

Vliv chloramfenikolu na produkci klavinových alkaloidů submerzními kulturami *Claviceps fusiformis*

579.1 683.1

RNDr. STANISLAVA CHOMÁTOVÁ, CSc., Ing. PETR PILÁT, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy, Ing. JANA HRUBÁ, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Klíčová slova: *Claviceps fusiformis*, klavinové alkaloidy, mikroorganismus, fermentace submerzní produkce, chloramfenikol, inhibice

1. Úvod

Při přípravě klavinových alkaloidů submerzními kulturami houby *Claviceps* s dlouhodobými inokulačními i produkčními fázemi je ekonomicky velmi významné zajistit sterilitu fermentačních procesů. Bakteriálnímu znečištění pomalu rostoucích kultur *Claviceps* je třeba zabránit zejména v počáteční fázi fermentace. Pro tento účel se jako o vhodném širokospektrém antibiotiku s minimálním vlivem na růst hub [2, 3] uvažuje i o chloramfenikolu (CHF). Cílem této práce bylo vyšetřit vliv CHF na růst mycelia a produkci klavinových alkaloidů submerzními kulturami *Claviceps*.

2. Materiál a metody

V experimentech byla použita saprofytní kultura *Claviceps fusiformis* kmen W1 [6] vyrostlá na T2 médiu [7]. Submerzní kultivace inokulačního i produkčního fermentačního stupně probíhala v 300 ml Erlenmeyerových baňkách s plněním 60 ml média na rotační třepačce (240 ot. min⁻¹, excentr 25 mm) v temnu při 24 ± 1 °C.

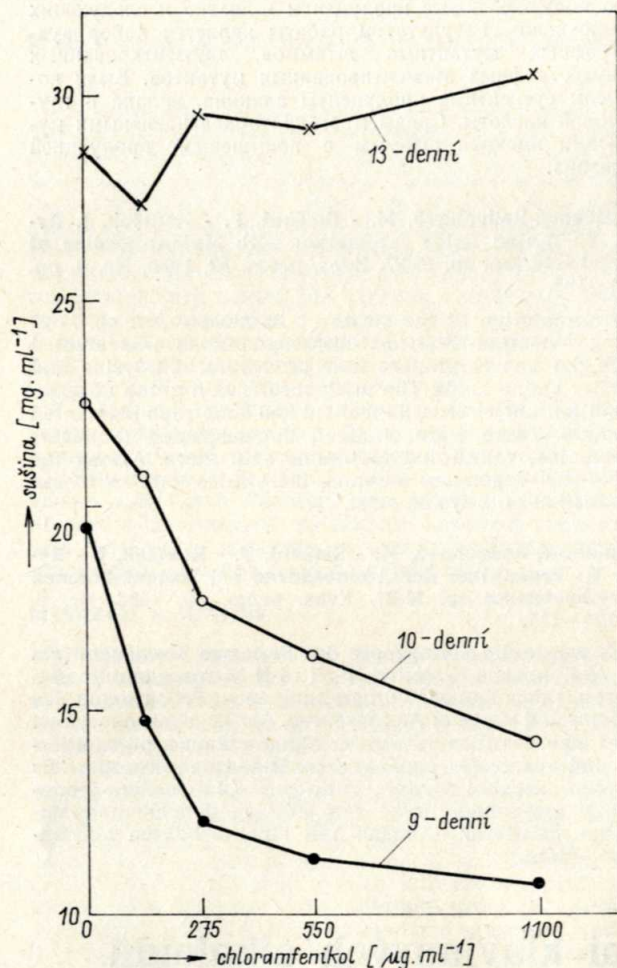
Hlavními složkami inokulačního i produkčního média byla sacharóza a kyselina jantarová. Hlavním zdrojem uhlíku v inokulačním médiu byl kukuřičný výluh a v produkčním médiu síran amonný. CHF bylo použito ve formě chloramfenikoljantaranu sodného (SPOFA).

Celkové množství klavinových alkaloidů bylo stanoveno van Urkovým činidlem [5]. Relativní celková produkce alkaloidů byla určena jako poměr celkové produkce alkaloidů při sledované koncentraci CHF a kontrolní produkce alkaloidů bez CHF a vyjádřena v procentech. Jednotlivé složky směsi klavinových alkaloidů byly určeny tenkovrstvou chromatografií podle *Agurella* [1] a kvantitativně vyhodnoceny densitometricky [4]. Sušina mycelia byla stanovena gravimetricky.

3. Výsledky

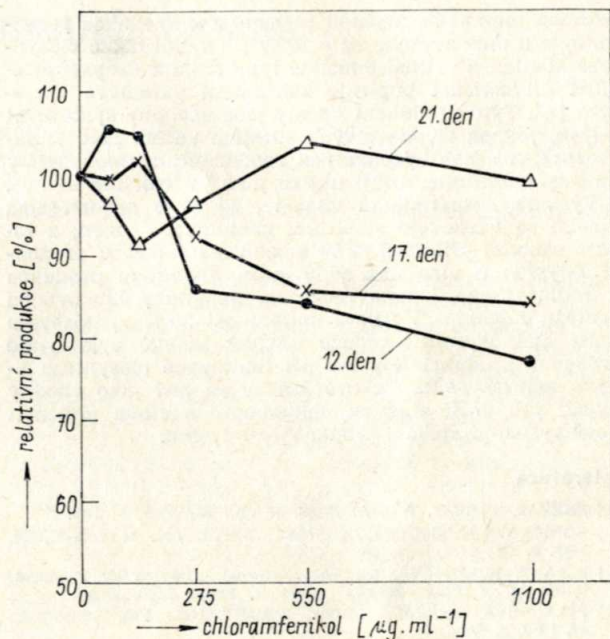
Ze závislosti množství sušiny mycelia kmene W1 na koncentraci CHF v inokulačním médiu (*obr. 1*) vyplývá, že CHF ovlivňuje růst mycelia. Toto ovlivnění závisí na délce fermentační přípravy vegetačního inokula. U devítidenního a desetidenního vegetativního inokula se inhi-

bice růstu mycelia projevuje při koncentracích od 140 $\mu\text{g CHF} \cdot \text{ml}^{-1}$ média. S délkou fermentační přípravy vegetativního inokula se inhibice růstu mycelia CHF zmenšuje. U třináctidenního vegetativního inokula je množství sušiny mycelia na koncentraci CHF téměř nezávislé.



Obr. 1. Závislost množství sušiny mycelia na koncentraci chloramfenikolu v inokulačním médiu pro 9, 10 a 13denní vegetativní inokulum.

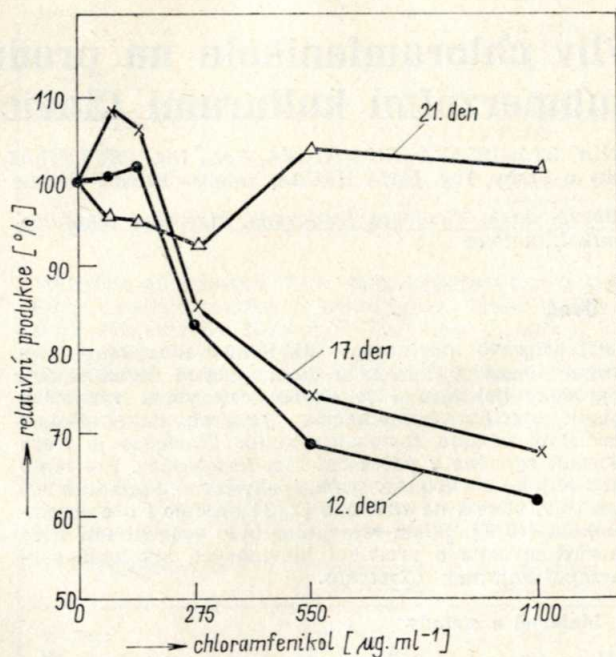
V první sérii experimentálního hodnocení závislosti produkce alkaloidů na koncentraci CHF (obr. 2 – obr. 5) bylo použito jedenáctidenního vegetativního inokula. Na obr. 2 je uvedena závislost relativní celkové produkce alkaloidů na koncentraci CHF v inokulačním médiu pro 12denní, 17denní a 21denní dobu produkční fermentace. Je zřejmé, že inhibice biosyntézy alkaloidů pro 12denní a 17denní fermentaci nastává od koncentrace 275 $\mu\text{g CHF} \cdot \text{ml}^{-1}$ inokulačního média a že s rostoucí koncentrací CHF se inhibice zvětšuje. Podstatně odlišná je však závislost relativní celkové produkce alkaloidů na koncentraci CHF pro 21denní fermentaci. V tomto případě inhibice produkce alkaloidů při vyšších koncentracích CHF téměř nenastává. Stejný charakter závislosti se experimentálně získá při přidání stejných koncentrací CHF jak do inokulačního, tak do produkčního média (obr. 3). V této variantě pokusu je v 12denní a 17denní fermentaci biosyntéza alkaloidů inhibována výrazněji než v předešlém případě. Avšak stejně jako v předešlém případě se vliv CHF neprojevuje u 21denní fermentace. Experimentální výsledky pro použití CHF pouze v produkčním médiu jsou uvedeny na obr. 4. Pro sledovanou 12denní, 17denní a 21denní fermentaci dochází k velmi výrazné inhibici produkce alkaloidů. Inhibice nastává přibližně od koncentrace 550 $\mu\text{g CHF} \cdot \text{ml}^{-1}$ produkčního



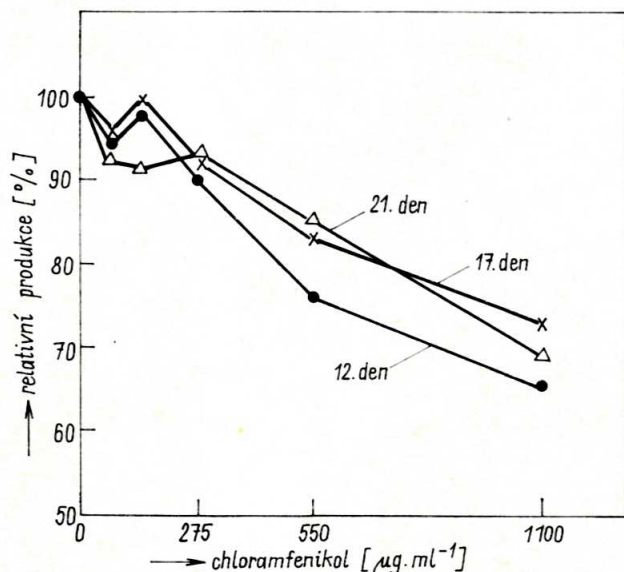
Obr. 2. Závislost relativní produkce alkaloidů na koncentraci chloramfenikolu přidaného do inokulačního média pro 12., 17. a 21. den produkční fermentace.

média. Relativní celková produkce alkaloidů klesá s koncentrací CHF prakticky stejným způsobem pro všechny sledované doby fermentace.

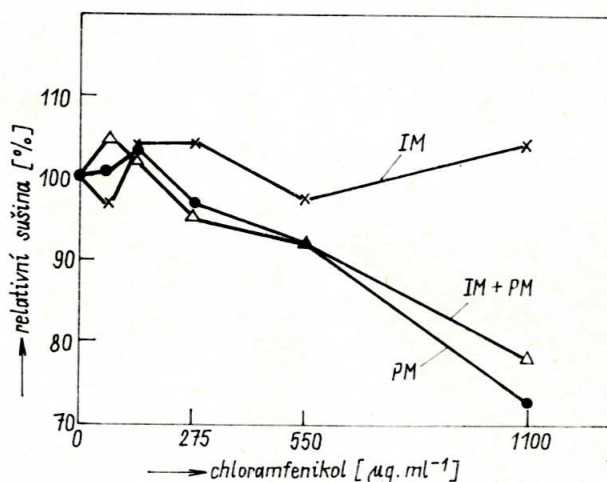
Závislost množství sušiny mycelia z 21. dne produkční fermentace na koncentraci CHF a způsobu jeho použití je uvedena na obr. 5. Je-li CHF přidán pouze do produkčního média nebo ve stejných koncentracích do inokulačního i produkčního média, je množství sušiny mycelia pro všechny použité koncentrace CHF téměř stejné. Při koncentraci 550 $\mu\text{g CHF} \cdot \text{ml}^{-1}$ produkčního média



Obr. 3. Závislost relativní produkce alkaloidů na koncentraci chloramfenikolu přidaného ve stejných koncentracích do inokulačního i produkčního média pro 12., 17. a 21. den produkční fermentace.



Obr. 4. Závislost relativní produkce alkaloidů na koncentraci chloramfenikolu přidaného do produkčního média pro 12., 17. a 21. den produkční fermentace.



Obr. 5. Závislost relativní sušiny mycelia pro 21. den produkční fermentace na koncentraci chloramfenikolu a způsobu jeho přidávání do médií. IM — inokulační médium, PM — produkční médium.

dochází přibližně k 10% inhibici růstu mycelia a při koncentraci $1100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ produkčního média přibližně k 25% inhibici. Inhibice růstu mycelia se však neprojevuje po přidání CHF pouze do inokulačního média.

V druhé sérii pokusů bylo pro submerzní fermentaci použito třináctidenního vegetativního inokula. CHF byl přidán pouze do inokulačního při přípravě vegetativního inokula. V celém rozsahu použitých koncentrací $0-1380 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ inokulačního média se vliv CHF prakticky neprojevil ani na množství sušiny mycelia, ani na celkovou produkci alkaloidů.

V žádném z provedených experimentů nebylo spektrum klavinových alkaloidů přidáním CHF ovlivněno.

Orientačním hodnocením bylo zjištěno, že CHF v koncentracích od 70 do $140 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ média měl bakteriostatický účinek na rody *Bacillus*, *Macroccoccus*, *Staphylococcus* a *Sarcina*.

4. Závěr

Uvedené výsledky ukazují možnost použití CHF jako ochranného prostředku proti bakteriálním kontamina-

cím při submerzní kultivaci kultur *Claviceps*. Vliv CHF v koncentracích přibližně od 70 do $255 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ média pouze málo ovlivňuje konečnou celkovou produkci alkaloidů pro všechny způsoby použití CHF. Při vyšších koncentracích, přibližně od $550 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ média, dochází k výrazné inhibici konečné produkce alkaloidů po přidání CHF jen do produkčního média, zatímco v ostatních dvou případech inhibice prakticky nenastává. Z uvedeného vyplývá, že z hlediska zachování celkové produkce alkaloidů je podstatné přidání CHF do inokulačního média. Prakticky významný je poznatek, že spektrum alkaloidů není CHF ovlivněno.

Literatura

- [1] AGURELL, S.: Acta Pharmaceutica Suecica 2, 1965, s. 357—374.
- [2] HAHN, F. E.: Antibiotics I, Mechanism of Action (Eds. Gottlieb, D., Shaw, P. D.) Springer-Verlag Berlin, New York, 1967, s. 308—330.
- [3] PESTKA, S.: Ann. Rev. Microbiol. 25, 1972, s. 487—562.
- [4] PROŠEK, M., KUČAN, E., KATIČ, M., BANO, M.: Chromatografia 10, 1977, s. 147.
- [5] ROBBERS, J. E. et al.: J. Bacteriol. 112, 1972, s. 791—796.
- [6] ŘEHAČEK, Z., SAJDL, P., KOZOVÁ, J., KŘEN, V., a RYKO V.: Čs. patent, 1984, PV 8832-84.
- [7] SPALLA, C.: Genetics of Industrial Microorganisms (Eds. Vaněk, Z., Hošťálek, Z. a Cudlín, J.) Elsevier, Amsterdam, 1973, s. 393.

Chomátová, S., Pilát P., Hrubá, J. Vliv chloramfenikolu na produkci klavinových alkaloidů submerzními kulturami *Claviceps*. Kvas. prům., 32, 1986, č. 6, s. 135—138.

Práce pojednává o vlivu chloramfenikolu na růst mycelia a produkci alkaloidů při submerzní kultivaci *Claviceps*. Chloramfenikol inhibuje růst mycelia a produkci klavinových alkaloidů v inokulační fázi do koncentrace $275 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ půdy a v produkční fázi od $550 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ půdy. Míra inhibice závisí na délce kultivace. Inhibice růstu mycelia i produkce alkaloidů se projevuje především v první části fermentace. Podle způsobu použití chloramfenikolu se produkce alkaloidů na konci produkčního procesu buď sníží, nebo zůstane zachována. Až do sledované koncentrace $1100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ půdy není spektrum alkaloidů chloramfenikolem ovlivněno. Z výsledků vyplývá možnost použití chloramfenikolu k antibakteriální ochraně fermentace bez podstatného ovlivnění produkce alkaloidů.

Хоматова, С., Пилат П., Груба Я.: Влияние хлорамфеникола на образование клавиновых алкалоидов при глубинном выращивании культуры *Claviceps fusiformis*. Квас. прум. 32, 1986, № 6, стр. 135—138.

Работа анализирует влияние хлорамфеникола на рост мицелия и образование алкалоидов при глубинном выращивании культуры *Claviceps fusiformis*. Хлорамфеникол подавляет рост мицелия и образование клавиновых алкалоидов в посевной фазе с концентрацией $275 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ среды. Степень подавления зависит от продолжения культивации. Подавление роста мицелия и образование алкалоидов выражено прежде всего в первой фазе ферментации. Падение или сохранение образования алкалоидов в конце ферментационного процесса зависит от способа использования хлорамфеникола. Хлорамфеникол в концентрации до $1100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ среды не имеет влияния на спектр алкалоидов. Результаты исследований показывают, что хлорамфеникол обеспечивает антибактериальную защиту ферментационного процесса не оказывая подавляющего влияния на образование алкалоидов.

Chomátová S., Pilát P., Hrubá J.: Effect of the Chloramphenicol on the Submerged Clavine Alkaloid Biosynthesis by *Claviceps fusiformis*. Kvas. prům. 32, 1986, No. 6, pp. 135—138.

The paper deals with the chloramphenicol effect on the culture growth and alkaloid biosynthesis during the submerged cultivation of *Claviceps fusiformis* Wl. Chloramphenicol inhibition of both the growth and production was observed in the inoculation phase (at $275 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) and in the production phase (at $550 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). The inhibition extent depends on the cultivation time. The mycelia growth and product biosynthesis suppression

occur above all in the first part of the process. The product of biosynthesis remains the same or decreases according to the manner of inhibitor dosing. The alkaloid spectrum produced is not influenced by chloramphenicol in the concentration range 0—1100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. The results show the possibility of applying chloramphenicol to the antibacterial protection of the fermentation without substantial negative effects on alkaloid biosynthesis.

Chomátová, S. - Pilát, P. - Hrubá, J.: Einfluss des Chloramphenikols auf die Alkaloidbildung von *Claviceps fusiformis*. Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 6, s. 135—138.

Die Arbeit befasst sich mit dem Einfluss des Chloramphenikols auf das Wachstum und Alkaloidbildung der

submerskultur von *Claviceps fusiformis* Wl. Wir stellten den Hemmungsanfang des Wachstums und der Alkaloidbildung in der Inokulationphase bei der Konzentration 275 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ und der Produktionphase 550 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ fest. Das Maß der Hemmung hängt auf der Kultivationslänge ab. Sie äussert sich vor allem in dem ersten Teil der Kultivation. Die Alkaloidbildung auf der Prozessende geht zurück oder bleibt dieselbe im Vergleich mit der Kontrollkultivation nach den Inhibitorabgaben. Das Alkaloidspektrum ist bis zur Konzentration 1100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ nicht beeinflusst. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die Verwendung des Chloramphenikols zum antibakteriellen Schutz der Fermentation ohne wesentlicher Einfluss auf Alkaloidbildung möglich ist.