

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

52322

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 29.VIII.1964 (P 105 596)

Pierwszeństwo: 29.VIII.1963 Szwajcaria

Opublikowano: 5.I.1967

Kl. 30 h, 6

MKP *C12 d 13/00*
~~A-61 k~~

UKD

BIBLIOTEKA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Współtwórcy wynalazku: dr Jürg Rutschmann, dr Hans Kobel

Właściciel patentu: Sandoz A. G., Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania ergobazyny

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania ergobazyny na drodze saprofitycznej hodowli nowego szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall.

Ergobazyna (zwana także ergometryną lub ergonowiną) jest jednym z naturalnie występujących alkaloidów sporyszu i można ją wyodrębnić ze sklerocji *Claviceps purpurea*. Wyodrębnianie takie jest jednak kłopotliwe i mało wydajne, ponieważ ergobazynę trzeba przy tym oddzielić od innych alkaloidów sporyszu. Można także uzyskać ergobazynę na drodze półsyntetycznej z reaktywnych pochodnych kwasu lizergowego (Helv. Chem. Acta 26, str. 956 (1943), opisy patentowe Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2.736.728 i 3.084.164).

Niezbędny do tego sposobu kwas lizergowy trzeba jednak najpierw uzyskać na drodze mikrobiologicznej lub przez hydrolityczną odbudowę innych mniej cennych terapeutycznie alkaloidów sporyszu, ponieważ pełnej syntezy kwasu lizergowego nie da się przeprowadzić w skali technicznej ze względu na koszty. Na skutek cennych właściwości farmakologicznych (działanie podobne do oksytocyny i zwężające naczynia) ergobazynę stosuje się w leczeniu jako lek w położnictwie i przeciw migrenie. Dlatego próbowano już otrzymać ergobazynę na drodze hodowli saprofitycznej wprost ze szczepów sporyszu. O ile dało się w ogóle wykazać obecność ergobazyny w otrzymanych przesączach z hodowli, to jej stężenie było tak małe, że produkcja tego alkaloidu tą drogą

2

w skali technicznej nie była możliwa: najwyższa osiągnięta dotąd wydajność (w przeliczeniu na ciężar wysuszonego podłoża hodowlanego) wynosiła 0.03%, (przy sposobie hodowli szczepu *Claviceps microcephala*, opisanym w Scientia Sinica, tom 11, 917—924, 1962).

Stwierdzono, że drogą saprofitycznej hodowli głębinowej szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Holl NRRL 3081 na pożywce, zawierającej poli-
alkohol jako źródło węgla, sole amonowe kwasów organicznych, jako źródło azotu oraz sole mineralne i przez przeróbkę przesączu z hodowli znanymi metodami można uzyskać ergobazynę jako
główny alkaloid z taką wydajnością, jaka umożliwia przeprowadzenie tego procesu w skali technicznej. Użyty do tego sposobu szczep został wyizolowany ze sklerocji, które znaleziono na *Paspalum dilatatum* w Olivaria (Argentyna). Dwie próbki tego grzyba o nazwie *Claviceps paspali* Stevens et Hall zostały zdeponowane w United States Department of Agriculture (Northern Utilization Research and Development Division) Peoria, Illinois pod numerem NRRL 3081. W przeciwieństwie do opisanych dotąd szczepów *Claviceps paspali* Stevens et Hall (Arcamone et. al. Proc. Roy. Soc. Series B, 155, 26, 1961; Nature 187, 236, 1960) te nowe szczepy są zdolne do tworzenia konidiów in vitro.

Niżej podano charakterystykę morfologiczną grzyba *Claviceps microcephala*, stosowanego w

znanych sposobach otrzymywania ergobazyny, jak również charakterystykę morfologiczną szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall NRRL 3081 stosowanego według wynalazku.

Stosowany w znanych metodach otrzymywania ergobazyny grzyb *Claviceps microcephala* ma mniej rozwinięte spermogona niż *Claviceps purpurea*. Ma on cylindryczne lub proste sklerocja, które są bardzo małe (długość 3–4 mm, w niektórych przypadkach 7–9 mm). Ma on nitkowate nóżki o długości 1–2 cm, na których znajdują się sferidia o średnicy do 0,7 mm. Występuje on na *Phragmites communis* Trin oraz na *Molinia caerulea* Moen w okolicach Paryża oraz w Niemczech Zachodnich.

Innymi żywicielami jego są:

Agrostis palustris Huds.
Aira caespitosa L.
Aira fluxuosa L.
Alopecurus agrestis L.
Alopecurus geniculatus L.
Alopecurus pratensis L.
Ammophila arenaria L.
Arrhenatherum erianthum Boiss. et Reut.
Calamagrostis aleutica Bong.
Calamagrostis arenaria Roth.
Calamagrostis arenaria x *epigeios*
Calamagrostis arundinacea Roth.
Calamagrostis epigeios Roth.
Calamagrostis Langsdorffii Trin.
Cinna latifolia Griseb.
Nardus stricta L.

Stosowane według wynalazku szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall mają konidia (*Sphaecelia paspali* Born.) bezbarwne, wydłużone, owalne, eliptyczne o wymiarach $3,5\text{--}1,5 \times 2,5\text{--}7,5 \mu$ globularne sklerocja, które w stanie dojrziałym są pomarszczone, na powierzchni żółtawe, a białe w środku, o wymiarach $2,5\text{--}0 \times 2\text{--}4 \text{ mm}$; żółtawe, twarde cylindryczne lub z boku spłaszczone nóżki o wymiarach $4\text{--}6,5 \times 0,3\text{--}0,8 \text{ mm}$; globularne lub subglobularne sferidia o wymiarach $1023\text{--}1618 \times 774\text{--}1023 \mu$, owalne wydłużone peritecja o wymiarach $173\text{--}300 \times 25\text{--}162 \mu$, aschi cylindryczne o wymiarach $90\text{--}205 \times 2,8\text{--}3,6 \mu$, nitkowate, nierozgałęzione askospory o wymiarach $65\text{--}110 \times 0,6\text{--}0,6 \mu$.

Pasożytuje na *Paspalum dilatatum* Poir. oraz *Paspalum laeve* Michx. (Północna Karolina).

Innymi żywicielami są:

Paspalum alium Chase
Paspalum caespitosum Flüg
Paspalum ciliatifolium Michx.
Paspalum cruciforme
Paspalum distichum L.
Paspalum distichum var. *paspalodes* Thell.
Paspalum floridianum Michx.
Paspalum floridianum var. *glabratum* Engelm.
Paspalum giganteum Baldw.
Paspalum intermedium Munro

Paspalum langei (Fourn.) Nash
Paspalum longipilum Nash.
Paspalum monostachyum Vasey
Paspalum notatum Flüg.
Paspalum orbiculare
Paspalum plicatulum Michx. (Brazylia)
Paspalum ploriferum (Brazylia)
Paspalum pubescens Muhl.
Paspalum pubiflorum Rupr.
Paspalum quadrifarium Lam.
Paspalum supinum Bosc.
Paspalum Urvillei Steud.

Dla wprowadzenia sposobu wytwarzania ergobazyny metodą mikrobiologiczną na skalę techniczną ogromne znaczenie ma fakt, czy stosowany w niej grzyb tworzy konidia in vitro czy też nie. Za pomocą konidiów można bowiem uzyskać materiał genetycznie jednorodny, a przez działanie promieniami Roentgena i promieniami nadfioletowymi, jak również związkami chemicznymi można z konidiów o wiele łatwiej wytworzyć i wyodrębnić mutanty niż z jałowej grzybni. Ponadto za pomocą konidiów można infekować kwitnące rośliny *Paspalum* uzyskując w ten sposób na naturalnym podłożu sklerocja nadające się bardzo dobrze do zakonserwowania szczepów. Można na przykład z tego trwałego materiału uzyskać w każdej chwili świeży materiał do szczepienia wtedy, kiedy hodowle prowadzone in vitro ulegną już po wielu przeszczepach degeneracji. Konidia można także nieograniczenie długo przechowywać w postaci zliofilizowanej, co również umożliwia zakonserwowanie szczepu. Do zaszczenia płynnej pożywki nadaje się najlepiej zawiesina konidiów, ponieważ w takiej postaci można najdogodniej dawkować ilość materiału do szczepienia i można z nią najłatwiej pracować w warunkach jałowych (podczas gdy jałową grzybnię trzeba z początku zhomogenizować w mikserze).

Wyodrębnienia i rozmnażania nowego szczepu grzyba *Claviceps paspali* Stevens et Hall NRRL 3081 można dokonać w następujący sposób: z wnętrza sklerocji pobiera się w sposób jałowy mały kawałek tkanki i przenosi na pożywkę o składzie: 250 ml jasnej brzeczki piwnej bez chmielu, sucha masa 17%. 18 g agar-agar, woda destylowana do 1 litra i pH = 5,2. Wyrasta kolista kolonia, która po 14 dniach w temperaturze 24°C osiąga średnicę 15 mm. Tworzy ona na agarze powłokę o strukturze pseudosklerocjalnej o grubości około 1 mm, na której znajduje się warstwa białej grzybni powietrznej. Brunatny barwnik dyfunduje do agaru. Nie tworzą się żadne konidia. Tę kolonię dzieli się za pomocą szpatułki na części i przenosi do probówki, w której znajduje się 12 ml pożywki agarowej o następującym składzie:

brzeczka piwna	—	500 ml
suszony wyciąg z kukurydzy	—	60 g
kwas mlekowy	—	1 ml
roztwór sialmiaku w ilości potrzebnej do uzyskania pH = 4,8		

agar-agar	—	20 g
woda destylowana	—	do 1 litra

Wokół każdej szczepionki tworzy się mała kolonia o strzępkach grzybni najpierw białych, później czerwono-brązowych. Po 10 dniach na końcach nitkowatych rozgałęzień grzybni zaczynają się tworzyć zarodniki. Po 20 dniach jest wystarczająca ilość zarodników (konidiów), aby z nich sporządzić zawiesinę wodną, którą można zaszczyć 20 probówek z agarem skośnym (ta sama pożywka agarowa jak wyżej). Kultury te poddaje się inkubacji w temperaturze 24° C. Konidia wypuszczają kielki po 24—36 godzinach. Po 6 dniach powierzchnia agaru powleka się równomiernie delikatnymi białymi strzępkami grzybni, po 10 dniach wytwarza się brunatno-szara delikatnie pobryżdżona powłoka strzępków grzybni, która przylega szczelnie do agaru i posiada tylko krótkie nitkowate rozgałęzienia powietrzne. Na nich wykształcają się konidia. Po 12 dniach powstają w licznych miejscach na strzępkach grzybni centra, z których wydzielają się małe kropelki czerwono-brunatnej cieczy. Kropelki osiągają średnicę 1—3 mm i wkrótce stają się wskutek bardzo licznych konidiów mleczno-mętne. Po 16—18 dniach tworzenie się konidiów jest praktycznie zakończone. Kultura na agarze w probówce o średnicy 2 cm, zawierającej 12 ml pożywki agarowej posiada około 10⁹ konidiów.

W celu prowadzenia hodowli głębinowej przygotowuje się najpierw hodowlę wstępną w następujący sposób: jako podłoże hodowlane stosuje się 4,5-procentowy wodny roztwór ekstraktu słodowego o pH = 5,4. Jeden litr tego roztworu poddaje się sterylizacji w kolbie stożkowej o pojemności 2 litrów w ciągu 20 minut w temperaturze 110° C, po czym zaszczyć się konidiami w ilości 4 × 10⁸ otrzymanymi z 17 dniowej hodowli na agarze opisanej poprzednio, a następnie poddaje inkubacji na wytrząsarce rotacyjnej w ciągu 3 dni w temperaturze 24° C. Powstaje zwarta hodowla, składająca się z delikatnych strzępków grzybni. Strzępki tworzą luźne pęczki nitkowatych rozgałęzień grzybni i mają średnicę 2—4 mm. Nie stwierdzono obecności alkaloidów.

W celu sporządzenia większych ilości hodowli wstępnej zaszczyć się wyżej opisane podłoże w szklanych naczyniach do fermentacji, zawierających po 10 litrów podłoża, konidiami w ilości 4 × 10⁹ sztuk na każde naczynie i poddaje inkubacji w ciągu 3 dni w temperaturze 23° C z równoczesnym napowietrzaniem (6 litrów powietrza/minutę i mieszaniem) 300 obrotów na minutę. W celu przeciwdziałania pienieniu się używa się emulsji silikonowej. Tak otrzymane hodowle z naczyń fermentacyjnych mają tę samą konsystencję co hodowle z wytrząsarek.

Do otrzymywania hodowli głównej szczególnie korzystne okazało się podłoże, zawierające w 1 litrze wody destylowanej:

sorbitu	—	50 g
kwasu bursztynowego	—	36 g
KH ₂ PO ₄	—	2 g

MgSO ₄	—	0,3 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	—	1 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	—	10 mg

5 Podłoże to nastawia się na pH = 5,4 za pomocą NH₄OH.

To podłoże zaszczyć się 10-procentami 3 dniowej hodowli wstępnej i poddaje inkubacji w porcjach po 100 ml w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml na wytrząsarce wahadłowej w temperaturze 23° C. Inne hodowle prowadzi się w analogiczny sposób w naczyniu fermentacyjnym z nierdzewnej stali, zawierającym 170 l podłoża. Stosuje się przy tym napowietrzanie z szybkością 170 l powietrza na minutę oraz mieszanie początkowo z szybkością 70, później 180 obrotów na minutę. W celu przeciwdziałania pienieniu się dodaje się emulsji silikonowej. W ten sposób powstają hodowle, złożone z licznych jednakowych strzępków grzybni. Średnica ich wynosi około 5 mm i posiadają one kuliste zwarte jądro o średnicy około 1 mm, zbudowane z tkanki pseudoparenchymatycznej. Jądro to posiada gwałtownie ułożone o długości około 2 mm wypustki z równoległe położonych nitkowatych rozgałęzień grzybni. Przy końcu 12 dniowej hodowli strzępki grzybni są zabarwione na ciemno-brunatno, a przesącz ma barwę intensywnie czerwono-brunatną. Wartość pH zmienia się nieznacznie. Z przesączu tak otrzymanej hodowli można na przykład w następujący sposób wydzielić wytworzone alkaloidy: 20 litrową porcję przesączu doprowadza się za pomocą około 1,2 kg sody do pH = 9,75 i ekstrahuje 3-krotnie chlorkiem etylu w ilości po 20 litrów. Warstwę organiczną przemycza się każdorazowo 5 l wody, a następnie podgęszcza w próżni do łącznej objętości 4 l. Podgęszczony roztwór ekstrahuje się 5-procentowym kwasem winowym 3-krotnie po 1 litrze, kwaśne wyciągi doprowadza się węglanem sodowym do pH = 9,0 po czym ekstrahuje chlorkiem etylenu 3-krotnie po 2 litry. Połączone wyciągi organiczne, wymyte małą ilością wody i osuszone nad siarczanem sodowym zawierają 8 g alkaloidów. Analizę tak uzyskanej mieszaniny alkaloidów dokonano na drodze chromatografii bibulowej i procentowy udział poszczególnych składników określono na podstawie identyczności plamy barwnej z plamą wzorca.

50	ergobazyna	—	65%
	ergobazynina	—	13%
	amid kwasu lizergowego	—	9%
	amid kwasu izolizergowego	—	5%
	chanoklawina	—	4%
55	elymoklawina	—	1%
	peniklawina	—	2%
	nieznane składniki	—	1%

60 Ergobazynę można wyodrębnić w czystej postaci z osuszonych wyciągów organicznych, sporządzonych z przesączu z hodowli na drodze chromatografii, przez przekrystalizowanie lub wykonyując zdolność ergobazyny do tworzenia soli na przykład z kwasami organicznymi. Tym sposobem można z 8 g otrzymanej sumy alkaloidów

uzyskać 5,39 g wodoromaleinianu ergobazyny w czystej, krystalicznej postaci.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania ergobazyny na drodze mikrobiologicznej, **zamienny** tym, że szczep *Claviceps paspali* Stevens et Hall nr NRRL 3081

poddaje się głębokiej hodowli saprophytycznej na pożywce, składającej się z polialkoholu jako źródła węgla, z soli amonowej organicznego kwasu jako źródła azotu i soli mineralnych, a wytworzoną przy tym ergobazynę ekstrahuje się z przesączu kultury organicznym rozpuszczalnikiem i następnie wyodrębnia w znany sposób.

