



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209382

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 1/06

(22) Přihlášeno 04 02 80

(21) (PV 758-80)

(40) Zveřejněno 27 02 81

(45) Vydáno 01 07 83

(75)

Autor vynálezu

HOMOLKA LADISLAV RNDr., TOSCANIOVÁ EVA ing. CSc.,
MUSÍLEK VLADIMÍR RNDr. PhMr. CSc.,
VONDRÁČEK MILOSLAV RNDr., PRAHA, CECHNER VÁCLAV ing.,
ROZTOKY, ČULÍK KAREL RNDr. a ETTLER PETR ing., PRAHA

(54) Způsob přípravy protihoubového antibiotika Muciderminu

Způsob přípravy protihoubového antibiotika Muciderminu Spofa pro povrchovou terapii kožních mykóz, které jsou vyvolávány vláknitými a kvasinkovými houbovými mikroorganismy, jako např. kandidóz, trichofycií, keratomykóz, epidermofycií apod.

Podstatou vynálezu je, že ze submersní kultury basidiomycety *Oudemansiella mucida* (Schrad. ex Fr.) Höhn. se připraví kultura na prose (prosná konzerva), kterou se přímo bez dalších mezistupňů očkují očkovací fermentory a z těchto dále produkční fermentory s živným médiem, obsahujícím jako zdroj uhlíku glukózu anebo glycerol v množství do 20 % hmot. počítáno na hmotnost média a jako zdroj dusíku řepnou případně třtinovou melasu v množství 0,5 až 2 % hmot., nebo kukuřičnou máčecí vodu v množství od 1 až 3 % hmot. v kombinaci s kyselým hydrolysátem kaseinu v množství od 0,2 do 2 % hmot. a dále síran hořečnatý v množství od 1 % hmot. a stopová množství minerálních solí, přičemž fermentace probíhá při teplotě 27 až 29 °C při počátečním pH 5 až 6 po dobu 200 až 300 hodin, načež se z média izoluje známým postupem protihoubové antibiotikum. Ve srovnání s postupem dle základního čs.

patentu č. 136 495 postup dle vynálezu zkrácení výrobního procesu přináší větší výtěžnost a lepší stabilitu produkce Muciderminu.

Vynález se týká způsobu přípravy protihoubového antibiotika.

Protihoubové antibiotikum (Mucidermin, Spofa) dle vynálezu se používá pro povrchovou terapii kožních mykóz, vyvolávaných kvasinkovými i vláknitými houbovými mikroorganismy jako například kandidos, trichofycií, keratomykóz a epidermofycií.

Je to antibiotikum vyráběné fermentačním postupem pomocí myceliální kultury basidiomycety *Oudemansiella mucida* (Schr. ex Fr.) Höhn. (dále jen *Oudemansiella mucida*) podle čs. patentu č. 136 492, s navazující extrakcí a izolací antibiotické substance podle č. patentu č. 136 495.

Dosavadní způsob přípravy tohoto antibiotika má některé nevýhody pokud jde o fermentační přípravu. Jsou to zejména:

a) nemožnost dlouhodobějšího uchovávání submersního vegetativního inokula bez ohrožení výtěžnosti produkční fermentace; inokulum je nutno nově připravovat před každou fermentací, což při pomalém nárůstu mycelia přenášeného z agarové kultury přináší značné časové ztráty

b) relativní variabilita produkce antibiotika v závislosti na kvalitě vegetativního inokula a na kvalitě kukuřičného výtěžku, používaného při dosavadní průmyslové výrobě jako hlavního zdroje dusíku, dále na teplotních vlivech apod.

c) relativní dlouhodobost celého fermentačního postupu v důsledku složité přípravy inokula, která je ovlivňována pomalejší růstovou rychlostí produkční houby a uvedenou dosavadní nutností přípravy prvního pomnožovacího stupně s použitím mycelia z agarové uchovávací kultury, s navazujícími dalšími pomnožovacími stupni v rozsahu úměrném objemu produkčního fermentačního stupně.

Výhodou zlepšeného způsobu přípravy antibiotika podle vynálezu je možnost přímého očkování velkých fermentačních objemů bez inokulačních mezistupňů, čímž se celková doba kultivace zkrátí nejméně o 300 hodin, dále snadná manipulace a dlouhodobá skladovatelnost inokulačního materiálu ve formě prosné konzervy.

Důsledkem průmyslového zavedení tohoto fermentačního postupu je podstatné zvýšení výtěžnosti účinné látky.

Podstatou způsobu přípravy protihoubového antibiotika Muciderminu dle vynálezu je, že ze submersní kultury basidiomycety *Oudemansiella mucida* (Schr. ex Fr.) Höhn. se připraví kultura na prose (prosná konzerva), kterou se přímo bez dalších mezistupňů očkují očkovací fermentory a z těchto dále produkční fermentory s živným médiem, obsahujícím jako zdroj uhlíku glukózu anebo glycerol v množství do 20 % hmot. (počítáno na hmotnost média) a jako zdroj dusíku řepnou nebo třtinovou melasu v množství od 2 do 8 % hmot., v kombinaci s peptonem v množství 0,5 až 2 % hmot., nebo kukuřičnou máčecí vodu v množství od 1 do 3 % hmot. v kombinaci s kyselým hydrolyzátem kaseinu v množství od 0,2 do 2 %

hmot. a dále síran hořečnatý v množství do 1 % hmot., případně uhličitán vápenatý v množství do 10 % hmot. a stopové množství minerálních solí jako chloridy, fosforečnany, jodidy, boritany anebo uhličitany, a to vápenaté, sodné, draselné, hořečnaté, zinečnaté, měďnaté, kobaltnaté, manganaté, železnaté nebo železité, přičemž fermentace probíhá při teplotě 27 až 29 °C při počátečním pH 5 až 6 po dobu 200 až 300 hod., načež se z média izoluje známým postupem protihoubové antibiotikum.

Způsob přípravy základního inokulačního materiálu, tj. prosné konzervy, je založen na použití vlhčeného sterilního prosa stacionárně prorostlého myceliem produkční houby, pocházejícím z udržovací agarové kultury s prověřenou produkční schopností. V případě produkčního kmene basidiomycety *Oudemansiella mucida* nejde o materiál sporulující, nýbrž o vegetativní mycelium prorostlé zrnky prosa. Prosných konzerv lze používat jako zdroj inokulačního materiálu pro fermentace nebo k dalšímu přeočkování na proso nebo na pevnou půdu (přes submersní inokulum). Kulturu produkční houby na prose lze dlouhodobě uchovávat (až 6 měsíců při +4 °C) bez negativního ovlivnění její produkční schopnosti. Dále ji lze přímo použít k očkování dalších submersních inokulačních stupňů, což vzhledem k většímu počtu růstových center je spojeno s rychlejším nárůstem a výsledným relativním zkrácením výrobního procesu. S ohledem na možnost jejího dlouhodobého uchovávání lze prosné konzervy hromadně připravovat z prověřeného myceliálního materiálu a postupně je používat pro očkování příslušných fermentačních šarží, což zaručuje průběžnou stabilitu produkce antibiotika a odpovídá kolísání výtěžku z jednotlivých fermentací.

Přesný teplotní režim při fermentační produkci Muciderminu v rozsahu udržované kultivační teploty 27 až 29 °C vede k průkaznému zvýšení maximální úrovně produkce antibiotika o 30 až 140 %, v závislosti na složení použité fermentační půdy, ve srovnání s dřívějšími fermentacemi prováděnými při teplotě kolem 25 °C.

Kvalitativní a kvantitativní změny inokulačního a fermentačního živného média zahrnují, zejména zvýšenou koncentraci glukosy, nebo použití glycerolu a použití kombinace řepné nebo třtinové melasy a peptonu místo kukuřičné máčecí vody, jejíž kvalita silně ovlivňuje fermentační výtěžky antibiotika, případně přídavek kyselého hydrolyzáta kaseinu do půdy s kukuřičnou máčecí vodou. Též v inokulační půdě lze kukuřičnou máčecí vodu nahradit kombinací melasy s peptonem.

Tyto specifické úpravy složení kultivačního média v případné kombinaci s dalším přídavkem živin během fermentace a upraveným teplotním režimem vedou ke zvýšeným produkcím Muciderminu, na úrovni cca 1000 až 2000 µg/ml.

Prakticky lze zlepšený postup fermentační produkce Muciderminu provádět podle následujících příkladů, aniž se na tyto výlučně omezuje. Úroveň

produkce Muciderminu byla stanovena plotnovou difusní mikrobiologickou metodou s použitím *Candida pseudotropicalis* jako citlivého mikroorganismu nebo kvantitativní plynovou chromatografií, a je vyjadřována v mikrogramech Muciderminu na 1 ml fermentačního vzorku.

Příklad 1

Inokulační materiál na prose (tzv. prosné konzervy) se připraví následovně:

Na 500 g vodou promytého prosa se přidá 200 ml vody a vaří se do odpaření. Pak se proso ponechá 30 min. přikryté, načež se rozprostře na filtrační papír a po vychladnutí rozplní po cca 25 ml do 250 ml Erlenmayerových baněk (prosná konzerva I). Lze připravovat i prosné konzervy II o dvojnásobném objemu 50 ml prosa v 500 ml Erlenmayerově bance. Sterilizuje se autoklávacím frakcionovaně dvakrát po 30 min. při 120 °C. Po roztrpání se proso naočkuje 2,5 ml resp. 5 ml (prosná konzerva I resp. II) narostlého submersního vegetativního inokula a inkubuje se za občasněho protřepání (jednou za 24 hod.) po dobu 7 až 10 dní při 25 °C. Prosná zrnka musí být dobře prorostlá a obalená bílým vatovitým myceliem. Při kultivaci je nutno dbát na přiměřenou vlhkost vzduchu; materiál má být sypký, ale ne příliš suchý. Skladovací teplota je +5 °C. Přibližně 1/10 obsahu prosné konzervy I se naočkuje do 1000 ml inokulační pudy o složení 6 % glukózy, 4 % řepné melasy, 1 % peptonu, 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 % chloramfenikolu (pro vyloučení případné bakteriální kontaminace) a kultivuje se ve skleněném laboratorním fermentoru o obsahu 2 l při teplotě 25 °C, vzdušnění 0,5 l/min. a míchání 600 obr./min. po dobu 168 hod. Obsahem skleněného laboratorního fermentoru (cca 1000 ml) se naočkuje 10 l produkční pudy o složení 12 % glukózy, 3 % řepné melasy, 1 % peptonu, 4 % CaCO_3 , 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,02 % chloramfenikolu. Kultivace probíhá ve fermentoru z nerezavějící oceli o obsahu 20 l při teplotě 28 °C ± 0,5 °C, vzdušnění 5 l vzduchu/min. a míchání 400 obr./min. Ve 100. a 144. hodině kultivace se přidá vždy po 2 % glukózy a 1 % řepné melasy ve formě sterilního vodného roztoku. V 264. hodině kultivace byl zjištěn obsah účinné látky 1760 µg/ml. Kultivace byla ukončena a izolace provedena postupem podle čs. patentu 136 495.

Příklad 2

Inokulační materiál na prose (tzv. prosné konzervy) se připravují jako u příkladu 1. Obsahem 4 prosných konzerv II se naočkuje 150 l inokulační pudy o složení 6 % glukózy, 2 % kukuřičné máčecí vody, 1 % peptonu, 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,02 % chloramfenikolu ve fermentoru z nerezavějící oceli o obsahu 300 l a kultivuje se při teplotě 25 °C, vzdušnění 75 l vzduchu/min. a míchání 190 obr./min. po dobu 168 hod. Postup se provede současně ve dvou stejných fermentorech. 300 litry takto získaného submersního vegetativního inokula se naočkuje 3000 l produkční pudy o složení

12 % glukózy, 1 % peptonu, 3 % řepné melasy, 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,02 % chloramfenikolu ve fermentoru z nerezavějící oceli o obsahu 5000 l. Kultivuje se při 28 °C ± 0,5 °C, vzdušnění 1500 l vzduchu/min. a míchání 200 obr./min. Ve 100. a 144. hodině kultivace se přidá vždy po 2 % glukózy a 1 % řepné melasy ve formě sterilního vodného roztoku. V 240. hodině kultivace obsahovala fermentační půda 1280 µg účinné látky/ml. Izolace byla provedena postupem podle čs. patentu 136 495.

Příklad 3

Inokulační materiál na prose (tzv. prosné konzervy) se připraví jako u příkladu 1. Přibližně 1/10 obsahu prosné konzervy I se naočkuje do 1000 ml inokulační pudy o složení 6 % glukózy, 2 % kukuřičné máčecí vody, 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,02 % chloramfenikolu a kultivuje se ve skleněném laboratorním fermentoru o obsahu 2 l při teplotě 25 °C, vzdušnění 0,5 l vzduchu/min. a míchání 600 obr./min. po dobu 168 hod. 100 ml takto připraveného submersního vegetativního inokula se použije k očkování 900 ml produkční pudy o složení 6 % glukózy, 6 % glycerolu, 4 % kukuřičné máčecí vody (CSL), 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 % chloramfenikolu a 0,5 % kyselého hydrolyzátu kaseinu. Kultivace probíhá za stejných podmínek jako u inokula s tím rozdílem, že kultivační teplota je 28 °C ± 0,5 °C. Při ukončení kultivace v 264. hodině byl nalezen obsah účinné látky 1485 µg/ml. Kontrolní systém, odlišný pouze nepřítomností kyselého hydrolyzátu kaseinu, poskytl pouze 1100 µg/ml účinné látky. Izolace byla provedena postupem podle čs. patentu 136 495.

Příklad 4

Inokulační materiál na prose (tzv. prosné konzervy) byl připraven jako u příkladu 1. Obsahem 1 prosné konzervy I se zaočkuje 10 l inokulační pudy o složení 6 % glukózy, 2 % kukuřičné máčecí vody (CSL), 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,02 % chloramfenikolu a kultivuje se ve fermentoru z nerezavějící oceli o obsahu 10 l při teplotě 25 °C, vzdušnění 5 l vzduchu/min. a míchání 400 obr./min. po dobu 168 hod. 1 litr takto připraveného submersního vegetativního inokula se použije k očkování 10 l produkční pudy o složení 12 % glukózy, 4 % kukuřičné máčecí vody (CSL), 0,2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 % chloramfenikolu a 0,5 % kyselého hydrolyzátu kaseinu (ve 100. hodině kultivace se přidají další 2 % glukózy ve formě sterilního vodného roztoku). Kultivace probíhá opět ve fermentoru z nerezavějící oceli o obsahu 20 l za stejných podmínek jako kultivace inokula s tím rozdílem, že kultivační teplota je 28 °C ± 0,5 °C. V 264. hodině kultivace byl nalezen obsah účinné látky 1692 µg/ml, kultivace byla ukončena a účinná látka izolována postupem podle čs. patentu 136 495.

Kontrolní systém, odlišný pouze nepřítomností kyselého hydrolyzátu kaseinu, poskytl pouze 1290 µg účinné látky/ml fermentační pudy.

Způsob přípravy protihoubového antibiotika Muciderminu, vyznačený tím, že ze submersní kultury basidiomycety *Oudemansiella mucida* (Sched. ex Fr.) Höhn. se připraví kultura na prose, kterou se přímo bez dalších mezistupňů očkují očkovací fermentory a z těchto dále produkční fermentory s živným médiem obsahujícím jako zdroj uhlíku glukózu anebo glycerol v hmotnostní koncentraci do 20 %, počítáno na hmotnost média, a jako zdroj dusíku řepnou případně třtinovou melasu v množství 0,5 až 2 %, nebo kukuřičnou

máčecí vodu v množství od 1 do 3 % v kombinaci s kyselým hydrolyzátem kaseinu v množství od 0,2 do 2 % a dále síran hořečnatý v množství do 1 % a stopová množství minerálních solí, jako chloridy, fosforečnany, jodidy, boritany anebo uhličitany a to vápenaté, sodné, draselné, hořečnaté, zinečnaté, měďnaté, kobaltnaté, manganaté, železnaté nebo železité, přičemž fermentace probíhá při teplotě 27 až 29 °C při počátečním pH 5 až 6 po dobu 200 až 300 hodin, načež se z média izoluje známým postupem protihoubové antibiotikum.