



⑪

632 639

## ⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑯1 Gesuchsnummer: 10140/77

⑯3 Inhaber:  
Kureha Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha,  
Chuo-ku/Tokyo (JP)

⑯2 Anmeldungsdatum: 18.08.1977

⑯2 Erfinder:  
Chikao Yoshikumi, Kunitachi-shi/Tokyo (JP)  
Takao Furusho, Shinjuku-ku/Tokyo (JP)  
Kenichi Matsunaga, Hino-shi/Tokyo (JP)  
Noriyuki Toyoda, Hino-shi/Tokyo (JP)

⑯4 Patent erteilt: 29.10.1982

⑯4 Vertreter:  
Ritscher & Seifert, Zürich⑯5 Patentschrift  
veröffentlicht: 29.10.1982

## ⑯6 Verfahren zum Züchten von Basidiomyzeten.

⑯7 Basidiomyzeten vom Genus Coriolus der Polyporaceae werden in einem Glucose-Hefeextrakt-Medium gezüchtet, das Glucose und Hefeextrakt in bestimmten Anteilen enthält, um die durch Züchtung gewonnene Myzel ausbeute erheblich zu verbessern.

### PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Züchten von Basidiomyzeten, die zum Genus *Coriolus* der Polyporaceae gehören, dadurch gekennzeichnet, dass die Basidiomyzeten in einem Glucose-Hefeextrakt-Medium gezüchtet werden, das 7,5 bis 15 Gew.-% Glucose bei einem Verhältnis Glucose zu Hefeextrakt von 3:1 bis 15:1 enthält.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Glucose zu Hefeextrakt 6:1 bis 10:1 beträgt.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Glucosegehalt des Mediums im Bereich von 10–15 Gew.-% liegt.

4. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Basidiomyzet *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél. ist.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Züchten von Basidiomyzeten, die zum Genus *Coriolus* der Polyporaceae gehören, und insbesondere ein Züchtungsverfahren zur Verbesserung der Myzelausbeute der Basidiomyzeten durch Verwendung eines Glucose-Hefeextrakt-Mediums bestimmter Zusammensetzung.

Polysaccharide, die aus Basidiomyzeten erhältlich sind, welche zum Genus *Coriolus* der Polyporaceae gehören, haben in letzter Zeit wegen ihrer ausgezeichneten Antitumoraktivität und anderen pharmakologischen Effekten grosse Beachtung gefunden, und es hat sich ein Bedarf für vorteilhafte technische Verfahren zur Herstellung solcher Stoffe entwickelt, insbesondere Verfahren zur Züchtung von Basidiomyzeten mit hoher Ausbeute.

Ziel der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Züchtung der Basidiomyzeten vom Genus *Coriolus* der Polyporaceae, das die Myzelausbeute erheblich zu verbessern gestattet.

Die vorliegende Erfindung beruht auf Untersuchungen von Züchtungsmethoden, welche in der Lage sind, das Wachstum der Basidiomyzeten vom Genus *Coriolus* der Polyporaceae in hoher Ausbeute zu ermöglichen. Als Ergebnis wurde gefunden, dass die Myzelausbeute der Basidiomyzeten erheblich verbessert werden kann, wenn der Pilz unter Verwendung eines Glucose-Hefeextrakt-Mediums gezüchtet wird, das Glucose und Hefeextrakt in hohen Konzentrationen und in einem bestimmten Verhältnis enthält.

Bisher wurden für die Züchtung der Basidiomyzeten allgemein Medien verwendet, wie sie üblicherweise für die Züchtung von Mikroorganismen verwendet werden, und es wurden keinerlei Versuche gemacht, Glucose-Hefeextrakt-Medien bestimmter Zusammensetzung für die Züchtung der Basidiomyzeten zu verwenden.

Das Verfahren der Erfindung ist gekennzeichnet durch die Verwendung eines Glucose-Hefeextrakt-Mediums, das Glucose und Hefeextrakt in einem Verhältnis von 3:1 bis 15:1 enthält, wobei die Glucose im Medium 7,5 bis 15% aus-

macht, für die Züchtung von Basidiomyzeten, die zum Genus *Coriolus* der Polyporaceae gehören.

Durch das Verfahren der Erfindung lässt sich die Myzelausbeute bei der Züchtung von Basidiomyzeten, die zum Genus *Coriolus* der Polyporaceae gehören, durch Verwendung des Glucose-Hefeextrakt-Mediums mit einem Verhältnis von Glucose zu Hefeextrakt von 3:1 bis 15:1 und einem Glucosegehalt im Bereich von 7,5 bis 15% erheblich verbessern. Es ist zu bemerken, dass bei einem Verhältnis von Glucose zu Hefeextrakt in der Mediumzusammensetzung im Bereich von 3:1 bis 15:1 keine erhebliche Erhöhung der Myzelausbeute zu erwarten ist, wenn der Glucosegehalt des Mediums niedriger als 7,5% liegt. Ferner wird die Ausbeute wenig verändert, wenn der Glucosegehalt über 15% liegt, und daher ist die Verwendung von Glucose im Medium in Anteilen von über 15% wirtschaftlich nicht zweckmäßig. Wenn Basidiomyzeten vom Genus *Coriolus* unter Verwendung eines Glucose-Hefeextrakt-Mediums bestimmter Zusammensetzung erfindungsgemäß entsprechend obigen Angaben gezüchtet werden, lässt sich eine zwei- bis fünfmal höhere Ausbeute an Myzel erhalten, als wenn der Basidiomyzet unter Verwendung konventioneller Medien gezüchtet wird. Beispiele solcher konventioneller Medien sind natürliche Medien, wie Peptonmedien oder modifizierte Formen hieron, Malzextraktmedien, Kornextraktmedien, Maisquellwassermedien oder synthetische Medien, wie Pfeffer's Medium, Sabouraud's Medium oder Meyer's Medium. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet auch zwei- bis viermal höhere Myzelausbeuten als bei Verwendung irgendeiner Glucose-Hefeextrakt-Medien mit Zusammensetzungen außerhalb des erfindungsgemäß wesentlichen Bereichs. In bezug auf die Zusammensetzung des erfindungsgemäß verwendeten Glucose-Hefeextrakt-Mediums wird zum Erzielen der höchsten Ausbeuten die Verwendung von Medien bevorzugt, bei welchen der Glucosegehalt im Bereich von 10–15% und das Glucose-Hefeextrakt-Verhältnis im Bereich von 6:1 bis 10:1 liegt.

Das erfindungsgemäß verwendete Medium kann mit mindestens einem mineralischen Material aus der Gruppe der Phosphor, Mangan, Magnesium, Calcium, Eisen und dergleichen enthaltenden Salze sowie mit Nährstoffen, wie Vitaminen, versetzt werden.

Was die für das erfindungsgemäße Verfahren angewendeten Züchtungsbedingungen betrifft, wird die Züchtung allgemein bei Temperaturen von  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durchgeführt, und zwar während einer Zeitspanne von 3–10 Tagen im Falle von Submerskultur unter Belüftung und Rühren bzw. während 20–30 Tagen im Falle von stationären Kulturen.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Basidiomyzeten vom Genus *Coriolus* der Polyporaceae sind bekannt. Ihre mykologischen Eigenschaften sind z. B. in den Veröffentlichungen «Colored Illustration of Fungi of Japan» von Rokuya Imazeki und Tsuguo Hongo, Bände I, 1975, und II, 1974, beschrieben. Von diesen Basidiomyzeten sind die folgenden Arten beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Chiba-shi, Japan, der japanischen Regierung hinterlegt.

Art	Hinterlegungs-Nr.	Hinterlegungsdatum
<i>Coriolus versicolor</i> (Fr.) Quél. CM-103	FERM-P No. 2414	25.12.1973
<i>Coriolus consors</i> (Berk.) Imaz. CM-166	FERM-P No. 988	24.6.1971
<i>Coriolus hirsutus</i> (Fr.) Quél. CM-151	FERM-P No. 2711	6.9.1974
<i>Coriolus pargamenus</i> (Fr.) Pat. CM-161	FERM-P No. 2712	6.9.1974

Von diesen Basidiomyzeten wird die Verwendung von *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél. besonders bevorzugt.

Das durch Züchtung eines der oben genannten Basidiomyzeten vom Genus *Coriolus* erhaltene Myzel wird meist mit einem wässrigen Lösungsmittel, wie Wasser oder verdünnter alkalischer Lösung, extrahiert und die erhaltene Extraktlösung zur Eliminierung von niedermolekularen Fraktionen raffiniert, worauf der Rückstand weiter getrocknet wird. Hierdurch erhält man eine Substanz mit Polysaccharidaufbau. Das so erhaltene Polysaccharid enthält Stickstoff in der Molekülstruktur und zeigt eine ausgezeichnete Antitumoraktivität. Beim Verabreichen dieser Substanz an Mäuse zeigt sie nicht nur bei intraperitonealer, sondern auch bei oraler Verabreichung eine ausgezeichnete Antitumoraktivität. Zahlreiche Berichte über die Antitumoraktivität dieser Substanz sind angekündigt. Die Verwendbarkeit dieser Substanz ist jedoch nicht auf die Antitumorbehandlung beschränkt. Die Testergebnisse zeigen vielmehr eine ausgezeichnete Wirksamkeit dieser Substanz auf die Immunitätsregeneration des Patienten, die Unterbindung von Nebeneffekten der Chemotherapie und die Vermeidung einer Verschlechterung des physischen Zustandes des Patienten nach Operationen oder aus anderen Gründen. Bei den Untersuchungen wurde auch festgestellt, dass die orale Verabreichung dieser Substanz Wirkungen in bezug auf Appetitanregung, Behebung von Verdauungs- bzw. Darmstörungen und Förderung des Harnabgangs hat.

Im folgenden werden Ausführungsformen der Erfindung anhand von Beispielen erläutert. Angaben in Prozent beziehen sich auf das Gewicht.

#### Beispiel

Jeweils 20 ml Medium der in Tabelle I angegebenen Zusammensetzung wurden in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben gegeben. Jedes dieser Medien wurde mit einer Saatkultur von *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél. CM-103 (FERM-P Nr. 2414) angeimpft und bei 25–28 °C während 28 Tagen als stationäre Kultur gezüchtet. Nach Beendigung der Züchtung wurde die in jedem Kolben erhaltene Myzelausbeute bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I dargestellt, und

zwar zusammen mit den Ergebnissen von Vergleichsversuchen, bei welchen die Züchtung unter gleichen Bedingungen mit der Abänderung durchgeführt wurde, dass das verwendete Glucose-Hefeextrakt-Medium eine Zusammensetzung ausserhalb des für das erfindungsgemäße Verfahren angegebenen Bereiches hatte.

Tabelle I

	Glucose (%)	Hefeextrakt (%)	Glucose/Hefe-Extrakt	Myzelausbeute (g/Liter)
erfindungsgemäß	15	1,0	15	28,7
	15	1,25	12	33,0
	15	1,5	10	39,1
	12,5	1,0	12,5	43,2
	12,5	1,25	10	39,2
	12,5	1,5	8,3	42,9
	10,0	0,75	13,3	30,7
	10,0	1,0	10	35,4
	10,0	1,25	8,0	41,2
	10,0	1,5	6,7	40,6
Vergleich	7,5	0,5	15	27,6
	7,5	0,75	10	33,7
	7,5	1,0	7,5	32,2
	7,5	1,25	6	30,3
	2,5	0,25	10	11,0
	5,0	0,5	10	23,3
erfindungsgemäß	7,5	0,25	30	18,8
	10,0	0,5	20	23,1
	12,5	0,5	25	15,9
	15,0	0,75	20	22,8
	2,5	1,25	2	5,8

Aus Tabelle I ist zu ersehen, dass die Myzelausbeute, die durch Züchten nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten wurde, gegenüber den Vergleichsbeispielen erheblich verbessert ist.