

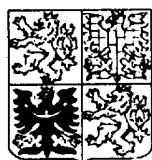
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 415

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3078-89**

(22) Přihlášeno: 23. 05. 89

(40) Zveřejněno: 17. 03. 93

(47) Uděleno: 22. 11. 95

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 01. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 17/10

C 12 P 19/44

C 12 P 19/58

C 12 P 19/60

(73) Majitel patentu:

Mikrobiologický ústav AVČR, Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Křen Vladimír ing. CSc., Praha, CZ;

Sajdl Přemysl RNDr. CSc., Praha, CZ;

Flieger Miroslav RNDr. CSc., Praha, CZ;

Svatoš Aleš ing. CSc., Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy fruktosidů námelových
alkaloidů**

(57) Anotace:

Způsob přípravy fruktosidů námelových alkaloidů elymoklavínu, chanoklavínu, lysergolu a DH-lysergolu, který spočívá v tom, že na tyto námelové alkaloidy se působí volným nebo imobilizovaným myceliem houby kmenů *Claviceps purpurea* nebo *Claviceps fusiformis* v médiu s 50 - 100 g sacharózy/l na pH 5,8 až 7,0, obsahujícím anorganické soli, například dusičnan vápenatý, kyselý fosforečnan draselný, chlorid vápenatý, síran hořečnatý, chlorid draselný, síran amonný a/nebo biologicky aktivní látky, například kvasničný autolyzát, kukuřičné máčecí vody, načež meziproduct se z média sorbuje na bentonit a po desorpci se dělí, s výhodou několikanásobnou kapalinovou chromatografií na kolonách s reverzní fází C-18 a mobilní fází směsí methanolu, vody a amoniaku.

CZ 280 415 B6

Způsob přípravy fruktosidů námellových alkaloidů

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy fruktosidů námellových alkaloidů elymoklavinu, chanoklavinu, lysergolu a DH-lysergolu.

Dosavadní stav techniky

Objevem elymoklavín-O- β -D-fruktosidů Flossem a kol. (Z. Naturforsch. 22b, 339, 1967) a elymoklavín-O- β -D-fruktofuranosyl (2--1)-O- β -D-fruktofuranosidu (Flieger a kol. J. Nat. Prod. 1989a), analogických fruktosidů chanoklavinu (Flieger a kol. J. Nat. Prod., 1989b), lysergolu a DH-lysergolu (Křen a kol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989) byla formována nová skupina námellových alkaloidů - glukosidy námellových alkaloidů.

Elymoklavín fruktosid je syntetizován ze sacharózy a elymoklavinu účinkem enzymu β -D-fruktofuranosidasy (Dickerson Biochem. J. 129, 363, 1972), který štěpí sacharózu na glukózu, utilizovanou organismem k růstu a fruktózu, která je přenášena na akceptor s primární alkoholickou skupinou, tj. např. na elymoklavín. Elymoklavín difruktosid vzniká z monofruktosidu přenosem fruktózy na volnou hydroxymethyl skupinu fruktózového zbytku. Analogicky vznikají i další fruktosidy námellových alkaloidů.

Tyto látky nebyly dosud získány ve větším množství, které by umožnilo studium jejich biologických aktivit a případně jejich využití ve farmacii. U elymoklavín-fruktosidů je možno předpokládat jisté imunomodulační účinky, které byly nalezeny u jejich aglykonu elymoklavinu (Šterzl a kol. Cz. Med. 1, 90, 1989), případně je možné jejich využití jako substrátu pro přípravu derivátů námellových alkaloidů.

Nevýhodou kmenů, které byly dosud popsány jako producenti těchto substancí, je nízká produkce a dlouhá kultivační doba, potřebná k jejich fermentativní přípravě. Kromě toho např. fruktosidy chanoklavinu, lysergolu a DH-lysergolu nelze připravit jinak než konverzí - fruktosylací - preformovaných alkaloidů.

Jedním z důležitých parametrů glykosylační aktivity u C. purpurea je koncentrace donoru fruktózy, tj. koncentrace sacharózy. Při nižších koncentracích sacharózy se projevuje nedostatek saturace substrátem, při vyšších koncentracích sacharóza sama kompetuje s alkaloidem o přenos fruktózy. Dalším důležitým parametrem pro funkci invertas je pH. O některých bifunkčních invertasách je známo, že jejich hydrolytická aktivita je vyšší v kyselém prostředí (ve směru štěpení glykosidů), naopak jejich syntetická aktivita (ve směru glykosylace) vzrůstá směrem k neutrálnímu až slabě zásaditému pH.

Pro glykosylaci elymoklavinu platí tato závislost striktně; při posuvu od pH 5 - 5,5 k neutrální oblasti pH 6,5 - 6,7 se glykosylační aktivita zvyšuje asi 5x.

pH-optimum pro glykosylaci chanoklavinu je však odlišné - asi pH 5,8. Souvisí to zřejmě s rozdílnými disociačními kons-

tantami elymoklavinu a chanoklavinu. Při uvedených pH-optimech obou alkaloidů je poměr disociované složky ku nedisociované roven přibližně 1. Optimalizací pH lze tedy docílit několikanásobného zvýšení výtěžku glykosidů námellových alkaloidů.

Dalším faktorem je vývojová závislost aktivity invertasy s věkem kultury. Maximální aktivity glykosylace se dosahuje asi 15. den věku produkční kultury. Tato závislost je způsobena jednak vyšší aktivitou enzymu v diferencovaném stadiu, ale i vyšší schopností kultury v tomto období neutralizovat médium.

Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody, tj. nízké výtěžky fruktosidů elymoklavinu a obtížné získání fruktosidů alkaloidů, odstraňuje způsob podle vynálezu, jehož podstatou je, že se na námellové alkaloidy elymoklavin, chanoklavin, lysergol a DH-lysergol působí volným nebo imobilizovaným myceliem houby kmenů *Claviceps purpurea* nebo *Claviceps fusiformis* v médiu s 50 - 100 g sacharózy a pH 5,8 až 7,0, obsahujícím anorganické soli, například dusičnan vápenatý, kyselý fosforečnan draselný, chlorid vápenatý, síran hořečnatý, chlorid draselný, síran amonný a/nebo biologicky aktivní látky, například kvasniční autolyzát, kukuřičné máčecí vody, načež mezi-produkt se z média sorbuje na bentonit a po desorpci se dělí s výhodou několikanásobnou kapalinovou chromatografií na kolonách s reverzní fází C-18 a mobilní fází směsí methanolu, vody a amoniaku.

Příklady provedení vynálezu

Způsob přípravy fruktosidů námellových alkaloidů je doložen následujícími příklady, aniž by předmět vynálezu byl jakkoliv omezen.

Příklad 1

Fruktosylace elymoklavinu

Pro fruktosylaci námellových alkaloidů byl použit kmen *Claviceps purpurea* 88-EP-47, který byl vyšlechtěn na vysokou glykosylační aktivitu.

Pro glykosylaci alkaloidů bylo použito promyté mycelium kmene *C. purpurea* 88-EP-47, narostlé na půdě TI (viz. tab. 1). Mycelium bylo za sterilních podmínek resuspendováno v médiu NP (viz. tab. 1) pro zamezení dalšího růstu a produkce alkaloidů de novo. Alkaloidy byly přidávány jako sterilní roztok ve formě citrátu v konc. 1,5 g/l. Pro fruktosylaci elymoklavinu byla přidána sacharóza v koncentraci 75 g/l. Na obrázku č.1 je znázorněna závislost glykosylační aktivity mycelia kmene *C. purpurea* na koncentraci sacharózy v médiu NP. Na ose S je vynesena koncentrace sacharózy v g/l, na ose K jsou vynesena procenta biokonverze elymoklavinu na celkové fruktosidy elymoklavinu (-o-) a na elymoklavin mono-fruktosid (-o-). pH pro konverzi elymoklavinu bylo udržováno na hodnotě 6,5. Na obrázku č.2 je znázorněna závislost glykosylační aktivity mycelia kmene *C. purpurea* na pH média NP (při konc. sacharózy 100 g/l). Na ose x je vyneseno pH média NP, na ose K

jsou % biokonverze elymoklavinu na celkové fruktosidy elymoklavinu (-o-) a na elymoklavin monofruktosid (-o-). V tomto případě lze s výhodou použít mycelium z desetidenního inokula na půdě TI, nebo mycelia z produkční kultivace na půdě CS2 (viz. tab. 1).

Separace alkaloidů:

Alkaloidy byly separovány z kultivační tekutiny po úpravě pH amoniakem na hodnotu 7,5 adsorpcí na bentonit (Lachema, Brno) (2 x 50/500 ml), desorbovány methanolem (3 x 100 ml) a směs alkaloidů byla odpařena na vakuové odparce na celk. objem 10 ml. Roztok byl nanesen (5 x 2 ml) na preparační nízkotlakou chromatografickou kolonu, plněnou Separonem SGX C18 (35g, 25 x 2,0 cm, zrnění 50 μ m) a eluován směsí methanol-voda-konc. čpavek (30:70:0,34). Detekce byla prováděna UV světlem při 288 nm, první frakce obsahovala směs glykosidů elymoklavinu. Další dělení bylo prováděno na HPLC Sepron SGX C18 (25 x 0,8 cm, zrnění 7 μ m) za podmínek jako při stanovení.

Identifikace byla provedena hmotovou spektrometrií na přístroji Finigan MAT 90 technikou DI-ci a DCI, teplota na vstupu 250 °C, teplota vzorku rostla od 25 do 300 °C rychlostí 1 °C/min, iontový tok 0,2 mA, urychlovací napětí 5 kV, chem. ionizace NH_3 . Cims elymoklavin difruktosidu (m/z - rel. int. %) : 417-33, 416-22, 254-23, 253-30, 237-100, 236-85, 223-9, 207-6, 167-9, 154-6, 127-1. Cims elymoklavinu difruktosidu (m/z - rel. int. %) : 597-25, 578-8, 416-10, 254-60, 253-45, 237-100, 236-93, 223-7, 207-3, 167-9, 154-10, 127-24.

Příklad 2

Fruktosylace chanoklavinu

Fruktosylace chanoklavinu se provádí stejně, jak je uvedeno v příkladu 1, pouze s tím rozdílem, že pH média NP bylo udržováno na hodnotě 5,8.

Dělení a charakterizace chanoklavin fruktosidů bylo prováděno obdobně jako v příkladu 1.

Cims chanoklavin monofruktosidu (m/z - rel. int. %) 154-19, 183-62, 239-71, 257-82, 418-47, 419-100.

Cims chanoklavin difruktosidu (m/z - rel. int. %) 154-14, 163-29, 183-39, 239-56, 257-53, 418-28, 419-100, 502-14, 582-29.

Příklad 3

Fruktosylace lysergolu

Fruktosylace lysergolu byla prováděna za stejných podmínek, jako v příkladu 1, pouze s tím rozdílem, že bylo použito lysergolu ve formě sterilního roztoku citrátu, upraveného na finální konc. 1,5 g/l, médium NP s obsahem sacharózy 75 g/l a pH 6,5. Výtěžky konverze jsou uvedeny v tabulce 2. Glykosidy lysergolu

byly analyzovány, jak je uvedeno v příkladu 1, a identifikace byla provedena pomocí HPLC. Fruktosidy lysergolu po hydrolýze kvasničnou invertázou dávají odpovídající aglykon, který se identifikuje srovnáním se standardem.

Příklad 4

Fruktosylace DH-lysergolu

Fruktosylace DH-lysergolu byla prováděna stejně, jako v příkladu 3, pouze s tím rozdílem, že pro fruktosylaci byl použit DH-lysergol. Výsledky konverze jsou uvedeny v tabulce 2. Dělení a identifikace fruktosidů DH-lysergolu byly prováděny, jak je uvedeno v příkladu 3.

Příklad 5

Fruktosylace kmene *Claviceps fusiformis*

Biokonverze námelových alkaloidů se provádí, jak je uvedeno v příkladech 1 až 4, pouze s tím rozdílem, že jako biologický materiál (mycelium) se použije kmen *Claviceps fusiformis*, s výhodou kmen W1 (A.O. 248612), kultivovaný postupem, jak je uvedeno v příkladu 1.

Příklad 6

Fruktosylace elymoklavinu imobilizovaným myceliem kmene *Claviceps purpurea*.

Pro biokonverzi elymoklavinu bylo použito imobilizovaných buněk kmene *Claviceps purpurea*, s výhodou kmen 88-EP-47. Pro imobilizaci bylo použito mycelium z inokulační kultury na médiu T1 (9. den). Mycelium se imobilizuje do Ca-alginátu (s výhodou Protanal LF 10/60 (Protan, Dramen, Norsko) v A.O. 250474, popř. v práci Křena a kol. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 26, 219, 1987). Koncentrace alginátu v biokatalyzátoru byla 3 %, koncentrace biomasy cca 70 mg vlhké váhy/ml biokatalyzátoru. Erlenmayerovy baňky (300 ml) obsahovaly 20 ml biokatalyzátoru v 60 ml média JCS-GY (tab. 1). Elymoklavin byl přidán jako roztok sukcinátu, sterilizovaný filtrací do finální koncentrace 1000 až 4000 mg/l (viz. tab. 3). Každých 22 dní bylo médium s elymoklavinem nahrazeno novým. Kultivace probíhala na třepačce za podmínek, uvedených v příkladu 1. Výsledky biokonverze jsou uvedeny v tabulce 3.

Příklad 7

Biokonverze chanoklavinu, lysergolu a DH-lysergolu imobilizovaných myceliem kmene *Claviceps purpurea*.

Bylo postupováno stejně, jako v příkladu 6, pouze s tím rozdílem, že ke konverzi byly použity roztoky chanoklavinu nebo lysergolu nebo DH-lysergolu v koncentracích 1 500 mg/l.

Dále je uvedena tabulka 1, ve které je uvedeno složení použitých médií.

Tabulka 1

komponenta [g/l]	NL829	TI	NP	CS2	JCSGY
sacharóza	100	100	100*	100	60
L-asparagin	10	10	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1	1	-	-	-
KH ₂ PO ₄	0,25	0,25	-	0,25	-
CaCl ₂	-	-	1,2	1,2	1,2
L-cystein.HCl	-	0,1	-	-	-
Kys. citronová monohydr.	-	-	16,8	16,8	2
Kys. jantarová	-	-	-	-	8,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	0,3	0,25	0,25	0,25
KCl	0,1	-	0,12	0,12	0,12
Kvas. autolyzát (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1	-	-	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	10	-	10	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	-	0,02	0,02	0,02
pH	0,02	0,02	0,015	0,015	0,015
báze k úpravě pH	5,5	5,5	5,5*	5,5	6,5
agar	NH ₄ OH	NaOH	NaOH	NaOH	NaOH
	25	-	-	-	-

* hodnota platí, pokud není v textu uvedeno jinak

V tabulce 2, která je uvedena dále, jsou výtěžky fruktosylace lysergolu a DH-lysergolu myceliem kmene *Claviceps purpurea*.

Tabulka 2

alkaloid	% ^a	
	p ^b	I ^c
Lysergol	7,7	0,5
DH-lysergol	2,8	13,3

^a konverze na celkové fruktosidy (mono- + oligo-)

^b biomasa z produkční kultivace na médiu CS2 (14. den), 6 g sušiny/l, doba konverze 50 dní.

^c biomasa z inokulační kultivace na TI (9. den), 6 g sušiny/l, doba konverze 50 dní.

Dále je uvedena tabulka 3, ve které jsou výsledky glykosylace elymoklavinu imobilizovanými buňkami *Claviceps purpurea*.

Tabulka 3

elymoklavin [mg/l]		1000	2000	4000	
		p ^a	I ^b	P	P
cyklus trvání cyklu č. [dny]					
1.	22	62,1	48,0	36,4	24,9
2.	22	38,4	50,8	18,7	17,2
3.	22	23,7	10,8	13,5	20,7

^ap - mycelium pro imobilizaci bylo z produkční kultivace na médiu CS2 (14. den),

^bI - mycelium pro imobilizaci bylo z inokula, narostlého na médiu TI (9. den).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob přípravy fruktosidů námelových alkaloidů elymoklavinu, chanoklavinu, lysergolu a DH-lysergolu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že na tyto námelové alkaloidy se působí volným nebo imobilizovaným myceliem houby kmenů *Claviceps purpurea* nebo *Claviceps fusiformis* v médiu s 50 - 100 g sacharózy/l a pH 5,8 až 7,0, obsahujícím anorganické soli, například dusičnan vápenatý, kyselý fosforečnan draselný, chlorid vápenatý, síran hořečnatý, chlorid draselný, síran amonný a/nebo biologicky aktivní látky, například kvasniční autolyzát, kukuřičné máčecí vody, načež mezi-produkt se z média sorbuje na bentonit a po desorpci se dělí, s výhodou několikanásobnou kapalinovou chromatografií na kolonách s reverzní fází C-18 a mobilní fází směsí methanolu, vody a amoniaku.

Konec dokumentu