



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

212526

(11) (B1)

(22) Přihlášeno 13 07 79
(21) (PV 4933-79)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 1/06

(40) Zveřejněno 31 08 81

(45) Vydáno 15 08 84

(75)
Autor vynálezu

SEMERDŽIEVA MARTA RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy antibakteriálního a antifungálního antibiotika z kloboukaté stopkovýtrusné houby

1

Předmětem vynálezu je způsob přípravy antibakteriálního a antifungálního antibiotika z kloboukaté stopkovýtrusné houby.

Dosud je z antifungálních antibiotik z kloboukatých stopkovýtrusných hub znám mucidin, připravený ze submersní kultury houby *Oudemansiella mucida* (Čs. patent 136 492).

Mucidin (*Mucidermin* SPOFA) se aplikuje povrchově např. ve formě spraye nebo masti. Antibakteriální antibiotika, získaná fermentační cestou z kloboukatých stopkovýtrusných hub, nejsou dosud v klinické praxi používána.

Podstatou způsobu přípravy antibakteriálního a antifungálního antibiotika podle vynálezu je, že se mycelární kultura kloboukaté stopkovýtrusné houby *Agrocybe aegerita* (Brig) Sing., kmen Ag ae I, kultivuje metodou hloubkové kultivace při teplotě 24 °C ($\pm 4^\circ$) po dobu 14 až 24 dnů v tekutém živném prostředí, obsahujícím asimilovatelné zdroje uhlíku a dusíku minerální živné sole a růstové látky, načež se odfiltruje kultivační tekutina obsahující antibiotikum.

Organismus, který produkuje nové antibiotikum podle vynálezu, je stopkovýtrusná houba *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing. (Basidiomycetes) z řádu hub lupenatých (Agaricales). Jde o teplomilnou dřevní jedlou houbu (M. Moser: "Röhrlinge und Blätterpilze, Kleine Kryptogamenflora I/2 Basidiomyceten", Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York, 1978, str. 286). Její synonymum je *Pholiota cylindracea* (DC ex Fr.). Vzhled a výskyt přírodní plodnice je popsán Pilátem (A. Pilát: "Klíč k určování našich hub hřibovitých a bedlovitých", Brázda, 1951, str. 356) a Hennigem (Michael Hennig: "Handbuch für Pilzfreunde, IV. Blätterpilze-Dunkelblätter", VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1967, str. 230).

Čistá kultura *Agrocybe aegerita* byla získána 1971 izolací explantátovou metodou z čerstvé plodnice z přírody. Kmen Ag ae I kloboukaté stopkovýtrusné houby *Agrocybe aegerita* je uložen ve sbírce kultur basidiomycetů oddělení experimentální mykologie MBÚ ČSAV, která je součástí sbírky "Czechoslovak Collection of Microorganismus".

Mycelium je udržováno na sladinkovém agaru 8^oBall. ve zkumavkách. Myceliální kolonie je vatovitá, hustá, žlutobílá, bez pigmentace do živného agaru. Vlákna hyf jsou přehrádkovaná, silná 3 až 5 μ m, netvoří žádné vegetativní výtrusy. Rychlost růstu je střední (většina podhoubí stopkovýtrusných hub roste pomalu), Petriho miska o průměru 10 cm, naočkovaná dikaryontní kulturou, poroste myceliem během 10 dnů. Sexualita tohoto druhu je řízena tetrapolárním mechanismem inkompability (Esser a Kuenen: "Genetik der Pilze". Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1967). Dikaryontní kultura roste o něco rychleji než monokaryont a má na hyfách přezky, charakteristické pro většinu kultur stopkovýtrusných hub.

Monokaryontní kultura (z 1 výtrusu) je makroskopicky podobná dikaryontu, na hyfách má však jednoduchá septa. *Agrocybe aegerita* splňuje předpoklady pro šlechtění, neboť tvoří za vhodných podmínek v laboratoři plodnice, má dobře klíčící basidiospory a poměrně krátký vývojový cyklus (Esser, Semerdžieva, Stahl: Genetische Untersuchungen an dem Basidiomyzeten *Agrocybe aegerita*, Theoret. Appl. Genetics 45: 77 až 85, 1974). Mycelium pěstované metodou hloubkové kultivace na třepacím stroji v tekuté půdě v baňce je kuličkovité, později se kuličky rozpadají. Růst submersní kultury probíhá pomaleji, než je tomu např. u penicilii nebo aktinomycetů.

Živná půda musí obsahovat zdroj asimilovatelného uhlíku a organického nebo anorganického dusíku, minerální sole, stopy kovů a růstové látky. Z komplexních půd roste houba nejlépe na sladince o koncentraci 8^oBall. při počátečním pH 5,5-7,0, ze syntetických půd na MS-půdě (glukóza 30 g, kyselina glutamová 2,5 g, glycin 0,1 g, vinná amonny 0,5 g, fosforečnan draselný primární 1,0 g, síran hořečnatý krystalický 0,5 g, chlorid vápenatý 0,25 g, 1 ml roztoku stopových prvků Fe, Zn, B, Mn, Cu, Na, KJ, aneurin 100 μ g, destilovaná voda 1 000 ml, pH 5,8).

Antibiotická látka, produkovaná submersní kulturou uvedenou stopkovýtrusné houby nebyla dosud izolována v chemicky čistém stavu. Antibiotikum, obsažené v kultivačním filtrátu, je extracelulární, rozpustné ve vodě. Je účinné proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím a fungicidní. V tabulce 1 je uveden antibiotický účinek antibiotika podle vynálezu (obsaženého v kultivačním filtrátu) na některé patogenní a podmíněné patogenní mikroorganismy.

T a b u l k a 1

Antibiotický účinek kultivačního filtrátu *Agrocybe aegerita* na některé patogenní a podmíněné patogenní mikroorganismy

typ	patogenní mikroorganismus	počet sledov. patog. kmenů	antibiotický účinek (průměr zóny v mm) stanoveno difusní titrací (komínek na plotně 5 mm) kapáno 0,1 ml filtrátu	
			baktericidní	bakteriostatický
gram + koky	<i>Pneumococcus</i>	15		8 až 28
	<i>Staphylococcus aureus</i>	7	8 až 10	
	<i>Streptococcus faecalis</i>	23		8 až 13
	<i>Streptococcus hemolyt. A</i>	8	10 až 15	15 až 30
	<i>Streptococcus hemolyt. B</i>	16	12 až 26	19 až 34
gram - tyčinky	<i>Aeromonas</i>	2	16 až 26	
	<i>Enterobacter agglomeratus</i>	1	12	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	8 až 12	
	<i>Enterobacter hafniae</i>	2	8 až 10	

pokračování tabulky 1

typ	patogenní mikroorganismus	počet sledov. patog. kmenů	antibiotický účinek (průměr zóny v mm) stanoveno difusní titrací (komínek na plotně 5 mm) kapáno 0,1 ml filtrátu	
			baktericidní	bakteriostatický
	<i>Escherichia coli</i>	18	8 až 18	10 až 36
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	8 až 10	
	<i>Proteus mirabilis</i>	10		12 až 25
	<i>Proteus morgani</i>	1		10
	<i>Proteus rettgeri</i>	2	11 až 26	
	<i>Proteus vulgaris</i>	6		10 až 18
	<i>Providentia</i>	1	16	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	8 až 20	
	<i>Salmonella</i>	2	8 až 12	
	<i>Serratia</i>	1	30	
	<i>Yersinia</i>	2	14 až 20	
kvasinky	<i>Candida albicans</i>	8	8 až 12	
	<i>Candida pseudotropicalis</i>	1	18	
	<i>Candida tropicalis</i>	4	8 až 10	

Z tab. 1 je patrné, že z gram-pozitivních kůček je účinnost antibiotika největší proti β hemolytickým streptokokům (inhibiční zóny až 34 mm), z gram-negativních kůček proti *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* a *P. rettgeri* a *Serratia* (inhibiční zóny 25 až 36 mm); na kvasinky rodu *Candida* má antibiotikum účinek fungicidní.

Antibiotická aktivita kultivačního filtrátu (lyofilizátu) byla stanovena plotnovou difusní mikrobiologickou titrací. Nebyla zjištěna v žádné části plodnic *Agrocybe aegerita*. Stacionární kultury vykazují slabou aktivitu proti gram-pozitivním bakteriím.

Dále jsou uvedeny příklady způsobu přípravy antibiotika podle vynálezu.

P ř í k l a d 1

Do rotačního třepacího stroje se vloží Erlenmayerovy baňky (à 300 ml) obsahující 100 ml tekuté 8^oBall. sladinky (pH 5,5). Baňky byly zaočkovány drátkem 10 až 20 částicemi dobře narostlé myceliální kultury *Ag ae I* (20 dnů) ze šikmého agaru ve zkumavce a uzavřeny vatovou zátkou. Po 20 dnech třepání byl kultivační filtrát oddělen od mycelia a testován metodou plotnové titrace na antibakteriální a antifungální aktivitu s kmeny *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Candida pseudotropicalis* při použití streptomycinu a fungicidinu jako srovnávacího standardu. Účinek aktivity (vzorek filtrátu 0,1 ml) odpovídal, pokud jde o antibakteriální aktivitu cca 100 j streptomycinu, pokud jde o antifungální aktivitu cca 500 j fungicidinu. Suchá váha mycelia 22 mg/ml.

P ř í k l a d 2

Kultivace na rotačním třepacím stroji jako u příkladu 1, avšak na syntetické půdě (MS-půdě: její složení uvedeno dříve). Kultura roste o něco slaběji (maximum 15 mg/ml suché váhy mycelia) a pomaleji (maximální produkce antibiotika po 28 dnech kultivace). Kultivační filtrát vykazuje rovněž antibiotickou aktivitu proti gram-pozitivním, gram-negativním bakteriím a kvasinkám. Koncentrace antibiotika je o něco nižší než u příkladu 1.

Na obr. 1 je graficky znázorněna antibiotická aktivita na mikroorganismy *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Candida pseudotropicalis* v průběhu 28 dnů submersní kultivace výchozího kmene *Ag ae I* na 8^oBall. sladinkové půdě. Z obrázku je patrné, například, že

největší antibakteriální účinek proti *Escherichia coli* je po 24 dnech kultivace výchozího kmene, kdy průměr inhibiční zóny je cca 24 mm. Křivky na obrázku znázorňují:

- gram + bakterie (*Bacillus subtilis*)
- △—△— gram - bakterie (*Escherichia coli*)
- kvasinka (*Candida pseudotropicalis*)

- suchá váha mycelia

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy antibakteriálního a antifungálního antibiotika z kloboukaté stopkovýtusné houby vyznačený tím, že myceliální kultura kloboukaté stopkovýtusné houby *Agrocybe aegerita*, kmen Ag ae I, se kultivuje metodou hloubkové kultivace při teplotě $24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}$ na sladinkové tekuté půdě při pH 5,5 až 7, po dobu 14 až 24 dnů, načež se odfiltruje kultivační tekutina, která obsahuje antibiotikum.

