



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

224532

(11) (B1)

(22) Přihlášeno 06 01 82
(21) (PV 121-82)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 17/18

(40) Zveřejněno 29 04 83

(45) Vydáno 15 12 85

(75)
Autor vynálezu

ŘÍČICOVÁ ALENA PhMr. CSc., FLIEGER MIROSLAV RNDr., SEDMERA PETR ing.,
VOKOUN JINDŘICH prom. chem. CSc., ŘEHÁČEK ZDENĚK PhMr. RNDr. DrSc.,
PRAHA, STUHLÍK JOSEF ing., HRABYNĚ,
KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing. DrSc., PRAHA

(54) Způsob výroby derivátů kyseliny lysergové submersní fermentací

Vynález se týká způsobu výroby alkaloidů derivátů kyseliny lysergové submersní fermentací při použití saprofytního kmene vrčkaté houby *Claviceps paspali* FA. Tento kmen je uložen v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod. č. CCMF - 731.

Kultury *Claviceps paspali* vrčkaté houby čeledi *Clavicipitaceae* [K. Cejp, Houby I, Nakl. ČSAV, Praha (1957)], patří ke skupině kmenů, které se vyznačují schopností vytvářet za určitých podmínek biologicky účinné látky, jejichž základem je ergolinové jádro. V přírodě se vyskytují tyto kmeny jako parazité na travě *Paspalum distichum* nebo *Paspalum dilatatum*. Byly popsány Stevensenem a Hallem (Bot. Gazette, 460 /1910/), avšak první zmínka o těchto kmenech jako zdrojích námelových alkaloidů se objevila v Tonolově a Arcamoneově práci (F. Arcamone et al., Nature (London), 187, 238/1960/). V průběhu dalších let byly popsány nové kmeny.

Se kmenem *C. paspali* izolovaným z trávy *Paspalum distichum* L. pracovali F. Arcamone et al. (Nature 187, 238 /1960/), Proc. Roy. Soc. Ser. B 155, 26 /1961/). Výtěžky celkových alkaloidů (CA) byly značně rozdílné, např. 504- μ g/ml CA až 2 mg/ml fermentační tekutiny (vyjádřeno jako lysergová kyselina). Podobně v dalších letech pracovali s řadou kmenů *C. paspali* Mercantini et al. (Ann. Ist. Super. Sanità 2, 536 (1967), D. Gröger a V. E. Tyler Jr., Lloydia 26, 174 (1963), F. Pacifici, Lloydia 25, 37 (1962), 26, 161 (1963), P. J. Rosazza et al., Appl. Microbiol. 15, 1270 (1967) nebo A. Puc et al. IV. Int. Congr. Culture Coll., Brno ČSSR (July 1981)).

Příprava produktů, které jsou předmětem způsobu výroby podle vynálezu, není dosud uspokojivě vyřešena, zejména pokud jde o výtěžnost a délku procesu, přestože se jedná o látky, které jsou biologicky účinné s aplikací v humánní medicíně. Některé nevýhody do-

224532

savadních způsobů přípravy odstraňuje způsob podle vynálezu, jehož podstatou je, že kmen vrčkaté houby *Claviceps paspali* FA se kultivuje na kultivační půdě o složení

manitol 29 až 31 g/l	fermentační tekutiny
Kyselina jantarová 29 až 31 g/l	
propylenglykol 29 až 31 g/l	
primární forforečnan draselný 0,9 až 1,1 g/l	
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,3 až 0,32 g/l
Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	0,03 až 0,035 g/l
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,01 až 0,015 g/l
NaNO ₃	0,1 g/l až 0,11 g/l a stopové množství
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	
CuSO ₄ .5 H ₂ O	

příjem zbytek tvoří vodovodní voda,
při teplotě 24 °C ± 1 °C o pH 5,2 až 5,3 po dobu 14 až 17 dnů, načež konečný produkt, směs derivátů kyseliny lysergové, se izoluje extrakcí známým způsobem.

Složení kultivační půdy je rozhodujícím faktorem pro výtěžnost produkovaných derivátů kyseliny lysergové. Půda obsahuje známé zdroje uhlíku a dusíku (Tylerovo médium viz P. Gröger a V. E. Tyler Jr., *Lloydia* 26, 174 /1963/) a specifickou směs anorganických solí a stopových prvků.

Důležitým faktorem je použití vodovodní vody, která zvyšuje celkovou produkci alkaloidů a dále přesné zachování kultivační teploty 24 °C.

V daných podmínkách se negativně projevuje vliv FeSO₄.7 H₂O. Je třeba, aby toto zařízení pro fermentaci bylo z nerezavějících materiálů.

Dále je uveden příklad způsobu výroby alkaloidů podle vynálezu.

P ř í k l a d

Submersní kultivace kmene *C. paspali* FA v baňkách na rotačním třepacím stroji.

Příprava základní kultury kmene *C. paspali* FA

Výchozí kmen se kultivuje při 23 až 24 °C v endozkumavkách (15 x 200 mm) s 15 ml Sabouraudovy půdy (g/l: pepton 10, glukosa 40, malt. extr. Difco 26, agar 20, vodovodní voda, pH 5,8 po ster. 25 min při 100 kPa). Vyrostlá kultura se uchovává v zaparafinové zkumavce v lednici při +4 °C a lze ji použít i po 6 měsících k další pasáži.

Příprava vegetativního inokula

Mycelium vyrostlé na šikmém agaru se setře kličkou nebo speciálně upravenou škrabkou do 7 ml Sabouraudova média a suspensí se zaočkuje varná baňka (500 ml) s 80 ml tekuté Sabouraudovy půdy. Organismus se kultivuje 4 dny při 24 °C na rotačním třepacím stroji typu Panel (frekvence 3,7 Hz, výkyv 70 mm).

Promytí mycelia

Mycelium z baňky se zbaví fermentační tekutiny odsátím na porcelánovém filtru s filtrační vložkou (Schleicher Schuell č. 589³) a poté se promyje 100 ml destilované vody.

Homogenizace mycelia

Odsáté mycelium se opatrně přeneso do sterilní baňky MSE-homogenizátoru, doplní destilovanou vodou v množství ekvivalentním odsáté tekutině a homogenizuje ± 5 s, aby došlo k rozrušení shluků mycelia. Touto suspenzí se zaočkuje kultivační médium v koncentraci 6 % na objem tekutiny.

Submersní fermentace

Kultivace probíhá při 24 °C v 500 ml baňkách s 80 ml média tohoto složení g/l:

manitol	30
kyselina jantarová	30
propylenglykol	30
prim. fosforečnan draselný	1
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,3
vodovodní voda	

Úprava pH = 5,2 až 5,3 amoniakem před sterilizací 35 min při tleku 100 kPa. Roztok soli (mg/l) o složení:

Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	30
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	5
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	5
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	10
NaNO ₃	100

byl přidáván po sterilizaci roztoku bakteriálním filtrem.

Průběh fermentace je sledován 16 dní. Při každém odběru vzorků je kontrolována čistota kultury výsevem na 5 paralelních Petriho misek se Seboursaudovou půdou, jež je vhodným prostředím pro růst plísní a bakterií.

Celkové alkaloidy byly stanoveny kolorimetricky Allport-Cockingovou metodou (Quart. J. Pharmacol. 2, 341 /1932/) a děleny papírovou chromatografií v sestupné úpravě v systému butanol-kyselina octová-destilovaná voda v poměru 4:1:5 (I. Hais a K. Macek: Papírová chromatografie, Nakladatelství ČSAV Praha, str. 500 /1954/).

Maximální výtěžky celkových alkaloidů získaných kultivací kmene C. paspali FA v submersních podmínkách popsaných způsobem se pohybovaly v rozmezí 1 600 až 2 000 µg/ml fermentační tekutiny.

Deriváty kyseliny lysergové získané způsobem podle vynálezu lze hydrolyzovat na kyselinu lysergovou (D. Gröger a V. E. Tyler Jr., Lloydia 26, 174 /1963/) a lze z ní připravit terapeuticky použitelné preparáty. Lysergová kyselina a její deriváty našly široké uplatnění ve farmakologii a lékařské terapii (A. Hofman, Die Mutterkornalkalide, Stuttgart /1964/).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby derivátů kyseliny lysergové submersní fermentací, vyznačený tím, že kmen vřeckaté houby *Claviceps paspali* FA CCMF-731 se kultivuje na kultivační půdě o složení

Manitol	29 až 31 g/l fermentační tekutiny
propylenglykol	29 až 31 g/l
kyselina jantarová	29 až 31 g/l
primární fosforečnan draselný	0,9 až 1,1 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3 až 0,32 g/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,03 až 0,035 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,01 až 0,015 g/l
NaNO_3	0,1 až 0,11 g/l a stopové množství
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$,	

příčemž zbytek tvoří vodovodní voda

při teplotě $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ o pH 5,2 až 5,3 po dobu 14 až 17 dnů, načež konečný produkt, směs derivátů kyseliny lysergové, se izoluje.