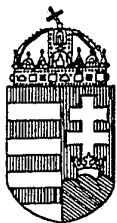


(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**204 571 B**

(21) A bejelentés száma: 1109/89  
(22) A bejelentés napja: 1989. 03. 07.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
88/05394 1988. 03. 07. GB  
(83) Letétbe helyezés: NCIB 12375; NCIB 12376; NCIB  
12616

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

**C 12 P 21/00**

A 01 N 63/02

A 61 K 37/00

(40) A közzététel napja: 1990. 11. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1992. 01. 28. SZKV 92/01

(72) Feltaláló:  
Rossal, Stephen, Derby, Derbyshire (GB)

(73) Szabadalmas:  
Agricultural Genetics Co. Ltd., Cambridge,  
Cambridgeshire (GB)

(54) **Eljárás MBI 600 antibiotikum előállítására valamint ezt az  
antibiotikumot és/vagy az antibiotikumot termelő bacillus subtilis tartalmazó  
növényvédőszer**

(57) KIVONAT

A Bacillus subtilis fermentálásával előállított új MBI 600 antibiotikum jellemzője többek között, hogy proteint és lipidet tartalmaz, móltömege körülbelül 63 500 dalton, és gombák és Gram-pozitív baktériumok ellen van, Gram-negatív baktériumok ellen nincs antibiotikus aktivitása.

A találmány növényvédő szerekre is vonatkozik, amelyek fenti antibiotikumot és/vagy a fenti antibiotikumot termelő Bacillus subtilis sejteket és/vagy spórákat és hordozó- vagy hígítóanyagot tartalmaznak.

**HU 204 571 B**

A találmány tárgya eljárás a MBI 600 jelölésű új antibiotikum előállítására *Bacillus subtilis* fermentálásával, valamint a fenti antibiotikumot és/vagy az antibiotikumot fermentáló *Bacillus subtilis* tartalmazó fungicid növényvédő szerek.

A *Bacillus subtilis* NCIB 12375, 12376 és 12616 törzsek tulajdonságait a 0 276 132 számon közzétett európai szabadalmi leírás ismerteti. Ezeket a törzseket 1986. 12. 22-én (NCIB 12375 és 12376), illetve 1987. 12. 24-én (NCIB 12616) helyezték letétbe a National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd.-nél (NCIB) (Torrey Research Station, P. O. Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen, AB9 8DG, Scotland).

Felismertük, hogy a *Bacillus subtilis* NCIB 12375, 12376 és 12616 törzsek antifungális tulajdonsága egy új antibiotikumnak tulajdonítható, amelyet a leírásban MBI 600-nak jelölünk.

A *Bacillus* faj törzsei által termelt antibiotikumokat már korábban ismertették [Bérdy J.: *Advances in Applied Microbiology*, 18, 308–406 (1974)]. Abban az esetben, ha ezeket jellemezték, általában azt tapasztalták, hogy ezek az antibiotikumok kis peptidok vagy peptidolipidok, móltömegük 270 dalton és 4500 dalton között változhat. Egyetlen olyan antibiotikum ismert csak, amelynek móltömege 100 000 daltonnál nagyobb, ezt a *Bacillus subtilis* APPL-1 törzs termeli [Baker C. J. és Stavely J. R.: 4 582 704 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás], egy későbbi publikáció szerint azonban a móltömege csak 5000–10 000 dalton [Baker és munkatársai: *Phytopathology* 73, 1148–1152 (1983)]. A *Bacillus*ok által termelt antibiotikumok többsége Gram-pozitív baktériumok ellen hatásos, de kevés olyan antibiotikum is ismert, amelynek Gram-negatív baktériumok, élesztők vagy gombák elleni hatása van [Katz E. és Demain A. L.: *Bacteriological Reviews*, 41, 449–474 (1977)].

Az összes eddigi ismert, *B. subtilis* törzsek által termelt antifungális hatású antibiotikum az antibiotikum lokalizálódásától (a bakteriális sejten belül vagy kívül) és a molekula szerkezetétől függően megkülönböztetett három csoport egyikébe tartozik [Sharon N. és munkatársai: *Nature* 174, 1190–1191 (1954); Besson F. és munkatársai: *Journal of Antibiotics* 29, 1043–1049 (1976); Besson és munkatársai: *Journal of Antibiotics* 31, 284–288 (1978)]. Ezek a csoportok az alábbiak:

1. intracelluláris ciklusos peptidolipidok,
2. extracelluláris ciklusos peptidolipidok, és
3. extracelluláris ciklusos peptidok.

Az egyetlen fent említett kivételtől eltekintve ezeknek az antibiotikumoknak móltömege 4500 daltonnál kisebb. A *B. subtilis* törzsek által termelt ismert antifungális antibiotikumokat az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat  
B. subtilis törzsek által termelt antifungális antibiotikumok

5	Vegyület típusa	Neve	Irodalom
	intracelluláris ciklusos peptidolipidok	mikoszubtilin	(a)
	extracelluláris ciklusos peptidolipidok	Aspergillus faktor	(b)
10		bacillomicin A	(c)
		bacillomicin B	(d)
		bacillomicin D	(e)
		bacillomicin F	(f)
		bacillomicin L	(g)
		bacillomicin R	(h)
15		bacillomicin S	(i)
		eumicin	(j)
		fengicin	(k)
		iturin A	(e)
20		toximicin	(l)
	extracelluláris peptidok	ketomacin	(m)
		fungisztatin	(n)
		mikobacillin	(o)
		Rhizoctonia faktor	(b)
25			
		(a) Walton R. B. és Woodruff H. B.: <i>J. of Clinical Invest.</i> 28, 924–926 (1949)	
		(b) Michener H. D. és Snell N.: <i>Archives of Biochemistry</i> 22, 208–214 (1949)	
30		(c) Cercos A. P.: <i>Rev. Invest. Agric.</i> 4, 325–335 (1950)	
		(d) Shibasaki I. és Terui G. J.: <i>Journal of Fermentation Technology</i> 32, 115–118 (1954)	
35		(e) Peypoux F. és munkatársai: <i>Journal of Antibiotics</i> 33, 1146–1149 (1980)	
		(f) Michel G. és munkatársai: <i>Fermentation and Industrial Chemistry</i> 16, 19 (1983)	
40		(g) Landy M. és munkatársai: <i>Proceedings of the Society of Experimental Biology, New York</i> , 67, 539 (1948)	
		(h) Babad J. és munkatársai: <i>Nature</i> 170, 618–619 (1952)	
		(i) Esterhuizen B.: <i>Aspects of the action of bacillomycin S</i> , doktori értekezés, University of Stellenbosch (1974)	
45		(j) Johnson E. A. és Burdon K. L.: <i>Journal of Bacteriology</i> 51, 591 (1946)	
		(k) Vanittanokom N. és Loeffler W.: <i>Journal of Antibiotics</i> 39, 888–901 (1986)	
50		(l) Stessel G. L. és munkatársai: <i>Mycologia</i> 45, 325–334 (1953)	
		(m) Taurus T. E. és Townsley P. M.: <i>Applied Environmental Microbiology</i> 47, 775–779 (1984)	
55		(n) Hobby G. L. és munkatársai: <i>Journal of Clinical Investigations</i> 38, 927–933 (1949)	
		(o) Majumdar S. K. és Bose S. K.: <i>Nature</i> 181, 134–135 (1958)	
60		Az 1. táblázatban felsorolt antibiotikumok egy részének fizikai tulajdonságait is ismertették. Az iturin	

csoportha tartozó antibiotikumok vízben oldhatatlanok, és néhány közülük acetonnal oldódik [Sharon N. és munkatársai: *Nature*, 174, 1190–1191 (1954); Besson F. és munkatársai: *J. of Antibiotics* 29, 1043–1049 (1976); Peypoux F. és munkatársai: *J. of Antibiotics* 33, 1146–1149 (1980)]. Az iturin A és bacillomicin F elektroforetikus vizsgálatok szerint neutrális peptidolipid [Peypoux F. és munkatársai: *J. of Antibiotics* 33, 1146–1149 (1980)]. Az iturin A és a bacillomicin L pH=3 és 10 közötti értéken hővel szemben stabilak, azonban egyéb pH-értékeken nem [Sharon N. és munkatársai: *Nature* 174, 1190 (1954); Landy M. és munkatársai: *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 67, 539 (1948); és Delcambe L.: *Bull. Soc. Chim. Bleg.* 74, 315–328 (1965)]. A bacillomicin L semleges pH-n nem oldódik butanolban [Barr J. G.: *J. Appl. Bacteriol.* 39, 1–13 (1976)]. Az intracelluláris peptidolipidek közé tartozó mikoszubtilin metanolban, etanolban és butanolban nem oldódik [Sharon N. és munkatársai: *Nature* 174, 1190 (1954) és Walton R. B. és Woodruff H. B.: *J. Clin. Inv.* 28, 924 (1949)]. A mikobacillin és ketomacin acetonnal oldódnak, de az előbbi vízben nem oldódik pH=7 vagy ez alatti értéken [Taurus T. E.: és Townsley, P. M.: *Appl. Environm. Microbiol.* 47, 775 (1984) és Majumdar S. K. és Bose S. K.: *Nature* 181, 134 (1958)]. A Rhizoctonia faktor etanolban és butanolban oldhatatlan, és csak pH=2 értéken van hőstabilitása [Sharon N. és munkatársai: *Nature* 174, 1190 (1954) és Michener H. D. és Snell N.: *Arch. Biochem.* 22, 208 (1949)]. A fungisztatin amfoter peptid, amely vízzel érintkezve inaktív gél képez [Cercos A. P.: *Rev. Invest. Agric.* 4, 325 (1950)].

A *Bacillus subtilis* B-3 törzs tenyészetéből izolálható egy antifungális antibiotikumok elegyét tartalmazó aktív frakció [McKeen C. D. és munkatársai: *Phytopathol.* 76, 136–139 (1986)]. Az antibiotikum elegy a proteinek kimutatására szolgáló ninhidrinvizsgálatban pozitív reakciót ad. Az elegynek csak 5,0 alatti pH-értékeken van hőstabilitása, ami kapcsolatban lehet azzal a megfigyeléssel, hogy az elegy etanolban, metanolban és izopropanolban oldódik, de etil-acetátban, acetonnal, dietil-éterben vagy metilén-kloridban nem.

A *B. subtilis* APPL-I törzs tenyészetéből izolált antibiotikum-frakció hőstabil, és 95% proteinből és 5% szénhidráttól áll [Baker C. J. és munkatársai: *Phytopathol.* 73, 1148 (1983)].

Az iturin A, fengicin és bacillomicin F és L lipidkomponensének zsírsav-összetételét is meghatározták [Vanittanokom N. és Loeffler W.: *J. Antibiotics* 39, 888 (1986); Peypoux F. és munkatársai: *Tetrahedron* 29, 3455–3459 (1973); Mhammedi A. és munkatársai: *J. of Antibiotics* 35, 306–311 (1982) és Peypoux F. és munkatársai: *Biochem.* 17, 3992–2996 (1978)]. A zsírsavak metiloldalláncot tartalmaznak, és 13–16 szénatomosak, és – a fengicin kivételével –  $\beta$ -aminosavak összetevői.

A találmány szerinti eljárás a *Bacillus subtilis* NCIB 12375, 12376 és 12616 törzsek fermentálásával előállítható új MBI 600 antibiotikum előállítására vonatkozik, amely az ismert, *B. subtilis* törzsek által termelt antibiotikumoktól határozottan eltérő tulajdonságokat

mutat. A találmány szerinti eljárással előállított antibiotikum az alábbi tulajdonságokkal rendelkezik:

- (1) antibiotikus aktivitással rendelkezik gombák és Gram-pozitív baktériumok ellen, de Gram-negatív baktériumok ellen nem hat;
- (2) móltömege  $63\,000 \pm 3700$  dalton, standard globuláris proteinnel kalibrált gél-szűrési kromatográfia meghatározás szerint;
- (3) pozitív reakciót ad az alábbi proteinkimutató vizsgálatokban: Lowry, fényabszorpció 280 nm-en, biuret és ninhidrin;
- (4) proteintartalmának aminosav-összetétele: aszparaginsav, treonin, szerin, glutaminsav, prolin, alanin, valin, izoleucin, leucin és tirozin;
- (5) proteintartalma rezisztens a pronáz E enzimrel végzett emésztésre;
- (6) lipidtartalmának zsírsavjai 14–17 szénatomosak;
- (7) pH-optimuma 6,0–7,0;
- (8) aktivitását megtartja 110 °C-on pH=5,0–9,0 értéken végzett 10 perces kezelés után is;
- (9) vízben oldódik 5,0-nél magasabb pH-értékeken;
- (10) metanolban, etanolban oldódik, butanolban és dimetil-szulfidban korlátozottan oldódik;
- (11) acetonnal, petroléterben, kloroformban, toluolban és hexánban nem oldódik.
- (12) ultraibolya-spektrumában 265 nm-nél egy bemélyedés, 275 nm-nél csúc és 285 nm-nél ezen a csúcson egy váll van.

A *B. subtilis* NCIB 12376 törzs a *B. subtilis* NCIB 12375 törzsből származik. Az NCIB 12375 törzs egy mutánsa vagy származéka, amely szintén képes az MBI 600 antibiotikum termelésére, az NCIB 12616 törzs. Mind az NCIB 12376, mind az NCIB 12616 törzs az NCIB 12375 törzssel rokon, MBI 600 antibiotikum-termelő törzseknek tekinthető. Szakemberek számára magától értetődő, hogy egyéb *B. subtilis* törzseket vagy más fajokat is lehet találni, amelyek képesek a találmány szerinti eljárással előállított MBI 600 antibiotikum termelésére.

A találmány szerinti eljárással előállított MBI 600 antibiotikumot növények gombás fertőzések elleni védelmére használhatjuk. Az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó mikroorganizmusok tenyésztését közvetlenül rápermetezhetjük a növény levélzetére annak érdekében, hogy a levélzet gombás fertőzéseitől megóvjuk a növényt. Bizonyos esetekben nagyobb hatást érhetünk el, ha a megfelelő tenyészetekből az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó frakciókat használjuk a teljes tenyészle helyett. Ezek a frakciók a mikroorganizmus spóráit is tartalmazhatják. Sok növénynek olyan a levélzete, amelyen nehéz a növényvédő szerekkel jó diszperziót vagy adhéziót elérni; ilyen esetekben a tenyészleket vagy az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó frakciókat előnyösen a diszpergálást és adhéziót elősegítő anyagokkal készítménnyé alakítjuk. A formálási eljárások szakember számára jól ismertek.

A találmány szerinti eljárással előállított MBI 600 antibiotikumot talajból eredő gombás fertőzések ellen is használhatjuk a növényvédelemben. Az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó mikroorganizmusok tenyész-

szetét vagy az abból nyert antibiotikum-frakciókat a magok bevonására használhatjuk, ezáltal védelmet biztosítunk a növénynek a talajból eredő gombás fertőzések ellen. A tenyészlövet vagy az MBI 600 antibiotikum-frakciókat közvetlenül a talajra is rávihetjük a magok környezetében. Erre a célra folyékony és szilárd készítményeket is használhatunk.

A találmányt közelebbről az alábbi példákkal ismertetjük.

### 1. példa

#### MBI 600 antibiotikum előállítás és tisztítása

B. subtilis NCIB 12376 törzset folyékony tápközegben, 30 °C-on rázógéppel rázatva 72 órán keresztül tenyésztünk. Tápközegként az alábbi két, kémiailag definiált tápközeg egyikét használjuk:

#### 1. tápközeg

glükóz	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
KCl	0,5 g
MnCl <sub>2</sub>	0,01 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
glutaminsav	5 g
víz	1 literre

#### 2. tápközeg

szorbit	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
KCl	0,5 g
MnCl <sub>2</sub>	0,01 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
glutaminsav	2,5 g
aszparagin	2,5 g
víz	1 literre

A tenyészléből 10 000 g-val 20 percen keresztül centrifugálással eltávolítjuk a baktériumsejteket és spórákat, és a sejtmentes közeg pH-ját sósavoldattal 2,0-re állítjuk be. A kicsapódott antibiotikumot magas fordulatszámú centrifugálással elválasztjuk. A kapott üledéket kevés, 0,1 móll/l koncentrációjú nátrium-hidroxid-oldatban újraoldjuk, vizet adunk hozzá, és pH-ját 8-ra csökkentjük. Az így kapott vizes készítményt azonos térfogatú butanollal háromszor kirázzuk, míg az antibiotikus aktivitás már csak a szerves fázisban mutatható ki.

A szerves fázisokat ezután egyesítjük és rotációs bepárló segítségével, vákuumban, 40 °C-on szárazra pároljuk. Az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó maradékokat kálium-foszfát-pufferben (pH=6,0) újraoldjuk. A géliszűrést 50 ml Sephadex® G-100 oszlopon végezzük. Az oszlopot két oszloptérfogatnyi 0,25 móll/l koncentrációjú nátrium-foszfát-pufferrel (pH=7,0) ekvilibráljuk, majd az oszlop tetejére beviszünk 0,5 ml részlegesen tisztított MBI 600 antibiotikum-oldatot. Az oszlopot 0,25 móll/l koncentrációjú nátrium-foszfát-pufferrel (pH=7,0) eluáljuk és 1,5 ml-es frakciókat szedünk,

LKB 7000 frakciószedő segítségével. A frakciók antibiotikus aktivitását a 3. példában leírtak szerint határozzuk meg.

5 Csak a 11–14. frakciókban mutatható ki antibiotikus aktivitás. Az oszlopot ismert molekulatömegű vegyületekkel (globuláris proteinnel: marhaszérum-albuminnal, tojásalbuminnal, kimotripsinnel és citokrom C-vel) kalibrálva kimutatható, hogy az MBI 600 antibiotikum móltömege 63 500±3700 dalton. Lineáris dextránokkal végezve a kalibrálást, az antibiotikum móltömege 35 000 dalton. Nem mutatható ki antibiotikus aktivitás sem a 4500 daltonnál kisebb móltömegnek megfelelő frakciókban, sem a kizárt térfogatban, ahol a molekulák móltömege nagyobb, mint 100 000 dalton.

15 Ha a baktériumot az 1. tápközegben tenyésztjük, az antibiotikus aktivitással rendelkező géliszűrési frakció vizsgálataink szerint proteint, lipidet és szénhidrátot (1,2 mg/ml) tartalmaz. Ha a baktériumot a 2. tápközegben tenyésztjük, az antibiotikus aktivitással rendelkező frakció lényegesen kevesebb szénhidrátot (0,1 mg/ml) tartalmaz, de az antibiotikus aktivitás nem csökken. Ebből arra következtethetünk, hogy az MBI 600 antibiotikum protein- és lipidkomponensekből áll.

### 25 2. példa

#### MBI 600 antibiotikum tisztítása gyors protein folyadékkromatográfiás eljárással (FPLC)

30 Az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó frakciót az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, a B. subtilis NCIB 12376 glükóztartalmú tápközeges tenyészetéből. A frakciót a 6. példában leírtak szerint pronáz E-vel kezeljük, ezzel a proteolízisre érzékeny proteineket hidrolizáljuk.

35 A frakció proteintartalmú komponenseit anioncserélő FPLC-vel választjuk szét, 5 ml Q Seph FF oszlopon (Pharmacia terméke). A frakcióból 100 µl-t viszünk az oszlopra, és 1 ml/perc sebességgel eluáljuk, 20 mmól/l koncentrációjú Tris-pufferrel (pH=8,0) és nátrium-klorid gradienssel (kiindulási koncentráció 0, végkoncentráció 1 móll/l, a gradiens összefogata 56 ml). A detektálást 254 nm-en végezzük, a detektor érzékenysége 0,45 abszorpciós egység (AU). Négy csúcsot mutatunk ki. A négy frakció mindegyikét 1000-szeres mennyiségű desztillált vízzel szemben dializáljuk, majd vákuumban bepárolva kétszeresére koncentrálnak. A dializált frakciók antibiotikus aktivitását ezután a 3. példában leírtak szerint határozzuk meg. Antibiotikus aktivitást csak az oszlopról negyediként eluálódó frakcióban találtunk.

### 50 3. példa

#### Antibiotikus aktivitás meghatározása biológiai úton

55 Diffúziós meghatározást végzünk, üvegtálcákon lévő agar felületén található a tesztorganizmust tartalmazó réteg, és a vizsgált mintát az agarba vágott lyukba tesszük. Az antibiotikum diffúziója következtében a tesztorganizmus szaporodásában gátlási zónák figyelhetők meg, és a gátlási zóna átmérője közelítőleg arányos az antibiotikum-koncentráció logaritmusával. Az antibiotikumot ily módon kvantitatíve mérhetjük.

Felhasználás előtt az üveglapokat (20•20 cm) metilalkohollal mossuk, majd 200 ml olvasztott Sabouraud-féle glükóz agart öntünk rá és hagyjuk megszilárdulni, ez adja az alapréteget.

Botrytis cinerea konídiumszuszpenziót készítünk oly módon, hogy a B. cinerea spórás szilárd tenyészetét tartalmazó lombikba 20 ml steril desztillált vizet mérünk, a konídiumokat steril drótkaccsal kapargatva elválasztjuk a táptalaj felületétől, és a kapott szuszpenziót steril közegen átszűrjük. A szűrletet előntjük, és a spórákat steril desztillált vízzel kétszer mossuk, majd 2000 g-vel 3 percen keresztül centrifugáljuk. A konídium-koncentrációt hemocitóméteres számlálással meghatározzuk, és steril desztillált vízzel hígítva  $1 \cdot 10^5$ /ml-re állítjuk be a konídium-koncentrációt. Az így kapott szuszpenzió 10 ml-ét 100 ml 40 °C-ra lehűtött olvasztott Sabouraud-féle glükóz agarhoz adjuk, a beoltott agart a fenti alaprétegre öntjük, és hagyjuk megszilárdulni. Az agarba 4-es méretű dugófúróval lyukakat vágunk, 6 sorból, soronként 6 lyukból álló sablon szerint.

Az egyes lyukakba 100 µl vizsgálandó oldatot mérünk, lemezenként minden egyes oldatból legalább 3 párhuzamos beméréssel. A vizsgálandó oldatokat a bemérés előtt 0,45 µm pórusméretű membránszűrőn átszűrjük. A lemezeket lefedjük, és 18 °C-on 3 napon keresztül inkubáljuk.

Az inkubálás befejezése után a gátlási zónák átmérőjét sublerral mérjük. A zónákat vizes tripánkéssel 1 percen keresztül festve, majd csapvízzel gyorsan leöblítve tesszük láthatóvá.

#### 4. példa

##### Protein kimutatása az MBI 600 antibiotikumban

Az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó frakciót az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, B. subtilis NCIB 12376 glükóztartalmú tápközeges tenyészetéből. A frakció proteintartalmát az alábbi módszerek pozitív eredményei valószínűsítik: Lowry, biuret, ninhidrin és 280 nm-en mért abszorpció. A Lowry, biuret és ninhidrin vizsgálatokat az irodalomban ismertett módon végezzük [Journal of Biological Chemistry 193, 265 (1951); Journal of Biological Chemistry 177, 751 (1949); és Journal of Biological Chemistry 176, 367 (1948)]. A fényabszorpciót 280 nm-en spektrofotométerrel mérjük.

#### 5. példa

##### MBI 600 antibiotikum aminosav-összetétele

Az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó frakciót az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, B. subtilis NCIB 12376 glükóztartalmú tápközeges tenyészetéből. A frakciót savas hidrolízisnek vetjük alá, oly módon, hogy 5,75 mól/l koncentrációban sósavat adunk hozzá, és nitrogénatmoszférában 100 °C-on 4 órán keresztül melegítjük. A hidrolizált mintát bepároljuk, vízben újraszuszpendáljuk, és nátrium-hidroxiddal semleges pH-ra állítjuk. Az aminosav-összetételt LKB 4400 aminosav-analizátorral határozzuk meg, 250•4 mm-es, Aminex A9 gyantával töltött oszlopon, és standard lítium-citrát-puffer elúciós rendszert alkalmazva.

Összesen 10, aminosavaknak tulajdonítható csúcsot kapunk, amelyek mólarányát a 2. táblázatban ismertetjük. 5 olyan csúcs is látható, amelyek nem felelnek meg egyetlen közösleges, proteineredetű aminosavnak sem. A fenti csúcsoknak megfelelő vegyületeket nem sikerült azonosítanunk.

#### 6. példa

##### Pronáz E-vel végzett emésztéssel szembeni rezisztencia

Az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó frakciót az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, B subtilis NCIB 12376 glükóztartalmú tápközeges tenyészetéből.

A frakciót 1 mg pronáz E-t tartalmazó 0,25 mól/l koncentrációjú nátrium-foszfát-pufferben (pH=7,5) 20 °C-on 3 órán keresztül inkubáljuk. A pronáz E-t ezután a minta 10 percen át tartó forralásával inaktíváljuk. A mintát butanollal megosztjuk, az 1. példában leírtak szerint. Mind a vizes, mind a szerves fázisok antibiotikus aktivitását meghatározzuk, a 3. példában ismertetett módon; csak a szerves fázisban találunk aktivitást, amelyet ezután vákuumban szárazra párolunk. A szilárd anyagot kevés, 1 mól/l koncentrációjú nátrium-hidroxid-oldatban újraoldjuk, és az oldat pH-ját sósavval 7-re állítjuk.

Az oldatot Sephadex G-100 oszlopon gélszűrési kromatográfias eljárással tisztítjuk, az 1. példában leírt módon. A 63 500 dalton móltömegnek megfelelő frakciókat összegyűjtjük és a pH-értéket 1 mól/l koncentrációjú sósavoldattal 2-re beállítva kicsapjuk az antibiotikumot. A 3. példában végzett vizsgálattal megerősítjük az antibiotikus aktivitás jelenlétét. A csapadékot a fent ismertetett módon újraoldjuk. A mintát savasan hidrolizáljuk, és az aminosav-összetételt az 5. példában ismertetett módon meghatározzuk. A pronáz E-vel végzett kezelés nem okoz lényeges változást az aminosavak mólarányában (2. táblázat), ebből arra következtetünk, hogy az MBI 600 antibiotikum ezzel a proteázzal végzett emésztéssel szemben ellenálló.

2. táblázat

MBI 600 antibiotikum aminosav-összetétele

Aminosav	Mólarány*	
	Kezeletlen	Pronázzal kezelt
aszparaginsav	5,1	7,0
treonin	1,8	2,2
szerin	2,1	2,8
glutaminsav	8,0	8,2
prolin	1,4	1,5
alanin	1,0	1,0
valin	3,4	4,1
izoleucin	1,1	1,1
leucin	6,2	3,7
tirozin	4,4	1,5

\* alaninhoz viszonyítva

## 7. példa

## MBI 600 antibiotikum zsírsav-összetétele

Az MBI 600 antibiotikumot tartalmazó frakciót az 1. példában leírtak szerint állítjuk elő, *B. subtilis* NCIB 12376 glükózos tápközeges tenyészetéből.

A frakciót 5% kénsavat tartalmazó vízmentes metanollal 2 órán át 72 °C-on inkubálva elszappanosítjuk. Az elszappanosított mintát oktanollal extraháljuk, és az extraktum zsírsav-összetételét gázkromatográfiával kombinált tömegspektrometriás eljárással (GC/MS) meghatározzuk Hewlett Packard GC/MS rendszer és az azzal összekapcsolt 24 méteres BP20 ömlesztett szilícium-dioxid kapilláris oszlop segítségével. Hét fő csúcsot mutatunk ki, amelyek a 3. táblázatban ismertetett zsírsavaknak felelnek meg. A zsírsavak lánchossza 14 és 17 szénatom között változik, és úgy tűnik, hogy mind teljesen telített. A fenti zsírsavak közül három valószínűleg metiloldalláncot tartalmaz, de az elágazás helyét nem ismerjük pontosan. Az elszappanosításra alkalmazott eljárással az észterkötések hidrolizálhatók, de a peptidkötések valószínűleg nem hasadnak el. Ezért nagyon valószínű, hogy a zsírsavak az MBI 600 antibiotikum proteinkomponenséhez észterkötéssel kapcsolódnak. Így ezek nem  $\beta$ -aminosavak összetevői, ellentétben a legtöbb, egyéb *B. subtilis* törzsből izolált antibiotikummal.

3. táblázat

## MBI 600 antibiotikum zsírsav-összetétele

Zsírsav	%-os aránya
14:0 7	
15:0 9	
15:0 (metiloldallánc)	36
16:0	23
16:0 (metiloldallánc)	4
17:0 6	
17:0 (metiloldallánc)	15

## 8. példa

## MBI 600 antibiotikum hőstabilitása

A *B. subtilis* NCIB 12375 törzset élesztős pepton-glükóz tápközegben (5 g élesztőkivonat, 5 g pepton, 20 g glükóz, desztillált vízzel 1 l-re feltöltve, pH=6,8) 30 °C-on rázatva 72 órán keresztül tenyésztjük. A baktériumsejteket és spórákat 10 000 g-vel 20 percen keresztül centrifugálással távolítjuk el a tenyészlézből. A felüliszórból vett alikvotok pH-ját híg sósavoldattal vagy híg nátrium-hidroxid-oldattal 4 és 10 közötti pH-értékre állítjuk be. Az egyes minták egy részét ezután McCartney-lombikokba visszük, és 110 °C-on 10 percen keresztül autoklávozzuk. Lehűlés után meghatározzuk a minták antibiotikus aktivitását a 3. példában ismertetett eljárással. Az aktivitás elveszik, ha a mintákat pH=4,0 vagy pH=10,0 értéken melegítjük, míg 5,0–9,0 pH-tartományban való melegítés után aktivitásuk megmarad. Az eredményeket a 4. táblázatban foglaljuk össze.

4. táblázat

## pH hatása az MBI 600 antibiotikum hőstabilitására

pH	Antibiotikus aktivitás*
5	
4,0	0
5,0	11,8
6,0	17,8
7,0	19,6
10	
8,0	19,6
9,0	16,0
10,0	0

\* gátlási zóna átlagos átmérője (mm) *B. cinerea* tesztorganizmus esetén

## 9. példa

## Antibiotikus aktivitás pH-optimuma

*B. subtilis* NCIB 12375 törzset folyékony tápközegben tenyésztjük, és a pH-t a 8. példában ismertetett módon 4,0 és 10,0 közötti tartományban változtatva beállítjuk. A mintákat 0,45  $\mu$ m-es membránszűrőn átszűrjük, majd meghatározzuk az antibiotikus aktivitást a 3. példában leírtak szerint. Az antibiotikus aktivitás pH-optimuma pH=6,0–7,0 (lásd 5. táblázat). Az 5,0-nél alacsonyabb, vagy 5,0 pH-értéken az MBI 600 antibiotikum kicsapódik az oldatból.

5. táblázat

## Antibiotikus aktivitás pH-optimuma

pH	Antibiotikus aktivitás*
30	
4,0	8,0
5,0	12,0
6,0	21,8
7,0	21,8
8,0	18,8
9,0	18,8
40	
10,0	17,8

\* gátlási zóna átlagos átmérője (mm) *B. cinerea* tesztorganizmus esetén

## 10. példa

## MBI 600 antibiotikum oldhatósága

*B. subtilis* NCIB 12375 törzset az 1. példában ismertetett 1. tápközegben tenyésztjük, amely tápközegzet 5 g L-glutaminsavval egészítünk ki. A tenyésztést 30 °C-on 72 órán keresztül rázatva végezzük. A tenyészetet centrifugáljuk és az antibiotikumot savas kicsapással, majd butanolos megosztással extraháljuk az 1. példában leírtak szerint. 10 ml butanolos extraktumot 40 °C-on vákuumban szárazra párolunk, és a maradékot háromszor 10 ml oldószerrel mossuk. Az oldószerket a 6. táblázatban soroljuk fel. A mosással kapott oldatokat egyesítjük, és vákuumban bepároljuk. A kapott extraktumot 1 ml kálium-foszfát-pufferben (pH=6,0) újraoldjuk. A mosott extraktum maradékát is újraoldjuk 1 ml pufferben. A minták antibio-

tikus aktivitását a 3. példában ismertetett módon meghatározzuk. Az eredményeket a 6. táblázatban ismertetjük.

6. táblázat  
MBI 600 antibiotikum oldhatósága

Oldószer	Antibiotikus aktivitás*	
	oldószerben	oldhatatlan maradékban
steril desztillált víz	17,3	0
metanol	17,8	0
etanol	17,0	0
butanol	14,8	10,0
dimetil-szulfoxid	15,5	11,5
aceton	0	17,0
petroléter	0	16,3
kloroform	0	16,5
toluol	0	16,3
hexán	0	14,5

\* gátlási zóna átlagos átmérője (mm) *B. cinerea* tesztorganizmus esetén

A fenti eredmények szerint az MBI 600 antibiotikum vízben, metanolban, etanolban jól oldódik, butanolban és dimetil-szulfoxidban kevésbé jól oldódik, és acetonban, petroléterben, kloroformban, toluolban és hexánban oldhatatlan.

#### 11. példa

*B. subtilis* NCIB 12375 antibiotikus aktivitásának összehasonlítása más *B. subtilis* törzsekével, *in vitro*

A *B. subtilis* NCIB 12375 antibiotikus aktivitását a *B. subtilis* NCIB 8872 (bacillomicin L-t termelő törzs) és a *B. subtilis* BD-1 (iturin A-t termelő törzs) antibiotikus aktivitásával hasonlítjuk össze *in vitro* vizsgálatban.

Mind a három baktériumtörzset élesztős peptonglükóz folyékony tápközegben vagy az 1. példa szerinti glükózos minimáltápközegben tenyésztjük 30 °C-on, lengő rázógépen 72 órán keresztül rázatva. A tenyészlevekből 10 000 g-vel 20 percen keresztül centrifugálva eltávolítjuk a baktériumsejteket és spórákat. A sejtmentes tenyészlevek antibiotikus aktivitását a 3. példában ismertetett agardiffúziós eljárással határozzuk meg, tesztorganizmusként egy laboratóriumunkban izolált *Penicillium chrysogenum* törzset használunk. Kétféle agart használunk: Sabouraud-féle glükózos agart és V8-tápközeges agart. Az utóbbi 200 ml V8 tápléből (Campbell's Soup Ltd.), 800 ml desztillált vízből és 20 g Oxoid agarból (No 3) áll. Az eredményeket a 7. táblázatban ismertetjük.

7. táblázat  
Különbféle *B. subtilis* törzsek antibiotikus aktivitása *in vitro*

5	Folyékony tápközeg	Agar-diffúziós szubsztrát	Gátlási zóna átmérője (cm)*		
			NCIB 12375	NCIB 8872	BD-1
10	élesztős pepton	V8	1,93	1,40	2,43
	glükózos	Sabouraud	1,83	1,27	2,50
	minimál	V8	2,00	1,86	2,46
		Sabouraud	2,60	2,60	2,80

15 \* 6 párhuzamos mérés átlaga

A *B. subtilis* NCIB 12375 törzs által termelt MBI 600 antibiotikum *in vitro* aktivitása a bacillomicin L és az iturin A között van eszerint a vizsgálat szerint. Megkíséreltük az aktivitások összehasonlítását *Botrytis fabae*, *Gauemannomyces graminis* és *Fusarium oxysporum* ellen is, előinkubált lemez módszert alkalmazva. Mindegyik antibiotikum aktívnek bizonyult mindhárom gombatörzs ellen, de nem lehetett 25 mennyiségi meghatározást végezni a mikrobaszaporodás morfológiájában meglévő lényeges különbségek miatt.

#### 30 12. példa

*B. subtilis* NCIB 12376 antibiotikus aktivitásának összehasonlítása más *B. subtilis* törzsekével, *in vivo*

Az antibiotikus aktivitás 11. példában ismertetett *in vitro* becslése bizonyos mértékben mesterséges, a valóságot jobban megközelítő adatok kaphatók *in vivo* vizsgálatokkal.

A *B. subtilis* NCIB 12376, NCIB 8872 és BD-1 törzseket élesztős peptonglükóz tápközegben tenyésztjük, 30 °C-on, lengő rázógépen 72 órán keresztül rázatva. A tenyészlevek aktivitását *Botrytis fabae* ellen *in vivo* az alábbiak szerint határozzuk meg.

Minden egyes *B. subtilis* törzs esetén négylevelűes fejlődési szakaszban lévő bokorbabról leveszünk 12 kettős levelet, és a tenyészlevekkel lefolyásig bepermetezzük. A kontrollokat vízzel permetezzük be. A leveleket szobahőmérsékleten levegővel megszárítjuk. Minden egyes levélre felviszünk 25 15 µl-es cseppet a *B. fabae* 10<sup>5</sup> spóra/ml koncentrációjú vizes szuszpenziójából. A leveleket 20 °C-on világosban inkubáljuk, majd a levél fertőződésből eredő sérüléseinek számát kiértékeljük. Az eredményeket a 8. táblázatban foglaljuk össze.

Az eredményekből megállapítható, hogy a fertőzés után 4 nappal mindegyik vizsgált antibiotikum azonos mértékű aktivitást fejt ki a *Botrytis fabae* ellen, azonban a fertőzés után 5 nappal a *B. subtilis* NCIB 12376 törzs által termelt MBI 600 antibiotikum fertőzéssel szembeni aktivitása meghaladja a másik két antibiotikumét.

8. táblázat  
B. subtilis törzsekből származó antibiotikumok  
aktivitása in vivo

B. subtilis törzs	Károsodás nélküli fertőzött hely (%)	
	4 nappal a fertőzés után	5 nappal a fertőzés után
Kontroll	4	0
NCIB 12376	52	49
NCIB 8872	58	42
BD-1	51	38

13. példa

B. subtilis tenyészeteket tartalmazó készítmények alkalmazása búza lisztharmat fertőzése ellen

A B. subtilis NCIB 12376 törzset élesztős peptonglükóz tápközegben, 30 °C-on, lengő rázógépen rázatva 72 órán keresztül tenyésztjük. A tenyészetből vett mintákhoz a 9. táblázatban ismertetett, formálásra használt anyagokat adjuk az ott feltüntetett koncentrációkban, és addig keverjük, míg azok diszpergálódnak vagy oldódnak. Az így kapott készítményeket a búza lisztharmat fertőzése (*Erysiphe graminis*) elleni hatás szempontjából úgy vizsgáljuk, hogy a búzát (cv. Aquila) kétleveles fejlődési szakaszában (Zadocks GS 12) a permetlé lefolyásáig bepermetezzük a vizsgálandó készítménnyel, majd a növényt az *E. graminis* konídiumok vizes szuszpenziójával megfertőzzük. Minden egyes készítmény hatásának vizsgálatára 20 cserép növényt permetezünk be. Az azonos készítménnyel kezelt 20 cserép növény közül 10 cserepet ködpadon alaposan átmedvesítünk 4 percen keresztül, a permetezés után 1 órával. A cserepeket üvegházban 14 napon keresztül inkubáljuk, majd kiértékeljük a fertőzöttségi szintet. Az eredményeket a 9. táblázatban közöljük.

A kapott eredmények szerint a tenyészeteket tartalmazó készítmények csökkentik a növények fertőzésének mértékét, és bizonyos esetekben a kereskedelmi forgalomban lévő fungicid hatású triadimefonnal összehasonlítható mértékű védőhatást fejtenek ki. A fertőzés gátlása még a lemosott növények esetén is megfigyelhető, ami azt jelzi, hogy a formálószeres csökken-tik a hatóanyag lemosódását.

9. táblázat

B. subtilis NCIB 12376 tenyészetet tartalmazó készítmények lisztharmat elleni védőhatása búzán

Kezelés	Fertőzöttség mértéke (fertőzött levélfelület %-ban)	
	le mosatlan	le mosott
kezelés nélkül	2,0	5,6
triadimefon (2 g/l)	0,2	0,1
formált tenyészetek:		
0,025% Silwett L77 (szilikonalapú nedvesítő szer)	0,6	1,2

Kezelés

Fertőzöttség mértéke (fertőzött levélfelület %-ban)  
le mosatlan le mosott

5	2,0%	Ashlade adjuváns olaj (ásványolaj)	0,1	0,6
	2,0%	Chiltern Crospray 11E (ásványolaj)	0,3	0,2
10	2,0%	Sprayprover (felületaktív szer)	0,3	0,2
	0,1%	Sprayfast (tapadást fokozó szer)	1,0	1,2
15	1,0%	Wilt-Pruf S-600 (felületaktív szer)	1,0	1,0

14. példa

B. subtilis NCIB 12376, NCIB 12616, N1 és NR1 törzsek antibiotikus aktivitása

A *Bacillus subtilis* NCIB 12376 törzs rifampicin- és nalidixsav-rezisztens mutánsait úgy szelektáljuk, hogy a baktérium élesztő-peptonglükóz folyékony tápközegben, 48 órás tenyésztésnek különböző hígításait 50, 100, 200 és 500 µg/l antibiotikummal kiegészített táplémezre szélesztjük. A következő tulajdonságú baktériumokat izoláljuk:

- (1) 200 µg/l rifampicinnel szemben rezisztens: a törzs jelzése NCIB 12616,
- (2) 100 µg/l nalidixsavval szemben rezisztens: a törzs jelzése N1,
- (3) 200 µg/l rifampicinnel és 100 µg/l nalidixsavval szemben rezisztens: a törzs jelzése NR1.

A fenti baktériumok *Rhizoctonia solani* Ag4 elleni in vitro aktivitását az alábbi 10. táblázatban ismertetjük. Látható, hogy mindegyik törzs rendelkezik antibiotikus aktivitással.

10. táblázat

Törzs	Rhizoctonia szaporodási zóna átmérője (mm)				
	Inkubálási idő (nap)				
	2	4	6	8	10
45	kontroll	19	46	80	85
	B. subtilis NCIB 12376	15	26	27	27
	B. subtilis NCIB 12616	15	36	45	48
	B. subtilis N1	18	35	48	58
50	B. subtilis NR1	24	41	48	54

15. példa

B. subtilis NCIB 12376 és NCIB 12616 törzsek antibiotikus aktivitása

Gyapoptmagokat vetünk 0,5 tömeg% kukoricaliszt-homok táptalajos *Rhizoctonia solani* tenyészetet tartalmazó tőzegalapú komposztba. A magokat a vetés előtt B. subtilissel vonjuk be, a 16. példa szerinti talkumalapú készítménnyel, magonként kb. 10<sup>6</sup> telepkezőegye-

ség koncentrációban. Az egyenként 5 magot tartalmazó edényeket 24 °C-os nappali és 22 °C-os éjszakai hőmérsékleten tartjuk, 16 órás megvilágítást biztosítva. A magok kikelését 7 nap múlva értékeljük, és a végső állapotot a 14. napon határozzuk meg.

Az eredményeket a 11. táblázatban ismertetjük. Mind a B. subtilis NCIB 12376, mind a NCIB 12616 törzs rendelkezik Rhizoctonia elleni antifungális aktivitással.

11. táblázat

Kezelé	Magok kikelése a 7. napon (%)		Végső állapot a 14. napon (%)	
	1.	2.	1.	2.
kontroll**	100	90	100	100
Rhizoctonia	38	58	0	0
Rhizoctonia+fungicid*	85	100	85	100
Rhizoctonia+B. subtilis NCIB 12376	88	100	80	97
Rhizoctonia+B. subtilis NCIB 12616	50	92	50	85

\* karboxin, PCNB és metalaxil kombinációja

\*\* Rhizoctoniával, fungiciddel és B. subtilissel nem kezelt magok  
a feltüntetett adatok 10 edényben mért értékek átlagai

### 16. példa

#### Csávázott magkészítmények előállítás

A gyapotmagok Bacillus subtilis NCIB 12376 törzssel való bevonására kétféle módszert dolgoztunk ki.

#### (a) Tőzegalapú inokulum

Steril, őrölt tőzeget tartalmazó zsákokat 120 ml élesztőkivont-peptonglükóz (YPG) táptalajon tenyésztett B. subtilis NCIB 12376 48 órás tenyészetével fertőzünk, amely  $9,25 \cdot 10^8$  telepképző egység/ml baktériumot,  $1,35 \cdot 10^6$ /ml spórát és 6,75 egység antibiotikumot tartalmaz. A tőzeget 7 napon keresztül 30 °C-on inkubáljuk, majd szárazon összekeverjük a gyapotmagokkal. A fenti kezelés eredményeként magonként  $2,8 \cdot 10^8$  ( $\pm 3,4$ ) telepképző egység baktériummal bevont magokat kapunk.

#### (b) Talkumos készítmény

1 liter 48 órás YPG-táptalajos tenyészetet – amely ml-enként  $9,25 \cdot 10^8$  telepképző egység baktériumot,  $17,35 \cdot 10^6$  spórát tartalmaz, és antibiotikum-tartalma 6,75 egység – 16 000 g-val centrifugálunk. A kapott, sejteket és spórákat tartalmazó üledéket mossuk, centrifugáljuk és 10 ml steril, desztillált vízben újrászuszpendáljuk. A kapott szuszpenziót ezután steril talkummal alaposan összekeverjük, 24 órán keresztül állni hagyjuk, majd finom porrá őröljük. A kapott port használjuk a magok száraz bevonására. Magonként  $7,2 \cdot 10^7$  ( $\pm 3,1$ ) telepképző egység baktériummal bevont magokat kapunk.

### 17. példa

#### Csávázott magkészítmények hatékonysága

A 16. példa szerint B. subtilis NCIB 12376 törzset tartalmazó, tőzeg- és talkumalapú bevonattal magkészítményeket állítunk elő. A csávázott magokat 0,05% Rhizoctonia solanival fertőzött komposztba ültetjük, 14 cm átmérőjű edényekbe. Kontrollként bevonat nélküli magokat és kémiai fungiciddel (PCNB, metaxalil és karboxin keverékével) csávázott magokat is ültetünk. Az edényeket üvegházban inkubáljuk, 24 °C nappali és 22 °C éjszakai hőmérsékleten, 14 napon keresztül, majd a magok kikelését és a végső állapotot értékeljük. Az eredményeket a 12. táblázatban ismertetjük. Eszerint mindkét B. subtilis készítmény rendelkezik fungicid aktivitással.

12. táblázat

Minta	Magoncok megjelenése (%)	Magoncok végső állapota (%)
kontroll (csávázatlan mag)	50 ( $\pm 2,2$ )	38 ( $\pm 2,4$ )
fungiciddel csávázott mag	85 ( $\pm 2,4$ )	85 ( $\pm 3,1$ )
tőzegalapú B. subtilis készítménnyel csávázott mag	80 ( $\pm 3,4$ )	75 ( $\pm 3,9$ )
talkumos B. subtilis készítménnyel csávázott mag	88 ( $\pm 2,2$ )	85 ( $\pm 3,1$ )

az adatok 10 edényben megfigyelt értékek átlagát jelentik  
a zárójelben megadott számok a standard hibát jelentik

### 18. példa

#### B. subtilis NCIB 12376-ot tartalmazó cseppfolyós készítmények előállítás és hatékonysága

A B. subtilis NCIB 12376 törzs folyékony élesztőkivonat-pepton-burgonyakeményítő tápközeggel (5 g élesztőkivonat, 5 g pepton, 20 g burgonyakeményítő, desztillált vízzel 1 l-re feltöltve, pH=6,8) készült tenyészetét adjuváns olajjal (Ashlade®) keverve a következő összetételű készítményeket állítjuk elő:

Készítmény	Spóra/ml	Antibiotikum aktivitása (egység)	Adjuváns olaj (térfogat%)
A	$4,0 \cdot 10^8$	6,8	1,02
B	$6,8 \cdot 10^8$	28,8	1,02
C	$1,1 \cdot 10^9$	91,7	1,02
D	$1,3 \cdot 10^9$	91,7	1,02

Az így kapott készítmények Erysiphe graminis elleni hatékonyságát búzán vizsgáljuk úgy, hogy a növényt a készítménnyel bepermetezzük, majd a patogén gom-

ba vizes szuszpenziójával fertőzzük. A növényeket 14 napon keresztül üvegházban tartjuk, majd meghatározzuk a levelek fertőzöttségének mértékét.

Az eredményeket a 13. táblázatban ismertetjük. Az eredmények azt mutatják, hogy a  $4,0 \cdot 10^8$ – $1,3 \cdot 10^9$  spóra/ml spórakoncentrációjú, és 6,8–91,7 egység antibiotikum-aktivitású készítmények képesek a növények gombafertőzésének megakadályozására.

13. táblázat

Kezelés	Levelek fertőzésének mértéke (%)
kontroll (kezelés nélkül)	9,4
A készítmény	0
B készítmény	0,5
C készítmény	0
D készítmény	0,4

## 19. példa

## MBI 600 antibiotikum tisztítása

B. subtilis NCIB 12376 törzs élesztőkivonat-peptonglükóz tápközeggel készült, 72 órás tenyészetéből centrifugálással eltávolítjuk a baktériumsejteket és spórákat. A sejtmentes felülúszót sósavval pH=2,0 értékre savanyítjuk, és a kicsapódott antibiotikumot centrifugálással összegyűjtjük. A kapott üledéket nátrium-hidroxid-oldatban újraoldjuk, és a pH-t 8,0-ra állítjuk. A vizes oldatot bután-1-ollal extraháljuk, amíg csak a szerves fázisban tudunk antibiotikus aktivitást kimutatni.

A szerves fázisokat egyesítjük és rotációs bepárlókészülék segítségével szárazra pároljuk. A maradékot kálium-foszfát-pufferben (pH=6,0) oldjuk, és G-100-zal töltött oszlopon géliszűrjük. Az antibiotikus aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtjük és bután-1-ollal addig extraháljuk, amíg csak a szerves fázisban tudunk antibiotikus aktivitást kimutatni. A szerves fázisokat egyesítjük és szárazra pároljuk. A maradékot 20 mmól/l koncentrációjú Tris-pufferben (pH=7,4) oldjuk és 0,45 µm pórusméretű szűrőn keresztülszűrjük.

A szűrt antibiotikum-oldatot nagyfeloldású folyadékromatográfiás eljárással tisztítjuk (HRLC), MA7Q anioncserélő oszlopon, az eluálást maximálisan 1 mól/l nátrium-klorid gradienst tartalmazó 20 mmól/l koncentrációjú Tris-pufferrel (pH=7,4) végezzük. Az antibiotikus aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtjük, egy éjszakán keresztül desztillált vízzel szemben dializáljuk és vákuumban koncentrálnak. Ily módon tisztított antibiotikumot nyerünk, amelynek fizikai állandói az alábbiak:

Móltömeg:  $63\,500 \pm 3700$  dalton

UV-spektrum: 265 nm-nél egy bemélyedés,

275 nm-nél csúcs és

285 nm-nél ezen a csúcson egy váll van.

A tisztítás különböző szakaszaiban a frakciók antibiotikus aktivitását mérjük, és kiszámítjuk az antibiotikum hozamát. Az eredményeket a 14. táblázatban foglalkozunk össze.

14. táblázat

Minta	Antibiotikum aktivitása (egység)	Antibiotikum hozama (%)
72 órás tenyészet	7,83	100
újraoldott savas csapadék	3,74	47,8
géliszűrővel kapott frakció	6,00	76,6
butanolos extraktum	3,99	51,0
száritott butanolos extraktum	0,60	7,7
pufferes oldata		
HRLC frakció	0,31	4,0

15

## 20. példa

## Spóra-antibiotikum elegy előállítás

B. subtilis NCIB 12376 törzset élesztő-peptonglükóz tápközegben tenyésztünk 72 órán keresztül, 30 °C-on, és a tenyészet pH-ját sósavoldattal 2,0-re állítjuk be. A savas tenyészetet centrifugáljuk, és a spórából és antibiotikum-ból álló üledéket kevés nátrium-hidroxid-oldatban újra feloldjuk, majd pH-ját – amennyiben szükséges – sósavoldattal 7,0-re állítjuk. A fenti módon kapott spóra-antibiotikum elegy hozama az eredeti tenyészetben lévő spórákra nézve 60%, és az antibiotikumra nézve 40%.

A spóra-antibiotikum elegyet 1 tömeg% végkoncentrációban adott Ashlade adjuváns olajjal formáljuk készítménnyé. Az így kapott, spórát és antibiotikumot tartalmazó készítmény fungicid aktivitását úgy határozzuk meg, hogy a készítményt üvegházban nevelt széles levelű babnövényre permetezzük. A permetezés után 9 nappal a leveleket eltávolítjuk a növényről, műanyag dobozokba helyezük, Botrytis cinerea-val fertőzzük és inkubáljuk. A B. cinerea-val végzett fertőzés után 7 nappal a leveleken meghatározzuk a levelek fertőzöttségének mértékét.

A találmány szerinti spóra-antibiotikum készítmény 70%-kal csökkenti a fertőzöttséget a kontroll-növényekkel összehasonlítva, amelyeket a spóra-antibiotikum készítmény helyett csak vízzel permeteztünk be.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás MBI 600 antibiotikum vagy antibiotikum-frakció előállítására, amely antibiotikum az alábbi tulajdonságokkal rendelkezik:

- (i) gombák és Gram-pozitív baktériumok ellen van, Gram-negatív baktériumok ellen nincs antibiotikus aktivitása;
- (ii) géliszűrőseles chromatográfiával meghatározott móltömege  $63\,500 \pm 3700$  dalton, globuláris proteinekkel végzett kalibrálás esetén;
- (iii) pozitív reakciót ad az alábbi proteinkimutató vizsgálatokban: Lowry, fényabszorpció 280 nm-en, biuret és ninhidrin;
- (iv) proteintartalma az alábbi aminosavakból áll: aszparaginsav, treonin, szerin, glutaminsav, prolin, alanin, valin, izoleucin, leucin és tirozin;

- (v) proteintartalma rezisztens pronáz E enzimmel végzett emésztéssel szemben;
- (vi) lipidtartalma 14–17 szénatomos zsírsavakból áll;
- (vii) pH-optimuma 6,0–7,0;
- (viii) 5,0–9,0 pH-tartományban 110 °C-on 10 percen keresztüli melegítés után aktivitását megtartja;
- (ix) 5,0-nél magasabb pH-értékeken vízben oldódik;
- (x) metanolban, etanolban oldódik, butanolban és dimetil-szulfidban korlátozottan oldódik;
- (xi) acetonban, petroléterben, kloroformban, toluolban és hexánban oldhatatlan, és
- (xii) ultraibolya-spektrumában 265 nm-nél egy bemélyedés, 275 nm-nél csúcs és 285 nm-nél ezen a csúcson egy váll van,

*azzal jellemezve*, hogy az MBI 600 antibiotikumot termelő bacillus subtilist tenyésztjük, és az MBI 600 antibiotikumot vagy antibiotikum-frakciót a tenyészetből kinyerjük. (Elsőbbsége: 1988. 03. 07.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy Bacillus subtilis NCIB 12375, 12376 vagy 12616 mikroorganizmust vagy ezek MBI 600 antibiotikumot termelő mutánsát vagy variánsát tenyésztjük. (Elsőbbsége: 1988. 03. 07.)

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sejteket a tenyészetből eltávolítjuk, és a kapott sejtmentes közeget megsavanyítva az MBI 600 antibiotikumot kicsapjuk. (Elsőbbsége: 1988. 03. 07.)

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Bacillus subtilis tenyésztését addig folytatjuk, míg a spóráképző sejtek jutnak túlsúlyba a vegetatív sejtekkel szemben, a spórák és az MBI 600 antibiotikum a tenyészetben felszaporódnak, majd a pH-t csökkentve az MBI 600 antibiotikumot kicsapjuk, és a szilárd és folyékony fázist szétválasztva a spórák és az MBI 600 antibiotikum elegyét kinyerjük. (Elsőbbsége: 1989. 03. 07.)

5. Fungicid növényvédő szer, amely biológiailag aktív hatóanyagot és szilárd vagy cseppfolyós hordozóanyagot és kívánt esetben felületaktív anyagot tartalmaz, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként legfeljebb 95 tömeg%-ban az 1. igénypont tárgyi körében meghatározott tulajdonságú MBI 600 antibiotikumot vagy antibiotikum-frakciót, és/vagy ezeket tartalmazó Bacillus subtilis sejteket és/vagy spórákat tartalmaz. (Elsőbbsége: 1989. 03. 07.)