



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

204303

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 15/00

/22/ Přihlášeno 19 04 78
/21/ /PV 1606-79/

(40) Zveřejněno 31 07 80

(45) Vydáno 15 03 83

(75)

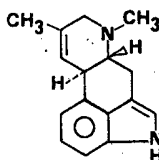
Autor vynálezu

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

(54) Průmyslová mutanta houby *Claviceps purpurea* CP7/274 CCM F-632

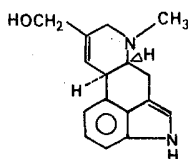
1

Vynález se týká nové průmyslové mutanty kmene *Claviceps purpurea* CP7/274 s vysokou submerzní produkcí farmaceuticky významných alkaloidů agroklavinu (M. Abe et al., Jap. pat. 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-632.

Vynálezem chráněná mutanta byla získána ze 664 izolátů připravených níže popsaným mutačním působením étylmetansulfonátu (EMS) a UV záření na laboratorní kmen *Claviceps purpurea* CP7 (Mikrobiologický ústav ČSAV v Praze 4).

204303

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 Microorganismus*. Eds. Z. Vaněk, Z. Hošťálek, J. Gudlín. 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 $4 \cdot 10^7$ spor.ml⁻¹, z toho pouze 0,5 % až 1 % klíčivých. Agarová živná půda T2 obsahovala tyto složky (g.l⁻¹ 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 sterilizaci v autoklávu při 105 °C 15 min.

Suspenze spor v 0,066 M fosfátovém pufru pH 7,2 byla vystavena 19 hod. účinku 0,02 až 0,075 M EMS (J. Nešvera, *Fol. Microbiol.* **18**, 352 /1973/), dvakrát promyta uvedeným puforem, vyseta na Petriho misky (Ø 10 cm) s agarovou půdou T2 obohacenou 0,02 % hydrolyzátem 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 J.m⁻².s⁻¹ dávkami 150 až 1 000 J.m⁻². V desetisekundových intervalech bylo odebráno 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 % hydrolyzátem kaseinu (Bacto-Casamino acids Difco). Takto zaočkováná 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 kolorimetricky (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		Velkové alkaloidy (g agroklavinu ml ⁻¹)	Agroklavin %	Elymoklavin %
		dávka (J.m ⁻²)	konc. (M)			
CP7/274	UV	800		1,8	70	30

Mutant CP7/274 se liší od rodičovského kmene, neboť je typickým sklerociálním kmenem. Na agarové živné půdě T2 i v submerzních podmínkách roste chudě (5 až 6 mg suché váhy mycelia.ml⁻¹) za tvorby pučícího mycelia se zvětšenými kulatými buňkami. U starší kultury se toto mycelium rozpadá na arthrospory o velikosti 4 x 12 μ. Vláknité mycelium a konidie se tvoří ojediněle. Obsah extracelulárních glukánů je nepatrný.

Produkční mutanta se uchovává v Endo zkumavkách na agarové půdě T2 v temnu při teplotě 4 °C. Každé 3 až 4 měsíce se přeočkovává a po 30denní inkubaci při 24 ± 1 °C se použije k přípravě inokula nebo se uchovává jako zásobní kultura při 4 °C.

Mutanta houby *Claviceps purpurea* označená CP7/274 zabezpečuje klíčový úsek velkokapacitní přípravy alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu submerzní fermentací.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Průmyslová mutanta houby *Claviceps purpurea* CP7/274, uložená v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM F-632 s produkcí alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu.