
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

LORENZO TUTTOBELLO, CORRAADO GALEFFI

Gli alcaloidi della *Claviceps fusiformis* (Loveless)-ISS/2070 in coltura sommersa

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 64 (1978), n.2, p. 200–203.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_64_2_200_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Chimica. — *Gli alcaloidi della Claviceps fusiformis (Loveless)-ISS/2070 in coltura sommersa* (*). Nota di LORENZO TUTTOBELLO e CORRADO GALEFFI, presentata (**) dal Corrisp. G. B. MARINI-BETTÒLO.

SUMMARY. — From submerged cultures of *Claviceps fusiformis* (Loveless)-ISS/2070 five clavine-type alkaloids (chanoclavine I and II, isochanoclavine, elymoclavine and agroclavine) were isolated by countercurrent distribution.

Gli alcaloidi clavinici sono stati ritrovati in piante del genere *Ipomoea* [1, 2], *Rivea* [3-5], *Cuscuta* [6-8], *Convolvulus* [7-8], *Argyreia* [9] ed in miceti dei generi *Aspergillus* [10-12], *Penicillium* [13-15], *Geotrichum*, *Mucor* [16], *Rhizopus* [12], *Pellicularia*, *Lenzites* [15], oltre che negli sclerozi od in colture di *Claviceps purpurea* [17-19], *C. paspali* [20] e *C. maritima* [21].

Una particolare specie di *Claviceps*, che aveva dato luogo a fenomeni di agalactia in pecore senza sintomi di ergotismo [22], isolata in Rhodesia dalla graminacea *Pennisetum typhoideum* fu denominata *C. fusiformis* [23]. Da colture sommerse di questa specie, che produce in alta concentrazione anche alcaloidi clavinici, fu isolato l'acido clavicipitico [24].

Gli alcaloidi clavinici, intermedi della biosintesi dell'acido lisergico [25, 26], sono stati poco studiati dal punto di vista dei loro effetti biologici anche per le piccole quantità disponibili. Le ricerche di Yui e Takeo [27-29] e di Hofmann [30] sono state riprese recentemente da Mantle [31-33] e da Edwardson [34, 35] e poi all'Istituto Superiore di Sanità di Roma [36, 38]; esse hanno permesso di stabilire che le clavine nella ratta e nella topina a certe dosi bloccano la lattazione, impediscono all'ovulo fecondato l'annidamento nell'utero ed annullano nell'utero di ratta, *in vitro*, l'attività contratturante dell'ossitocina e dell'acetilcolina.

Al fine di proseguire queste sperimentazioni è stata messa a punto la produzione di alcaloidi clavinici con *C. fusiformis* per la successiva separazione ed identificazione. Alcaloidi clavinici erano stati ottenuti in coltura superficiale [39-41] e con più difficoltà in coltura sommersa [42, 43]. Sulla base di precedenti indicazioni [43] è stato standardizzato per il ceppo in esame il procedimento appresso riportato.

La coltura del ceppo ISS/2070 inizia con colonie cresciute a 27 °C per 15-20 giorni in piastre Petri con agar patata glucosio 2 %. La coltura sommersa avviene in 3 fasi: un primo stadio di brodo di patata con 2 % di glucosio a

(*) Lavoro eseguito presso i laboratori del Servizio Biologico e di Chimica del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità Roma.

(**) Nella seduta dell'11 febbraio 1978.

pH 7.0, prima della sterilizzazione a 100 °C per 20' e 110 °C per altri 20'; un secondo stadio di moltiplicazione vegetativa ancora in brodo patata; un terzo stadio fermentativo di produzione in terreno con peptone Difco al 2 % e glicerina al 10 %, pH 7.0 prima della sterilizzazione.

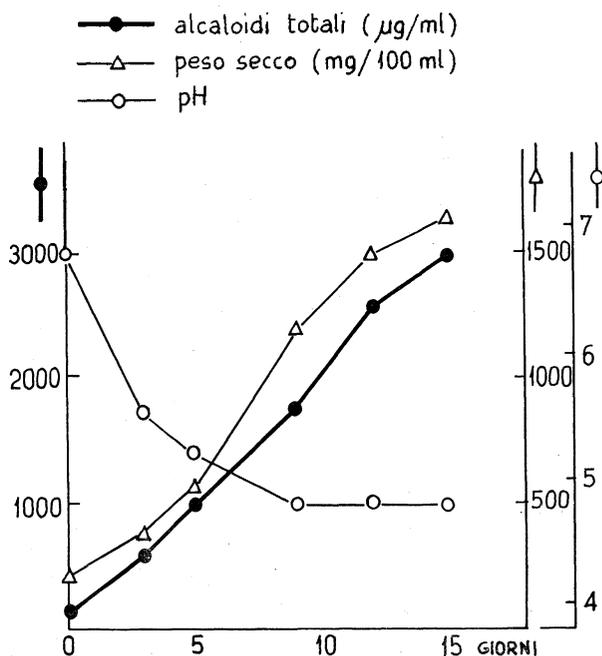


Fig. 1. - Fermentazione con ceppo di *C. fusiformis* ISS/2070. Alcaloidi calcolati come agroclavina, titolati secondo R. Voigt («Microchim. Acta», 619, 1959). Peso secco determinato dopo filtrazione per carta ed essiccamento per 48 h a 105 °C. Preparazione inoculo: beute da 500 ml con 100 ml di brodo patata, altrove indicato, seminate con una sola colonia di *C. fusiformis* del tipo seguente: colore biancastro con essudato viola-marroncino nella parte aerea e retropatina viola-bruno. Trasferimento dopo 5 giorni di 10 ml del brodo cultura in identico terreno. Fermentazione: beute da 500 ml con 150 ml del terreno altrove indicato, inocolato con 30 ml di coltura di moltiplicazione al 3° giorno. Le tre fasi dello sviluppo sommerso sono realizzate con agitatore a 200 gir/min in cella termostatica a 27 °C.

Dopo circa due settimane di fermentazione, se si è realizzata la crescita del micelio in forma pseudoscleroziale, la concentrazione di alcaloidi prodotti ammonta a 3000 (ed anche 4000) µg/ml. Le brodo colture attive, molto viscosi, vengono filtrate sottovuoto con filtro a paniere con celite come coadiuvante, il pH del brodo limpido è portato a pH 8.5-9 con NaHCO₃ e gli alcaloidi vengono estratti al 95 % con tre estrazioni in CHCl₃ e separazione in Sharples. L'estratto cloroformico viene dibattuto con 1/4 del suo volume di soluzione di ac. tartarico al 4 % dalla quale gli alcaloidi vengono riestratti con CHCl₃ previa alcalinizzazione a pH 8.5 con NaHCO₃. Il brodo alcalino, dopo estrazione con CHCl₃, è estratto con *n*-butanolo; nel residuo non è stato ritrovato acido clavicipitico [24].

L'estratto cloroformico, invece, è frazionato per distribuzione in controcorrente tra CHCl_3 e *n*-propanolo 2 : 1 (*v* : *v*) a pH discontinuamente decrescente secondo il procedimento descritto da uno di noi per la *C. purpurea* [44].

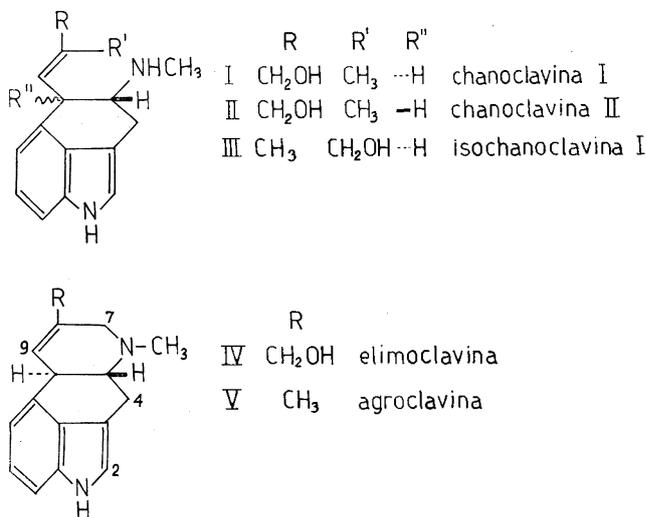


Fig. 2.

Si sono separati nell'ordine: a pH 7.0 due alcaloidi in miscela (2 %, $K_r K_b 9 \times 10^{-8}$), a pH 6.0 la isochanoclavina (III, 2 %, $K_r K_b 4.1 \times 10^{-8}$), a pH 5.0 la elimoclavina (IV, 18 %, $K_r K_b 3.2 \times 10^{-9}$) ed a pH 3.0 la agroclavina (V, 78 %, $K_r K_b 1.4 \times 10^{-12}$). La miscela di alcaloidi non risolta è poi separata per riciclo (1180 trasferimenti) con un diverso sistema di solventi (CHCl_3 ed acetato di etile 1 : 1, *v* : *v*, e Na_2HPO_4 1/15 M).

Si sono così separati ed identificati la chanoclavina II, più mobile (II, $K_r K_b 3.2 \times 10^{-5}$) e la chanoclavina I (I, $K_r K_b 2.4 \times 10^{-5}$) (fig. 2).

CONCLUSIONI

Dalla *C. fusiformis* (Loveless)-ISS/2070 in coltura sommersa si ottiene in elevata concentrazione (oltre 3 mg/ml) una miscela di soli alcaloidi clavini (agroclavina, elimoclavina, isochanoclavina e chanoclavina I e II) che possono trovare interessanti applicazioni farmacologiche.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. STAUFFACHER, P. NIKLAUS, H. TSCHERTER, H. P. WEBER e A. HOFMANN (1969) - «Tetrahedron», 25, 5879.
 [2] B. NIKOLIN e A. NIKOLIN (1971) - «Acta Pharm. Yug.», 21, 109.
 [3] A. HOFMANN e H. TSCHERTER (1960) - «Experientia», 16, 414.
 [4] D. STAUFFACHER, H. TSCHERTER e A. HOFMANN (1965) - «Helv. Chim. Acta», 48, 1379.

- [5] K. GENEST, W. B. RICE e C. G. FARMILLO (1965) - « Proc. Can. Soc. Forensic Sci. », 4, 167.
- [6] R. IKAN, E. RAPOPORT e E. D. BERGMANN (1968) - « Israel J. Chem. », 6, 65.
- [7] L. TUTTOBELLO, A. MACRÌ e F. VALFRÈ (1971) - « Atti Soc. It. Sc. Vet. », 25, 299.
- [8] L. TUTTOBELLO, A. MACRÌ e F. VALFRÈ (1972) - « Atti Soc. It. Sc. Vet. », 26, 382.
- [9] M. D. MILLER (1970) - « J. AOAC », 53, 123.
- [10] T. YAMANO, K. KISHINO, S. YAMATODANI e M. ABE (1962) - « Takeda Kenkyusho Nempo », 21, 83.
- [11] L. A. R. SALLAM e A. E. REFAI (1971) - « Z. Allg. Microbiol. », 11, 147.
- [12] J. F. SPILBURY e S. WILKINSON (1961) - « J. Chem. Soc. », 2085.
- [13] S. AGURELL (1964) - « Experientia », 20, 25.
- [14] W. A. TABER e L. C. VINING (1958) - « Can. J. Microbiol. », 4, 611.
- [15] M. ABE, S. OHMOMO, T. OHASHI e T. TABUCHI (1969) - « Nippon Nogei-Kagaku Kaishi », 43, 575.
- [16] A. E. EL-REFAI, L. A. R. SALLAM e N. NAIM (1970) - « Jap. J. Microbiol. », 14, 91.
- [17] A. STOLL, A. HOFMANN e T. PETRZILKA (1951) - « Helv. Chim. Acta », 34, 1544.
- [18] M. ABE, T. YAMANO, Y. KOZU e M. KUSUMOTO (1952) - « J. Agr. Chem. Soc. Japan », 25, 458.
- [19] M. ABE (1954) - « J. Agr. Chem. Soc. Japan », 28, 44.
- [20] F. ARCAMONE, C. BONINO, E. B. CHAIN, A. FERRETTI, P. PENNELLA, A. TONOLO e L. VERO (1960) - « Nature », 187, 238.
- [21] R. J. SAMUELSON e G. GJERSTAD (1966) - « Medd. Norsk Farm. Selskap. », 28, 228.
- [22] D. K. SHONE, J. R. PHILIP e G. J. CHRISTIE (1959) - « Vet. Rec. », 71, 129.
- [23] A. R. LOVELESS (1967) - « Trans. Br. mycol. Soc. », 50, 15.
- [24] G. S. KING, P. G. MANTLE, C. A. SZCZYRBAK e E. S. WAIGHT (1973) - « Tetrahedron Letters », 215.
- [25] H. G. FLOSS, U. HORNEMANN, N. SCHILLING, K. KELLEY, D. GROEGER e D. ERGE (1968) - « J. Am. Chem. Soc. », 90, 6500.
- [26] M. ABE, T. OHASHI, S. OHMOMO e T. TABUCHI (1971) - « Nippon Nogei-Kagaku Kaishi », 45, 6.
- [27] T. YUI e Y. TAKEO (1958) - « Jap. J. Pharmacol. », 7, 157.
- [28] T. YUI e Y. TAKEO (1962) - « Folia Pharmac. Japon. », 58, 836.
- [29] T. YUI e Y. TAKEO (1964) - « Jap. J. Pharmacol. », 14, 107.
- [30] A. HOFMANN (1964) - « Australasian J. Pharm. », 42, 7.
- [31] P. G. MANTLE (1968) - « Proc. Roy. Soc. B », 170, 423.
- [32] P. G. MANTLE (1969) - « J. Reprod. Fert. », 18, 81.
- [33] C. A. FINN e P. G. MANTLE (1969) - « J. Reprod. Fert. », 20, 527.
- [34] J. A. EDWARDSON (1968) - « Brit. Pharmacol. Soc. », 33, 215.
- [35] J. A. EDWARDSON (1969) - « Brit. Pharmacol. Soc. », 35, 367.
- [36] L. TUTTOBELLO, F. VALFRÈ e A. MACRÌ (1971) - « Riv. Vet. », 20, 147.
- [37] F. VALFRÈ, L. TUTTOBELLO e A. MACRÌ (1971) - « Atti Soc. It. Sci. Vet. », 25, 302.
- [38] F. VALFRÈ, A. MACRÌ e L. TUTTOBELLO (1972) - « Atti Soc. It. Sci. Vet. », 26, 378.
- [39] M. ABE (1946) - « J. Agr. Chem. Soc. Japan », 21, 29.
- [40] M. ABE e S. YAMATODANI (1964) - *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 5, D. I. D. Hockenhull Gordon and Breach Sci. Publ., London, p. 205.
- [41] A. STOLL, A. BRACK, H. KOBEL, A. HOFMANN e R. BRUNNER (1954) - « Helv. Chim. Acta », 37, 1815.
- [42] L. C. VINING e P. M. NOIR (1966) - « Can. J. Microbiol. », 12, 915.
- [43] A. TONOLO e EVA UDVÁRDY-NAGY (1968) - « Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. », 15, 29.
- [44] C. GALEFFI, S. MATOSIC e A. TONOLO (1974) - « Atti Accad. Naz. Lincei, Rend. Cl. Sci. fis. mat. e nat. », 8, 56, 951.