



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **237 677 A5**

4(51) **C 12 P 17/16**
C 12 P 15/00
C 12 P 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 P / 276 810 1	(22)	30.05.85	(44)	23.07.86
(31)	P3420953.0	(32)	01.06.84	(33)	DE

(71) siehe (73)
(72) Wilke, Detlef, Dr., DE; Weber, Alfred, Dr., 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 α -Ergokryptin**

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von α -Ergokryptin beansprucht, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Mikroorganismus *Claviceps paspali* DSM 2836 kultiviert und das gebildete α -Ergokryptin nach Beendigung der Fermentation isoliert.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von α -Ergokryptin, **gekennzeichnet dadurch**, daß man den Mikroorganismus *Claviceps paspali* DSM 2836 kultiviert und das gebildete α -Ergokryptin nach Beendigung der Fermentation isoliert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von α -Ergokryptin.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

α -Ergokryptin = 9,10 α -Dihydro-12'-hydroxy-2'-(1-methyl-ethyl)-5' α -(2-methylpropyl)-ergotaman-3',6',18-trion ist bekanntlich pharmakologisch wirksam. Nach den bisher bekannten Verfahren wird es aber auf fermentativem Wege nur im Gemisch mit anderen Ergotalkaloiden und Peptidalkaloiden erhalten (DE-OS 31 04 151). Demzufolge ist seine Herstellung und Isolierung sehr aufwendig.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Suche nach einem Verfahren zur Herstellung von reinem α -Ergokryptin.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Es wurde nun gefunden, daß ein Pilzstamm *Claviceps spec.* α -Ergokryptin in hohen Ausbeuten und neben Spuren von Agroclavin und ansonsten frei von anderen Ergotalkaloiden in das Kulturmedium ausscheidet. Dieser Stamm *Claviceps spec.* wurde aus einem Mutterkorn eines wild wachsenden Schlickgrases der Species *Spartina alterniflora* isoliert. Er hat die interne Bezeichnung SCHERING, MBCE 5227 und ist bei der deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Nummer DSM 2836 hinterlegt. Der Stamm bildet auf Agrarmedien mit Saccharose als Kohlenstoffquelle und Asparagin, als Stickstoffquelle flache, gelbliche Kolonien aus kompakten Mycel. Der Koloniedurchmesser beträgt nach 7 Tagen Kulturzeit 2 bis 3 cm und nach 20 Tagen Kulturzeit 6 bis 8 cm.

Auf Agar-Nährmedium mit Saccharose als Kohlenstoffquelle und Ammoniumsuccinat oder Ammoniumcitrat als Stickstoffquelle bildet der Pilz langsam wachsende, gewölbte und von der Agar-Oberfläche leicht abgehobene gelblich braune Kolonien. Die Kolonie hat eine durch Luftmycelbildung rauhe, insidiöse Oberfläche. Der Kolonienrand ist ausgefranst. Der Durchmesser der Kolonie beträgt nach 14 Tagen 2 bis 3 cm und nach 30 Tagen 6 bis 7 cm. Neben hyphenartigen Mycel treten kurze, runde bis unregelmäßig geformte, häufig in Ketten liegende und mit stark lichtbrechenden Vakuolen angefüllte Zellen auf (sklerotialer Zelltyp). Der Hyphendurchmesser beträgt 3 bis 4 μ m. Die vakuolisierten Zellen haben einen Durchmesser von 6 bis 10 μ m und eine Länge von 10 bis 25 μ m.

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 Ammoniumsulfat. 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. Für die Vorkultur wird vorzugsweise Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet, für die Hauptkultur vorzugsweise Saccharose. Das Vorkulturmedium enthält vorzugsweise 10 bis 100 mg/l Kohlenstoffquelle, das Hauptkulturmedium vorzugsweise 100 bis 300 mg.

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 α -Ergokryptins in üblicher Weise ermittelt.

Nach erfolgter Fermentation wird das gebildete α -Ergokryptin 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.

Das nachfolgende Ausführungsbeispiel dient zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Beispiel

Claviceps spec. DSM 2836 wird auf einem Nährmedium angezüchtet, welches folgende Komponenten enthält: Saccharose (100g/l), Citronensäure (10g/l), Hefeextrakt (0,1g/l), Kaliumdihydrogenphosphat (500mg/l), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (300mg/l), Ammoniumsulfat (6g/l), Calciumnitrat-Tetrahydrat (1g/l), Einensulfat-Heptahydrat (7mg/l), Zinksulfat-Heptahydrat (6mg/l), Agar (16g/l). Das Nährmedium ist auf pH 5,1 eingestellt. Die Anzuchtkultur wird 5 bis 20 Tage lang bei 30°C im Brutschrank aufbewahrt.

Kochsalzlösung zerkleinert und damit 50 ml eine Vorkultur enthaltend Glucose (110 g/l), Citronensäure (7,5 g/l), Kaliumdihydrogenphosphat (0,59 g/l), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (300 mg/l), Ammoniumsulfat (6 g/l), Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat (7 mg/l), Zinksulfat-Heptahydrat (7 mg/l), Calciumnitrat-Tetrahydrat (1 g/l), Hefeextrakt (0,1 g/l) — eingestellt auf pH 5,1 — die sich in einem 500 ml Erlenmeyerkolben befindet, beimpft und auf einem Rundschüttler 4 Tage lang bei 24°C und 220 Umdrehungen pro Minute kultiviert.

5 ml der so erhaltenen Vorkultur werden in 80 ml eines Mediums enthaltend Saccharose (200 g/l), Citronensäure (10 g/l), Hefeextrakt (0,1 g/l), Kaliumdihydrogenphosphat (500 mg/l), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (300 mg/l), Ammoniumsulfat (6 g/l), Calciumnitrat-Tetrahydrat (1 g/l), Eisensulfat-Heptahydrat (7 mg/l) und Zinksulfat-Heptahydrat (6 mg/l) — eingestellt auf pH 5,1 — die sich in einem 500 ml Erlenmeyerkolben befindet, überführt und 9 Tage lang bei 24°C auf einem Rundschüttler mit 240 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Dann wird das Kulturmedium abfiltriert und der Gehalt an α -Ergokryptin mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Fresenius Z. Anal. Chem. **303**, 1980, 208) ermittelt. Die Konzentration des Kulturfiltrates beträgt 525 mg/l.