

ČESKOSLOVENSKÁ  
SOCIALISTICKÁ  
REPUBLIKA  
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

**246704**

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 1/14

(22) Přihlášeno 12 03 84

(21) (PV 1761-84)

(40) Zveřejněno 17 04 86

(45) Vydáno 15 12 87

(75)  
Autor vynálezu

ŘEHÁČEK ZDENĚK RNDr. DrSc., PAŽOUTOVÁ SYLVA RNDr. CSc.,  
KOZOVÁ JAROSLAVA RNDr., SAJDL PŘEMYSL RNDr. CSc.,  
KŘEN VLADIMÍR ing., FLIEGER MIROSLAV RNDr. CSc., PRAHA

(54) Produkční kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* CP 7/5/35 CC-2/85

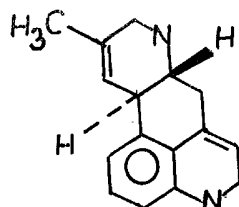
1

2

Řešení se týká nového produkčního kmeně mikroorganismu *Claviceps purpurea* CP 7/5/35, produkujícího klavinové alkaloidy, který se od předchozích kmenů liší vyšší produkcí agroklovinu a elymoklovinu, omezenou produkcí extracelulárních glukanů, intenzivní konidiací a vyšší klíčivostí spor. Kmen je uložen ve sbírce mikroorganismů Mikrobiologického ústavu v Praze pod číslem CC-2/85.

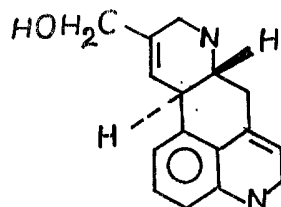
Vynález se týká nového produkčního kmene mikroorganismu *Claviceps purpurea* CP 7/5/35, který produkuje agroklaavin, elymoklaavin a stopové množství dalších klavinových alkaloidů. Vzorek kmene je uložen ve sbírce mikroorganismů Mikrobiologického ústavu ČSAV v Praze pod č. CC-2/85.

Kmen se vyznačuje vysokou submersní produkcí farmaceuticky významných alkaloidů agroklaavinu (Abe M. et al., Jap. pat. 178 336) strukturního vzorce I



(I)

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



(II)

Pokles produkce alkaloidů<sup>s</sup> na půdě CS2 (pops. v AO 199 986) fortifikované fosfátem (Pi)

Kmen

	Kultivace (dnů)			
	10	10	21	21
	5 × P <sub>i</sub>	10 × P <sub>i</sub>	5 × P <sub>i</sub>	10 × P <sub>i</sub>
CP 7/5/35	35	39	42	31
CP 7	21	24	34	26

<sup>s</sup> % kontroly (půda CS2)

Mutantní kmen *C. purpurea* CP 7/5/35 byl získán z rodičovského kmene *C. purpurea* CP 7 (uloženého ve sbírce mikroorganismů MBÚ ČSAV, Praha) mutací UV světlem. Vodná suspenze konidií z čtyřtýdenních agarů kultur kmene CP 7 na půdě T2 (Spala C., In: Genetics of Industrial Microorganisms, Elsevier, Amsterdam 1973, p. 393) byla vystavena UV světlu tak, aby přežilo 20–40 % konidií. Vzorky ozářené suspenze pak byly vysety po vhodném naředění na Petriho misky s půdou T2 a inkubovány 3 týdny při 24 ± 1 °C. Vždy 50 až 100 kolonií, které se vzhledem nelišily od rodičovského kmene, bylo jednotlivě izolováno na šikmé agarové půdy T2 a po 3- až 4týdenní kultivaci testováno na výtěžek alkaloidů způsobem popsaným v AO 199 986 s tou výjimkou, že kultivace vegetativního inokula i fermentace trvaly 10 dní. Obsah alkaloidů

Kmen se odlišuje od dřívě patentovaných kmenů téhož původu

- dvojnásobnou produkcí alkaloidů (měřeno 10. den fermentace),
- intenzivní tvorbou konidií,
- vyšší klíčivostí konidií,
- nízkou hladinou extracelulárních glukanů, které znesnadňují extrakty alkaloidů podporou vzniku emulze rozpouštědla s kulturační tekutinou,
- vyšší resistencí produkce alkaloidů k fosfátu média v celém průběhu kultivace.

ve fermentační tekutině byl stanoven kolorimetricky (G. T. Banks et al., J. Gen. Microbiol. 82, 345 (1974)). U kultur převyšujících produkci rodičovský kmen bylo stanoveno i složení směsi alkaloidů tenkovrstvou chromatografií. Vždy dva nové izoláty s nejvyšší tvorbou alkaloidů byly použity k další mutaci. UV světlu byla vystavena směsná suspenze konidií s rovným zastoupením obou kmenů. Kmen *C. purpurea* CP 7/5/35 je výsledkem tří mutačních kroků:

Kmen	produkce 10. den (mg/L)
CP 7	1 100
I	1 200
II	1 990
CP 7/5/35	2 440

Morfologická a růstová charakteristika kmene CP 7/5/35

## a) Kultivace na agarové půdě T 2

Při kultivaci na půdě T2 tvoří kmen CP 7/5/35, stejně jako rodičovský kmen CP 7, šedobílé vzdušné mycelium se sporofory, nescoucími hlavice konidií spojené slizem polysacharidické povahy [Pažoutová et al. Can. J. Microbiol. 23, 1182 (1977)]. Konidiace je po 12 až 14 dnech plně rozvinuta. Do agaru je vylučován červenohnědý pigment provázející tvorbu alkaloidů. Při smývání konidií z agarových kultur vykazuje kmen CP 7/5/35 ve srovnání s kmenem CP 7 dvojnásobné výtěžky konidií u kultur mladších 30 dnů. Z výsledků stanovení klíčivosti konidií výsevem na půdu T2 vyplývá, že konidie kmene CP 7/5/35 vykazují přibližně 10 × vyšší klíčivost než konidie kmene rodičovského.

## b) Submersní kultivace

Submersní kultivace kmene CP 7/5/35 i rodičovského kmene CP 7 byla provedena na rotační třepačce i v laboratorním fermentoru na médiích popsaných v AO 199 986. Rodičovský kmen CP 7 tvořil při submersní kultivaci glukany, jejichž produkce dosahovala maxima mezi 7. a 11. dnem fermentace. Poté docházelo k jejich částečnému odbourávání. Množství polysacharidů dosahovalo až 35 g/L. Mutantní kmen CP 7/5/35 tyto polysacharidy za podmínek umožňujících maximální tvorbu alkaloidů obvykle nevytváří.

Směs klavinů 21. den submersní kultivace

kmene CP 7/5/35 obsahuje 10 až 30 % elymoklavinu, 65 až 90 % agroklavinu, 1 až 5 % chanoklavinu-I a stopy některých dalších klavinových alkaloidů.

Z uvedených charakteristik je zřejmé, že nový kmen *Clavices purpurea* CP 7/5/35, získaný po působení UV světla, se liší od rodičovského kmene *C. purpurea* CP 7 v těchto znacích:

a) dvojnásobný výtěžek alkaloidů v 10. dni kultivace

b) zvýšená klíčivost konidií

c) zvýšená schopnost konidiace na půdě T2

d) omezená tvorba glukanů za podmínek umožňujících maximální produkci alkaloidů

e) vyšší resistance produktivity alkaloidů k fosfátu.

Mutanta houby *C. purpurea* označená CP 7/5/35 zabezpečuje klíčový úsek fermentace agroklavinu a elymoklavinu, které jsou vhodnými substráty pro polosyntetickou přípravu známých i nových derivátů námelo-vých alkaloidů.

## P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Produkční kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* CP 7/5/35 CC 2/85 produkující v podmínkách hloubkové kultivace agro-

klavin a elymoklavín s omezenou tvorbou extracelulárních glukanů.