



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

236660

(11)

(B2)

(51) Int. Cl.⁵
C 12 P 1/06

(22) Přihlášeno 06 02 81
(21) (PV 913-81)

(40) Zveřejněno 17 09 84

(45) Vydáno 15 02 87

(72)
Autor vynálezu

NAGY UDVARY ÉVA dr., BUDAI MIKLÓS, FEKETE GYÖRGY dr.,
GÖRÖG SÁNDOR dr., HERÉNYI BULCSU, WACK GÉZA, ZALAI KÁROLY,
BUDAPEŠT (MLR)

(73)
Majitel patentu

RICHTER GEDEON VEGYÉSZETI GYÁR Rt., BUDAPEŠT (MLR)

(54) Způsob regulace množství a vzájemného poměru obsahu alkaloidů

1

2

Způsob regulace množství a vzájemného poměru obsahu alkaloidů produkovaných za saprofytických podmínek variantami kmene *Claviceps purpurea*, produkujících při fermentaci prováděné na kapalném živném médiu, obsahujícím zdroj uhlíku, dusíku, minerální soli, popřípadě další živné látky, v určitém tepelném rozmezí a při určité hodnotě pH, především ergokornin a α, β -ergokryptin.

Podstata řešení spočívá v tom, že u fermentace prováděné v submerzní kultuře za aerobních podmínek na kapalném živném médiu obsahujícím zdroj uhlíku, dusíku a minerální soli při 20 až 26 °C a hodnotě pH od 5,2 až 6,8 po dobu čtyř až osmi dnů použije kmenů *Claviceps purpurea* deponovaných pod čísly MNG 0022, MNG 0083, MNG 00186 u Maďarského státního hygienického ústavu, přičemž se jako regulátoru použije v množství od 0,01 do 10 kg/m³ fermentační břečky, s výhodou 0,05 až 5,0 kg na m³ fermentační břečky, sloučeniny činné v biosyntéze jako meziprodukt, a to α -ketomásliné kyseliny, treoninu a/nebo homoserinu nebo sloučeniny homocysteinu a/nebo metioninu stimulující biochemickou tvorbu isoleucinu.

Vynález se týká způsobu regulace množství a vzájemného poměru obsahu alkaloidů produkovaných za saprofytických podmínek variantami kmene *Claviceps purpurea* produkujících při fermentaci prováděné na kapalném živném médiu obsahujícím zdroj uhlíku, dusíku, minerální soli, popřípadě další živné látky, v určitém tepelném rozmezí a při určité hodnotě pH, především ergokornin a α - a β -ergokryptin.

Je známo, že dihydroergotoxin-metan- nebo etansulfonát se v lékařství používá jako regulátor centrální látkové výměny a také při léčení centrálního i periferního oběhového okruhu. Preparát zvyšuje syntézu proteinu centrálního nervového systému a brzdí tvorbu katecholaminem stimulovanou adenylyklazy. Preparát působí dále jako slabé sedativum, brzdí reflexní tachykardii, zlepšuje prokrvení mozku a snižuje tlak krve. V lékařství je preparát používán především u nemocí pro uklidnění periferních nebo mozkových poruch krevního oběhu.

Dihydroergotoxin se připravuje hydrogenací ergotoxinu. Vzniklý produkt je směsí dihydroergokristinu, dihydroergokorninu a dihydroergokryptinu. Dihydroergokryptin se vyskytuje ve dvou modifikacích (α - a β -formě) a podle nejnovějších výzkumů není farmakologický účinek obou forem zcela identický.

α -Forma při antikoncepčním testu u krysa je aktivnější, zatímco β -forma má silnější účinek u decerebrovaných koček. Z těchto důvodů je v předpisech pro preparáty obsahující dihydroergotoxin stanoven vzájemný poměr α - a β -dihydroergokryptinu. Ideálním poměrem α - a β -formy je 2:1 a celkové optimální složení dihydroergotoxinu odpovídá složkám dihydroergokristin, dihydroergokornin, α -dihydroergokryptin a β -dihydroergokryptin v poměru 3:3:2:1.

Příslušné tolerance poměru mezi α - a β -formou jsou v jednotlivých státech různé. V USA a většině evropských států leží příslušné hodnoty obsahu β -dihydroergokryptinu v mezích 26,7 až 44 procent z celkového obsahu dihydroergokryptinu, zatímco v ostatních evropských státech a v Japonsku se tolerance pohybuje v mezích 28,6 až 40 procent.

Prvním krokem ve výrobě dihydroergotoxin-metan nebo etansulfonátu je příprava nehydrogenovaných námelových alkaloidů (ergokristinu, ergokorninu, α - a β -ergokryptinu).

Tyto alkaloidy jsou připravovány biologickou cestou. Jednou z možností je parazitická biosyntéza, při které je infikováno žito a vzniklý alkaloid se získá extrakcí drogy. Tohoto postupu se převážně používá při výrobě ergokristinu.

Dále lze použít saprofytickou syntézu, při které jsou alkaloidy izolovány z fermentační břečky. Nejznámějšími kmeny pro tento způsob přípravy jsou kmeny ATCC 20102, který produkuje ergokryptin a ergotamin,

kmen ATCC 20106 produkující ergokornin a ergosin, kmen ATCC 20019 produkující ergokryptin, kmen Soc. Farmaceutici Italia produkující α -ergokryptin a ergosin.

Z uvedeného výčtu je zřejmé, že tyto selektivní kmeny neprodukují pouze alkaloidy vhodné pro přípravu ergotoxinu, ale také jiné námelové alkaloidy, to znamená, že jejich fermentace není orientovaná výhradně na ergotoxin.

Maďarští výzkumní pracovníci jako první vypěstovali kmeny *Claviceps purpurea*, které produkují převážně α - a β -ergokryptin. Také u těchto kmenů není nastavení vzájemného poměru alkaloidů během fermentace regulovatelné. Vzájemný poměr tří vzniklých alkaloidů mezi sebou lze nastavit pouze dodatečně, proto je nutno získanou směs alkaloidů rozdělit na jednotlivé složky zdlouhavými, dosud známými postupy a tyto pak v požadovaném poměru znovu smíchat dohromady.

Dále je znám postup, při kterém jsou fermentovány dva kmeny současně, přičemž jeden produkuje ergokornin, ergokryptin a jeho izomer, druhý kmen produkuje ergokristin. Ze společného roztoku kultur obou kmenů nelze získat výše uvedené alkaloidy v blíže určeném poměru. Také u tohoto způsobu přípravy nelze regulovat vzájemné poměry alkaloidů. Také je problematické a obtížnější zvládnout fermentaci při současném nasazení dvou kmenů než u postupu, při kterém jsou požadovány optimální podmínky pouze pro růst jednoho kmene.

Bylo zjištěno, že biosyntézu peptidových alkaloidů lze ovlivnit určitými aminokyselinami. Biosyntézu ergokorninu, který ve své peptidové části obsahuje valin, lze podpořit přísadou valinu, biosyntézu α -ergokryptinu, obsahujícího leucin, lze podpořit přísadou leucinu. Přesto, že β -ergokryptin obsahuje isoleucin, nelze biosyntézu v tomto případě ovlivnit přísadou isoleucinu. K vysvětlení pravděpodobné příčiny tohoto zvláštního jevu se uvádí, že růst kmene schopného produkovat β -ergokryptin je isoleucinem brzděn.

I když v břečce známých kmenů, produkujících ergokryptin nebo ergokornin a ergokryptin, je právě podíl β -ergokryptinu menší, než je žádoucí, nemůžeme vzájemný poměr doposud ovlivňovat. Smyslem vynálezu proto bylo ovlivnit fermentaci kmene *Claviceps purpurea* žádoucím směrem.

Překvapující bylo však zjištění, že podíl β -ergokryptinu ve fermentační břečce vzroste, když produkci alkaloidů varianty kmene *Claviceps purpurea* ovlivníme místo isoleucinem sloučeninou, která v biosyntéze vystupuje jako meziprodukt. Meziprodukty isoleucinu tedy nebrzdí růst kmene.

Dále bylo zjištěno, že tvorbu alkaloidů lze regulovat také sloučeninami, které biochemickou regulací stimulují tvorbu isoleucinu. Meziprodukty a regulačními sloučeninami

nami jsou ketokyseliny, hydroxysloučeniny a aminokyseliny se 2 až 4 uhlíkovými atomy, jejichž biosyntéza vychází z asparagové kyseliny nebo fosfátu této kyseliny.

K ovlivnění fermentace žádoucím směrem byly také izolovány selekcí nové varianty kmene. Během těchto pokusů byla izolována nová varianta kmene *Claviceps purpurea*, která byla deponovaná pod č. MNG 00186. Kmen má morfolologii blízkou kvasinkám a převážně produkuje ergokornin a β -ergokryptin, je vhodný tudíž ke zvýšení podílu β -ergokryptinu.

Dosavadním způsobem fermentace variant kmene *Claviceps purpurea* nelze ovlivňovat ani obsah ani vzájemný poměr vznikajících námelových alkaloidů. Podíl β -ergokryptinu ve fermentační břečce je nízký.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob regulace podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se u fermentace prováděné v submerzní kultuře za aerobních podmínek na kapalném živném médiu obsahujícím zdroj uhlíku, dusíku a minerální soli při 20 až 26 °C a hodnotě pH od 5,2 až 6,8 po dobu čtyř až osmi dnů použije kmenů *Claviceps purpurea* deponovaných dne 22. dubna 1963 pod číslem MNG 0022, dne 25. ledna 1972 pod číslem 0083, dne 9. května 1979 pod číslem MNG 00186 u Maďarského státního hygienického ústavu, přičemž se jako regulátoru použije v množství od 0,01 do 10 kg/m³ fermentační břečky, s výhodou 0,05 až 5,9 kg/m³ fermentační břečky, sloučeniny činné v biosyntéze jako meziprodukt, a to α -ketomásečné kyseliny, treoninu a/nebo homoserinu nebo sloučeniny homocysteinu stimulující chemickou tvorbu isoleucinu.

Fermentace je prováděná za přítomnosti přísad (prekursorů) regulujících vzájemný poměr alkaloidů.

Jako regulační přísadu lze použít sloučeninu, která vystupuje v biosyntéze isoleucinu jako meziprodukt nebo sloučenina.

Meziprodukty v takové biosyntéze isoleucinu jsou — v takovém pořadí, jak se tvoří — tyto: přes homoserin a treonin nebo kyselinu 3-metylasparagovou (kyselinu 2-amino-3-methyljantarovou) a kyselinu metyloxalovou [2-metyl-3-oxo-jantarovou kyselinu, kyselinu α -ketomásečnou až nakonec na α -acetyl- α -hydroxymásečnou kyselinu, α,β -dihydroxy- β -methylvalerovou kyselinu a α -ketoto- β -methylvalerovou kyselinu.

Sloučeniny, které stimulují vznik isoleucinu biochemickou regulací, biochemicky patří k takzvaným asparátům, tedy sloučeninám, jejichž biosyntéza vychází z kyseliny asparagové nebo fosfátu této kyseliny. V první řadě se jedná o ketokyseliny, hydroxykyseliny a aminokyseliny se čtyřmi až šesti uhlíkovými atomy. Přednostně to jsou homocystein a/nebo methionin.

Sloučeniny, které regulují tvorbu alkaloidů se do fermentační břečky přidávají v množství od 0,01 do 10 kg/m³, s výhodou

0,05 až 5,0 kg/m³. V daném případě se slabě kyselý vodný roztok regulační sloučeniny přidává po sterilizaci, a to buď najednou, nebo rozdělený na několik dávek, nebo plynu během celé fermentace.

Dříve se obsah alkaloidů ve fermentační břečce často uváděl v hodnotách měřených spektrofotometricky. Celkový obsah alkaloidů byl měřen spektrofotometricky, i když výsledky měření nejsou dostatečně specifické.

Jednotlivé složky ergotoxinu byly kromě toho určovány eluční chromatografií, případně kvantitativně kapalinovou chromatografií.

Vynález je blíže objasněn dále uvedenými příklady, kterými však není omezen.

Příklad 1

200 ml živného média GK v 500 ml Erlenmeyerové baňce se naočkuje kulturou *Claviceps purpurea* MNG 0022, předpěstovanou na agarovém živném médiu AIC. Erlenmeyerová baňka se temperuje při 24 °C na vibračním stole s kmitočtem 300 min⁻¹ tři dny. Takto vzniklý zárodek se přeočkuje na 5 litrů živného média St do fermentátoru o obsahu 10 litrů.

Kultura se pěstuje při 24 °C a 240 otáčkách za minutu při protřepávání 0,5 litry vzduchu na litr fermentační břečky a minutu po dobu sedmi dnů. Ve 40., 64., 88. a 112. hodině se k fermentační břečce přidává jako prekursor 10% vodný roztok metyloxalové kyseliny (0,5 g prekursoru . litr⁻¹ fermentační břečky). Obsah alkaloidů ergokorninu a ergokryptinu po sedmi dnech fermentace vzroste na požadovanou hodnotu.

Celkový obsah alkaloidů podle barevné reakce je 1150 γ /ml. Chromatografií na tenké vrstvě [J. of Chrom. **87**, 433—1973] bylo zjištěno 300 γ /ml ergokorninu, 180 γ /ml ergokryptinu a 110 γ /ml jejich pravotočivých epimerů. Poměr mezi α - a β -ergokryptinem, stanovený vysokotlakou kapalinovou chromatografií byl určen 66 : 34.

Alkaloidy byly z fermentační břečky izolovány známým způsobem.

Složení použitých živných médií:

Agarové médium AIC

Manit	40,0 g
kyselina citrónová	7,0 g
voda zbobtnalé kukuřice	2,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný	1,0 g
síran hořečnatý	0,3 g
práškovitý agar (Difco)	25,0 g
čpavek	do pH 5,2 až 5,3
voda	do 1000 ml

Požadovaná hodnota pH se nastavuje během zahřívání k varu. Pak se dávky živného média po 6 ml vpraví do zkumavek a pone-

chají se v šikmo uložených zkumavkách zatuhnout.

Živné médium GK

tryptasin	7,0 g
kyselina citrónová	4,1 g
dihydrogenfosforečnan draselný	0,3 g
síran hořečnatý	0,3 g
čpavek	do pH 5,7 až 5,8
voda	do 840 ml

Živným médiem se plní baňky po 84 ml nebo 168 ml. Do každé baňky se přidá 16 nebo 32 ml 50% roztoku glukózy.

Živné médium St

sacharóza	100,00 g
kyselina jantarová	10,00 g
dihydrogenfosforečnan draselný	0,25 g
síran hořečnatý	0,25 g
dusičnan amonný	1,00 g
chlorid vápenatý	1,00 g
čpavek	do pH 5,2 až 5,3
voda	do 1000 ml

Živné médium se sterilizuje v dávkách po 0,1 nebo 5 nebo 100 litrů.

Příklad 2

200 ml živného média GK v Erlenmeyero-vé baňce o objemu 750 ml se naočkuje variantou kultury *Claviceps purpurea* MNG 0088, pěstované na živném médiu AIC. Kultura se tři dny temperuje při 24 °C na vibračním stole při kmitočtu 300 min⁻¹.

Získaná kultura se převede do pěti litrů živného média TC 54, které je v laboratorním fermentátoru o obsahu 10 litrů. Kultura se pak při 24 °C a otáčkách míchadla 240 min⁻¹ profukuje 0,5 litry vzduchu na litr fermentační břečky a minutu, po dobu tří dnů. Získanou očkovací kulturou je naočkováno 100 litrů živného média St ve fermentátoru, který je kyselinovzdorný a vybaven míchadlem.

Kultura je udržovaná při 24 °C za promíchávání rychlostí 120 min⁻¹ a provětrávání 0,3 litry vzduchu na litr fermentační břečky a minutu po dobu šesti dnů. V prvních pěti dnech fermentace se ke kultuře přidává jako prekursor 5% vodný roztok kyseliny α -ketomásečné s rychlostí 20 ml h⁻¹.

Po skončení fermentace byl obsah alkaloidů 920 γ /ml. Chromatografickou metodou popsanou v příkladu 1 bylo zjištěno 260 γ na mililitr ergokorninu, 155 γ /ml α -ergokryptinu a 95 γ /ml β -ergokryptinu. Mimoto bylo nalezeno ještě 80 γ /ml ergokorninkryotininu.

Živné médium TC 54 má toto složení:

sacharóza	100,0 g
kyselina citrónová	10,0 g
chlorid sodný	10,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný	0,5 g
síran hořečnatý	0,5 g
čpavek	do 5,7 až 5,8
voda	do 1000 ml

Živné médium se sterilizuje v dávkách po pěti litrech v laboratorním fermentátoru.

Příklad 3

100 ml živného média GK v Erlenmeyero-vé baňce o objemu 500 ml se naočkuje kulturou varianty *Claviceps purpurea* MNG 0088, množené na agarovém živném médiu St. Kultura se pak temperuje při 24 °C na vibračním stole při kmitočtu 300 min⁻¹ tři dny. 10 ml získané kultury bylo přeočkováno na 100 ml živného média T 25.

Tato kultura byla rovněž temperovaná pět dnů při 20 °C na vibračním stole. Ve 20. hodině bylo do fermentační břečky přidáno 0,5 g treoninu jako prekursoru. V 5. dnu byla celková koncentrace alkaloidů 1200 γ na mililitr. Metodou uvedenou v příkladu 1 bylo zjištěno 260 γ /ml ergokorninu, 140 γ na mililitr α -ergokryptinu a 80 γ /ml β -ergokryptinu. Celkový obsah ergokornininu a ergokryptininu byl 130 γ /ml.

Živné médium St se liší od kapalného živného média St, uvedeného v příkladu 1 tím, že do roztoku bylo přidáno 25 g práškového agaru (Difco). Po přidání agaru se živné médium zahřeje k varu, pak po 6ml porcích se rozdělí do zkumavek, sterilizuje a v šikmé poloze se nechá zatuhnout.

Živné médium T 25 má toto složení:

sacharóza	300,0 g
kyselina citrónová	15,0 g
kvasnicový výtažek	1,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný	0,5 g
síran hořečnatý	0,5 g
čpavek	do pH 5,2 až 5,3
voda	do 1000 ml

Živné médium se ve 100ml dávkách plní do baněk, ve kterých se sterilizuje.

Příklad 4

Postup prací je stejný jako v příkladu 3, avšak jako prekursor se použije místo treoninu 0,5 g homoserinu. Po 5. dnu fermentace byl celkový obsah alkaloidů 880 γ /ml.

Fermentační břečka obsahovala 220 γ /ml ergokorninu, 150 γ /ml α -ergokryptinu a 80 γ na mililitr β -ergokryptinu. Ergokorninu a ergokryptinu bylo dohromady zjištěno 180 γ na mililitr.

Příklad 5

Postup prací je stejný jako v příkladu 3, avšak jako prekursoru bylo použito 0,05 g homocysteinu. Po 5. dnu fermentace byla celková koncentrace alkaloidů 700 γ /ml. Fermentační břečka obsahovala 190 γ /ml ergokorninu, 85 γ /ml α -ergokryptinu a 90 γ na mililitr β -ergokryptinu. Ergokorninu a ergokryptinu bylo celkem 150 γ /ml.

Příklad 6

100 ml živného média GK v Erlenmeyerově baňce o obsahu 500 ml se naočkuje kulturou kmene *Claviceps purpurea* MNG 00186,

pěstované na agarovém živném médiu St. Kultura se temperuje při 24 °C na vibračním stole s kmitočtem 300 min⁻¹ čtyři dny. Takto získaná kultura se po 10 ml dávkách přenese do osmi baněk, ve kterých je po 100 mililitrech živného média St. Kultury jsou fermentovány rovněž při 24 °C na vibračním stole po dobu sedmi dnů. Ke čtyřem kulturám nebyl přidán prekursor. Ke zbývajícím čtyřem kulturám byl přidán ve 24. a 48. hodině fermentace po 0,02 g metioninu, rozpuštěného ve 2 ml vody. Po sedmi dnech byla fermentace přerušena.

Fermentační břečky, kultivované bez prekursoru, byly spojeny dohromady a byl určen obsah alkaloidů: 80 γ /ml ergokorninu, 15 γ /ml α -ergokryptinu, 30 γ /ml β -ergokryptinu.

Fermentační břečky kultivované s prekursorem byly smíchány dohromady a v nich určen obsah alkaloidů: průměrný obsah ergokorninu byl 250 γ /ml, 50 γ /ml α -ergokryptinu a 100 γ /ml β -ergokryptinu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob regulace množství a vzájemného poměru obsahu alkaloidů produkovaných za saprofytických podmínek variantami kmene *Claviceps purpurea* produkujících při fermentaci prováděné na kapalném živném médiu obsahujícím zdroj uhlíku, dusíku, minerální soli, popřípadě další živné látky v určitém tepelném rozmezí a při určité hodnotě pH, především ergokornin a α - a β -ergokryptin, vyznačující se tím, že se při fermentaci prováděné v submerzní kultuře za aerobních podmínek na kapalném živném médiu obsahujícím zdroj uhlíku, du-

síku a minerální soli při 20 až 26 °C a hodnotě pH od 5,2 až 6,8 po dobu čtyř až osmi dnů použije kmenů *Claviceps purpurea* MNG 0022, MNG 0083 a MNG 00186, přičemž se jako regulátoru použije v množství od 0,01 do 10 kg/m³ fermentační břečky, s výhodou 0,05 až 5,0 kg/m³ fermentační břečky, sloučeniny činné v biosyntéze jako meziproduct, a to α -ketomáselné kyseliny, treoninu a/nebo homoserinu nebo sloučeniny homocysteinu a/nebo metioninu stimulující biochemickou tvorbu isoleucinu.