



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

271 314

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
C 12 P 17/18
C 07 D 457/02

(21) PV 3921-85.C
(22) Přihlášeno 31 05 85
(30) Právo přednosti od 01 06 84 DE
(P 34 20 955.7)

(40) Zveřejněno 12 02 90
(45) Vydáno 05 08 91

(72) Autor vynálezu WILKE DETLEF dr., WENNIGSEN/DEISTER (DE),
WEBER ALFRED dr., ZÁPADNÍ BERLÍN (WB)
(73) Majitel patentu SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, ZÁPADNÍ BERLÍN
(WB),
BERGKAMEN (DE)

(54) Způsob výroby festuklavinu

(57) Řešení se týká způsobu výroby festuklavinu, vyznačujícího se tím, že se kultivuje mikroorganismus *Claviceps paspali* 2838 a vzniklý festuklavin se po skončené fermentaci izoluje.

Vynález se týká způsobu vyznačeného v předmětu vynálezu.

Festuklavin (6,8-dimethylergolin) je známým předstupněm při biosynthese farmakologických účinných námelových alkaloidů a kromě jiného jej lze použít k přípravě farmakologicky účinných N_1 -alkyl-4,8-dimethylergolinů (Čs.pat. spis č. 189.485, citace v C.A. 96, 1982, 143138x). Podle dosud známých způsobů fermentační cestou se však získává jenom ve směsi s jinými námelovými alkaloidy. Jeho výroba a izolace jsou proto velice náročné.

Nyní bylo nalezeno, že kmen houby *Claviceps paspali* vylučuje do živného prostředí festuklavin ve vysokých výtěžcích a prakticky bez ostatních námelových alkaloidů. Tento kmen *Claviceps paspali* byl izolován z námele v Argentině divoce rostoucí trávy druhu *Paspalum*. Má inertní označení Schering, MBCE 12426 a je uložen v německé sbírce mikroorganismů pod číslem DSM 2838. Kmen vytváří na agarových prostředích s glukózou nebo sacharózou jako zdrojích uhlíku a s asparaginem, jantaranem amonným nebo komplexními dusíkatými zdroji jako peptinem, ploché, rychle rostoucí kolonie, které sestávají z hyf, konidií a krátkých, ztlustělých a silně vakuolizovaných buněk.

Hyfy mají průměr od 4 do 5 μm . Konidie jsou vejčité a široké od 6 do 10 μm a dlouhé od 6 do 20 μm . Kolonie jsou šedobílé, kompaktní a mají lišejníkovitě zkadeřený povrch a nepravidelně roztržený okraj. Průměr kolonií činí po 10 dnech kultivace 1 až 2 cm a po 35 dnech kultivace 4 až 5 cm.

Způsob podle vynálezu se provádí za takových podmínek, kterých se používá obvykle při pěstování kultur houby metabolickou syntesou. Tak se nejdříve v obvyklých předpokusech zjišťují nejpříznivější podmínky fermentace, jako například výběr vhodného živného prostředí, technických podmínek, jako je teplota, vzdušnění, hodnota pH a optimální doby klíčení a rozvoje mikroorganismů.

Jako zdroj uhlíku lze použít pro fermentační prostředí například glukózu nebo sacharózu. Jako zdroj dusíku slouží především asparagin, jantaran amonný nebo komplexní látky jako pepton. 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 probíhat v jednom nebo ve dvou stupních, přičemž médium používané u předkultury může být identické s médiem hlavní kultury nebo být odlišné.

Na začátku fermentace se nastavuje s výhodou hodnota pH prostředí v rozmezí od 4 do 6. Teplota kultivace se pohybuje v rozmezí od asi 10 až do 35 $^{\circ}\text{C}$, s výhodou v rozmezí od 20 do 30 $^{\circ}\text{C}$. Podmínky kultivace jsou přísně aerobní. Optimální doba fermentace se určuje pomocí analýzy vytvořeného festuklavinu obvyklým způsobem.

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

Následující příklady slouží k vysvětlení způsobu podle vynálezu.

Příklad 1

Claviceps paspali DSM 2838 se pěstuje na živném prostředí, které obsahuje následující složky:

Sacharóza (100 g/l), asparagin (10 g/l), kvasničný extrakt (0,1 g/l), dihydrogenfosfát draselný (250 mg/l), heptahydrát síranu hořečnatého (250 mg/l), chlorid draselný (120 mg/l), tetrahydrát dusičnanu vápenatého (1 g/l), heptahydrát síranu železnatého (20 mg/l), heptahydrát síranu zinečnatého (15 mg/l), agar (18 g/l). Hodnota pH živného prostředí se nastaví na 5,1. Násadová kultura udržuje po dobu 5 až 20 dnů při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$ v termostatu.

Asi 1 cm² velký kousek mycelia byl rozmělněn pomocí mixeru za sterilních podmínek v prostředí 5 ml fyziologického roztoku a tím se očkuje 50 ml předkultury obsahující sacharózu (100 g/l), pepton (20 g/l), dihydrogenfosfát draselný (1 g/l), heptahydrát síranu hořečnatého (250 mg/l), která je umístěna v 500 ml Erlenmeyerově baňce a kultivuje se po dobu 4 dní na rotační třepačce při teplotě 24 °C a 220 otáčkách za minutu.

5 ml takto získané předkultury se přenese do 50 ml prostředí obsahujícího sacharózu (100 g/l), asparagin (10 g/l), kvasničný extrakt (0,1 g/l), dihydrogenfosfát draselný (250 mg/l), heptahydrát síranu hořečnatého (250 mg/l), chlorid draselný (120 mg/l), tetrahydrát dusičnanu vápenatého (1 g/l), heptahydrát síranu železnatého (20 mg/l) a síran zinečnatý (15 mg/l), nastaveného na hodnotu pH 5,1, které je umístěno v 500 ml Erlenmeyerově baňce a po dobu 7 dní se třepe při teplotě 24 °C na rotační třepačce s 240 otáčkami za minutu.

Potom se živné prostředí odfiltruje a van Urksovou reakcí (Mikrochim. Acta 1959, 619 - 630) se fotometricky stanoví obsah festuklavinu. Koncentrace ve filtrátu činí 2,28 g/l.

Příklad 2

Za podmínek příkladu 1, ale po záměně živného prostředí u předkultury a hlavní kultury se po devíti dnech kultivace získává v prostředí hlavní kultury 2,07 g festuklavinu v litru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby festuklavinu, vyznačující se tím, že se kultivuje mikroorganismus *Claviceps paspali* 2838 a vytvořený festuklavin se po skončení fermentace izoluje.