



ESPAÑA

(11) ES	(12) 447074	(13) AI
(14)	FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

(10) PRIORIDADES (11) NUMERO 4898/75	(12) FECHA 18 de Abril de 1.975	(13) PAIS Suiza
---	---	---------------------------

(14) FECHA DE PUBLICIDAD	(15) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	(16) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	---	--

(17) TITULO DE LA INVENCION
**PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ALCALOIDES DEL GRUPO DE LA ERGO
TOXINA POR FERMENTACION COMBINADA.**

(18) SOLICITANTE (19)
SANDOZ A.G., entidad suiza

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Basilea, Suiza.

(20) INVENTOR (21)
**Dr. Hans Kobel
Jean-Jacques Sanglier
Botanist**

(22) TITULAR (23)

(24) REPRESENTANTE
D. JAIME GOMEZ-ACEBO Y MODET

PATENTE DE INVENCION

=====
Case 100-4332

3700/RA/HP.

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ALCALOIDES DEL
GRUPO DE LA ERGOTOXINA POR FERMENTACION COMBINADA.

=====

Solicitante: SANDOZ A.G., entidad suiza, residente en Basilea,
Suiza.

=====

5

La presente invención se relaciona con un nuevo procedimiento para la producción fermentativa de una asociación natural de los alcaloides ergocornina, ergocriptina y ergocristina en partes iguales, incluyendo sus isómeros correspondientes ergocorninina, ergocriptinina y ergocristinina, mediante cultivo saprofitico de hongos del cornezuelo de centeno de la

especie *Claviceps purpurea* en una combinación de fermentación uniforme, y subsiguiente aislamiento de los alcaloides resultantes.

5 Se conocen ya procedimientos para la producción de ergocornina y ergocriptina mediante fermentación, así como procedimientos para la producción de ergocristina mediante fermentación. También es sabido que puede usarse una combinación en partes iguales de ergocornina, ergocriptina y ergocristina, incluyendo sus isómeros correspondientes, como producto inicial para la elaboración de
10 preparaciones farmacéuticas especiales.

Con el fin de obtener tal asociación de alcaloides se ha usado hasta ahora un producto que se obtenía mediante la inoculación de cepas adecuadas de
15 *Claviceps purpurea* en hojas de centeno en campos cultivados. La composición de este producto se equilibra en forma tal que puedan obtenerse partes iguales de los alcaloides ergocristina, ergocornina y ergocriptina, incluyendo sus isómeros, mediante la extracción subsiguiente. De acuerdo con otro procedimiento conocido, se
20 cultiva mediante fermentación una cepa productora de ergocristina y, separadamente, se cultiva del mismo modo una cepa productora de ergocornina y ergocriptina. Los licores de cultivo así obtenidos se combinan, y el aislamiento se efectúa mediante métodos conocidos.
25

Aunque son evidentes las ventajas de un proce-

dimiento para la producción de una asociación natural de los alcaloides antes citados en una fase de fermentación uniforme, tal procedimiento nunca ha sido puesto en uso debido a las razones siguientes:

5 La fermentación combinada, es decir el cultivo simultáneo de varias cepas, usando el mismo medio nutritivo, siempre ha conducido a grandes dificultades, y hasta ahora no se ha conocido un procedimiento de esta naturaleza que realmente sea de interés práctico. En
10 efecto, la experiencia adquirida en el campo de la producción microbiológica industrial de metabolitos secundarios, ha demostrado que, aparte de las condiciones físicas bajo las cuales se efectúa el cultivo, es de importancia decisiva la composición del medio nutritivo.
15 Es preciso encontrar un medio nutritivo que sea adecuado para cada cepa y, en general, no se ha encontrado un medio que permita la producción óptima de metabolitos con dos cepas diferentes.

20 Hemos descubierto ahora sorprendentemente un procedimiento para la producción de una asociación natural de partes iguales de los alcaloides del cornezuelo de centeno antes citados mediante fermentación combinada con un alto grado de pureza.

25 Por consiguiente, la invención se relaciona particularmente con un procedimiento para la producción de una asociación en partes iguales de ergocornina, ergocriptina y ergocristina, incluyendo los isómeros de los

mismos, mediante cultivo saprofitico de hongos del cornezuelo de centeno del tipo *Claviceps purpurea*, procedimiento según el cual la fermentación de una cepa productora de ergocornina, ergocriptina y sus isómeros se combina con la de una cepa productora de ergocristina y su isómero, en una combinación de fermentación uniforme.

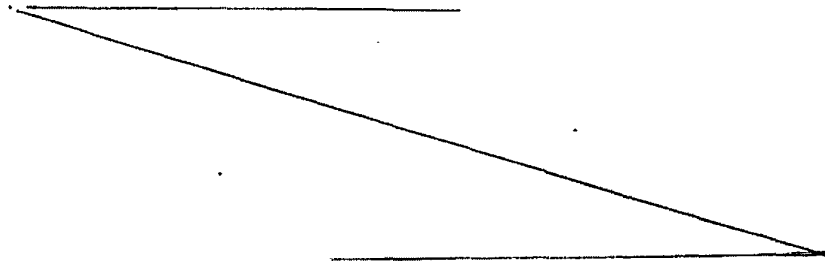
En la producción fermentativa de alcaloides del cornezuelo de centeno es ventajoso, como lo indica la experiencia práctica, preparar un medio de cultivo previo antes de usar el medio de producción. El medio escogido para esta primera etapa deberá permitir una germinación rápida de los esporos inoculados y a continuación un buen desarrollo del micelio. Los cultivos obtenidos en el medio de cultivo previo se usan para la subsiguiente inoculación del medio de producción, el que preferentemente tendrá una composición tal que se obtenga un peso elevado de micelio en corto tiempo.

Esto puede lograrse usando como medio de cultivo previo adecuado un medio nutritivo conteniendo sacarosa como fuente de carbono y sales de amonio como fuente de nitrógeno. Además, también deberán hallarse presentes las sales minerales y los oligoelementos hierro y cinc. De importancia especial es la adición de una

mezcla de aminoácidos y vitaminas. En lugar de una
mezcla producida sintéticamente, es ventajoso usar una
preparación de semilla de algodón, desengrasada, tal co-
mo puede obtenerse comercialmente bajo el nombre Proflo.
5 Sorprendentemente, el medio nutritivo con la composición
antes indicada es adecuado para el cultivo tanto de
una cepa de ergocristina como de una cepa de ergocornina/
ergocriptina. Un medio nutritivo conteniendo sacarosa
como fuente de carbono y sales de amonio como fuente de
10 nitrógeno se usa como medio de producción adecuado. Tam-
bién deberán hallarse presentes las sales minerales y
los oligoelementos hierro y cinc. Sin embargo, deberá
evitarse la presencia de compuestos que contengan amino-
15 ácidos complejos o agentes de desarrollo en grandes can-
tidades, por ej. extracto de levadura o peptonas hidro-
lizadas. Sorprendentemente, el medio nutritivo con la
composición antes indicada, es adecuado para el cultivo
tanto de una cepa de ergocristina como de una cepa de
20 ergocornina/ergocriptina. En el caso de la cepa de
ergocornina/ergocriptina, ambos alcaloides así como los
isómeros correspondientes se obtienen en una proporción
de 1 : 1.

En vista de que el desarrollo de la cepa productora de ergocristina es más rápido y más fuerte en el cultivo de inoculación, el cultivo previo y el cultivo principal, esta cepa predomina en un cultivo combinado con inoculación igualmente fuerte, de tal modo que se forma sólo ergocristina y no se forma ninguna ergocornina/ergocriptina. Sin embargo, con el fin de obtener una proporción igual de alcaloides es necesario que se forme una cantidad dos veces mayor del micelio de la cepa productora de ergocornina/ergocriptina que del micelio de la cepa productora de ergocristina al final del período de cultivo, con un contenido igual de alcaloides totales. Esto puede lograrse mediante un desplazamiento de la cantidad de inóculo a favor de la cepa productora de ergocornina/ergocriptina.

Por ejemplo, la cepa productora de ergocristina o de ergocornina y ergocriptina puede cultivarse como cultivo combinado sobre agar inclinado, con lo cual se inocula el cultivo inclinado con un inóculo



conteniendo 1.10^8 a 5.10^8 esporos por cc, la proporción del número de esporos de ambas cepas, que deberá determinarse exactamente en ensayos previos, siendo de 1 : 2 a 1 : 20.

5 Un segundo método consiste en usar una combinación de suspensiones de esporos de ambas cepas para el cultivo previo. Esto se efectúa inoculando el medio de cultivo previo con 1.10^8 a 5.10^9 esporos por litro, ----- la proporción del número de esporos de ambas cepas, que deberá determinarse exactamente en ensayos previos, siendo de 1 : 20 a 1 : 200.

15 Una tercera posibilidad es el cultivo separado de los cultivos previos de ambas cepas, las que luego se usan, a una proporción por volumen exacta entre 1 : 3 y 1 : 20, para la inoculación del cultivo principal. Una vez finalizado el tiempo de cultivo, se extraen los alcaloides del micelio con disolventes orgánicos.

20 Se prefiere usar la cepa denominada Exy 20 como cepa de producción productora de ergocornina y ergocriptina. La cepa Exy 20 ha sido depositada en la colección de hongos de la firma Sandoz AG en Basilea. La cepa Exy 20 se obtiene aislando una cepa de hongo original de un esclerocio hallado sobre la hierba Festuca
25 pratensis en Martigny en el valle del Ródano, que contiene ergocornina y ergocriptina, y sometiendo esta cepa

a diversas etapas de tratamiento mutagénico mediante el uso de luz ultravioleta y sustancias químicas alquiladoras.

5

La cepa Exy 20 puede caracterizarse como sigue:

10

Cuando se inocula un pedacito de micelio de la cepa Exy 20 en el centro de una placa de agar con un medio conteniendo 70 g de extracto de malta, 30 g de hojuelas de patatas, 10 g de agar y agua destilada hasta completar un litro, a un pH de 5,2, entonces el micelio se extiende rápidamente sobre la superficie total. Después de 7 días a 24°C, se obtiene una colonia con un diámetro de aprox. 3 cm, después de 14 días una colonia con un diámetro de aprox. 4,5 cm y después de 20 días una colonia con un diámetro de aprox. 8,5 cm.

15

20

El centro de la colonia es plegado, la zona marginal muestra ramales actiniformes. El micelio descansa sobre el agar como piel acuosa, incolora. Sólo raramente se forma una pequeña cantidad de micelio aéreo en el centro. Los conidios se forman en abundancia en tal cultivo. Un micelio de 20 días contiene aprox. $2 \cdot 10^8$ conidios por cm^2 . El tamaño de los mismos varía considerablemente (4 - 13 x 2 - 4 μ ; generalmente, sin embargo, 6 - 9 x 3 μ). El micelio no contiene alcaloides.

25

Se prefiere usar la cepa denominada Ech k 420 como cepa de producción productora de ergocristina. La cepa Ech k 420 ha sido depositada en la colección de hongos de la firma Sandoz AG en Basilea. Esta cepa se obtiene aislando una cepa de hongo original de un esclerocio hallado sobre centeno en Black River, Wisconsin, EE.UU.A., que contiene ergocristina, y sometiendo esta cepa a varias etapas de tratamiento mutagénico mediante el uso de luz ultravioleta y sustancias químicas alquiladoras.

5

10

La cepa Ech k 420 puede caracterizarse como sigue:

Cuando se inocula un pedacito de micelio de la cepa Ech k 420 con un medio conteniendo 70 g de extracto de malta, 30 g de hojuelas de patatas, 10 g de agar y agua destilada hasta completar un litro, a un pH de 5,2, entonces se obtiene una colonia con un diámetro de aprox. 4 cm después de 7 días y una colonia con un diámetro de aprox. 5 cm después de 14 días a una temperatura de 24°C.

15

20

El micelio es planamente arqueado y está cubierto de una malla de hifas, blanca, con aspecto de algodón en rama, que se eleva hacia el aire. En el centro se forma una protuberancia con forma de cráter, la cual tiene un diámetro de aprox. 1 cm. De esta protuberancia emanan pliegues radiales. El micelio situado sobre el agar es de color violeta. Se forman zonas con-

25

EJEMPLO 1:

Los esporos de un cultivo inclinado de agar de la cepa Ech k 420 y de un cultivo inclinado de agar de la cepa Exy 20 se suspenden en agua estéril, y esta
5 suspensión se mezcla de tal modo que la mezcla contenga 1,05 · 10⁶ esporos de la cepa Ech k 420 y 1 · 10⁸ esporos de la cepa Exy 20.

10 10 cc de esta suspensión se usan para la inoculación de 500 cc de un medio que tiene la composición siguiente:

sacarosa	100	g
oxalato de amonio	3	g
Proflo	10	g
15 PO ₄ H ₂ K	0,25	g
SO ₄ Mg	0,25	g
ClK	0,12	g
SO ₄ Fe · 7H ₂ O	16,6	mg
SO ₄ Zn · 7H ₂ O	6,8	mg

20 agua destilada hasta completar un litro

pH 6,2

(en adelante denominado medio 1)

en un matraz Erlenmeyer de 2 litros. El cultivo se incuba sobre una máquina de sacudimiento, rotatoria, con 180
25 revoluciones por minuto, a 24° durante 5 días. El cultivo previo obtenido en esta forma se usa para la inoculación

del medio de producción.

Matraces Erlenmeyer de 500 cc, cada uno con-
teniendo 50 cc de un medio esterilizado que tiene la com-
posición siguiente:

5	sacarosa	240	g
	oxalato de amonio	9,6	g
	urea	1,7	g
	PO_4H_2K	0,625	g
10	SO_4Mg	0,625	g
	ClK	0,31	g
	$SO_4Fe \cdot 7H_2O$	25	mg
	$SO_4Zn \cdot 7H_2O$	10	mg
	agua destilada hasta completar un litro		
15	pH 6,2		

(en adelante denominado medio 2)

se inoculan con cantidades de 10 cc del cultivo previo
anteriormente obtenido, y se incuban a 24° sobre una
máquina de sacudimiento, rotatoria, con 180 revoluciones
por minuto durante 14 días.

20

Un litro de este cultivo contiene 850 mg
de alcaloides de egotoxina, encontrándose presentes
ergocristina + ergocristinina, ergocornina + ergocorninina
y ergocriptina + ergocriptinina en partes iguales (con
una variación de \pm 5 %). Estos alcaloides pueden ais-

25

larse de acuerdo con métodos conocidos, mediante extracción con disolventes orgánicos, de la masa de cultivo íntegra o del micelio separado mediante filtración o centrifugación, el cual está enriquecido con la porción principal de los alcaloides.

5

Los cultivos inclinados de agar de las cepas de producción Ech k 420 y Exy 20, usados como material inicial, se producen como sigue:

10

1. Cultivo inclinado de agar de la cepa de producción Ech k 420

a) Producción de la cepa de producción de Ech k 420

Los conidios de un cultivo inclinado de agar [12 cc de un medio que tiene la composición siguiente:

15

extracto de malta	70	g
hojuelas de patatas	30	g
agar	10	g
agua destilada hasta completar un litro		
pH 5,2		

20

(en adelante denominado medio 3)]

de una cepa aislada de un esclerocio conteniendo ergocristina y hallado sobre centeno en Wisconsin, EE.UU.A., se suspenden en agua estéril para producir una concentración de aprox. 10000 esporos/cc. 1 cc de una solución de etilenimina al 10 % se añade a 100 cc de esta sus-

25

pensión. Después de un período de acción de 110 minutos (correspondiendo a un grado de destrucción de aprox. 99 %), los conidios se separan de la solución con un filtro de membrana, se lavan sobre el filtro y nuevamente se suspenden en 100 cc de agua estéril. Cantidades de 0,2 cc de esta suspensión se usan para la inoculación uniforme de placas de agar conteniendo un medio que tiene la composición siguiente:

10	sacarosa	150	g
	oxalato de amonio	4	g
	PO_4H_2K	0,25	g
	SO_4Mg	0,25	g
	ClK	0,12	g
15	$(NO_3)_2Ca$	1	g
	aneurina	0,1	g
	cisteína	10	mg
	$SO_4Fe \cdot 7H_2O$	8,3	mg
	$SO_4Zn \cdot 7H_2O$	3,4	mg
20	agar	15	g
	agua destilada hasta completar un litro (en adelante denominado medio 4)		

25 Las placas se incuban a continuación a 24° durante 3 semanas, las colonias individuales se aislan, se propagan sobre un agar inclinado conteniendo el medio 3, y se exa-

mina su formación de alcaloides en un cultivo sacudido (medios 1 y 2).

5 La mejor de 8000 cepas examinadas muestra un aumento de 230 % en la formación de alcaloides al compararse con el material inicial.

10 Esta mejor cepa se usa para la producción de 500 cc de una suspensión de conidios conteniendo aprox. 2000 conidios/cc, y conteniendo 450 cc de solución reguladora de Mc-Ilvaine con un pH de 4,5, aparte de 5 cc de agua estéril. A esta suspensión se le añade una cantidad igual de una solución de nitrito de sodio con una concentración de 2,5 g de nitrito de sodio por litro de solución y que ha sido esterilizada a 120° durante 20 minutos. Todo el material se deja reposar a 15 temperatura ambiente durante 50 minutos (correspondiendo a un grado de destrucción de aprox. 99 %). Los conidios se separan luego de la solución con un filtro de membrana y el procedimiento se continúa en la forma descrita con 20 anterioridad. La mejor de 10000 cepas examinadas muestra un aumento de 100% en la formación de alcaloides al compararse con la cepa usada para el tratamiento con nitrito.

25 La mejor cepa obtenida en la etapa previa se usa para la producción de 400 cc de una suspensión de conidios conteniendo aprox. 1000 conidios/cc en una

mezcla de solución reguladora de trimaleato/sosa cáustica con un pH de 6, y a esta suspensión se le añaden 40 cc de una solución acuosa conteniendo un total de 10 mg de N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina. Después de dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos (correspondiendo a un grado de destrucción de aprox. 97 %), los conidios se separan con un filtro de membrana, y el procedimiento se continúa en la forma descrita en la primera etapa de tratamiento. La mejor de 10000 cepas examinadas muestra un aumento de 125 % en la formación de alcaloides al compararse con la cepa usada en esta etapa.

La mejor cepa obtenida en la etapa anterior se usa para la producción de una suspensión de conidios en agua estéril conteniendo aprox. 100 conidios/cc. 1000 cápsulas de Petri, conteniendo cada una 17,5 cc del medio 3, se inoculan uniformemente con cantidades de 1 cc de esta suspensión. Las placas inoculadas se irradian con luz ultravioleta con un largo de onda de 254 m μ durante 40 segundos, de modo que se destruya el 90 % de los esporos. Después de 3 semanas, se examina la formación de alcaloides de 10000 cepas de acuerdo con el método antes descrito.

La mejor cepa, en adelante denominada cepa Ech k 420, muestra un aumento de 95 % en la formación de alcaloides al compararse con la cepa de la etapa ante-

rior.

b) Cultivos de inoculación de la cepa de producción
Ech k 420

5 Los conidios obtenidos de las colonias en
las cápsulas de Petri resultantes de los conidios super-
vivientes después del tratamiento mutagénico, se enjuagan
en agua estéril y se usan para la inoculación de tubos
10 inclinados de agar. Después de 18 días, uno de estos cul-
tivos inclinados de agar (12 cc del medio 3 en un tubo de
ensayo con un diámetro de 18 mm y un largo de 20 cm, cunei-
forme) contiene aprox. $1 - 2 \cdot 10^9$ conidios. Pueden obte-
nerse grandes cantidades de cultivos inclinados de agar
15 de la cepa Ech k 420 mediante otra inoculación; estos
cultivos inclinados de agar pueden almacenarse durante
largo tiempo mediante refrigeración a baja temperatura o
liofilización.

2. Cultivo inclinado de agar de la cepa de producción
Exy 20

20 a) Producción de la cepa de producción Exy 20

25 Los conidios de un cultivo inclinado de
agar (conteniendo el medio 3) de una cepa aislada de
un esclerocio conteniendo ergocornina y ergocriptina,
hallado sobre la hierba Festuca en el valle del Ródano,
se suspenden en agua estéril, y se diluyen hasta una

concentración de aprox. 100 conidios por cc. Placas de agar conteniendo el medio 4 se inoculan uniformemente con cantidades de 1 cc de esta suspensión. Las placas se irradian a continuación con luz ultravioleta hasta que
5
hayan sido destruídos 90 - 95 % de los conidios. Las placas se incuban luego a 24° durante 3 semanas, las colonias individuales se aíslan, se propagan sobre agar inclinado (medio 3) y se examina su formación de alcaloides en un cultivo sacudido (medios 1 y 2). La mejor de
10
3000 cepas muestra un aumento de 120 % en la formación de alcaloides al compararse con la cepa inicial.

Esta cepa mejor se usa para la producción de la suspensión de conidios con aprox. 1000 esporos/cc.
15
10 cc de una solución al 10 % de etilenimina se añaden a 1000 cc de esta suspensión. Después de un período de acción de 100 minutos (correspondiendo a un grado de destrucción de aprox. 99 %), los conidios se separan de la solución con filtro de membrana, se lavan sobre el filtro,
20
y nuevamente se suspenden en 1000 cc de agua estéril. El procedimiento se continúa con esta suspensión en forma análoga a la anteriormente descrita. La mejor de 9000 cepas muestra un aumento de 100 % en la formación de alcaloides al compararse con la cepa obtenida en la etapa de
25
tratamiento anterior.

En una tercera etapa de tratamiento, los

conidios de la mejor cepa se tratan en la forma anteriormente descrita con una solución 10^{-2} molar de mostaza nitrogenada [metilbis(chloroetil)amina]. El procedimiento se continúa en la forma anteriormente indicada.

5 La mejor de 12000 cepas de esta serie, en adelante denominada cepa Exy 20, muestra un aumento de 75 % en la formación de alcaloides al compararse con la cepa de la serie anterior.

10 b) Cultivos de inoculación de la cepa de producción Exy 20

Los conidios obtenidos de las colonias resultantes de los conidios supervivientes después del tratamiento mutagénico, se enjuagan en agua estéril y se
15 usan para la inoculación de tubos inclinados de agar. Después de 18 días, uno de estos cultivos inclinados de agar (12 cc del medio 3 en un tubo de ensayo con un diámetro de 18 mm y un largo de 20 cm, cuneiforme) contiene aprox. $2 - 3 \cdot 10^9$ conidios. Pueden obtenerse
20 grandes cantidades de cultivos inclinados de agar de la cepa Exy 20 mediante otra inoculación; estos cultivos inclinados de agar pueden almacenarse durante largo tiempo mediante refrigeración a baja temperatura
25 o liofilización.

EJEMPLO 2:

De dos matraces de Erlenmeyer de 2 litros, cada uno conteniendo 500 cc del medio 1, se inocula uno con 1.10^8 esporos de la cepa Ech k 420 y el otro con 1.10^8 esporos de la cepa Exy 20, y el cultivo se incuba a 24° durante 5 días sobre una máquina sacudidora con 180 revoluciones por minuto.

Los cultivos previos resultantes se mezclan a una proporción de 4 : 16, es decir 40 cc del cultivo previo Ech k 420 se combinan y mezclan perfectamente con 160 cc del cultivo previo Exy 20.

Este cultivo combinado se usa para la inoculación del medio de producción 2, añadiendo 10 cc del cultivo mixto a 50 cc del medio 2 estéril. El procedimiento se continúa luego en forma análoga a la descrita en el Ejemplo 1.

Después de 14 días, un litro del cultivo contiene 950 mg de alcaloides de ergotoxina, encontrándose presentes partes iguales de ergocristina + ergocristinina, ergocornina + ergocorninina y ergocriptina + ergocriptinina (con una variación de $\pm 5\%$).

Estos alcaloides pueden extraerse de la masa de cultivo íntegra con disolventes orgánicos de acuerdo con métodos conocidos, o antes de la extracción se separa el micelio, enriquecido con la porción princi-

pal de los alcaloides, mediante filtración o centrifugación.

EJEMPLO 3:

5 Se producen suspensiones de conidios de
cultivos inclinados de agar de las cepas Ech k 420 y
Exy 20 en agua estéril, y estas suspensiones se combinan
de tal modo que 1 cc de la combinación contenga $9 \cdot 10^7$ conidios
de la cepa Ech k 420 y $2,7 \cdot 10^8$ conidios de la cepa Exy 20.
10 Esta mezcla de esporos se usa para la inoculación de cul-
tivos sobre agar inclinado con el medio 3 en tubos de
ensayo, los que a su vez forman conidios en abundancia.
Estos cultivos pueden almacenarse mediante refrigeración
a baja temperatura a -40° o mediante liofilización.

15 Los conidios de diez de estos cultivos combina-
dos de agar se usan para la inoculación de un fermenta-
dor conteniendo 10 litros del medio 1. Después de un
período de incubación de 60 horas a 25° con aeración a
0,6 y agitación a 200 revoluciones por minuto, se ob-
20 tiene un cultivo de hojuelas finas, el que se trans-
fiere a un fermentador conteniendo 100 litros del medio
1 esterilizado. Se incuba bajo condiciones de cultivo
iguales durante 120 horas. Se obtiene un cultivo previo
25 secundario, de hojuelas gruesas. Este se usa para la
inoculación de un fermentador conteniendo 500 litros
del medio 2 esterilizado. Se incuba durante 18 días a

5 una temperatura de 24°, aerándose inicialmente a razón de 0,5 y aumentando sucesivamente a 1,2, y agitando, inicialmente a 75 revoluciones por minuto y aumentando gradualmente a 150 revoluciones por minuto. Después de este tiempo, cada litro del caldo de cultivo contiene 75,1 g de micelio seco con un contenido total de alcaloides de 1,037 % calculado sobre un peso molecular de 600. Esto corresponde a una cantidad total de alcaloides de 779 mg por litro.

10 El análisis preparativo de la mezcla de alcaloides da los valores siguientes:

ergocristina + ergocristinina	206 mg
ergocornina + ergocorninina	200 mg
ergocriptina + ergocriptinina	203 mg
alcaloides secundarios	170 mg

15 La elaboración posterior se efectúa separando el micelio de la solución mediante filtración y a continuación extrayendo el micelio con disolventes orgánicos de acuerdo con métodos conocidos.

20 Descrita suficientemente la naturaleza del invento así como la manera de realizarse en la práctica debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto
25 no alteren su principio fundamental

REIVINDICACIONES

5
10
1. Procedimiento para la producción de alcaloides del grupo de la ergotoxina por fermentación combinada, en particular para preparar una asociación natural en partes iguales de ergocornina, ergocriptina y ergocristina, incluyendo sus isómeros ergocorninina, ergocriptinina y ergocristinina, mediante cultivo saprofitico de hongos del cornezuelo de centeno de la especie *Claviceps purpurea*, caracterizado porque el cultivo de una cepa productora de ergocornina, ergocriptina y sus isómeros se combina con una cepa productora de ergocristina y su isómero en una mezcla de fermentación uniforme.

15
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fermentación combinada de las dos cepas se efectúa en una etapa del cultivo sobre medio de agar que produce esporos que sirven para inocular el cultivo previo.

20
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el cultivo sobre un medio de agar se inocula con una suspensión conteniendo de $1 \cdot 10^8$ a $5 \cdot 10^8$ esporos/cc, la proporción del número de esporos de la cepa productora de ergocristina y su isómero y el número de esporos de la cepa productora de ergocornina, ergocriptina y sus isómeros siendo entre 1:2 y 1:20.

25
4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fermentación combinada de las dos

cepas se efectúa en la etapa del cultivo previo.

5 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el cultivo previo se inocula con una suspensión de esporos de las dos cepas, conteniendo de $1 \cdot 10^8$ a $5 \cdot 10^9$ esporos/litro, la proporción del número de esporos de la cepa productora de ergocristina y su isómero y el número de esporos de la cepa productora de ergocornina, ergocriptina y sus isómeros siendo entre 1:20 y 1:200.

10 6. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fermentación combinada de las dos cepas se efectúa en la etapa del cultivo principal.

15 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el cultivo principal se inocula mediante combinación de un cultivo previo de la cepa productora de ergocristina y su isómero con un cultivo previo de la cepa productora de ergocornina, ergocriptina y sus isómeros, a una proporción por volumen de entre 1:3 y 1:20.

20 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque se usa la cepa Exy 20 como cepa productora de ergocornina, ergocriptina y sus isómeros.

25 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque se usa la cepa Koh K 420 como cepa productora de ergocristina y su isómero.

10. Procedimiento para la producción de alcaloides del grupo de la ergotoxina por fermentación combinada, tal y

como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria,

Esta Memoria consta de 25 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid, 27 MAYO 1977

SANDOZ A.G.

GÓMEZ ACEBO Y PONS
Firmado: L. Gaeta Fernández

