

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

248612

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 19 11 84
(21) PV 8832-84

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 17 07 86

(45) Vydáno 15 02 88

(75)

Autor vynálezu

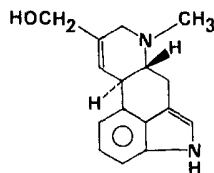
ŘEHÁČEK ZDENĚK RNDr., DrSc., SAJDL PŘEMYSL RNDr. CSc.,
KOZOVÁ JAROSLAVA RNDr., KŘEN VLADIMÍR ing.,
RYLKŮ VIKTOR RNDr., PRAHA

(54) Průmyslový mutant houby *Claviceps fusiformis* W1 CC-1/85

Řešení se týká nového průmyslového mutantu houby *Claviceps fusiformis* W1 produkující alkaloid elymoklavin, uložený ve sbírce mikroorganismů Mikrobiologického ústavu ČSAV v Praze 4 pod č. CC 1/85.

Submersní fermentací tohoto kmene lze několikanásobně zvýšit produkci klavinových alkaloidů, zejména farmakologicky významného alkaloidu elymoklavinu.

Vynález se týká nového průmyslového mutantu kmene *Claviceps fusiformis* W1 produkující farmaceuticky významný alkaloid elymoklavin (M.Abe et al., US Pat. 2835675) strukturního vzorce



Vzorky mutantu jsou uloženy ve sbírce mikroorganismů Mikrobiologického ústavu ČSAV v Praze 4 pod označením *Claviceps fusiformis* pod č. CG 1/85.

Mutant byl získán ze 70 isolátů připravených níže popsaným mutačním působením UV zářením na laboratorní kmen *Claviceps fusiformis* MI525 (Mikrobiologický ústav ČSAV v Praze 4).

Příprava vysokoprodukčního mutantu. Veškeré statické kultivace kmene probíhaly v temnu při 24 ± 1 °C na agarové půdě T2 (C.Spalla, in Genetics of Industrial Microorganisms. Eds. Z.Vaněk, Z.Hošťálek, J.Cudlín. Elsevier, Amsterdam 1973, p.393). Půda T2 obsahovala tyto složky (g.L^{-1}): sacharosa 100, L-asparagin 10, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1, kvasničný extrakt 0.1, KH_2PO_4 0.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, KCl 0.12, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015, agar 20, dest. H_2O , pH 5.2 po sterilizaci v autoklávu 15. min. při 105 °C.

Spóry 21 denní rodičovské kultury *Claviceps fusiformis* MI525, vyrostlé na sešikmené agarové půdě T2 v Endo zkumavkách, byly smyty s povrchu kultury destilovanou vodou. 5 ml takto získané suspenze obsahující přibližně $1,5 \cdot 10^7$ spór v 1 ml bylo přeneseno na Petriho misku ($\varnothing$ 10 cm) a ozářeno zdrojem UV nastaveným na $10 \text{ uJ.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dávkou $0,1 \text{ mJcm}^{-2}$ (1 000 erg).

Ozářená suspenze spór byla vhodně naředěna dest. vodou a spóry obsažené v 5 ml výsledné suspenze byly vysety na povrch agarové půdy T2 v Petriho misce ($\varnothing$ 10 cm) a inkubovány 21 dní.

Kolonie vyrostlé z autogenisovaných spór, byly pak jednotlivě přeneseny na sešikmenou agarovou půdu T2 a inkubovány 21 až 28 dní.

Narostlé kultury byly testovány na schopnost tvořit elymoklavin a další klavinové alkaloidy v podmínkách submersní fermentace (Řeháček et. al., čs. AO 199986).

Alkaloidy byly stanoveny ve fermentační půdě 21 denních submersních kultur kalorimetricky (G.J.Banks et al., J.gen. Mikrobiol 82,345,1974) a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (M.Wurst et. al., J.Chromat. 150,477, 1978).

Charakteristika vysokoprodukčního mutantu. Srovnání základních znaků vysokoprodukčního kmene W1 se znaky rodičovského kmene MI 525 je uvedeno v tab. 1.

a) Kultivace na agarovém mediu T2.

Mutant W1 roste na agarovém mediu T2 při teplotě 24 ± 1 °C v souvislé bohatě zvrásněné vrstvě tvořené šedým myceliem a oválnými konidiemi. Do media vylučuje fialový pigment.

b) Submersní kultivace

Submersní kultivace nového kmene W1 i rodičovského kmene MI 525 byla provedena při teplotě 24 ± 1 °C na rotačním třepacím stroji i v laboratorním fermentoru na upraveném fermentačním mediu CS2 (čs. AO 199986). Submersní kultury kmene W1 se vyznačují vláknitým, větveným mnohobuněčným myceliem, které vytváří četné mikro- a makrokonidie a na konci fermentace se

se rozpadá na blastoarthrospóry. Submersní vývoj kmene W 1 je provázen tvorbou fialového exocelulárního pigmentu.

Ve srovnání s rodičovským kmenem *Claviceps fusiformis* WI 525 se mutant W 1 vyznačuje téměř trojnásobně vyšší produkcí elymoklavinu a polovičním obsahem nežádoucích exogenních glukonů. V podmínkách submersní fermentace produkuje v 1 l média 4,2 g klavinových alkaloidů, z toho 2,5 g elymoklavinu. Průvodní alkaloidy jsou agroklavin a chanoklavin. Srovnání základních znaků vysokoprodukčního mutantu W 1 se znaky rodičovského kmene *C.fusiformis* WI525 je uvedeno v tab. 1. Mutant podle vynálezu je uchován v temnu při 4 °C, zabezpečen proti vysychání média, a to ve formě 21 denních kultur vyrostlých na sešikmeném mediu T2 v Endo zkumavkách při teplotě 24 ± 1 °C. Uchovávané kultury jsou pravidelně přeočkovávány ve tříměsíčních intervalech.

Vynálezem chráněný vysokoprodukční mutant *Claviceps fusiformis* W 1, zabezpečuje klíčový úsek velkokapacitní přípravy elymoklavinu submersní fermentací.

Tabulka 1

Z n a k	Kultura na agarové půdě T2		Submersní kultura [§]	
	kmen W1	kmen MT525	kmen W1	kmen MI525
Nárůst	bohatý v souvislé vrstvě	sporý v jednotlivých koloniích	dobrý	bohatý
Zbarvení vzdušného mycelia	šedé	hnědobílé	-	-
Konidie	oválné	oválné	makrokonidie mikrokonidie	protáhle oválné
Rozpusťný pigment	fialový	hnědočervený	tmavofialový	hnědorůžový
Exogenní glukany (g.L ⁻¹)	-	-	20	40
Celkové alkaloidy (g.L ⁻¹)	-	-	4,2	1,2
Elymoklavín (g.L ⁻¹)	-	-	2,5	0,9

§ V upravené fermentační půdě CS2 (čs. autorské osvědčení 199986)

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Průmyslový mutant houby *Claviceps fusiformis* W1 CC - 1/85 produkující alkaloid elymoklavín.