



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

249461

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/38

(22) Přihlášeno 22 05 85
(21) PV 3661-85

(40) Zveřejněno 14 08 86

(45) Vydáno 15 12 87

(75)

Autor vynálezu

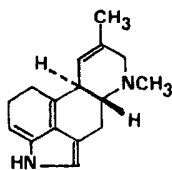
ŘEHÁČEK ZDENĚK RNDr. PhMr. DrSc., RYLKO VIKTOR RNDr., PRAHA

(54) Způsob potlačení tvorby extracelulárních glukánů a konidií
v submersních kulturách houby *Claviceps* produkujících alkaloidy
agroklavin a elymoklavin

Potlačení tvorby glukánů a konidií se provádí tak, že do fermentačního média se přidá sodná sůl fenobarbitalu o koncentraci 0,4 až 0,5 g L⁻¹ při pH 5 až 6. Výhodou je, že se sníží náklady na vzdušnění, míchání, odpěňování a chlazení média a zvýší extrahovatelnost alkaloidu z filtrátu fermentačního média.

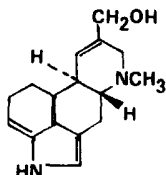
Vynález se týká způsobu potlačení tvorby extracelulárních glukánů a konidií v submersních kulturách houby *Claviceps* produkujících alkaloidy agroklavin a elymoklavin.

Dosud známé postupy pro produkci farmaceuticky významných alkaloidů agroklavinu (M. Abe et al., Jap. pat. 178 336) o strukturním vzorci I



(I)

a elymoklavinu (M. Abe et al., US Pat 2 835 675) o strukturním vzorci II



(II)

saprofytními kulturami houby rodu *Claviceps* jsou zatíženy nadměrnou tvorbou extracelulárních glukánů a intenzivní konidiací submersních kultur. Glukany ve vyšších koncentracích zvyšují viskozitu fermentačního média a negativně ovlivňují jeho rovnoměrné vzdušnění, míchání a chlazení. To má za následek nízké výtěžky alkaloidů z média a nesnadnou schůdnou izolaci alkaloidů. Extrakci alkaloidů ztěžují také konidie přítomné v médiu ve vyšším počtu.

Předmětem vynálezu je způsob potlačení tvorby extracelulárních glukánů a konidií v submersních kulturách houby *Claviceps* produkujících alkaloidy agroklavin a elymoklavin, jehož podstatou je, že do fermentačního média se přidá sodná sůl fenobarbitalu o koncentraci 0,4 až 0,5 g L⁻¹ při pH 5-6.

Tato sloučenina tvoří novou složku fermentačních médií v dříve popsaném postupu pro výrobu agroklavinu a elymoklavinu (Z. Řeháček et al. AO 199 986). Úlohu barbiturátu lze spatřovat v jeho inhibičním vlivu na fosfodiesterázu a ve stimulaci enzymu cytochrom P-450 (V. Rylko, v tisku). Barbiturát, např. fenobarbital (sodná sůl kyseliny 5-ethyl-5-fenylbarbiturové), lze do fermentačního média přidat před úpravou pH, sterilizací a zaočkováním média nebo v průběhu fermentace ve formě sterilního roztoku o upraveném pH. Inhibiční účinek barbiturátu na tvorbu glukánů a konidií stoupá se vzrůstající koncentrací barbiturátu (příklad 1).

Při výrobě agroklavinu a elymoklavinu používající pro přípravu vegetativního inokula média s vysokým obsahem fosforečnanů je možno způsob potlačení tvorby glukánů barbiturátem kombinovat se způsobem přípravy vegetativního inokula na médiu se sníženým obsahem fosfátu (příklad 2).

Dále jsou uvedeny příklady způsobu podle vynálezu.

P ř í k l a d 1

Submersní fermentace klavinových alkaloidů kmenem *Claviceps purpurea* CP/7/5/35 (Z. Řeháček et al. AO: 246 704) byly provedeny v Erlenmayerových bankách (300 ml) způsobem podle Z. Řeháčka et al. (AO 199 986). Jako nové složky fermentačního média bylo použito sodné soli fenobarbitalu v koncentraci 0,4 až 0,5 g.L⁻¹.

Složení základních fermentačních médií je uvedeno v tab. 1.

Tabulka 1: Složení základních fermentačních médií

Základní fermentační média 1, 2, 3

Složky (g.L^{-1})	1	2	3
sacharosa	100	80	100
glukosa	-	20	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	10	10
citronová kys.	15	15	-
jantarová kas.	-	-	10
sodná sůl fenobarbitalu	0,40	0,5	0,5
CaCl_2	1,2	1,2	1,1
KH_2PO_4	0,25	0,25	0,25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,015	0,015	0,015
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	0,02	0,02
dest. H_2O	0,02		

pH 5,5 (upraveno NaOH)

Obsah celkových alkaloidů ve fermentační tekutině byl stanoven podle J. E. Robberse et al. (J. Bacteriol. 112, 791, 1972), kvalitní stanovení směsi klavinových alkaloidů ve fermentační tekutině bylo provedeno podle Wursta et al. (J. Chromat. 150, 477, 1978). Extracelulární glukany byly stanoveny gravimetricky po vysrážení čtyřnásobným množstvím acetaátu. Intensita tvorby konidií ve fermentačním médiu byla sledována mikroskopicky.

Jak vyplývá z tabulky 2, fenobarbital přidáný do fermentačního média výrazně snížil (v kon. $0,40 \text{ g.L}^{-1}$) nebo dokonce vyloučil (v kon. $0,5 \text{ g.L}^{-1}$) nežádoucí tvorbu extracelulárních glukánů. Přitom mírně stimuloval produkci klavinových alkaloidů a významně se uplatnil jako inhibitor kondiace kultury.

Tabulka 2: Vliv fenobarbitalu na tvorbu extracelulárních glukánů a klavinových alkaloidů submersní kultury kmene *Claviceps purpurea* CP/7/5/35.

Fermentační médium		Glukany (g.L^{-1}) [§]	Alkaloidy (mg.L^{-1}) ^{§§}		
č.	Fenobarbital (g.L^{-1})		celkové	agro- klavin	elymo- klavin
1	0	42,2	2110	1540	528
	0,5	0	2364	1702	584
2	0	35,1	1965	1194	707
	0,4	11	2458	1548	836
3	0	38,4	2476	1906	495
	0,4	8,5	2371	1849	451
	0,5	0	2440	1830	537

§ 7. den fermentace v době svého maxima

§§ 16. den fermentace

Příklad 2

U kmene *C. purpurea* SL 096 (CCM F-733 bylo vegetativní inokulum připraveno na médiích A a B (Tab. 3) dříve popsaným způsobem (Řeháček et al. AO 199 986).

Tab. 3: Složení inokulačních médií A a B

Složky (g.L^{-1})	A	B
sacharosa	150	150
corn-steep (60%)	10	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3	0,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,2
KH_2PO_4	0,25	0,25
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1	1
jantarová kys.	10	10
dest. H_2O		

pH 5,2 (upraveno NaOH)

Vlastní fermentace probíhala při $24 \pm 1^\circ \text{C}$ v laboratorním feremontu (3 L) s 1,5 L média rozdílne míchaného a vzdušného.

Při použití inokulační půdy A pro přípravu submersního inokula a následně fermentační půdy 3 s fenobarbitalem ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) míchané 400 ot/min (počátečních 6 dní a 200 ot/min (následných 7 dní) s intenzitou vzdušnění $0,75 \text{ L/min}$ byla tvorba extracelulárních glukánů vyloučena a výtěžek celkových alkaloidů činil 1155 mg.L^{-1} , z toho agroklavinu 650 mg/L a elymoklavinu 400 mg/L . Při použití inokulační půdy B s fermentačního média 3 bez fenobarbitalu byl obsah extracelulárních glukánů vysoký (50 g/L) a produkce alkaloidů nízká (119 mg/L). Při použití inokulační půdy B a fermentačního média 3 s fenobarbitalem byla tvorba extracelulárních glukánů nízká (2 g/L) a produkce alkaloidů 411 mg/L .

P ř í k l a d 3

Kmen *C. fusiformis* W1 (Řeháček et al. AO 248612) byl kultivován způsobem uvedeným v příkladu 1. Jako fermentační médium bylo použito médium 3 a to jednak s fenobarbitalem ($0,5 \text{ g/L}$) jednak bez fenobarbitalu.

V médiu s fenobarbitalem byla zjištěna nízká koncentrace extracelulárních glukánů (48 g/L 7. den) a příznivý výtěžek klavinových alkaloidů, tj. 2993 mg/L s převahou elymoklavinu (21. den). Přitom médium nepěnilo a kultura tvořila pouze ojedinělé konidie. Naproti tomu v kontrolním médiu bez fenobarbitalu bylo zjištěno $36,4 \text{ g/L}$ glukánů a 2914 mg/L klavinových alkaloidů s dominantním elymoklavinem. Médium bohatě pěnilo a kultura v pozdní fázi intenzivně sporulovala.

Výhody použití kombinace médií inokulačního média s nízkým obsahem fosfátu a fermentačního média s barbiturátem, pro submersní fermentaci agroklavinu a elymoklavinu saprofytními kmeny houby *Claviceps* spočívající a) v potlačení až vyloučení tvorby extracelulárních glukánů, b) v redukci spolurace kultur, c) v příznivém ovlivnění produkce alkaloidů, d) ve snížení nákladů na vzdušnění, míchání, odpěňování a chlazení média, e) v ekonomičtější extrakci alkaloidů organickými rozpouštědly.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob potlačení tvorby extracelulárních glukánů a konidií v submersních kulturách houby *Claviceps* produkujících alkaloidy agroklavin a elymoklavin vyznačený tím, že do fermentačního média se přidá sodná sůl fenobarbitalu o koncentraci $0,4$ až $0,5 \text{ g L}^{-1}$ při pH 5 až 6.