



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

204302

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 19 04 78
/21/ /PV 1605-79/

(51) Int. Cl.³
C 12 N 15/00

(40) Zveřejněno 31 07 80

(45) Vydáno 15 03 83

(75)

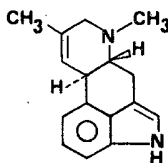
Autor vynálezu

ŘEHÁČEK ZDENĚK RNDr. DrSc., PAŽOUTOVÁ SYLVIE RNDr.,
KOZOVÁ JAROSLAVA RNDr. a SAJDL PŘEMYSL RNDr. CSc., PRAHA

(54) Průmyslová mutanta houby *Claviceps purpurea* CP7/63 CCM F-631

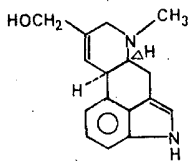
1

Vynález se týká nové průmyslové mutanty kmene *Claviceps purpurea* CP7/63 s vysokou submerzní produkcí farmaceuticky významných alkaloidů agroklavinu (M. Abe et al., Jap. patent 178 336) strukturního vzorce I



(I)

a elymoklavinu (M. Abe et al., US Pat. 2 835 675) strukturního vzorce II



(II)

Vzorky mutanty jsou uloženy v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně pod č. CCM F-631.

Mutanta byla získána ze 664 izolátů připravených níže popsaným mutačním působením etylmetansulfonátu (EMS) a UV záření na laboratorní kmen *Claviceps purpurea* CP7 (Mikrobio-

204302

logický ústav ČSAV v Praze 4). Při přípravě vysokoprodukční mutanty probíhaly veškeré inkubace kultur v temnu při 24 ± 1 °C. Spory mateřské kultury CP7, která byla kultivována 3 až 4 týdny na sešikmené 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 jednak v 0,066 M fosfátovém pufru pH 7,2, jednak ve fyziologickém roztoku. Výsledná suspenze obsahovala vždy 1 až $4,10^7$ spor ml^{-1} , z toho pouze 0,5 % až 1 % klíči- vých. Agarová živná půda T2 obsahovala tyto složky (g.l^{-1} dest. H_2O): sacharóza 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, pH 5,2 po sterilizaci v autoklávu při 105 °C 15 min.

Suspenze spor v 0,066 M fosfátovém pufru pH 7,2 byla vystavena 19 hodin. účinku 0,02 až 0,075 M EMS (J. Nešvera, Fol. Microbiol. 18 /1973/), dvakrát promyta uvedeným pufrem, vyseta na Petriho misky (Ø 10 cm) s agarovou půdou T2 obohacenou 0,02 % hydrolyzátu kaseinu (Bacto-Casamino acids Difco) a inkubována 2 týdny.

Ze suspenze spor ve fyziologickém roztoku bylo přeneseno 5 ml na Petriho misku (Ø 10 cm) a za stálého pohybu ozařováno zdrojem UV záření nastaveným na $10 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dávkami 150 až 1 000 J.m^{-2} . V desetisekundových intervalech bylo odebíráno 0,5 ml sporové suspenze. Po vhodném naředění fyziologickým roztokem byla výsledná suspenze spor přenesena na Petriho misky (Ø 10 cm) s agarovou půdou T2 obohacenou 0,02 % hydrolyzátu kaseinu (Bacto-Casamino acids Difco). Takto zaočkovaná živná půda byla inkubována 2 týdny.

Kolonie vyrostlé z mutagenizovaných spor na agarovém médiu v Petriho miskách byly jednotlivě přeneseny na sešikmenou agarovou půdu T2 a inkubovány 3 až 4 týdny. Narostlé kultury byly pak testovány na schopnost tvořit alkaloidy v podmínkách submerzní fermentace (čs. autorské osvědčení č. 199 986).

Alkaloidy byly stanoveny ve fermentační tekutině 14denních kultur kolometricky (G. T. Banks et al., J. Gen. Microbiol. 82, 345 /1974/) a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (M. Wurst et al., J. Chromat. 150, 477 /1978/).

Charakteristika vysokoprodukční mutanty:

Schopnost mutanty tvořit extracelulární směs agroklavinu a elymoklavinu v podmínkách submerzních fermentací je uvedena v tabulce 1.

T a b u l k a 1

Mutant	typ	Mutagen dávka J.m^{-2}	konc. (M)	Celkové alkaloidy (g agroklavinu ml^{-1})	Agroklavin %	Elymoklavin %
CP7/63	UV	720		3,2	94	6

Mutanta CP7/63 je morfologicky shodná s rodičovským kmenem CP7. V podmínkách submerzní fermentace bohatě roste (12 až 20 mg suché váhy mycelia ml^{-1}), intenzivně sporuluje makro- a mikrokoniidemi a produkuje extracelulární glukany a extracelulární hnědočervený pigment. Na agarové půdě T2 tvoří nízkou vrstvu šedobílého vzdušného mycelia bohatě větveného s postranními hyfami zakončenými konidiogenními buňkami. U mutanta CP7/63 hmotnostní poměr akroklavin/elymoklavin ve vyprodukované směsi alkaloidů činí 15,6.

Produkční mutanta se uchovává v Endo zkumavkách na agarové půdě T2 a v temnu při teplotě 4 °C. Každé 3 až 4 měsíce se přeočkovává a po 30denní inkubaci při 24 ± 1 °C se jich použije k přípravě inokula nebo se uchovává jako zásobní kultura při 4 °C. Mutanta houby Claviceps purpurea označená CP7/63 zabezpečuje klíčový úsek velkokapacitní přípravy alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu submerzní fermentací.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Průmyslová mutanta houby *Claviceps purpurea* CP7/63 uložená v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM F-631 s produkcí alkaloidů agroklovinu a elymoklovinu.