



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 225 272

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 11 03 82
(21) PV 1645-82

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 15 09 82
(45) Vydáno 01 07 85

(75)

Autor vynálezu MALINKA ZDENĚK RNDr., OPAVA
HARAZIM PAVEL ing., KOBEŘICE
SPÁČIL JIŘÍ PhMr., OPAVA

(54) Nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL, CCM F-721

1

Vynález se týká nového průmyslového kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL., vyznačující se při polní kultivaci na žitě tvorbou námele s vysokým obsahem alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu.

Alfa-ergokryptin a beta-ergokryptin jsou významnými léčivými substancemi a výchozími látkami pro přípravu polosyntetických derivátů s rozšířeným spektrem léčivých účinků. Strukturu alfa-ergokryptinu popsali poprvé Stoll a Hofmann (Helv. Chim. Acta 26, 1570, 1943), strukturu beta-ergokryptinu popsal poprvé Schlientz se sp. (Experientia 23, 991, 1967).

V současné době jsou v terapii používány lékové formy námelových alkaloidů s přesně definovaným poměrem alfa-ergokryptinu ku beta-ergokryptinu 2 : 1. Pro výrobu alfa a beta-ergokryptinu v průmyslovém měřítku jsou dosud využívány kmeny *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. nesoucí označení PLO 2 (Strnadová K., Kybal J., Folia Microbiol. 19, 272 - 280, 1974) a CCM F-508 (Strnadová K., Kybal J., autorské osvědčení č. 176 803, 1976). Tyto kmeny produkují při kultivaci na žitě v narostlých sklerociích především směs ergokorninu s alfa a beta-ergokryptinem v poměru přibližně 1,2 : 1 a řadu doprovodných alkaloidů v menším množství (ergometrin, laktamové deriváty ergotoxinových alkaloidů, ergotamin). Poměr alfa-ergokryptinu ku beta-ergokryptinu je u těchto kmenů

4 : 1 až 7 : 1. Průměrný hmotnostní obsah alkaloidů ve sklerociích těchto kmenů je 0,424 % sušiny, z toho ergokornin a ergokryptiny tvoří 70 až 80 % a doprovodné alkaloidy 20 až 30 % celkové sumy alkaloidů.

V terapeutické praxi široce používané lékové formy, obsahující ergokornin, alfa a beta-ergokryptin a ergokristin obsahují přesně definovaný poměr složek ergokornin ku ergokryptinu ku ergokristin 1 : 1 : 1 a poměr alfa-ergokryptin ku beta-ergokryptin 2 : 1. Ergokornin a ergokryptiny jsou získávány ze sklerocií kmenů FLO 2 a CCM F-508, ergokristin je získáván ze sklerocií jiného kmene námele označeného MY. Za současného stavu je pro výrobu výše zmíněných lékových forem limitujícím faktorem nízký obsah beta-ergokryptinu ve sklerociích kmenů FLO 2 a CCM F-508. Při výrobě těchto lékových forem nemohou být ergokornin a alfa-ergokryptin plně využity a zůstávají jako komerčně nevyužitelný odpad. Separační a izolační operace, které oddělují ze směsi alkaloidů alfa-ergokryptin a ergokornin se snahou zachovat původní kvantum beta-ergokryptinu jsou ztrátové a značně prodražují tuto část výroby. Je vyvinut způsob fermentační přípravy námelových alkaloidů s řízeným poměrem ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu (Kybal J., Malinka Z., Harazim P., Stuchlík J., Spáčil J., Svoboda E., autorské osvědčení č. 202 613, 1980), který je však dosud devizově náročný a vhodný zejména pro operativní pokrytí poptávky po některém z uvedených alkaloidů.

Uvedené nedostatky výše zmíněných kmenů námele a fermentačního způsobu výroby beta-ergokryptinu odstraňuje do značné míry vynález, jímž je nový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL., uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J.E. Purkyně, Brno, Tr. Obránců míru 10 pod označením CCM F-721. Uvedený kmen je předmětem tohoto vynálezu.

Hlavní výhodou nového kmene je při kultivaci na žitě vysoká produkce sumy alkaloidů ve sklerociích, která dosahuje průměru 0,56 % sušiny biomasy, snížená tvorba doprovodných alkaloidů, které tvoří průměrně 8 % sumy alkaloidů a vysoká tvorba žádoucích alkaloidů alfa a beta-ergokryptinu (průměrně 92 % sumy alkaloidů) a zejména vysoká tvorba dosud nedostatkového beta-ergokryptinu, který je tvořen ve směsi s alfa-ergokryptinem v poměru průměrně 1 : 1,15. Tento poměr alfa a beta-ergokryptinu umožňuje zhodnotit i dosud nevyužitelné zásoby přebytečného alfa-ergokryptinu a ergokorninu.

Popis vlastností nového kmene:

Při saprofytickém růstu na sladidinové půdě ztužené agarem tvoří houba kolonie z typického sfaceliového vzdušného mycelia. Mycelium má hyfy bohatě větvené a postranní hyfy jsou ukončené konidiogenními buňkami. Bohatě tvořené konidie mají průměrné rozměry 7 x 4 mikrometru. Mycelium je téměř bílé, starší kultury jsou slabě růžovofialově pigmentované. Při parazitickém růstu na žitě tvoří houba středně

tmavá, hnědofialově pigmentovaná sklerocia o váze v rozmezí 0,09 až 0,56 g.

Ve sklerociích, vznikajících při parazitickém růstu na žitě jsou biosynteticky tvořeny námelové alkaloidy v množství 0,36 až 0,73 % sušiny biomasy při průměrném obsahu 0,56 %. 90 až 95 % sumy alkaloidů je tvořeno směsí alfa a beta-ergokryptinu při poměru alfa-ergokryptinu ku beta-ergokryptinu 0,9 : 1 až 1,8 : 1 s průměrem 1,15 : 1. Doprovodné alkaloidy jsou ergokornin, ergokryptamy, ergometrin a ergosin tvořící dehromady 5 až 10 % sumy alkaloidů.

Nový průmyslový produkční kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. byl vyšlechtěn z původního produkčního kmene PLO 2. Sklerocium tohoto kmene bylo převedeno do saprofytické kultury, byla provedena monokonidiová izolace, od jednotlivých monokonidiových izolátů připravena suspense konidií, která byla ozařována UV zářením o výkonu $15 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ po dobu 240 sekund. Živé konidie byly opětne monosporicky izolovány a suspense konidií opětne ozařována UV zářením o stejném výkonu po uvedenou dobu. Celý postup ozařování kombinovaný monokonidiovou izolací byl opakován 5 krát. Po ukončeném ozařování bylo získáno 1 117 monokonidiových izolátů, které byly jednotlivě testovány na tvorbu sklerocií na žitě. Získaná sklerocia byla zanalyzována pro zjištění tvorby námelových alkaloidů. Z vybraných sklerocií, u nichž se projevila průkazně zvýšená tvorba sumy alkaloidů, zvýšená tvorba beta-ergokryptinu provázená sníženou tvorbou ergokorninu nebo alfa-ergokryptinu byly připraveny saprofytické kultury, dále monokonidiové izoláty a ty opět ozařovány UV zářením. Postup ozařování kombinovaný s monokonidiovou izolací byl opakován 3 krát. Po ukončeném ozařování bylo získáno 453 monokonidiových izolátů, které byly jednotlivě testovány na růst na žitě. Ze získaných sklerocií byl vybrán kmen, který se vyznačuje snížením tvorby ergokorninu a doprovodných alkaloidů na minimum, zvýšenou tvorbou beta-ergokryptinu, zvýšenou tvorbou celkové sumy alkaloidů ve sklerociích a uspokojivými výnosy při produkčním pěstování na žitě. Genetická stabilita uvedených vlastností byla potvrzena opakovaným pěstováním na žitě ve dvou vegetačních obdobích. Tento kmen je předmětem vynálezu.

Způsob kultivace nového kmene pro získání výchozí suroviny k izolaci námelových alkaloidů je dále doložen v příkladech použití, aniž by se jím způsob kultivace, použití a vlastnosti nového kmene jakkoli omezovaly.

Příklad použití:

Ze saprofytických kultur kmene na ztužené sladinové živné půdě se připraví suspense konidií, kterou se naočkuje 6 až 8 kg předem vysterilizovaných vlhkých obilíků s přidávkou terciárního citronanu amonného, které jsou umístěny ve vhodných lahvích nebo obalech opatřených zátkou z buničité vaty. Naočkované žitné obilky se inkubují 18 až 28 dní při teplotě 22 až 28 °C. Během této doby prorostou žitné obilky sfaceliovým myceliem, které vytváří značné množství konidií. Takto připravená

očkovací látka se uchovává při teplotě 2 až 10 °C. Konidie z této očkovací látky se bezprostředně před infekcí žita suspendují ve vodě. Příslušně naředěnou suspensí konidií se pomocí očkovacího stroje naočkují klasy žita ve fázi metání na ploše 1 ha. Po 35 až 60 denním růstu na žitě se provede postupný opakovaný sběr narostlých sklerocií námele. Z 1 ha žita bylo získáno 207 kg suchých sklerocií námele, obsahujících v průměru 0,56 % sumy alkaloidů, ze které bylo 92 % tvořeno směsí alfa a beta-ergokryptinu s poměrem alfa-ergokryptin ku beta-ergokryptin 1,15 : 1.

Získaná droga byla vyextrahovaná, alfa-ergokryptin a beta-ergokryptin byly vyizolovány a použity pro výrobu ergotoxinu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL., CCM F-721, vytvářející v polní kultuře na žitě sklerocia s obsahem sumy alkaloidů nejméně 0,36 % vztaženo na sušinu biomasy, s obsahem alfa a beta-ergokryptinu minimálně 90 % sumy alkaloidů a se vzájemným poměrem alfa-ergokryptinu ku beta-ergokryptinu 0,9 : 1 až 1,8 : 1.