Союз Советских Социалистических Республик

Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 956560

(61) Дополнительный к авт. свид-ву –

(22) Заявлено 16.01.78 (21) 7770077/28-13

(23) Приоритет – (32) 04.02.77

(31) WPC12D/197246 (33) ГДР

Опубликовано 07.09.82. Бюллетень № 33

Дата опубликования описания 07.09.82

(89) 129801 ГДР

(51) М. Кл.^{3} C 12 P 1/00 //A 61 K 31/18

(53) УДК 6678.044.29(088.8)

(72) Авторы изобретения

Иностранцы
Грёгер Детлеф, Шмаудер Ханз-Петер, Ёне Зигфрид, Майер Валтер и Ерге Дитер
(ГДР)

(71) Заявитель

Иностранное предприятие "Академи дер Виссеншафтен дер ГДР"
(ГДР)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭРГОЗИНА

1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения эргозина.

Известен способ получения естественных алкалоидов из спорыньи.

Однако этот способ позволяет получить небольшое количество эргозина. Кроме того, присутствуют родственные пектидные алкалоиды, которые сложно отделять друг от друга.

Цель изобретения - получение эргозина.

Эта цель достигается тем, что способ получения эргозина осуществляют путем культивирования штамма Claviceps purpurea (Fr)Tul МУТ 168 в аэробных глубинных или поверхностных условиях в жидких питательных средах, содержащих источники углерода, азота и минеральные соли, при 20-30°С и pH 4,0-6,2 в течение 10-35 дней и выделяют алкалоиды известным путем.

При этом культивирование ведут при 22-25°С и pH 5,2-5,9.

Новый штамм выделен из диких штаммов (ПУР 13, ПУР 50) вида Claviceps purpurea (Fr)Tul на ржи растущих склеротий, образующих эрготамин. После двойной мутации этих штаммов

2

была изолирована линия, которая способна образовывать эргозин. В ходе этих работ стало возможным превратить сапрофитично свободные от алколоидов дикие штаммы в производящие линии и одновременно переключить спектр алколоидов относительно Sklerotium.

Выделенный штамм Cl.purpurea (Fr)Tul МУТ 168 зарегистрирован под номером УМЕТ РА (ИМЕТ ПА/134 в центральном исследовательском институте микробиологии и экспериментальной терапии АН ГДР в г. Йена). Штамм образует эргозин и его изомер эргозинин до 90% и только 10% легко отделяемого смеси клавина.

Штамм обладает следующими культурально-морфологическими признаками.

На агаровых средах колонии состоят из более или менее сильно разветвленного мицелия, который имеет толщину 4-5 мк, в узлах разветления 7-8 мк. Конидии отсутствуют, но в общепринятых средах, вызывающих образование спор, мицелий распадается частично на довольно мелкие части.

Капли жира в относительно малом количестве обнаружены только на средах 846 и 829. Мицелий глубинных культур состоит из длинных разветвленных гифов толщиной около 5 мк. Гифы имеют частично шаровидно округленные утолщения и содержат много капель жира.

Среда М10 - рост очень хороший со складчатой и частично приподнятой поверхностью, коричневая пигментация, обратная сторона с частично темными пятнами, без конидий.

Среда 846 - рост хороший, колонии со складчастой извилистой поверхностью, коричневая обратная сторона светло-коричневая без конидий.

Среда 829 - рост хороший, колонии со светло-коричневой до коричневой пигментацией, со складчатой поверхностью, курчавым и неравномерным краем. Обратная сторона светло-коричневая.

Среда 784 - рост хороший, колонии имеют коричневую верхнюю сторону и бесцветную нижнюю сторону, колонии складчатые, волнистые с неровным краем, без конидий,

Культивирование штамма лучше всего идет в жидких питательных средах в поверхностных или глубинных условиях.

Питательные среды содержат источник углерода, который может быть ассимилирован, как, например, сахароза, глюкоза, маннит, сорбин, глицерин, лимонная или янтарная кислота, ассимилируемый источник азота, например аммоний, аспарагин, пептон, гидролиз казеина или соль аммония и минеральные соли.

Ферментация может проходить в колбах Фернбаха, Эрлен-Майера, в качалочных колбах или в ферментерах. Алкалоиды в большинстве (выше 80%) содержатся в питательных средах и их можно получить обычным путем.

Культивирование проводят одноступенчато, двухступенчато или трехступенчато. Желательно, если предварительные культуры 5-12-дневного возраста и соотношение внесения предварительных культур к основным культурам равняется 1:5 (до 1:20). Значение pH может колебаться от 4,0 - 6,2, а температура от 20-30°С.

Пример 1. Штамм МУТ 168 со скошенного агафа гомогенизируют в 100 мл среды 821 и вносят в качалочные колбы объемом 500 мл. Среда имеет следующий состав:

Сахароза, г	200
Цитрат аммония, г	15
$Ca(NO_3)_2$, г	1
KH_2PO_4, г	0,25
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, г	0,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$, мг	10
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, мг	30,8
KCl, мг	0,1
Дрожжевой экстракт, г	3,0
Вода, л	До 1
pH (перед стерилизацией)	5,8-6,0

Стерилизация 30 мин при 110°С.

Колбы культивируют 7 дней при 24 ± 1°С при 200 об/мин.

10% полученных культур используют для того, чтобы в 500 мл колбы внести 100 мл среды 720 следующего состава:

Сахароза, г	200
Цират аммония, г	15
$Ca(NO_3)_2$, г	1
KH_2PO_4, г	0,25
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, г	0,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$, мг	10
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, мг	30,8
KCl, г	0,1
Вода, л	До 1
pH (перед стерилизацией)	5,8-6,0

Стерилизация 30 мин при 110°С. Колбы инкубируют 7 дней при 24 ± 1°С и 200 об/мин.

После 12-21-дневного инкубирования при вышеуказанных условиях культуральная жидкость содержит 180 - 280 мкг/мл алкалоида с содержанием до 90% смеси эргозина и эргозинина и 10% смеси клавиналкалоида. Алкалоиды выделяют известным способом и очищают.

Пример 2. 10% описанной в примере 1 исходной культуры переводят в колбы Фернбаха объемом 400 мл со 100 мл среды 720. При 24 ± 1°С колбы культивируют и после 20 дней культивирования надводный мицелий отделяют от среды. Колбы содержат 250-350 мг общего алкалоида на 1 мл питательной среды, имеющей такой же состав, как в примере 1.

Определение алкалоидов проводят следующим образом.

После 20-дневной ферментации поверхностная культура содержит 300 мг/мл смеси алкалоидов. 10 мл подщелачивают и проводят экстракцию хлороформом. Объем экстракта уменьшают до 5 мл и 2 мл из них отделяют послойным хроматографированием препарата на силикагеле с флюоресцентным индикатором (система растворителя хлороформ-этанол (8:2)).

Алкалоидные пятна снимают, добавляют к смеси вода-метанол-ледяная уксусная кислота (45:45:10) и смешивают потом с реактивом Ван-Урка в соотношении 1:2. Окрашенные в голубой цвет растворы центрифугируют, надосадочную жидкость облучают кварцевой лампой 5 мин и определяют экстинкцию фотометром. Количество алкалоида определяют из составленных при одинаковых условиях эталонных

кривых. Смесь алкалоидов этого штамма имеет следующий состав, %:

Эргозин	65
Эргозинин	25
Клавиналкалоиды	10

Препаративное получение пептидных алкалоидов осуществляют следующим образом.

2,5 л питательного раствора подщелачивают (pH 9) и экстрагируют хлороформом. Очищенный экстракт выпаривают в вакууме. Получают 690 мг сырой смеси алкалоидов.

Этот материала растворяют в небольшом количестве хлороформа и хроматографируют в колонке на силикагеле. Элюирующим раствором служит хлороформ, к которому добавляют повышающееся количество этанола (до 15%). Образуются две разделенные флюоресцирующим голубым цветом в ультрафиолетовом свете зоны. Быстро перемещающаяся зона дает эргозинин. После перекристаллизации из метанола получают 150 мг эргозинина ($C_{30}H_{37}O_5N_5$), т.пл. 225°C $[\alpha]_D^{29} = +394$ (C = 1% хлороформа).

Масс-спектр высокого разрешения м/е: 547 (M^+), найдено 5472807, рассчитано 547,2794 для $C_{30}H_{37}O_5N_5$. Другие выступающие фрагменты м/е: 280, 267, 224, 221, 210, 167, 154.

Элюат медленно перемещающейся зоны содержит 350 мг эргозина ($C_{30}H_{37}O_5N_5$). Масс-спектр м/е: 547 (M^+).

В обоих случаях реакция Келлера и Ван-Урка положительны и спектр поглощения в ультрафиолетовом свете имеет максимум при $\lambda = 312$.

При кислом гидролизе образуется лейцин и пролин. При щелочном гидролизе получаются лизергиновая кислота (эргозин) или изолизергиновая кислота (эргозинин).

Хроматографические свойства обоих выделенных пептидных алкалоидов совпадают с аутентичным эргозином или эргозинином.

Превращение алкалоидов друг в друга возможно обычными методами.

Пример 3. Штамм со скошенного агара примера 1 гомогенизируют в 100 мл среды 815 и вносят в качалочные колбы объемом 500 мл.

Среда имеет следующим состав, г.

Сахароза	300
KH_2PO_4	0,5
$NaNO_3$	2,0
Дрожжевой экстракт	0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6
KCl	0,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$, мг	10
Вода, л	До 1
pH до стерилизации	5,5-5,8

Стерилизация 30 мин при 110°C. После инкубирования при тех же условиях, как в примере 1, 10% исходной культуры переводят в колбу объемом 500 мл с 100 мл среды 833 следующего состава, г:

Сахароза	300
Цитрат аммония	20
$Ca(NO_3)_2$	1
KH_2PO_4	0,25
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$, мг	10
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, мг	30,8
Вода, л	До 1
pH до стерилизации	5,4-5,7

Стериализация 30 мин при 110°C

После 14-дневного инкубирования колбы содержат 180-200 мг/мл общего алкалоида того же состава, как в примере 1.

Предложенный способ позволяет получить эргозин микробиологическим путем, что упрощает технологию производства.

Формула изобретения

1. Способ получения эргозина, отличающийся тем, что штамм Claviceps purpurea (Fr) Tul МУТ 168 культивируют в аэробных глубинных или поверхностных условиях в жидких питательных средах, содержащих источники углерода, азота и минеральные соли, при 20-30°C и pH 4,0-6,2 в течение 10-35 дней и выделяют алкалоиды известным способом.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование ведут при 22-25°C и pH 5,2-5,9.

Признано изобретением по результатам экспертизы, осуществленной Ведомством по изобретательству Германской Демократической республики.

Составитель С. Малютина
Редактор Н. Киштулинец Техред Е.Харитончик Корректор Е.Рошко

Заказ 6519/5 Тираж 505 Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4