



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

261951
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 17/18

(22) Přihlášeno 17 01 86
(21) (PV 388-86.C)

(40) Zveřejněno 15 07 88

(45) Vydáno 15 05 89

(75)
Autor vynálezu

BŘEMEK JAN RNDr., OPAVA, ŘEHÁČEK ZDENĚK RNDr. PhMr. DrSc.,
PILÁT PETR ing. CSc., PRAHA, MALINKA ZDENĚK RNDr., OPAVA,
PAŽOUTOVÁ SYLVIE RNDr. CSc., CHOMÁTOVÁ STANISLAVA RNDr. CSc.,
PRAHA, SPÁČIL JIŘÍ PhMr., OPAVA, RYLKO VIKTOR RNDr., BARTA
MIROSLAV RNDr., PRAHA, KRAJÍČEK ALOIS PhMr., OPAVA, KOZOVÁ
JAROSLAVA RNDr., SAJDL PŘEMYSL RNDr. CSc., HOMOLKA LADISLAV
RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy námelových klavinových alkaloidů se sníženým
obsahem glukanu submersní kultivací saprofytních kultur houby rodu
Claviceps

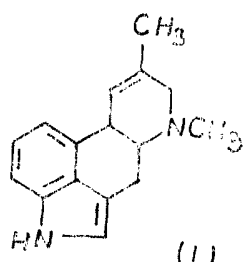
1

2

Řešení se týká oborů biotechnologie, fermentačního a farmaceutického průmyslu a řeší fermentační přípravu námelových klavinových alkaloidů submersní kultivací při snížení až úplné eliminaci nežádoucího výskytu glukanu v produkční fázi kultivačního procesu. Účelem je zvýšení výtěžnosti fermentační výroby, extrakce a izolace alkaloidů a následné zlepšení surovinové základny pro výrobu preparátů s léčebným účinkem. Účinku se dosáhne přípravou alkaloidů kultivací saprofytních kultur houby rodu *Claviceps*, vyznačující se tím, že příprava vegetativního inokula produkčního kmene je dvoustupňová. Inokulum 1. stupně se připravuje kultivací při teplotě 18 až 27 °Celsia po dobu 5 až 17 dnů ve vodném médiu obsahujícím sacharosu, kukuřičný výluh, soli anorganických kyselin a kyselinu jantarovou. Inokulum 2. stupně se připravuje kultivací při stejné teplotě po dobu 3 až 11 dnů ve vodném médiu obsahujícím sacharidy, případně též soli anorganických kyselin, kukuřičný výluh, organické kyseliny a fenobarbital. Tímto inokulem se zaočkuje vhodný druh živného média produkční fáze kultivačního procesu.

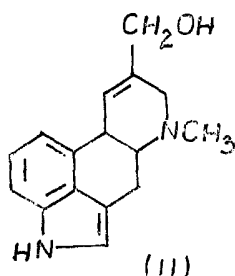
Vynález se týká způsobu přípravy námelových klavinových alkaloidů submersní kultivací saprofytních kultur houby rodu *Claviceps*, s výhodou kmenů *C. fusiformis* W1 čs. AO č. 245 126 nebo *C. purpurea* CP/7/5/35 podle čs. AO č. 246 704 nebo *C. purpurea* CCM F-733 s použitím specifického způsobu přípravy inokulačního materiálu pro zaočkování produkčního stupně submersního fermentačního procesu.

Strukturu agroklavinu a elymoklavinu určili M. Abe et al. [J. Agric. Chem. Soc. Japan 22, 2, 1948, J. Agric. Chem. Soc. Japan 25, 458, 1952]. Oba alkaloidy se ve větším množství vyskytují ve sklerocích některých parazitních kmenů houby rodu *Claviceps* a v saprofytních kulturách vyšlechtěných kmenů této houby. Agroklavin strukturního vzorce I



se vyznačuje mimořádnými fyziologickými a farmakologickými účinky, např. inhibuje laktaci [P. G. Mantle, Proc. Royal Soc. B. 170, 423, 1968], brání implantaci fertilizovaného vajíčka [P. G. Mantle, J. Reprod. Fertility 18, 81, 1969], vykazuje aktivitu antibakteriální [G. Schwarz a E. Eich, Planta Med. 47, 212, 1983], a cytostatickou [E. Eich et al., Biochem. Pharm. 33, 4, 1984].

Elymoklavin se vyznačuje antibakteriální aktivitou [G. Schwarz a E. Eich, Planta Med. 47, 212, 1983], avšak jeho význam spočívá především v tom, že je výhodným substrátem pro přípravu farmakologicky významných polosyntetických derivátů kyseliny lysergové, např. nicergolinu [Tung-Chung Choong, H. R. Shough, Tetrahedron Letters 19, 1627, 1977, M. Semonský, N. Kucharz-szyk, Coll. Czech. Chem. Commun. 33, 577, 1968, M. Beran et al., Coll. Czech. Chem. Commun. 39, 1768, 1974, J. Křepelka et al., Coll. Czech. Chem. Commun. 42, 1412, 1977, belg. pat. 633 438]. Strukturní vzorec elymoklavinu je II



Fermentační produkce námelových klavinových alkaloidů není dosud uspokojivě vyřešena. Byla sice popsána v řadě publikací a patentů [M. Abe a S. Yamatodani, Progr. Ind. Microbiol. 5, 205, 1964; L. Vining a P. M. Nair, Can. J. Microbiol. 12, 915, 1966; A. Tonolo a E. Udvardy-Nagy, Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 15, 29, 1968; čs. AO č. 199 986] avšak vesměs zůstává zatížena nízkou výtěžností a délkou procesu. Realizace dosud popsaných postupů fermentační přípravy klavinových alkaloidů vysokoprodukčními kmeny je značně znesnadněna průvodní tvorbou extracelulárních polysacharidů (glukanů), např. v množství 42 g.l⁻¹ fermentačního média podle čs. AO č. 249 461. Přítomnost glukanů ve fermentačním médiu nepříznivě mění reologii média, přetěžuje pohonné agregáty, znesnadňuje míchání a vzdušnění, zpomaluje přestup kyslíku, vyvolává nadměrné pění média a posléze i zastavení produkce alkaloidů. V přítomnosti glukanů v médiu se nemůže plně uplatnit produkční schopnost průmyslových kmenů, zvyšují se energetické nároky na fermentační proces, stoupá jeho poruchovost a nebezpečí kontaminace. Zvýšený obsah extracelulárních glukanů podstatně znesnadňuje další zpracování média, především separaci mycelia a extrakci a izolaci klavinových alkaloidů z média.

Výše uvedené nevýhody odstraňuje způsob přípravy námelových klavinových alkaloidů submersní kultivací saprofytních kultur houby rodu *Claviceps* s vysokou produkcí alkaloidů na médiích, obsahujících zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální soli, stopové prvky a/nebo biologicky aktivní látky, vyznačující se dvoustupňovou přípravou inokula. Inokulum prvního stupně se připravuje v živném vodném médiu o hodnotě pH 4,7 až 6,2, obsahujícím 8 až 20 % hmot. sacharosy, 0,5 až 2,0 % hmot. dusičnanu vápenatého, 0,3 až 1,5 % hmot. kukuřičného výluhu, 0,02 až 0,3 % hmot. dihydrofosforečnanu draselného, 0 až 0,3 % hmot. síranu hořečnatého, 0 až 0,3 % hmot. síranu zinečnatého, 0,2 až 2,0 % hmot. kyseliny jantarové. Kultivace inokula prvního stupně se provádí při teplotě 18 až 27 °C po dobu 5 až 17 dnů. Inokulum druhého stupně se připravuje v živném vodném médiu o hodnotě pH 4,7 až 6,2, obsahujícím 7 až 23 % hmot. sacharosy nebo sorbitu nebo manitu nebo glukosy nebo vzájemné směsi těchto sacharidů, 0 až 2,0 % hmot. dusičnanu vápenatého, 0 až 1,5 % hmot. kukuřičného výluhu, 0 až 0,3 % hmot. dihydrofosforečnanu draselného, 0 až 0,3 % hmot. síranu hořečnatého, 0 až 0,32 % hmot. síranu zinečnatého, 0 až 0,05 % hmot. síranu železnatého, 0 až 2,0 % hmot. kyseliny jantarové nebo kyseliny citrónové nebo jejich vzájemné směsi, 0 až 1,6 % hmot. síranu amonného, 0 až 0,5 % hmot. chloridu vápenatého a 0 až 1,2 % hmot. fenobarbitalu nebo

jeho soli. Kultivace inokula druhého stupně se provádí při teplotě 18 až 27 °C po dobu 3 až 11 dnů. Takto připraveného inokula druhého stupně se použije k zaočkování produkční fáze fermentačního procesu, která probíhá po dobu 12 až 25 dnů při teplotě 21 až 26 °C v živném vodném médiu o hodnotě pH 4,7 až 6,2 obsahujícím 8 až 20 proc. hmot. sacharosy, 0 až 2,0 % hmot. glukosy, 0,5 až 2,0 % hmot. síranu amonného, 0 až 1,5 % hmot. kyseliny jantarové, 0 až 2,0 % hmot. kyseliny citrónové, 0,01 až 0,05 % hmot. dihydrofosforečnanu draselného, 0,1 až 0,2 % hmot. chloridu vápenatého, 0,02 až 0,03 % hmot. síranu hořečnatého, 0,001 až 0,002 % hmot. síranu zinečnatého, 0,001 až 0,002 % hmot. síranu železnatého, 0,02 až 0,1 % hmot. fenobarbitalu, s výhodou jeho sodné soli. Kultivace produkční fáze probíhá za míchání 1,8 až 3,4 ot./s a vzdušnění 120 až 240 l vzduchu na 10 l média/h.

Hlavní výhodou způsobu podle vynálezu je značné snížení až eliminace tvorby extracelulárních polysacharidů (glukanů) při kultivaci vysokoprodukčních průmyslových kmenů hub rodu *Claviceps* v produkčním stupni fermentačního procesu. Tato skutečnost umožňuje racionální řízení fermentačního procesu s navozením fyziologického stavu kultury vhodného pro intenzivní tvorbu alkaloidů [Z. Řeháček, 1985 In: P. N. Cheremisinoff and R. P. Ouellette (Eds.) *Biotechnology*, Technomic Publ. Co, Inc, Basel, p. 565] s dokonalejším využitím produkční schopnosti průmyslového kmene za současného snížení energetické náročnosti procesu, poruchovosti a nároků na obsluhu a údržbu a umožňuje rovněž kontinualizaci fermentačního procesu. Další výhodou je snížení nákladů na odpěňovací prostředky. Další výhodou je snadná manipulace s fermentačním médiem obsahujícím narostlou biomasu, snadnější separace biomasy od média, efektivnější extrakce a izolace alkaloidů z média s nižšími nároky na materiál, energii, pracovní síly a extrakční a isolační kapacity. Další výhodou je možnost použít extrakční postupy bez nutnosti separace biomasy od média.

Způsob přípravy námelových klavinových alkaloidů submerzní kultivací saprofytních kultur houby rodu *Claviceps* podle vynálezu je popsán v následujících příkladech použití, aniž by jimi byl předmět vynálezu jakkoli omezován.

Příklad 1

Množství 50 ml média IN1 (Tab. 1) v 250 ml Erlenmayerově baňce se zaočkuje suspensí konidií připravenou stěrem 14denní kultury kmene houby *Claviceps fusiformis* W1 vyrostlé při 24 ± 1 °C na agarovém médiu T2 [C. Spalla 1973, In: Z. Vaněk et al. (Eds.) *Genetics of Industrial Microorganismus*, Elsevier, Amsterdam] a to tak,

aby v zaočkovaném médiu bylo $2 \cdot 10^4$ konidií/ml a kultivuje se při 26 ± 1 °C po dobu 7 dnů na rotační třepačce o excentru 5,5 cm a 4 ot./s. Z takto připraveného inokula prvního stupně se zaočkuje 50 ml média IN2 (Tab. 1) v 250 ml Erlenmayerově baňce, a to objemem inokula 8% objemu média IN2 a kultivuje se při 23 ± 1 °C po dobu 10 dnů na rotační třepačce o excentru 5,5 cm a 4 ot./s. Z takto připraveného inokula 2. stupně se 5 ml přenese do 50 ml produkčního média CP (Tab. 1), které se pak inkubuje při 24 ± 1 °C po dobu 17 dnů za stejných ostatních podmínek. Filtrát fermentační tekutiny obsahuje v 17. dnu 4 579 mg/l celkových alkaloidů, z toho 2 085 mg/l agroklavinu, 2 338 mg/l elymoklavinu, 156 mg/l ostatních klavinových alkaloidů a 0,25 g/l glukanů.

Příklad 2

Množství 2,5 l média IN3 (Tab. 1) v 5 l laboratorního fermentoru se zaočkuje suspensí konidií připravenou stěrem 30denní kultury kmene *C. fusiformis* W1 vyrostlé na agarovém médiu T2 tak, aby zaočkované médium obsahovalo $5 \cdot 10^6$ konidií/ml a kultivuje se za míchání 6,67 ot./s a vzdušnění 48 l/h při 25 ± 1 °C po dobu 11 dnů. Takto připraveným inokulem 1. stupně se zaočkuje 27 l média IN4 (Tab. 1) v 50 l fermentoru a za míchání 5,8 ot./s a vzdušnění 720 l/h se při 24 ± 1 °C kultivuje po dobu 10 dnů. Celým objemem takto získaného inokula 2. stupně se zaočkuje 270 l produkčního média CSP (tab. 1) v 500 l fermentoru a kultivuje se za míchání 3,33 ot./s, vzdušnění 6 000 l/h a při teplotě 23 ± 1 °C po dobu 15 dnů. Filtrát fermentační tekutiny obsahuje v 15. dnu 2 836 mg/l celkových alkaloidů, z toho 405 mg/l agroklavinu, 2 322 mg/l elymoklavinu a 109 mg/l ostatních klavinových alkaloidů a 0,08 g/l glukanů.

Příklad 3

Množství 110 l média IN5 (tab. 1) v 200 l fermentoru se zaočkuje suspensí konidií produkčního kmene *C. fusiformis* W1 tak, aby médium obsahovalo $8 \cdot 10^5$ konidií/ml. Zaočkované médium se kultivuje za míchání 3 ot./s a vzdušnění 1 200 l/h při 25 ± 1 °C Celsia po dobu 8 dnů. Takto připravené inokulum 1. stupně se přenese do 1 500 l fermentoru obsahujícího 900 l média IN6 (tab. 1) a kultivuje se za míchání 2,83 ot./s a vzdušnění 12 000 l/h při 23 ± 1 °C po dobu 7 dnů. Takto připraveným inokulem 2. stupně se zaočkuje 10 m³ média CSP (tab. 1) v 15 m³ fermentoru a kultivuje se za vzdušnění 50 l/s a míchání 1,83 ot./s při 22 ± 1 °C po dobu 20 dnů. Filtrát fermentačního média obsahuje ve 20. dnu 2 459 mg/l celkových alkaloidů, z toho 147 mg/l agroklavinu a 2 204 mg/l etylmoklavinu a 108 mg/l ostat-

ních klavinových alkaloidů a dále 0,59 g/l glukanu.

Příklad 4

Množství 110 l média IN2 (tab. 1) v 200 l fermentoru se zaočkuje suspenzí konidií produkčního kmene *C. purpurea* CCM F-733 tak, aby médium obsahovalo $4 \cdot 10^5$ konidií/ml. Zaočkované médium se kultivuje za míchání 3 ot/s a vzdušnění 1200 l/h při $24 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 5 dnů. Takto připravené inokulum 1. stupně se přenesse do 1500 l

fermentoru obsahujícího 900 l média IN2 (tab. 1) a kultivuje se za míchání 2,83 ot/s a vzdušnění 12000 l/h při $23 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 5 dnů. Takto připraveným inokulem 2. stupně se zaočkuje 10 m³ média CP (tab. 1) v 15 m³ fermentoru a kultivuje se za vzdušnění 56 l/s a míchání 1,83 ot/s při $24 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 21 dnů. Filtrát fermentačního média obsahuje po ukončení kultivace 2892 mg/l celkových alkaloidů, z toho 683 mg/l agroklovinu, 1957 mg/l elymoklovinu a 252 ostatních klavinových alkaloidů a dále 0,33 g/l glukanu.

TABULKA 1

Kapalná média pro kultivaci saprofytních kultur produkčních kmenů houby rodu *Claviceps* podle vynálezu

Složky [g/l H ₂ O]	Médium	IN1	IN2	IN3	IN4	IN5	IN6	CP	CSP
sacharosa		150	150	150	100	150	100	100	80
glukosa									20
kukuřičný výluh		10	10	5		10			
dusičnan vápenatý tetrahydrát		1	1		1	1	1		
síran amonný					10		10	10	10
čpavek 25 %		6,3							
kyselina jantarová		10	10	10	10	10	10	10	
kyselina citrónová							16		15
dihydrofosforečnan draselný		0,25	0,25	2,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
chlorid vápenatý				1,1			1,1	1,1	1,2
síran hořečnatý									
heptahydrát		0,25	0,25		0,25	2,5	0,25	0,25	0,25
síran zinečnatý									
heptahydrát		0,2	0,2	0,2	0,015	2	0,015	0,015	0,01
síran železnatý									
heptahydrát					0,03		0,02	0,02	0,02
fenobarbital sodný					0,5			0,5	0,25
pH		5,2	5,2	5,5	5,3	5,2	5,5	5,5	5,5

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy námelových klavinových alkaloidů se sníženým obsahem glukanu submersní kultivací saprofytních kultur houby rodu *Claviceps* s vysokou produkcí alkaloidů v médiích obsahujících zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální soli, stopové prvky a/nebo biologicky aktivní látky, vyznačující se tím, že příprava inokula vegetativního typu je dvoustupňová, přičemž inokulum prvního stupně se připravuje v živném vodném médiu o hodnotě pH 4,7 až 6,2, obsahujícím 8 až 20 % hmotnostních sacharosy, 0,5 až 2,0 % hmot. dusičnanu vápenatého, 0,3 až 1,5 % hmot. kukuřičného výluhu, 0,02 až 0,3 % hmot. dihydrofosforečnanu draselného, 0 až 0,3 % hmot. síranu hořečnatého, 0 až 0,3 % hmot. síranu zinečnatého, 0,2 až 2,0 % hmot. kyseliny jantarové s kultivací při teplotě 18 až 27 °C po dobu 5 až 17 dnů a příprava

vegetativního inokula druhého stupně probíhá 3 až 11 dnů při teplotě 18 až 27 °C ve vodném živném médiu o hodnotě pH 4,7 až 6,2, obsahujícím 7 až 23 % hmot. sacharosy nebo sorbitu nebo manitu nebo glukosy nebo vzájemné směsi těchto sacharidů, 0 až 2,0 % hmot. dusičnanu vápenatého, 0 až 1,5 % hmot. kukuřičného výluhu, 0 až 0,3 % hmot. dihydrofosforečnanu draselného, 0 až 0,3 % hmot. síranu hořečnatého, 0 až 0,32 % hmot. síranu zinečnatého, 0 až 0,05 % hmot. síranu železnatého, 0 až 2,0 % hmot. kyseliny jantarové nebo kyseliny citrónové nebo vzájemné směsi těchto kyselin, 0 až 1,6 procenta hmot. síranu amonného, 0 až 0,5 procenta hmot. chloridu vápenatého, 0 až 1,2 % hmot. fenobarbitalu nebo jeho soli a takto připraveného vegetativního inokula se použije k zaočkování produkční fáze fer-

mentačního procesu probíhajícího 12 až 25 dnů při teplotě 21 až 26 °C v živném vodném médiu o hodnotě pH 4,7 až 6,2, obsahujícím 8 až 20 % hmot. sacharosy, 0 až 2,0 % hmot. glukosy, 0,5 až 2,0 % hmot. síranu amonného, 0 až 1,5 % hmot. kyseliny jantarové, 0 až 2,0 % hmot. kyseliny citrónové, 0,01 až 0,05 % hmot. dihydrogenfosforečnanu dra-

selného, 0,1 až 0,2 % hmot. chloridu vápenatého, 0,02 až 0,03 % hmot. síranu hořečnatého, 0,001 až 0,002 % hmot. síranu zinečnatého, 0,001 až 0,002 % hmot. síranu železnatého, 0,02 až 0,1 % hmot. fenobarbitalu nebo jeho solí, za míchání 1,8 až 3,4 ot/s a vzdušnění 120 až 240 l vzduchu na 10 l média/h.