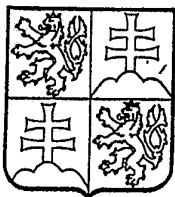


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

272 562

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. 5

G 12 N 1/14

(21) PV 3054-88. C

(22) Přihlášeno 05 05 88

(40) Zveřejněno 14 05 90

(45) Vydáno 04 11 91

(75) Autor vynálezu

KŘEN VLADIMÍR ing.,
SAJDL PŘEMYSL RNDr. CSc.,
REHÁČEK ZDENĚK RNDr. PhMr. DrSc., PRAHA,
MALINKA ZDENĚK RNDr.,
BŘEMEK JAN RNDr., OPAVA

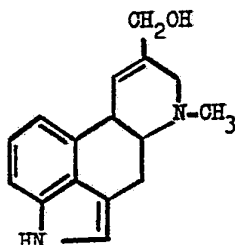
(54)

Průmyslový kmen houby *Claviceps purpurea*
(Fr.) Tul. 88-EP/1988 pro přípravu
elymoklavinu

(57) Řešení spadá do oblasti farmakologického průmyslu. Týká se nového průmyslového kmene, který v podmínkách kultivace na kapalných médiích produkuje za dobu kratší než dříve popsané kmeny vysoké koncentrace alkaloidu elymoklavinu o dostatečnou čistotu při vyloučení produkce exocelulárních polysacharidů a konidií. Účelem řešení je urychlení a zefektivnění fermentační produkce elymoklavinu.

Vynález se týká průmyslového kmene houby *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. pro přípravu elymoklavinu.

Alkaloid elymoklavin obecného vzorce I



(I)

se stal významnou farmaceutickou surovinou pro přípravu semisyntetických derivátů námelo-vých alkaloidů, využívaných jako léčiva, například Nicergolinu (US Pat. 2835675).

Elymoklavin se vyrábí převážně submerací fermentací pomocí průmyslových kmenů *Claviceps purpurea* a *Claviceps fusiformis*.

Nevýhodami dosud využívaných kmenů je pomalý nástup produkce, kdy ekonomicky zajímavých koncentrací alkaloidu je dosahováno až 21. den kultivace, dále tvorba doprovodného alkaloidu agroklavinu, který je nutno následnou separací od elymoklavinu odstraňovat, a také produkce exocelulárních glukánů a konidií, které vyvolávají tvorbu emulsí a tak snižují filtratelnost fermentační tekutiny a komplikují extrakci alkaloidů.

Uvedené nevýhody odstraňuje kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. 88-EP podle vynálezu, který se vyznačuje rychlým nástupem produkce elymoklavinu při submeraci kultivací. Již 16. den fermentace produkuje průměrně 2 500 mg elymoklavinu/L média o čistotě cca 90 %. Přitom se netvoří nežádoucí konidie ani exocelulární glukany.

Vzorky nového kmene jsou uloženy ve sbírce mikroorganismů Mikrobiologického ústavu ČSAV v Praze pod označením *Claviceps purpurea* pod číslem 88-EP/1988.

Charakteristika nového kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. 88-EP:

Nárůst kultury kmene na tuhém agarovém médiu NL 829 (viz Tabulka 2) (Maier a kol., *Planta Medica* 40, 104, 1980) je souvislý, slabě zvrásnělý. Mycelium kmene je šedivé až šedobílé. Po delší době kultivace produkuje do půdy hnědočervený pigment. Kolonie kmene v UV světle tmavěmodře fluoreskují. Kmen nesporuluje na pevném ani kapalném médiu. V kapalném médiu tvoří ojedinělé blastosporý a arthosporý. Mycelium submerací kultury kmene je převážně sfaceliálního typu a je provázeno řídkým výskytem shluků sklerociálních buněk. Na půdách GS2, (viz Tabulka 2) tvoří submerací kultura sespenzní, snadno filtrovatelné mycelium bez nežádoucích exocelulárních glukánů. Hnědý až hnědočervený rozpustný pigment je tvořen až v konečné fázi kultivace - po 20. dnu.

Kmen podle vynálezu se od původního rodičovského kmene liší ztrátou tvorby konidií, změnou spektra alkaloidů (z ergotoxinů na elymoklavin) a vyšší produkcí alkaloidů.

Uchovávání kmene *Claviceps purpurea* 88-EP

Krátkodobě lze kmen podle vynálezu uchovávat na agarovém médiu NL 829 (jako 20 až 22 denní kultury) při teplotě 4 °C. Kmen je nutno přeočkovávat po 2 až 3 měsících, delším skladováním se podstatně snižuje jeho životaschopnost.

Pro dlouhodobé uchovávání kmene lze s výhodou použít lyofilizace podle postupu:

Konzervační roztok

30 mL 60% rozt. sacharosy sterilizovaného v autoklávu při 115 °C/15 min. 15 mL rozt. sušeného netučného mléka (12,5 g/100 mL dest. H₂O) sterilizuje se v autoklávu při 105 až 110 °C 10 až 15 min (nesmí zhnědnout), po sterilizaci se oba roztoky sterilně smísí a přidá se promyté mycelium kmene připravené 6 až 8 denní kultivací, na médiu TI promísíme, rozpl-

níme do ampulí, lyofilizujeme, ampule uzavřeme zatavením a uchováváme při 4 °C. Za těchto podmínek si kmen podle vynálezu uchová vitalitu minimálně 1 rok.

Suspenzi mycelia kmene podle vynálezu lze v konzervačním roztoku pouze zmrazit a bez lyofilizace ji uchovávat minimálně 6 měsíců při -18 °C. Rozmrazením a opětovným zmrazením ztrácí kmen životaschopnost.

Postup získání nového kmene podle vynálezu:

Kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul 88-EP byl získán kombinovanou mutační technikou a následujícím testováním asi 500 izolátů (Tab. 1).

Protoplasty kmenů v průběhu šlechtění byly připravovány následujícím postupem:

Submersní kultivací kmene v médiu TI (viz Tabulka 2) 4 dny za podmínek uvedených v příkladu 1 bylo získáno mycelium, které bylo odstředěno a promyto 2x médiem PM (viz Tabulka 2). Do sterilní baňky (100 mL) se vloží 500 mg vlhké váhy mycelia, přidá 10 mL média PM a 1 až 2 mL roztoku (5 %) gastrické šťávy (helikasa) z hlemýžďe zahradního *Helix pomatia* a za mírného třepání se inkubuje asi 2 h při 28 °C, směs se přefiltruje přes fritu S1 a odstředí se (10 min/5 000 rpm). Protoplasty se nashromáždí na hladině, odkud se stáhnou Pasteurovou pipetou. Protoplasty se potom naředí médiem PM a buď se přímo vysévají na médium NL 829, nebo se ozařují UV světlem, popřípadě se na ně působí N-nitro-N'-nitrosomethylguanidinem (NNTG). NNTG se rozpustí v malém množství acetonu a doplní se na konc. 1/mg/mL médiem PM. K 5 mL suspenze protoplastů v médiu PM se přidá 0,5 mL rozt. NNTG. Po 1 h inkubaci při 24 °C ve tmě se protoplasty odstředí, promyjí médiem PM a vysévají na médium NL 829. Samotný proces přípravy protoplastů helikasou vyvolává mutagenní účinky; helikasa je mírným mutagenem (Černá, Mutat. Res. 143, str. 169, (1985)).

Mutageneze hyfových fragmentů:

Mycelium připravené obdobně jako pro tvorbu protoplastů se důkladně zhomogenizuje mixérem Ultra-Turrax. Stupeň homogenizace se kontroluje mikroskopicky. Suspenzi takto připravených hyfových fragmentů ozáříme UV světlem a potom se vysévá na médium NL 829.

Kolonie, které po cca 23 dnech kultivace při 24 °C vyrostly ze zárodků mutovaných různým postupem, se potom přeočkují na šikmé agary s médiem NL 829 a testují na produkci elymoklavinu kultivačním způsobem na médiu CS2.

Způsob kultivace kmene *C. purpurea* 88-EP podle vynálezu pro získání výchozí suroviny k izolaci elymoklavinu a k následné výrobě finálních produktů a léčebných preparátů je doložen v příkladech použití, aniž by se tímto příkladem jakkoliv omezovaly vlastnosti nového kmene, způsob jeho kultivace a použití při průmyslové výrobě.

Příklad 1

Výchozí inokulum kmene pro submersní fermentaci elymoklavinu se připraví ze zásobní kultury kmene *C. purpurea* 88-EP narostlé na agarovém médiu NL 829 v Endově zkumavce. Kultura má být stará 21 až 25 dní, nejlépe bez uchovávání v chladničce. Veškeré kultivace kmene podle vynálezu probíhají ve tmě při teplotě 24 °C. Mycelium kultury takto narostlé je velmi křehké a je možno ho snadno smýt uříznutou pipetou do inokulačního média TI (Spala C., ing Genetics of Industrial Microorganisms, eds. Z. Vaněk et al., Elsevier, Amsterdam 1973, str. 393). Zaočkované médium (60 mL ve 300 mL Erlenmayerově baňce) se kultivuje na rotační třepačce (240 rpm, 5,5 cm excentr.) s výhodou 6 dní, popřípadě i déle. Z takto získaného inokula je 5 mL přeneseno do Erlenmayerových baněk (300 mL) s médiem CS2 (60 mL) (AO 199986). Kultury se kultivují 16 až 21 dní. Produkce celkových alkaloidů v 16. dni fermentace činí 2 100 až 2 500 mg/L s obsahem elymoklavinu až 90 %, produkce v 21. dni je 2 800 až 3 500 mg/L s obsahem elymoklavinu 70 až 80 %.

Příklad 2

Kultivace probíhá za obdobných podmínek, jak je uvedeno v příkladu 1, pouze místo produkčního média CS2 je použito média CS25, popřípadě média CS30 s vyššími koncentracemi sacharosy. Tento postup dává o 10 až 20 % vyšší výtěžky elymoklavinu a nástup produkce to-

hoto alkaloidu je rychlejší, než při použití média GS2.

Tabulka 1 Postup přípravy nového kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul 88-EP kombinovaným mutačním šlechtěním (na médiu GS2)

Generalogie		Mutace		Produkce alkaloidů		
Claviceps purpurea pracovní označení (mezistupně)	objekt mutagenese	mutagen	celková (mg/L)	agro- klavin (%)	elymo- klavin (%)	
1. (výchozí kmen) P	-		900 ^b	stopy	stopy	
2	E	protoplasty	C	900 až 1 100	10	80
3	E-I	protoplasty	C	1 300	10	80
4.	E-HF	fragmenty hyf	UV 80 mJ/cm ²	1 700	15	70
5	EK 10	protoplasty	UV 40 mJ/cm ²	2 000 až 2 200	15	75
6	88-EP	protoplasty	NNTG 0,1 mg/mL (působení 1 h)	2 100 až 2 500	5	90

^a16. den submeraní fermentace

^bkmen P produkoval převážně ergotoxiny

^cvýsev intaktních protoplastů - potenciální mutagenní účinek helikasy při přípravě protoplastů

Tabulka 2

Složení použitých médií:

NL 829		TI	
	g/L		g/L
sacharosa	100	sacharosa	100
L-asparagin	10	kvas. extrakt	0,1
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1	L-asparagin	10
KH ₂ PO ₄	0,25	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,30	L-cystein.HCl	0,1
Kvasničný extrakt Difco	0,1	KH ₂ PO ₄	0,25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
KCl	0,1	(NH ₄) ₂ SO ₄	10
agar	25	voda vodovodní	
H ₂ O destilovaná		pH upravit NaOH	5,5
pH upravit NH ₄ OH	5,4 až 5,6		
PM		GS2	
	mol/L		g/L
sacharosa	0,8	sacharosa	100
MgCl ₂	0,01	kys. citronová	
CaCl ₂	0,01	monohydrát	16,8
citrát sodný	0,01	CaCl ₂	1,2
pH (NaOH)	4,8	KCl	0,12
destilovaná voda		KH ₂ PO ₄	0,25
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,015
		(NH ₄) ₂ SO ₄	10
		voda vodovodní	
		pH upravit NaOH	5,5

<u>CS25</u>	g/L	<u>CS30</u>	g/L
sacharosa	250	sacharosa	300
ostatní komponenty jako médium CS2		ostatní komponenty jako médium CS2	

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Průmyslový kmen houby *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. pro přípravu elymoklavinu kultivací na tekutých médiích, které obsahují zdroj asimilovatelného uhlíku, dusíku, minerální sole, stopové a/nebo biologicky aktivní látky, uložený ve Sbírce mikroorganismů Mikrobiologického ústavu ČSAV v Praze pod číslem 88-EP/1988.

1
2