



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

239 883

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 27 02 84
(21) PV 1348-84

(51) Int. Cl.³

C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 13 06 85
(45) Vydáno 01 07 87

(75)
Autor vynálezu

HARAZIM PAVEL ing., KOBEŘICE; MALINKA ZDENĚK RNDr.;
KRAJÍČEK ALOIS PhMr., SPÁČIL JIŘÍ PhMr.;
BOHÁČ JIŘÍ ing.; VALÍK JOSEF RNDr.;
BŘEMEK JAN RNDr.; ČERNOUŠKOVÁ MILENA, OPAVA

(54)

Nový průmyslový kmen mikroorganismu druhu
Claviceps purpurea (Fr) TUL. CCM F-745

Řešení se týká oborů mikrobiologie a farmaceutického průmyslu. Účelem je zlepšení surovinové základny pro výrobu zejména ergokorninu, dále ostatních alkaloidů ergotoxinové skupiny a pro výrobu polosyntetických alkaloidů. Jako surovinová základna slouží sklerocia námele, obsahující námelové alkaloidy. Uvedeného účelu se dosáhne použitím sklerocií nového průmyslového kmene mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-745, která obsahuje námelové alkaloidy v množství 0,30 až 0,89 % (průměrný obsah 0,48 %) při příslušných výrobcích. Ve sklerociích je minimálně 70 % sumy alkaloidů tvořeno ergokorninem a minimálně 12 % sumy alkaloidů tvořeno alfa-ergokryptinem a beta-ergokryptinem s průměrným vzájemným poměrem 1,8 : 1. Nový průmyslový kmen se dále vyznačuje schopností poskytovat při parazitickém růstu na žitě za užití recentní agrotechniky velmi vysoké hektarové výnosy v rozmezí 692 až 1 118 kg.

Vynález se týká nového průmyslového kmene mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL., vyznačujícího se při polní kultivaci na žitě velmi vysokými hektarovými výnosy námelových sklerocií s vysokým obsahem ergokorninu a s doprovodnými žádoucími alkaloidy alfa-ergokryptinem a beta-ergokryptinem ve výhodném poměru.

Ergokornin, alfa-ergokryptin a beta-ergokryptin jsou alkaloidy ergotoxinové skupiny a jsou významnými léčivými substancemi. Mohou být použity i jako výchozí látky pro přípravu polosyntetických derivátů námelových alkaloidů s rozšířeným spektrem účinků. Strukturu námelových alkaloidů ergokorninu a alfa-ergokryptinu popsali poprvé Stoll a Hofmann (Helv. Chim. Acta 26, 1570, 1943), strukturu beta-ergokryptinu popsal poprvé Schlie-ntz se sp. (Experientia 23, 991, 1967).

Ergokornin je v současné době v terapeutické praxi používán v lékových formách ve směsi s alfa a beta-ergokryptinem a ergokristinem většinou pod obchodním názvem DH-ergotoxin. Uvedené alkaloidy jsou v lékových formách obsaženy v přesně definovaném poměru. Pro výrobu ergokorninu v průmyslovém měřítku je dosud využíván kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-508 (Strnadová K., Kybal J., autorské osvědčení č. 176 803, 1976). Dále je vyvinut způsob fermentační přípravy námelových alkaloidů s řízeným poměrem tvorby ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu (Kybal J., Malinka Z., Harazim P., Stuchlík J., Spáčil J., Svoboda E., autorské osvědčení č. 202 613, 1980) a vyšlechtěn kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-725 produkující v saprofytických podmínkách směs ergokorninu, alfa a beta-ergokryptinu (Strnadová K., Kybal J., Svoboda E., Spáčil J., autorské osvědčení č. 222 391, 1982).

Kmen CCM F-508 se při kultivaci na žitě vyznačuje produkcí sklerocií s průměrným obsahem sumy alkaloidů 0,424 %, z toho

ergokornin, alfa a beta-ergokryptin tvoří 70 - 80 % v přibližném poměru 8 : 5,5 : 1. Průměrné hektarové výnosy sklerocií kmene CCM F-508 se pohybují kolem 120 kg. Při výrobě lékových forem námellových alkaloidů ergotoxinové skupiny ze sklerocií tohoto kmene je limitujícím faktorem nízký obsah sumy alkaloidů, nepříznivý vzájemný poměr alfa a beta-ergokryptinu, vysoký obsah nežádoucích doprovodných alkaloidů a v důsledku nízkých hektarových výnosů vysoká cena tohoto námele. Fermentační způsob výroby ergokorninu, alfa a beta-ergokryptinu podle autorského osvědčení č. 202 613 (1980) a při využití kmene CCM F-725 není dosud ekonomicky přístupný.

Pro výrobu alfa a beta-ergokryptinu jsou mimo kmene CCM F-508 v současné době využívány i kmeny *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-672 (Malinka Z., Harazim P., Spáčil J., autorské osvědčení č. 222 150, 1982), CCM F-721 (Malinka Z., Harazim P., Spáčil J., autorské osvědčení č. 225 272, 1983). Kmen CCM F-672 se při kultivaci na žitě vyznačuje produkcí sklerocií, obsahujících velmi čistý alfa-ergokryptin. Při výrobě lékových forem námellových alkaloidů ergotoxinové skupiny z tohoto kmene je nutno přidávat všechny ostatní složky. Ekonomicky výhodnější je použití tohoto kmene pro výrobu polosyntetických léčebných preparátů. Kmen CCM F-721 se při kultivaci na žitě vyznačuje vysokými hektarovými výnosy námellových sklerocií s vysokým obsahem alfa a beta-ergokryptinu a nízkým obsahem doprovodných alkaloidů. Při výrobě lékových forem námellových alkaloidů ergotoxinové skupiny z tohoto kmene je nutno přidávat ergokornin.

Uvedené nedostatky kmene CCM F-508 a fermentačního způsobu výroby ergokorninu odstraňuje do značné míry vynález, jímž je nový kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL., uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně, Brno, tř. Obránců míru 10, pod označením CCM F-745. Tento kmen je předmětem vynálezu.

Hlavní výhodou nového kmene je při kultivaci na žitě vysoká produkce sumy alkaloidů ve sklerociích, která dosahuje průměru 0,48 % sušiny biomasy, přičemž v sumě alkaloidů je převážující složkou ergokornin, který je obsažen v poměru k žádoucím doprovodným alkaloidům alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu v průměrné hodnotě 4,2 : 1. Poměr alfa-ergokryptinu ku beta-ergokryptinu je ve výhodné hodnotě průměrně 1,8 : 1. Další

výhodou je nízká tvorba nežádoucích doprovodných alkaloidů (ergokornam, ergokryptamy, ergometrin), které tvoří průměrně 12 % sumy alkaloidů. Další výhodou jsou velmi vysoké hektarové výnosy sklerocií, které dosahují při užití recentní agrotechniky pěstování námele průměru 847 kg. Tyto vlastnosti kmene umožňují získat při polním pěstování sklerocia za nižší pořizovací cenu, než při pěstování dosud používaného kmene CCM F-508. Tato sklerocia jsou velmi výhodnou surovinou pro farmaceutický průmysl vzhledem k obsahu a spektru alkaloidů. Zejména při současném užití s kmenem CCM F-721 při výrobě preparátů ergotoxinového typu poskytuje kmen efektivní zdroj ergokorninu a poměr doprovodných žádoucích alkaloidů alfa a beta-ergokryptinu podstatně zjednodušuje pracovní operace při přesném nastavování požadovaného poměru jednotlivých složek. Přínosy použití tohoto kmene se promítají především do zefektivnění postupů extrakce a izolace při výrobě produktů ergotoxinového typu. Vlastnosti kmene umožňují rovněž použití jeho sklerocií jako suroviny pro výrobu polosyntetických preparátů.

Popis vlastností nového kmene:

Při saprofytickém růstu na sladidinové živné půdě ztužené agarem tvoří houba kolonie z typického sfaceliového vzdušného mycelia. Mycelium je poměrně bohatě větvené a postranní hyfy jsou ukončeny konidiogenními buňkami. Konidie mají průměrné rozměry 6,6 x 3,5 mikrometru. Mladé mycelium je téměř bílé, starší kultury mají střední růžovo-fialovou pigmentaci. Při parazitickém růstu na žitě tvoří houba středně tmavá, hnědo-fialově pigmentovaná sklerocia. Na diploidním fertilním žitě je průměrná hmotnost sklerocií 0,113 g. Sklerocia tohoto kmene, vyrostlá na žitě, obsahují námelové alkaloidy v množství od 0,30 do 0,89 % sušiny biomasy, při průměrném obsahu 0,48 %. Minimálně 70 % sumy alkaloidů je tvořeno ergokorninem, minimálně 12 % sumy alkaloidů je tvořeno alfa-ergokryptinem a beta-ergokryptinem ve vzájemném poměru 0,6 - 2,3 : 1 (průměr 1,8 : 1). Poměr ergokorninu ku alfa a beta-ergokryptinu je 2,3 - 7,8 : 1 (průměr 4,2 : 1). Další doprovodné alkaloidy jsou ergokornam, ergokryptamy a ergometrin; jejich obsah činí nejvýše 18 % sumy alkaloidů (průměr 12 %).

Nový produkční kmen byl vyšlechtěn z původně travního kmene

námele, získaného ze třtiny lesní. Sklerocia námele ze třtiny obsahovala průměrně 0,34 % námellových alkaloidů, tvořených ze 64 % směsí ergokorninu, alfa a beta-ergokryptinu, z 19 % ergosinem. Zbývajících 17 % tvořily ergokornam, ergokryptamy a ergometrin. Po naočkování tohoto travního kmene na žito byla získána sklerocia obsahující průměrně 0,38 % alkaloidů. Pro další šlechtění bylo vybráno sklerocium obsahující 0,38 % sumy alkaloidů, z toho 73 % tvořily ergokornin, alfa-ergokryptin a beta-ergokryptin v poměru 5,3 : 3,6 : 1; 12 % tvořil ergosin, 15 % tvořily ergokornam, ergokryptamy a ergometrin. Vybrané sklerocium bylo převedeno do saprofytické kultury a vytvořené konidie byly ozařovány UV zářením. Suspenze konidií byla ozařována zdrojem UV záření s výkonem $15 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ po dobu 280 sekund, kdy přežívalo 0,15 % konidií. Po ozařování byla suspenze konidií monokonidiově rozizolována. Celý postup UV mutageneze byl opakován třikrát. Potom byly kultury z jednotlivých monokonidiových izolátů naočkovány na žito a vzniklá sklerocia byla jednotlivě analyzována. Z těchto sklerocií bylo pro další šlechtění vybráno sklerocium s obsahem alkaloidů 0,43 %, z toho 79 % tvořily ergokornin, alfa a beta-ergokryptin v poměru 4,9 : 2,3 : 1; 21 % tvořily ergokornam, ergokryptamy a ergometrin. Suspenze konidií, vykultivovaných z tohoto sklerocia, byla ozařována UV zářením a postup ozařování kombinovaný monokonidiovou izolací byl opakován čtyřikrát. Kultury z monokonidiových izolátů byly naočkovány na žito. Na základě analýzy sklerocií získaných z jednotlivých izolátů a infekceschopnosti kultur pro žito byl vybrán kmen, který se vyznačuje vysokou tvorbou ergokorninu, tvorbou žádoucích doprovodných alkaloidů alfa a beta-ergokryptinu ve výhodném poměru, nízkým obsahem nežádoucích doprovodných alkaloidů a dlouhodobou stabilitou těchto vlastností. Při růstu na hostitelské rostlině při recentně užívané agrotechnice pěstování námele se tento kmen vyznačuje velmi vysokými hektarovými výnosy sklerocií. Stabilita těchto vlastností byla potvrzena opakovaným pěstováním na žitě ve třech vegetačních obdobích. Tento kmen je předmětem vynálezu.

Způsob kultivace nového kmene pro získání výchozí suroviny k izolaci a extrakci ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu a k následné výrobě finálních produktů z těchto alkaloi-

dů 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.

Příklad použití:

Z potřebného objemu saprofytické kultury kmene 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 35-60 denním růstu na žitě s chemicky vyvolanou samčí sterilitou se provede sběr narostlých sklerocií námele. Z jednoho hektaru žita bylo získáno 927 kg suchých sklerocií námele tohoto kmene, obsahujících 0,48 % sumy alkaloidů, ze které bylo 88 % tvořeno ergokorninem, alfa-ergokryptinem a beta-ergokryptinem ve vzájemném poměru 7,6 : 1,8 : 1. Získaná droga byla vyextrahována, extrakty z části použity pro výrobu ergotoxinu, z části použity pro výrobu polosyntetických preparátů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

239 883

Nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-745, *vytvářející* v polní kultuře na žitě sklerocia v minimálním množství 692 kg/ha, s obsahem sumy alkaloidů nejméně 0,30 % vztaženo na sušinu biomasy, s obsahem ergokorninu v sumě alkaloidů minimálně 70 %, s poměrem ergokorninu ku alfa a beta-ergokryptinu minimálně 2,3 : 1 a s poměrem alfa-ergokryptinu ku beta-ergokryptinu minimálně 0,6 : 1.