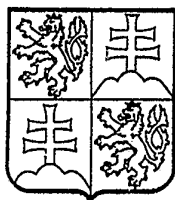


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

272 206

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
C 07 D 519/02
C 12 N 1/14
C 12 P 17/18

(21) PV 3919-85.

(22) Přihlášeno 31 05 85

(40) Zveřejněno 11 04 90

(45) Vydáno 14 10 91

(72) Autor vynálezu

WILKE DETLEF dr., WENNIGSEN/DEISTER (DE),
WEBER ALFRED dr., ZÁPADNÍ BERLÍN (WB)

(73) Majitel patentu

SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT, ZÁPADNÍ BERLÍN (WB)
A BERGKAMEN (DE)

(54)

Způsob výroby alfa-ergokryptinu

(57) Způsob výroby alfa-ergokryptinu spo-
čívá v tom, že se mikroorganismus druhu
Claviceps paspali DSM 2836 kultivuje za
anerobních podmínek v přítomnosti uhlohyd-
rátů, dusíkatých sloučenin, růstových lá-
tek a minerálních solí při hodnotě pH 4 až
6 za teploty 20 až 35 °C a po skončené fer-
mentaci se vzniklý alfa-ergokryptin izoluje.

Vynález se týká způsobu výroby alfa-ergokryptinu kultivací určitého druhu mikroorganismu.

alfa-Ergokryptin = 9,10^{alfa}-dihydro-12'-hydroxy-2'/1-methylethyl/-5'alfa-/2-methyl-propyl-/ergotaman-3', 6', 18-trion je, jak známo, farmakologicky účinný. Podle dosud známých způsobů výroby je alfa-ergokryptin dostupný fermentační cestou jenom ve směsi s ostatními námelovými a peptidovými alkaloidy /německý zveřejňovací spis 31 04 151/. Tím je jeho výroba izolace velice náročná

Nyní bylo nalezeno, že kmen houby druhu *Claviceps* vylučuje do kultivačního prostředí ve vysokých výtěžcích alfa-ergokryptin prostý vedle stop agroklavinu přítomnosti dalších námelových alkaloidů. Tento kmen druhu *Claviceps* byl izolován z námele divoce rostoucí traviny druhu *Spartina alterniflora*; má interní označení Schering, MBCE 5227 a je uložen v německé sbírce pro mikroorganismy pod číslem DSM 2836. Kmen vytváří na agarových prostředcích se sacharózou jako zdrojem uhlíku a asparaginem jako zdrojem dusíku ploché, nažloutlé kolonie z kompaktního mycelia. Průměr kolonií činí po 7 dnech kultivace 2 až 3 cm a po 20 dnech kultivace 6 až 8 cm.

Na agarovém živiném prostředí se sacharózou jako zdrojem uhlíku a jantaranem amonným nebo citranem amonným jako zdrojem dusíku vytváří houba pomalu rostoucí, klenuté a nad agarovým povrchem lehce nadzdvížené, nažloutlé hnědé kolonie. Kolonie má tvorbou vzdušného mycelia hrubý, kulovitý povrch. Okraj kolonie je roztrěpen. Průměr kolonie činí po 14 dnech 2 až 3 cm a po době 30 dní 6 až 7 cm. Vedle hyfovitého mycelia se vyskytují krátké kulovité buňky, které mohou být též nepravidelně tvarované a často vytvářejí řetězce a vyplněné vakuolami silně lámou světlo. Průměr hyf činí 3 až 4 μm . Vakuolizované buňky mají průměr od 6 do 10 μm a délku od 10 do 25 μm .

Způsob výroby alfa-ergokryptinu podle vynálezu spočívá v tom, že se mikroorganismus druhu *Claviceps paspali* DSM 2836 kultivuje za anaerobních podmínek v přítomnosti uhlohydrátů, dusíkatých sloučenin, růstových látek a minerálních solí při hodnotě pH 4 až 6 za teploty 20 až 35 °C a po skončené fermentaci se vzniklý alfa-ergokryptin izoluje.

Způsob podle vynálezu se tedy provádí za podmínek, kterých se obvykle používá k pěstování kultur hub pro metabolickou syntézu. Tak se nejprve určí v obecných obvyklých předběžných pokusech nejpriznivější podmínky fermentace, jako například volba nejpriznivějšího živiného prostředí, technických podmínek, jako teploty, vzdušnosti, přesné hodnoty pH a optimálních časů pro klíčení a vývoj mikroorganismu.

Jako zdroj uhlíku pro fermentační prostředí lze použít například glukózu nebo sacharózu. Jako zdroj dusíku slouží kromě jiného asparagin, jantaran amonný nebo síran amonný. Prostředí obsahuje dále nezbytné růstové látky /například kvasničný extrakt/ a minerální látky /draselné, hořečnaté, vápenaté, železnaté a zinečnaté kationty, jakož i sulfátové, fosfátové, dusičnanové a chloridové anionty/ v obvykle používané koncentraci.

Fermentace může být jedno- nebo dvoustupňová, přičemž prostředí užitá pro předkulturu může být totožné s prostředím hlavní kultury nebo odlišné. Pro předkulturu se používá s výhodou glukóza jako zdroj uhlíku, pro hlavní kulturu s výhodou sacharóza. Prostředí předkultury obsahuje s výhodou 10 až 100 mg/l zdrojů uhlíku, prostředí hlavní kultury s výhodou 100 až 300 mg.

Na začátku fermentace se nastavuje hodnota pH prostředí s výhodou v rozsahu od 4 do 6. Teplota kultivace se pohybuje v rozmezí asi od 10 až do 35 °C, s výhodou v rozmezí od 20 do 30 °C. Podmínky kultivace jsou přísně aerobní. Optimální doba fermentace se zjišťuje obvyklým způsobem pomocí analýzy vzniklého alfa-ergokryptinu.

Po skončené fermentaci se vzniklý alfaergokryptin izoluje o sobě známým způsobem, například tak, že se fermentační náklady extrahují s vodou nemísitelným organickým rozpouštědlem, jako ethylacetátem, methylisobutylketonem, dichlormethanem, chloroformem nebo tetrachlorethanem, extrakty se zkoncentrují a získaný surový produkt se čistí chromatografií a/nebo krystalizací.

Následující příklad provedení slouží k vysvětlení způsobu podle vynálezu.

Claviceps druh DSM 2836 se pěstuje na živném prostředí, které obsahuje následující složky:

Sacharózu /100g/l/, kyselinu citronovou /10g/l/, kvasničný extrakt /0,1 g/l/, dihydrogenfosfát draselný /500 mg/l/, heptahydrát síranu hořečnatého /300 mg/l/, síran amonný /6 g/l/, tetrahydrát dusičnanu vápenatého /1 g/l/, heptahydrát síranu železnatého /7 mg/l/, heptahydrát síranu zinečnatého /6 mg/l/, agar /16 g/l/. Hodnota pH živného prostředí se nastává na 5,1. Pěstovaná kultura se uchovává po dobu 5 až 20 dnů při teplotě 30 °C v termostatu.

Asi 1 cm² velký kousek mycelia se za sterilních podmínek rozmělní pomocí mixéru v 5 ml fyziologického roztoku a tím se očkuje 50 ml předkultury obsahující glukózu /100 g/l/, kyselinu citronovou /7,5 g/l/, dihydrogenfosfát draselný /0,59 g/l/, heptahydrát síranu hořečnatého /300 mg/l/, síran amonný /6 g/l/, heptahydrát síranu železnatého /7 mg/l/, heptahydrát síranu zinečnatého /7 mg/l/, tetrahydrát dusičnanu vápenatého /1 g/l/, kvasničný extrakt /0,1 g/l/, nastavené na hodnotě pH 5,1, která je umístěna v 500 ml Erlenmeyerově baňce a kultivuje se na rotační třepačce s 220 otáčkami za minutu po dobu 4 dní při teplotě 24 °C.

5 ml takto získané předkultury se přenesou do 80 ml prostředí obsahujícího sacharózu /200 g/l/, kyselinu citronovou /10 g/l/, kvasničný extrakt /0,1 g/l/, dihydrogenfosfát draselný /500 mg/l/, heptahydrát síranu hořečnatého /300 mg/l/, síran amonný /6 g/l/, tetrahydrát dusičnanu vápenatého /1 g/l/, heptahydrát síranu železnatého /7 mg/l/ a heptahydrát síranu zinečnatého /6 mg/l/, nastaveného na hodnotu pH 5,1, které je umístěno v 500 ml Erlenmeyerově baňce a po dobu 9 dní se při teplotě 24 °C třepě na rotační třepačce se 240 otáčkami za minutu.

Potom se živné prostředí odfiltruje a pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie /Fresenius Z.Anal.Chem. 303, 1980, 208/ se určí obsah alfaergokryptinu. Koncentrace kultivačního filtrátu činí 525 mg/l.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby alfa-ergokryptinu, vyznačující se tím, že se mikroorganismus druhu Claviceps paspali DSM 2836 kultivuje za anerobních podmínek v přítomnosti uhlohydrátů, dusíkatých sloučenin, růstových látek a minerálních solí při hodnotě pH 4 až 6 za teploty 20 až 35 °C a po skončené fermentaci se vzniklý alfa-ergokryptin izoluje.