

Изобретение относится к области микробиологии, а именно к получению микотоксина роридина Н.

Роридин Н входит в группу макроциклических трихотеценовых микотоксинов (МЦТЦ) с антилейкемическим и фунгистатическим действием.

Известно получение МЦТЦ при помощи микроскопических грибов рода *Myrothecium*, которые в сапрофитной культуре при утилизации Сахаров (глюкоза, крахмал, декстрин, лактоза, тростниковый сахар), органических и неорганических азотсодержащих соединений (аминокислоты, сульфат и нитрат аммония), минеральных солей и микроэлементов образуют внутри- и внеклеточный роридин Н [1].

Недостатками получения МЦТЦ с помощью этих грибов-продуцентов можно считать следующие: 1) сложность получения роридина Н указанным способом, связанная с внутриклеточной локализацией роридина Н, в связи с чем для его выделения требуются дорогостоящие энергозатратные методы дезинтеграции мицелиальных структур; 2) невысокая продуктивность грибов; 3) недоступность зарубежных штаммов-продуцентов для отечественного производства.

Наиболее близким к предполагаемому изобретению является использование штамма NRRL 3019 *Myrothecium verrucaria* (Albertini et Schweinitz) Ditmar et Fries, который в сапрофитной культуре на питательной среде, содержащей в г/л: KH_2PO_4 - 2, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 2, дрожжевой экстракт Difco - 2, мясной экстракт - 2, пептон Gudahay - 2, глюкоза - 20, образует внутри- и внеклеточный роридин Н. Общий выход роридина Н-36 мг/л [2].

Недостатком штамма NRRL 3019 в качестве продуцента роридина Н является то, что для его культивирования требуется питательная среда, содержащая дорогостоящие органические компоненты (дрожжевой экстракт Difco, мясной экстракт Schwelz, Ferment AY, пептон Gudahay), и недостаточно высокая продуктивность внеклеточного роридина Н. Существенным недостатком является также недоступность этого продуцента для отечественного производства.

В основу изобретения поставлена задача получения отечественного экономичного штамма-продуцента роридина Н, который при культивировании на недорогой полусинтетической питательной среде продуцирует повышенное количество внеклеточного роридина Н, что существенно снижает стоимость конечного продукта.

Поставленная задача решается тем, что используется штамм гриба *Dendrodochium toxicum* 339A ВНИИА, который культивируется для получения роридина Н. В отличие от *M. verrucaria*, для культивирования которого требуется питательная среда с дрожжевым и мясным экстрактами, пептоном и глюкозой, используется дешевая полусинтетическая питательная среда Чапека, содержащая лишь один органический компонент - глюкозу (2%). Полученный продуцент образует внеклеточный роридин Н, что удешевляет способ получения, поскольку отпадает необходимость в энергозатратной дезинтеграции мицелиальных структур. Важным преимуществом этого продуцента перед зарубежным аналогом (общий выход внутри- и внеклеточного роридина Н-36 мг/л) является повышенный выход внеклеточного роридина Н, а именно 52,1 мг/л.

Новый штамм 100115 выделен на юге Украины и относится к *Dendrodochium toxicum* как и известный возбудитель дендродохиотоксикоза с/х животных. Штамм хранится в Коллекции культур Всесоюзного научно-исследовательского института антибиотиков АН СССР, г. Москва, регистрационный номер 339 А. Штамм токсичный, растет с разной скоростью на различных природных и искусственных средах (сусло-агар, агаризованная среда Чапека, картофельный агар, голодный агар). На этих средах штамм образует колонии с белым войлочным краем, линейный размер колоний на сусло-агаре - 12 мм (2-й день), 36 мм (7-й день); на агаризованной среде Чапека - 12 мм (2-й день), 36 мм (7-й день); на картофельной среде № 12 мм (2-й день), 34 мм (7-й день); на голодном агаре - 11 мм (2-й день), 34 мм (7-й день). Мицелий белый пушистый на сусло-агаре и агаризованной среде Чапека; присубстратный разбегающийся хаотично-извилистый - на голодном агаре; разреженный ворсистый - на картофельном агаре. Спороншение - светло-серого цвета, расположенное бугорками в виде концентрических окружностей, ближе к центру черного цвета. С возрастом культуры цвет конидий в слое приобретает оливково-черный или черный цвет. Мицелий состоит из интенсивно ветвящихся гиф двух видов: субстратные утолщенные до 4 мкм и воздушные тонкие - 1,5 мкм, септированные, мелкоранулированные с зернами волютина, каплями жира. Конидиеносцы образуют плотный на плектенхиматическом сплетении гиф, неправильно или древовидно разветвленные толщиной до 3 мкм с конечными ответвлениями часто мутовчатыми 12 - 40 x 1,5-2 мкм. Конидии продолговато-эллиптические к обоим концам заостренные 6,6 - 8,0 x 2,75 - 3,5 мкм. Спородожии более или менее округлые и неправильные диаметром 0,2 - 1 мкм.

Штамм способен утилизировать глюкозу, мальтозу, маннит, фруктозу, галактозу, клетчатку, крахмал для роста и образования токсинов. Из неорганических источников предпочтительными для азотного питания являются азотнокислый, фосфорнокислый, виннокислый, роданистый, уксуснокислый аммоний. Из органических азотистых соединений повышают выход токсина аспарагин и бета-аланин. При использовании названных выше источников углеродного и азотного питания, а также минеральных солей и микроэлементов штамм образует и накапливает в мицелии и культуральной жидкости роридин Н. Роридин Н экстрагируют из культуральной жидкости хлороформом в соотношении 1:5 трижды. Хлороформенные экстракты объединяют и упаривают под вакуумом. Полученный препарат-сырец подвергают очистке методом адсорбционной хроматографии на колонне (Silicagel II степени активности по Брокману, 100-600 меш.). Роридин Н кристаллизуется из смеси гексантилэтилового эфира в виде бесцветных игл с температурой плавления около 320°C.

Роридин Н не содержит азота, серы, галогенов. Молекулярная масса 512,2. Эмпирическая формула $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_8$. Элементный состав: С 67,27%; 67,97%; 67,71% (расчетный 67,97%); Н - 7,04%; 7,06%; 7,01%; О - 25,69%; 25,02%, 25,69% (расчетный 24,97%). Роридин Н не растворим в воде, но растворяется в бензоле, хлороформе, этилацетате, ацетоне, ацетонитриле.

Роридин Н обладает антифунгальным действием, минимальная ингибирующая концентрация 0,03 мкг, и слабым антибактериальным действием в отношении некоторых грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. По отношению к лабораторным животным (крысам) ЛД₅₀=20 мг/г веса при внутрибрюшинном введении.

Пример. Штамм не утрачивает исходных токсических свойств при хранении в сапрофитных условиях на стерильном просе, почве, соломенной смеси в течение 8-10 лет. В лабораторных условиях штамм культивируют

в два этапа; вначале - поверхностным способом при температуре 27-28°C на косяках сусло-агара в течение 30 суток, затем - в жидкой питательной среде Чапека следующего состава: г/л KNO_3 - 1,0; KH_2PO_4 - 1,0; Na_2SO_4 x 0,5; KCl - 0,5; FeSO_4 x $7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; глюкоза - 20,0; pH 5,0-5,5 в ферментационных колбах объемом 500 мл, содержащих по 150 мл питательной среды, на качалках 150 об/мин при температуре 27-28°C в течение 120 час. Культуральные фильтраты объединяют и трижды экстрагируют хлороформом в соотношении 1:5. Растворитель упаривают под вакуумом до получения маслянистого остатка. Из 40 литров культурального фильтрата выход препарата-сырца составляет 3,96 г. Ступенчатую колоночную хроматографию осуществляют с использованием силикагеля II степени активности по Брокману 100-160 меш. Системы растворителей: н-гексан (1,8 л); н-гексан-хлороформ (3:1)- 1,5 л; н-гексан-хлороформ (1:1)-2,4 л; н-гексан-хлороформ (1:-) - 1,2 л; хлороформ-ацетон (9:1) - 0,9 л; хлороформ-ацетон (1:1)-0,9 л; ацетон (0,6 л). Такой прием позволяет разделить комплексный препарат МЦТП на ряд компонентов, среды которых в значительном количестве выделяются веррукарин А, роридин А и роридин Н.

При общем выходе препарата МЦТЦ 82,16мг/л соотношения названных веществ составляло 2:1:7 с выходом 15,5; 7,9 52,11 мг/л соответственно. Содержание основного метаболита составляет 63,36%. Роридин Н кристаллизуется из смеси гексан-диэтиловый эфир в виде бесцветных игл с температурой плавления, около 320°C. Выход роридина Н составляет 52,1 мг/л.

В отличие от зарубежного аналога, требующего для роста и биосинтеза метаболита дорогостоящих органических добавок, предлагаемый в качестве изобретения штамм накапливает более 52,1 мг/л роридина Н на синтетической среде Чапека, что существенно снижает стоимость конечного продукта и не требует затрат энергии на дезинтеграцию мицелия.