

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2002-4026**
(22) Přihlášeno: **09.12.2002**
(40) Zveřejněno: **12.10.2005**
(Věstník č. 10/2005)
(47) Uděleno: **08.02.2006**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.03.2006**
(Věstník č. 3/2006)

(11) Číslo dokumentu:

296 475

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12P 19/04 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
US 5576015; US 5702719; CZ 274918 B; CZ 281220 B.

(73) Majitel patentu:
MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, Praha, CZ

(72) Původce:
Flieger Miroslav RNDr. CSc., Praha, CZ
Votruba Jaroslav Ing. CSc., Praha, CZ
Pažoutová Sylva RNDr. CSc., Praha, CZ
Kantorová Michaela Mgr., Uničov, CZ
Cvak Jan Mgr., Praha, CZ
Benada Oldřich RNDr. CSc., Praha, CZ
Kofroňová Olga RNDr. CSc., Praha, CZ

(74) Zástupce:
Patentové a licenční služby SSČ AV ČR, tř. Politických
vězňů 7, Praha 1, 11121

(54) Název vynálezu:
**Způsob fermentační přípravy extracelulárního
glukanu pomocí hub Claviceps sp.**

(57) Anotace:
Způsob fermentační přípravy extracelulárního glukanu pomocí hub z rodu Claviceps, spočívající v tom, že se jako producent použije kmen hub z rodu Claviceps, který naprodukuje exopolysacharidy a neprodukuje alkaloidy a jim podobné biologicky aktivní látky, zejména ze skupiny kmenů Claviceps viridis a Claviceps maximensis, a submersní kultivace se provádí při teplotě 18 až 28 °C, na syntetickém kultivačním médiu, biomasa produkčního mikroorganismu se z kultivační tekutiny po fermentaci odstraní filtrací či odstředěním a retenát je po dialýze stabilizován do finální podoby lyofilizací. Neamorfní forma glukanu se připraví tak, že se retenát vystaví účinku stejnosměrného proudu v elektrokoagulačním zařízení s železnou či hliníkovou obětovanou elektrodou při proudové hustotě 0,05 až 0,8 mA/cm² plochy vnořených elektrod při napěťovém gradientu 0,2 až 2 V/cm vzdálenosti mezi dvěma elektrodami, nebo se v elektrokoagulačním zařízení použijí elektrody z nerezové oceli a do roztoku se přidají soli těžkých kovů, s výhodou soli hliníku, mědi, železa, kadmia nebo olova, v množství 2 až 15 ml nasyceného roztoku soli na 1 litr kultivační tekutiny.

CZ 296475 B6

Způsob fermentační přípravy extracelulárního glukanu pomocí hub *Claviceps* sp.

Oblast techniky

Vynález se týká dvoustupňového způsobu extracelulárního glukanu, založeného na využití hub rodu *Claviceps* sp.

Dosavadní stav techniky

3/1,6 β -glukan (dále glukan) je polysacharid, jehož výjimečné vlastnosti jsou v souvislosti s imunoprotektivním účinkem (Patent US 5 576 015 a 5 702 719) studovány (Hiroiku Ueno Beta-1,3-D-Glucan, its Immune Effect and its Clinical Use. Jap J. Soc. Terminal Systemic Diseases. 6:151-154, 2000) více než 40 let. Jelikož se glukan nejčastěji nachází ve stěnách mikroorganismů, představuje pro imunitní systém lidského organismu signál pro indukci nespecifické imunitní reakce. (Větvíčka, V, et al. Orally -administered yeast β -1,3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. J. Am. Nutraceutical Assoc. 5(2), 16-20, 2002). Glukan se tradičně izoluje z přírodních zdrojů jako je obilí (zejména oves, ječmen, žito: přihláška WO 2001/59147), dále pak z buněčných stěn mikroorganismů. Významným zdrojem glukanu je pekařské droždí (patent CZ 274918 a 281220) a biomasa vyšších hub (Borchers et al.. Mushrooms, tumors and immunity. Proc. Coc. Exp Biol Med. 221(4): 281-93, 1999). Hlavním technologickým problémem při izolaci a purifikaci čistého glukanu je množství dalších látek doprovázejících glukan ve výchozích přírodních materiálech (Autio et al. Effects of processing on the microstructure of oat bran concentrate and the physicochemical properties of isolated beta-glucans Food structure 11, 47-54, 1992). Tento problém je možno vyřešit za pomoci mikroorganismů, které produkují rozpustný glukan do fermentační půdy během submerzní kultivace. V roce 1991 publikoval (Lawford a Rosseau Bioreactor design considerations in the production of high-quality microbial exopolysaccharide Appl Biochem Biochem 28, 667-684) studii o fermentační přípravě velmi čistého exopolysacharidu (glukanu) v submerzní kultuře pomocí bakterií *Alcaligenes faecalis* a *Agrobacterium radiobacter*. V literatuře je také popsána nadprodukce (Buck et al. J. Gen. Microbiol. 51, 337-352 1968; Pažoutová et al., J. Nat. Prod. 44, 225-235, 1981) glukanu v submerzní kultivaci hub druhu *Claviceps* sp. doprovázená biosyntézou alkaloidů. Nespornou výhodou fermentační přípravy je poměrně snadná izolace glukanu srážením acetonem či ethanolom z kultivační tekutiny zbavené biomasy ve srovnání s komplikovanou technologií izolace glukanu z obilí. (Bhatty R. Extraction and enrichment of (1-3),(1-4)-Beta-D-glycan from barley and oat brans Cereal Chem. 70, 73-77 1993). Srážením rozpouštědly se však glukan trvale převede do nerozpustné amorfnní formy.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob fermentační přípravy extracelulárního glukanu pomocí hub z rodu *Claviceps*, při kterém je jako producent použit kmen hub z rodu *Claviceps*, který nadprodukuje exopolysacharidy a neprodukuje alkaloidy a jim podobné biologicky aktivní látky. Tuto podmínku splňují zejména kmeny vybrané ze skupiny *Claviceps viridis* a *Claviceps maximensis*. Pro přípravu extracelulárního glukanu podle vynálezu vykazují nejvhodnější vlastnosti kmeny *Claviceps viridis* a *Claviceps maximensis*, PF2. Submerzní kultivace se provádí při teplotě 18 až 28 °C, na syntetickém kultivačním médiu, biomasa produkčního mikroorganismu se z kultivační tekutiny po fermentaci odstraní filtrací či odstředěním a retenát je po dialýze stabilizován do finální podoby lyofilizací.

V případech, kde není podmínkou aplikace snadná rozpustnost glukanu lze tento produkt izolovat za použití modifikované metody elektokoagulace do neamorfnní formy (Mollah et al. Electrocoagulation(EC)-science and applications J Hazard. Mat. B84 29-41 2001).

Při této metodě se postupuje tak, že se retenát vystaví účinku stejnosměrného proudu v elektrokoagulačním zařízení s železnou či hliníkovou obětovanou elektrodou při proudové hustotě 0,05 až 0,8 mA/cm² plochy vnořených elektrod při napěťovém gradientu 0,2 až 2 V/cm vzdálenosti mezi dvěma elektrodami.

Tento postup je možno modifikovat tak, že se v elektrokoagulačním zařízení použijí elektrody z nerezové oceli a do roztoku se přidají soli těžkých kovů, s výhodou soli hliníku, mědi, železa, kadmia a olova v koncentraci 2 až 15 ml nasyceného roztoku soli na 1 litr kultivační tekutiny. Tímto postupem je možno ve spojení s účinkem stejnosměrného proudu připravit homogenní směs sférických nanočástic o různém průměru.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Rozpustný glukán byl připraven submerzní fermentací za pomoci kmene *Claviceps maximensis* PF2 ze sbírky Mikrobiologického ústavu AV ČR. Použitý kmen neprodukuje alkaloidy. Fermentace byla provedena v kultivačním zařízení BioFlo o pracovním objemu 1 litr (New Brunswick Scientific, Edison USA) při teplotě 24 °C, otáčkách míchadla 5 Hz a vzdušnění 0,3 VVM. Pro kultivaci byla použita půda T2 (Pažoutová et al., J.Nat. Prod. 44, 225–235, 1981) a fermentace probíhala vsádkovým způsobem bez automatické úpravy pH po dobu 8 dní. Po odstředění biomasy byla kultivační tekutina zbavena solí a zbytkového cukru za pomoci dialyzační trubice (Sigma Diagnostic, StLouis, USA) a vysušena v servisní lyofilizační jednotce BT MBU AV ČR. Výtěžek rozpustného glukánu byl 8,3 g/l kultivační tekutiny.

Příklad 2

Kultivační tekutina, získaná postupem popsaným v příkladu 1 byla nalita do elektrokoagulačního zařízení s dvěma železnými elektrodami a roztok byl po dobu 45 minut podroben účinku stejnosměrného elektrického proudu (potenciálový gradient 0,8 V/cm, proudová hustota 0,2 mA/cm² plochy vnořených elektrod). Po této době bylo 95 % glukánu převedeno do nerozpustné formy a ve finálním kroku separováno odstředěním na laboratorní odstředivce a po promytí dosušeno na konstantní hmotnost při 60 °C.

Příklad 3

Byla provedena submerzní kultivace kmene *Claviceps viridis* ve fermentoru MBR (Sultech, Švýcarsko) o pracovním objemu 7 litrů při teplotě 24 °C, otáčkách míchadla 2 Hz a vzdušnění 0,3 VVM. Pro kultivaci byla použita půda CS2 (Pažoutová et al., J.Nat.Prod. 44, 225–235, 1981) s počátečním obsahem sacharózy 50 g/l. Fermentace probíhala vsádkovým způsobem bez automatické úpravy pH po dobu 7 dní. Použitý kmen neprodukuje alkaloidy. Kultivační tekutina byla zbavena biomasy filtrací na vakuovém filtru. Bylo použito laboratorní zařízení pro elektrokoagulaci jako v příkladu 2 opatřené nerezovými elektrodami (potenciálový gradient 0,8 V/cm, proudová hustota 0,24 mA/cm² plochy vnořených elektrod) a do roztoku bylo přidáno 5 ml/litr nasyceného roztoku síranu měďnatého. Po 60 minutách působení stejnosměrného elektrického proudu byl všechen glukán převeden na nerozpustný glukán obsahující chemicky vázanou měď ve formě homogenní suspenze mikrosfér o průměru 3 až 5 μm. Celkový výtěžek byl 10,3 g/l fermentační pudy.

Průmyslová využitelnost

5 Rozpusťný glukanový preparát podle vynálezu lze použít jako potravinový přípravek s imunoprotektivním účinkem, při výrobě papíru a přípravě biodegradovatelných polymerních kompozitů. Nerozpustný glukan izolovaný pomocí elektrokoagulace je možno použít pro přípravu nanokompozitních membrán (E. Coronado a spol. Nature 408, 447 2000) vhodný pro použití v ultrapermeabilních membránových separačních jednotkách.

10

PATENTOVÉ NÁROKY

15

1. Způsob fermentační přípravy extracelulárního glukanu pomocí hub z rodu *Claviceps*, **vyznačující se tím**, že jako producent se použije kmen hub z rodu *Claviceps*, který naprodukuje exopolysacharidy a neprodukuje alkaloidy a jim podobné biologicky aktivní látky, zejména ze skupiny kmenů *Claviceps viridis* a *Claviceps maximensis*, a submerzní kultivace se
20 provádí při teplotě 18 až 28 °C, na syntetickém kultivačním médiu, biomasa produkčního mikroorganismu se z kultivační tekutiny po fermentaci odstraní filtrací či odstředěním a retenát je po dialýze stabilizován do finální podoby lyofylizací.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se retenát vystaví účinku stejnosměrného proudu v elektrokoagulačním zařízení s železnou či hliníkovou obětovanou elektrodou při proudové hustotě 0,05 až 0,8 mA/cm² plochy vnořených elektrod při napěťovém gradientu 0,2 až 2 V/cm vzdálenosti mezi dvěma elektrodami.

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že se v elektrokoagulačním zařízení
30 použijí elektrody z nerezové oceli a do roztoku se přidají soli těžkých kovů.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se do elektrokoagulačního zařízení přidá 2 až 15 ml nasyceného roztoku solí hliníku, mědi, železa, kadmia nebo olova na 1 litr
35 kultivační tekutiny.

40

Konec dokumentu
