

UDC 582.282.19+581.42:581.137.3=862

MORFOLOŠKA DIFERENCIJACIJA GLJIVE
CLAVICEPS PASPALI STEVENS ET HALL
PRI BIOSINTEZI ERGOT ALKALOIDA
SUBMERZNYM NAČINOM KULTIVACIJE

With Summary in English

SREČKO MATOŠIĆ I ZORAN HAJEK

(Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb i »Podravka«, Koprivnica)

Primljeno 13. 10. 1982.

Ispitan je utjecaj morfološke diferencijacije micelija, pri submerznoj kultivaciji *C. paspali* na biosintezu ergot alkaloida. Maksimalna biosinteza alkaloida postiže se s peletima sinematskog izgleda i jezgrom sastavljenom od čvrsto agregiranih hifa micelija. Postizanje takve strukture uvjetovano je sastavom hranjive podloge te načinom priređivanja vegetativnog inokuluma.

Uvod

Proizvodnja ergot alkaloida primjer je procesa u kojima je idiofazni karakter mikrobnog metabolizma usmjeren u biosintezu određenog metabolita. Za razliku od mikrobnih procesa proizvodnje antibiotika (koji su najvažniji primjer takvih procesa) biosintezu ergot alkaloida u industrijskim razmjerima može se provesti i tzv. parazitskim načinom kultivacije. Naime, gljive roda *Claviceps* formiraju sklerocije — micelijske strukture — koje mogu sadržavati do 0,8% alkaloida od suhe tvari biomase ako sekultiviraju na raži (U d v a r d y 1980).

Povezanost biosinteze alkaloida, pri submerznoj kultivaciji gljiva roda *Claviceps*, s morfološkom diferencijacijom micelija, na način sličan onome u sklerociju, zapazili su A r c a m o n e et al. (1961), B a r c e l o n a et al. (1966), T o n o l o (1967) i J e r a j i T a m b u r a š e v (1969).

U ovom radu su ispitani način i uvjeti morfološke diferencijacije micelija pri submerznoj kultivaciji *C. paspali* i utjecaj na biosintezu ergot alkaloida.

Materijal i metode

Proizvodni mikroorganizam upotrijebljen u ovom radu bio je soj gljiva *Claviceps paspali* Stevens i Hall F-2057. Održava se i čuva na čvrstoj podlozi, koja se sastoji od glukoze (20), krumpirovog infuzuma pripremljenog kuhanjem 300 g krumpira, agara (20 g) i destilirane vode (1 l), pH 7,0.

Inokulum je kultiviran u podlozi sastava: manitol (40 g), jantarna kiselina neutralizirana s amonijakom do pH 5,2 (10 g), slanutkovo brašno (1 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,3 g) i vodovodna voda (1l).

Morfološka diferencijacija micelija *C. paspali* pri submerznoj kultivaciji praćena je u podlogama sastava:

- I — manitol (50 g), jantarna kiselina neutralizirana s amonijakom do pH 5,2 (40 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,3 g) i vodovodna voda (1 l) (Arca mone et al., 1961);
- II — manitol (90 g), pepton (30 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,3 g) i vodovodna voda (1 l), pH 5,2;
- III — manitol (150 g), pepton (70 g) i vodovodna voda (1 l), pH 6,4;
- IV — manitol (200 g), pepton (90 g) i vodovodna voda (1 l), pH 6,4

Sterilizacija se vrši na 110° kroz 30 minuta.

Gljiva *C. paspali* kultivirana je submerznim postupkom u Erlenmaye-rovim tikvicama od 500 ml s po 100 ml hranjive podloge pri temperaturi 25°C na rotacionoj tresilici s 180°/min i ekscentrom od 5 cm.

Priprema inokuluma je provedena u dvije faze: Prva u trajanju od 7 dana a druga u trajanju od 2 dana. S 10% vol/vol homogeniziranog inokuluma (Waring Blendor-homogenizator) I. faze naciepljena je podloga za uzgoj II. faze inokuluma. Količina inokuluma za naciepljivanje podloge za biosintezu iznosila 10% vol/vol, a kultivacija je trajala 17 dana.

Količina ergot alkaloida određivana je spektrofotometrijski (Voigt 1959) sa reagensom Ehrlich-van Urk pri 545 nm, a izražena je kao ergometrin u g/l komine.

Rezultati i diskusija

Morfološka diferencijacija micelija *C. paspali* praćena je pri submerznoj kultivaciji u četiri različite podloge. Rezultati prikazani na sl. 1 pokazuju da su maksimalni prinosi (2,5 g l⁻¹) alkaloida postignuti u podlozi s 20% manitola i 9% peptona, te u podlozi s manitolom i amonijevim sukcinatom. Znatno niži prinosi (oko 25% od maksimalnih) postignuti su u podlozi s 9% manitola i 3% peptona uz dodatak anorganskih soli.

Izgleđ karakteristične kolonije soja *C. paspali* F-2057 prikazan je na slici 2. Kolonija pokazuje tipične morfološke karakteristike, koje osiguravaju postizavanje visokih prinosa alkaloida pri submerznoj kultivaciji kako navode i Mercantini et al. (1967).

Iz djelića micelija kolonija izraslih na krutoj hranjivoj podlozi pojavljuju se pri kultivaciji inokuluma u submerznim uvjetima nakon dva do tri dana uzgoja prve micelijske strukture. Te agregacije hifa — sine-mate sačinjene su od snopića paralelno izraslih i isprepletenih hifa (sl. 3). U središtu sinemate isprepletene hife u kasnijem rastu stvaraju plektenhim, osnovicu tzv. sklerocijalne jezgre peleta, koja osigurava fiziološke uvjete potrebne za biosintezu alkaloida.

Morfološka diferencijacija micelija *C. paspali* pri submerznim uvjetima uzgoja ovisi u znatnoj mjeri o sastavu hranjive podloge koja se upotrebljava za rast mikroorganizama. Pritom biosinteza i prinosi alkaloida ovisi o načinu agregiranja hifa micelija. Tipična micelijska struktura pri submerznoj kultivaciji su peleti. Za ostvarivanje maksimalnih prinosa alkaloida peleti moraju imati jasno diferencirane sinemate s pobočnim grananjem, te čvrstu sklerocijalnu jezgru, kako je vidljivo na slici 5. Takva struktura peleta pojavljuje se pri submerznoj kultivaciji u podlozi I, III, IV (s visokim prinosima alkaloida), a povezana je s početkom intenzivne biosinteze alkaloida. Ukoliko *C. paspali* ne ostvari sinematni rast peleta kao što je slučaj pri kultivaciji u podlozi II, tada su i prinosi alkaloida znatno niži (25% od maksimalno postignutih u podlozi IV) (sl. 1, 4).

Peleti su pritom nešto većih dimenzija, bez čvrste sklerocijalne jezgre »pamučasti«, bez sinemata, kako je prikazano na slici 4.

Takva povezanost strukture peleta, odnosno načina agregiranja hifa i sposobnosti biosinteze alkaloida ustanovljena je i za različite testirane sojeve *C. paspali* (Barcelona et al. 1966, Jeraj i Tamburašev 1969).

Homogeniziranje inokuluma *C. paspali* prije nacjepljivanja podloge za biosintezu alkaloida također je neophodno za postizavanje maksimalnih prinosa. Iz nehomogeniziranog inokuluma obično izrastaju veliki gusto pakirani peleti bez sinemata. Promjena izgleda peleta dovodi do 50 postotnog sniženja prinosa alkaloida pri kultivaciji u podlozi I (od 2,5 g.l⁻¹ na 1,25 g.l⁻¹ alkaloida).

U svim kulturama i različitim hranjivim podlogama ustanovljeno je da se u toku uzgoja, oko jedanaestog dana, u miceliju pojavljuju stanice koje različitom optičkom gustoćom i izgledom upućuju na vegetativne spore — artrospore (slika 6).

U ranijim radovima (Tonolo 1967, Mercantini 1967) utvrđeno je da produktivni micelij *C. paspali* u toku biosinteze alkaloida ne stvara vegetativne spore. Međutim, Rehaček et al. (1975) pretpostavljaju da su vegetativne — artrospore ili klamido spore u kulturi *C. purpurea* morfološki vrlo slične heksagonalnim stanicama sklerocijalne jezgre sinematnih peleta, koje osiguravaju visoke prinose alkaloida. Prema tome diferencijacija hifa micelija *C. paspali* u vegetativne artrospore nije u suprotnosti sa sposobnošću intenzivne biosinteze ergot alkaloida.

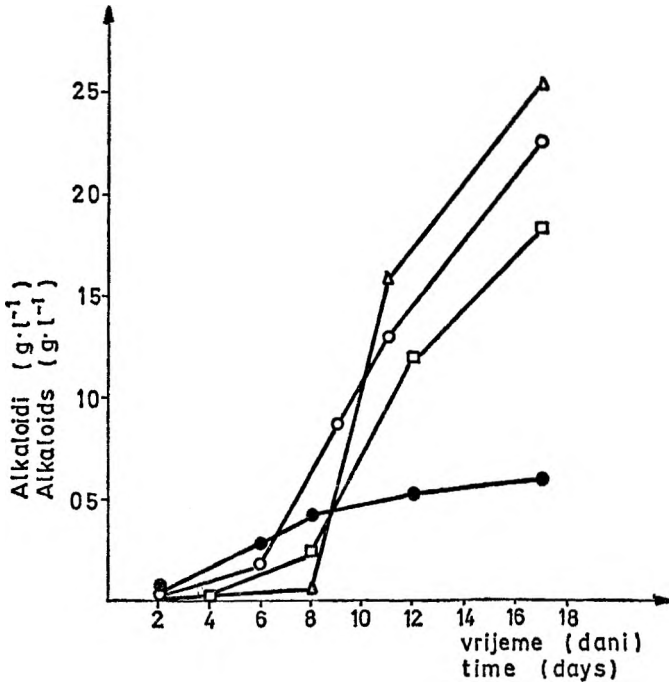
Zaključak

Morfološka diferencijacija micelijske biomase pri biosintezi ergot alkaloida u submerznoj kulturi gljiva roda *Claviceps* ima značajnu ulogu u postizavanju maksimalne količine proizvoda.

Ispitivan je zbog toga tip i način agregiranja hifa u miceliju pri submerznoj kultivaciji soja gljive *C. paspali* F-2057 u različitim hranjivim podlogama.

Ustanovljeno je da se maksimalna biosinteza alkaloida postiže s peletima gljive *C. paspali* koji su sinematnog izgleda i imaju jezgru s hifama agregiranim u tzv. sklerocijalnu strukturu. Peleti rahle strukture, bez čvrste jezgre, te peleti zbijene strukture imaju znatno slabiju sposobnost biosinteze alkaloida.

Postizanje sinematne strukture peleta uvjetovano je sastavom hranjive podloge, te načinom priređivanja vegetativnog inokuluma, kao što je ustanovljeno u ovom radu.



- Sl. 1. Biosinteza ergot alkaloida u submerznoj kulturi *C. paspali*.
 Podloge sastava:
 ○ — I (manitol 5%, amonijev sukcinat 4%)
 ● — II (manitol 9%, pepton 3%)
 □ — III (manitol 15%, pepton 7%)
 △ — IV (manitol 20%, pepton 9%)

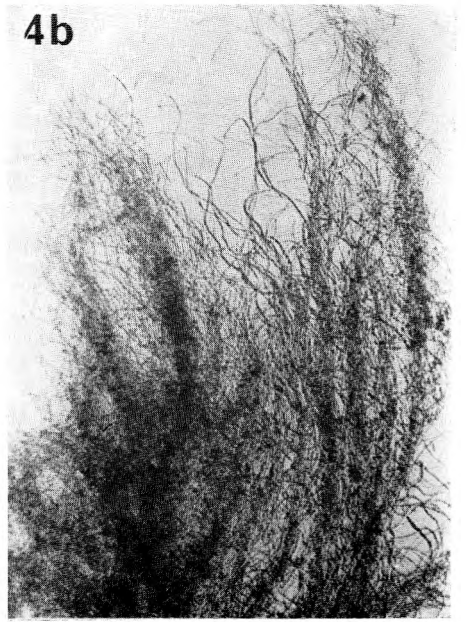
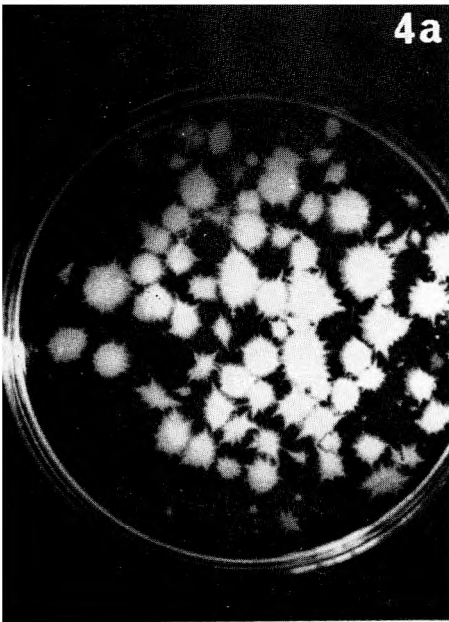
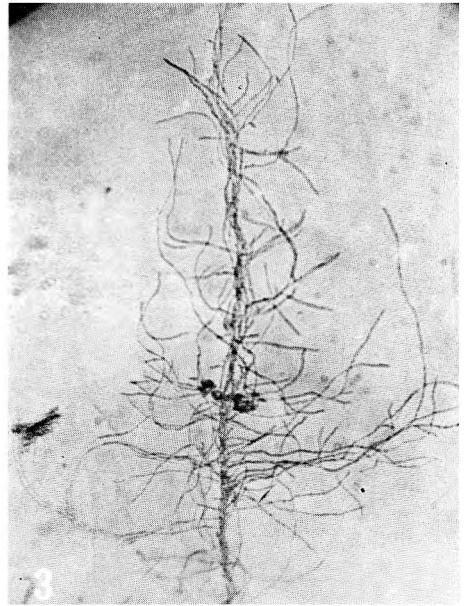
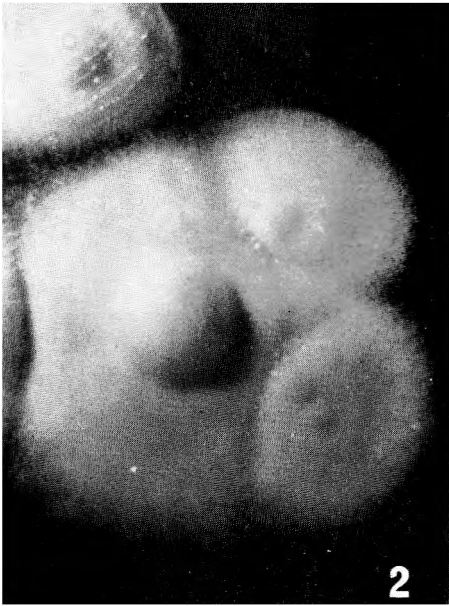
- Fig. 1. Biosynthesis of ergot alkaloids in submerged culture of *C. paspali*.
 Medium content:
 ○ — I (mannitol 5%, ammonium succinate 4%)
 ● — II (mannitol 9%, peptone 3%)
 □ — III (mannitol 15%, peptone 7%)
 △ — IV (mannitol 20%, peptone 9%)

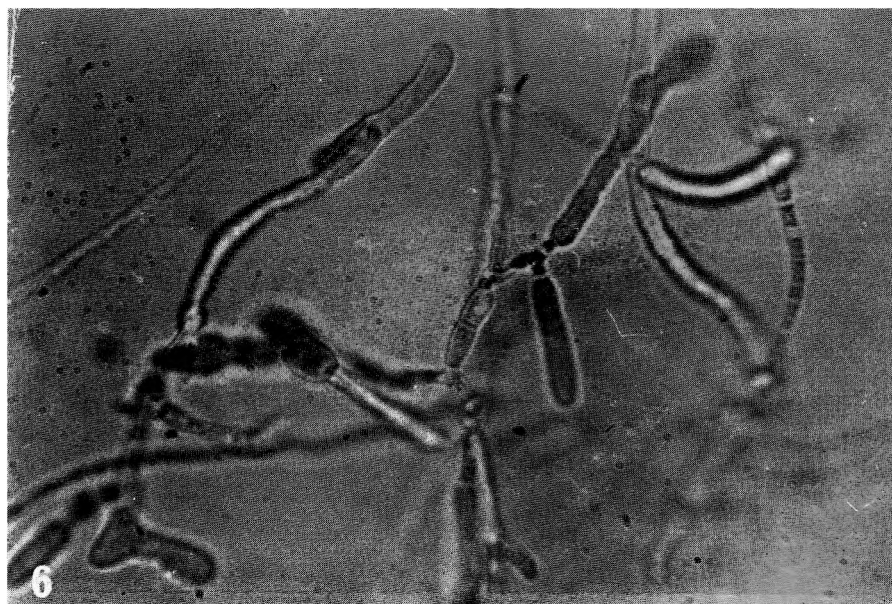
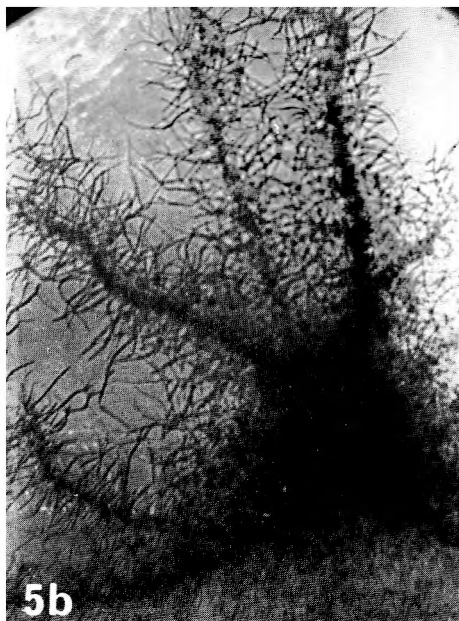
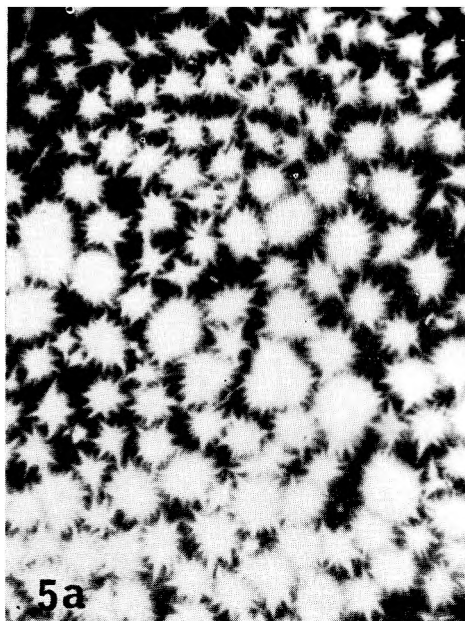
- Sl. 2. Kolonija *C. paspali* stara 13 dana (x 1)
 Fig. 2. Colony of *C. paspali* 13 days old (x 1)

- Sl. 3. Formiranje sinemata u submerznoj kulturi *C. paspali* (x 70)
 Fig. 3. Formation of synnemata in submerged culture of *C. paspali* (x 70)

- Sl. 4. Peleti *C. paspali* nakon 6 dana uzgoja u podlozi II. A — (x1); B — (x 70)

- Fig. 4. Pellets of *C. paspali* cultivated in medium II. (6 days old), A — (x 1); B — (x 70)





Literatura

- Arcamone, F., E. B. Chain, A. Ferretti, A. Minghetti, P. Pennella, A. Tonolo, L. Vero, 1961: Production of a New Lysergic Acid Derivate in Submerged Culture by a Strain of *Claviceps paspali* Stevens and Hall. Proc. Roy. Soc. Biol. Sci. 155, 26—54.
- Barcelona Vero, L., P. Bianchi, A. Tonolo, 1966: Produzione di alcaloidi in coltura sommersa con differenti ceppi di *Claviceps paspali* Stev. et Hall. Ann. Ist. Super. Sanità, 2, 363—367.
- Jeraj, V., G. Tamburašev, 1969: Izolacija i selekcija sojeva *Claviceps paspali* u cilju ispitivanja mogućnosti proizvodnje alkaloida ergota saprofitnim uzgojem plijesni u submerznim uvjetima. I. kongres mikrobiologa Jugoslavije, 971—977.
- Mercantini, R., N. Oddo, A. Tonolo, 1967: Produzione di alcaloidi in coltura sommersa con un nuovo ceppo di *Claviceps paspali* Stev. et Hall. Ann. Ist. Super. Sanità, 3, 536—549.
- Rehaček, Z., J. Vorišek, J. Kozova, 1975: Morfološke i fiziološke karakteristike kulture *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. obrazujućih alkaloidi. Mikrobiologija (Moskva) 44, 559—562.
- Tonolo, A., 1967: Alcune considerazioni sulla produzione di alcaloidi in colture artificiali con specie diverse di *Claviceps* Tul. Ann. Ist. Super. Sanità, 3, 613—628.
- Udvardy, E. N., 1980: Consideration of the Development of an Ergot Alkaloid Fermentation Process. Process Biochem. 15, 4, 5—8.
- Voigt, R., 1959: Zur Bestimmung der Mutterkornalkaloide mit p-dimethyl-amino benzaldehyd. Microchim. Acta, 619—630.

-
- Sl. 5. Sinematni peleti *C. paspali* nakon 6 dana uzgoja u podlozi I.
A — (x 1); B — (x 50)
- Fig. 5. Synnematic pellets of *C. paspali* cultivated in medium I. (6 days old)
A — (x 1); B — (x 50)
- Sl. 6. Spore u submerznoj kulturi gljive *C. paspali* (x 1000)
- Fig. 6. Spores in submerged culture of *C. paspali* (x 1000)

SUMMARY

MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION OF *CLAVICEPS PASPALI* STEVENS AND HALL IN BIOSYNTHESIS OF ERGOT ALKALOIDS IN SUBMERGED CULTURE

Srećko Matošić and Zoran Hajek

(Faculty of Food and Biotechnology, Zagreb and »Podravka«, Koprivnica)

Morphological differentiation of mycelial biomass in biosynthesis of ergot alkaloids in submerged culture of fungi of the genus *Claviceps* has an important role in achieving maximal quantity of the product. Therefore, the type and manner of aggregation of hyphae in mycelia in submerged cultivation of *C. paspali* strain F-2057 have been tested in various nutritive media.

It has been found that maximal biosynthesis of alkaloids is achieved with synnemetic pellets of *C. paspali*, having the nucleus with hyphae aggregated in the so-called sclerotial structure. Pellets of loose structure, without a firm nucleus, as well as pellets of compact structure have a considerably lesser ability for alkaloid biosynthesis.

The achievement of the synnemetic structure of pellets is related to the composition of the nutritive medium, and the way of cultivation of vegetative inoculum.

Doc. dr. Srećko Matošić
Zoran Hajek, dipl. ing.
Prehrambeno-biotehnoški
fakultet, Zagreb
Pierottijeva 6/IV
YU-41000 Zagreb (Jugoslavija)