

UDC 547.94:582.282.19 = 862

BIOSINTEZA ERGOT ALKALOIDA POMOĆU
GLJIVE *CLAVICEPS PASPALI* STEVENS
ET HALL

With Summary in English

SREČKO MATOŠIĆ, VERONA BAŠIĆ i MIRA LIŠNJIC

(Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb)

Primljeno 07. 11. 1983.

Ispitani su parametri proizvodnje ergot alkaloida u submerznoj kulturi gljive *Claviceps paspali* F-2057. Maksimalni prinosi alkaloida postižu se pri kultivaciji *C. paspali* u podlozi s manitolom i amonijevim sukcinatom (od 11 do 14% suhe tvari u podlozi) i iznose $2,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Uvod

Ergot alkaloidi farmakološki važni i odavno poznati spojevi tek se u novije vrijeme proizvode industrijski, submerznom kultivacijom gljiva roda *Claviceps*. Samo dvije, među mnogim vrstama mikroorganizama koji proizvode ergot alkaloidne, sintetiziraju farmakološki vrijedne alkaloidne, i to: *Claviceps purpurea* tzv. peptidne ergot alkaloidne (Tonolo 1966, Galeffi i sur. 1974) i *Claviceps paspali* jednostavne derivate lizerginske kiseline (Arcamone i sur. 1961).

Proizvodnja alkaloida u submerznoj kulturi gljiva roda *Claviceps* može slijediti jedan od dva modela uobičajena u biosintezi sekundarnih metabolita (Vining 1973). Kod prvog češćeg modela uočavaju se metaboličke faze. Trofofaza, karakterizirana brzim rastom i odsustvošću proizvodnje alkaloida, nakon koje slijedi idiofaza u toku koje brzina rasta opada, a odvija se biosinteza alkaloida. Pri biosintezi alkaloida po drugom modelu metaboličke faze nisu uočljive. Alkaloidi se nakupljaju brzinom koja odgovara brzini rasta micelija. Vining (1973) navodi da se biosinteza alkaloida pri kultivaciji *C. paspali* odvija istovremeno s porastom biomase, tj. prema drugom modelu proizvodnje.

Tema ovog rada je ispitivanje biosinteze ergot alkaloida sa stajališta unapređivanja procesa submerzne kultivacije gljive *C. paspali*.

Materijal i metode

Mikroorganizam upotrijebljen u ovom radu bio je *Claviceps paspali* F-2057 iz zbirke Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Podloge za gljivu *C. paspali* bile su sastava:

- podloga za održavanje i selekciju mikroorganizama:
glukoza 2%; infuzija krumpira priređena iz 300 g krumpira u 1 l vodovodne vode i agar, 2%; pH 7,0 i sterilizacija 30 min na 110°C;
- podloga za uzgoj inokuluma I i II faze:
manitol, 4%; jantarna kiselina neutralizirana do pH 5,2 s amonijakom, 1%; slanutkovo brašno, 0,1%; KH_2PO_4 , 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,03% i vodovodna voda; sterilizacija 20 min na 120°C;
- podloga za biosintezu: manitol, 6%; jantarna kiselina neutralizirana do pH 5,2 s amonijakom, 5%; KH_2PO_4 , 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,03% i vodovodna voda; sterilizacija 20 min na 120°C. U podlozi je ispitan utjecaj različitih koncentracija izvora ugljika (manitol) i dušika (amonijev sukcinat) na biosintezu alkaloida.

Uzgoj *C. paspali* te priprema inokuluma provodili su se submerznim postupkom u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 ml sa 100 ml hranjive podloge, na rotacionoj tresilici s 200 o/min. i ekscentrom od 5 cm, pri temperaturi od 25°C.

Inokulum *C. paspali* uzgojen je u dvije faze (7 dana i 3 dana). Nakon I. faze pripremljeni inokulum je homogeniziran sterilno (Warring blender) pri 15.000 o/min. kroz 15 sek. Količina od 10% v/v služila je za naciepljivanje II. faze uzgoja inokuluma iz koje je naciepljena podloga za biosintezu, također s količinom od 10% v/v.

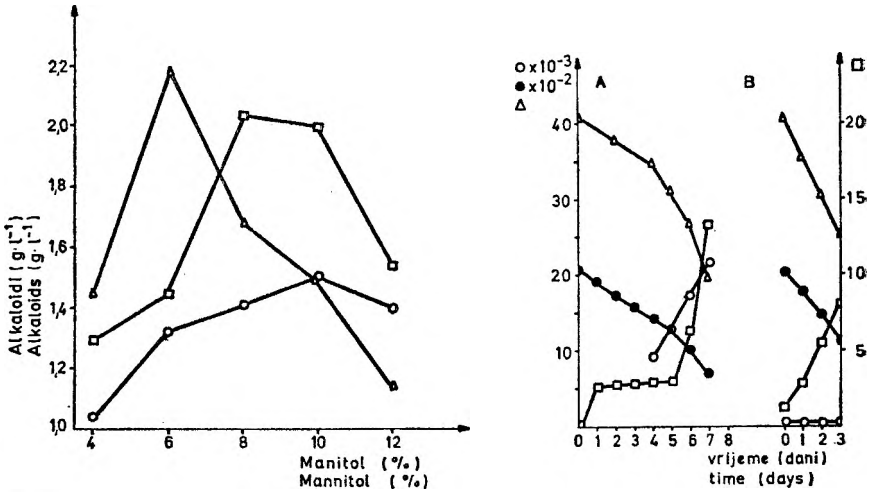
Alkaloidi su određivani spektrofotometrijskom metodom po van Urku (V o i g t, 1959). Rezultati su izražavani u $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ergometrina.

Količina suhe tvari biomase je određena filtriranjem, pranjem i sušenjem na 105°C.

Manitol je određivan polarimetrijski (A r c a m o n e i sur. 1961), a fosfati spektrofotometrijski (B e r e n b l u m i C h a i n 1938).

Rezultati i diskusija

Koncentracija i odnos izvora ugljika, odnosno dušika, ima vrlo izražen utjecaj na biosintezu »sekundarnih metabolita« pa i ergot alkaloida. Ispitivanjem odnosa koncentracije manitola i amonijevog sukcinata u hranjivoj podlozi pri kultivaciji *C. paspali*, ustanovljeno je da se maksimalni prinosi alkaloida od $2,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ostvaruju s 4% amonijevog sukcinata, te 8 i 10% manitola, odnosno 5% amonijevog sukcinata i 6% manitola (slika 1). Količina suhe tvari podloge pri tome iznosi od 11 do 14%. Ti su rezultati u suglasnosti s tvrdnjom (J e r a j i T a m b u r a š e v 1972) da više koncentracije manitola u podlozi (8 do 15%) daju i više prinose alkaloida. Međutim, iz rezultata u ovom radu (slika 1) vidljivo je da se radi prije o uravnoteženju između odnosa količina dvaju izvora ugljika (manitol i jantarna kiselina) i izvora dušika (amonijev ion).



Sl. 1. Utjecaj koncentracije manitola i amonijevog sukcinata u podlozi na biosintezu ergot alkaloida pri kultivaciji gljive *C. paspali* (Rezultati nakon 15 dana uzgoja)

% amonijevog sukcinata u podlozi:
 O, 3% □, 4% △, 5%

Fig. 1. Influence of the concentration of mannitol and ammonium succinate in the medium on biosynthesis of ergot alkaloids by means of *C. paspali* (Results after 15 days of cultivation)

% of ammonium succinate in the medium:
 O, 3% □, 4% △, 5%

Sl. 2. Parametri kultivacije inokuluma *C. paspali*

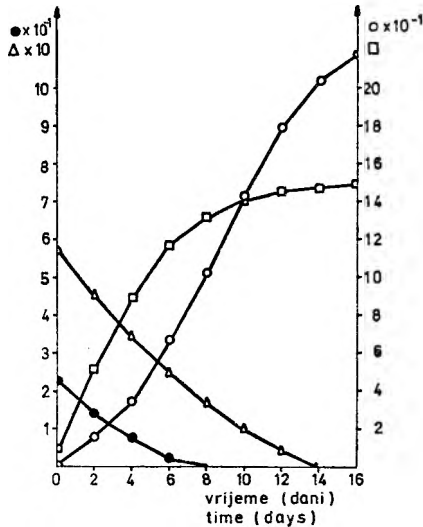
A — I faze i B — II faze
 ○ Alkaloidi g·l⁻¹
 □ Suha tvar biomase g·l⁻¹
 △ Manitol g·l⁻¹
 ● Anorganski fosfor u filtratu g·l⁻¹

Fig. 2. Parameters of inoculum cultivation of *C. paspali*

A — phase I, B — phase II
 ○ Alkaloids g·l⁻¹
 □ Biomass dry weight g·l⁻¹
 △ Mannitol g·l⁻¹
 ● Inorganic phosphorus in the filtrate g·l⁻¹

Uzgoj inokuluma pri biosintezi ergot alkaloida s pomoću *C. paspali* provodi se u dvije faze (A rca mone i sur. 1961; Jeraj i Tamburašev 1972) s homogenizacijom komine odnosno micelija nakon I. faze. Uzgoj inokuluma u II. fazi (samo 3 dana) ne utječe na povećanje prinosa alkaloida, no potreban je zbog brzog dobivanja veće količine homogene biomase.

Uzgoj inokuluma u I. fazi je karakteriziran produženom lag fazom rasta — čak do 5 dana, s vrlo slabim nakupljanjem alkaloida i utroškom 66% anorganskog fosfata i 56% manitola iz podloge (slika 2).



Sl. 3. Parametri biosinteze ergot alkaloida pri kultivaciji gljive *C. paspali* (podloga — manitol 6% i amonijev sukcinat 5%)

- Alkaloidi $g \cdot l^{-1}$
- Suha tvar biomase $g \cdot l^{-1}$
- △ Manitol $g \cdot l^{-1}$
- Anorganski fosfor u filtratu $g \cdot l^{-1}$

Fig. 3. Parameters of cultivation of *C. paspali* and biosynthesis of ergot alkaloids (medium — mannitol 6% and ammonium succinate 5%)

- Alkaloids $g \cdot l^{-1}$
- Biomass dry weight $g \cdot l^{-1}$
- △ Mannitol $g \cdot l^{-1}$
- Inorganic phosphorus in the filtrate $g \cdot l^{-1}$

Druga faza uzgoja inokuluma karakterizirana je eksponencijalnim rastom i brzim utroškom manitola i fosfora, uz potpunu odsutnost alkaloida u komini.

Biosinteza ergot alkaloida pri kultivaciji *C. paspali* u podlozi sa 6% manitola i 5% amonijevog sukcinata teče od 4. dana do 14. dana uzgoja nepromijenjenom brzinom s maksimalnim prinosom od $2,2 g \cdot l^{-1}$ (slika 3). Rast mikroorganizama je karakteriziran dvjema fazama — trofaza i idiofaza. Završetak eksponencijalnog uravnoteženog rasta obilježen je utroškom fosfata ($0,25 g \cdot l^{-1}$) u podlozi u periodu od 6. do 8. dana kultivacije. S utroškom ukupne količine manitola u podlozi je povezano i smanjenje brzine biosinteze alkaloida (slika 3).

Pri uzgoju *C. paspali* jasno su izražene faze rasta, trofaza i idiofaza, a biosinteza alkaloida odvija se prema modelu karakterističnom za ovaj način rasta (sinteza alkaloida u idiofazi). Ovi navodi nisu u skladu s tvrdnjom Vininga (1973) da pri kultivaciji *C. paspali* brzina biosinteze alkaloida odgovara brzini rasta mikroorganizma. Drugi autori su također ustanovili slična odstupanja (Udvardy 1980; Matošić i Tamburašev 1983). Pri kultivaciji *C. purpurea*, za koju je karakteristično da nakuplja alkaloida u idiofazi, promjenom uvjeta uzgoja, sinteza alkaloida se odvija po srednjem putu, tj. ne slijedi niti jedan od dva navedena modela. Može se stoga zaključiti da model pro-

izvodnje alkaloida nije prirodeno svojstvo mikroorganizama. Ono vjerojatno odražava fiziološke uvjete primijenjene da bi se pokrenuo sekundarni metabolizam kulture organizma.

Zaključak

Pri uzgoju *C. paspali* jasno su izražene trofofaza i idiofaza, a biosinteza ergot alkaloida se odvija prema modelu karakterističnom za ovaj način rasta — nakupljanjem alkaloida u idiofazi.

Maksimalni prinosi alkaloida postižu se pri kultivaciji *C. paspali* u podlozi s manitolom i amonijevim sukcinatom (od 11 do 14% suhe tvari u podlozi) i iznose 2,2 g · l⁻¹.

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. B Biol. Sci. 155, 26—54.
- Berenblum, I., E. B. Chain, 1938: An Improved Method for Colorimetric Determination of Phosphate. Biochem. J. 32, 295—298.
- Galeffi, C., S. Matošić, A. Tonolo, 1974: Gli alcaloidi della *Claviceps purpurea*. Lincei Rend. Sc. fis. mat. e nat. 56, 952—956.
- Jeraj, V., G. Tamburašev, 1972: Dobivanje ergot alkaloida pomoću gljive *Claviceps paspali*. Mikrobiologija 9, 79—85.
- Matošić, S., G. Tamburašev, 1983: Biosinteza ergot alkaloida pomoću gljive *Claviceps purpurea*. Prehrambeno-tehnološka revija 21, 3—6.
- Tonolo, A., 1966: Production of Peptide Alkaloids in Submerged Culture by a Strain of *Claviceps purpurea*. Nature 209, 1134—1135.
- Udvardy, E. N., 1980: Consideration of the Development of an Ergot Alkaloid Fermentation Process. Process. Biochem. 15, 4, 5—8.
- Vining, L. C., 1973: Physiological Aspects of Alkaloid Production by *Claviceps*. Genetics of Industrial Microorganisms (Z. Vanek, Z. Hoštalek, J. Cudlin, ured.), Czechoslovak Academy of Science, Prague, 405—419.
- Voigt, R., 1959: Zur Bestimmung der Mutterkornalkaloide mit p-Dimethylamino Benzaldehyd. Microchim. Acta, 619—630.

SUMMARY

BIOSYNTHESIS OF ERGOT ALKALOIDS BY MEANS OF FUNGUS *CLAVICEPS PASPALI* STEVENS AND HALL

Srećko Matošić, Verona Bašić and Mira Lišnjić

(Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb)

Parameters of ergot alkaloids production in submerged culture of *Claviceps paspali* were investigated. Two distinct phases, trophophase and idiophase, were observed during the cultivation of microorganism. Biosynthesis of alkaloids follows a characteristic pattern of idiophasic accumulation of the product.

The maximal yields of alkaloids were obtained in the culture of *C. paspali* in the medium with mannitol and ammonia succinate (from 11% to 14% of dry matter in the medium) and amounted to about 2.2 g · l⁻¹.

Doc. dr. Srećko Matošić
Mr. Verona Bašić
Mira Lišnjić, dipl. inž.
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6/IV
YU-41000 Zagreb (Jugoslavija)