



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

199 986

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 19 04 78
(21) PV 2517-78

(51) Int. Cl.³ C 12 P 1/02

(40) Zveřejněno 30 11 79
(45) Vydáno 30 04 83

(75)

Autor vynálezu

ŘEHÁČEK ZDENĚK Dr.Sc, PRAHA

SPÁČIL JIŘÍ PhMr, OPAVA

PAŽOUTOVÁ SYLVIE Dr.

SAJDL PŘEMYSL Dr.CSc,

KOZOVÁ JAROSLAVA Dr.

FLIEGER MIROSLAV Dr. PRAHA

KRAJÍČEK ALOIS PhMr.

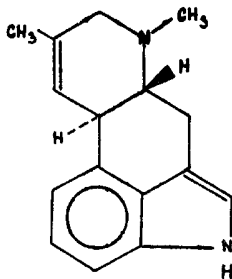
MALINKA ZDENĚK Dr. OPAVA

(54) Způsob výroby alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu submersní fermentací

1

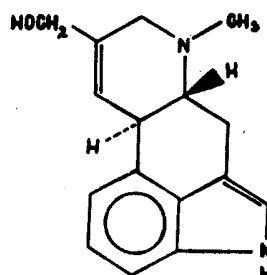
Vynález se týká způsobu výroby alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu submersní fermentací za použití vysokoprodukčních mutantů houby *Claviceps purpurea* CP7/5, CP7/63 a CP7/274 uložených v Československé sbírce mikroorganismů University J.E. Purkyně v Brně pod č. CCM F-630, CCM F-631, CCM F-632.

Agroklavin (M.Abe et al., Jap. Pat. 178 336)
strukturního vzorce I



(I)

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



(II)

se vyskytují především ve sklerociu různých druhů houby *Claviceps parasitujících* na divokých travách. Dálného Východu a Afriky. Ve stopových množstvích jsou oba alkaloidy obsaženy také v saprofytních kulturách *Claviceps purpurea*, *C. paspali*, *Aspergillus fumigatus* a některých kmenů fyko-, basidio- a deuteromycet. Elymoklavin byl izolován i ze semen určitých rostlin čeledi *Convolvulaceae* (A. Hofmann, *Planta Med.* **9**, 354 (1961)). Tento alkaloid je prekursorem derivátů kyseliny lysergové a parazitních i saprofytních kulturách ergotových hub (S. Agurell a M. Johansson, *Acta Chem. Scand.* **18**, 2285 (1964); H.G. Floss et.al., *Z. Naturforsch.* **21b**, 128 (1966); H.G.Floss, *J.Org. Chem.* **38**, 2249 (1973). Agroklavin inhibuje laktaci (P.G. Mantle, *Proc. Royal Soc. B* **170**, 423 (1968) a preventivně působí na implantaci fertilisovaného vajíčka (P.G. Mantle, *J. Reprod. Fertility* **18**, 81 (1969). Oba uvedené alkaloidy slouží současně jako substráty pro parciální syntézu komerčně významných derivátů kyseliny lysergové (Tung-Chung Choong a H.R. Shough, *Tetrahedron Letters* **19**, 1627 (1977)) a dalších farmakologicky významných látek (M. Semonský a N. Kucharczyk, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **33**, 577 (1968); J. Křepelka et.al., *Coll. Czech. Chem. Commun.* **42**, 1412 (1977)).

Příprava agroklavinu ani elymoklavinu není dosud uspokojivě vyřešena. Chemická příprava těchto alkaloidů je ekonomicky neschůdná a fermentační příprava ať již povrchová (M.Abe a S.Yamatodani, *Progr. Ind. Microbiol.* **5**, 205 (1964) nebo submersní (L.C. Vining a P.M. Nair, *Can. J. Microbiol.* **12**, 915 (1966); A. Tonolo a E. Udvardy-Nagy, *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **15**, 29 (1968) je zatížena nízkou výtěžností a délkou procesu, a neumožňuje tak výrobu agroklavinu a elymoklavinu ani v rozsahu obdobné výrobě derivátů kyseliny lysergové (R.A. Bassett et al., *Biochem. J.* **134**, 1 (1973)).

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob podle vynálezu vyznačený tím, že mutant houby *Claviceps purpurea* CP7/5 se inkubuje na živných mediích o pH 5,2 až 5,5 v temnu při 24 ± 1 °C, přičemž se získají spory kultury vyrostlé na agarovém mediu, které jsou přeneseny do tekutého inokulačního média obsahujícího sacharosu 10%, L-asparagin 1%, L-cystein 0,01%, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 %, kvasničný extrakt 0,01%, KH_2PO_4 0,02% a další anorganické sole ve stopových množstvích, a ze kterých po 7 až 9 denní submersní kultivaci vyrůstá inkulum, jímž se sáčkuje fermentační médium obsahující sacharosu 8 až 12%, meziprodukt cyklu trikarboxylových kyselin 0,04 až 0,08 M, (s výhodou kyselinu

citronovou, 2-ketoglutarovou nebo fumarovou, nebo asparagin 0,04 až 0,08 M, dále Ca^{2+} 5 až 10mM, KH_2PO_4 0,025%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025%, KCl 0,012% a další anorganické sole ve stopových množstvích načež po 14 až 21 denní submersní fermentaci se z fermentačního media izolují konečné produkty. Stejným způsobem se agroklavin a elymoklavin vyrábějí za použití dalších mutant CP7/63 a CP7/274.

Pro vysokou produkci alkaloidů je nutné použít fermentační půdu, která obsahuje sacharosu v kombinaci s kyselinou citronovou 2-ketoglutarovou nebo fumarovou nebo asparagin a ionty Ca^{2+} . Naproti tomu glukosa i fruktosa snižují výtěžek alkaloidů o 50 až 70 % a navíc v případě mutant CP7/5 a CP7/63 podporují nežádoucí tvorbu extracelulárních glukánů. Na půdě se sorbitem nebo mannitem se všechny mutanty vyznačují chudým růstem a nízkou produkční aktivitou. Fermentace alkaloidů na produkční půdě CS2 je dvoufázová. Pro první fázi je příznačný paralelní nárůst alkaloidů, biomasy a počtu spór. Druhou fází fermentace charakterizuje nárůst produkce alkaloidů, téměř setrvalý stav objemu biomasy, počtu spór a hladiny extracelulárních glukánů.

Dále je uveden příklad způsobu výroby alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu podle vynálezu.

P Ř Í K L A D

Příprava inokula. Výchozí inokulum pro submersní fermentaci alkaloidů se připraví smytím spór z 30 denní kultury produkčního mutantu vyrostlého na agarové půdě T2 (C. Spalla, Genetics of Industrial Microorganisms. Eds. Z. Vaněk, Z. Hošťálek a J. Cudlín. Elsevier, Amsterdam 1973, p.393). Získaná suspence spór se upraví na přibližnou koncentraci 10^6 až 10^7 spór.ml.⁻¹. Z této suspence se přenese 1,5 až 2 ml do 60ml tekuté živné půdy T1 (A. Stoll et al. Helv. Chim. Acta 37, 1815 (1954)) v Erlenmeyerových bankách (300 ml) a inkubuje se 7 až 9 dnů v temnu při 24±1 °C na rotačním třepacím stroji (240 ot.min.⁻¹, excent 5,5 cm). Výsledné submersní inokulum je tvořeno krátkými fragmenty vláken, spórmi a chomáčky mladého mycelia. Indikátorem kvalitního inokula je růžová pigmentace.

Půda T2 (g.l ⁻¹)	Půda T1 g.l ⁻¹ ,
sacharosa 100	sacharosa 100
L-asparagin 10	L-asparagin 10
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1	L-cystein.HCl 0,1
kvasničný extrakt 0,1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,0
KH_2PO_4 0,25	kvasničný extrakt 0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25	KH_2PO_4 0,25
KCl 0,12	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,015	dest. H ₂ O
agar Difco 20	
dest. H ₂ O	
pH 5,5 po 15 min sterilizaci v autoklávu při 105 °C	pH 5,5 po 15 min sterilizaci v autoklávu při 105 °C

K úpravě pH půd T1 a T2 se použije 2,5M NaOH.

Vlastní fermentace alkaloidů. Submersní inokulum se v množství 3 až 5 ml přenesse do Erlenmeyerových baněk (300 ml) s 60 ml níže uvedeného fermentačního media CS2 a inkubuje se 14 až 21 dnů v temně při 24,1 °C na rotačním třepacím stroji (240 ot.min⁻¹, excentr 5,5 cm).

Půda CS2

sacharosa 100 g
kyselina citronová 0,08M
(NH₄)₂SO₄ 10g
CaCl₂ 1,2g
KH₂PO₄ 0,25g
MgSO₄·7H₂O 0,25g
KCl 0,12g
FeSO₄·7H₂O 0,02g
ZnSO₄·7H₂O 0,015g
dest.H₂O ad 1000ml

pH 5,5 po sterilizaci media v autoklávu 15 min při 105°C a úpravě pomocí 2,5M NaOH.

Extrakce směsi agroklavinu a elymoklavinu z fermentační tekutiny. Fermentační tekutina zbavená mycelia filtrací nebo centrifugací se upraví amoniakem na pH 9. Přidá se k ní dvojnásobné množství diethyletheru, a po 30 min extrakci na magnetickém míchadle se oddělí etherová vrstva. K oddělené fermentační tekutině se přidá stejný objem směsi chloroform-isopropanol (80:20) a znovu se 30 min extrahuje. Po oddělení chloroformové vrstvy se extrakce opakuje. Získané extrakty se spojí a suší síranem amonným. Po odstranění sušidla se roztok při teplotě 30 °C a za sníženého tlaku odpaří do sucha. Účinnost takto provedené extrakce dosahuje přibližně 99% z celkového množství alkaloidů (měřeno fotometricky). Obsahuje-li fermentační tekutina nadměrné množství glukanu, tyto se před extrakcí alkaloidů odstraní vysrážením ethanolem (1 díl fermentační tekutiny + 1 díl ethanolu). Po odstranění glukanu centrifugací, se směs za sníženého tlaku zahustí na původní objem a alkaloidy se extrahují výše popsaným způsobem. Výtěžnost celkových alkaloidů a procentuální zastoupení agroklavinu a elymoklavinu v alkaloidové směsi 14 denní submersní kultury jsou znázorněny v Tabulce 1.

T A B U L K A 1

Mutant	celkové alkaloidy (g.agroklavinu) -1	Agroklavin Elymoklavin	
		%	
CP7/5	3,9	77	23
CP7/63	3,2	94	6
CP7/274	1,8	70	30

Dělení agroklavinu a elymoklavinu. Surový agroklavin a elymoklavin se oddělí sloupcovou chromatografií na silikagelu o velikosti částic 100 až 200 nm (Serva). Jako eluční soustavy se používá směs chloroform-methanol-amoniak (80:20:0,02). Jednotlivé frakce se analyzují metodou chromatografie na tenké vrstvě v téže soustavě. Frakce s jednotlivými alkaloidy se spojí a za sníženého tlaku odpaří do sucha. Krystalizace agroklavinu se provádí z etheru, krystalizace elymoklavinu z methanolu.

Stanovení agroklavinu a elymoklavinu. Kvantitativní analýsa jednotlivých vzorků se provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Alakloidy se extrahují výše popsaným postupem. Vzorky surových alkaloidů se ponechají v suchém stavu. Těsně před měřením se rozpustí v soustavě ether-ethanol (84:16). Takto upravené vzorky se přímo dávají do kolony kapalinového chromatografu (Varian LC 8500). Detekce se provádí při vlnových délkách 225, 240 a 282 nm na UV detektoru. Stacionární fázi HPLC je modifikovaný silikagel (Lichrosorb NH₂, Merck) o velikosti částic 10 um umístěný v koloně 250 mm dlouhé o vnitřním průměru 2 mm. Mobilní fázi tvoří soustava diethylether-ethanol (84:16). Relativní retenční čas agroklavinu odpovídá hodnotě 1,00, v případě elymoklavinu hodnotě 3,22. Uvedené hodnoty dokumentují dokonalé rozdělení agroklavinu a elymoklavinu. Relativní koncentrace obou složek směsi alkaloidů jsou vypočítány metodou vnitřní normalizace na základě známých specifických absorpčních koeficientů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu submersní fermentací, vyznačený tím, že se mutant houby *Claviceps purpurea* CCM F-630 a/nebo CCM F-631 a/nebo CCM F-632 inkubuje na živných médiích o pH 5,2 až 5,5 v temnu při 24±1 °C, přičemž se získají spóry kultury vyrostlé na agarovém mediu, které jsou přeneseny do tekutého inokulačního media, obsahujícího sacharosu 10%, L-asparagin 1 %, L-cystein.HCl 0,01 %, Ca(NO₃)₂.4H₂O 0,1 %, kvasniční extrakt 0,01 %, KH₂PO₄ 0,02 % a další anorganické sole ve stopových množstvích, a ze kterých po 7 až 9denní submersní kultivaci vyrůstá inokulum, jímž se zaočkuje fermentační medium obsahující sacharosu 8 až 10 %, meziprodukt cyklu trikarboxylových kyselin 0,04 až 0,08 M, s výhodou kyselinu citronovou, 2-ketoglutarovou nebo fumarovou, nebo asparagin 0,04 až 0,08 M, dále Ca²⁺ 5 až 10mM, KH₂PO₄ 0,025 %, MgSO₄.7H₂O 0,025 %, KCl 0,012 % a další anorganické sole ve stopových množstvích, načež po 14 až 21denní submersní fermentaci se z fermentačního media izolují konečné produkty.