



⑫ PATENTSCHRIFT A5



615 221

⑯ Gesuchsnummer: 9546/74

⑬ Inhaber:
RAMOT University Authority for Applied
Research and Industrial Development Ltd. c/o
Legal Adviser, Ramat Aviv/Tel Aviv (IL)

⑭ Anmeldungsdatum: 10.07.1974

⑭ Erfinder:
Eugene Rosenberg, Raanana (IL)

⑮ Priorität(en): 10.07.1973 IL 42701

⑯ Vertreter:
Patentanwaltsbüro Eder & Cie., Basel

⑯ Patent erteilt: 15.01.1980

⑯ Patentschrift
veröffentlicht: 15.01.1980

⑭ Verfahren zur Herstellung eines Antibiotikums.

⑭ Zur Herstellung eines Antibiotikums wird ein geeigneter Stamm Mikroorganismus *Myxococcus Xanthus*, vorzugsweise von der Rinde eines Olivenbaumes isoliert, unter aeroben Bedingungen gezüchtet. Das Züchten erfolgt z.B. in einem Kultur-Medium, das bis zu 1% eines enzymatischen Aufschlusses von Kasein und Magnesiumsulfat enthält, wobei die Kultur durch Schütteln belüftet wird. Das Antibiotikum wird dann hauptsächlich während eines späten Stadiums der exponentiellen Wachstumsphase und während der stationären Wachstumsphase erzeugt. Das gebildete Antibiotikum wird mit Chloroform aus der wässrigen Lösung abgetrennt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines Antibiotikums, dadurch gekennzeichnet, dass ein geeigneter Stamm Mikroorganismen der Art *Myxococcus xanthus* unter aeroben Bedingungen gezüchtet wird, bis er eine Menge Antibiotikum erzeugt hat, und dass dieses anschliessend gereinigt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Myxococcus xanthus* TA ATCC Nr. 31046 gezüchtet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Myxococcus xanthus* FB ATCC Nr. 25232 gezüchtet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen unter Luftzufuhr in einem flüssigen Nährmittel gezüchtet werden, bis die Kultur eine späte Phase des exponentiellen Wachstums oder einen stationären Zustand erreicht.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen in einem Kultur-Medium gezüchtet werden, das bis zu 1% eines enzymatischen Aufschlusses von Kasein und Magnesiumsulfat enthält.

Die Myxokokken sind gram-negative, nicht-photosynthetische, prokaryotische Mikroorganismen, die sich durch Gleiten auf festen Oberflächen frei fortbewegen können. Unter bestimmten Ernährungsbedingungen erleiden sie einen komplexen Lebens-Zyklus, der aus Aggregation, Fruchtkörper- und Myxosporenbildung besteht.

Über die mögliche Erzeugung von Antibiotika mit Myxbakterien bestanden bisher gegensätzliche Ansichten. Es wurde berichtet, dass der *Myxococcus virescens* während des Endes der exponentiellen Wachstumsphase ein Antibiotikum in das Kultur-Medium aussondere. Dieses Antibiotikum wurde jedoch wegen seiner offensichtlichen Unstabilität nicht gereinigt und weiter verarbeitet. Andere Autoren kamen zu andern Ergebnissen und berichten, dass *Myxococcus virescens* ein Antibiotikum erzeuge, das gegen *Aerobacter aerogenes* wirksam sei. Dagegen konnten Kletter und Henis (Can. J. of Microbiology 9, 577) bei zellenfreien Filtraten von *Myxococcus fulvus* oder *Myxococcus virescens* weder gegen gram-positive noch gegen gram-negative Bakterien eine antibiotische Wirksamkeit feststellen.

Der einzige klare und direkte, vorbekannter Nachweis der Erzeugung eines Antibiotikums durch Myxbakterien wurde von Petersen et al. (Can. J. Mikrobiol. 12, 221) erbracht. Diese Autoren stellten fest, dass eine bestimmte Art von *Sorangium* ein Breit-Spektrum-Antibiotikum, nämlich 1-hydroxy-6-methoxyphenazin-5,10 dioxyd (Myxin) erzeugt. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Myxin eine schnelle Degradation der DNS in *E.coli*-Bakterien bewirkt.

Die vorliegende Erfindung betrifft nun ein Verfahren zur Herstellung eines Antibiotikums. Dieses ist erfindungsgemäss dadurch gekennzeichnet, dass ein geeigneter Stamm Mikroorganismen der Art *Myxococcus xanthus* unter aeroben Bedingungen gezüchtet wird, bis er eine Menge Antibiotikum erzeugt hat, und dass dieses anschliessend gereinigt wird.

Es wurde eine Anzahl von Stämmen der Art *Myxococcus xanthus* untersucht, die, abgesehen von einigen degenerierten Mutanten, alle zur Gewinnung eines Antibiotikums, das im folgenden als Antibiotikum TA bezeichnet wird, verwendet werden konnten. Ein Stamm, der im folgenden als *Myxococcus xanthus* TA bezeichnet wird, wurde mit dem Standard-Verfahren der Peterson-Methode (Microbiology, 3B, 1969, Academic Press, N. Y., USA, p. 85-210) aus der Rinde eines Olivenbaums

isoliert. Eine Kultur dieses Mikroorganismus wurde der American Type Culture Collection in Rockville, Maryland, USA, zugestellt, ist dort am 10. Juni 1974 eingegangen und ist dort auf Verlangen unter der Nummer 31046 erhältlich.

- 5 Ein anderer untersuchter, an sich bereits bekannter Stamm, der bei der American Type Culture Collection unter der Nummer 25232 hinterlegt ist, wird im folgenden als *Myxococcus xanthus* FB bezeichnet. *Myxococcus xanthus* TA und TB können etwa auf einem Kultur-Medium wachsen, das eine
 10 Mischung von Aminosäuren enthält. Als Kultur-Medium können jedoch auch gewisse Proteine, wie etwa Kasein verwendet werden. Als besonders vorteilhaftes und preisgünstiges Kultur-Medium hat sich ein enzymatischer Aufschluss von Kasein erwiesen, der unter dem Namen Casiton bekannt ist. Dabei handelt es sich um einen pankreatischen Aufschluss von Kasein. Andere pankreatische Aufschlüsse von Kasein, wie etwa NZ-Kase sind ebenfalls sehr gut geeignet.

Für viele Versuche wurde ein im folgenden als CT 1% bezeichnetes Kultur-Medium mit folgender Zusammensetzung
 20 verwendet: Casiton-1% (Difco), Magnesiumsulfat-0,1 Gew.-%. Die Zucht wurde im allgemeinen bei einer Temperatur von 32 °C unter Luftzufuhr durchgeführt.

Wie schon erwähnt, wurde das Antibiotikum TA aus Kulturen von verschiedenen Stämmen *Myxococcus xanthus* gewonnen. Im folgenden soll nun jedoch zur Erläuterung der Erfahrung die Gewinnung des Antibiotikums aus *Myxococcus xanthus* TA und *Myxococcus xanthus* FB näher beschrieben werden.

Das erfindungsgemäss Verfahren und die Eigenschaften
 30 des erzeugten Antibiotikums werden zusätzlich anhand der Zeichnung illustriert. In dieser zeigen
 die Fig. 1 ein Eluierungs-Profil des Kieselsäure-Chromatographie-Schrittes,
 die Fig. 2 ein Ultraviolet-Absorptions-Spektrum des Antibiotikums TA und
 35 die Fig. 3 ein Infrarot-Spektrum des letzteren.

Der *Myxococcus xanthus* wird unter aeroben Bedingungen gezüchtet, die etwa dadurch erreicht werden können, dass die Kultur zur Belüftung konstant geschüttelt wird, oder dass Luft
 40 durch das Kultur-Medium enthaltende Flüssigkeit geblasen wird. Das Antibiotikum TA wird dann während eines späten Stadiums der exponentiellen Wachstumsphase und während der stationären Wachstumsphase der Kultur erzeugt. Durch Testen der Mikroorganismen mit Glycerin kann die Bildung
 45 von Myxosporen ausgelöst werden. Auch die Sporen erzeugen das gleiche Antibiotikum. Die Mikroorganismen können auch auf einem festen Stoff gezüchtet werden und erzeugen auch in diesem Fall das gleiche Antibiotikum.

Wie noch erläutert wird, nimmt die Produktion des Antibiotikums nach einer gewissen Zeit ab, so dass die Antibiotikum-Menge dann ungefähr konstant bleibt. In diesem Zeitpunkt wird die Zucht vorteilhafterweise abgebrochen und das Antibiotikum mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel aus der wässrigen Lösung extrahiert und gereinigt. Auf diese
 55 Weise erhält man das reine Antibiotikum TA in Form eines weissen, festen Stoffes, der in Chloroform und Methanol lösbar ist. Das Antibiotikum TA ist in Wasser ebenfalls so weit lösbar, dass antibiotisch wirksame Lösungen hergestellt werden können. Das reine Antibiotikum TA ist sowohl in saurer als auch in
 60 basischer Umgebung stabil und ebenfalls relativ hitzebeständig. Es kann zudem ohne weiteres mit sehr grossem Reinheitsgrad hergestellt werden. Beispielsweise wurde eine Reinigung mit einem Reinigungsfaktor von etwa 1000 vorgenommen.

Im übrigen wurde das Antibiotikum TA durch einige seiner
 65 Eigenschaften, wie etwa sein Infrarot- und Ultraviolet-Spektrum, durch sein Massenspektrum und sein chromatographisches Verhalten in sechs Lösungssystemen charakterisiert.

Als nächstes soll nun die Zucht des *Myxococcus xanthus*

TA näher beschrieben werden. Die Mikroorganismen *Myxococcus xanthus* TA wurden im Laboratorium mit einem Standard-Verfahren von der Rinde eines Olivenbaumes isoliert. Die Lagerung der Mikroorganismen erfolgte dann entweder als Fruchtkörper auf toten E.Coli-Agarplatten oder auf 0,1% CT-Agar, das 0,1% Casiton (Difco) und 0,1% Magnesiumsulfat enthält und mit 1,5% Agar verfestigt ist. Falls nicht anderes angegeben ist, wurde der verwendete *Myxococcus xanthus* als flüssige Kultur bei 32 °C durch eine periodische Übertragung in 1% CT-Medium mit 1% Casiton (Difco) und 0,1% Magnesiumsulfat erhalten. Die Belüftung erfolgte durch Schütteln mit einem Rotationsschüttler mit einer Drehzahl von 300 Umdrehungen pro Minute.

Bei den Laborversuchen wurde das Antibiotikum beispielsweise durch das folgende Verfahren gewonnen: Ein 250 ml-Kolben mit 50 ml 0,5% CT-Medium wurde mit einer 1 ml-Teilmenge einer am Abend zuvor zubereiteten Kultur von *Myxococcus xanthus* TA geimpft. Die Kolben werden dann bei einer Temperatur von 32 °C und während einer starken Rotations-Schüttelbewegung (300 U/min.) bebrütet. Der Hauptanteil des Antibiotikums wurde in 3 bis 4 Tagen produziert. Da die Zellen einen an der Wand des Kolbens haftenden Ring bildeten, konnte die Flüssigkeit in einfachster Weise durch Ausgiessen abgetrennt werden. Wenn dies nötig war, wurde das Entwicklungs-Medium durch eine 15 Minuten dauernde, bei einer Temperatur von 4 °C stattfindende Zentrifugierung mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 10⁵ m/s² geklärt. Anschliessend wurde der antibiotische Wirkstoff von der oben aufschwimmenden Phase mit 0,8 Volumenteilen Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wurde ein Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann im Vakuum oder in einem Strom von filtriertem Stickstoff getrocknet und konzentriert.

Für die nachstehend beschriebene Papierscheiben-Testmethode wurde direkt die Chloroformlösung des Antibiotikums verwendet. Für bestimmte Versuche wurde das Antibiotikum in einen 0,1 M Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethanpuffer mit einem pH von 7,2 übertragen, wobei der Puffer direkt einer hochkonzentrierten Chloroformlösung des Antibiotikums beigefügt wurde. Das verbleibende Chloroform wurde dann dadurch entfernt, dass die Flüssigkeit mit Stickstoff durchblasen wurde.

Zur Herstellung von grösseren Mengen des Antibiotikums wurde ein 20-l-Säureballon mit 4 l Entwicklungs-Medium verwendet und bei einer Temperatur von 32 °C mit einer Hin- und Herbewegung geschüttelt.

Die Prüfung der antibiotischen Wirksamkeit erfolgte nach dem Papierscheiben-Prüfverfahren von Loo et al. (J. Bacteriol., 50, p. 701-709), wobei als Testorganismen E.Coli-Bakterien verwendet wurden. Verschiedene Mengen einer Chloroformlösung des direkt extrahierten oder zusätzlich gereinigten Antibiotikums wurden auf eine Scheibe mit 5,5 mm Durchmesser des Whatman Nr. 3 mm Filterpapiers aufgebracht und während mindestens einer Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurden die Scheiben auf eine Nährstoff-Agar-Platte aufgesetzt, die vorgängig mit einer milden, Agar enthaltenden Nährstoffbrühe und 10⁸ E.Coli-Bakterien belegt worden war. Nach einem bei einer Temperatur von 37 °C stattfindenden, 18 Stunden dauernden Test wurde der Durchmesser der Hemmungszone gemessen. Aus dem letzteren wurde dann mit Hilfe einer Standard-Kurve die antibiotische Aktivität in Funktion der auf die Scheibe aufgebrachten Antibiotikumsmenge bestimmt. Eine Einheit der antibiotischen Aktivität entspricht einem Durchmesser der Hemmungszone von ungefähr 3 mm.

Des weiteren wurde ein antibakterielles Wirkungs-Spektrum des Antibiotikums TA bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in der vorstehend beschriebenen Weise mit dem Papierscheiben-Prüfverfahren, wobei jedoch anstelle der E.Coli-Bakterien 10⁶ andere Testorganismen auf die Agarplatte aufgebracht wur-

den.

Ferner wurden verschiedene chromatographische Analysen und Trennverfahren durchgeführt. Die Abtrennung wurde beispielsweise papierchromatographisch unter Verwendung eines Whatman Nr. 1-Papiers mit absteigendem Lösungsmittel durchgeführt. Als Lösungssystem wurde 1-Butanol-Essigsäure-Wasser mit einem Volumenmischungsverhältnis von 4 : 1 : 1 verwendet. Des weiteren wurde eine Analyse unter Verwendung der Dünnenschicht-Chromatographie mit Aluminiumoxid und DC-Karten AL F (Riedel-De Haen) durchgeführt. Präparative Dünnenschichtchromatographie wurde auf Aluminiumoxidplatten (P 254, Typ T; Merck) mit 1,5 mm Dicke und einer Oberfläche von 200×200 mm durchgeführt. Die Platten wurden mit Methanol gewaschen, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, bei einer Temperatur von 120 °C während 15 Minuten aktiviert, gekühlt und sofort verwendet. Bei der 2-dimensionalen Dünnenschichtchromatographie liess man die Platten nach der Entwicklung mit dem ersten Lösungsmittel über Nacht bei Raumtemperatur trocknen. Säulenchromatographie wurde mit von der Firma Fluka AG in Buchs SG bezogenen Kieselsäure mit einer Maschenweite 100 entsprechenden Korngrösse durchgeführt. Die Kieselsäure wurde vor dem Zusatz der Antibiotikum-Probe während einer Stunde bei einer Temperatur von 120 °C aktiviert, 15 Minuten abgekühlt, mit Chloroform verrührt, zu einem Brei gepresst und dann mit zwei Säulenvolumen Chloroform gewaschen.

Mit dem Antibiotikum wurden verschiedene weitere Analysen durchgeführt. Zur Bestimmung des Trocken-Gewichtes des Antibiotikums wurde das Chloroform verdampft. Dazu wurde zuerst filtrierter Stickstoff durchgeblasen und die Proben dann in einen Raumtemperatur aufweisenden Vakuum-Trockenapparat gebracht und mit der Tarier-Methode gewogen. Des weiteren wurde das ultraviolett-Spektrum des gereinigten Antibiotikums aufgenommen. Dazu wurde ein Gilford Spektrophotometer Modell 240 mit einem Lichtweg von 1 cm und als Lösungsmittel Methanol der optischen Qualität (Merck) verwendet. Ferner wurde mit einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer (Modell 337) das Infrarot-Spektrum bestimmt. Des weiteren wurde mit einem Hitachi-Perkin-Elmer-Spektrometer (Modell BNV-6E) das Massenspektrum bestimmt.

Die Versuche erwiesen, dass der zeitliche Verlauf und die Ausbeute der Antibiotikum-Produktion mit den Mikroorganismen *Myxococcus xanthus* TA auf einem Kultur-Medium, das 0,2%, 0,5%, 0,75% oder 1% Casiton enthält, im wesentlichen gleich bleibt. Dagegen wird die Antibiotikum-Produktion bei Verwendung von Kultur-Medien mit mehr als 1% Casiton deutlich reduziert.

Der während des Wachstums beobachtete Anstieg des pH-Wertes scheint nicht mit der Antibiotikum-Produktion verknüpft zu sein, da sich auch bei Verwendung von gepufferten Medien ähnliche Resultate ergaben (pH-Werte am Ende 7,4 bis 7,6).

Zur Festlegung der optimalen Produktionsbedingungen wurden verschiedene Parameter variiert. Beispielsweise wurde die Temperatur im Bereich von 23 bis 37 °C, der pH-Wert im Bereich von 6,8 bis 8,5 und die Drehzahl des Rotations-Schüttelapparates von 100 bis 500 U/min. verändert. Des weiteren wurde der MgSO₄-Anteil des Mediums von 0,01 bis 2 M variiert und der Einfluss einer K₂HPO₄-Beigabe bis zu einem Gehalt von 0,1 M und eine Hefe-Extrakt-Zugabe von 0,05% untersucht. Die Ergebnisse erwiesen jedoch, dass die Antibiotikum-Produktion durch keine der vorgenannten Massnahmen wesentlich erhöht werden konnte.

Im folgenden soll nun noch die Reinigung und Aufbereitung des Antibiotikums TA näher beschrieben werden. Vor der Durchführung einer Reinigung wurden die Stabilität des Antibiotikums untersucht. Einige der erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1
Stabilität des mit den Mikroorganismen *Myxococcus xanthus*
TA gewonnenen Antibiotikums

Test-Behandlung a)	Verbleibende Aktivität in % b)
pH 1,2; 25 °C; 30 min.	95–100
pH 3,2; 25 °C; 30 min.	95–100
pH 9,8; 25 °C; 30 min.	95–100
pH 12,5; 25 °C; 30 min.	80–85
pH 7,4; 100 °C; 30 min.	75–80

a) Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl (pH 1,2), Essigsäure (pH 3,2), NH₄OH (pH 9,8), NaOH (12,4) und Tri-(hydroxymethyl)-Aminomethanpuffer (pH 7,4).

b) Die Aktivität wurde mit dem Papier scheiben-Prüfverfahren bestimmt, wie es in «Materials and Methods» beschrieben ist.

Die Versuche ergaben, dass das aus den Mikroorganismen *Myxococcus xanthus* TA gewonnene Antibiotikum eine für die Durchführung der üblichen Reinigungsverfahren ausreichende Säure-, Basen- und Hitzebeständigkeit aufweist.

Die Extraktion und Reinigung des Antibiotikums erfolgte dann nach dem folgenden Schema:

Zucht der Kultur während 3 bis 4 Tagen auf 0,5% CT-Medium

↓ Zentrifugierung oder Abgiessen der Flüssigkeit; Entfernung der Zellen

↓

- Obenaufschwimmende Flüssigkeit
 ↓
 Extraktion mit 0,8 Vol. CHCl₃; Entfernen der wässrigen Phase
 ↓
 5 CHCl₃-Phase (Fraktion I)
 ↓
 Anreicherung durch Absorption mit Kieselsäure und Eluierung mit 5% Methanol in CHCl₃; verdampfen, trocknen und
 ↓
 10 lösen in CHCl₃ (Fraktion II)
 ↓
 Säulenchromatographie mit Kieselsäure; Entwicklung mit 5% Methanol in CHCl₃
 ↓
 15 Aktiven Anteil trocknen und lösen in CHCl₃ (Fraktion III)
 ↓
 Auftragen auf präparativen Dünnschichtchromatographie-Träger; entwickeln mit 5% Methanol in CHCl₃
 ↓
 20 Aktive Zone eludieren, trocknen und lösen in CHCl₃ (Fraktion IV)
 ↓
 Fleckenbildung für 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie;
 25 1. 10% Methanol in CHCl₃
 2. Ethylacetat, Isopropanol, H₂O
 ↓
 Aktive Flecken eludieren; trocknen und lösen in CHCl₃ (Fraktion V)
 30 Die sich bei einem gemäss vorstehendem Schema durchgeführten Reinigungsverfahren für die verschiedenen Fraktionen ergebenden Mengenverhältnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2
Antibiotikum-Mengen der aus 34 l Kultur-Flüssigkeit erhaltenen Reinigungsfraktionen

Fraktion	Volumen mg	Trocken- Gewicht mg/ml	Antibiotische Aktivität		Spezifische Total Einheiten	Ausbeute Aktivität Einheiten/mg	% %
			Total Gew. mg	Einheiten/ml			
I. CHCl ₃ -Phase	27 150	0,067	1819	0,5	13 600	7,0	100
II. Konzentrat	85	19,1	1630	120	10 200	6,2	75
III. Kieselsäuren-Chromato- graphie	5,0	67,5	337	2000	10 000	30,0	74
IV. Dünnschicht-Chromato- graphie	26,0	-	3,3	317	8 200	2500	60
V. 2-dim-Chromatographie	15,0	-	0,39	217	3 250	8300	24

Durch Abtrennung der obenauf schwimmenden Flüssigkeit wird das Antibiotikum von einer wässrigen in eine Chloroform-Phase übertragen (Fraktion I). Kein Antibiotikum konnte aus den Zellen extrahiert werden. Kieselsäure wurde sowohl für die 40fache Anreicherung des Antibiotikums (Fraktion I) als auch für die 4bis 5fache Reinigung der Aktivität (Fraktion III) verwendet. Beim Anreicherungs-Schritt waren 300 g Kieselsäure erforderlich, um das Antibiotikum aus 27 l Chloroform zu absorbieren. Die Eluierung der Aktivität aus der Kieselsäure erfolgte dann schubweise mit etwa 3 l von 5% Methanol-Chloroform.

Das Eluierungs-Profil des Kieselsäure-Chromatographie-Schrittes ist in der Fig. 1 dargestellt. Das Antibiotikum wurde unmittelbar nach einem braunen Verunreinigungsband und vor einem gelben Pigment aus der Säule eluiert.

Präparative Dünnschicht-Chromatographie wurde mit den nachstehenden, aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt:

1. Das angereicherte Antibiotikum wird als Strichkultur auf eine Platte aufgetragen und mit 5% Methanol-Chloroform entwickelt, wobei der R_xR_f-Wert des aktiven Materials 0,17 betrug.

55 2. Aus der Fraktion IV wird ein Einzel-Flecken für die zweidimensionale Chromatographie gebildet. Für die Durchführung des Trennvorganges in der ersten Richtung wird Methanol-Chloroform mit einem Volumenmischverhältnis von 10 zu 90 verwendet. Die Durchführung der Trennung in der zweiten

60 Richtung erfolgt mit im Verhältnis von 65 zu 23,5 zu 11,5 Volumeneinheiten gemischten Ethylacetat, Isopropanol und Wasser. Bei der nach der Entwicklung in der zweiten Richtung durchgeführten Untersuchung der Dünnschichtplatten mit Ultraviolet-Licht wurde ein isolierter Ultraviolet-Absorptionsflecken festgestellt, der genau der Lage der antibiotischen Aktivität entsprach. Die R_f-Werte des Antibiotikums in den zwei Lösungssystemen betrugen 0,62 beziehungsweise 0,65.

65 Durch das ganze Reinigungsverfahren konnte eine mehr als

1000fache Erhöhung der Reinheit erzielt werden, wobei die Ausbeute des ganzen Verfahrens etwa 24% betrug (vgl. Tabelle 2). Das Endprodukt (Fraktion V) wies eine spezifische Aktivität von 8,3 Einheiten pro Mikrogramm auf.

Das Reinigungsverfahren wurde ebenfalls mit einer Menge von 70 l Kulturflüssigkeit mit einer Anfangs-Aktivität von 1 Einheit/ml durchgeführt. Dabei konnte bei einer totalen Ausbeute von 45% 3,2 mg gereinigtes Antibiotikum TA gewonnen werden. Dieses gereinigte Antibiotikum wurde dann für weitere chemische und biologische Untersuchungen verwendet.

Im folgenden sollen nun noch verschiedene Eigenschaften des Antibiotikums TA beschrieben werden. Bei der Aluminiumoxyd-Dünnschicht-Chromatographie, die mit sechs verschiedenen Lösungssystemen durchgeführt wurde, erschien das 5 Antibiotikum TA bei der Ultraviolett-Untersuchung als wandernder Einzel-Absorptions-Flecken. Die Dünnschicht-Chromatographie wurde gemäß der Beschreibung in «Materials and Methods» durchgeführt. Die Parameter sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

10

Tabelle 3

Chromatographie des aus dem Mikroorganismus *Myxococcus xanthus* TA gewonnenen Antibiotikums auf Aluminiumoxyd.

Lösungs-System	Anteile in Volumen-% R _f	
Methanol; Chloroform	5 : 95	0,17
Methanol; Chloroform	10 : 90	0,62
Methanol; Chloroform	15 : 85	0,83
Essigsäure; Methanol; Chloroform	1 : 10 : 89	0,70
Ammoniak; Methanol; Chloroform	1 : 10 : 89	0,66
Essigsäure; Isopropanol; Wasser	65 : 23,5 : 11,5	0,65

In jedem Fall entsprach der Ultraviolett-Absorptions-Flecken genau der Lage der antibiotischen Aktivität. Der Aktivitäts-Flecken reagierte positiv auf Jod und schnelles Blau B und negativ auf Bromokresol-Grün, Dichlorfluoreszein, Dimethylaminobenzoldehyd, Ninhydrin und Dragendorff-Reagenzien. Die Tatsache, dass die Mobilität des Antibiotikums TA in neutralen, sauren und basischen Lösungs-Systemen ähnlich ist, deutet darauf hin, dass das Molekül keine leicht ionisierbare Gruppe enthält.

Das Ultraviolett-Absorptions-Spektrum des in Methanol gelösten Antibiotikums TA ist in der Fig. 2 dargestellt. Es weist ein einziges Absorptions-Maximum bei einer Wellenlänge von 242 nm auf, dem ein Extinktionskoeffizient von E = 108%/cm entspricht. Unter der Annahme eines auf der massenspektrometrischen Untersuchung basierenden Molekulargewichtes von etwa 650 ergibt sich für den molaren Extinktionskoeffizienten ein Wert in der Grössen von 7000.

Im Bereich des sichtbaren Lichtes konnte sogar bei der Untersuchung einer Lösung mit einem Gehalt von 0,1% gereinigtem Antibiotikum keine Absorption festgestellt werden.

Das Infrarot-Durchlass-Spektrum des Antibiotikums TA ist 30 in der Fig. 3 dargestellt.

Die Massenspektrometrische Untersuchung deutet auf ein Molekül-Ion mit einem Molekulargewicht von 650 hin. Die für aromatische Verbindungen charakteristischen Ionen mit Massen-zu-Ladungs-Verhältnissen von 39, 50, 51, 52 und 65 wurden 35 nicht festgestellt.

Anschliessend wird nun noch die antibakteriologische Wirksamkeit des Antibiotikums TA beschrieben. Das rohe Antibiotikum, das heisst die Fraktion I, war sowohl gegen Gram-positive (*Staphylococcus albus* und *Bacillus subtilis*) als 40 auch gegen Gram-negative (*E. coli* und *Shigella dysenteriae*) Bakterien wirksam. Da beim Reinigungsverfahren als Testorganismen nur *E.Coli*-Bakterien verwendet wurden, war es von Interesse, zu prüfen, ob die Wirksamkeit gegen andere Bakterien beim gereinigten Material erhalten bleibt oder nicht. Die 45 Untersuchung zeigte, dass das rohe und das gereinigte Antibiotikum innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen das gleiche Aktivitäts-Spektrum aufweisen. Einige Ergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4
Antibakterielle Wirksamkeit des aus *Myxococcus xanthus* TA gewonnenen Antibiotikums TA.

Testorganismus	Chloroform-Extrakt		Gereinigtes Antibiotikum	
	Fraktion I 2 Einheiten	10 Einheiten	Fraktion V 2 Einheiten	10 Einheiten
<i>Staphylococcus albus</i>	2,5	5,5	2	3
<i>Bacillus subtilis</i>				
168	1	3	0	3
<i>E. Coli</i> B.	6	12	6	12,5
<i>Shigella dysenteriae</i>	2,5	10,5	1	10,5

Die angegebenen Werte bezeichnen den Durchmesser des Hemmungskreises in mm.

Die antibiotische Wirksamkeit gegen E.Coli-Bakterien wurde entweder mit einem Dilutions-Reihen-Prüfverfahren oder nach der Papierscheiben-Methode von Loo et al. (J. Bac., 50, 701) durchgeführt. Beim Dilutions-Reihen-Prüfverfahren wurde eine über Nacht in Nährbrühe angesetzte Kultur von E.Coli-Bakterien im Verhältnis von 1 : 100 mit frischer vorgewärmter Nährbrühe verdünnt und anschliessend unter Luftzufuhr während einer Stunde bei 37 °C bebrütet. Bei diesem Verfahren ergab sich in der exponentiellen Wachstumsphase ein Zellengehalt von etwa 10⁸ Zellen pro Milliliter. Der exponentiell wachsenden Kultur wurde dann bei fortwährender Bebrütung in verschiedenen Konzentrationen in 0,02 M Tripuffer mit einem pH von 7,2 gelöstes Antibiotikum zugegeben. Nachdem die Kultur zwei Stunden dem Antibiotikum ausgesetzt worden war, wurde eine geeignete Dilution gebildet und auf Nährstoff-Agar verteilt und dadurch die Anzahl Entwicklungsfähiger Zellen bestimmt. Eine Einheit des Antibiotikums wird als diejenige Antibiotikum-Menge definiert, die bei diesem Standard-Prüfverfahren eine hundertfache Reduktion der in einem Milliliter enthaltenen, Entwicklungsfähigen Zellen bewirkt.

Bei der Papierscheiben-Methode wurden verschiedene

Mengen einer Chloroformlösung des Antibiotikums auf einen Durchmesser von 5,5 mm aufweisende Scheiben des Whatman Nr. 1,3 mm Filterpapiers aufgebracht und während mindestens einer Stunde bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die Scheiben wurden dann auf Nährstoff-Agar-Platten angesetzt, die vorgängig mit milde Agar enthaltender Nährstoffbrühe und 10⁸ E.Coli-Bakterien belegt worden waren. Nach einem bei einer Temperatur von 37 °C erfolgenden, 18 Stunden dauernden Test wurde der Durchmesser der Hemmungszone gemessen. Die Anzahl der antibiotischen Aktivitäts-Einheiten wurde dann mit Hilfe einer Standard-Hemmungs-Kurve bestimmt. Eine Einheit des Antibiotikums entspricht, abzüglich des 5,5 mm Scheibendurchmessers, einem Durchmesser der Hemmungszone von etwa 3 mm.

Ein antibakterielles Wirkungs-Spektrum wurde gemäss der vorstehend beschriebenen Papierscheiben-Methode bestimmt, wobei jedoch anstelle der E.Coli-Bakterien verschiedene andere Mikroorganismen verwendet wurden. Bei jedem Test wurde der milde Agar mit 10⁶ Testorganismen besät. Penicillin-G-Scheiben mit einer Aktivität von 10 Einheiten wurden als Vergleichselemente verwendet.

Die Ergebnisse der Tests sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5
Antibakterielle Wirksamkeit des Antibiotikums TA in Millimetern des Hemmungszone-Durchmessers

Test-Organismus	Antibiotikum TA a)		Penicillin 100 Einheiten	10 Einheiten
	2 Einheiten	10 Einheiten		
Gram-negative Bakterien:				
E. coli B	6,6 b)	12,13 b)	-	12
E. coli K 12	4	7,4 b)	15	2
E. coli CW 3747	3	5	10	5
E. coli (Arzneimittel resistant)	0	2	9	0
E. coli 428 (LAC)	1	2	-	0
Klebsiella pneumoniae	9,8 b)	17,15 b)	-	0
Proteus morganii	0	0	7,5	8
Pseudomonas fluorescens	0	0	0	-
Salmonella typhimurium	0	0	2,5	21
Serratia marcescens	0	0	-	0
Shigella dysenteriae	3,1 b)	11,11 b)	-	12
Shigella flexneri 2a	3	8	16	3
Vibrio cholerae	0	0	0	14
Gram-positive Bakterien:				
Bacillus pumilus	3	5	-	26
Bacillus subtilis 168	1,0 b)	3,3 b)	-	26
Bacillus subtilis W 23	2,5 b)	4,8 b)	8	26
Corynebacteria diphtheriae	0,5 b)	7,11 b)	-	34
Corynebacteria xerosis	0	2,1 b)	9	22
Staphylococcus albus	0	2,3 b)	5	24
Staphylococcus aureus	0,0 b)	3,2 b)	8	42
Streptococcus faecalis	0	1	3	44

a) Falls nichts anderes angegeben ist, wurde das mit Chloroform extrahierte und aus der Kieselsäure eludierte Antibiotikum verwendet.

b) Gereinigtes Antibiotikum; 10 Einheiten = 1,2.

Das gereinigte und das rohe, mit Chloroform extrahierte Antibiotikum weisen das gleiche Wirkungs-Spektrum auf. Das Antibiotikum ist sowohl gegen Gram-positive als auch gegen Gram-negative Bakterien wirksam. Mit der Ausnahme von Pseudomonas fluorescens, Vibrio cholerae und Serratia marcescens waren alle getesteten Bakterien empfindlich auf die Einwirkung des Antibiotikums. Von besonderem Interesse ist

die Feststellung, dass E.Coli-Bakterien, die die Arzneimittel-Resistenz-Markierung tragen, ebenfalls auf das Antibiotikum TA reagierten. E.Coli-Bakterien wiesen sowohl auf Nährstoff-Agar als auch im Minimal-Medium und auf Blut-Agar-Platten die gleiche Empfindlichkeit gegen das Antibiotikum TA auf. Die zwei Pilze *Sacharomyces cerevisiae* und *Schizophyllum commune* wurden durch 10 Einheiten des Antibiotikums TA nicht beeinträchtigt.

Das erfindungsgemäss Antibiotikum hat also eine breite antibakterielle Wirksamkeit und lässt sich in verschiedener Form als pharmazeutisches Präparat verwenden.

