

Collected Papers on **Antibiotics**

Section VIII

(New Antibiotics in 1972—II)

December 1973

Collected Papers on Antibiotics

Section VIII

«New Antibiotics in 1972—II»

December 1973

CONTENTS

新規抗生物質の製造法.....	1
(特許公報, 昭 47-2555, 第 1 产业部門, 1972)	
1-Hydroxy- & Acetyloxy-3-(-Hexenylazoxy)-2-Butanone	9
(USP 3,647,776, 1972)	
Antibiotic <i>Ingramycin</i> & Process for Preparing the Same.....	14
(USP 3,651,219, 1972)	
イセマイシンの製造法.....	23
(特許公報, 昭 47-38, 第 1 产业部門, 1972)	
コトマイシンの製造法.....	29
(特許公報, 昭 47-2558, 第 1 产业部門, 1972)	
抗真菌性抗生物質ムシジンの製造法.....	35
(特許公報, 昭 47-18637, 第 1 产业部門, 1972)	
ナルボノライドの制法.....	45
(特許公報, 昭 47-26318, 第 2 产业部門, 第 4 区分, 1972)	
The Antibiotic <i>Nyphimycin</i>	51
(BP 1,254,721, 1971)	
<i>Sparsogenin</i> & <i>Sparsogenin A</i> & Methods of Preparation	61
(USP 3,629,406, 1971)	
チオペプチン A ₃ の製造法	71
(特許公報, 昭 47-13117, 第 1 产业部門, 1972)	
チオペプチン A ₄ の製造法	79
(特許公報, 昭 47-13118, 第 1 产业部門, 1972)	
<i>Venturicidin B</i> & <i>X</i> & Process for Their Manufacture	87
(USP 3,636,198, 1972)	
Improvements in or Relating to Antibiotics & The Manufacture Thereof	99
(BP 1,277,150, 1972)	
新規抗生物質ザイゴスポリン群の製造法.....	133
(特許公報, 昭 47-23394, 第 1 产业部門, 1972)	
Antibiotics <i>A4993A</i> & <i>A4993B</i> & Process for Producing The Antibiotics.....	140
(USP 3,629,405, 1971)	
Antibiotic <i>CP-21,635</i>	150
(USP 3,655,876, 1972)	

<i>Antifungal BH890 & Preparation Thereof</i>	155
(BP 1,278,848, 1972)	
Novel Antifungal Compounds & Process for Producing Same	175
(BP 1,270,637, 1972)	
新抗生物質 <i>K-231</i> の製造法	193
(特許公報, 昭 47-27040, 第 2 産業部門, 第 4 区分, 1972)	
Antibiotic Effective Against Gram-positive Bacteria & Method of Preparation	200
(USP 3,651,217, 1972)	
新抗生物質 <i>NA-181</i> 製造法	207
(特許公報, 昭 47-39, 第 1 産業部門, 1972)	
Antibiotic <i>SL 3238</i> & Process for the Production of Same.....	214
(USP 3,655,880, 1972)	
Antibiotic Substances Produced by <i>Polyangium Cellulosum</i> var. <i>Fulvum</i> ...	218
(USP 3,651,216, 1972)	
抗生物質の製造法.....	223
(特許公報, 昭 47-15752, 第 1 産業部門, 1972)	
<i>WS-1921</i> 物質の製造法	233
(特許公報, 昭 47-679, 第 1 産業部門, 1972)	
<i>WS-8096</i> 物質の製造法	239
(特許公報, 昭 47-15750, 第 1 産業部門, 1972)	
Antibiotic <i>X-5108</i> for Stimulating Growth	248
(USP 3,657,421, 1972)	
Antibiotic Prepared by Cultivation of <i>Streptomyces Roseopullatus</i> & Designated <i>17967RP</i>	261
(USP 3,657,420, 1972)	
抗腫瘍性物質の製造法.....	269
(特許公報, 昭 47-2554, 第 1 産業部門, 1972)	
Some New Antibiotics Reported in 1972.....	274
(Hindustan Antibiotics Bulletin, Vol. 15, No. 4, p. 164-173, 1973)	

⑤ Int. Cl
C 12 d
C 07 g
A 61 k

⑤ 日本分類
36(2)D 914
30 A 32

日本国特許庁

① 特許出願公告

昭47-2555

特許公報

④ 公告 昭和47年(1972)1月24日

発明の数 1

(全8頁)

1

⑤ 新規抗生物質の製造法

② 特 願 昭44-44698

② 出 願 昭44(1969)6月9日

優先権主張 ② 1968年6月11日 ③ イタリア5
ア国 ④ 17570A/68

⑦ 発 明 者 エルネスト・コッタ

イタリア国ミラノ・ラルゴ・グイ
ド・ドネガニ1-2

同 ビエーラ・ジュリータ

同所

同 アウローラ・サンフィリツボ

同所

⑦ 出 願 人 ソシエタ・ファルマセウチシ・イ
タリア

同所

代 理 人 弁理士 山下白

発明の詳細な説明

本発明はアクセノマイシン(Axenomycine) A 20
(F.I.2604Aとも呼ばれる)およびアクセ
ノマイシンB(F.I.2604Bとも呼ばれる)
およびそれらの塩からなる抗生物質複合アクセノ
マイシン(Complex Axenomycine)の製法に関
する。この新規なアクセノマイシンAおよびアク
セノマイシンBはすぐれた薬理作用を示し、特に
駆虫剤、抗原虫剤および抗かび剤として有用であ
る。

この抗生物質複合体を製造する微生物学的方法
はストレプトマイセス・リスアンドリー(Stre-
ptomyces Iisandri)n.sp.(ストレプトマイ
セスF.I.2604とも呼ばれる)(この番号は
ソシエタ ファルマセウチシ イタリアの菌株コレ
クション番号である)の抗生物質生産菌株を培
養することからなる。

ストレプトマイセス・リスアンドリーn.sp.は
アルゼンチンのリスアンドロ・オルモスで採取し
た土壌から単離された。

2

この菌はミラノ大学の植物病理学研究所にI.
P.V.1951の番号で寄託され、米国のラッジ
ヤー(Rutgers)大学にIMRU 3935の番号
で、イングランドの国立菌学研究所にIMI
137178の番号で寄託されており、次の性質
を有している。

顕微鏡的性質

通常の培地では、栄養菌糸は厚さ0.5~0.9
μの多かれ少かれ薄い、長くそして数多く分枝し
10 た菌糸からなり、その菌糸は厚さ1.1~1.3 μの
長くそして真直くな分生子柄を形成している。こ
れらは単軸型に分枝した菌糸として分かれるが、
この菌糸は通常の長さの胞子を生成し、その末端
15 子柄に逆にあるいは互い違いに挿入していること
があり、完全に発達すると胞子又は分生子の鎖に
変化する。これらは終には平滑な表面と卵形を有
し、0.9~1.2×1~1.4 μの大きさを有する。

肉眼的性質

第1表は前記の微生物を種々の培地で28℃で
培養し、接種後3日目、8日目、15日目、20
日目および30日目に観察して得られた培養特性
を示したものである。この微生物は迅速で豊富な
成長を示し、ちみつてがつしりした栄養菌糸の
生成を伴い、合成培地では平滑で有機培地ではや
やしわがよつているパティナ(patina)を伴つて
いる。ここにパティナとは基質の全面をおおう栄
養菌糸体の均一で平滑な成長を意味する。合成培
地ではこの栄養菌糸体は無色であるが、その裏側
30 はその培地により、種々の色調をとることがある。
すなわち、わらの黄色から濃黄色ないし栗茶色あ
るいはすみれがかつた灰色、ブドウ色のピンク又
は暗緑色の色調をとることがある。有機培地では
栄養菌糸体ははちみつ色で、その裏側は比較的変
35 りがないがレモン色あるいは黄土色で、それらは
時間とともに変り、多少明るい栗茶色へと変化する。
この気菌子は合成培地では豊富であり、有機
培地ではむしろ乏しい。合成培地では、白色がか

っており、それは培地によつてはブドウ酒色のピンクあるいはページアイボリーあるいはまた、褐色ーライトグレーの色調となることがある。有機培地では、きれいな白色かあるいは汚れた白*

* 色で、時により、褐色ーライトグレーの色調を帯びることもある。この外見は培地により、けば立つた綿ないし濁りのように見える。

第 1 表

ストレプトマイセス・リスアンドリの培養特性

培 地	発 育 状 態	気 菌 糸	栄 養 菌 糸 体 Vegetative Mycelium	可溶性色素 Soluble Pigment
ベネット培地 Bennet's Agar (1)	豊富 ややシワのよつ たパティナ	豊富 やや綿状 ピンクーページの 色合をもつた白色	はち蜜色 裏側は淡オークルな いし淡栗茶色	淡い茶 (tea) 色
ツアベック培地 C zapeck's Agar (1)	乏しい	豊富 幾分綿状 白色	無色、裏側は最初ス トロー(わら)黄色 で、次に多少深いす みれ色ーグレーの色 調となる。	淡いすみれ色 茶色がかつた色 合
アスバラギン グルコース寒天 (1)	豊富 平滑なパティナ	個々に分離 幾分局平 ピンクの色合いを帯 びた白色系	無色 裏側は最初レモン 黄色、次にブドウ酒 色ピンク	淡いブドウ酒色
グリセリンーグ リシン寒天 (1)	個々に分離 平滑なパティナ	非常に豊富 綿状 ややページの色合 いを帯びた白色	無色 裏側はわら黄色ない し茶ーオークル(黄 土色)	な し
エマーソン培地 Emerson's Agar (1)	豊富 ややしわのよつ たパティナ	乏しい 白色系 扁平	はち蜜色 裏側は深いオークル	淡い茶(tea)色
デンプン寒天お よび塩類 (1)	個々に分離 平滑なパティナ	非常に豊富 扁平 茶色ー淡いページ 色に変ずる	無色 裏側は淡い黄色から 茶褐色ないしグレー に変ずる	淡い黄色
ポテト寒天 (1)	豊富 やや平滑なパテ イナ	個々に分離 幾分局平 褐色ーページの色 調を帯びた白色系	わら黄色ないしレモ ン 裏側は次第に栗茶色 を帯びる	茶(tea)色
えん麦寒天 (3)	非常に乏しい 徐々に平滑なパ ティナ	豊富 扁平 白色ないし茶褐色ー 淡いグレー	無色 裏側は最初レモン黄 色、次に淡い茶褐色	淡い黄色ー茶褐色
グリセリンーア スバラギン寒天 (1)	乏しい 平滑なパティナ	非常に豊富 平滑 ページの色調を帯 びた白色	わら黄色 裏側はオレンジオー クルないし茶褐色	淡い黄褐色
酵母抽出物グル コース寒天 (1)	豊富 ややしわの寄つ たパティナ	豊富 幾分局平 白色	わら黄色 裏側は淡オークル	な し

ベプトン-デ ン寒天 (1)	豊富 平滑なバティナ	豊富 幾分扁平 白色	はち蜜色ないしレモ ン黄色 裏側は褐色-オーク ル ピンクの色合いを帯 びる	淡い茶(tea)色
ベプトン寒天 KNO ₃ (1) (1)	平滑なバティナ 個々に分離	豊富 やや綿状 白色	無色 裏側はわら黄色	なし
普通寒天	豊富	なし	無色 裏側はレモン黄色な いし淡いくり褐色	なし
栄養寒天	豊富	なし	無色 裏側はわら黄色ない し淡褐色	なし
馬鈴薯	豊富	殆んどなし 白色を帯びる	わずかに褐色 裏側は褐色	褐色
ベプトン・グル コース寒天	豊富	極めてわずか 白色を帯びる	無色 裏側はわら黄色ない しくり褐色	なし
ゼラチン	豊富	殆んどなし 白色を帯びる	レモン黄色 裏側は褐色	褐色
チロシン寒天	豊富	なし	無色 裏側はわら黄色	なし
リトマス・ミル ク	豊富	なし	わら黄色	なし
繊維素	なし	—	—	—

1) ワックスマン S.A. : 「アクチノマイセテス」第2巻

ザ・ウイリアム・アンド・ウイルキンス・コンパニー,

1961, P.328-334.

2) プリダム (Pridham) T.G., アンダーソン P., フォーレイ (Foley) C.,
リンデンフェルサー L.A., ヘッセルタイン (Hesseltine) G.M. およびベネデ
イクト (Benedict) R.B. : 「アンティバイオティクス・アニユアル」 1959
-1957, P.947-953.

3) バルダッチ (Baldacci) E., ジオリツティ (Giolitti) G., キュスター (Kuster)
E. およびスコッティ (Scotti) T. : 「ジャーナル・オブ・ミクロバイオロジー」
1961, 9, P.39.

4) グレイン (Grein) A., スパラ (Spalla) C., およびコッタ (Cotta) E. :
「ジャーナル・オブ・ミクロバイオロジー」 1965, 13, 299.

生化学的性質

ゼラチン	: 全蛋白質分解
硝酸塩	: 亜硝酸塩への減少なし
デンプン	: 全加水分解
ミルク	: 凝固せず 完全にペプトン化
メラノイド色素	: 産生せず
チロシン	: 分解される
硫化水素	: 産生せず
繊維素	: 分解せず

寒天培地において、この微生物は可溶性色素を産生する。この色素は合成培地では淡いブドウ酒色ピンク又は淡い褐黄色であり、有機培地では淡い茶 (tea) 色である。この微生物は次の炭素源を発育に利用する。グルコース、 ℓ -アラビノース、サツカロール、 d -キシロース、メソイノシトール、 d -マンニトール、 d -フラクトース、マルトース、マンノースおよびラフィノース。ラムノース、サリシンおよびラクトースは利用しない。この微生物は50℃で発育せず、菌核 (sclerotia) を産生しない。深部攪拌液体培養において、この微生物は複合アクセノマイシンを形成する抗生物質を産生する。

この微生物の同定

この微生物の示す性質はストレプトマイセス・ワクスマン・エ・ヘンリチ (*Streptomyces Waksman et Henrici*) (パージエイズ・マニユアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー 第7版、1957、P. 744-745参照) 属に関連する。この菌株はプリダム (Pridham) 等 (*Appl. Microbiol.* 1958、6、p. 52) の「ホワイト」("White") の体系では「スピラ」("Spira") のセクションに属し、バルダッチ (Baldacci) の「アルビドフラウス」("Albidoflavus") 体系 (*J. Microbiol.* 1958、P. 10) のセクションIIに属し、ワクスマンの「アルブス」("Albus") 体系 (*The Actinomycetes*, 1961、Vol II、P. 117) に属し、ヒュッター (Hütter) の気菌糸「ニベウス」("niveus") (*Systematik der Streptomyces*・Bibl. Microbiol. Fasc. 6、S. Karger, Basel. 1967、P. 256) を有するストレプトマイセスのグループに属する。この微生物の性質と上記の亜属の系統的グループ (Subgeneric systematic group) (Taxa) に属する種の性質を比較すると、後者のいずれもが

この微生物の調査の結果得られた性質に相当する性質のすべてを有していない。

特に、この微生物は合成培地において、ピンクないし赤色 (reddish) ないし、すみれ色-ブドウ酒色ないしレモン黄色に至る可溶性色素を産生するが、これは上記の亜属 (subgeneric) の Taxa に属する微生物の種のいずれの記載にも見られず、また、この微生物は新規な抗生物質複合アクセノマイシンを産生するので、これは新菌種と考えられ、これをストレプトマイセス・リスアンドリ n. sp. と命名する。

この微生物、ストレプトマイセス・リスアンドリ n. sp. は固体培地において、継代培養 (Subsequent Transfer) し、その胞子のビヒクル懸濁液の凍結乾燥することによつて保存することができる。

本発明の抗生物質複合アクセノマイシンの製造法はこの新規な微生物ストレプトマイセス・リスアンドリ n. sp. の抗生物質生産菌株を、同化し得る炭素源、同化し得る窒素源およびミネラル塩を含有する培地において、好気条件下に培養することからなる。得られた複合体は抽出、分離され、含有成分のそれぞれの物質について特性化される。この微生物は好ましくは液体培地で23℃

25~37℃好ましくは28℃で、60~160時間培養される。pHは使用する培地により6~9の種々の値をとり得る。

炭素源としては、デンプン、デキストリン、種類のミール (たとえば、大豆、トウモロコシ、あるいは小麦など)、コーン ステープ リカーおよびその他通常用いる物質を使用することができる。窒素源としては、前述の複合物質の外に、カゼイン、カゼイン水解物、綿実ミールあるいはアンモニウム塩たとえばサルフェート、フォスフェート、クロライドおよび通常用いるその多の物質を使用することができる。この抗生物質を製造するために有用なミネラル塩は使用する培地により、種々のものを使用できる。炭酸カルシウムはほとんど通常に存在するが、塩化物 (塩酸塩)、硫酸塩たとえばナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、鉄塩、銅塩、亜鉛塩、マンガン塩、コバルト塩などを加えることもできる。

前記の醗酵はエルレンマイヤーのフラスコ中で、あるいは、種々の容量の実験室的醗酵装置又は工業的醗酵装置中で行うことができる。醗酵が終了

したら、前記の抗生物質複合体は培養ブロスから溶媒で抽出し、クロマトグラフのカラムに吸着することによつて、構成成分の各抗生物質を分離することができる。培地中の抗生物質複合体の濃度の測定は、この微生物の発育中に、水分を含んだ菌糸体をエチルアルコールで抽出することにより得られる試料を用いて、行うことができる。この溶媒を真空下に蒸発させた後、残留物を最少量の溶媒（エチルアルコール、メチルアルコール、ジメチルホルムアミド）にとり、次に水で希釈する。これらの試料はこの抗生物質複合体に対する生物の反応（Sensitive）性試験し付される。たとえば、杆虫（*Rhabditis macrocerca*）あるいは酵母菌（*Saccharomyces carlsbergensis*）を用いて、この試料の試験用の各希釈度の系をつくり、既知の力価の抗生物質複合体の溶液と比較される。同様に、次々に精製して得られる各種試料の力価を測定することができる。

化学的・物理的性質

抗生物質複合アクセノマイシンを構成するアクセノマイシンAとアクセノマイシンBとは類似の化学的・物理的性質を有する。これらは無晶質の黄白色物質の形で存在するが、ベンゼンおよび石油エーテルには不溶であり、水、酢酸エチル、アセトン、クロロホルムにはわずかに溶ける。これらはエチルアルコール・メチルアルコールおよびプロピルアルコールには溶け、フエーリング液およびアンモニア性硝酸銀を還元し、テトラゾールブルー反応は陽性である。モリーリツシュ反応は弱陽性である。アルドースのアニリンフタレート反応およびケトースのナフトレゾルシノール反応はペーパーとともに陰性である。塩化第二鉄との反応は陰性である。

抗生物質アクセノマイシンAは次の元素分析値を有する。

C 61.74 H 8.52 O 28.87 (%)

分子量は14513である。この化合物は127～142℃で融解し、透明なレンガ赤色ゲルを生成する。

$(\alpha)_D^{23} = +10.5^\circ$ (C=0.9メタノール中) Rf=0.49

(pH 7に緩衝したシリカゲル使用) (n, ブタノール:酢酸:水=4:0.5:1 使用)

メタノール中でのU.V.スペクトルは次の波長で最大吸収を示す。249・254および330

mμ。シヨルダー 265～268mμ臭化カリウムセルを用いたIR、スペクトルは次の波長(μ)でバンドを示す。

2.94-3.44-5.78-6.00-6.16-
6.24-6.88-7.25-7.41-8.61-
8.85-9.35-10.00-10.40-10.95-
11.8-12.5

抗生物質アクセノマイシンBは次の元素分析値を示す。

C 62.8 H 8.58 O 27.8 (%)

分子量 1330.2

この化合物は122～140℃で融解する。

$(\alpha)_D^{23} = +5^\circ$ (C=0.9メタノール中)

Rf=0.61 pH 7に緩衝したシリカゲル使用、(n, ブタノール:酢酸:水=4:0.5:1 使用)メタノール中のU.V.スペクトルは次の波長で最大吸収を示す。249-254および330mμ。シヨルダー 265～268mμ。臭化カリウムセルにおけるIRスペクトルは次の波長(μ)でバンドを示す。

2.94-3.40-5.82-6.00-6.16-
6.24-6.86-7.25-7.41-8.60-
8.85-9.35-10.00-10.40-10.98-
11.8-12.5

前記の元素分析および構造に関する実験からアクセノマイシンAおよびBは中性の物質であることが認められる。

本発明によつて得られる抗生物質アクセノマイシンはグラム陽生菌、グラム陰性菌に対しては抗菌性を示さない。

駆虫作用

試験管内で種々の寄生虫に対し、種々のやり方で駆虫作用がテストされた。

杆虫ラブデイトイス・マクロセルカ (*Rhabditis macrocerca*) (実験室内で飼養したもの) を種々の濃度の前記抗生物質で処理した酵母抽出物を用いて寒天中で飼養する。適当な培養時間の後、試験生物の発育を完全に阻止する前記抗生物質のD I M (最小阻止量) を測定する。

サイファシア蟻虫サイファシア オブベラダ (*Syphacia obvelata*) および膜様条虫ハイメノレビス・ナナ (*Hymenolepis nana*) (いずれもマウスに実験的に感染させて採取したもの) を pH 7.5 に緩衝した食塩溶液に浸し、種々の濃度

の前記抗生物質と混ぜる。種々の接触時間において * わせしめるに至る物質の最少量)を測定する。
て前記 2 種の寄生虫の生き残りを調べ、D I m M 4 時間の接触後、測定した D I M および D I m M
(最小不動化量) (試験生物の動きを試験内で失 * を第 2 表に示す。

第 2 表

試験生物	アクセノマイシン A		アクセノマイシン B	
	DIM/ μ g/cc	DImM/ μ g/cc	DIM/ μ g/cc	DImM/ μ g/cc
ラブデイトイス・マクロセルカ (<i>Rhabditis macrocerca</i>)	10		10	
サイファシア・オブベラータ (<i>Syphacia obvelata</i>)		1000		1000
ハイメノレビス・ナナ (<i>Hymenolepis nana</i>)		0.5		0.5

生体内駆虫作用は、ハイメノレビス・ナナを実験室的に感染させた体重 25 g の白マウスを用いてテストした。このテストは各 10 匹のマウスを 1 群として行なつた。寄生虫を有するこの動物の 100% が前記抗生物質アクセノマイシン A 又はアクセノマイシン B の唯一回の経口投与により治療する結果が得られる。この投与量すなわち治療量は 10 mg/kg に相当し、それは毒性データにより許容される量よりもはるかに低い。

第 3 表はマウスを用いた急性毒性のデータである。

第 3 表

投与経路	DL 50mg/kg	
	アクセノマイシン A	アクセノマイシン B
経口	200	300
腹腔内	3.7	10

抗原虫作用

抗原虫作用は試験管内で赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 菌株 F 22 を用いパヴロバ (Pavlova) の単相培地でテストし、またトリコモナス・フエトウス (*Trichomonas foetus*) を用い凝固した卵ロック (Locke) の食塩溶液馬血清を使用した二相培地でテストされた。37℃ で 48 時間培養した後、顕微鏡下に生存する原虫

20 を算えることにより DIM を測定する。

第 4 表は試験管内で実験的に得られる抗原虫作用である。

第 4 表

	DIM μ g/cc	
	アクセノマイシン A	アクセノマイシン B
トリコモナス・フエトウス	0.1	1.1
エントアメーバ・ヒストリテイカ	1.5	3

抗かび作用

抗かび作用は試験管内でサツカロマイセス・カールスベルゲンシス (*Saccharomyces carlsbergensis*) およびカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) を用いてサブロー (Sabouraud) の培地でテストされた。30℃ で 48 時間培養した後、DIM を測定した。データは第 5 表にある。

第 5 表

	DIM μ g/cc	
	アクセノマイシン A	アクセノマイシン B
サツカロマイセス・カールスベルゲンシス	0.04	0.04
カンジダアルビカンス	1.25	1.25

本発明の実施態様には、本発明による抗生物質の1種又はそれ以上を許容し得るビヒクルとの混和物の形で含有する製薬組成物を包含している。

次に実施例をあげ本発明を説明する。

実施例 1

2個の300cc入りエルレンマイヤーフラスコを次の培地各60ccを含有するように調製する。

デキストリン	3 %
カゼイン	0.5 %
炭酸カルシウム	0.4 %
硫酸アンモニウム	0.1 %
コーン・ステープリカー	1 %

水道水で100とする。

オートクレーブ中で120℃、20時間加熱することにより滅菌が行なわれる。

この培地のpHは殺菌後6.8～7.0の範囲にある。グルコース-ポテト寒天に発育させたストレプトマイセス・リスアンドリの斜面培養の15日目のパティナ(Patina)を滅菌蒸留水4ccで洗うことにより得られた孢子懸濁液0.5ccずつを用い、各フラスコに接種する。各フラスコを225 r.p.m.で3cmのストロークのロータリーシーカーを用い28℃で48時間培養する。この培養物2ccを用い、次の生産培地各60ccを含有する他の300cc入りフラスコに接種する。

デンプン	4.5 %
ソーヤミール	2.2 %
コーン・ステープリカー	2.3 %
炭酸カルシウム	0.4 %
塩化ナトリウム	0.5 %

水道水を加え100とする。

滅菌は120℃で20分間加熱することにより行なわれる。

この培地は前記の栄養培養と同じ方法で28℃で培養する。120時間培養した後、培養ブロスccあたり50μgの前記抗生物質複合体が製造される。

実施例 2

栄養培養は例1と同様に行なう。生産培養は次の培地を用いて行なう。

可溶性デンプン	8 %
綿実ミール	4 %
コーン・ステープリカー	2.5 %
オイルベア-コン-脂	1.5 %
炭酸カルシウム	1 %

硫酸アンモニウム	1 %
硫酸マンガン	0.01 %
硫酸コバルト	0.0007 %

水道水で100とする。

5 このpHを4N水酸化ナトリウムを用いて6.2に調整する。滅菌は120℃で20分間行なう。この培地は例1と同じような攪拌条件下に28℃で培養する。12時間培養した後、前記の抗生物質複合体は培養ブロスccあたり70μg得られる。

10 実施例 3

次の培地各60ccを含有する300cc入りエルレンマイヤーフラスコ2個を調製する。

デキストリン	5 %
炭酸カルシウム	0.5 %
コーン・ステープリカー	1 %
カゼイン	1 %
硫酸アンモニウム	0.2 %
モノリン酸カリウム	0.01 %

水道水で100とする。

20 滅菌は120℃で20分間加熱することにより行なう。滅菌後、この培地のpHは6.7～7.0の範囲にある。

グルコース-ポテト寒天で発育させたストレプトマイセス・リスアンドリの斜面培養の15日目のパティナを滅菌蒸留水5ccで洗うことにより得られる孢子懸濁液1ccを各フラスコに接種する。これらのフラスコを例1および2と同じ攪拌条件の下で28℃で48時間培養する。この培養物2ccを用い、次の組成の生産培地各60ccを含有する他の300cc入りフラスコに接種する。

グルコース	6 %
ソーヤミール	3 %
コーン・ステープリカー	2 %
炭酸カルシウム	1 %
塩化ナトリウム	0.3 %
ソーヤオイル	0.05 %

水道水で100とする。

滅菌は120℃で20分間行なう。滅菌後のpHは6.2～6.8の範囲にある。これらのフラスコは例1および例2の攪拌条件と同じ条件下で28℃で培養する。120時間培養後、前記抗生物質複合体は120μg/cc得られる。

実施例 4

3個の水遮断装置と接種用側頸を備えている

45 2000cc入りフラスコに例3に記載した栄養培

養用培地 500 cc を入れ、120℃で20分間加熱することにより滅菌する。グルコース-ポテト寒天で1.5日間斜面培養した4個のパティナを蒸留水で洗うことにより得られた孢子懸濁液のすべてをこのフラスコに冷後、接種する。次にこのフラスコを120 r.p.m. のロータリーシェーカー（1ストローク4.5 cm）上で、28℃で48時間培養する。こうして得られた培養液 50 cc を用い、次の組成を有する培地 3 ℓ を予め、120℃で30分間滅菌を入れた 5 ℓ 入りのガラスの醗酵器中に接種する。

デキストリン	4 %
カゼイン	1 %
コーン・ステープリカー	1 %
炭酸カルシウム	0.50 %
硫酸アンモニウム	0.1 %
モノ磷酸カリウム	0.01 %
水道水で100とする。	

このブロス を 400 r.p.m. で攪拌し、この培地の単位容量あたり、毎分約1容量の空気を送りこみ、27～28℃で、約24時間培養する。この培養の時間の終期に、前記菌糸体懸濁液 3 ℓ が醗酵培地 50 ℓ に接種するのに用いられる。この醗酵培地は次の組成を有する。

グルコース	8 %
ソーヤミール	3 %
コーン・ステープリカー	2 %
炭酸カルシウム	1 %
塩化ナトリウム	0.25 %
ソーヤオイル	0.5 %
水道水で100とする。	

121℃で30分間滅菌後、そして接種後、この培地を4枚の平板の翼を有するタービン・ディスクプロベラで200 r.p.m. で振盪し、培地 1 ℓ あたり、毎分0.7 ℓ の空気を送りこみ、27～28℃で120時間保持する。培養ブロス 5 ℓ を濾過することにより得られる菌糸体を1回にメタノール 3 ℓ を用いて4回抽出する。この抽出物をあつめて一箱にし、減圧で濃縮し、この水性残留物を石油エーテルで洗い、次に n-ブチルアルコールを同量用いて4回抽出する。この抽出物をあつめ、真空で蒸発乾固し、残留物をメチルアルコール 100 cc にとる。不溶部分は廃棄し、溶液を

蒸発させる。この残留物をクロロホルム 200 cc に懸濁し、次に濾過する。このクロロホルム溶液を濃縮し、石油エーテルを用いて沈殿を起させると、抗生物質アクセノマイシン A とアクセノマイシン B とを含有する粗生成物 2.0 g が得られる。

この粗生成物を二相系のクロロホルム-四塩化炭素-メタノール-水（3:2:4:1）を用いて向流分配法により精製する。50本の試験管にフラクションをとると第10番目から第20番目に至る間の試験管において前記活性の最大が得られる。これらの試験管の内容物を蒸発乾固することにより、純アクセノマイシン複合体 0.20 g が得られる。得られた複合体はプレートクロマトグラフにより2成分を含有することがわかる。それらはアクセノマイシン A および B であり、それらの R_f はそれぞれ 0.49 および 0.61 である。この2つの活性物質の分離は、0.05 M の磷酸塩緩衝剤を用いて pH を 7 に緩衝したシリカゲルのカラムで33%のセルロース末を加えたものを用いてクロマトグラフを行なうことによつて達成される。この抗生物質複合体 1 g を得るには、直径 2.4 cm、高さ 30 cm のカラムが必要である。n-ブチルアルコール:酢酸:水（容量比 4:0.5:1）混合物で溶離することにより、前記化合物 B 0.60 g を含有するフラクション、次に前記化合物 A 0.25 g を含有するフラクションが得られる。各抗生物質はその溶出液を蒸発させた後、メタノールにとり、その溶媒を除去することにより回収し、五酸化磷を用いて 0.2 mm Hg で室温で一定重量になるまで 0.2 mm Hg で乾燥する。

特許請求の範囲

1 新規な微生物 *Streptomyces lisandri* n. sp. を炭素源、窒素源およびミネラル塩を含有する液体培養培地中で、23～37℃の温度で、60～160時間、pH 6～9 で、好気性条件下に培養し、得られた新規抗生物質複合体アクセノマイシンをその培養物から分離し、次に2つの抗生物質成分アクセノマイシン A とアクセノマイシン B とに分離することを特徴とする。抗生物質アクセノマイシン A およびアクセノマイシン B およびそれからなる新抗生物質複合体アクセノマイシンの微生物学的製造法。

1

3,647,776

1-HYDROXY- AND ACETYLOXY-3-(1-HEXENYL-AZOXY)-2-BUTANONE

William James McGahren, Demarest, and John Norman Porter, Ramsey, N.J., and Joseph Daniel Korshalla, Pearl River, N.Y., assignors to American Cyanamid Company, Stamford, Conn.

No Drawing. Filed Apr. 2, 1969, Ser. No. 812,861

Int. Cl. A01n 9/20; C07c 105/00; C12k 1/06

U.S. Cl. 260-143

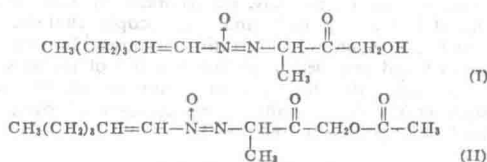
2 Claims

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

This disclosure describes 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone and 1-acetyloxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone, compounds useful as antifungal agents.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

This invention relates to new antifungal compounds: 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone (I) and 1-acetyloxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone (II), which may be represented by the following structural formulae:



The invention includes within its scope the antifungal compounds in dilute forms, as crude concentrates, and in pure liquid form as well as methods of preparing the antifungal compounds. These novel compounds possess broad-spectrum antifungal activity in vitro against a variety of standard laboratory microorganisms.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The new compound 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone (I) is formed during the cultivation under controlled aerobic conditions of a strain of *Streptomyces hinnulinus* n.s. This new antifungal-producing streptomycete was isolated from a sample of peat moss and soil. A viable culture of the organism has been deposited with the Culture Collection Laboratory, Northern Utilization Research and Development Division, United States Department of Agriculture, Peoria, Ill., and has been added to its permanent collection. It is freely available to the public in this depository under its accession number NRRL 3592.

The description and identification of this new microorganism, maintained in the culture collection of the Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company, of Pearl River, N.Y., was supplied by Dr. H. D. Tresner of these laboratories. The following is a general description of the organism *S. hinnulinus*, NRRL 3592, based on diagnostic characteristics observed. The underscored descriptive colors and color chip designations are taken from Jacobson et al., "Color Harmony Manual,"

2

3rd ed. (1948), Container Corporation of America, Chicago, Ill.

Amount of growth

Moderate to good on most media; very light on Czapek's solution agar and light and restricted on inorganic salts-starch agar.

Aerial mycelium and/or en masse spore color

Aerial mycelium whitish; spore masses in grayish shades, ranging from Beige (3 ge) to Lt. Fawn (4 ge) to Fawn (4 ig). Sporulation light to good depending upon medium.

Soluble pigments

None on most media; yellowish and light on yeast extract and Kuster's oatflake agars.

Reverse color

In yellowish shades on most media.

Miscellaneous physiological reactions

Nitrates not reduced; complete liquefaction of gelatin in 7 days; melanoid pigments not produced on peptone-iron agar; tolerates up to 7% NaCl in growth medium. Carbon sources utilization, according to the Pridham and Gottlieb method [J. Bacteriol. 56, 107 (1948)], as follows: Fair to good utilization of l-arabinose, d-fructose, d-mannitol, d-trehalose, d-xylose and dextrose; poor or no utilization of adonitol, i-inositol, lactose, d-melezitose, d-melibiose, d-raffinose, l-rhamnose, salicin, and sucrose.

Micromorphology

Aerial mycelium giving rise to spore chains in the form of hooks, loops, coils and loose spirals. Spores subglobose to elliptical; variable in size, 0.5-0.6 μ x 0.8-1.2 μ . Spores smooth-walled as determined by electron microscopy at 8000 $\times$.

The general characteristics of NRRL 3592 place the organism in the genus *Streptomyces*. The range of spore color shades exhibited by the culture covers a wide span which overlaps between the "Gray" and "Red" series of the Tresner and Backus color system [Appl. Microbiol. 11, 335 (1963)]. When other diagnostic criteria such as its spiralled sporophores, smooth-walled spores and its lack of melanoid pigments are considered, relationship to certain streptomycetes within each of the two color series is suggested. However, comparative studies with actual reference specimens and published descriptions of these organisms failed to indicate any which were closely enough allied to be considered of the same species. Therefore, NRRL 3592 is proposed as a new species. The epithet *Streptomyces hinnulinus* sp. nov. has been given the culture to be descriptive of its fawn-color spores.

A critical examination of the cultural, physiological and morphological features of the organism was made when it was grown on several media; including those recommended by Pridham et al., Antibiotics (1956-1957), pp. 947-953. Detailed observations are recorded in Tables I, II, III and IV below. Underscored descriptive colors are taken from the "Color Harmony Manual."

TABLE I.—CULTURAL CHARACTERISTICS OF *STREPTOMYCES HINNULINUS* NRRL 3592

[Incubation: 14 days; Temperature: 28° C.]

Medium	Amount of growth	Aerial mycelium and/or spores	Soluble pigment	Reverse color	Remarks
Czapek's solution agar.....	Very light.....	No aerial mycelium; thin colorless substrate growth.	None.....	Colorless.....	
Asparagine dextrose agar.....	Moderate.....	Aerial mycelium whitish, becoming beige (3 ge.) to light fawn (4 ge.) in sporulating areas. Sporulation moderate.	do.....	Bamboo (2 ec.) to light wheat (2 ea.).	
Hickey and Tresner's agar.....	do.....	Aerial mycelium whitish, becoming fawn (4 ig.) to light fawn (4 ge.) in sporulating areas. Sporulation moderate.	do.....	Light wheat (2 wa.).....	
Yeast extract agar.....	do.....	Aerial mycelium whitish, becoming beige (3 ge.) to light fawn (4 ge.) in sporulating areas. Sporulation moderate.	Yellowish, light.....	Maize (2 hb.).....	
Kuster's oatflake agar.....	Good.....	Aerial mycelium whitish, becoming beige (3 ge.) to light fawn (4 ge.) in sporulating areas. Sporulation good.	do.....	Wheat (2 ea.) to light amber (3 ic.).....	Moderate starch hydrolysis.
Tomato paste oatmeal agar.....	do.....	Aerial mycelium whitish, becoming beige (3 ge.) to light fawn (4 ge.) in sporulating areas. Sporulation moderate.	None.....	Light amber (3 ic.).....	
Potato dextrose agar.....	do.....	Aerial mycelium whitish, becoming beige (3 ge.) to light fawn (4 ge.) in sporulating areas. Sporulation good.	do.....	Wheat (2 ea.) to light tan (3 ge.) to chestnut brown (4 nl.).	Sectors of Cork tan (4 ic.) sporulation. Moderate starch hydrolysis.
Bennett's agar.....	Moderate.....	Aerial mycelium whitish, becoming beige (3 ge.) to light fawn (4 ge.) in sporulating areas. Sporulation moderate.	do.....	Light wheat (2 ea.).....	
Inorganic salts starch agar.....	Light, restricted.	Aerial mycelium whitish, trace of grayish sporulation.	do.....	Pearl (3 ba.).....	

TABLE II.—MICROMORPHOLOGY OF *STREPTOMYCES HINNULINUS* NRRL 3592

Medium	Aerial mycelium and/or sporiferous structures	Spore shape	Spore size	Spore surface
Kuster's oatflake, agar.....	Spore chains arising from aerial mycelium as hooks, loops, coils and loose spirals.	Subglobose to elliptical. Variable in size.	0.5-0.6 μ 0.8-1.2 μ	Spore surface smooth as determined by electron microscopy at 8,000X.

TABLE III.—MISCELLANEOUS PHYSIOLOGICAL REACTION OF *STREPTOMYCES HINNULINUS* NRRL 3592

[Temperature: 28° C.]

Medium	Incubation period, days	Amount of growth	Physiological reaction
Organic nitrate broth.....	7	Good.....	Nitrates not reduced.
Do.....	14	do.....	Do.
Gelatin.....	7	do.....	Complete liquefaction.
Do.....	14	do.....	Do.
Peptone-iron agar.....	14	do.....	Melanoid pigments not formed.
4-13% NaCl in yeast extract agar.....	10	do.....	Tolerates a maximum of 7% NaCl in growth medium.

¹ Hours.

TABLE IV

Carbon source utilization pattern of *Streptomyces hinnulinus* NRRL 3592

[Incubation: 10 days; temperature: 28° C.]

Carbon source:	Utilization ¹
Adonitol.....	0
l-Arabinose.....	3
d-Fructose.....	3
i-Inositol.....	0
Lactose.....	1
d-Mannitol.....	3
d-Melezitose.....	0
d-Melibiose.....	0
d-Raffinose.....	0
l-Rhamnose.....	0
Salicin.....	0
Sucrose.....	0
d-Trehalose.....	2
d-Xylose.....	3
Dextrose.....	3
Negative control.....	0

¹ See following table:

	Utilization
3.....	Good.
2.....	Fair.
1.....	Poor.
0.....	None.

It is to be understood that for the production of the new antifungal agent 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone (I) the present invention is not limited to this particular organisms only, nor to organisms fully answering the above growth and microscopic characteristics which are given for illustrative purposes. In fact, it is desired and intended to include the use of mutants produced from the described organism by various means such as X-radiation, ultraviolet radiation, nitrogen mustard, phage exposure, and the like.

The fermentation process

Cultivation of the organism *S. hinnulinus*, NRRL 3592, may be carried out in a wide variety of liquid culture media. Media which are useful for the production of the novel antifungal include an assimilable source of carbon such as starch, sugar, molasses, glycerol, etc.; an assimilable source of nitrogen such as protein, protein hydrolysate, polypeptides, amino acids, corn steep liquor, etc.; and inorganic anions and cations, such as potassium, sodium, calcium, sulfate, phosphate; chloride, etc. Trace elements such as boron, molybdenum, copper, etc., are supplied as impurities of other constituents of the media. Aeration in tanks and bottles is provided by forcing sterile air through or onto the surface of the fermenting medium. Agitation in tanks is provided by a mechanical impeller. An antifoaming agent, such as lard oil may be added as needed.

Inoculum preparation

Shaker flask "seed" inoculum of *S. hinnulinus* is prepared by inoculating 100 milliliter portions of sterile liquid medium in 500 milliliter flasks with scrapings or washings of spores from an agar slant of the culture. The following medium is ordinarily used.

	Grams
Glucose.....	20
Soy bean flour.....	10
Corn steep liquor.....	5
Calcium carbonate.....	3
Water to 1,000 milliliters.	

The flasks are incubated at a temperature of 25°–29° C., preferably 28° C., and agitated moderately on a rotary shaker for 30 to 48 hours. These 100 milliliter portions of seed inoculum are used to inoculate twelve liters of the same medium in 20 liter glass fermentors. The inoculum mash is aerated with sterile air while growth is continued for 36 to 48 hours. The inoculum mash is used to inoculate tank fermentors.

Tank fermentation

For the production of the antifungal in tank fermentors the following medium is preferably used.

	Grams
Molasses	20
Glucose	10
Bacto-Peptone	5
Water to 1,000 milliliters.	
(pH is adjusted to 7.3 with 10 N sodium hydroxide.)	

Each tank containing the above sterilized medium is inoculated with 3 to 8 percent of second stage inoculum made as described above. Aeration is supplied at 0.3 to 1.0 liter of sterile air per liter of broth per minute and the fermenting mixture is agitated by an impeller driven at 200–400 r.p.m. The temperature is maintained at 25°–29° C., usually at 28° C. Hodag LG-8 oil is ordinarily used as a defoaming agent if necessary. The fermentation is ordinarily continued for 24 to 48 hours, at which time the mash is harvested. If fermentation is prolonged, activity is greatly diminished. Loss of antifungal activity during holding periods can be minimized by chilling the mash to 18°–20° C. and by allowing the air supply to play upon the mash surface instead of using direct aeration.

Isolation procedure

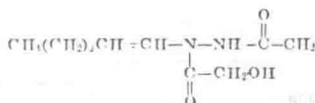
After the fermentation is completed, the fermented mash containing the 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone is filtered, preferably with the addition of diatomaceous earth or other conventional filter aid. Normally, the mycelial filter cake is washed with a small portion of water, and the water wash is combined with the filtrate. The combined filtrate and wash is extracted with chloroform using about 300 to 350 milliliters of solvent per liter of filtrate. Other solvents, for example, ethyl acetate and methylene chloride may be used in place of chloroform. The chloroform extract is concentrated under reduced pressure to a small volume, dried over anhydrous magnesium sulfate and then further concentrated under reduced pressure to a black mobile oil. The temperature is not allowed to exceed 30°–35° C. Ordinarily, yields of the black oil vary from about 15 grams to 35 grams per 300 liters of fermentor mash. Concentrations of 200 micrograms per milliliter of these oils typically give zones of inhibition of 33 to 37 millimeters against *Paecilomyces varioti* using the agar plate diffusion method. These oils can be stored under nitrogen at –15° C. for periods of up to six months without significant loss of antifungal activity.

The dark oil is purified by adsorption chromatography over neutral silica gel and elution with such solvent mixtures as chloroform-hexane or hexane-ethyl acetate. Appropriate fractions of eluent containing antifungal activity, as determined by agar plate diffusion assay against *Paecilomyces varioti* or *Candida albicans*, are combined and concentrated to a light yellow, mobile oil. Optionally, activity can be monitored using ultraviolet spectroscopy at 237 mμ or by thin layer chromatography on silica gel, $R_f=0.7-0.8$ when developed in the system hexane:ethyl acetate (60:40). The dark oil also may be purified by partition chromatography over diatomaceous earth using the partition system consisting of hexane: ethyl acetate: methanol: water (90:10:15:6). With this system the antifungal agent is eluted in the second and third hold-back volumes.

A yellow oil is obtained on evaporation of the solvents from appropriate fractions.

Further purification of the 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone obtained from either the adsorption or partition chromatography procedures may be carried out by dissolving the yellow oil in hexane and decolorizing the solution with charcoal. Subsequent evaporation of the hexane solution yields the purified antifungal, 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone, as a light yellow, mobile oil.

The antifungal agent 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone can be distilled across a short path-length onto a cold-finger at temperatures not exceeding 35° C. at from 5 to 10 μ of pressure. In the mass spectrum the molecular ion peak at $m/e=214$ is very weak. A major abundant peak occurs at $m/e=198$ which arises due to the facile loss of oxygen from the azoxy group. The compound has the optical rotation $[\alpha]_D^{25}+153^{\circ}\pm 1.7$ ($c=1.73$ methanol), and exhibits a maximum absorption in the ultraviolet range in methanol; λ_{max} 238 mμ (ϵ 9,000). The compound is relatively unstable and begins to decompose almost immediately in the light at room temperature and within one week is approximately 50% decomposed into the following compound:



Mild refluxing of 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone in methanol in the presence of potassium bicarbonate for a period of a few minutes results in a 70–90% conversion into the above degradation compound.

The 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone (I) and 1-acetyloxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone (II) of the present invention are potent antifungal agents and possess broad-spectrum antifungal activity in vitro against a variety of standard laboratory microorganisms as determined by the agar-dilution streak-plate technique. In this assay, the compounds to be tested are made up to contain 2.5 mg. of test compound per milliliter of solution. Observing sterile techniques, two-fold serial dilutions are made of each test solution. One milliliter of each of the original solutions and of each of the serial dilutions is then added to 9 ml. of warm sterile nutrient agar capable of supporting growth of the fungal test cultures. The standard sterile nutrient agar solutions containing the different dilutions of the test compounds, along with suitable and comparable control dilutions containing no test compound, are then allowed to cool in Petri dishes thereby forming solidified agar plates. The test yeast-like fungi are prepared for use by growing in broth overnight. The spores of the filamentous fungi are harvested from mature agar slant cultures and are suspended in sterile physiological saline solution. A loopful of each of the resulting live suspensions is then, still employing sterile techniques, streaked upon the surfaces of each of the agar plates and the resulting streaked plates are then incubated. After an appropriate period of time, each of the streaks on each of the plates is inspected visually and the extent, if any, of fungal growth is noted. Appropriate calibration of these observations permits the quantitative calculation of the minimal inhibitory concentration (expressed in micrograms per milliliter) causing complete inhibition of growth for each test compound.

The minimal inhibitory concentrations of 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone (I) and of 1-acetyloxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone (II) against various test or-

ganisms as determined in the above-described assay are set forth in Table V below:

TABLE V

Fungal culture	Minimal inhibitory concentration, mcg./ml.	
	(I)	(II)
<i>Candida albicans</i> E 83	31.0	50.0
<i>Cryptococcus neoformans</i> E 138	1.5	5.0
<i>Trichophyton tonsurans</i> NIH 662	1.5	2.0
<i>Trichophyton rubrum</i> E 97	3.1	5.0
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> E 11	1.5	5.0
<i>Microsporum canis</i> ATCC 10211	3.1	1.0
<i>Microsporum gypseum</i> ATCC 13683	6.2	5.0
<i>Philophora jeikei</i> ATCC 10234	6.2	20.0

The invention will be described in greater detail in conjunction with the following specific examples.

EXAMPLE 1

Inoculum preparation

"Seed" inoculum for inoculating tank fermentors is prepared in two stages.

First Stage.—The spores from an agar slant of culture *S. himmulinus*, NRRL 3592, are scraped into two 500 milliliter flasks each containing 100 milliliters of sterile liquid medium. The following medium is ordinarily used.

	Grams
Glucose	20
Soybean flour	10
Corn steep liquor	5
Calcium carbonate	3
Water to 1,000 milliliters.	

The flasks are placed on a rotary shaker (150 r.p.m.) and growth is allowed to continue for about 48 hours at a temperature of 28° C.

Second stage.—Two hundred milliliters of inoculum from the first stage are added to 12 liters of the above sterile medium contained in a 20-liter bottle. The bottle is incubated at a temperature of about 28° C. for about 48 hours. The inoculum mash is aerated with sterile air. The inoculum so obtained is used to inoculate tank fermentors.

EXAMPLE 2

Tank fermentation

A fermentation medium is prepared according to the following formula:

	Grams
Molasses	20
Glucose	10
Bacto Peptone	5

Water to 1,000 milliliters.

(pH is adjusted to 7.3 with 10 N sodium hydroxide.)

Three hundred liters of the above medium is sterilized with steam pressure at 120° C. for 60 minutes. After cooling to 28° C., the fermentor is inoculated with twelve liters of inoculum, prepared as described in Example 1. The fermentation mash is aerated at the rate of 0.5 liter of sterile air per liter of mash per minute and agitated at 200 r.p.m. The temperature is maintained at 28° C. and Hodag LG-8 oil is used as defoaming agent. The activity of the antifungal in the mash is followed by agar-diffusion cylinder plate assay against *P. varioti*. The fermentation is harvested 30 hours after inoculation. At harvest time, the mash filtrate produces a zone of inhibition of 33 millimeters.

EXAMPLE 3

Isolation of 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone

Two hundred and ninety liters of fermented mash, obtained as described in Example 2, is filtered using diatomaceous earth as filter aid in the proportion 3% weight per volume. The filtrate is extracted with two portions

of chloroform using one-third volume of chloroform to one volume of filtrate. The chloroform extracts are combined and evaporated under reduced pressure at 30°–35° C. to volume of about three liters. The concentrate is dried over magnesium sulfate, and following removal of the salt by filtration, evaporation of the concentrate under the above conditions is continued until a mobile dark oil is obtained (weight 17.5 g.).

Purification of the dark oil is carried out using column chromatography. About 200 g. of acid-washed diatomaceous earth is equilibrated with 100 ml. of the lower phase of the solvent system n-hexene:ethyl acetate:methanol:water (90:10:15:6) and packed into a column (I.D. 1 3/8 inches). A 6.0 g. portion of the dark oil is dissolved in 10 ml. of the lower phase. About 20 g. of diatomaceous earth is added to the solution and the mixture is charged onto the column. The column is developed using the upper phase of the solvent system while monitoring the effluent with ultraviolet light at 238 mμ. The active material, eluted in the second and third hold-back volumes, is recovered following evaporation of the solvent under reduced pressure (1.2 g. of mobile yellow oil). Further purification is effected by dissolving the oil in about 50 ml. of hexane and decolorizing with 150 to 200 mg. of Darco G-60. Essentially pure product, as shown by thin layer chromatography, is obtained on removal of the charcoal and evaporation of the solvent under reduced pressure. [Thin layer chromatography of the purified oil on partially deactivated silica gel using the developing system hexane:ethyl acetate (60:40) shows it to be a single entity, R_f=0.7.]

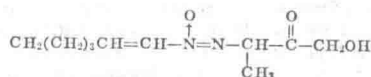
EXAMPLE 4

Preparation of 1-acetyloxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone

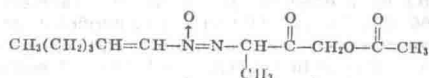
About 428 mg. (2 mmole) of 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone is dissolved in 5 ml. of acetic anhydride and 60 mg. of anhydrous sodium acetate is added to the solution. The reaction mixture is kept in the dark at room temperature for at least 2 hours. At the end of this period the solvent is evaporated under reduced pressure at 30°–35° C., and the resultant oil-solid suspension is treated with toluene. The hydrated sodium acetate is removed by filtration and the filtrate is evaporated under reduced pressure to an oil. The oil is purified by chromatography using 20 g. of silica gel (Davidson, Grade 922) with 5% ethyl acetate in hexane as the eluting solvent. The product is recovered as a light yellow oil from the second and third hold-back volumes upon evaporation of the solvent. For further purification the oil is taken up in a small volume of hexane and the solution is treated with 1 to 2% (w./w.) of Darco G-60. The suspension is filtered and the acetyl derivative is recovered by evaporation of the hexane under reduced pressure. (The yield of the acetyl derivative, prepared as described, is normally about 60 percent.) Optical rotation $[\alpha]_D^{25} +143 \pm 3.3$ (c=0.918 methanol). Ultraviolet maximum, λ_{max} 239 mμ (ε 7,500) methanol. Molecular ion by mass spectroscopy given by m/e=256.

We claim:

1. The compound 1-hydroxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone represented by the formula:



2. The compound 1-acetyloxy-3-(1-hexenylazoxy)-2-butanone represented by the formula:



(References on following page)

References Cited

- Mortimer, J. *Org. Chem.*, vol. 30, pp. 1632-1634 (1965).
 Moss et al., *Tetrahedron Letters*, No. 44, pp. 3897-3899 (1969).
 Stevens et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, pp. 6088 to 6092 (1958).
 Aston et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 54, pp. 1530-1538 (1932).
 Aston et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 56, pp. 1387-1388 (1934).

- Aston et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 60, pp. 1930-1935 (1938).
 Aston et al., *Nature*, vol. 167, pp. 863-864 (1951).
 Gillis et al., *J. Org. Chem.*, vol. 32, pp. 95-96 (1967).
 Iffland et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 83, pp. 747-749 (1961).

FLOYD DALE HIGEL, Primary Examiner

U.S. Cl. X.R.

195-27, 53, 80; 424-115, 226