DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **218 388 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **C 12 P 17/08**
C 12 R 1/55

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 252 302 7	(22)	23.06.83	(44)	06.02.85
(31)	57415	(32)	15.07.82	(33)	BG

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1190 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Schlegel, Rolf, Dr. rer. nat., DD; Thrum, Heinz, Dr. sc., DD; Kleinwächter, Walter, Dr. rer. nat., DD; Tresselt, Dieter, Dr. rer. nat., DD; Iwanowa, Veneta B., Dipl.-Chem., BG; Geschewa, Raschel I., Dr. med., BG; Rusew, Pantscho P., Prof. Dr. med. vet. Dr. med., BG; Geschewa, Viktoria J., Dipl.-Biol., BG; Belomuschowa, Dolores W., BG; Radonowa, Neli A., Dipl.-Biol., BG

(54) Verfahren zur Herstellung eines antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines neuen Antibiotika-Komplexes, der gegen Pilze, Hefen und grampositive Bakterien aktiv ist und potentiell zur Bekämpfung von einigen Pflanzenkrankheiten geeignet ist. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung des antifungalen Antibiotika-Komplexes 165 unter Verwendung des Mikroorganismus Streptomyces hygroscopicus, Stamm 111-81. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch aerobe Submersfermentation des Stammes 111-81 in Medien mit geeigneten Einsatzstoffen der antifungale Antibiotika-Komplex 165 gebildet, mit geeigneten Methoden aus Mycel und Kulturfiltrat isoliert, gereinigt und nötigenfalls nachfolgend in die Komponenten 165-1, 165-2, 165-3, 165-4, 165-5, 165-A und 165-B getrennt wird.

ISSN 0433-6461

19 Seiten

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung eines antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes, der gegen Pilze, Hefen und grampositive Bakterien aktiv ist und aus sieben Komponenten besteht, die der Gruppe der nicht-polyenigen Makrolid-Antibiotika zugeordnet werden. Der Komplex kann zur Prophylaxe und Behandlung von einigen Krankheiten bei Pflanzen und Tieren eingesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Behandlung von Mykosen, die insbesondere beim tierischen und menschlichen Organismus als Folge der antibakteriellen Antibiotika-Therapie im Ansteigen begriffen sind, sind eine Reihe von Präparaten synthetischen als auch mikrobiellen Ursprungs mit antifungaler Wirkung entwickelt worden. Auch im Pflanzenschutz werden antifungale Stoffe verwendet, da insbesondere in Ländern mit intensiver Landwirtschaft die Schäden der durch Hefen und Pilze hervorgerufenen Pflanzenkrankheiten sehr hoch sein können.

Die Hauptvertreter der aus Mikroorganismen (insbesondere der Gattung Actinomycetales) isolierten Nichtpolyen-Antibiotika sind Melanosporin (Giorn. Microbiol. 7 (1959), 207), Niphimycin A und B (Antibiotiki(Moskau) 1974, 23), Niphithricin A

und B (J. Antibiotics (Tokyo) 34 (1981), 1107), Scopafungin (J. Am. Chem. Soc. 104 (1982), 4129), Copiamycin (Appl. Microbiol. 21 (1971), 986), Azalomycin F_1, F_3, F_4, F_5 (J. Antibiotics (Tokyo) 13 (1960), 51), Primycin (J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1974, 816). Auf Grund der unterschiedlichen chemischen Struktur ergeben sich verschiedene Wirkungsweisen und Anwendungsgebiete dieser Antibiotika.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist die Herstellung eines neuen antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes, der aus 7 Komponenten besteht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines neuen antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes aus leicht zugänglichen und billigen Einsatzstoffen mit Hilfe des Stammes Streptomyces hygroscopicus 111-81 zu beschreiben. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß die Biosynthese des Stammes Streptomyces hygroscopicus 111-81 bzw. seiner Mutanten oder Varianten auf Nährböden, die Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Mineralsalze enthalten, durgeführt, dieser Prozeß nach Erreichung des Maximums der antibiotischen Aktivität, gewöhnlich nach 72 bis 144 h beendet und die gebildete antibiotische Aktivität nach der Agar-Diffusionsmethode gegen die Testkultur Candida albicans und Bacillus subtilis bestimmt wird.

Der Stamm Streptomyces hygroscopicus, der 1971 in der VR Bulgarien isoliert wurde, ist in der bulgarischen Mikrobensammlung im Staatlichen Institut für Arzneimittelkontrolle (DIKLS) in Sofia unter der Nummer 111-81 hinterlegt worden. Die morphologischen und physiologisch-biochemischen Eigenschaften des Stammes Streptomyces hygroscopicus 111-81 sind in einem Patent beschrieben, das beim Amt für Erfindungs- und Patentwesen der DDR am 26. 2. 1982 unter dem Aktenzeichen WP C 12 P/237 725/8 registriert worden ist.

Zur Isolierung des antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes (siehe Schema 1) wird die Kulturflüssigkeit bei einem pH-Wert von 7,0 bis 7,5 zentrifugiert, das feuchte Mycel mehrfach mit Methanol extrahiert, der Extrakt im Vakuum konzentriert und die resultierende wäßrige Restlösung mit n-Butanol extrahiert. Das ebenfalls aktive Kulturfiltrat wird mehrfach mit n-Butanol extrahiert, der erhaltene Butanolextrakt nach Konzentrierung mit dem Extrakt des Mycels vereinigt und im Vakuum bis zu einem öligen Rückstand eingeengt. Nach Auflösen in Methanol wird der antifungal wirksame Antibiotika-Komplex durch Versetzen mit einer Mischung Aceton/Ether in Form eines gelben Niederschlages erhalten, der gegebenenfalls durch Säulenchromatographie weiter gereinigt und aufgetrennt werden kann, während Begleitantibiotika wie Azalomycin B, Polyether- oder Polyenantibiotika in Lösung verbleiben.

Das antibiotische Spektrum des antifungalen Antibiotika-Komplexes wird gegen eine bestimmte Zahl von Mikroorganismen mit Hilfe der Agar-Diffusionsmethode nach 5tägiger Kultivierung des Bildners bestimmt und ist in Tabelle 4 dargestellt. Hervorzuheben ist die Wirksamkeit in vitro gegen Fusarium oxysporum, dem Erreger der Fäulniskrankheit bei Kartoffeln und anderen Pflanzen, gegen Fusarium graminearum und Fusarium culmorum, die als Getreideschädlinge und Erreger der Kernobstfäule in Erscheinung treten, gegen Botrytis cinerea, dem Erreger des Grauschimmels bei Weintrauben, sowie gegen Candida albicans und Alternaria tennius.

Im weiteren Ausbau besteht das Verfahren zur Herstellung des antifungalen Antibiotika-Komplexes aus folgenden Schritten: In 300 ml Erlenmeyer-Kolben werden je 50 ml flüssiger Nährboden eingefüllt und nach der Sterilisation mit einer Sporensuspension von 15 bis 20tägigen Kulturen des Stammes Streptomyces hygroscopicus 111-81 beimpft. Die Kultivierung wird auf einem Schüttelapparat bei 180 bis 200 U/min und einer Temperatur von 26 bis 32 °C im Verlauf von 40 bis 48 h durchgeführt. Das gewonnene vegetative Material wird in 1 oder 2 l Erlenmeyer-Kolben übertragen, die mit 200 bzw. 400 ml Nährboden gefüllt sind. Die Kultivierung wird unter den oben genannten

Bedingungen 4 bis 5 Tage lang durchgeführt. Der Fermentationsprozeß wird nach Erreichen der maximalen antibiotischen Aktivität beendet, die nach der Agar-Diffusionsmethode mit den Testkulturen Candida albicans und/oder Bacillus subtilis nach Zusatz von Dimethylformamid zur Kulturlösung bestimmt wird. Zur Gewinnung des Feuchtmycels, das die Hauptmenge des antifungalen Komplexes enthält, wird der pH-Wert der Kulturflüssigkeit mit anorganischer Säure auf pH 7,0 bis 7,5 eingestellt, wonach filtriert, zentrifugiert oder separiert wird. Das feuchte Mycel wird dreimal mit Methanol extrahiert, die vereinigten Extrakte konzentriert und im Vakuum bei 40 °C bis zum wäßrigen Rückstand konzentriert und anschließend mit n-Butanol extrahiert. Die im Kulturfiltrat vorhandene antibiotische Aktivität wird bei pH 7,5 mit n-Butanol dreimal extrahiert. Die aus dem Mycel und dem Kulturfiltrat erhaltenen Butanolextrakte werden vereinigt oder getrennt weiterverarbeitet. Die vereinigten Butanolextrakte werden dreimal mit Wasser ausgewaschen und im Vakuum bei 50 °C bis zum Sirup konzentriert, der in wenig Methanol gelöst wird. Aus dieser Methanollösung wird der antifungale Antibiotika-Komplex durch Fällen mit Aceton/Ether (10 : 1) als gelblicher Niederschlag erhalten, der mit Ether ausgewaschen und getrocknet wird. Die weitere Reinigung des Antibiotika-Komplexes sowie die Trennung in die Einzelkomponenten wird mit Hilfe der Säulenchromatographie unter Verwendung von Kieselgel oder anderen Adsorptionsmitteln und Chloroform/Methanol/Wasser-Gemischen als Elutionsmittel durchgeführt. Das Schema zur Extraktion, Reinigung und Trennung des antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes ist in Schema 1 dargestellt.

Der Antibiotika-Komplex 165 stellt ein schwach gelbliches amorphes Pulver dar, das in niederen Alkoholen, Dimethylformamid, Essigsäure, Pyridin und Dimethylsulfoxid löslich ist. Unlöslich ist der Komplex in Wasser, Aceton, Benzen, Ether, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff und anderen organischen Lösungsmitteln. Das UV-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 204 nm, 226 nm, 233 nm und 240 nm (Schulter). Im IR-Spektrum sind folgende charakteristische Absorptionsbanden zu erkennen:

1710 cm^{-1} (Laktonring), 1635, 1600 cm^{-1} (NH-Gruppe), 1665, 985 cm^{-1} (konjugierte Doppelbindungen), 3350, 3200 cm^{-1} (OH- und NH-Gruppen), 2900 cm^{-1} (CH_2- und CH_3-Gruppen).

Die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten in verschiedenen Lösungsmittelsystemen zeigt, daß der Antibiotika-Komplex 165 aus sieben Komponenten mit verschiedenen R_F-Werten besteht (Tab. 1). Die Farbreaktionen der einzelnen Komponenten mit verschiedenen Anfärbereagenzien sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Ein Vergleich der chemisch-physikalischen Eigenschaften der sieben Komponenten des antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes ist in Tabelle 3 dargestellt. Den Vergleich der minimalen Hemmkonzentration der sieben Komponenten des Antibiotika-Komplexes 165 zeigt Tabelle 5.

Die Untersuchungen zur chemischen Struktur des Antibiotika-Komplexes wurden mit der Hauptkomponenten des Komplexes, 165-3, durchgeführt. Die physikalisch-chemischen Meßmethoden in Kombination mit chemischen Methoden zeigen, daß 165-3 eine Substanz mit einem hohen Molekulargewicht und einer komplizierten chemischen Struktur ist. Auf Grund des ^{13}C-NMR-, ^{1}H-NMR-, UV-, IR-, Massen-Spektrums und anderer physikalisch-chemischer Eigenschaften kann der Schluß gezogen werden, daß das Molekül der Komponente 165-3 aus 40 bis 50 Kohlenstoffatomen, einem Laktonring und 4 bis 5 Doppelbindungen besteht. Die intensiven UV-Banden bei 226 und 233 nm (mit Schulter bei 240 nm) zeigen, daß zwei Doppelbindungen konjugiert vorliegen. Im 50 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum (Lösungsmittel DMSO-D_6) liegen 8 bis 10 Signale der olefinischen C-Atome zwischen 128,7 und 135,1 ppm. Ihre Dublettstruktur im off-Resonanzspektrum läßt darauf schließen, daß die Doppelbindungen mit Wasserstoffatomen besetzt sind. Im Bereich von 64,3 bis 77,5 ppm finden sich 10 bis 12 Signale, die auf Grund ihrer chemischen Verschiebung H-$\overset{|}{C}$-O- Gruppierungen zuzuordnen sind. Weiterhin sind im ^{13}C-Spektrum Signale einer Laktongruppe (174,3 ppm), eines Guanidinrestes (156,4 ppm), eines Hemiketal-C-Atoms (98,5 ppm) sowie von C-N, -CH_2- und -CH_3 Gruppen vorhanden. Im Unterschied zu den ^{13}C-NMR-Spektren von Copiamycin (J. An-

tibiotics (Tokyo) 35 (1982), 1480), Niphimycin (Helv. Chim. Acta 66 (1983), 92), Niphithricin und Scopafungin ist in der Komponente 165-3 im Bereich von 168 bis 177 ppm nur das Laktonsignal bei 174,3 ppm vorhanden, so daß das Vorhandensein eines Malonylhalbesters, wie in den genannten Antibiotika, ausgeschlossen werden kann. Im ^{1}H-NMR-Spektrum des 165-3 weist ein charakteristisches Signal bei 2,73 ppm (in DMSO-D_6 in ein Dublett aufgespalten) auf eine N-Methylgruppe hin, die in Übereinstimmung mit den zitierten Literaturangaben einem Methylguanidinrest zugeordnet wird. Der chemische Beweis für das Vorhandensein einer Guanidingruppe wurde nach schwacher Hydrolyse und Oxidation der Komponenten 165-3 geführt, in dem ein Methylguanidin nachgewiesen wurde. Auch das Absorptionsmaximum bei 204 nm kann der Guanidingruppe (Azomethin) zugeordnet werden. Die charakteristischen Farbreaktionen mit Sakaguchis Reagenz und mit N-Bromsuccinimid weisen ebenfalls auf die Anwesenheit eines Guanidin-Restes in der Komponenten 165-3 hin. Die oben angeführten Beweise beziehen sich auch auf die anderen Komponenten des Antibiotika-Komplexes. Nach saurer Hydrolyse der Komponente 165-3 wurde ein Neutralzucker isoliert, der durch Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie (Tab. 6) als der Hexosezucker Glucose identifiziert wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Moleküle der Komponente 165-3 aus 40 bis 50 Kohlenstoffatomen, die den makrocyclischen Ring des Aglykons bilden, aufgebaut sind. Das Aglykon ist mit einem Molekül Glucose und einem Guanidinrest verbunden. Die Ergebnisse zeigen, daß es sich um ein makrolides Antibiotikum mit antifungaler und antibakterieller Wirkung handelt, das aber auf Grund des UV-Spektrums nicht zur Gruppe der Polyenantibiotika gehört. Die Anwesenheit einer Hexose (Glucose) in den Strukturen des Antibiotika-Komplexes unterscheidet diesen von den Vertretern der anderen nichtpolyenigen Makrolidantibiotika, die in der Literatur beschrieben sind. Primycin ist ein Makrolidantibiotikum, dessen Aglykon mit der Pentose D-Arabinose verbunden ist, während Niphimycin, Niphithricin, Copiamycin und Scopafungin keinen Zuckerrest enthalten. Außerdem konnte im Antibiotika-Komplex 165 kein

Malonylhalbester nachgewiesen werden, wie kürzlich für Niphimycin, Copiamycin und Scopafungin. Bezüglich der anderen nichtpolyenigen Makrolidantibiotika, die ähnliche biologische und physiko-chemische Eigenschaften mit dem hier untersuchten Antibiotika-Komplex haben, liegen keine Angaben über die chemische Struktur vor.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

1. Der Streptomyceten Stamm 111-81 wird auf Maisnährboden N 6 oder SRI-Nährboden mit Glucose 15 Tage lang bei einer Temperatur von 26 bis 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; $CaCO_3$ 2,0. Der pH-Wert nach der Sterilisation bei 115 °C liegt bei 6,8 bis 7,0. Die Kultivierung wird auf einem Schüttelapparat mit 200 U/min bei 27 bis 32 °C im Verlauf von 40 Stunden durchgeführt. Das gewonnene vegetative Mycel wird zur Beimpfung eines 10 l-Fermentors verwendet, der 6 l Nährboden mit folgender Zusammensetzung (g/l) enthält: Glucose 20,0; Sojamehl 10,0; Maisextrakt 5,0; NaCl 5,0; $CaCO_3$ 3,0; oder Glucose 25,0; Sojaschrot 15,0; Kaseinhydrolysat 1,0; $CaCO_3$ 3,0. Der pH-Wert nach der Sterilisation liegt bei 6,8 bis 7,1. Der Prozeß verläuft bei 26 bis 32 °C, bei einer Rührgeschwindigkeit von 325 U/min und einer Belüftung von 1 l Luft/1 l Nährboden/min. Nach 4 bis 5tägiger Kultivierung wird die maximale Aktivität erreicht. Die antibiotische Aktivität wird mit den Testkeimen Bacillus subtilis und Candida albicans bestimmt. Nach Beendigung der Fermentation wird die Kulturflüssigkeit bei einem pH-Wert von 7,0 bis 7,5 durch Separieren in Mycel und Kulturfiltrat getrennt.

2. Das feuchte Mycel, das nach Beispiel 1 gewonnen wurde, wird mit Wasser ausgewaschen und dreimal mit Methanol im Ge-

wichtsverhältnis 1 : 2 (Mycel : Methanol) extrahiert. Die vereinigten Methanolextrakte werden im Vakuum bei maximal 40 °C bis zum wäßrigen Rückstand konzentriert und anschließend mit n-Butanol reextrahiert. Der Butanolextrakt wird dreimal mit entionisiertem Wasser ausgewaschen und im Vakuum bei Temperaturen bis 50 °C bis zu einem sirupartigen Rückstand konzentriert, der in Methanol gelöst wird. Aus der Methanollösung wird der rohe Antibiotika-Komplex durch Versetzen mit einer Mischung Aceton/Ethylether (10 :1, v/v) ausgefällt. Der Niederschlag wird zwei- bis dreimal mit Ether ausgewaschen und im Vakuum-Trockenschrank bei 35 °C getrocknet. Der Antibiotika-Komplex wird als hellgelbes Rohprodukt gewonnen. Die Ausbeute aus dem Mycel von 20 l Kulturflüssigkeit beträgt 8 g Rohsubstanz.

3. 20 l Kulturfiltrat, das nach Beispiel 1 durch Separieren der Kulturflüssigkeit erhalten wurde, werden dreimal mit n-Butanol extrahiert. Die vereinigten Butanolextrakte werden mit entionisiertem Wasser ausgewaschen und im Vakuum bei Temperaturen bis 50 °C bis zu einem sirupartigen Rückstand konzentriert, der in Methanol gelöst und wie in Beispiel 2 angegeben weiter verarbeitet wird. Die Ausbeute aus 20 l Kulturfiltrat beträgt 1 g Rohantibiotika-Komplex.

4. Zur Trennung des Antibiotika-Komplexes, der nach Beispiel 2 und 3 gewonnen wurde, wird die Rohsubstanz der Säulenchromatografie an Kieselgel (Korngröße 0,063 bis 0,2 mm) unterworfen. Die Elution erfolgt mit der Unterphase einer Mischung von Chloroform : Methanol : Wasser im Verhältnis 175 : 100 : 50 (v/v). Mit dieser beweglichen Phase werden die Komponenten 165-1 bis 165-5 eluiert. Zur Elution der polareren Komponenten 165-A und 165-B wird das Mischungsverhältnis Chloroform : Methanol : Wasser zu 175 : 175 : 50 verändert. Die Fraktionen werden durch Dünnschichtchromatografie und im biologischen Test überprüft; gleiche Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum bis zum Rückstand konzentriert. Die trocknen Rückstände werden in 1 bis 5 ml Methanol gelöst und mit Aceton/Ether-

Gemischen zu einem festen, amorphen Niederschlag umgewandelt. Bei Anwendung von 2 g Antibiotika-Komplex werden folgende Mengen der einzelnen Komponenten erhalten:
165-1: 50 mg, 165-2: 70 mg, 165-3: 600 mg,
165-4: 95 mg, 165-5: 70 mg, 165-A: 20 mg, 165-B: 20 mg.
Die R_f-Werte der Komponenten im Dünnschichtchromatogramm sind in Tab. 1 dargestellt.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes auf mikrobiologischem Wege, gekennzeichnet dadurch, daß der Mikroorganismus Streptomyces hygroscopicus, Stamm 111-81, unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen sowie Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur zwischen 26 und 32 °C während eines Zeitraumes von 3 bis 6 Tagen kultiviert wird und der dabei gebildete antifungal wirksame Antibiotika-Komplex isoliert wird, indem entweder aus dem Mycel oder aus dem Kulturfiltrat oder aus beiden extrahiert, nachfolgend mit bekannten Methoden konzentriert, mit einem Lösungsmittelgemisch ausgefällt und gegebenenfalls durch Säulenchromatographie weiter gereinigt und in die Einzelkomponenten aufgetrennt wird.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß zum Ausfällen des Antibiotika-Komplexes ein Lösungsmittelgemisch aus Aceton-Ether verwendet wird, wobei der Volumenanteil des Acetons mindestens dreimal so groß ist wie der des Ethers.

Hierzu 8 Seiten Tabellen bzw. Schema.

Schema 1

Schema zur Extraktion, Reinigung und Trennung des antifungal wirksamen Antibiotika-Komplexes aus Streptomyces hygroscopicus 111-81

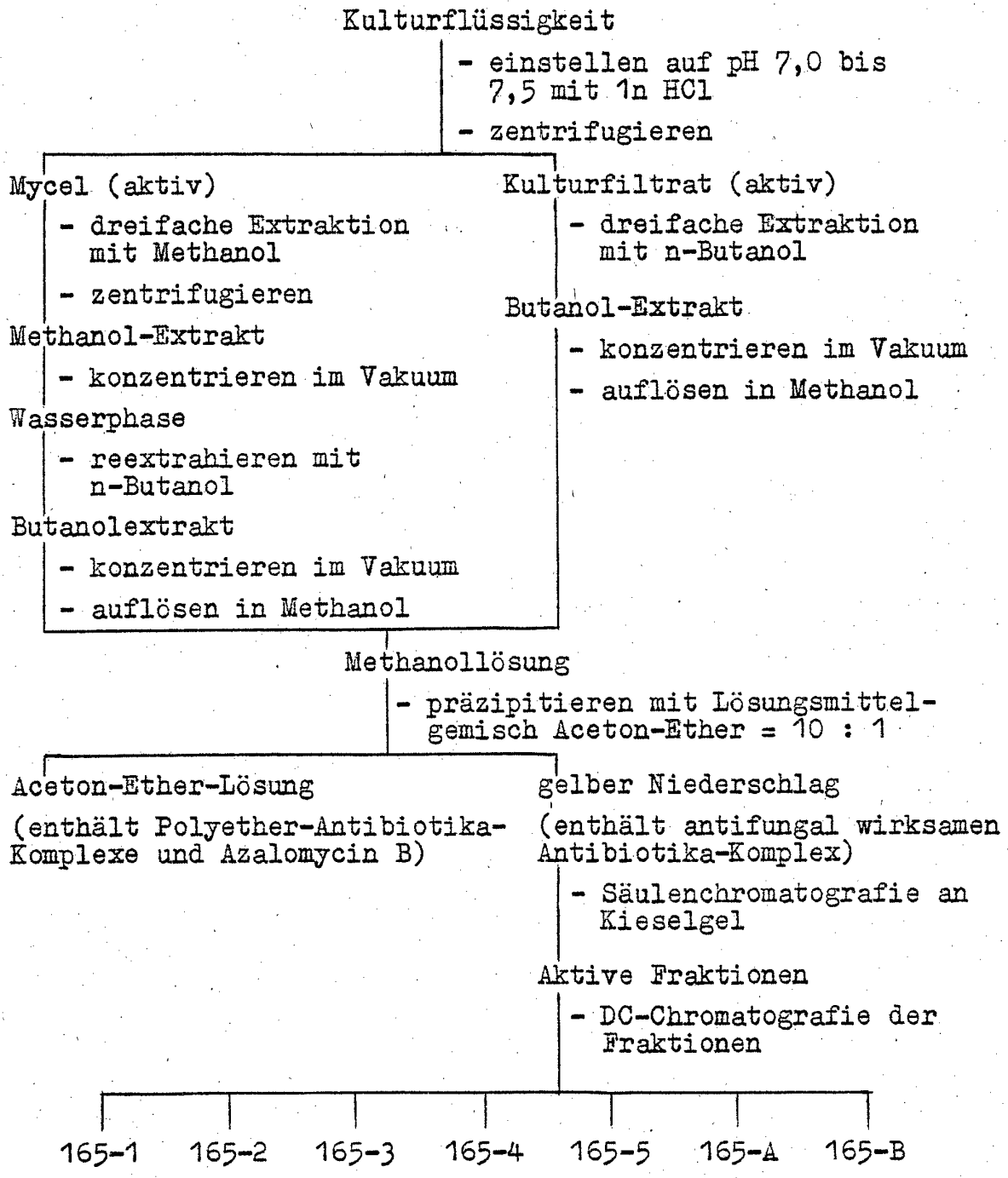


Tabelle 1
Dünnschichtchromatografie des Antibiotika-Komplexes 165 in verschiedenen Lösungsmittelsystemen auf Kieselgelplatten

Lösungsmittelsystem	Rf-Werte der Komponenten						
	165-1	165-2	165-3	165-4	165-5	165-A	165-B
1. n-Butanol-Ethanol-Wasser = 5:1:4	0,18	0,37	0,57	0,65	0,72	0,11	0,08
2. Chloroform-Methanol-Wasser = 2:2:1	0,21	0,25	0,30	0,37	0,54	0,18	0,14
3. Chloroform-90 % Methanol Essigsäure = 15:5:1	0,24	0,26	0,32	0,37	0,48	0,22	0,20
4. Chloroform-Methanol-Wasser = 35:20:10	0,22	0,29	0,31	0,42	0,55	0,18	0,16
5. Chloroform-Essigsäure-Wasser = 3:35:0,5	0,46	0,50	0,52	0,57	0,61	0,44	0,42
6. n-Propanol-Wasser = 8,5:1,5	0,23	0,25	0,36	0,41	0,70	0,14	0,10

Tabelle 2
Farbreaktionen der sieben Komponenten des Antibiotika-Komplexes 165 auf Kieselgel

Reagenz	165-1	165-2	165-3	165-4	165-5	165-A	165-B
Vanillin-Schwefelsäure	blau	dunkel-violett		~	~	~	~
Konz. Schwefelsäure	braun	braun	braun	braun	braun	braun	braun
Konz. Salzsäure	rosa	grün	rosa	grün	blau-grün	rosa	rosa
Ehrlich-Reagenz	rosa	grün	rosa	grün	grün	rosa	rosa
Dragendorffs-Reagenz	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
Sakaguchis Reagenz	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot
Molisch Reaktion	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb

Negativ sind die Reaktionen mit Anthron-Reagenz, Ninhydrin, Biuret, Ferrichlorid und Liebermann-Buchard-Reagenz.

Tabelle 3
Physikalisch-chemische Charakterisierung der sieben Komponenten des Antibiotika-Komplexes 165

		165-1	165-2	165-3	165-4	165-5	165-A	165-B
Äußere Form		Amorphes Pulver für sämtliche Komponenten						
Farbe		gelb	weiß	weiß	weiß	gelb	creme	creme
Elementare Zusammensetzung in %	C	57,45	57,98	57,80	59,44	57,69	47,03	45,70
	H	9,65	8,94	8,51	9,31	8,61	6,17	7,85
	N	4,35	3,98	4,41	4,42	4,40	3,08	2,02
	O	28,55	29,10	29,28	26,83	29,30	43,72	44,43
Löslichkeit		- löslich in niederen Alkoholen, Pyridin, Essigsäure, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid. - nicht löslich in Wasser, Aceton, Chloroform, Ether, Ester, Ethylacetat, Benzen usw.						

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	165-1	165-2	165-3	165-4	165-5	165-A	165-B
UV-Spektrum Absorbtionsmaxima in nm	204 226 233 240	204 226 233 240	204 226 233 240	204 226 233 240	204 226 233 240	204 226 233 240	204 226 233 240
$E^{1\%}_{1cm}$ bei: 204 nm	214	195	200	206	219	171	170
226 nm	228	219	262	236	222	139	94
240 nm	158	168	191	176	153	89	72
Optische Drehung (in Methanol), α_D	+ 25,8°	+ 28°	+ 35,9°	+ 33,4°	+ 28,2°	+ 20,5°	-
Schmelzpunkt °C	125 bis 127	115 bis 118	126 bis 128	113 bis 115	112 bis 114		
Äquivalent-Gewicht	1600 ± 60						

Tabelle 4

Antimikrobielles Spektrum des Antibiotika-Komplexes 165 und der Komponente 165-3 (Agar-Diffusionsplattentest)

Test-Organismus	Minimale Hemmkonzentration MHK (µg/ml)	
	Antibiotika-Komplex 165	Komponente 165-3
1. Staphylococcus aureus 209 P	12	6
2. Bacillus subtilis L-2	12	6
3. Bacillus pseudoanthracis	25	6
4. Bacillus mycoides	25	12
5. Bacillus mycoides B-5	25	6
6. Bacillus idosus	25	12
7. Sarcina citrina	12	1
8. Saccharomyces cerevisiae	10	6
9. Candida albicans	10	12
10. Candida stellatoidea	25	25
11. Candida tropicalis	15	25
12. Candida krusei	15	25
13. Candida guilliermondii	25	25
14. Candida utilis	5	6
15. Fusarium lini	7	x)
16. Fusarium graminearum	25	12
17. Fusarium oxysporum	25	12
18. Fusarium culmorum	25	12
19. Penicillium chryzogenum	20	x)
20. Botrytis cinerea	20	20
21. Alternaria tennius	15	x)
22. Pullularia pullulans	5	x)

x) nicht getestet

Tabelle 5
Vergleich der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der sieben Komponenten des Antibiotika-Komplexes 165 (µg/ml)

Test-Organismus	Komponente						
	165-1	165-2	165-3	165-4	165-5	165-A	165-B
Bac. subtilis 6633	50	10	5	10	10	80	80
Sacch. cerevisiae	100	25	6	50	100	100	100

Tabelle 6
Massenspektrum des Pentaacetates des Neutralzuckers, isoliert aus der Antibiotika-Komponente 165-3

m/e gefunden	Intensität %	berechnet	Summenformel des Fragmentes
390			M
273,0965	0,8	,0974	$C_{12}H_{17}O_7$
242,0757	3	,0790	$C_{11}H_{14}O_6$
215,0552	1	,0556	$C_9H_{11}O_6$
200,0665	3	,0685	$C_9H_{12}O_5$
184,0734	8	,0736	$C_9H_{12}O_4$
170	6		$C_8H_{10}O_4$
157,0494	34	,0501	$C_7H_9O_4$
145	18		$C_6H_6O_4$
115,0402	46	,0395	$C_5H_7O_3$
103	22		$C_4H_7O_3$
101,0601	28	,0602	$C_5H_9O_2$
79	70		
73	16		
43	100		