



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 224 048 A1

4(51) C 12 P 7/66

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 255 960 8 (22) 26.10.83 (44) 26.06.85

(71) Friedrich-Schiller-Universität Jena, 6900 Jena, Neugasse, DD
(72) Häßler, Gabriele; Schubert, Barbara, Dr.; Fritsche, Wolfgang, Prof. Dr., DD

(54) Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Oosporein und seines Eisen(III)-Komplexes

(57) Die Erfindung betrifft ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von Oosporein und seinem Eisen(III)-Komplex. Grundlage der Erfindung ist der neue Mikroorganismus *Aphanocladium spec.*, der unter submersen Bedingungen in einem Komplexmedium Oosporein produziert. Die Ausbeute ist gegenüber anderen Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Oosporein wesentlich erhöht. Auf Grund seiner biologischen Aktivität kann Oosporein als Algizid, Herbizid und Cytostatikum eingesetzt werden. Mit Schwermetallen werden Komplexe gebildet, insbesondere der Oosporein-Eisen(III)-Komplex, der siderophore Eigenschaften besitzt.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Oosporein und seines Eisen(III)-Komplex, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Stamm *Aphanocladium spec.* unter submersen Bedingungen in einem Komplexmedium bei einem pH-Wert von 5 bis 7 und einer Temperatur von 26 bis 30°C kultiviert wird, daß der Eisengehalt des Nährmediums unter einem Schwellenwert von 5×10^{-5} Mol liegt, daß aus dem Kulturfiltrat des Stammes *Aphanocladium spec.* Oosporein isoliert und zu einem reinen Produkt in hohen Ausbeuten aufgearbeitet wird und daß man Oosporein, gelöst in Alkohol, bei Raumtemperatur mit einer schwach wässrigen Eisen(III)-chlorid Lösung zu einem Komplex umsetzt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kultivierung im pH-Bereich von 5,6 bis 6,6 und bei einer Temperatur von 28°C durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß mit einer 1%igen wässrigen Lösung gearbeitet wird, die Abtrennung durch Zentrifugation erfolgt und mit kaltem Alkohol gereinigt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von Oosporein und seinem Eisen(III)-Komplex. Oosporein ist die natürlich vorkommende Dibenzochinon — Verbindung 2,2', 5,5' — Tetrahydroxy — 4,4' — dimethyl — bi — 1,4 — cyclohexadien — 1 — yl — 3,3', 6,6' — tetron, die von verschiedenen Mikroorganismen gebildet wird. Sie ist in der Lage, mit verschiedenen Schwermetallen Komplexe zu bilden. Mit Eisen(III)-Ionen bildet Oosporein einen Komplex, der siderophore Eigenschaften besitzt und zu medizinischen Zwecken herangezogen werden könnte. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Erfindung besteht in dem Einsatz von Oosporein als Algizid, Herbizid und Cytostatikum.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bisher sind verschiedene mikrobielle Verfahren zur Herstellung von Oosporein bekannt (LLOYD, G. et al. (1955) J. Chem. Soc. 2136; TAKESHITA, H. et al. (1964) Science 147, 152; DIKEVAR, P. V. et al. (1959) Can. J. Chem. 37, 2097; VINING, L. C. (1962) Can. J. Microbiol. 8, 931; KÖGL, F. et al. (1944) 63, 5; SMITH, J. et al. (1960) Tetrahedron 10, 148). Diese Verfahren haben allerdings den Nachteil, daß Oosporein nur in geringen Ausbeuten gebildet wird. Es wird mit synthetischen Nährlösungen gearbeitet (LLOYD, G. et al. (1955) J. Chem. Soc. 2136; DIKEVAR, P. V. et al. (1959) Can. J. Chem. 37, 2097; SOHAIR, H. et al. (1966) Can. J. Biochem. 44, 557; SOHAIR, H. et al. (1968) Can. J. Bot. 46, 441) bzw. mit halbsynthetischen Nährlösungen mit Zusatz von Pepton und Kartoffel (VINING, L. C. (1962) Can. J. Microbiol. 8, 931; TAKESHITA, H. et al. (1964) Science 147, 152; SOHAIR, H. et al. (1968) Can. J. Bot. 46, 441). Der Oosporein — Eisen(III)-Komplex ist bisher noch nicht hergestellt worden.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist die mikrobielle Herstellung von Oosporein in hohen Ausbeuten. Damit soll die Grundlage zur weiteren Verarbeitung in Richtung eines Eisen(III)-Komplexes aufgezeigt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von Oosporein und seines Eisen(III)-Komplexes zu beschreiben, das nicht die geschilderten Nachteile im Sinne von geringen Ausbeuten besitzt.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein mikrobielles Verfahren gelöst, das von einem neuen Mikroorganismus ausgeht, der als *Aphanocladium spec.* bezeichnet ist und der in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstitutes für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena der Akademie der Wissenschaften der DDR für die Hinterlegung von Mikroorganismen bei der Vornahme von Erfindungsanmeldungen unter der Nummer ZIMET 43718 hinterlegt worden ist.

Der Stamm *Aphanocladium spec.* wird unter submersen Bedingungen in einem Nährmedium von Malzextrakt und Pepton bei einem pH-Wert von 5 bis 7 und einer Temperatur von 26 bis 30°C kultiviert. Nach einer Kultivierungszeit von 10 Tagen wird die höchste Ausbeute erreicht. Entscheidend für diese hohe Ausbeute ist der geringe Eisengehalt des Nährmediums. Es wurde ein Schwellenwert von 5×10^{-5} Mol ermittelt.

Als Impfmateriale für die Vorkultur dienen Kulturen auf Schrägagar bzw. Agarplatten. Als Impfmateriale für die Hauptkultur dient zerkleinertes Deckmyzel der Vorkultur.

Die Kulturlösung wird vom Myzel getrennt und zur Isolierung von Oosporein mit Essigsäureäthylester extrahiert. Die Behandlung der organischen Phase mit Natriumhydrogencarbonatlösung und eine anschließende Fällung erbringen in hohen Ausbeuten Oosporein. Durch die Umsetzung von Oosporein mit verschiedenen Schwermetallen werden Komplexe gebildet. Oosporein wird in Alkohol gelöst und anschließend mit einer 1%igen wässrigen Eisen(III)-chlorid Lösung versetzt. Die entstandene Komplexverbindung wird in der bekannten Weise isoliert. Dieser Oosporein — Eisen(III)-Komplex ist neu und weist siderophore Eigenschaften auf.

Ausführungsbeispiel 1

An einem Ausführungsbeispiel soll das Verfahren näher erläutert werden.

Die Stammhaltung von *Aphanocladium spec.* erfolgt in Schrägagarröhrchen bzw. Agarplatten, die Vor- und Hauptkultur in Flüssigkeitskultur (500ml Rundkolben mit je 100ml Nährlösung). Der Nährboden und die Nährlösung haben folgende Zusammensetzung:

40g Malzextrakt flüssig (ohne Kalk und Biotinzusatz)

1g Pepton

20–30g Agar — Agar

auf 1l Aqua dest.

Bei der Flüssigkeitskultur entfällt der Agarzusatz. der pH-Wert der Nährlösung beträgt 5,6 bis 6,6. Sie wurde jeweils bei 1,2atm 20min bei 120°C sterilisiert.

Die Beimpfung der emers — Vorkultur erfolgt mit 5 Rondellen einer 7 Tage alten Pilzagarplatte. Nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen bei 28°C wird die Myzeldecke steril entnommen, in steriles Aqua dest. übertragen und durch kräftiges Schütteln mit Ballontini — Kugeln zerkleinert. 5ml dieser Suspension dienen als Inokulum für die Hauptkultur.

Die Kultivierung der Hauptkultur erfolgt submers bei 28°C 10 Tage lang auf einem Fanalschüttler (220 U/min Schüttelfrequenz).

Aufarbeitung der Kulturlösung

Die Kulturlösung wird vom Myzel befreit, auf einen pH-Wert von 2,8 bis 3,0 eingestellt und viermal mit Essigsäureäthylester extrahiert. Die neutralgewaschene und getrocknete organische Phase wird bis fast zur Farblosigkeit mit 1n Natriumhydrogencarbonatlösung ausgezogen. Nach Abtrennung der wässrigen Phase säuert man diese sofort an, wobei Oosporein ausfällt. Das Produkt wird durch Kristallisation aus Dioxan gereinigt.

Der Stamm *Aphanocladium spec.* produziert 1020 bis 1035 mg Oosporein pro Liter Kulturlösung.

Eine weitere Erhöhung der Ausbeute an Oosporein um ca. 80 mg pro Liter Kulturlösung kann durch eine Aufarbeitung der wässrigen Phase nach dem Fällungsschritt durch Extraktion mit Essigsäureäthylester erfolgen.

50 mg Oosporein werden unter Erwärmen in 15 ml absolutem Alkohol gelöst und anschließend bei Raumtemperatur mit 20 ml einer 1%igen wässrigen Eisen(III)-chlorid Lösung versetzt. Der entstandene Niederschlag wird durch Zentrifugation abgetrennt und durch Waschen mit kaltem Alkohol gereinigt.