



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

242 138

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 05 11 84
(21) PV 8398-84

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 22 08 85
(45) Vydáno 01 02 88

(75)

Autor vynálezu

MALINKA ZDENĚK RNDr., OPAVA;
HARAZIN PAVEL ing., KOBERICE;
SPAČIL JIRÍ PhMr.;
JUCHELKA JIRÍ ing., OPAVA

(54)

Nový průmyslový kmen mikroorganismu druhu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-755

Vynález se týká oborů mikrobiologie, mykologie a farmaceutický průmysl.

Účelem vynálezu je optimalizace surovinové základny pro výrobu zejména ergotaminu a dále pro výrobu polosyntetických alkaloidů. Jako surovinová základna slouží sklerocia námele, obsahující námellové alkaloidy.

Uvedeného účelu se dosáhne vypěstováním a použitím sklerocií nového průmyslového kmene mikroorganismu (pyrenomycety) *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-755, která obsahují námellové alkaloidy v množství 0,51 až 1,73 % sušiny biomasy (průměrný obsah 0,74 %), při příslušných výrobcích. Ve sklerociích je minimálně 90,5 % gumy alkaloidů tvořeno ergotaminem a nejvýše 1,6 % sumy alkaloidů je tvořeno ergostinem. Nový průmyslový kmen se dále vyznačuje schopností poskytovat při parazitickém růstu na žitě za užití recentní agrotechniky velmi vysoké hektarové výnosy v rozmezí 516 až 954 kg.

Vynález se týká nového průmyslového kmene mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL., vyznačujícího se velmi vysokým obsahem ergotaminu, minimálním zastoupením doprovodných a nežádoucích alkaloidů v námelových sklerociích a velmi vysokými hektarovými výnosy námele při polní kultivaci na žitě.

Ergotamin je námelový alkaloid s významnými fyziologickými a léčivými účinky. Může být použit i jako výchozí látka pro přípravu polosyntetických derivátů alkaloidů s rozšířeným spektrem účinků. Strukturu ergotaminu popsal poprvé v r. 1918 A. Stoll (Švýc. patent č. 79879).

Ergotamin je v současnosti používán v terapeutické praxi především v hydrogenovaném stavu (DH-ergotamin) samostatně nebo v lékových formách ve směsi s jinými účinnými látkami. Ergotamin může být získáván ze sklerocií houby kultivované paraziticky v polní kultuře na žitě (Békésy von N., in *Genetics of Industrial Microorganisms*, 375-392, Academia, Prague, 1973; Breuel K. et al., *Planta Med.* 44, 121, 1982; Grzybowska T. et al., *Herba Pol.* 26, 95, 1980; Kosir B. et al., *Farm. Vestn.* 32, 21, 1981; Kybal J., Starý F., *Planta Med.* 6, 406, 1958; Pandotra V.R. et al., *Cultiv. Util. Med. Aromat. Plants* 97, 1977; Ramstad E., Gjerstad G., *J. amer. pharm. Ass.* 44, 741, 1955; Šalagina A. I. et al., *Mikrobiologia* 39, 67, 1970) nebo fermentačními postupy (Amici A. M. et al., *Experientia* 22, 415, 1966; *Appl. Microbiol.* 15, 597, 1967; *Appl. Microbiol.* 18, 464, 1969; Arcamone F. et al., *Can. J. Microbiol.* 16, 923, 1970; Stoll A. et al., *Helv. chim. Acta* 37, 1815, 1954; Šalagina A.I. et al., *Mikrobiologia* 34, 901, 1965; Tonolo A., *Nature* 209, 1134, 1966; čs. patent 104 613; švédské patenty 310 477 a 354 673; francouzské patenty 1 108 120 a 1 404 533 a 1 576 678; USA patent 2 809 920). Pro výrobu ergotaminu v ČSSR byla dříve

užívána sklerocia kmene PLA 4 (Hroneš J., Kybal J., Z. Pflanzenzücht. 48, 73, 1962; Strnadová K., Planta Med. 12, 521, 1964) a nověji sklerocia kmene FBA 4 (Strnadová K., Kybal J., Folia Microbiol. 19, 272, 1974).

Kmen FBA 4 se při kultivaci na žitě vyznačuje produkcí sklerocií, která obsahují průměrně 0,531 % sumy alkaloidů, vztaženo na sušinu biomasy, z toho žádoucí ergotamin tvoří průměrně 87,1 %. Dále jsou zastoupeny doprovodné alkaloidy ergometrin (6,9 %), alkaloidy ergotoxinové skupiny (1,7 %), klavinové alkaloidy (1,9 %) a zejména nežádoucí ergostin (2,4 %). Průměrný hektarový výnos námele tohoto kmene je při pěstování na žitě 249 kg.

Hlavní nevýhodou kmene FBA 4 je ve srovnání s kmenem CCM F - 755 relativně nízký obsah ergotaminu ve sklerociích. Další nevýhodou kmene FBA 4 je vyšší obsah doprovodných alkaloidů a zejména poměrně vysoké zastoupení nežádoucího alkaloidu ergostinu. Při extrakčních a izolačních postupech k získání čistého ergotaminu je ergostin velmi obtížně oddělován. Pro léčebnou praxi jsou nyní vyžadovány lékové formy ergotaminu s obsahem ergostinu nejvýše 0,5 % účinné látky (British Pharmacopoeia 1980, Vol. I, p. 157, Her Majesty's Stationery Office London, 1980). K dosažení této kvality substance jsou při výrobě z námele FBA 4 potřebné opakované náročné a ztrátové izolační a purifikační operace. Další nevýhodou kmene FBA 4 jsou nižší hektarové výnosy. Tato vlastnost spolu s nižším obsahem ergotaminu podmiňovala při polní kultivaci námele FBA 4 potřebu značných ploch orné půdy.

Všechny další kmeny, určené pro polní produkci, popsané ve výše uvedených citacích se vyznačují oproti novému kmeni CCM F-755 zejména podstatně vyšším zastoupením doprovodných a nežádoucích alkaloidů v sumě, nižším obsahem ergotaminu, nižším celkovým obsahem alkaloidů a nižšími hektarovými výnosy.

Pro fermentační produkci ergotaminu, popsanou ve výše uvedených citacích je nezbytné speciální technologické zařízení. V těchto citacích popsané kmeny a postupy produkují poměrně nízká množství ergotaminu, často s velmi vysokým zastoupením doprovodných i nežádoucích alkaloidů.

Uvedené nedostatky kmenů námele pro polní a fermentační produkci ergotaminu odstraňuje do značné míry vynález, jímž je nový kmen mikroorganismu (pyrenomycety) *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL., uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně, Brno, tř. Obránců míru 10, pod ozna-

Hlavní výhodou nového kmene je při kultivaci na žitě velmi vysoká produkce sumy alkaloidů ve sklerociích, která dosahuje průměru 0,74 % sušiny biomasy, vysoké zastoupení ergotaminu v sumě alkaloidů (92,1 %) a nízký obsah doprovodných alkaloidů (7,9 % sumy), z toho pak zejména nežádoucího ergostinu (1,3 % sumy). Další výhodou nového kmene je vysoká schopnost infikovat hostitelské rostliny, která umožňuje při recentně užívané optimální agrotechnice pěstování námele na žitě dosahovat hektarového výnosu 516 - 954 (průměrně 713) kg námelových sklerocií. Tato vlastnost kmene umožňuje získat při polním pěstování sklerocia za nižší cenu, než při pěstování dosud užívaného kmene FBA 4. Použití sklerocií kmene CCM F-755 při výrobě produktů ergotaminového typu umožní zefektivnit postupy extrakce a izolace, zejména snížením spotřeby surovin a energií, počtu technologických operací a pracnosti. Vlastnosti kmene umožňují rovněž použití jeho sklerocií jako suroviny pro výrobu polosyntetických námelových alkaloidů.

Popis vlastností nového kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL.

CCM F-755 :

Při saprofytickém růstu na sladinové živné půdě ztužené agarem tvoří houba kolonie z typického sfaceliového vzdušného mycelia. Mycelium je bohatě větvené s postranními hyfami ukončenými konidiogenními buňkami. Konidie mají průměrné rozměry 7,3 x 3,9 mikrometru. Mladé mycelium je téměř bílé, starší kultury jsou výrazně fialově pigmentované. Při parazitickém růstu na žitě tvoří houba tmavá, hnědo-fialově pigmentovaná sklerocia. Na diploidním fertilním žitě je průměrná hmotnost sklerocia 0,296 g. Sklerocia tohoto kmene, vyrostlá na žitě, obsahují námelové alkaloidy v množství od 0,51 do 1,73 % sušiny biomasy, při průměrném obsahu 0,74 %. Minimálně 90,5 % sumy alkaloidů je tvořeno ergotaminem (průměrně tvoří 92,1 % sumy). Zbytek je tvořen doprovodnými alkaloidy ergometrinem (průměrně 6,3 % sumy), ergostinem (průměrně 1,3 % sumy), klavinovými alkaloidy (průměrně 0,3 % sumy) a stopami ergotoxinových alkaloidů.

Nový produkční kmen byl vyšlechtěn z původně travního kmene námele, získaného z trávy *Melica uniflora* Retz. v září 1978 na Plešivecké planině. Sklerocia travního námele obsahovala průměrně 0,41 % námelových alkaloidů tvořených 62 % ergotaminu,

23 % ergosinu, 9 % ergometrinu, 4 % ergostinu, 1,5 % ergotoxinových alkaloidů a 0,5 % klavinových alkaloidů. Vybrané sklerocium bylo převedeno do saprofytické kultury a konidie byly naočkovány na žito. Byla získána sklerocia obsahující 0,39 % alkaloidů, tvořených 74 % ergotaminu, 12 % ergosinu, 7,5 % ergometrinu, 3,5 % ergostinu, 2 % ergotoxinových alkaloidů a 1 % klavinových alkaloidů. Vybrané sklerocium bylo převedeno do saprofytické kultury a vytvořené konidie byly ozařovány UV-zářením. Suspenze konidií byla ozařována zdrojem UV-záření o výkonu $15 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ po dobu 300 sekund, kdy přežívalo 0,32 % konidií. Po ozařování byla suspenze konidií monokonidiálně rozizolována. Postup UV-mutageneze a izolace byl opakován třikrát. Potom byly kultury z jednotlivých monokonidiových izolátů naočkovány na žito a vzniklá sklerocia byla jednotlivě analyzována. Ze získaných sklerocií bylo pro další šlechtění vybráno sklerocium s obsahem alkaloidů 0,52 %, z toho 76 % tvořil ergotamin, 16 % ergometrin, 5 % ergosin, 1,3 % ergostin, zbytek byl tvořen ergotoxinovými a klavinovými alkaloidy. Suspenze konidií, vykultivovaných z tohoto sklerocia, byla ozařována UV-zářením a postup ozařování kombinovaný monokonidiovou izolací byl opakován pětikrát. Kultury z monokonidiových izolátů byly naočkovány na žito a vzniklá sklerocia byla jednotlivě analyzována. Ze získaných sklerocií bylo pro další šlechtění vybráno sklerocium s obsahem alkaloidů 0,81 %, z toho 88 % tvořil ergotamin, 6 % ergosin, 3 % ergometrin, 1 % ergostin, zbytek byl tvořen ergotoxinovými a klavinovými alkaloidy. Suspenze konidií, vykultivovaných z tohoto sklerocia byla ozařována UV-zářením a postup ozařování kombinovaný monokonidiovou izolací byl opakován dvakrát. Kultury z monokonidiových izolátů byly naočkovány na žito. Na základě analýzy sklerocií získaných z těchto izolátů a infekceschopnosti kultur byl vybrán kmen označený CCM F-755, který se vyznačuje výše uvedenými vlastnostmi. Stabilita vlastností kmene byla potvrzena opakovanou kultivací na žitě ve 3 vegetačních obdobích. Tento kmen je předmětem vynálezu.

Způsob kultivace nového kmene pro získání výchozí suroviny k izolaci ergotaminu a následné výrobě finálních produktů i pro získání výchozí suroviny k extrakci sumy alkaloidů a následné výrobě polosyntetických preparátů, je doložen v příkladě použití, aniž by se tímto příkladem jakkoli omezovaly vlastnosti nového kmene, způsob jeho kultivace a použití ve výrobě.

Příklad použití :

242 138

Z potřebného objemu saprofytické kultury kmene CCM F-755 se připraví vodná suspenze konidií. Příslušně naředěnou suspenzí konidií se pomocí očkovacího stroje naočkují klasy žita ve fázi metání na ploše jednoho hektaru. Pro naočkování této plochy se použije minimálně $5 \cdot 10^{11}$ konidií. Po 35 až 60 denním růstu na žitě se samčí sterilitou se provede sběr narostlých sklerocií námele. Z jednoho hektaru žita bylo získáno 825 kg suchých sklerocií námele, obsahujících 0,83 % sumy alkaloidů, ze které bylo 91,6 % tvořeno ergotaminem, 6,5 % ergometrinem, 1,1 % ergostinem, 0,7 % klavinovými alkaloidy a 0,1 % ergotoxinovými alkaloidy. Získaná droga byla vyextrahována, extrakty byly zčásti použity pro výrobu substancí ergotaminového typu, zčásti pro výrobu polosyntetických námellových alkaloidů.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL.CCM F-755, vyznačující se tím, že v polní kultuře na žitě vytváří sklerocia v minimálním množství 516 kg/ha, s obsahem sumy alkaloidů nejméně 0,51 % sušiny biomasy, s obsahem ergotaminu nejméně 90,5 % sumy alkaloidů a s obsahem ergostinu nejvýše 1,6 % sumy alkaloidů.