



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **237 185 A5**

4(51) C 12 P 17/00
C 12 P 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 P / 276 813 4	(22)	30.05.85	(44)	02.07.86
(31)	P3420955.7	(32)	01.06.84	(33)	DE

(71)	siehe (73)
(72)	Wilke, Detlef, Dr., DE; Weber, Alfred, Person mit ständigem Wohnsitz in Berlin (West)
(73)	Schering AG, 1000 Berlin (West) 65, Müllerstraße 170–178, WB, und Bergkamen, DE

(54) Verfahren zur Herstellung von Festuclavin

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von Festuclavin beansprucht, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Mikroorganismus *Claviceps paspali* 2838 kultiviert und das gebildete Festuclavin nach Beendigung der Fermentation isoliert.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Festuclavin, **gekennzeichnet dadurch**, daß man den Mikroorganismus *Claviceps paspali* 2838 kultiviert und das gebildete Festuclavin nach Beendigung der Fermentation isoliert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Festuclavin.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Festuclavin (6,8-Dimethyl-ergolin) ist bekanntlich eine Vorstufe zur Biosynthese pharmakologisch wirksamer Ergotalkaloide und kann unter anderem zur Herstellung pharmakologisch wirksamer N_1 -Alkyl-4,8-dimethyl-ergolinen verwendet werden.

(CS-PS 189485, referiert in C. A. 96, 1982, 143148x).

Nach den bisher bekannten Verfahren wird es aber auf fermentativem Wege nur im Gemisch mit anderen Ergotalkaloiden erhalten. Demzufolge ist seine Herstellung und Isolierung sehr aufwendig.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Suche nach einem Verfahren zur Herstellung von reinem Festuclavin.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Es wurde nun gefunden, daß ein Pilzstamm *Claviceps paspali* Festuclavin in hohen Ausbeuten und praktisch frei von anderen Ergotalkaloiden in das Kulturmedium ausscheidet. Dieser Stamm wurde aus einem Mutterkorn einer in Argentinien wild wachsenden Grassorte der Gattung *Paspalum* isoliert. Er hat die interne Bezeichnung SCHERING, MBCE 12426 und ist bei der deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Nummer DSM 2838 hinterlegt. Der Stamm bildet auf Agarmedien mit Glucose oder Saccharose als Kohlenstoffquelle und Asparagin, Ammoniumsuccinat oder komplexen Stickstoffquellen wie Pepton flache, schnellwüchsige Kolonien, die aus Hyphen, Konidien und kurzen verdickten und stark vakuolisierten Zellen bestehen.

Die Hyphen haben einen Durchmesser von 4 bis 5 μm . Die Konidien sind oval und haben eine Breite von 6 bis 10 μm und eine Länge von 10 bis 20 μm . Die Kolonien sind grauweiß, kompakt, und zeigen eine flechtenartig gekräuselte Oberfläche und einen unregelmäßig ausgefranzten Rand. Der Koloniedurchmesser beträgt nach 10 Tagen Kulturzeit 1 bis 2 cm und nach 35 Tagen Kulturzeit 4 bis 5 cm.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird unter Bedingungen durchgeführt, die man üblicherweise zur Anzucht von Pilzkulturen für eine Stoffwechselsynthese anwendet. So werden zunächst in allgemein üblichen Vorversuchen die günstigsten Fermentationsbedingungen, wie z. B. die Auswahl des günstigsten Nährmediums, der technischen Bedingungen wie Temperatur, Belüftung pH-Wert und der optimalen Zeiten für die Germination und die Entwicklung des Mikroorganismus ermittelt.

Als Kohlenstoffquelle kann für das Fermentationsmedium beispielsweise Glucose oder Saccharose verwendet werden. Als Stickstoffquelle dient unter anderem Asparagin, Ammoniumsuccinat oder komplexe Substanzen wie Pepton. Ferner enthält das Medium die nötigen Wachstumsstoffe (beispielsweise Hefeextrakt) und Mineralstoffe (Kalium-, Magnesium-, Kalzium-, Eisen- und Zink-Kationen sowie Sulfat, Phosphat, Nitrat und Chlorid-Anionen) in der üblicherweise angewendeten Konzentration.

Die Fermentation kann ein- oder zweistufig erfolgen, wobei das für die Vorkultur verwendete Medium mit dem der Hauptkultur identisch sein oder von diesem verschieden sein kann.

Zu Beginn der Fermentation wird der pH-Wert des Mediums vorzugsweise in einem Bereich von 4 bis 6 eingestellt. Die Züchtungstemperatur liegt im Bereich von etwa 10 bis 35°C, vorzugsweise im Bereich von 20 bis 30°C. Die Kulturbedingungen sind streng aerob. Die optimale Fermentationszeit wird durch Analyse des gebildeten Festuclavins in üblicher Weise ermittelt.

Nach erfolgter Fermentation wird das gebildete Festuclavin in an sich bekannter Weise isoliert, beispielsweise indem man die Fermentationsansätze mit einem nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, wie Ethylacetat, Methylisobutylketon, Dichlormethan, Chloroform oder Tetrachlorethan extrahiert, die Extrakte einengt und das erhaltene Rohprodukt durch Chromatographie und/oder Kristallisation reinigt.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele dienen zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Beispiel 1

Claviceps paspali DSM 2838 wird auf einem Nährmedium angezüchtet, welches folgende Komponenten enthält:

Saccharose (100 g/l), Asparagin (10 g/l), Hefeextrakt (0,1 g/l), Kaliumdihydrogenphosphat (250 mg/l), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (250 mg/l), Kaliumchlorid (120 mg/l), Calciumnitrat-Tetrahydrat (1 g/l), Eisensulfat-heptahydrat (20 mg/l), Zinksulfat-Heptahydrat (15 mg/l), Agar (18 g/l). Das Nährmedium ist auf pH 5,1 eingestellt. Die Anzuchtkultur wird 5 bis 20 Tage lang bei 30°C im Brutschrank aufbewahrt.

Ein ca. 1 cm² großes Mycelstück wird mittels eines Ultraturrax unter sterilen Bedingungen in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung zerkleinert und damit 50 ml eine Vorkultur enthaltend Saccharose (100 g/l), Pepton (20 g/l), Kaliumdihydrogenphosphat (1 g/l), Magnesiumsulfat-heptahydrat (250 mg/l), die sich in einem 500 ml Erlenmeyerkolben befindet, beimpft und auf einem Rundschtüttler 4 Tage lang bei 24°C und 220 Umdrehungen pro Minute kultiviert.

ml der so erhaltenen Vorkultur werden in 50 ml eines Mediums enthaltend Saccharose (100 g/l), Asparagin (10 g/l), Hefeextrakt (1 g/l), Kaliumhydrogenphosphat (250 mg/l), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (250 mg/l), Kaliumchlorid (120 mg/l), Calciumnitrat-Tetrahydrat (1 g/l), Eisensulfat-Heptahydrat (20 mg/l) und Zinksulfat (15 mg/l) — eingestellt auf pH 5,1 — die sich in einem 500 ml Erlenmeyerkolben befindet, überführt und 7 Tage lang bei 24°C auf einem Rundschüttler mit 240 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Dann wird das Kulturmedium abfiltriert und der Gehalt an Festuclavin mittels der van Urk's-Reaktion (Mikrochim. Acta, 1959, 19–630) fotometrisch ermittelt. Die Konzentration des Kulturfiltrates beträgt 2,28 g/l.

Beispiel 2

Unter den Bedingungen des Beispiels 1 aber nach Austausch des Vor- und Hauptkulturmediums gegeneinander erhält man nach 7 Tagen Kulturzeit im Medium der Hauptkultur 2,07 g pro Liter Festuclavin.