



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217574

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 19 01 81
(21) [PV 365-81]

(40) Zveřejněno 28 05 82

(45) Vydáno 15 09 84

(51) Int. Cl.³
C 12 P 1/02

(75)

Autor vynálezu

BENEŠOVÁ VĚRA ing. CSc., SEMERDŽIEVA MARTA RNDr. CSc., PRAHA

(54) Metabolit z kloboukaté stopkovýtrusné houby *Agrocybe aegerita* kmen Ag ae I.

1

2

Vynález se týká nového metabolitu, který byl izolován z kloboukaté stopkovýtrusné houby *Agrocybe aegerita*, kmen Ag ae I., který je uložen ve sbírce kultur basidiomycetů CCM v Brně. Uvedená látka je chemické individuum molekulární váhy 496 sumárního vzorce $C_{30}H_{40}O_6$. Metabolit se izoluje z kultivační tekutiny této houby adsorpční chromatografií na silikagelu (Silpearl) soustavou octan ethylnatý — n-hexan v poměru 7 : 3 jako majoritní komponenta s $R_F = 0,05$.

Získaný metabolit vykazuje antibakteriální a antifugální aktivitu.

Vynález se týká metabolitu, který byl získán z kloboukaté stopkovýtrusné houby *Agrocybe aegerita*, kmen Ag ae I., který je uložen ve sbírce kultur basidiomycetů CCM v Brně pod uvedeným číslem.

Mezi antibiotiky je dnes známa celá řada látek, které byly izolovány z kloboukatých stopkovýtrusných hub, jako např. pleuromutilin, agrocybin atd. Žádný z těchto metabolitů zatím nedosáhl upotřebení jako léčivo. Pouze mucidin, antifungální antibiotikum, připravené ze submersní kultury houby *Oudemansiella mucida* (Čs. patent 136 492) našel uplatnění v klinické praxi v ČSSR. Jeho komerční produkt (Mucidermin SPOFA) se používá k povrchové aplikaci ve formě spraye.

Z houby *Agrocybe aegerita* nebyl dosud popsán žádný aktivní metabolit. Kultivační tekutina této houby, připravená hloubkovou kultivací (autorské osvědčení 212 526), však obsahuje na základě analytického rozboru, provedeného metodou chromatografie na tenké vrstvě, několik metabolitů neznámé struktury. Některé, včetně majoritní komponenty, vykazují antibakteriální a antifungální účinnost, zatímco kvantitativně nevýrazné složky komplexu jsou neúčinné.

Podstata vynálezu je nový metabolit z kloboukaté stopkovýtrusné houby *Agrocybe aegerita*, kmen Ag ae I., který je uložen ve sbírce kultur basidiomycetů CCM v Brně pod uvedeným číslem, sumárního vzorce $C_{30}H_{40}O_6$, molekulární váhy 496, získaný z kultivační tekutiny této houby adsorpční chromatografií na silikagelu (Silpearl) soustavou octan ethylnatý — n-hexan v poměru 7 : 3 jako majoritní komponenta s $R_F = 0,05$.

Uvedená látka je chemické individuum, které vykazuje antibakteriální a antifungální účinky s fyzikálně-chemickými parametry, které jsou určujícím faktorem pro stanovení jeho struktury.

Dále jsou uvedeny příklady izolace a identifikace metabolitu podle vynálezu.

Příklad

Hloubková kultivace podle čs. autorského osvědčení č. 212 526) byla provedena za použití houby *Agrocybe aegerita*, kmen Ag ae I, při teplotě 24 °C ($\pm 4^\circ$) na sladinkové půdě 8°Ball. (pH 5,5–7,0) po dobu 14 až 24 dnů, načež kultivační tekutina, která obsahuje antibiotikum, byla odfiltrována přes plachetku. Poté v dělicí nálevce byla tekutina extrahována třikrát po sobě 700 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty (2000 ml) byly vysušeny síranem sodným a zahuštěny ve vakuu při teplotě 40 °C. Viskózní odparek po ochlazení ztuhl ve světle oranžově-hnědě zbarvenou sklovitou masu.

Zahuštěný chloroformový extrakt supernatantu (0,6 g) byl naadsorbován na přibližně pětinasobné množství aktivního silikagelu (Silpearl). Chloroform byl ze vzorku odstraněn destilací ve vakuu, až silikagel do-

sáhl opět sypké konzistence bez hrudek. Silikagel s naadsorbovanou směsí metabolitů byl vnesen nad předem připravený sloupec stonásobného množství téhož adsorbentu v chromatografické koloně, do níž byl vlit v suspenzi s n-hexanem. Sloupec byl postupně eluován směsí n-hexanu s přibývajícím množstvím ethylacetátu.

Chromatografické dělení na sloupci bylo průběžně sledováno chromatografií na tenké vrstvě na silufolových deskách. Jako standard byl použit roztok výchozího chloroformového extraktu supernatantu. Po ukončení chromatografie byly spojeny frakce, obsahující oddělené komponenty. Jejich antibiotická aktivita byla kontrolována mikrobiologickou titrací.

V uvedeném příkladu byla z chromatografických frakcí, eluovaných z kolony směsí ethylacetát — n-hexan (7 : 3), izolována látka hydrofilní povahy, která se projevuje na silufolové desce po postřiku směsí koncentrované kyseliny sírové a 1% vanilinu charakteristickým sytě žlutým zbarvením a jejíž R_F je 0,05. Po odpaření rozpouštědla bezbarvý sklovitý odparek (0,150 g, tj. 25% výtěžek z výchozího extraktu) reprezentuje metabolit dle vynálezu, který má následující fyzikálně-chemické parametry:

V infračerveném spektru (měřeno v KBr) se vyznačuje pásem při 1727 cm^{-1} , odpovídajícím karbonylové skupině a velice intenzivním pásem při 3410 cm^{-1} , k němuž se řadí i pás při 1038 cm^{-1} , které oba svědčí o přítomnosti jedné nebo i více hydroxylových skupin v molekule látky. V hmotovém spektru M^+ 496 (high resolution) odpovídá molekulárnímu složení $C_{30}H_{40}O_6$. Ze spektra možno soudit, že jde o nesymetrickou molekulu, jejíž části jsou charakterizovány fragmenty: m/e 247, který odpovídá složení $C_{15}H_{19}O_3$ a m/e 231, který odpovídá složení $C_{15}H_{19}O_2$. V souhlase s údaji infračerveného a hmotového spektra je i interpretace ^1H —NMR a ^{13}C —NMR spekter. ^1H —NMR (200 MHz, CDCl_3 , 25°, TMS): 0,51 mt (1H); 0,74 mt (1H); 0,91 mt (1H); 1,170 s (3H); 1,198 s (3H); 2,09 s (3H); 2,40 s (2H); 3,17 s (2H); 3,45 s (2H); 3,165 T ($J=7$ Hz, 2H); 4,21 br s (1H, exchangeable). ^{13}C —NMR (15,036 MHz, CDCl_3 , 25°, TMS): 7,4 t, 8,3 t, 14,8 q, 15,5 q, 21,3 t, 25,1 d, 26,4 q, 28,2 t, 32,0 t, 32,6 s, 38,9 t, 39,4 t, 41,1 s, 42,9 t, 43,8 s, 44,6 t, 61,7 t, 71,1 t, 71,6 t, 80,8 t, 81,1 s, 118,6 s, 124,4 s, 127,2 s, 130,6 s, 132,9 s, 135,3 s, 141,5 s, 148,7 s, 207,7 s.

Z těchto spekter možno dedukovat, že molekula obsahuje tři terciární methylskupiny, z nichž jedna přísluší uhlíku, nesoucímu dvojnou vazbu, dále je součástí molekuly cyklopropanový kruh, čtyři $-\text{OCH}_2-$ skupiny a alifatická keto skupina.

V molekule jsou čtyři tetrasubstituované dvojně vazby [osm sp^2 -hybridizovatelných uhlíků].

V tabulce je dále uveden počet komponent, obsažených v chloroformovém extraktu supernatantu za současného sledování

biologické aktivity metabolitů, zkoncentrovaných chromatografickým dělením v oddělených zónách.

T a b u l k a

Výsledek chromatografie odparku chloroformového extraktu z kultivačního filtrátu *Agroclybe aegerita*

zóna č.	zbarvení po detekci	přibližné R_F v soustavě ethylacetát n-heptan 7:3	výtěžek v % odparku	zóna mm	Bac. subtilis		antibiotická aktivita		Cand. pseudotrop	
					zóna mm	vztah k 8m.j./ml streptom	zóna mm	vztah k 8m.j./ml streptom	zóna mm	vztah k 50m.j./ml fungicid.
1	červenofialová	0,84	3,0	11	5,2	—	0	—	11	39,3
2	červenofialová	0,75	0,3	12	5,6	—	—	—	11	39,3
3	červenofialová	0,60	2,6	—	—	—	—	—	—	—
4	modrá	0,48	2,3	0	—	—	0	—	0	—
5	fialověčervená	0,35	17,6	12	5,6	—	10	5,3	13	46,4
6	fialová	0,14	19,8	17	8,0	—	—	—	23	82,1
7	žlutá {metabolit dle vynálezu}	0,05	25,8	13	6,5	—	10	5,3	12	42,9
8	fialověčerná	0,03	15,1	0	—	—	0	—	0	—

Celkový eluát byl 86,5 % odparku a zbývajících 13,5 % zůstalo zadrženo v koloně.

× chloroformový roztok
 ×× vodný roztok
 ××× ethanolickeý roztok

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Metabolit z kloboukaté stopkovýtrusné houby *Agrocybe aegerita*, kmen AG ae I., který je uložen ve sbírce kultur basidiomycetů CCM v Brně pod uvedeným číslem, sumárního vzorce $C_{30}H_{40}O_6$, molekulární váhy

496, získaný z kultivační tekutiny této houby adsorpční chromatografií na silikagelu soustavou octan ethylnatý — n-hexan v poměru 7:3 jako majoritní komponenta s $R_F = 0,05$.