



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

253097

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/14

(22) Přihlášeno 11 02 86

(21) PV 924-86

(40) Zveřejněno 12 03 87

(45) Vydáno 16 05 88

(75)

Autor vynálezu

ŘEHÁČEK ZDENĚK RNDr. PhMr. DrSc., PAŽOUTOVÁ SYLVIE RNDr. CSc.,
RYLKO VIKTOR RNDr., KOZOVÁ JAROSLAVA RNDr., SAJDL PŘEMYSL RNDr. CSc.,
CHOMÁTOVÁ STANISLAVA RNDr. CSc., PILÁT PETR ing. CSc.,
BÁRTA MIROSLAV RNDr., HOMOLKA LADISLAV RNDr. CSc., PRAHA,
BŘEMEK JAN RNDr., MALINKA ZDENĚK RNDr., KRAJÍČEK ALOIS PhMr.,
SPÁČIL JIŘÍ PhMr., OPAVA

(54) Průmyslový kmen houby *Claviceps fusiformis* Loveless F 27 CC-4/85

Předmětem řešení je nový průmyslový kmen houby *Claviceps fusiformis* Loveless F 27 produkující alkaloidy elymoklavin a agroklavin submerzní fermentací, uložený ve sbírkách Mikrobiologického ústavu ČSAV v Praze pod č. CC-4/85. Kmen v podmínkách hloubkové kultivace produkuje vysoká množství klavinových alkaloidů s výhodným zastoupením elymoklavinu, nízkou hladinou původního chanoklavinu a zanedbatelnou tvorbou exopolysacharidů. Další výhodou nového kmene je bohatá klíčivost konidií na agarových živných médiích. Použití kmene při fermentační produkci alkaloidů elymoklavinu a agroklavinu umožní zefektivnit vlastní fermentační postup, extrakci a izolaci alkaloidů i následnou výrobu polysyntetických léčebných preparátů.

Vynález se týká nového průmyslového kmene houby *Claviceps fusiformis* Lovelless, produkující alkaloidy elymoklavin a agroklavin submersní fermentací.

Agroklavin se vyznačuje mimořádnými biologickými účinky, např. inhibuje lakataci (P.G. Mantle, Proc. Royal Soc. B. 170, 423, 1968), brání implantaci fertilizovaného vajíčka (G. Mantle, J. Reprod. Fertility 18, 81, 1969), vykazuje účinky antibakteriální (S. Schwarz a E. Eich, Planta Med. 47, 212, 1983), a cytostatické (E. Eich et al., Biochem. Pharm. 33, 4, 1984).

Elymoklavin se vyznačuje antibakteriální aktivitou (G. Schwarz a E. Eich, Planta Med. 47, 212, 1983) a je výhodným substrátem pro přípravu farmakologicky významných polosyntetických derivátů kyseliny lysergové, např. nicergolinu (Tung-Chung Choong, H. R. Shough, Tetrahedron Letters 19, 1627, 1977; M. Semonský, N. Kucharzsyk, Coll. Czech. Chem. Commun. 33, 577, 1968; M. Beran et al. Coll. Czech. Commun. 39, 1768, 1974; J. Křepelka et al., Coll. Czech. Chem. Commun. 42, 1412, 1977; Belg. pat. 633 438).

Fermentační produkce klavinových alkaloidů není dosud uspokojivě vyřešena. Sčkoliv byla popsána v řadě publikací (M. Abe a S. Yamatodani, Progr. Ind. Microbiol. 5, 205, 1964; L. Vinning a P. M. Nair, Can. J. Microbiol. 12, 915, 1966; A. Tonolo a E. Udvardy-Nagy, Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 15, 29, 1968; Čs. AO 199 986), vesměs zůstává zatížena nízkou výtěžností a délkou procesu.

Uvedené nedostatky do značné míry odstraňuje nový průmyslový kmen houby *Claviceps fusiformis* Lovelless F 27, produkující alkaloidy elymoklavin a agroklavin submersní fermentací, uložený ve sbírkách Mikrobiologického ústavu ČSAV v Praze, pod č. CC-4/85.

Charakteristika nového kmene F27

Nový kmen houby *C. fusiformis* F27 (dále jen kmen F27) roste na agarovém živném médiu T2 pozvolně za tvorby souvislé silně zvrásněné vrstvy šedo zelenavého vzdušného mycelia, které do média vylučuje olivově zelený pigment. Vzdušné mycelium bohatě sporuluje. Tvoří $3-4 \times 10^7$ /cm² spór, převážně (80 %) mikrokonidií (2x3-5 um) a v menší míře makrokonidií (2x10 um). Z některých buněk mycelia vznikají chlamydospóry a arthrospóry. Submersní mutanta F27 jsou charakterizována dlouhými vlákny větveného mnohobuněčného mycelia složeného zpočátku ze sfaceliálních buněk a u staršího mycelia z buněk sklerociálních. Submersní vývoj kultury je provázen tvorbou makro- a mikrokonidií.

Jak vyplývá z tab. 1, nový kmen F27 se do mateřského kmene W1 liší intenzitou a charakterem růstu na garovém živném médiu T2, zbarvením vzdušného mycelia, tvorbou rozdílného rozpustného pigmentu a výrazně vyšší klíčivostí konidií. Submersní kultury kmene F27 se ve srovnání s mateřským kmenem W1 vyznačují vyšší produkcí klavinových alkaloidů, vyšším zastoupením elymoklavinu a nižší hladinou průvodního chanoklavinu (tab. 2).

Tab. 1 - Srovnání nového kmene *C. fusiformis* F27 s mateřským kmenem *C. fusiformis* W1 na agarovém médiu T2

Znak	F2	W1
Růst	pozvolná tvorba silně zvrásněné vrstvy mycelia	intenzivní tvorba mírně zvrásněné vrstvy mycelia
Zbarvení vzdušného mycelia	šedo zelené	nařialovělé
Rozpustný pigment	olivově zelený	červenofialový
Klíčivost konidií (%)	5,5	1,4

Tab. 2 - Produkce klavinových alkaloidů novým kmenem *C. fusiformis* F27 a mateřským kmenem *C. fusiformis* W1 v podmínkách submersní fermentace[†]

Kmen	Mutagen typ	dávka (erg)	celkové g/l	elymoklavin %	agroklavin %	chanoklavin %
F27	UV	1 000	4,4	71	24	3
W1	-	-	4,0	57	28	12

[†]Na rotačním třepacím stroji v Erlenmayerových baňkách (300 ml) s 60 ml média (Řeháček et al. AO 199 986).

Kmen F27 byl vyšlechtěn z průmyslového kmene *C. fusiformis* W1 (čs. AO 000 000). Veškeré kultivace kmenů probíhaly v temnu při 24 ±1 °C. Spóry mateřské kultury *C. fusiformis* W1, která byla kultivována 3 až 4 týdny v Endo zkumavkách na zešíkmené agarové živné půdě T2 (*C. Spalla*, in *Genetics of Industrial Microorganisms*. Eds. Z. Vaněk, Z. Hošťálek, J. Cudlín, Elsevier, Amsterdam 1973, p. 393), byly suspendovány ve fyziologickém roztoku. Výsledná suspenze obsahovala vždy 1 až 4.10⁷.ml⁻¹ spór. Médium T2 pozůstávalo z následujících složek (g/l dest. H₂O): sacharóza 100, L-asparagin 10, Ca(NO₃)₂.4 H₂O 1, kvasničný extrakt 0,1, KH₂PO₄ 0,25, MgSO₄.7 H₂O 0,25, KCl 0,12, FeSO₄.7 H₂O 0,02, ZnSO₄.7 H₂O 0,015, agar 20, pH 5,2 po 15min sterilizaci v autoklávu při 105 °C.

Ze suspenze spór ve fyziologickém roztoku bylo 5 ml obsahující přibližně 1,5x10⁴ spór přeneseno na Petriho misku (Ø 10 cm) a za stálého pohybu ozářeno dávkou 0,1 mJ/m² (1 000 erg) ze zdroje UV nastaveného na 10 uJ/m²/s. V desetisekundových intervalech bylo odebráno 0,5 ml spórové suspenze. Po vhodném naředění fyziologickým roztokem byla výsledná suspenze spór přenesena na Petriho misky (Ø 10 cm) s agarovou živnou půdou T2, obohacenou 0,02 % hydrolyzátu kaseinu (*Bacto-Casamino Acids* Difco). Takto zaočkováná živná půda byla inkubována dva týdny.

Kolonie vyrostlé z mutagenizovaných spór na garovém médiu v Petriho miskách byly jednotlivě přeneseny na zešíkmenou agarovou půdu T2 v Endo zkumavkách a inkubovány 3 až 4 týdny. Narostlé kultury pak byly testovány na schopnost tvořit alkaloidy v podmínkách submersní fermentace (Řeháček et al. AO 199 986).

Před použitím pro průmyslovou výrobu alkaloidů je nový kmen F27 podle vynálezu uchováván v temnu při teplotě 4 °C se zabezpečením proti vysychání média ve formě 25 denních kultur vyrostlých na zešíkmeném agarovém médiu T2 v Endo zkumavkách při 24 ±1 °C. Uchovávané kultury jsou pravidelně přeočkovány v tříměsíčních intervalech. Dlouhodobě je kmen F27 uchováván buď v tekutém dusíku při teplotě -176 °C v inaktivovaném koňském séru, obohaceném 20 % glycerinu nebo specifickým postupem s využitím lyofilizace.

Výchozí inokulum pro submersní fermentaci klavinových alkaloidů je připraveno smytím spór z 3 až 4týdenní kultury kmene F27 vyrostlé na agarovém médiu T2 (*C. Spalla*, *Genetics of Industrial Microorganisms*. Eds. Z. Vaněk, Z. Hošťálek a J. Cudlín, Elsevier, Amsterdam 1973, p. 393). Získaná suspenze spór je upravena na přibližnou koncentraci 1 až 4-10⁷ spór/ml. Z této suspenze je přeneseno 1,5 až 2 ml do 60 ml tekuté živné půdy v Erlenmayerových baňkách (300 ml) obsahující tyto složky (g/l dest. H₂O): sacharóza 150, Ca(NO₃)₂.4 H₂O, cornsteep (60%) 10, KH₂PO₄ 0,25, MgSO₄.7 H₂O 0,3, ZnSO₄.7 H₂O 0,2, kyselina jantarová 10, pH 5,2 (upraveno NaOH). Zaočkované médium je inkubováno 7 až 9 dnů v temnu při 24 ±1 °C na rotačním třepacím stroji (240 ot/min, excentr 5,5 cm). Z takto získaného submersního inokula je 3 až 5 ml přeneseno do Erlenmayerových baňek (300 ml), obsahujících 60 ml fermentačního média s těmito složkami (g/l⁻¹ dest. H₂O): sacharóza 100, Ca(NO₃)₂.4 H₂O 1, CaCl₂ 1,1 (NH₄)₂SO₄ 10, KH₂PO₄ 0,25, MgSO₄.7 H₂O 0,25, ZnSO₄.7 H₂O 0,015, FeSO₄.7 H₂O 0,02, kyseliny jantarové 10, fenobarbital 0,5, pH 5,2 (upraveno NaOH). Zaočkované fermentační médium je inkubováno 21 dnů v temnu při teplotě 24 ±1 °C na rotačním třepacím stroji (240 ot/min, excentr 5,5 cm).

Alkaloidy vyloučené do fermentačního média jsou stanoveny kolorimetricky (G. J. Banks et al., J. Gen. Microbiol. 82, 345, 1974) a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (M. Wurst et al., J. Chromat. 150, 477, 1978). Médium s 21denní kulturou nového kmene F27 obsahuje 4 g/l klavinových alkaloidů, z toho 70 % elymoklavinu, 23 % agroklavinu a 3 % chanoklavinu.

Získané fermentační médium je vyextrahováno a z extraktu jsou izolovány alkaloidy elymoklavin a agroklavin. Elymoklavin je použit pro další výrobu polosyntetických léčebných preparátů.

Podstatnými výhodami nového kmene F27 jsou: zvýšená produkce klavinových alkaloidů (v průměru 4,4 g/l), výhodné zastoupení elymoklavinu v alkaloidové směsi (71 %), nízká hladina průvodního chanoklavinu (3 %), snížený výskyt exopolysacharidů (0,3 g/l), intenzivní sporulace, bohatá klíčivost konídií kultur na agarovém živném médiu (5,5 %) a možnost uplatnění kmene při úpravě producentů chanoklavinu.

Použití kmene F27 při fermentační produkci elymoklavinu a agroklavinu umožní zefektivnit vlastní fermentační postup, extrakci a izolaci alkaloidů i případnou následnou výrobu polosyntetických léčebných preparátů.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Průmyslový kmen houby *Claviceps fusiformis* Loveless F27 CC-4/85 produkující alkaloidy elymoklavin a agroklavin submersní fermentací.