



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

215148

(11)

(B2)

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 12 P 1/00

(22) Přihlášeno 06 02 81

(21) (PV 912-81)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 08 02 80  
(282/80) Maďarská lidová republika

(40) Zveřejněno 30 10 81

(45) Vydáno 15 10 84

(72)  
Autor vynálezu

WACK GÉZA, KISS JÁNOS ing., LENGYEL ZSUZSA, NAGY LAJOS, NAGY  
UDVARDY ÉVA dr., ZALAT KÁROLY, ZSÓKA ERZSÉBET, BUDAPEŠŤ  
(MLR)

(73)  
Majitel patentu

RICHTER GEDEON VEGYÉSZETI GYÁR RT., BUDAPEŠŤ (MLR)

(54) Způsob výroby námellových alkaloidů, zejména ergokorninu a  
 $\beta$ -ergokryptinu

1

2

Vynález se týká způsobu výroby námellových alkaloidů, zvláště ergokorninu a  $\beta$ -ergokryptinu fermentací *Claviceps purpurea*, za aerobních podmínek, na živném médiu, obsahujícím zdroj uhlíku a dusíku, minerální soli a případně jiné přísady.

Pro postup je významné, že jako kmen produkující alkaloidy je použit kmen *Claviceps purpurea* MNG 00186. Tento kmen je uložen v Maďarské národní kmenové sbírce.

Vynález se týká způsobu výroby námelových alkaloidů, zejména ergokorninu a  $\beta$ -ergokryptinu, prováděného za aerobních podmínek fermentací *Claviceps purpurea* na živném médiu, obsahujícím zdroj uhlíku a dusíku, minerální soli a popřípadě jiné přísady.

Je známo, že hydridací ergotoxinu vzniká látka s léčivými účinky, dihydroergotoxin; je směsí dihydroergokristinu, dihydroergokorninu a dihydroergokryptinu.

Bylo zjištěno, že ergokryptin se vyskytuje ve dvou formách: vedle již dříve identifikovaného  $\alpha$ -ergokryptinu byl z námelové drogy izolován také  $\beta$ -ergokryptin,  $\beta$ -ergokryptin připravený extrakcí z drogy, popřípadě polosynteticky, byl vyšetřován farmakologicky a prokázala se jeho vhodnost k ovlivnění pohlavní aktivity, sérotoninového antagonismu, stahů dělohy a cévního tonusu.

Je též popsán kmen *Claviceps purpurea*, který produkuje převážně  $\beta$ -ergokryptin.

Je-li tento kmen pěstován v živném médiu obsahujícím jako zdroj uhlíku například sacharosu, glukosu, manit, jako zdroj dusíku například asparagin, peptony, hydrolyzovaný kasein a amonné soli, za provětrávání při 24 °C, pak lze během 10 až 16 dnů získat zrcadlo alkaloidu celkově o 950 až 1240 gama/ml. Směs alkaloidů převážně obsahující  $\beta$ -ergokryptin je však bohatá na ergosin a nelze ji proto bezprostředně (bez odstranění ergosinu) použít k přípravě ergotoxinu.

Vlastními pokusy byla vypěstována plíseň z *Claviceps-Sklerotikum*, rostoucí v jikrovém poli, které nebylo uměle očkováno, a z ní opakovanou selekcí, střídavou solací kolonií a obohacením v kapalně kultuře byla získána stabilní varianta kmene *Claviceps purpurea*.

Základ selekce spočívá v tom, že na živných půdách, popsaných v citovaném patentovém spisu, tvoří kmen produkující alkaloid barevné kolonie, které lze dobře odlišit od bílých kolonií kmenů, neprodukujících alkaloidy.

Kolonie nového kmene produkujícího alkaloid byly izolovány a z důvodu obohacení přešlechtěny na tak zvaném diferenčním živném médiu. Diferenční živné médium obsahuje kromě anorganických fosfátů a jiných minerálních solí především sacharosu, kyselinu jantarovou a glycin.

Několikanásobným opakováním isolačních kroků a obohacování byla získána nová varianta kmene. Varianta (s interním označením: CLY) roste pomaleji než kultura divoké *Claviceps*, nevykazuje žádné konidie a v běžných živných médiích je morfologicky podobná droždí, tedy chybí pro mycelový tvar charakteristické vláknité hyfy.

#### Makroskopický popis kmene

Na agarovém médiu použitým v selekci,

které obsahuje škrob a tryptofan, jsou po 10 dnech po povrchu rozseté kolonie s oranžově-růžovým zbarvením, jsou ostře ohraničené, jejich průměr je 6 až 8 mm. Po dvaceti dnech mají kolonie průměr 20 až 25 mm, uprostřed jsou vypouklé a jsou radiálně zvrásněné, jejich barva je růžově lila. Dolní strana kolonie je tmavě hnědá, živná půda v jejím okolí je zbarvena do lila.

Na sladovém agaru tvoří kmen ve stáří deseti dnů světle zbarvené kolonie o průměru 1 až 2 mm, které jsou pravidelně polokulovité. Ve stáří po 20 dnech mají kolonie průměr 2 až 4 mm, jejich vzrůst je slabý a barva se prohlubuje do hněda.

Na St-agaru jsou kolonie kmene ve stáří od 10 dnů ostře ohraničené, ve směru na střed zvrásněné, uprostřed mají špičatou vyvýšeninu a mají průměr 8 až 12 mm. Špička je 3 až 5 mm vysoká. Barva kolonií je béžová až světle hnědá. Po dvaceti dnech je povrch kolonií silně a k okrajům rozvětveně rozbrázděn, špička má tvar kráteru. Kolonie mají světle hnědou barvu s kakaovým stínováním, jejich průměr je různý, mezi 25 až 40 mm, výška je 6 až 8 mm. Kolonie lze s povrchu agaru obtížně sejmut. Netvoří žádné spory.

#### Mikroskopická charakteristika kmene v kapalně kultuře

V živném médiu KG po 40 hodinách kultivace:

Kolonie mají málo buněk, převážně jednotlivé buňky. Buňky jsou 4 až 8 × 8 až 20  $\mu$ m velké, válcovité, zaokrouhlené nebo nepravidelného tvaru. Lze pozorovat dělení na konci buněk nebo postranní větvení. Buněčné řady jsou krátké, jsou tvořeny několika buňkami. Při pozorování v mikroskopu s fázovým kontrastem se buňky jeví silně zrnité, starší buňky obsahují vakuoly. Netvoří žádné spory.

V St-živném médiu po čtyřicetihodinové kultivaci:

Mikroskopický obraz je identický s obrazem již dříve popsaným, pouze s tím rozdílem, že na tomto živném médiu je tvoření kolonií z buněčných řad častější. Jednotlivé buňky jsou větší, starší a větší buňky nemají vakuoly.

Použitá živná média při určování makroskopického a mikroskopického vzhledu jsou zčásti uvedena níže, zatímco živná média St-živné médium, St-agar a živné médium-GK jsou popsána v příkladové části.

#### Škrob — tryptofan — agar

|                           |      |
|---------------------------|------|
| škrob                     | 20 g |
| tryptofan                 | 1 g  |
| chlorid draselný          | 1 g  |
| hydrofosforečnan diamonný | 2 g  |

Hodnotu pH upravíme na 6,6 až 6,8 a do-

plníme vodou na objem 1000 ml; k roztoku přidáme 25 g práškového agaru (Difco), živné médium zahřejeme k varu a rozdělíme po 150 ml do láhví a sterilizujeme.

Slad — agarové živné médium

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Sladový výtěžek       | 60 g       |
| voda                  | do 1000 ml |
| práškový agar (Difco) | 25 g       |

Živné médium zahřejeme k varu, rozdělíme po 150 ml do láhví a sterilizujeme.

Biochemická charakteristika kmene:

Rozkládá se  $\beta$ -frukto-furanosidasou sacharosy a poskytuje transfer-oligosacharidy; dobře zužitkovává kyselinu citrónovou; z hydroxyantrachinonu produkuje především pigment antrachinonového charakteru.

Je-li nový kmen pěstován na živném médiu známém z literatury, které obsahuje cukr a amonnou sůl některé organické kyseliny, pak produkuje alkaloid. 25 až 30 % ze vzniklých alkaloidů je  $\beta$ -ergokryptin, hlavní podíl, 55 až 60 %, tvoří ergokornin, a zbytek je  $\alpha$ -ergokryptin. Mimo charakteristické peptidické alkaloidy kmen produkuje pouze ergometrin.

Výše popsaná nová varianta kmene *Claviceps purpurea* byla již deponována.

Při zkouškách možnosti využití tohoto kmene bylo objeveno, že kmen při fermentaci za aerobních podmínek na živném médiu obsahujícím zdroj uhlíku, dusíku, minerální soli a případně další přísady produkuje určité komponenty ergotoxinu, jmenovitě ergokornin,  $\beta$ - a  $\alpha$ -ergokryptin.

Dále bylo objeveno, že množství vzniklých alkaloidů ve fermentačním roztoku vzroste, přidá-li se během fermentace k fermentačnímu roztoku jako prekursor vznikající sloučeniny valinu a/nebo isoleucinu.

Dosavadní způsob výroby námelových alkaloidů poskytuje malé výtěžky, vzhledem k tomu při fermentaci vznikají také látky nepotřebné, které se dodatečně musí odstraňovat.

Tyto nevýhody jsou odstraněny u způsobu výroby námelových alkaloidů podle vynálezu, jehož podstatou je, že jako pěstovaný kmen je použita varianta *Claviceps purpurea* MNG 00186.

Podle vynálezu probíhá fermentace v submerní kultuře, v kapalném živném médiu za aerobních podmínek, které obsahuje zdroj uhlíku a dusíku, minerální soli a případně další přísady.

Fermentace se provádí při teplotě mezi 20 až 26 °C, při hodnotě pH od 5,2 do 6,8 čtyři až osm dnů.

Při fermentaci jsou popřípadě použity přísady, které zvyšují tvorbu alkaloidů (prekursory), například valin a/nebo isoleucin.

Prekursorem je suspence kultury v množství 0,05 až 0,5 g. 100 ml<sup>-1</sup>, s výhodou 0,1 až 0,3 g. 100 ml<sup>-1</sup>, která se přidává ve formě vodného, eventuálně slabě kyselého roz-

toku, po sterilisaci živného média. Prekursor může být přidán najednou, v několika dávkách nebo průběžně během fermentace.

V literatuře se výtěžek často udává hodnotami celkového obsahu alkaloidů, které byly zjištěny spektrofotometricky. Také u zde popisovaných pokusů byl celkový obsah alkaloidů zjišťován fotokolorimetricky na základě barevných reakcí; toto měření není specifické.

Pro charakterisaci fermentace byly jednotlivé složky ergotoxinu určovány eluční chromatografií nebo kvantitativní kapalinovou chromatografií. Použití kmene má proti dříve popsaným postupům tyto přednosti:

1. Výroba pomocí fermentace je modernější než postup zakládající se na extrakci drogy. Odpadají také obvyklé nevýhody, které vznikají ze spolupráce se zemědělstvím. Postup lze řídit bezprostředními technickými zásahy u každé šarže.

2. V porovnání s polysyntetickým postupem, který sestává z dlouhé řady reakcí, se v případě fermentace připraví složité molekuly z jednoduchých, lehce dosažitelných látek (sacharosy, amonných solí) a živých buněk, při 24 °C za přívodu vzduchu. Polysyntetickou výrobou je řešena pouze syntéza peptidové části, část obsahující kyselinu lysergovou musí být vyrobena výhradně fermentací.

3. Kmen produkuje prakticky pouze složky ergotoxinu. Nepatrné množství ergometrinu lze od peptidových alkaloidů, které připadají v úvahu pro přípravu ergotoxinu, snadno oddělit (ergometrin je totiž rozpustný ve vodě).

Vynález je blíže objasněn na následujících příkladech, kterými však není omezen.

#### Příklad 1

Kultura *Claviceps purpurea* MNG 00186, pěstovaná na živné půdě z St-agaru se naočkuje do 100 ml GK-živného média, které je v 500 ml Erlenmayerově baňce. Baňka je umístěna na vibrační stůl (kmitočet 300 min<sup>-1</sup>). Obsah v baňce je temperován 4 dny na teplotu 24 °C. Po 10 ml takto získané kultury se přeočkuje celkem do osmi 100 ml dávek St-živného média v baňkách. Tyto kultury jsou fermentovány při 24 °C na vibračním stole 7 dnů. Do čtyř baněk nebyl přidán prekursor. K obsahu čtyř zbylých baněk se na počátku fermentace přidalo po 2 g valinu jako prekursoru. Po sedmi dnech bez prekursoru byl slit dohromady a v suspensi byl stanoven obsah alkaloidů. Množství ergokorninu bylo 80  $\gamma$ ml<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -ergokryptinu 15  $\gamma$ ml<sup>-1</sup> a  $\beta$ -ergokryptinu 30  $\gamma$ ml<sup>-1</sup>.

Suspense kultury připravená s prekursorem byla rovněž slita dohromady a stanoven obsah alkaloidů. Suspence obsahovala 250

$\gamma\text{ml}^{-1}$  ergokorninu, 25  $\gamma\text{ml}^{-1}$   $\alpha$ -ergokryptinu a 30  $\gamma\text{ml}^{-1}$   $\beta$ -ergokryptinu.

Použité živné půdy

Živné médium GK

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| Trypkasin                   | 7,0 g      |
| kyselina citrónová          | 4,1 g      |
| dihydrofosforečnan draselný | 0,3 g      |
| síran hořečnatý             | 0,3 g      |
| hydroxid amonný do pH       | 5,7 až 5,8 |
| voda                        | do 840 ml  |

Živné médium se do baněk rozdělí po 84, eventuálně 840 ml a za sterilních podmínek zředí 16 ml nebo 160 ml 50% roztokem glukosy.

St — živné médium

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| sacharosa                   | 100,0 g    |
| kyselina jantarová          | 10,0 g     |
| dihydrofosforečnan draselný | 0,25 g     |
| síran hořečnatý             | 0,25 g     |
| dusičnan amonný             | 1,0 g      |
| chlorid vápenatý            | 1,0 g      |
| hydroxid amonný do pH       | 5,2 až 5,3 |
| voda do                     | 1000 ml    |

Živné médium se sterilisuje ve 100 ml dávkách v Erlenmeyerových baňkách nebo v polopropovozním fermentátoru v množství 100 litrů.

St-agarové živné médium (Blake) se liší od kapalného St-živného média tím, že se k litru roztoku přidá 25 g práškového agaru. Po přidání agaru se živné médium zahřeje k varu, rozdělí se do láhví po 150 ml a sterilisuje.

#### Příklad 2

Typické, dvacet dnů staré kolonie *Claviceps purpurea* MNG 00186, namnožené na St-agarovém živném médiu, se z povrchu agaru sejmu, zhomogenizují se v 20 ml sterilního fyziologického roztoku kuchyňské soli a 10 ml suspence se přidá ke 100 ml předsterilizovaného St-živného média v 500 mililitrové Erlenmeyerově baňce. Kultura se pěstuje 6 dní při 24 °C na vibračním stole a pak se přeočkuje do 500 ml Erlenmeyerové baňky na 100 ml živného média TC-54. Po třídní fermentaci na vibračním stole

se 10 ml kultury přeočkuje na 100 ml sterilizovaného živného média — St, které je opět v 500 ml Erlenmeyerové baňce. Tato kultura se za jmenovaných podmínek pěstuje na vibračním stole sedm dnů. Tímto postupem se získá dále uvedené množství alkaloidů: ergokornin 150  $\gamma\text{ml}^{-1}$ ,  $\alpha$ -ergokryptin 40  $\gamma\text{ml}^{-1}$ , a  $\beta$ -ergokryptin 90  $\gamma\text{ml}^{-1}$ .

Složení St-živného média a St-agarového živného média (Blake) bylo již uvedeno v příkladu 1. Živné médium TC-54 má toto složení:

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| sacharosa                   | 100,0 g    |
| kyselina citrónová          | 10,0 g     |
| chlorid sodný               | 10,0 g     |
| dihydrofosforečnan draselný | 0,5 g      |
| síran hořečnatý             | 0,5 g      |
| hydroxid amonný do pH       | 5,7 až 5,8 |
| voda do                     | 1000 ml    |

Živné médium se sterilisuje po 100 ml dávkách v Erlenmeyerových baňkách o obsahu 500 ml nebo po deseti litrových dávkách v laboratorních fermentátorech s objemem 15 litrů.

#### Příklad 3

Dvacet pět dnů stará kultura *Claviceps purpurea* MNG 00186 z St-agarové živné půdy se s povrchu agaru seškrábe a shomogenisuje se ve 100 ml fyziologického roztoku kuchyňské soli. Takto získanou suspenzí se naočkuje 1 litr živného média GK (předem sterilizovaného v Erlenmeyerové baňce o obsahu 3 l). Kultura se 44 hodiny při 24 °C třepe. Pak se kultura přenese do fermentátoru o obsahu 15 l, ve kterém je 10 l živného média TC-54. Fermentace se provádí při 24 °C za přívodu 0,25 l vzduchu na litr a minutu, při kmitočtu 240  $\text{min}^{-1}$ . Po třech dnech se kultura převede do kyselinovzdorného laboratorního fermentátoru (150 l), ve kterém je 100 l St-živného média. Tato kultura se pěstuje při 22 °C, kmitočtu 150  $\text{min}^{-1}$  a za přívodu vzduchu v množství 0,35 l/min, po dobu šesti dnů. V druhém, třetím a pátém dnu se přidá vždy po 100 g valinu a 20 g isoleucinu.

Po šestidenní fermentaci břečka obsahuje 320  $\gamma\text{ml}^{-1}$  ergokorninu, 60  $\gamma\text{ml}^{-1}$   $\alpha$ -ergokryptinu a 160  $\gamma\text{ml}^{-1}$   $\beta$ -ergokryptinu.

#### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby námelových alkaloidů, zejména ergokorninu a  $\beta$ -ergokryptinu, prováděný za aerobních podmínek fermentací *Claviceps purpurea* na živném médiu, obsahujícím zdroj uhlíku a dusíku, minerální soli a popřípadě jiné přísady, vyznačený tím, že jako pěstovaný kmen je použita varianta *Claviceps purpurea* MNG 00186.

2. Způsob výroby podle bodu 1 vyznačený tím, že fermentace probíhá při 20 až 26 °C a hodnotě pH 5,2 až 6,8.

3. Způsob výroby podle bodu 1 vyznačený tím, že se k fermentačním roztokům jako přísady přidávají prekursor produkovaných alkaloidů.