



Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von Indolen durch Kultivierung von Agaricales, die durch Festphasenfermentation von *Psilocybe cyanescens* Wakefield emend. Kriegelsteiner erhalten werden, gekennzeichnet durch
  - die Kultivierung der Pilzmycelien auf einem festen, natürlichen und wasserhaltigen Nährmedium
  - die Kultivierungstemperatur von 2 bis 32 °C
  - die Kultivierungsdauer von 30 bis 50 Tagen
  - anschließende Trocknung des Fermentationsgemisches
  - Extraktion und chromatographische Isolierung des Psilocybins.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Trocknung des Fermentationsgemisches bei 20 bis 50 °C unter Vakuum oder Normaldruck erfolgt.
3. Nährmedium für die Festphasenfermentation von *Psilocybe cyanescens*, gekennzeichnet durch die Zusammensetzung
  - abgefallene Ästchen und Laub von *Quercus*, *Tilia*, *Salix*, *Acer*, *Aesculus*, *Populus*, *Betula*, *Carpinus*, *Aldus* und *Fagus* und/oder
  - abgefallene Nadeln von *Picea* und *Pinus* und/oder
  - am Standort abgestorbene Pflanzen von *Urtica*
  - Wasser von 10 bis 100 %, bezogen auf den festen Nährboden.

4. Nährmedium nach Anspruch 3, gekennzeichnet dadurch, daß dem Nährmedium zusätzlich 0,01 bis 0,3 % Harnstoff zugesetzt wird.
5. Nährmedium nach Anspruch 3 und 4, gekennzeichnet dadurch, daß das Nährmedium vor seiner Beimpfung autoklaviert und anschließend auf eine Temperatur von 2 bis 32 °C abgekühlt wird.

Titel

Verfahren zur Gewinnung von Indolen durch Kultivierung von Agarices und Nährboden hierfür

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Indolen durch künstliche Anzucht von Pilzmycelien auf geeigneten Nährböden. Die Substanz Peilocybin ist in der neurobiologischen Forschung als Modellschubstanz anwendbar.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Die Indolverbindung Peilocybin kommt in natürlichen Fruchtkörpern verschiedener Pilzarten der Agaricales aus den Gattungen Peilocybe, Stropharia, Conocybe, Inocybe, Pluteus und Panaeolus vor.

Es ist bekannt, daß aus den kultivierten Mycelien verschiedener Arten der Wirkstoff neben geringen Anteilen von Nebenalkaloiden wie Peilocin und Baeocystin gewonnen werden kann.

So beschreibt ein Verfahren (DE-OS 1087321) die Gewinnung der Verbindung aus Mycel und Sklerotien, die durch Anzucht von Pilzarten der Gattungen Peilocybe und Stropharia in Oberflächenkulturen unter Einsatz von Malzextrakt bei Anwesenheit verschiedener Mineralsalze angezüchtet worden sind. Der Nachteil des Verfahrens ist, daß bei konstanten Temperaturen fermentiert werden muß, was zusätzliche apparative Aufwendungen erfordert. Schließlich ist ein steriles Arbeiten nötig, da das verwendete Substrat auch ein geeigneter Nährboden für eine Vielzahl von schnellerwüchsigem Bakterien und niederen Pilzen darstellt.

Diesen Nachteil hat auch ein bereits vorgeschlagenes Verfahren, das bei Verwendung synthetischer Nährmedien eine höhere Akkumulation der Indolalkaloide bei variablen Fermentationstemperaturen in den Mycelien als beim ersteren Verfahren bewirkt. Die Ausgangsstoffe bei beiden Verfahren sind teuer; eine Abtrennung der Mycelien vor der Extraktion der Biomassen ist als zusätzlicher Verfahrensschritt jedesmal nötig.

#### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung von Indolen aus Pilzmycelien, bei welchem unter Anwendung von billigen, natürlichen Rohstoffen eine Kultivierung unter unsterilen Bedingungen und bei variablen Temperaturen bewirkt wird; wobei der zusätzliche Verfahrensschritt der vorherigen Abtrennung der Mycelien entfällt und weitgehend konstante Ausbeuten an Psilocybin trotz unterschiedlicher Substrate erreicht werden sollen.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Substrat als Nährmedium für die Kultur der Mycelien Psilocybin bildender Arten zu entwickeln und einzusetzen. Erfindungsgemäß erfolgt die Kultivierung der Pilzmycelien auf natürlichen Abfallstoffen im Sinne einer Festphasenfermentation. Die Substrate sind schimmelfest und werden von Bakterien in den üblichen Kultivierungszeiten nicht meßbar abgebaut. Dadurch ist eine unsterile Fermentation möglich.

Als Substrate werden verwendet

- abgefallene Ätchen und Laub von Quercus, Titia, Salix, Acer, Aesculus, Populus, Betula, Carpinus, Alnus, Fagus
- abgefallenen Nadeln von Picea und Pinus
- am Standort abgestorbene Pflanzen von Urtica im beliebigen Gemisch oder als Monosubstrat mit oder ohne Zusatz von Harnstoff in Mengen von 0,01 bis 0,3 %.

Als kultivierte Pilzart wird *Psilocybe cyanescens* Wakefield emend Krieglesteiner verwendet. Durch den Einsatz dieser Pilzart ist eine Kultivierung bei 2 bis 32 °C ohne jegliche Temperaturregelung möglich.

Man verfährt so, daß die erwähnten organischen Abfallstoffe je nach Feuchtigkeitsgehalt mit 10 bis 100 % Wasser, bezogen auf das feste Substrat, versetzt werden. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wird bei den obigen Temperaturen mit einer Suspension von Mycelflocken der *Psilocybe cyanescens* aus einer nach bekannten Verfahren gewonnenen Vorkultur beimpft und die Kultur unsteril 30 bis 50 Tage sich selbst überlassen. Danach werden die resultierenden Mycelien zusammen mit den durchwachsenen Resten des Nährmediums bei 20 bis 50 °C unter Vakuum oder Normaldruck getrocknet, zermahlen und nach bekannten Verfahren extrahiert und der Wirkstoff mittels bekannter chromatographischer Methoden abgetrennt. Bei den Substraten von aus Pflanzenresten von Picea und Pinus bewirkt der Harnstoff eine erhöhte Einwachsgeschwindigkeit der Mycelien in das Substrat. Durch diese Arbeitsweise entfällt die Abtrennung der Mycelien aus Nährlösungen, eine Einstellung der Temperaturen und die Notwendigkeit der sterilen Arbeitsweise im Sinne einer Einfachtechnologie bei Anwendung natürlicher Abfallstoffe und

Erzielung weitgehend konstanter Ausbeuten an Wirkstoff.  
Durch die Bildung des Psilocybins als einziges Indol vereinfacht sich die Auftrennung bedeutend.  
Durch die nachfolgenden Beispiele soll die Erfindung näher erläutert werden.

#### Beispiel 1

Man legt von Basidiosporen der *Psilocybe cyanescens* eine Primärkultur auf 6 %igem, festem Malzagar an, wobei dann auf ein autoklaviertes Gemisch aus 100 g Reiskörnern mit 200 ml Wasser steril überimpft wurde. Nach 30 Tagen Kultur wurde dieses Impfmateriale nach der Zugabe von 100 ml Wasser mit dem Spatel zerfasert. 10 ml dieser Mycelauspension dienten zur Beimpfung eines vorher autoklavierten Gemisches aus 100 g trockenen Abfallnadeln von *Picea*, 100 ml Wasser und 0,3 g Harnstoff. Nach 30 Tagen unsteriler Fermentation bei 15 bis 25 °C wurde bei 40 °C getrocknet und die Masse zermahlen.

Gehalt der Trockensubstanz an Psilocybin: 0,28 %

#### Beispiel 2

Mit 10 ml einer analogen Impfkultur eines 2. Stammes der gleichen Pilzart wie bei Beispiel 1 wurden 60 g einer natürlichen Mischung aus Falllaub, grob zerkleinerten, abgefallenen Ästchen von Tille und 100 ml Wasser versetzt und autoklaviert. Nach 40 Tagen unsteriler Kultivierung bei 4 bis 6 °C wurde die Mischung bei 50 °C im Vakuum getrocknet, dann zermahlen, mit Methanol erschöpfend extrahiert und an einer Cellulosesäule mit wassergesättigtem n-Butanol aufgetrennt, wobei mit Ehrlich-Reagenz bei der DC die einzelnen Fraktionen auf Indolderivate geprüft wurden.

Ausbeute an Psilocybin, bezogen auf das Trockenprodukt: 0,35 %