



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT A5**

⑪

644 635

②1 Gesuchsnummer: 7343/79

⑦3 Inhaber:
Richter Gedeon Vegyészeti Gyar RT, Budapest X
(HU)

②2 Anmeldungsdatum: 10.08.1979

⑦2 Erfinder:
Dr. Ernö Szarka, Budapest XII (HU)
Dr. Endre Tömörkény, Budapest XI (HU)
Dr. Zoltan Szeleczky, Budapest XVIII (HU)
Dr. Attila Szentirmai, Budapest XI (HU)
Dr. Tibor Balogh, Budapest XIII (HU)
Laszlo Tölgysri, Budapest X (HU)
Lajos Ilia, Budapest XX (HU)
Géza Wack, Budapest II (HU)
Istvan Zambo, Budapest XIV (HU)
Katalin Szerecz-Völcsy, Budapest II (HU)
Emma Simonovits, Budapest XIV (HU)
Gabriella Murányi-Farkas, Budapest II (HU)
Maria Trinn, Budapest XII (HU)
Erzsébet Zsoka-Somkuti, Budapest XIV (HU)

③0 Priorität(en): 11.08.1978 HU GO 1416

②4 Patent erteilt: 15.08.1984

⑦4 Verteiler:
Patentanwälte W.F. Schaad, V. Balass, E.E.
Sandmeier, Zürich

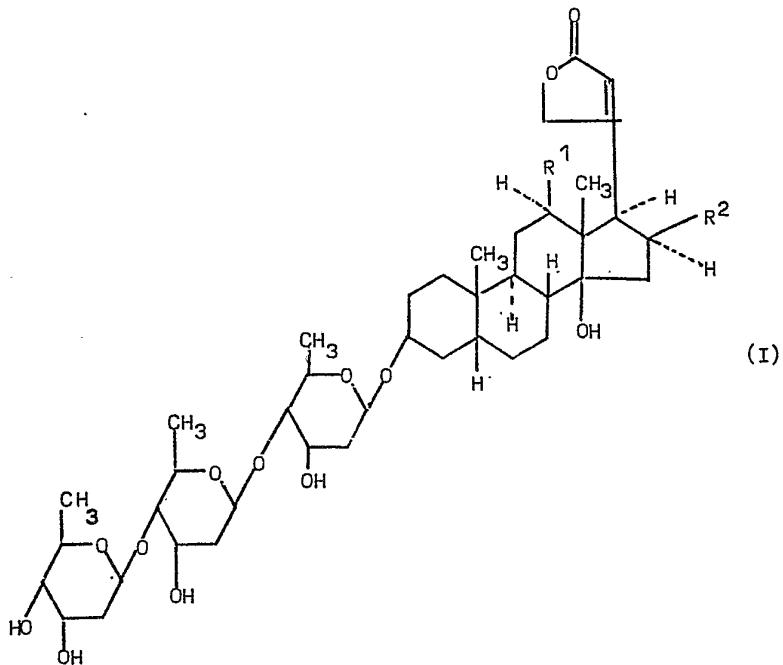
④5 Patentschrift
veröffentlicht: 15.08.1984

⑤4 Mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von sekundären Glykosiden aus primären Digitalisglykosiden.

⑤7 Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung von sekundären Digitalis-Glykosiden (Digitoxin, Gitoxin und Digoxin) aus den entsprechenden primären Glykosiden (Lanatosid A, B und C) und/oder aus den 3'''-Acetyl-derivaten der sekundären Glykoside (Acetyldigitoxin usw.); diese Ausgangsstoffe werden mit der submersen Kultur des neuen Mikroorganismenstammes Streptomyces griseolus MNG 168 oder mit einem aus dieser Kultur hergestellten Enzympräparat fermentiert.

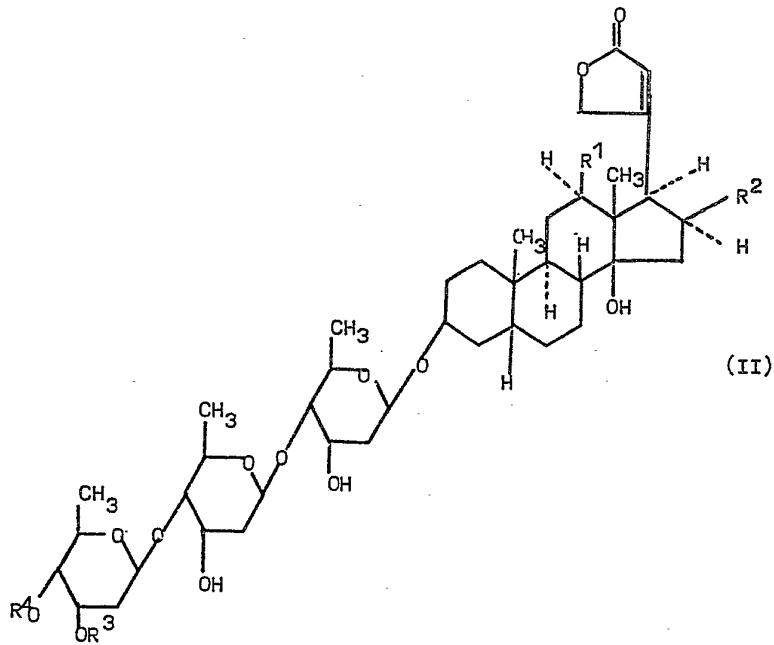
PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung von sekundären Digitalis-Glykosiden der allgemeinen Formel I



worin R¹ und R² je ein Wasserstoffatom oder eine Hydroxylgruppe bedeuten, dadurch gekennzeichnet, dass man primäre

30 Digitalis-Glykoside und/oder Acetyl derivate von sekundären Digitalis-Glykosiden der allgemeinen Formel II

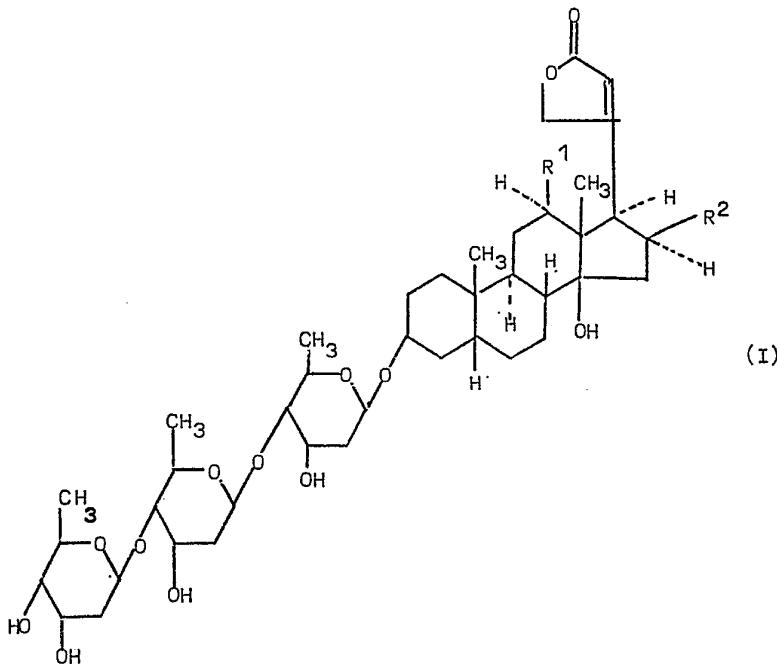


worin R¹ und R² die obigen Bedeutungen haben, R³ ein Wasserstoffatom oder eine Acetylgruppe und R⁴ ein Wasserstoffatom oder eine D-Glucosegruppe bedeuten, aber R³ und R⁴ nicht beide zugleich Wasserstoffatome bedeuten können, mit einer submersen Kultur des Stammes Streptomyces griseolus MNG 168 oder mit einem aus einer solchen Kultur hergestellten Enzympräparat fermentiert und die erhaltenen sekundären Glykoside aus der Fermentationsflüssigkeit isoliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das Enzym auf den Mikroorganismenzellen fixiert

60 und die hydrolytische Umsetzung mit dem auf diese Weise fixierten Enzympräparat durchführt.

65 Die Erfindung betrifft ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von sekundären Digitalisglykosiden der allgemeinen Formel I



worin R¹ und R² je ein Wasserstoffatom oder eine Hydroxylgruppe bedeuten.

Bekanntlich befinden sich im aus den Blättern von Digitalis lanata gewonnenen Glykosidgemisch neben den primären Glykosiden oder Lanatosid-Verbindungen (Lanatosid A, B und C) und den sekundären Glykosiden (Digitoxin, Gitoxin und Digoxin) auch die AcetylDerivate der letzteren (Acetyl-digitoxin, Acetylgitoxin und Acetyl digoxin). Bei der Aufarbeitung der Blätter nach beliebigen bekannten Methoden werden immer solche Gemische von Glykosiden erhalten, von denen nicht alle Komponenten gleichermassen als Arzneimittel verwendet werden können. Es ist also zweckmässig, Methoden zu suchen, nach welchen die einzelnen Komponenten des Glykosidgemisches in die für therapeutische Zwecke am besten geeigneten Formen gebracht werden können.

Die Verbindungen der Lanatosidreihe unterscheiden sich von den sekundären Glykosiden dadurch, dass während bei den sekundären Glykosiden sich nur drei Digitoxose-Einheiten an den Aglykon-Teil des Moleküls anknüpfen, enthalten die Verbindungen der Lanatosidreihe ausser diesen Zuckern eine zu dritten Digitoxose gebundene Glucose, wobei die 3"-Hydroxylgruppe der dritten Digitoxose durch Essigsäure verestert ist.

Zum Abspalten der in β-Stellung stehenden Glucose bzw. der 3"-Acetylgruppe der Lanatoside sind schon mehrere Methoden bekannt. So kann z.B. die 3"-Acetylgruppe durch sehr milde alkalische Behandlung abgespalten werden.

Bei der sauren oder alkalischen Hydrolyse von Lanatosid-Verbindungen wird im allgemeinen auch die zwischen dem Aglykon und dem ersten Digitoxose anwesende Bindung gespalten, es wird also nicht nur die gewünschte terminale Glucose-Abspaltung erreicht, sondern auch die erwähnte weitere, hier unerwünschte Spaltung zu Geninen (Digitoxigenin, Gitoxigenin und Digoxigenin), so dass auf diesem Weg sekundäre Herzglykoside aus Lanatosiden nicht erhalten werden können; die gewünschten sekundären Herzglykoside können aus Lanatoside nur auf umständlichen chemischen Wegen hergestellt werden.

Es kann zwar durch eine entsprechende Fermentierung der Blätter von Digitalis lanata erreicht werden, dass die Verbindungen der sekundären Reihe im Glykosidgemisch angereichert werden; in diesem Fall kann aber das als Arzneimittel

wertvolle Lanatosid C nicht aus dem Glykosidgemisch gewonnen werden.

Auch mikrobiologische Methoden sind Spaltung von Verbindungen der Lanatosidreihe seit längerer Zeit bekannt. So kann die terminale Glucose mit Hilfe von Schimmelpilz-Kulturen oder von daraus hergestellten β-Glucosidaseen abgespalten werden. A. Stoll und seine Mitarbeiter haben zuerst die lanatosidspaltende Aktivität von Schimmelpilzen untersucht (vgl. Helv. Chim. Acta 34, 397-401 [1951]. Die terminale Glucose von Lanatosiden konnte mit Hilfe des aus der Kultur von verschiedenen Schimmelpilzarten (meistens von Aspergillus-Arten) durch Behandlung mit Acetontrockenpulver abgespalten werden. F. Pitra und Mitarbeiter (tschechoslowakische Patentschrift Nr. 108 046) haben ein aus Aspergillus orizae gewonnenes Enzympräparat zur Herstellung von acetylierten sekundären Glykosiden verwendet. Die Acetylase-Aktivität der Schimmelpilzkulturen ist aber nicht mit ihrer β-Glucosidase-Aktivität vergleichbar; deshalb wird diese Methode im allgemeinen nur zur Herstellung von acetylierten Verbindungen der sekundären Reihe angewendet.

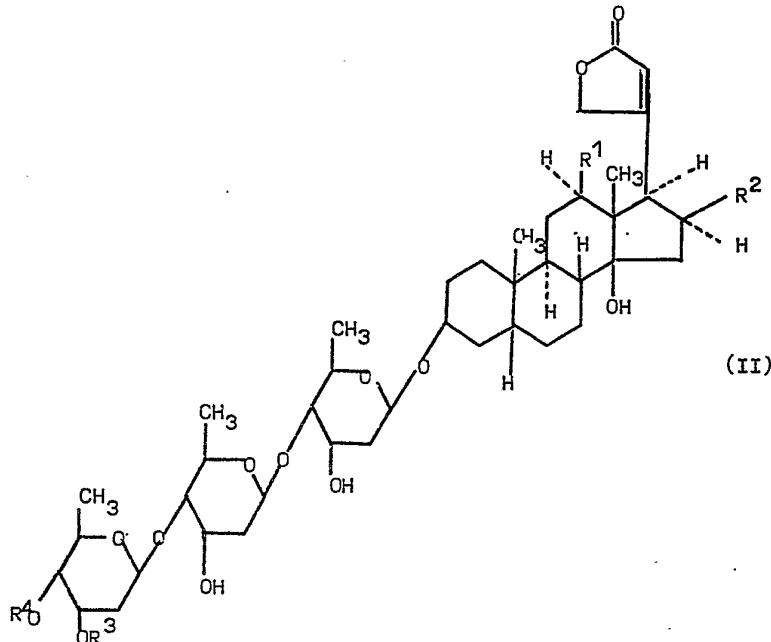
Die Zielsetzung der vorliegenden Erfindung war die Herstellung von Verbindungen der sekundären Reihe aus Lanatosiden, und zwar mit Hilfe von solchen Mikroorganismen, welche neben der β-Glucosidase-Aktivität auch eine entsprechende Acetylase-Aktivität aufweisen, so dass sie das Substrat mit grosser Geschwindigkeit und in hoher Konzentration derart umsetzen können, dass dabei sowohl die Glucose als auch die Acetylgruppe in demselben Fermentation abgespalten werden. Weiterhin wird von den zu diesem Zweck verwendbaren Mikroorganismen noch gefordert, dass die erwähnten beiden Aktivitäten, d.h. die β-Glucosidase- und die Acetylase-Aktivität, praktisch gleich stark sein sollen und dass während der Umsetzung sich keine Zwischenprodukte (AcetylDerivate der sekundären Reihe bzw. Desacetyl-lanatoside, auch als Purpurea-Glykoside bekannt) anhäufen sollen. Es ist also erwünscht, dass die zu verwendenden Mikroorganismen fähig sein sollen, sekundäre Glykoside sowohl aus den AcetylDerivaten der sekundären Glykoside (wobei die Acetylase-Aktivität zur Geltung kommt) als auch aus den Purpurea-Glykosiden (wobei die β-Glucosidase-Aktivität die entscheidende Rolle spielt) herzustellen.

Es wurde nun gefunden, dass es möglich ist, die den obi-

gen Forderungen entsprechenden Ergebnisse mit Hilfe eines zum Genus *Streptomyces* gehörenden, sich durch hervorragend hohe Enzymaktivität auszeichnenden Mikroorganismenstammes zu erzielen. Dieser neue Mikroorganismenstamm wurde als *Streptomyces griseolus* identifiziert und von der Titularin in der Ungarischen Nationalen Mikroorganismenstamm-Sammlung des Ungarischen Landesinstituts für

Hygiene unter Nr. MNG 168 am 6. Dezember 1977 depositiert.

Die Erfindung ist demnach ein neues Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung von sekundären Digitalisglykosiden der oben definierten allgemeinen Formel I, worin R¹ und R² Wasserstoffatome oder Hydroxylgruppen bedeuten, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man primäre Glykoside der allgemeinen Formel II



worin R¹ und R² je ein Wasserstoffatom oder eine Hydroxylgruppe R³ ein Wasserstoffatom oder eine Acetylgruppe und R⁴ ein Wasserstoffatom oder eine D-Glucosegruppe bedeuten, aber R³ und R⁴ nicht beide zugleich Wasserstoff bedeuten können, mit einer submersen Kultur des Stammes *Streptomyces griseolus* MNG 168 oder mit einem aus einer solchen Kultur hergestellten Enzympräparat in Berührung bringt und die erhaltenen sekundären Glykoside aus der Fermentationsflüssigkeit auf sich bekannte Weise isoliert.

Nach einer vorteilhaften Ausführungweise des erfundungsgemäßen Verfahrens wird das Enzym an den Mikroorganismenzellen fixiert und die hydrolytische Umsetzung mit dem auf diese Weise gebundenen Enzympräparat durchgeführt.

Der im erfundungsgemäßen Verfahren angewendete Mikroorganismenstamm wurde aus einem Bodenmuster isoliert; der Stamm zeigte die folgende taxonomischen Eigenschaften:

Morphologie: Die Sporenträger zeigen sympodiale Verzweigungen, haben gerade Endungen; Spirale oder Schlingen kommen nicht vor. Im Lichtmikroskop sind die Sporen eiförmig, ihre Grösse ist 0,7–0,9 × 0,9–1,1 µ.

Wachstum an verschiedenen Nährböden:

Saccharose-Nitrat-Agar: Wachstum farblos, später grau; die Luftmyzelien sind dünn, weiss, später olivgrün. Schwaches braunes Pigment diffundiert in das Agar.

Tyrosin-Agar: Melanin negativ. Die Luftmyzelien und das gesamte Wachstum zeigen lockere Struktur. Ein hellbraunes lösliches Pigment diffundiert in das Agar.

Nähr-Agar: Kompaktes, starkes Wachstum, anfangs grau, später bräunlich. Die Luftmyzelien sind dünn, staubig, hellgrau; kein lösliches Pigment.

Bennett-Agar: Wachstum kremfarbig, dunkelt sich mit der Zeit zu bräunlich. Die Luftmyzelien sind dünn, aber kompakt, mit staubiger Struktur und von blaugrauer Farbe.

Glukose-Asparagin-Agar: Wachstum grau, dunkelgrau, später stellenweise schwarz. Luftmyzelien werden nur stellenweise gebildet, mit mausgrauer Farbe. Wenig braunes lösliches Pigment diffundiert in das Agar.

Bouillon-Agar: Wachstum dick, grau, wird runzelig. Weder Luftmyzelien, noch lösliches Pigment werden gebildet.

Calciummalat-Agar: Rasches Wachstum, hellgrau, später dunkelgrau. Die Luftmyzelien sind blaugrau, stellenweise in Flecken olivgrün. Sehr wenig bräunliches, lösliches Pigment diffundiert in das Agar.

Kartoffel-Glucose-Agar: Das Wachstum zeigt mittlere Geschwindigkeit, breitet sich aber stark aus, mit brauner Farbe. Die Luftmyzelien sind in der Mitte samrig, blaugrau, kriechen am Rand der Kolonie spinnengewebartig auseinander. Wenig hellbraunes lösliches Pigment diffundiert in das Agar.

Maismehl-Agar: Wachstum hellbraun, die Luftmyzelien sind staubig, dünn, anfangs hellgrau, später blaugrau. Kein lösliches Pigment.

Glyzerin-Nitrat-Agar: Wachstum grau, graubraun, zuletzt schwarz, stark runzelnd. Die Luftmyzelien sind gipsartig, staubig, gleichmäßig aschgrau. Wenig, aber ausgeprägt braunes lösliches Pigment diffundiert in das Agar.

Sabouraud-Glucose-(Glucose-Pepton-) Agar: Das wachsende Bodenmyzel ist hellbraun, die Luftmyzelien sind dünn, hellgrau, gipsartig, trocken, es entsteht ein schwach braunes lösliches Pigment.

Kartoffelscheibe: Starkes und rasches Wachstum, mit sich grob runzelnder Oberfläche; anfangs grau, später schwarz. Die Luftmyzelien sind aschgrau, das lösliche Pigment braun.

Löfflerscher geronnener Molke-Nährboden: braunes

Wachstum, starke proteolytische Aktivität.

Cellulose als einzige Kohlenstoffquelle: gutes Wachstum. Nitratreduktion: positiv. Gelatine-Verflüssigung: positiv.

Milch: starke Koagulation und starke Peptonisation werden beobachtet.

Blut-Agar: Wachstum runzelig, olivgrün; Luftmyzelien hellgrau; schwache Beta-Hämolyse.

Assimilation von Kohlenstoffquellen

D-Glucose	+	D-Sorbit	schwach
D-Galaktose	++	lösliche Stärke	++
Saccharose	+	D-Xylose	+
Maltose	+	L-Rhamnose	+
Lactose	+	Galaktit	-
Raffinose	+	D-Mannit	+
L-Sorbose	-	Inositol	+
Cellobiose	+	D-Fructose	+
Trehalose	++	D-Mannose	+
Glycerin	++		

Auf Grund der obigen charakteristischen Eigenschaften gehört der neue Stamm zur Art *Streptomyces griseolus* (Waksman) Waksman et Henrici 1948 (vgl. Waksman: The Actinomycetes, Vol. 2, The Williams Wilkins Company, Baltimore, 1961, S. 222-223).

Zum Züchten der im erfundungsgemäßen Verfahren angewendeten Mikroorganismen können die bei dem Züchten von Strahlenpilzen allgemein üblichen Methoden angewendet werden. Die Züchtung erfolgt am vorteilhaftesten in submerser Kultur. Der zum Züchten geeignete Nährboden kann in Wasser gelöste bzw. suspendierte, durch die Pilze assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie anorganische Salze und sonstige übliche Zusätze (Biosstoffe, Antischäummittel usw.) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Malz, Glucose, Maltose, Saccharose oder andere Zucker, Fette, Fettsäuren, Aminosäuren und Peptide eingesetzt werden. Als assimilierbare Stickstoffquellen kommen Stickstoffverbindungen mikrobialer, tierischer oder pflanzlicher Herkunft und/oder anorganische Stickstoffverbindungen, wie Hefeextrakt, Pepton, Fleischextrakt, hydrolysiertes Kasein, Sojamehl, Maisquellwasser, Ammoniumsalze und Nitrate in Betracht.

Unter Berücksichtigung auch von wirtschaftlichen Gesichtspunkten können am vorteilhaftesten Glucose als Kohlenstoffquelle und Sojamehl und/oder Maisquellwasser als Stickstoffquelle im Nährboden verwendet werden. Die Bestandteile des Nährbodens werden in Leitungswasser gelöst bzw. suspendiert und zusammen bei 121 °C 20 bis 45 Minuten sterilisiert, mit Ausnahme der reduzierenden Zukker, da diese zweckmäßig separat sterilisiert werden.

Die Züchtung der im erfundungsgemäßen Verfahren verwendeten Mikroorganismen kann bei 22-37 °C, vorzugsweise bei 28 °C, erfolgen. Diese Mikroorganismen sind gegenüber der Belüftung und der Umdrehungszahl des Rührwerkes nicht besonders empfindlich; im allgemeinen können in einem 100-l-Fermentor mit einer Belüftungsgeschwindigkeit von 100 l/min, mit einer Rührgeschwindigkeit von 400 U/min gute, zur raschen Umsetzung geeignete Kulturen erhalten werden; ähnlich gute Ergebnisse können aber auch mit davon nicht allzusehr abweichenden anderen Belüftungsgeschwindigkeiten und Rührwerk-Umdrehungszahlen erzielt werden.

Die im erfundungsgemäßen Verfahren umzusetzenden Substrate werden in mit Wasser mischbaren und die Funktion von biologischen Systemen nicht oder nur mäßig schädigenden organischen Lösungsmitteln (Methanol, Äthanol, Dimethylformamid, Aceton, Tetrahydrofuran), vorteilhaft in Methanol, gelöst, die Lösung durch Filtern sterilisiert und dann der voll entwickelten, maximale Enzymaktivität zeigenden Kultur zugegeben. Die Umsetzung wird in einem belüfteten, mit Rührwerk ausgerüsteten Gefäß, bei 22 bis 37 °C, vorzugsweise bei 28 bis 32 °C, durchgeführt.

Die Umsetzung kann auch gesondert von dem Fermentationsvorgang durchgeführt werden, indem man aus der zur Umsetzung schon geeigneten Kultur ein Enzympräparat herstellt und dieses zur Umsetzung verwendet. Das Enzympräparat kann nach der allgemein bekannten Methode der Herstellung von «durch Behandlung mit Aceton gewonnenen trockenen Pulvern» hergestellt werden. Etwa 70% der gesamten β-Glucosidase und Acetylase Aktivität der Kultur ist in diesem Acetontrockenpulver enthalten. Die Aktivität solcher trockenen Enzympräparate bleibt bei einmonatiger Lagerung bei 4 bis 6 °C voll erhalten.

Nach der Beendigung der Umsetzung werden die in der Fermentationsflüssigkeit anwesenden sekundären Glykoside zweckmäßig mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel (Chloroform, Dichloräthan, Äthylacetat, Methylisobutylketon usw.), besonders mit Chloroform, aus der Fermentationsflüssigkeit extrahiert. Das Ablösen der zum Myzel gebundenen sekundären Glykoside kann durch die Zugabe von mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln (Methanol, Äthanol, Aceton usw.), besonders von Methanol, erleichtert werden. Während der Herstellung kann das Fortschreiten der Umsetzung mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie verfolgt werden.

Die praktische Ausführung und die näheren Einzelheiten des erfundungsgemäßen Verfahrens werden durch die nachfolgenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiel 1

Eine auf schrägem Kartoffelglucose-Agar gezüchtete eine-wöchige Kultur des Stammes *Streptomyces griseolus* MNG 168 wird mit steriler physiologischer Kochsalzlösung über-schüttet und die Oberfläche des Agars mit einer sterilen Platin-schleife aufgekratzt. Mit der auf diese Weise erhaltenen Mikroorganismensuspension wird ein Inokulum-Nährboden folgender Zusammensetzung eingeimpft: 2% Glucose, 1% Sojamehl, 0,5% Maisquellwasser (feuchtes Gewicht, auf 50% Trockensubstanz berechnet), 0,2% Pepton, 0,3% Calciumcarbonat; Gesamtvolume 1 Liter sterilisiert in 3-l-Erlenmeyerkolben. Die Kultur wird auf einer Schüttelmaschine bei 28 °C 36-48 Stunden geschüttelt. Drei solche Inokulum-Kulturen werden parallel hergestellt und die auf diese Weise gewonnenen 3-Liter-Inokulum-Kulturen werden zum Einimpfen des in einem mit Rührwerk ausgerüsteten Fermentor von 100 Liter nützlichem Rauminhalt zubereiteten Nährmediums gleicher Zusammensetzung verwendet. Während der Fermentation wird das Medium mit 400 U/min gerührt und mit 100 l/min Luftstrom belüftet. Als Antischäummittel wird Speiseöl verwendet. Die Fermentation wird bei 28 °C 36 bis 48 Stunden lang fortgeführt, um die zur Umsetzung erforderliche Enzymaktivität zu erreichen.

500 g Lanatosid A werden in 10 l heissem Methanol gelöst, die Lösung durch einen Seitz-Filter abfiltriert und dann unter sterilen Bedingungen und Rühren der auf obige Weise zubereiteten Fermentationsflüssigkeit zugesetzt. Das Fortschreiten der Umsetzung wird mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie (auf Merck «Kieselgel-G»-Platten; Laufmittel: 55:35:10-Gemisch von Äthylacetat, Cyclohexan und abs. Äthanol) verfolgt. Der Fleck des Substrats verschwindet nach 48 bis 60 Stunden und auf der Platte ist nur mehr die entstandene Verbindung der sekundären Reihe, das Digitoxin sichtbar. Nach voller Umsetzung wird die Fermentationsflüssigkeit filtriert. Das Myzel wird mit 80 l Methanol 2 Stunden gerührt, filtriert und mit weiteren 80 l Methanol wieder 2 Stunden gerührt. Die methanolisch-wässrigen Waschflüssigkeiten werden vereinigt, im Vakuum bei höchstens 40 °C auf 5 Liter eingeengt und bei 0 °C 24 Stunden zum Kristallisieren stehen gelassen. Die erhaltenen Kristalle werden mit 70%igem wässrigem Methanol gewaschen (rohes Produkt

I). Die Mutterlaugen und Waschflüssigkeiten der Kristallisierung werden mit je $\frac{1}{2}$ Vol. Chloroform dreimal extrahiert und die vereinigten Extrakte zur Trockne eingedampft (rohes Produkt II).

Das Filtrat der Fermentationsflüssigkeit wird ebenfalls mit je $\frac{1}{2}$ Vol. Chloroform dreimal extrahiert und die vereinigten Extrakte zur Trockne eingedampft (rohes Produkt III).

Die vereinigten rohen Produkte II und III werden mit 5 Liter 50%igem wässrigem Methanol aufgenommen und mit 2 Liter Petroläther extrahiert. Die wässrig-methanolische Phase wird zur Trockne eingeampft (halbfertiges Produkt II-III); die Petroläther-Phase wird verworfen.

Das rohe Produkt I wird mit dem halbfertigen Produkt II-III vereinigt, zerpulvert, in 5 Liter eines 1:1-Gemisches von Methanol und Benzol gelöst, die Lösung mit Aktivkohle gerührt und durch eine Aluminiumoxidschicht filtriert. Das Filtrat wird unter Röhren mit 2,5 Liter Leitungswasser versetzt und bei 0°C 48 Stunden zum Kristallisieren stehen gelassen. Die Benzolphase wird verworfen, die Kristalle werden abfiltriert, mit Benzol und dann mit einem 1:1-Gemisch von Methanol und Wasser gewaschen und schliesslich bei 50°C bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Es werden auf diese Weise 310 g Digitoxin (Reinheit mindestens 97%) erhalten. Die Mutterlaugen und Waschflüssigkeiten der Kristallisierung werden vereinigt und ebenfalls auf die obige Weise aufgearbeitet; wobei weitere 25 g Digitoxin erhalten werden. Gesamtausbeute: 85%.

Beispiel 2

Die auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise erhaltene, zur Umsetzung schon geeignete Kultur des Mikroorganismenstammes wird abfiltriert, das Myzel mit Wasser gewaschen, dann in eine solche Menge von auf -20°C abgekühltem Aceton eingelegt, dass die Flüssigkeit die Myzelmasse überdeckt. Das Myzel wird in dem bei -20°C gehaltenen Aceton eine Stunde gerührt, dann kalt abfiltriert und bei Raumtemperatur bis konstantem Gewicht getrocknet. Es werden auf diese Weise 70 g trockenes Enzympräparat erhalten.

70 g Enzympräparat (welches nicht älter ist, als 1 Monat) werden in 80 Liter 0,01 M Phosphat-Pufferlösung ($\text{pH} = 7$) unter Röhren suspendiert; dann wird unter weiterem Röhren die heiße konzentrierte methanolische Lösung von 350 g Lanatosid A zugegeben. Das Gemisch wird bei 28°C weiter gerührt und das Fortschreiten der Umsetzung durch Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach 48 bis 60 Stunden zeigt sich der Fleck des Ausgangsstoffes nicht mehr, es ist nur der Fleck von Digitoxin sichtbar. Das Reaktionsgemisch wird auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise aufgearbeitet; es werden 236 g Digitoxin (85% d. Th.) erhalten.

Beispiel 3

Zu 1 Liter nach Beispiel 1 erhaltenem Enzymaktivem Fermentationsmedium werden 5 g Lanatosid B zugesetzt. Nach der Beendigung der Umsetzung wird das Reaktionsgemisch auf die beschriebene Weise aufgearbeitet; es werden 3,37 g Gitoxin (85% d. Th.) erhalten.

Ähnliche Ergebnisse werden erhalten, wenn man das

Lanatosid B zu 1 Liter nach Beispiel 2 erhaltenem, in Phosphat-Pufferlösung suspendiertem Enzympräparat zugibt.

Beispiel 4

5 g Lanatosid C werden nach Beispiel 3 behandelt; es werden 3,34 g Digoxin (84% d. Th.) erhalten.

Beispiel 5

5 g Acetyldigitoxin werden nach Beispiel 3 behandelt; es 10 5 g Acetyl-digitoxin werden nach Beispiel 3 behandelt; es werden 3,95 g (85% d. Th.) Digitoxin erhalten.

Beispiel 6

5 g Acetylgitoxin werden auf die im Beispiel 3 beschriebene Weise umgesetzt; es werden 3,92 g (84% d. Th.) Gitoxin erhalten.

Beispiel 7

5 g Acetyl-digitoxin werden auf die im Beispiel 3 beschriebene Weise umgesetzt; es werden 3,90 g Digoxin (84% d. Th.) erhalten.

Beispiel 8

5 g Desacetyl-lanatosid A werden auf die im Beispiel 3 beschriebene Weise umgesetzt; es werden 3,54 g Digitoxin (84% d. Th.) erhalten.

Beispiel 9

5 g Desacetyl-lanatosid B werden auf die im Beispiel 3 beschriebene Weise umgesetzt; es werden 3,55 g Gitoxin (84% d. Th.) erhalten.

Beispiel 10

5 g Desacetyl-lanatosid C werden auf die im Beispiel 3 beschriebene Weise umgesetzt; es werden 3,51 g Digoxin (83% d. Th.) erhalten.

Beispiel 11

Es wird in allen Einzelheiten auf die in den Beispielen 1 oder 2 beschriebene Weise gearbeitet, mit dem Unterschied, dass anstatt von reinem Lanatosid A beliebige Gemische von Lanatosid A, Lanatosid B, Lanatosid C, Desacetyl-lanatosid A, Desacetyl-lanatosid B, Desacetyl-lanatosid C, Acetyldigitoxin, Acetylgitoxin und/oder Acetyl-digitoxin als Ausgangsstoffe eingesetzt werden. Als Endprodukte werden in jedem Fall entsprechende Gemische von Digitoxin als Verbindung der Reihe A, Gitoxin als Verbindung der Reihe B und Digoxin als Verbindung der Reihe C erhalten, wobei die Mengenverhältnisse dieser drei sekundären Glykoside jeweils jenen Mengenverhältnissen entsprechen, in welchen die Verbindungen der Reihe A (Lanatosid A, Desacetyl-lanatosid A, Acetyl-digitoxin), die Verbindungen der Reihe B (Lanatosid B, Desacetyl-lanatosid B, Acetyl-gitoxin) und die Verbindungen der Reihe C (Lanatosid C, Desacetyl-lanatosid C, Acetyl-digitoxin) in dem als Ausgangsstoff eingesetzten Glykosidgemisch anwesend waren. Die Ausbeute an sekundären Glykosiden beträgt im allgemeinen 84%.