



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz
der DDR vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

4(51) C 12 P 17/10

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 P / 328 463 8	(22)	10.05.89	(44)	03.10.90
(71)	siehe (73)				
(72)	Müller, Marina, Dipl.-Biol., DD				
(73)	Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, Institut für Futterproduktion, Kreis Nauen, Paulinen- aue, 1551, DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung des Mykotoxins Tenuazonsäure				

(55) Mykotoxin; Tenuazonsäure; mikrobiologisches Verfahren; *Alternaria alternata* IFP/A374; Kultivierung; Flüssigmedium; chromatografische Reinigung; Ausbeute; Reinheit; Standardsubstanz; Analytik; Toxikologie
(57) Die Erfindung betrifft ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung des Mykotoxins Tenuazonsäure mit Hilfe eines geeigneten *Alternaria alternata*-Stammes. Tenuazonsäure wird als Standardsubstanz für analytische und toxikologische Untersuchungen in Einrichtungen der Human- und Veterinärmedizin, der Landwirtschaft und der Nahrungsgüterindustrie genutzt. Es ist das Ziel des Verfahrens, Tenuazonsäure in hohen Ausbeuten durch die Kultivierung von *Alternaria alternata* IFP/A374 und in hoher Reinheit zu isolieren. Es werden die Kultivierung des *Alternaria*-Stammes auf halbsynthetischem Flüssigmedium sowie eine effektive chromatografische Reinigung des Mykotoxins beschrieben.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung des Mykotoxins Tenuazonsäure, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus *Alternaria alternata* IFP/A374 in flüssigem Nährmedium, bestehend aus Hefeextrakt und Saccharose, als Standkultur bei 25°C während eines Zeitraumes von 28 Tagen kultiviert wird und das dabei gebildete Mykotoxin Tenuazonsäure sowohl aus dem Myzel als auch aus dem Kulturfiltrat extrahiert, nachfolgend mit den üblichen Methoden konzentriert, säulenchromatografisch gereinigt und in sein stabiles Kupfersalz überführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung des Mykotoxins Tenuazonsäure, das als Standardsubstanz für analytische Untersuchungen mykotoxinverdächtigter Nahrungs- und Futtermittel und für toxikologische Untersuchungen benötigt wird.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Für das die Erfindung betreffende mikrobiologische Verfahren unter Verwendung des hinterlegten *Alternaria*-Stammes konnten keine technischen Lösungen ermittelt werden. In der Fachliteratur (SCHADE, J. E., und KING, A. D.: J. Food Prot. 47 [1984], 978-995) werden der Nachweis von Tenuazonsäure mit den üblichen chemischen Extraktions- und Reinigungsverfahren beschrieben sowie eine Isolierung von Tenuazonsäure mittels nicht näher charakterisierter *Alternaria*-Stämme und ohne Angaben über Ausbeute und Reinheit des isolierten Mykotoxins.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein mikrobiologisches Verfahren für die Herstellung des Mykotoxins Tenuazonsäure mittels *Alternaria alternata* IFP/A374 in hoher Ausbeute und Reinheit zu schaffen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

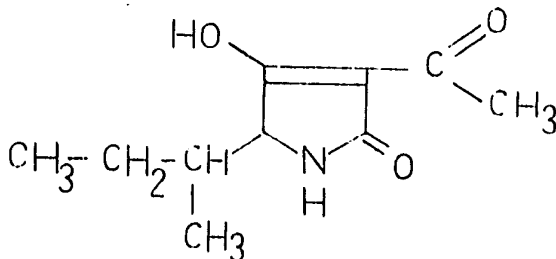
Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, mit Hilfe eines hochproduktiven *Alternaria alternata*-Stammes das Mykotoxin Tenuazonsäure herzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß der Pilzstamm *Alternaria alternata* IFP/A374 zur Herstellung des Mykotoxins in einer Hefeextrakt/Saccharose-Bouillon bei 25°C für 28 Tage kultiviert wird.

Tenuazonsäure wird zu 70-80% ins Kulturmedium abgegeben, deshalb erfolgt die Extraktion sowohl des Flüssigmediums als auch des getrockneten Pilzmyzels mit einem organischen Lösungsmittel wie Methanol oder Chloroform. Die vereinigten Rohextrakte werden säulenchromatografisch an Kieselgel gereinigt.

Tenuazonsäure ist ein viskoses Öl, das als Kupferkomplex auskristallisiert wird (Schmelzpunkt: 170°C-175°C). Die notwendige Reinheit als Standardsubstanz von $\geq 99\%$ wird am Hochdruckflüssigkeitschromatografen überprüft. Die Ausbeute an Tenuazonsäure mit einer Reinheit von $\geq 99\%$ beträgt etwa 15-30 mg/100 ml Kulturansatz.

Die nach dem beschriebenen Verfahren gewonnene Tenuazonsäure der Formel



ist durch folgende physikalisch-chemisch Daten charakterisiert:

- a) Molekulargewicht: 197
- b) Aussehen: gelbbraunes viskoses Öl
- c) Löslichkeit: gut löslich in Aceton, Benzene, Chloroform, Ethanol
MeOH, acidisch (log e)
- d) UV-VIS-Spektrum: $\lambda_{\max}$ 218 nm (3,70)
277,5 nm (4,10)
MeOH, neutral, basic $\lambda_{\max}$ 240 nm, 280 nm

e) dünnschichtchromatografische Daten

Adsorbent: Kieselgel

Detektion: – nach Besprühen mit 1%iger ethanolischer FeCl_3 -Lösung zeigt sich intensive orangefarbene Färbung
 – Fluoreszenzlösung unter kurzwelligem UV-Licht

Lösungsmittel: Benzene/Methanol/Eisessig 90 + 5 + 5

 R_f -Wert: 0,48–0,51

Der zur Produktion von Tenuazonsäure verwendete *Alternaria alternata*-Stamm IFP/A374 wurde im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena (ZIMET) unter der Bezeichnung IMET 43903 hinterlegt.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Je 100 ml einer 2%igen Yeastextraktlösung mit Zusatz von 4% Saccharose werden in 500-ml-Standkolben bei 121°C sterilisiert. Jeder Kolben wird mit einer Sporensuspension einer 7 Tage alten Einsporkultur von *Alternaria alternata* IFP/A374, die auf Kartoffel-Dextrose-Agar angezogen wurde, beimpft. Die Kolben werden als Standkultur 28 Tage bei 25°C inkubiert.

Anschließend wird das Pilzmyzel durch Filtrieren vom Flüssigmedium getrennt und bei 50°C getrocknet.

Das Kulturmedium wird mit $2\text{NH}_3\text{PO}_4$ auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und anschließend mit dem 1/2fachen Volumen Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird dann mit dem gleichen Volumen einer 5%igen wässrigen NaHCO_3 -Lösung versetzt und extrahiert. Die wässrige Phase wird nochmals auf pH 2 eingestellt und anschließend mit Hexan extrahiert. Diese organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und bis zur Trockne eingeeengt.

Das getrocknete und gemahlene Pilzmyzel wird mit Chloroform/Methanol/Ameisensäure (94 + 3 + 3) 4 Stunden extrahiert und anschließend filtriert. Das Filtrat wird mit dem gleichen Volumen 5%iger NaHCO_3 -Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wird auf pH 2 eingestellt und mit Hexan extrahiert. Die gewonnene organische Phase wird mit dem Rohextrakt der Extraktion des Kulturmediums vereinigt.

Für die anschließende säulenchromatografische Reinigung wird das verwendete Kieselgel 60 (0,063–0,2 mm) mit Oxalsäure präpariert (5 g Oxalsäure/95 g Kieselgel). 200–800 mg Tenuazonsäure-Rohextrakt werden an 20 g aktiviertem Kieselgel in einer 300 mm × 23 mm Säule gereinigt. Zuerst wird die Säule mit 75 ml Toluol gewaschen, anschließend wird als Elutionsmittel ein Stufengradient von Methylchlorid/Aceton von 100 + 0 nach 90 + 10 mit je 100 ml eingesetzt. Es werden Fraktionen zu je 15 ml gesammelt und dünnschichtchromatografisch auf Tenuazonsäure untersucht. Alle Tenuazonsäure enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und zur Trockne eingeeengt. Zur stabilen Lagerung wird Tenuazonsäure als Kupferkomplexsalz auskristallisiert. Dazu wird Tenuazonsäure in Methanol aufgenommen (etwa 100 mg/ml MeOH) und mit einer 2%igen wässrigen Kupfer(II)-acetat-Lösung (0,5 mol äquivalent) versetzt. Es wird zweimal aus Methanol/Wasser (1 + 1) umkristallisiert. Kupfertenuazonat liegt dann in Form hellgrüner kurzer Nadeln (Schmelzpunkt: 172°C) vor. Der Reinheitsgrad wird hochdruckflüssigkeitschromatografisch bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt.