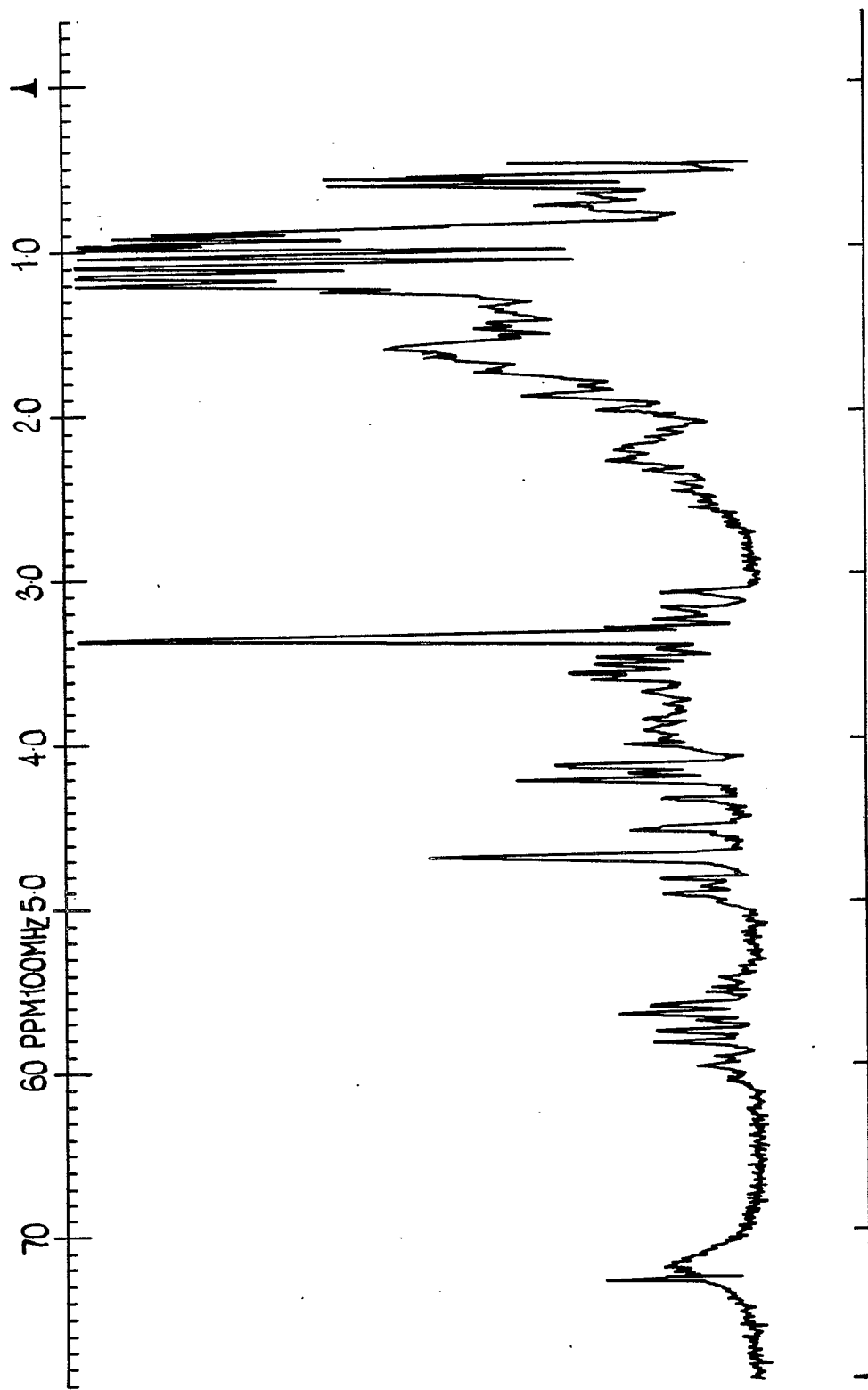


Fig.4