Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к штаммам бактерий Pseudomonas syringae, продуцирующим один или более псевдомицинов.

Известный уровень техники

Грибковые инфекции являются существенной причиной заболевания, снижения качества жизни и смертности среди людей, в особенности у больных с нарушениями иммунной системы. Случаи грибковых инфекций у человека значительно возросли за последние 20 лет. Это отчасти обусловлено увеличением количества людей с ослабленной иммунной системой или ослабленных из-за трансплантации органов, химиотерапии рака, СПИДа, возраста или других сходных нарушений или состояний. Такие больные предрасположены к атаке грибковыми патогенами, которые преобладают в популяции, но которые остаются под контролем функционирующей иммунной системы. Данные патогены трудно контролировать из-за того, что некоторые существующие противогрибковые агенты являются либо высоко токсичными, либо только тормозят активность гриба. Например, полиены являются фунгицидными, но токсичными; в то время как азолы являются гораздо менее токсичными, но оказывают лишь фунгистатическое действие. Более важно то, что недавно появились сообщения о резистентных к азолам и полиенам штаммах Candida, которые существенно ограничивают возможности терапии при инфицировании такими штаммами.

Один из классов новых противогрибковых агентов, псевдомицины, является многообещающим в отношении лечения грибковых инфекций у множества больных. (См., например, Harrison, L., et al., "Pseudomycins, a family of novel peptides from Pseudomonas syringae possessing broad-spectrum antifungal activity", J. Gen. Microbiology, 137(12), 2857-65 (1991) и патенты США №№ 5576298 и 5837685). Псевдомицины являются природными продуктами, получаемыми из изолятов Pseudomonas syringae. P. syringae является большой группой связанных с растениями бактерий, которые послужили источником нескольких биологически активных веществ, таких так бацитрацин и сирингомицины. Природные штаммы и образованные с помощью транспозонов мутанты P. syringae продуцируют соединения с противогрибковой активностью. Образованный с помощью транспозона регулируемый мутант дикого штамма P. syringae MSU 174, известный как MSU 16H (ATCC 67028), продуцирует несколько псевдомицинов. Псевдомицины A, B, C и C' были выделены, химически охарактеризованы и, как было показано, обладают широким спектром противогрибковой активности, включая активность против важных грибковых патогенов как у человека, так и у растений. Псевдомицины структурно относятся к сирингомицину и другим противогрибковым агентам из изолятов P. syringae, но отличаются от них. Пептидная часть псевдомицинов A, B, C, C' соответствует L-Ser-D-Dab-L-Asp-L-Lys-L-Dab-L-aThr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl) с концевой карбоксильной группой, замыкающей макроциклическое кольцо на OH-группу N-концевого Ser. Аналоги различаются по N-ацильной боковой цепи, т.е. псевдомицин A является N-ацилированным 3,4-дигидрокситетрадеконоатом, псевдомицин B - 3-гидрокситетрадеканоатом, псевдомицин C - 3,4-дигидроксигексадеканоатом и псевдомицин C' - 3-гидроксигексадеканоатом. (См., например, Ballio, A., et al., "Novel bioactive lipodepsipeptides from Pseudomonas syringae: the pseudomycins", FEBS Letters, 355(1), 96-100, (1994) и Coiro, V.M., et al., "Solution conformation of the Pseudomonas syringae MSU 16H phytotoxic lipodepsipeptide Pseudomycin A determined by computer simulations using distance geometry and molecular dynamics from NMR data", Eur. J. Biochem., 257(2), 449-456 (1998)).

Несмотря на преобладающий рост грибковых инфекций и перспективность псевдомицинов, получение псевдомицинов в коммерческих количествах оставалось проблематичным. Опубликованные способы получения псевдомицинов осуществляются в культуре без встряхивания или перемешивания с применением дорогой среды на основе декстрозы картофеля. Такие культуры обычно продуцируют псевдомицины в малых количествах, пригодных для лабораторных исследований, и в концентрациях, несовместимых с производством в большом или коммерческом масштабе. Культура в спокойном состоянии также непригодна для применения в масштабе приблизительно более одного литра, когда становятся проблематичными диффузия питательных веществ, газов, в особенности кислорода, и поддержание адекватного клеточного роста.

Остается потребность в способе получения псевдомицинов с применением P.syringae в масштабе и концентрации, пригодных для коммерческих применений псевдомицинов в качестве противогрибковых агентов для использования против инфекций у животных, человека или растений.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к биологически очищенным культурам штаммов P. syringae, которые пригодны для получения псевдомицинов.

Более конкретно, изобретение относится к штамму бактерий Pseudomonas syringae 25-B1 (ATCC PTA-1622), штамму бактерий Pseudomonas syringae 67H1 (ATCC PTA-1621) и штамму бактерий Pseudomonas syringae 7H9-1 (ATCC PTA-1623), продуцирующих один или более псевдомицинов в количестве, превышающем приблизительно 10 мкг/мл.

Штаммы P. syringae могут быть штаммами дикого типа, выделенными из природных источников, включая растения, такие как ячмень, цитрусовые, сирень и тому подобное. P. syringae обладает свойствами, включающими способность расти и продуцировать один или более псевдомицинов в среде, ли-

шенной продуктов из картофеля, или на минимальной среде; продуцировать псевдомицины в значительном количестве, таком как, по меньшей мере, приблизительно 10 мкг/мл; продуцировать псевдомицины в желаемом соотношении; и/или тормозить рост одного или более грибов.

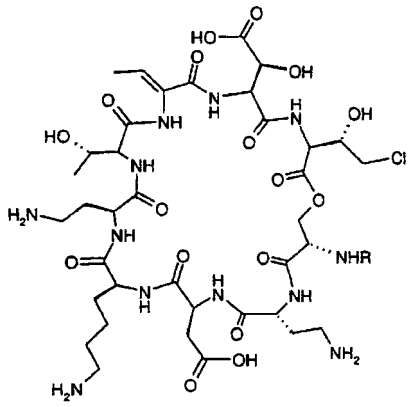
В соответствии с изобретением P. syringae проявляет способность к долговременному росту и метаболизму в питательной среде, включающей три или менее аминокислот и, необязательно, липид, продукт из картофеля или их сочетание до тех пор, пока один или более псевдомицинов не продуцируется в концентрации, по меньшей мере, приблизительно 10 мкг/мл. Более предпочтительно, чтобы штамм P. syringae продуцировал от приблизительно 40 мкг/мл до приблизительно 700 мкг/мл одного или более псевдомицинов, и наиболее предпочтительно приблизительно 200 мкг/мл псевдомицина A или, по меньшей мере, приблизительно 100 мкг/мл псевдомицина B.

Предпочтительно один или более псевдомицинов продуцируются при росте штамма P. syringae при условиях культивирования при периодическом или непрерывном поступлении питательных веществ. Культуры P. syringae растут в течение периода времени и при плотности, достаточных для повышения продукции псевдомицина. Предпочтительно культура поддерживается при pH от приблизительно 4 до приблизительно 6,5, более предпочтительно при pH от 4,5 до 5,5 для сохранения стабильности псевдомицина.

Продуцирование псевдомицинов включает культивирование Pseudomonas syringae в среде, включающей три или меньшее количество аминокислот, и извлечение одного или более псевдомицинов из культуры. Три или меньшее количество аминокислот включает глутаминовую кислоту, глицин, гистидин или их сочетание. В одном осуществлении культура P. syringae находится в среде, включающей глицин и, необязательно, липид, продукт из картофеля или их сочетание при pH от приблизительно 4 до 6,5, до тех пор, пока один или более псевдомицинов не продуцируется в концентрации, по меньшей мере, приблизительно 10 мкг/мл, предпочтительно более чем приблизительно 40 мкг/мл. Данный способ особенно пригоден для получения одного или более псевдомицинов в масштабе, достаточном для извлечения одного или более псевдомицинов для применения в качестве противогрибкового агента для лечения животных, человека или растений.

Определения

Применяемый здесь термин "псевдомицин" относится к соединениям, имеющим следующую формулу I:



I

где R является липофильной группой. Псевдомициновые соединения A, A', B, B', C, C' представлены указанной выше формулой I, где R определено ниже.

Псевдомицин A	R = 3,4-дигидрокситетрадеканоил
Псевдомицин A'	R = 3,4-дигидроксипентадеканоат
Псевдомицин B	R = 3-гидрокситетрадеканоил
Псевдомицин B'	R = 3-гидроксидодеканоат
Псевдомицин C	R = 3,4-дигидроксигексадеканоил
Псевдомицин C'	R = 3-гидроксигексадеканоил

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны уровни продукции псевдомицинов A, B, C и C' несколькими штаммами P. syringae, культивируемыми в N21SM или среде измельченного картофеля в течение ≈67 ч;

на фиг. 2 - уровни продукции псевдомицинов A, B, C и C' несколькими штаммами P. syringae, которые росли в среде N21SM в сосудах в течение ≈67 ч;

на фиг. 3 - продукция псевдомицинов A, B и/или C с применением штамма MSU 16H P. syringae в невстряхиваемых сосудах со средой, включающей бульон декстрозы картофеля, и с той же средой, дополнительно содержащей соли, глицин, метилмиристат и/или растворимый крахмал;

на фиг. 4 - продукция псевдомицина при условиях, описанных для фиг. 3, за исключением того, что сосуды встряхивали;

на фиг. 5 - продукция псевдомицинов при использовании среды, содержащей глицин и встряхиваемых сосудов, как описано для фиг. 4. Эти результаты иллюстрируют синергизм между глицином и метилмиристатом в стимуляции продукции псевдомицина;

на фиг. 6 - продукция псевдомицинов A, B и/или C штаммом MSU 16H P. syringae в присутствии различных метиловых эфиров жирных кислот, добавленных в концентрации 0,1% об./об. к среде, включающей бульон декстрозы картофеля, глицин, соли и растворимый крахмал. Каждая из жирных кислот была насыщена, и числа под столбиками представляют собой длину углеродной цепи;

на фиг. 7 - показатели титров псевдомицина при ферментации в объеме 150 л. Растворенный кислород поддерживали на уровне 30% с помощью управляемых компьютером интенсивности встряхивания и воздушного потока. Глюкозу поставляли на уровне 200 мл/ч, начиная с 18 ч, а гидроокись аммония поставляли в объеме 20 мл/ч, начиная с 20 ч. При такой ферментации псевдомицин C' не определялся;

на фиг. 8 - поглощение кислорода и растворенный кислород в ходе ферментации в объеме 150 л, продукция псевдомицина при которой проиллюстрирована на фиг. 7;

на фиг. 9 - продукция псевдомицинов A, B и/или C различными штаммами P. syringae при применении среды, свободной от добавленных продуктов картофеля, в присутствии или в отсутствие метилмиристата во встряхиваемых сосудах.

Подробное описпние

Pseudomonas syringae.

Pseudomonas syringae включает широкий спектр бактерий, которые обычно связаны с растениями. Некоторые из P. syringae являются патогенами растений, тогда как другие являются лишь слабо патогенными или являются сапрофитами. Многие из различных изолятов P. syringae продуцируют один или более цитотоксичных агентов, которые могут помогать этой бактерии выживать в дикой природе, где она должна конкурировать с грибами и другими бактериями. Продуцируемые P. syringae цитотоксические агенты включают противогрибковые агенты, такие как псевдомицины, сирингомицины, сиринготоксины и сирингостатины.

Выделенные штаммы P. syringae, которые продуцируют один или более псевдомицинов, известны в данной области. Например, штамм дикого типа MSU 174 (выделенный с ячменного поля в Монтане) и мутант данного штамма, образованный с помощью транспозонного мутагенеза с применением Tn905 (MSU 16H), были описаны в патенте США № 5576298, опубликованном 19 ноября 1996 г. и принадлежащем G. Strobel et al.; Harrison et al., "Pseudomycins, a family of novel peptides from Pseudomonas syringae possessing broad-spectrum antifungal activity", J. Gen. Microbiology 137, 2857-2865 (1991); Lamb et al., "Transposon mutagenesis and tagging of fluorescent Pseudomonas; and Antimycotic production is necessary for control of Dutch elm disease", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6447-6451 (1987). Культуры MSU 174 и MSU 16H находятся на хранении в университете штата Монтана (Bozeman, Montana, USA) и доступны от American Type Culture Collection (Parklawn Drive, Rockville, MD, USA). Описание цитированных в данном параграфе источников включены здесь в качестве ссылки.

Настоящее изобретение относится к штаммам P. syringae, которые продуцирует один или более псевдомицинов в количестве, превышающем приблизительно 10 мкг/мл, предпочтительно от по меньшей мере приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 900 мкг/мл и более предпочтительно от приблизительно 800 мкг/мл до приблизительно 900 мкг/мл. Предпочтительно, чтобы биологически очищенная культура микроорганизма была штаммом и MSU 16H 25-B1, 67H1 или 7H9-1 Pseudomonas syringae. Культуры MSU 174 и MSU 16H были получены, как описано в цитированных здесь выше ссылках.

Штамм P. syringae, который пригоден для продуцирования одного или более псевдомицинов, может быть выделен из природных источников, включая растения, такие как ячмень, цитрусовые, сирень и тому подобное, а также из таких источников как почва, вода, воздух, пыль и тому подобное.

Предпочтительный штамм выделяют из растений. Штаммы P. syringae, которые выделяют из природных источников, могут быть отнесены к дикому типу. Используемый здесь термин "дикий тип" относится к доминантному генотипу, который естественно существует в нормальной популяции P. syringae (т.е. штаммы или изоляты P. syringae, которые находятся в природе, а не образованы путем лабораторных манипуляций). Как и в случае других организмов, свойства продуцирующих псевдомицин культур, используемых в данном изобретении штаммов P. syringae, таких как MSU 174, MSU 16H, MSU 206, 25-B1, 67H1 и 7H9-1, являются предметом для изменений. Так, производные данных штаммов, например, рекомбинанты, мутанты и варианты, могут быть получены с помощью способов, хорошо известных специалистам.

Продуцирующие псевдомицин штаммы P. syringae выбраны для роста на минимально определенной среде, такой как среда N21, и/или для продуцирования одного или более псевдомицинов на уровне, большем, чем приблизительно 10 мкг/мл. Эти штаммы проявляют свойство продуцирования одного или более псевдомицинов при росте в среде, включающей три или менее аминокислот и, необязательно, либо липид, либо продукт из картофеля или их сочетание.

Рекомбинантные штаммы могут быть получены путем трансформации штаммов P. syringae с помощью способов, хорошо известных специалистам. Путем применения технологии рекомбинантной ДНК штаммы P. syringae могут быть трансформированы для экспрессии множества генных продуктов в до-

полнение к антибиотикам, продуцируемым данными штаммами. Например, можно трансформировать штаммы рекомбинантным вектором, обеспечивающим резистентность к антибиотику, к которому штаммы в норме чувствительны. Полученные таким способом трансформанты должны продуцировать не только псевдомицины, но также и обеспечивающий резистентность фермент, что дает возможность для отделения трансформированных клеток от клеток дикого типа. Более того, применяя сходные способы, можно модифицировать существующие штаммы путем введения множества копий эндогенных генов биосинтеза псевдомицина для достижения большего выхода псевдомицина. Производные, т.е. природные или индуцированные варианты, мутанты и рекомбинанты штаммов P. syringae 25-B1, 67H1 и 7H9-1, которые сохраняют свойства гиперпродукции псевдомицинов, являются частью данного изобретения.

Псевдомицины.

Применяемый здесь термин псевдомицин относится к одному или более членам семейства противогрибковых агентов, которые были выделены из бактерии Pseudomonas syringae. Псевдомицин представляет собой липодепсипептид, циклический пептид, включающий одну или более необычных аминокислот и имеющий одну или более присоединенных гидрофобных боковых цепей или боковых цепей в виде жирных кислот. Конкретнее, псевдомицины представляют собой липодепсинонапептиды с циклической частью пептида, замкнутой лактонной связью, и включающей необычные аминокислоты 4-хлортреонин, 3-гидроксиаспарагиновую кислоту, дегидро-2-аминомасляную кислоту и 2,4-диаминомасляную кислоту. Считается, что данные необычные аминокислоты участвуют в обеспечении биологических характеристик псевдомицинов, таких как стабильность в сыворотке и их вызывающее гибель действие. Псевдомицины включают псевдомицин A, псевдомицин A', псевдомицин B, псевдомицин B', псевдомицин C и псевдомицин C'. Каждый из данных псевдомицинов имеет одинаковое ядро циклического пептида, но они отличаются по гидрофобной боковой цепи, присоединенной к данному ядру.

Каждый из псевдомицинов A, A', B, B', C и C' выделен и очищен и их структура охарактеризована рядом способов, включая секвенирование аминокислот, ЯМР и масс-спектрометрию. Псевдомицины A, B, C и C' обсуждаются в патенте США № 5576298, вышедшем 19 ноября 1996 г., принадлежащем G. Strobel et al.; Harrison et al., "Pseudomycins, a family of novel peptides from Pseudomonas syringae possessing broad-spectrum antifungal activity", J. Gen. Microbiology 137, 2857-2865 (1991); и Ballio et al., "Novel bioactive lipodepsipeptides from Pseudomonas syringae: the pseudomycins", FEBS Letters, 355, 96-100, (1994). Псевдомицины A' и B' описаны в патентной заявке США, серийный № PCT/US 00/08727 Palaniappan Kulanthaivel, et al., называющейся "Pseudomycin Natural Products", представленной тем же числом, что и настоящая, которую заявители цитируют в примерах. Противогрибковая активность, обусловленная некоторыми псевдомицинами, была прослежена для P. syringae, несущей транспозон, известный как Tn 903, который кодирует факторы, включающие устойчивость к канамицину. Его последовательность и способы манипуляций с транспозоном Tn 903 известны. Oka et al., "Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn 903", J. Mol. Biol. 147, 217-226 (1981). Каждая из ссылок, процитированных в этом параграфе, включена здесь специально для справки.

Псевдомицины отличаются по структуре и свойствам. Предпочтительные псевдомицины A, B, C и C' проявляют активность против обширного множества грибов, а также обычно характеризуются приемлемой токсичностью. По сравнению с другими предпочтительными псевдомицинами псевдомицин B имеет более высокую эффективность против определенных грибов и более низкий уровень токсичности. Следовательно, для настоящих способов псевдомицин B более предпочтителен. Каждый псевдомицин имеет циклическое нонапептидное кольцо, имеющее последовательность Ser-Dab-Asp-Lys-Dab-aThr-Dhb-HOAsp-ClThr (серин; 2,4-диаминомасляная кислота; аспарагиновая кислота; лизин; 2,4-диаминомасляная кислота; алло-треонин; дегидро-2-аминомасляная кислота; 3-гидроксиаспарагиновая кислота; 4-хлортреонин), более конкретно, L-Ser-D-Dab-L-Asp-L-Lys-L-Dab-L-aThr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl) с карбоксильной группой ClThr и гидроксильной группой серина, замыкающимися в кольцо лактонной связью. Псевдомицины отличаются по природе липофильной части, которая присоединена к аминогруппе N-концевого серина. Аминогруппа серина образует амидную связь с карбоксилом 3,4-дигидрокситетрадеканоильной части в псевдомицине A, 3-моногидрокситетрадеканоильной части в псевдомицине B, 3,4-дигидроксигексадеканоильной части в псевдомицине C и 3-моногидроксигексадеканоильной части в псевдомицине C'. Карбоксильная группа серина образует амидную связь с Dab кольца.

Биологическая активность псевдомицинов.

Псевдомицин имеет несколько видов биологической активности, включая уничтожение различных грибов, таких как грибковые патогены растений и животных. В частности, псевдомицин является активным противогрибковым агентом в отношении грибов, которые способны вызвать инфекции у индивидуумов с нарушениями иммунной системы. Данные грибы включают различные виды Candida, включая C. parapsilosis, C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis и C. krusei. Они также включают другие виды, такие как Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus, и Histoplasma capsulatum. Уничтожение, а не торможение роста грибов, особенно грибковых патогенов, является желательной и предпочтительной биологической активностью псевдомицина.

Показано также, что псевдомицины являются токсичными в отношении широкого диапазона патогенных для растений грибов, включая Rynchosponum secalis, Ceratocystis ulmi, Rhizoctonia solani, Scle-

rotinia sclerotiorum, Verticillium albo-atrum, Verticillium dahliae, Thielavlopis basicola, Fusarlum oxysporum и Fusarium culmorum. (См. Harrison, L., et al., "Pseudomycins, a family of novel peptides from Pseudomonas syringae possessing broad-spectrum antifungal activity", J. of General Microbiology, 7, 2857-65 (1991). Кроме того, показано, что P. syringae MSU 16H дает большую защиту, чем штамм дикого типа у вязов, инфицированных Ceratocystic ulmi, агент, вызывающий заболевание у голландского вяза. (См., например, Lam et al., Proc. Natl. Sci. USA, 84, 6447-6451 (1987)).

Выращивание Pseudomonas syringae.

Как здесь описывается, "водная питательная среда" относится к композиции на основе воды, включающей минералы, органические соединения и их соли, необходимые для роста микроорганизма, применяемого в настоящем изобретении. Предпочтительная питательная среда содержит эффективное количество трех или менее аминокислот, предпочтительно глутаминовую кислоту, глицин, гистидин или их сочетание. В одном осуществлении среда содержит эффективное количество глицина и, необязательно, один или более продуктов из картофеля и липид. Глицин может предлагаться как единственная аминокислота, или как часть смеси аминокислот, такой как гидролизованный белок. Подходящие липиды включают соевое масло, жирные кислоты, алифатическую цепь из 14 или 16 углеродов и сложные эфиры жирных кислот и алифатической цепи из 14 или 16 углеродов. Предпочтительные сложные эфиры жирных кислот включают метилпальмитат и метилмиристат, предпочтительно метилмиристат. Подходящими продукты из картофеля включают бульон декстрозы картофеля, декстрин картофеля, белок картофеля и картофельное пюре в виде имеющегося в продаже пищевого продукта. Предпочтительные минералы в питательной среде включают смесь солей, обычно применяемую в культуре клеток и ферментации, такую как минеральные соли Czapek, которые включают KCl, $MgSO_4$ и $FeSO_4$. Органические соединения в питательной среде предпочтительно включают глюкозу или сахарозу и могут необязательно включать растворимый крахмал; могут быть также включены другие, подобные этим органические соединения. pH среды составляет предпочтительно от приблизительно 4 до 6,5, более предпочтительно от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,7, наиболее предпочтительно приблизительно 5,2.

Хотя количество каждого ингредиента в питательном бульоне обычно не является критическим для роста бактерий или продукции одного или более псевдомицинов, выгодны определенные уровни питательных компонентов. Предпочтительное количество глицина составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 г/л, более предпочтительно от приблизительно 0,3 до приблизительно 3 г/л, наиболее предпочтительно приблизительно 1 г/л. Предпочтительное количество липида составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10 г/л продукта в виде масла, такого как соевое масло, более предпочтительно от приблизительно 0,5 до приблизительно 2 г/л соевого масла. Предпочтительное количество жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 г/л. Предпочтительным сложным эфиром жирной кислоты является метилмиристат в количестве от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 г/л, предпочтительно от приблизительно 0,3 до приблизительно 3 г/л, более предпочтительно приблизительно 1 г/л. Предпочтительное количество продуктов из картофеля включает от приблизительно 12 до приблизительно 36 г/л, более предпочтительно приблизительно 24 г/л бульона декстрозы картофеля; от приблизительно 5 до приблизительно 50 г/л, более предпочтительно приблизительно 30 г/л имеющейся в продаже смеси картофельного пюре; от приблизительно 1 до приблизительно 30 г/л, предпочтительно приблизительно 20 г/л декстрина картофеля; и/или от приблизительно 1 до приблизительно 10 г/л, предпочтительно приблизительно 4 г/л белка картофеля. Предпочтительная питательная среда включает минералы, такие как KCl в количестве от приблизительно 0,02 до приблизительно 2 г/л, более предпочтительно приблизительно 0,2 г/л; $MgSO_4$, предпочтительно $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ в количестве от приблизительно 0,02 до приблизительно 2 г/л, более предпочтительно приблизительно 0,2 г/л; $FeSO_4$, предпочтительно $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в количестве от приблизительно 0,4 до приблизительно 40 мг/л, более предпочтительно приблизительно 4 мг/л и тому подобное. Если он присутствует, растворимый крахмал составляет предпочтительно от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 г/л, более предпочтительно приблизительно 5 г/л. Глюкоза предпочтительно присутствует от приблизительно 2 до приблизительно 80 г/л, более предпочтительно приблизительно 20 г/л. Сахароза предпочтительно присутствует от приблизительно 2 до приблизительно 80 г/л, более предпочтительно приблизительно 30 г/л.

P. syringae обычно растет в описанных средах в условиях контролируемых или регулируемых pH, температуры и тому подобное. P. syringae растет и продуцирует один или более псевдомицинов при температуре между приблизительно 15°C и приблизительно 35°C, предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 30°C, более предпочтительно от приблизительно 22 до приблизительно 27°C, наиболее предпочтительно приблизительно 25°C. P. syringae растет и продуцирует один или более псевдомицинов при pH между приблизительно 4 и приблизительно 7, предпочтительно между приблизительно 4 и приблизительно 6, более предпочтительно от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5. Обычно рост P. syringae не наступает, когда температура превышает 37 или ниже 10°C, или когда pH составляет выше 9 или ниже 4.

Способ продукции псевдомицинов.

Для продукции одного или более псевдомицинов штаммом P. syringae дикого типа или мутантным штаммом организм культивируют при перемешивании в водной питательной среде, включающей эффективное количество трех или менее аминокислот. Три или менее аминокислот представляют собой предпочтительно глутаминовую кислоту, глицин, гистидин или их сочетание. В одном предпочтительном осуществлении аминокислоты включают глицин и, необязательно, один или более продуктов из картофеля и липид. Культивирование проводят в условиях, эффективных для роста P. syringae и продукции желаемого псевдомицина или псевдомицинов. Эффективные условия включают температуру от приблизительно 22 до приблизительно 27°C и продолжительность от приблизительно 36 ч до приблизительно 96 ч. При культивировании в среде такой, как описанная здесь, P. syringae может расти при клеточной плотности до приблизительно 10-15 г/л сухого веса и продуцировать псевдомицины в суммарном количестве по меньшей мере приблизительно 10 мкг/мл, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 мкг/мл, более предпочтительно приблизительно 500 мкг/мл или более.

Для продукции псевдомицина является выгодным контролирование концентрации кислорода в среде в течение культивирования P. syringae. Предпочтительно уровень кислорода поддерживается от приблизительно 5% до приблизительно 50% насыщения, более предпочтительно приблизительно 30% насыщения. Барботирование воздухом, чистым кислородом или смесью газов, включающей кислород, может регулировать концентрацию кислорода в среде. Более того, может быть использован подбор скорости перемешивания для регулирования скорости перехода кислорода.

Для продукции псевдомицина является выгодным контролирование pH среды в течение культивирования P. syringae. Псевдомицины являются лабильными при щелочном pH, и значительная деградация может наступить, если pH культуральной среды находится выше приблизительно 6 в течение более чем приблизительно 12 ч. Предпочтительно pH культуральной среды поддерживается при менее чем приблизительно 6, более предпочтительно при менее чем приблизительно 5,5 и наиболее предпочтительно выше 4. pH предпочтительно поддерживается от приблизительно 5 до приблизительно 5,4, более предпочтительно при от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,2. Хотя это не лимитирует настоящее изобретение, считается, что разрушение псевдомицина при щелочном pH обусловлено открытием лактонного кольца и удалением Cl^-.

P. syringae может продуцировать один или более псевдомицинов при росте в культуре с периодическим поступлением питательных веществ. Однако периодическое или полунепрерывное поступление глюкозы и, необязательно, кислоты или основания, такого как гидроксид аммония, для контролирования pH, увеличивает продукцию псевдомицинов. Продукция псевдомицинов P. syringae может быть дополнительно увеличена при применении способов непрерывного поступления питательных веществ, в которых глюкоза и, необязательно, кислота или основание, такое как гидроксид аммония, для контролирования pH, поступают автоматически.

При применении P. syringae один или более псевдомицинов могут быть получены в значительных количествах. Данное суммарное количество одного или более псевдомицинов составляет от по меньшей мере приблизительно 200 мкг/мл до приблизительно 900 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 600 мкг/мл до приблизительно 900 мкг/мл, более предпочтительно от приблизительно 800 мкг/мл до приблизительно 900 мкг/мл. Предпочтительно при получении псевдомицина A псевдомицин A продуцируется в суммарном количестве от по меньшей мере приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 400 мкг/мл, более предпочтительно от приблизительно 300 мкг/мл до приблизительно 400 мкг/мл, наиболее предпочтительно от приблизительно 350 мкг/мл до приблизительно 400 мкг/мл. Предпочтительно при получении псевдомицина B псевдомицин B продуцируется в суммарном количестве от по меньшей мере приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 300 мкг/мл, более предпочтительно от приблизительно 200 мкг/мл до приблизительно 300 мкг/мл, наиболее предпочтительно от приблизительно 250 мкг/мл до приблизительно 300 мкг/мл. Предпочтительно, при получении псевдомицина C псевдомицин C продуцируется в суммарном количестве от по меньшей мере приблизительно 5 мкг/мл до приблизительно 100 мкг/мл, более предпочтительно от приблизительно 5 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, наиболее предпочтительно от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл. Предпочтительно при получении псевдомицина C' псевдомицин C' продуцируется в суммарном количестве от по меньшей мере приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, более предпочтительно от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, наиболее предпочтительно от приблизительно 30 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл.

Выбор штамма P. syringae может влиять на количество и распределение псевдомицина или псевдомицинов, продуцируемых путем культивирования в описанных здесь условиях. Например, штаммы MSU 16H и 67 H1 и подобные им штаммы, каждый продуцирует главным образом псевдомицин A, хотя также продуцирует псевдомицин B и C, обычно в отношении примерно 4:2:1. Штамм 67 H1 и подобные ему штаммы, однако, обычно продуцируют псевдомицины на уровне, большем в от приблизительно 3 до приблизительно 5 раз, по сравнению с продуцируемым штаммом MSU 16H. По сравнению со штаммами MSU 16H и 67 H1 штамм 25-B1 и подобные ему штаммы продуцируют больше псевдомицина B и меньше псевдомицина C. Штамм 7H9-1 и подобные ему штаммы отличаются тем, что продуцируют в основ-

ном псевдомицин B и продуцируют псевдомицин B в больших количествах, чем другие штаммы. Например, данный штамм может продуцировать псевдомицин B по меньшей мере в 10-кратном избытке по отношению как к псевдомицину A, так и C.

Каждый псевдомицин или смеси псевдомицинов могут быть обнаружены, определены, выделены и/или очищены любым из множества способов, известных специалистам в данной области. Например, степень активности псевдомицина в бульоне или в выделенной или очищенной композиции может быть определена по противогрибковому действию по отношению к такому грибу, как Candida. Известны многочисленные способы получения и анализа псевдомицинов. Например, один или более псевдомицинов могут быть выделены и очищены хроматографией, такой как ВЭЖХ.

Псевдомицины, получаемые способом настоящего изобретения, могут быть выделены в виде их фармацевтически приемлемых солей. Применяемый здесь термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям соединений, описанных выше, которые, по существу, не токсичны для живых организмов. Типичные фармацевтически приемлемые соли включают те соли, которые получены путем взаимодействия соединений настоящего изобретения с неорганической или органической кислотой или с неорганическим основанием. Такие соли известны как аддитивные соли кислоты и аддититивные соли основания.

Кислоты, обычно применяемые для образования аддитивных солей кислот, представляют собой неорганические кислоты, такие как соляная кислота, бромисто-водородная кислота, йодисто-водородная кислота, серная кислота и фосфорная кислота, и органические кислоты, такие как п-толуолсульфокислота, метансульфокислота, щавелевая кислота, п-бромфенилсульфокислота, угольная кислота, янтарная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота и уксусная кислота. Примеры таких фармацевтически приемлемых солей представляют собой сульфат, пиросульфат, бисульфат, сульфит, бисульфит, фосфат, однозамещенный кислый фосфат, двузамещенный кислый фосфат, метафосфат, пирофосфат, хлорид, бромид, иодид, ацетат, пропионат, деканоат, каприлат, акрилат, формат, изобутират, капроат, гептаноат, пропиолат, оксалат, малонат, сукцинат, суберат, соль себациновой кислоты, фумарат, малеат, бутин-1,4-диоат, гексин-1,6-диоат, бензоат, хлорбензоат, метилбензоат, динитробензоат, гидроксибензоат, метоксибензоат, фталат, сульфонат, ксиленсульфонат, фенилацетат, фенилпропионат, фенилбутират, цитрат, лактат, гамма-гидроксибутират, гликоллат, тартрат, метансульфонат, пропансульфонат, нафталин-1-сульфонат, нафталин-2-сульфонат и манделат. Предпочтительными фармацевтически приемлемыми аддитивными солями кислот являются те, которые образуются с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота и бромисто-водородная кислота, и те, которые образуются с органическими кислотами, такими как малеиновая кислота и метансульфокислота.

Аддитивные соли оснований включают те, которые происходят из неорганических оснований, таких как гидроксиды аммония или щелочных или щелочно-земельных металлов, карбонаты и бикарбонаты. Такие основания, пригодные для получения солей настоящего изобретения, таким образом, включают гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, карбонат калия, карбонат натрия, бикарбонат натрия, бикарбонат калия, гидроксид кальция и карбонат кальция. Особенно предпочтительны калиевые и натриевые формы солей.

Должно быть признано, что природа конкретного противоиона, образующего часть любой соли настоящего изобретения, не является принципиальной, до тех пор, пока соль в целом является фармацевтически приемлемой и до тех пор, пока противоион не привносит нежелательные свойства соли в целом.

Настоящее изобретение может быть лучше понято при ссылке на следующие примеры. Данные примеры предназначены для представления конкретных осуществлений изобретения и не предназначены в качестве ограничивающих объем изобретения.

Примеры

Хранящиеся биологические материалы

P. syringae находится при открытом доступе в American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, MD, США под инвентарным No. ATCC 67028. Штаммы P. Syringae 25-B1, 7H9-1 и 67 H1 положены на хранение в American Type Culture Collection 23 марта 2000 г. со следующими инвентарными №№:

25-B1	Инвентарный № PTA-1622
7H9-1	Инвентарный № PTA-1623
67 H1	Инвентарный № PTA-1621

Пример 1. Определение и очистка псевдомицинов.

Выявление и количественное определение псевдомицинов на основе противогрибковой активности.

Наличие или количество псевдомицина или смеси псевдомицинов может быть определено путем измерения противогрибковой активности препарата. Противогрибковую активность определяли in vitro путем получения минимальной ингибирующей концентрации (MIC) препарата с применением стандартного теста разведения агара или теста круговой диффузии. В качестве препарата одного или более псевдомицинов может служить экстракт клеточной культуры или более очищенная смесь. Типичным грибком, применяемым для определения противогрибковой активности, является C. albicans. Противогрибко-

вая активность считалась значимой, когда тестируемый препарат (50 мкл) вызывал появление зон ингибирования диаметром 10-12 мм в чашках с агаром, засеянных Candida albicans x657.

Выявление и количественное определение псевдомицинов с помощью ВЭЖХ.

Образец, в котором предполагалось наличие одного или более псевдомицинов, сначала экстрагировали либо равным объемом ацетонитрила, либо 1,5 объемами смеси метанол/H_3PO_4 (0,1% об./об.) и затем осветляли фильтрацией или центрифугированием. Осветленную смесь хроматографировали на колонке Zorbax 300SB-C8 (частицы 3,5 мкм, 5,0 × 0,46 см, MacMod каталожный № 865973-906) при скорости тока 2 мл/мин и температуре колонки 60°C. Колонку элюировали градиентом подвижной фазы A (25 мМ фосфат натрия, 7,74 г/л октансульфокислота и 10% ацетонитрил в воде при pH 6,5) и подвижной фазы B (25 мМ фосфат натрия, 7,74 г/л октансульфокислота и 60% ацетонитрил в воде при pH 6,5). Псевдомицины разделяли и количественно определяли с помощью градиента от 28% до 38% подвижной фазы B в течение 10 мин. Обычно псевдомицин A элюировался приблизительно на 10,2 минуте (612 секунде), псевдомицин B - на 10,98 мин (659 с), псевдомицин C - на 11,5 мин (691 с), псевдомицин B' - на 9,6 мин (576 с), а псевдомицин C' - на 12,17 мин (730 с). Псевдомицины выявляли по поглощению при 214 нм и количественно определяли суммированием пиков в УФ. Стандартами для идентификации и количественного определения служили известные стандарты каждого из псевдомицинов.

Очистка псевдомицинов из перемешиваемых ферментеров.

Бульон из 150-литрового, 1000-литрового или другого ферментера фильтровали для удаления клеток. Фильтрат наносили на колонку HP-20SS для извлечения псевдомициновых факторов. Собирали фракции при промывке колонки от 15 до 30% ацетонитрилом с 0,1% трифторуксусной кислотой. Содержавшие псевдомицины фракции наносили на колонку Amberchrom CG300-sd. Фактор A элюировали 22-30% ацетонитрилом в 0,2% натрий-ацетатном буфере (pH 4,8). Факторы B, C и C' элюировали 25-35% ацетонитрилом с 0,2% натрий-ацетатным буфером (pH 4,8). Фактор A имел 85% чистоту (поглощение в УФ). Фактор A наносили на колонку C18 для ВЭЖХ с обращенной фазой и элюировали 30-60% ацетонитрилом с 0,2% трифторуксусной кислотой. Элюированный материал имел более чем 95% чистоту (УФ/ЯМР).

Пример 2. Выделение, характеристика и мутагенез Pseudomonas syringae.

В качестве первого этапа на пути получения больших количеств псевдомицинов были выбраны природные изоляты и были созданы мутанты этих изолятов. Затем исследовали эти изоляты и мутанты в отношении факторов, улучшающих продукцию псевдомицинов и культуральную среду.

Материалы и способы.

Штаммы MSU 174 и MSU 16-H были выделены и охарактеризованы, как описано в принадлежащем G. Strobel et al. патенте США № 5576298, опубликованном 19 ноября 1996 г; Harrison et al., "Pseudomycins, a family of novel peptides from Pseudomonas syringae possessing broad-spectrum antifungal activity", J. Gen. Microbiology 137, 2857-2865 (1991) и Lamb et al., "Transposon mutagenesis and tagging of fluorescent pseudomonas: Antimycotic production is necessary for control of Dutch elm disease", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6447-6451 (1987). Раскрытие цитированных в данном параграфе источников включено здесь в качестве ссылки.

Дополнительные штаммы были получены из таких штаммов дикого типа и образованных с помощью транспозонов мутантов путем химического мутагенеза. Подвергнутые мутагенезу штаммы включают MSU 174, MSU 16H и 25-B1. Штамм, подлежащий мутагенезу, выращивали в среде, содержащей картофельный продукт, после чего разделяли между средами, содержащими 0, 1, 2, 4, 16 или 32 мкг/мл химического мутагена 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидина (NTG или MNNG). Данные клетки затем замораживали для последующего скрининга и селекции.

Мутировавшие клетки отбирали по признаку желаемых условий роста и/или продукции псевдомицина. Подвергнутые химическому мутагенезу клетки P. syringae, такие как мутантный штамм 25-B1, оттаивали и разводили до концентрации 6 клеток/мл в среде N21SM (табл. 1). Данная среда иногда содержала один или более компонентов для селекции, таких как варьирующие концентрации фосфата. Мутировавшие клетки в объеме 50 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета с круглым дном для микротитрования для достижения внесения в среднем 0,3 клетки/лунку. Обычно в каждую лунку добавляли силиконовое масло для сведения испарения к минимуму. Планшеты инкубировали при встряхивании от 6 до 12 дней при 25°C.

Таблица 1

Состав среды N21SM

Ингредиент	Грамм на литр
Глюкоза	20
Сульфат аммония	0,5
Первичный кислый глутамат натрия или L-глутаминовая кислота	2
L-Гистидин	2
Глицин	0,5
Растворимый крахмал	5
KH_2PO_4	0,2
Раствор минеральных солей Czapek	2 мл
Буфер MES	9,8
Доведение pH до 5,0	

После данной инкубации аликвоту, обычно объемом 5 мкл, из каждой лунки последовательно разводили (например, 1:56, 1:196, 1:320, 1:686 и/или 1:1715) и оценивали на активность против Candida albicans в биотесте в жидкостном планшете для микротитрования. Планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи и лунки оценивали на предмет ингибирования роста C. albicans. Штаммы, вызывавшие ингибирование при предельных разведениях (например, 1:320, 1:686 и/или 1:1715), собирали, инокулировали в среду CSM (табл. 2) и выращивали в течение от 1 до 3 дней при 25°C.

Таблица 2

Полная среда для Streptomyces (CSM)

Компонент	Концентрация (г/л)
Глюкоза	5
Мальтоза	4
Триптический соевый бульон Difco	30
Дрожжевой экстракт Difco	3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2
Без доведения pH	

Отобранные штаммы сохраняли и инокулировали в сосуды для ферментации, содержащие 13 мл среды N21SM, и выращивали в течение приблизительно 66 ч при 25°C. Из данной ферментационной смеси отбирали аликвоту, экстрагировали в течение 1 ч равным объемом ацетонитрила, центрифугировали и декантировали для анализа псевдомицинов с помощью ВЭЖХ как описано в примере 1. Штаммы, продуцирующие псевдомицины на подходящем уровне, обычно превышающем 10 мкг/мл, повторно выделяли, повторно ферментировали и подготавливали к выращиванию в большем масштабе.

Среду и условия выращивания также подвергали скринингу на предмет их влияния на выход и распределение псевдомицинов. Одновременно меняли несколько компонентов среды в статистически значимых сериях экспериментов. Эти эксперименты были предназначены для подбора химически определенной среды, не содержащей продукта из картофеля, имеющей определенный уровень фосфата, повышенную прозрачность и обеспечивающей высокую скорость роста P. syringae.

Результаты.

С помощью описанных выше способов было получено множество штаммов, проявляющих высокий уровень продукции псевдомицина, продуцирующих преимущественно только один псевдомицин и/или растущих на минимальной среде. Штаммы, продуцирующие повышенный уровень одного или более псевдомицинов, и распределение псевдомицинов при ферментации в объеме 13 мл представлены в табл. 3. Распределение псевдомицинов и их уровень, полученные с применением среды с картофелем и среды N21SM, представлены для некоторых мутантов на фиг. 2 и 3.

Таблица 3

Штаммы, отобранные для получения псевдомицинов и/или роста на минимальной среде

Штамм	Псевдомицин (мкг/мл) A	B	C	C'	Плотность клеток ($ОП_{600}$)	$\frac{PSA+PSB}{ОП_{600}}$	$\frac{PSB}{PSA}$
30 E3	109	69			0.759	234	0.64
40G11	81	66			0.818	179	0.82
7H9-1	3.3	60.4			0.744	86	18.58
75F8	65	57			0.884	137	0.88
18 E6	111	57			0.855	196	0.51
8 E3	38.47	55.07			0.830	113	1.43
305H8	165.0	48	39	7	0.762	280	0.29
17H9	96	46			0.769	185	0.48
67H1-1	216.9	44.2	39.9	5.8	0.817	320	0.20
49C5	110	43			0.804	190	0.39
67H1	197	42			0.817	293	0.21
67H1-6	225.9	42.1	40.2	4.8	0.791	339	0.19
67H1-6	216.4	41.5	38.6	5	0.797	324	0.19
67H1-1	232.7	38.3	41.7	4.7	0.819	331	0.16
160G8	123.5	38	27	7	0.738	219	0.31
96C8	175.1	38	44	6	0.719	296	0.21
52G11	68	36			0.822	127	0.53
11G3	110	33			0.675	212	0.30
7D11	77.13	32.73			0.706	156	0.42
8B6	72.1	32.3			0.706	148	0.45
16E12	46.4	30	10	5	0.672	113	0.64
11B11	41	29			0.779	89	0.71
49G5	61	29			0.744	121	0.47
288 E11	87.0	28	20	6	0.736	157	0.33
224H8	76.9	26	20	5	0.570	181	0.34
19D3	40	24			0.804	80	0.60
37 E9	33	23			0.776	72	0.68
40B2	56	23			0.420	187	0.40

Штамм	Псевдомицин (мкг/мл) A	B	C	C'	Плотность клеток ($ОП_{600}$)	$\frac{PSA+PSB}{ОП_{600}}$	$\frac{PSB}{PSA}$
13B8	38.1	21.15	9.6		0.676	88	0.56
7D10	50.95	20.4	14.05		0.898	79	0.40
51D2	45	20			0.817	80	0.45
49D1	41	20			0.826	73	0.48
6B7	34.35	18.3	8.55		0.698	75	0.53
17G1	30	17			0.848	55	0.58
159D4	30.6	15	7	2	0.699	65	0.50
1F12	47.7	14.9			0.756	83	0.31
12E 9	64.7	14.3			0.769	103	0.22
41G8	48	14			0.850	73	0.30
37F8	43	14			0.935	60	0.32
218F10	66.0	13	18	1	0.619	128	0.20
45E10	27	13			0.698	58	0.50
7G5	50.2	12.7			0.703	89	0.25
3C11	44.4	12.5			0.895	64	0.28
18C2	29.45	12.45	7.8		0.474	88	0.42
8D6	19.43	11.63			0.783	40	0.60
6D5	2.5	11.5			0.230	61	4.60
3C3	36.0	10.4			0.622	75	0.29
4E 12	27.6	10.3			0.695	54	0.27
25B-1	26.6	10.2					0.38
25B-1	26.5	10.1					0.38
40G2	26	10			0.489	73	0.39
18G1	31	9			0.699	58	0.30
8H3	16	0.45	3.2		0.843	29	0.53
42F2	22	8			0.754	40	0.37

Штамм	Псевдомицин (мкг/мл) A	B	C	C'	Плотность клеток ($ОП_{600}$)	$\frac{PSA+PSB}{ОП_{600}}$	$\frac{PSB}{PSA}$
25B-1	22.63	7.9	6.23				0.35
7A10	21.8	7.7			0.731	40	0.35
102D5	9	8			0.791	21	0.81
11E9	24.85	7.2	5.25		0.561	57	0.29
101 E4	16.0	7	3	0	0.850	27	0.44
18C7	28	7			0.737	48	0.25
25B-1	18.9	6.7					0.36
15E 6	13.05	6.2	3.8		0.391	49	0.48
263H12	13.8	6	4	0	0.832	23	0.40
40D2	32	5			0.866	42	0.14
25B-1	13.53	4.27					0.32
10A4	28.1	4.2			0.190	170	0.15
6B2	8.55	4.1	2.9		0.535	24	0.48
41G6	14	4			0.798	23	0.29
6C1	14.7	4.1			0.726	26	0.28
6A4	25.7	4.0			0.685	43	0.16
7G3	17.2	3.8			0.210	100	0.22
17G10	43.0	3.7			0.341	137	0.09
7C5	15.1	3.6			0.836	22	0.24
11E 1	9.55	3.5	1.6		0.873	15	0.37
97D11	12.4	3	4	0	0.685	23	0.26
16F9	7	3			0.833	12	0.45
40G6	11	3			0.243	57	0.27
19H12	5	3			0.703	11	0.59
6F4	8.0	2.8			0.655	16	0.35
024 E5	14.5	2.5	3.4	0	0.697	24	0.17

Штамм	Псевдомицин (мкг/мл) A	B	C	C'	Плотность клеток ($ОП_{600}$)	$\frac{PSA+PSB}{ОП_{600}}$	$\frac{PSB}{PSA}$
52A3	17	2			0.188	102	0.13
6H4	6.2	1.2			0.307	24	0.19
37B28	8	1			0.749	12	0.15
5H8	8.2	1.2			0.725	13	0.14
97C3	4.9	1	2	0	0.740	8	0.20
9D7	19.07	0.00			0.626	30	0.00
7C11	5.3	0	0		0.709	7	0.00
18H8	10	0	3.1		0.760	13	0.00
11B3	2.75	0	0		0.351	8	0.00
7H10	6.4	0.0			0.205	31	0.00
7B5	5.8	0.0			0.286	20	0.00
6F1	2.6	0.0			0.719	4	0.00
6B12	4.4	0.0			0.467	9	0.00
4C4	8.8	0.0			0.744	12	0.00
3H7	4.2	0.0			0.777	5	0.00
3H6	4.7	0.0			0.727	6	0.00
3G5	7.1	0.0			0.636	11	0.00
3C12	3.1	0.0			0.711	4	0.00
13G11	5.4	0.0			0.887	6	0.00
50G10	9	0			0.526	18	0.00
50F2	12	0			0.651	18	
48F3	11	0			0.585	19	
47C3	2	0			0.123	13	
46H5	8	0			0.375	20	
38 E5	5	0			0.803	6	
12A3	6	0			0.658	10	

Штамм	Псевдомицин (мкг/мл) A	B	C	C'	Плотность клеток ($ОП_{600}$)	$\frac{PSA+PSB}{ОП_{600}}$	$\frac{PSB}{PSA}$
37B11	2.2	0	0	0	0.158	14	
215B1	2.2	0	0	0	0.500	4	
25B-1	8.4	0	3.1				
25B-1	7.6	0	3.1				
269A7	4.6	0	0	0	0.08	58	
7G3	0	0	0		0.729	0	
17C1	0	0	0		0.171	0	
13B10	0	0	0		0.103	0	
10C4	0	0	0		0.682	0	
9B6	0.0	0.0			0.338	0	
7A9	0.0	0.0			0.509	0	
52H7	0	0			0.828	0	
41A6	0	0			0.583	0	
16 E5	0	0			0.224	0	
277H4	0.0	0	0	0	0.123	0	

Выводы.

Раскрытые здесь способы селекции и критерии являются эффективными для получения штаммов P. syringae, которые растут на минимальной среде и продуцируют один или более псевдомицинов на повышенном уровне. Были выявлены некоторые штаммы и условия, которые меняют распределение продуцируемых псевдомицинов. Меньшее количество твердых веществ и повышенная прозрачность мини-

мальной среды обеспечивают более быструю фильтрацию среды и более точное определение клеточной плотности.

Пример 3. Неудачные попытки повышения продукции псевдомицина с применением известных условий культивирования.

Продукция псевдомицина статической или встряхиваемой культурой в сосудах.

В качестве первого этапа в направлении крупномасштабного получения псевдомицинов было необходимо воспроизвести известные лабораторные способы масштабирования для выращивания P. syringae и получения псевдомицинов.

Материалы и способы.

Штамм MSU 16H P. syringae культивировали без встряхивания (статичная или спокойная культура) и во встряхиваемых сосудах в 250 мл сосудах для культивирования в течение 1-10 дней при 25°C с применением питательного раствора, описанного в табл. 4. Данный раствор сходен с тем, который применяли Harrison et al. J. Gen. Microbiol., см. выше. В качестве контроля инокулят P. syringae добавляли в сосуды, содержащие питательные вещества в соответствии с табл. 4, но не содержащие бульон декстрозы картофеля. В дополнительном тесте на питательные вещества из картофеля бульон декстрозы картофеля заменяли средой с глюкозой (20 г/л) и белком картофеля (Alburex) (4 г/л) или средой с глюкозой (20 г/л) и декстрином картофеля (Avebe) (20 г/л). Противогрибковую активность измеряли, как описано в примере 1.

Таблица 4

Бульон декстрозы картофеля плюс добавочная среда (среда PDB)

Компонент	Концентрация
Бульон декстрозы картофеля Difco	24 г/л
Растворимый крахмал	5 г/л
Глицин	1 г/л
Концентрированный раствор минеральных солей Czapek (смотри Таблицу 5)	2 мл/л
Буфер MES	9,8 г/л

Довести pH до 5,0

Таблица 5

Концентрированный раствор минеральных солей Czapek

Компонент	Количество
Часть A	
KCl	100 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100 г
Деионизированная H_2O	900 мл
Часть B	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2 г
HCl (1н)	2 мл
Деионизированная H_2O	98 мл
Медленно добавить часть B к части A; перемешивать до осветвления раствора	

Результаты.

Противогрибковая активность продуцировалась на уровне, указывающем на наличие приблизительно 10,5-29 мкг/мл псевдомицина, когда P. syringae выращивали в среде с бульоном декстрозы картофеля в соответствии с табл. 4. Культуры в статичных сосудах также производили противогрибковую активность, свидетельствующую о содержании псевдомицина в количестве приблизительно 30 мкг/мл при данных условиях, когда бульон декстрозы картофеля заменяли средой с глюкозой и белком картофеля (Alburex) или средой с глюкозой и декстрином картофеля (Avebe). Противогрибковая активность не обнаруживалась в статичных сосудах, культивируемых при данных условиях и с тем же питательным раствором в отсутствие продуктов из картофеля.

В случае инкубации со средой на основе бульона декстрозы картофеля (PDB) динамика продукции псевдомицина указывала на то, что псевдомицины продуцируются как в статичных сосудах (табл. 6), так и в сосудах, встряхиваемых со скоростью 250 об./мин (табл. 7). Во встряхиваемых сосудах продукция псевдомицинов начиналась быстро при инкубации, но псевдомициновые факторы исчезали после повышения pH культуры до величины 7,5 или более. В точке максимальной продукции суммарного псевдомицина в статичной культуре распределение псевдомицинов было следующим: 77% A, 11% B и 12% C.

В точке максимальной продукции суммарного псевдомицина во встряхиваемой культуре распределение псевдомицинов было следующим: 67% A, 24% B и 9% C.

Таблица 6

Временная зависимость продукции псевдомицинов в статичных сосудах, содержащих среду PDB

Инкубационный период (часы)	pH Культуры	Псевдомицины A+B+C (мкг/мл)
0	5,1	0
8	5,9	0
24	5,5	0
48	5,5	4
72	5,6	7
96	5,7	14,5
120	5,5	19,5
168	4,9	21,5
192	4,6	23
312	4,9	29

Таблица 7

Временная зависимость продукции псевдомицинов во встряхиваемых сосудах, содержащих среду PDB

Инкубационный период (часы)	pH Культуры	Псевдомицины A+B+C (мкг/мл)
0	5,1	0
8	5,3	0
24	5,0	4,5
32	4,6	9,0
40	4,9	10,5
48	7,5	6,5
56	7,9	0,5
72	8,3	0,5
80	8,3	0,5

При инкубации со средой декстрина картофеля изучение динамики продукции псевдомицинов показало, что псевдомицины продуцируются как в статичных сосудах, так и во встряхиваемых со скоростью 250 об./мин сосудах (табл. 8). pH доводили до 5,0 и штамм MSU 16H инокулировали в 50-мл порции стерилизованной среды для начального роста. В части встряхиваемых сосудов, содержащих данную среду, величины pH оставались ниже 6,0, и наблюдалась лишь незначительная потеря псевдомицинов. В точке максимальной продукции суммарного псевдомицина в статичной культуре распределение псевдомицинов было следующим: 70% A, 16% B и 14% C. В точке максимальной продукции суммарного псевдомицина во встряхиваемой культуре распределение псевдомицинов было следующим: 62% A, 19% B и 19% c.

Таблица 8

Временная зависимость продукции псевдомицинов во встряхиваемых сосудах, содержащих среду с декстрином картофеля

Инкубационный период (часы)	Псевдо. в статичных сосудах (A+B+C в мкг/мл)	Псевдо. во встряхиваемых сосудах (A+B+C в мкг/мл)
0	0	0
8	0	0
24	11	13,5
48	22,5	15,5
72	28,5	11
96	28,5	10

Выводы.

Для получения псевдомицинов были применены известные лабораторные способы масштабирования. Продукты картофеля являются необходимыми для воспроизведения известного способа получения. Среда, включающая белок картофеля или декстрин картофеля, может заменять бульон декстрозы картофеля.

Продукция псевдомицина статичной или встряхиваемой культурой в баках для ферментации.

В качестве второго этапа крупномасштабного получения псевдомицинов известные лабораторные способы масштабирования для выращивания P. syringae и получения псевдомицинов были опробованы в 150-л баках.

Материалы и способы.

Штамм MSU 16H P. syringae культивировали с или без встряхивания в 150-л ферментере в течение периода времени до 10 дней при 25°C с применением питательного раствора, описанного в табл. 4, pH которого был доведен до 5,2. Встряхивание 150-л бака включало перемешивание со скоростью 75-150 об./мин и барботаж струёй воздуха со скоростью 0,5 SCFM. При проверке альтернативных питательных веществ картофельного происхождения бульон декстрозы картофеля заменяли средой с глюкозой и белком картофеля (Alburex) или средой с глюкозой и декстрином картофеля (Avebe). Противогрибковую активность измеряли, как описано в примере 1.

Результаты.

Культура в баке без перемешивания давала очень небольшой рост P. syringae и неопределимый уровень противогрибковой активности или псевдомицина. Перемешивание 150-л бака с помощью перемешивания при низкой скорости и барботажа с низкой интенсивностью струи воздуха при данных условиях также давали очень небольшой рост P. syringae и неопределимый уровень противогрибковой активности или псевдомицина. Замена среды с глюкозой и белком картофеля (Alburex) или среды с глюкозой и декстрином картофеля (Avebe) на бульон декстрозы картофеля также приводила к небольшому росту P. syringae и неопределимому уровню противогрибковой активности или псевдомицина.

Заключение.

Известные способы статичной культуры для получения псевдомицинов с помощью P. syringae неэффективны при реализации в масштабе 150 л.

Пример 4. Успешное масштабирование продукции псевдомицина с помощью модификации известных условий культивирования и сред.

Исследовали влияние изменений известных условий культивирования P. syringae на продукцию псевдомицина.

Контроль концентрации кислорода.

Материалы и способы.

P. syringae выращивали в 150-л баках с применением условий, описанных в примере 3 со средой из бульона декстрозы картофеля (PDB) и контролем концентрации кислорода. В другом испытании среду по табл. 4 заменяли на альтернативные продукты картофеля, среду из измельченного картофеля (PPM) согласно табл. 9, и контролировали концентрацию кислорода. Измельченный картофель представлял собой Classic Country Style Potato Pearls ® от Basic American Foods.

Контролируемая концентрация растворенного кислорода составляла 30% на протяжении первых 24 ч культивирования, а затем в отдельных партиях снижалась до 5% в оставшиеся 72 ч инкубации. Концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне 5% за счет снижения скорости барботажа или смешивания газа азота с воздухом, барботируемым в бак. Оценивали влияние данных условий на рост штаммов MSU16H и мутантного штамма 25-B1. Измеряли противогрибковую активность и уровень псевдомицина A как описано в примере 1.

Таблица 9

Среда с измельченным картофелем (PPM)

Компонент	Количество
Глюкоза	20 г/л
Измельченный картофель	30 г/л
Растворимый крахмал	5 г/л
Глицин	1 г/л
Раствор минеральных солей Czapek	2 мл/л
Довести pH до 5,2	

Для определения временной динамики продукции псевдомицина в модифицированной среде с измельченным картофелем 150-л ферментер загружали декстрозой (2,3 кг), растворимым крахмалом (575 г), картофельным пюре быстрого приготовления от Basic American Foods Country Style Potato Pearls (3,45 кг), глицином (115 г), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (23 г), KCl (23 г), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,46 г) и 115 л воды. pH доводили до 5,0. Культуру для посева штамма 25-B1 (1,8 л) инокулировали в ферментер с последующей стерилизацией паром и охлаждением. Встряхивание ферментера устанавливали на уровне 150 об./мин, а интенсивность струи воздуха устанавливали на уровне 0,5 SCFM (0,14 vvm.). Перемешивание и воздушный поток автоматически поддерживали во время ферментации на уровне, поддерживающем уровень растворенного кислорода 30% от насыщения. Температуру поддерживали на уровне 25°C. pH Культуры поддерживали на уровне 5,5 или ниже добавлением 30% H_2SO_4.

Для еще большего масштабирования в 1000-л ферментер загружали PDB от Difco (24,0 кг), растворимый крахмал (5,0 кг), глицин (1,0 кг), $MgSO \cdot 7H_2O$ (200 г), KCl (200 г), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (4 г) и 1000 л воды. pH доводили до 5,0. В ферментер инокулировали пятьдесят литров 16-часовой культуры для посева штамма MSU 16H. Температуру поддерживали на уровне 25°C и концентрацию растворенного кислоро-

да поддерживали на уровне 30% насыщения или выше за счет встряхивания и барботирования воздуха. pH Культуры поддерживали таким образом, чтобы он не превышал величину 5,5, посредством добавления 30% H_2SO_4.

Результаты.

При контролируемой концентрации кислорода противогрибковая активность продуцировалась при культивировании в 150-л баке. Контроль кислорода путем добавления газообразного азота в барботаж приводило к повышению уровня псевдомицина. Замена штамма MSU 16H мутантным штаммом P. syringae 25-B1 приводила к приблизительно удвоению как роста микроба, так и выхода противогрибковой активности (табл. 10). Дальнейшее близкое к удвоению роста и выхода получали заменой среды согласно табл. 4 питательной средой согласно табл. 9.

Таблица 10

Продукция псевдомицинов с двумя картофельными средами при контроле уровня кислорода

Штамм	Суммарный титр псевдомицина A[1], мкг/мл			
	PDB с барботированием азотом	PDB без барботирования азотом	PPM с барботированием азотом	PPM без барботирования азотом
MSU 16H	21 (8)	12 (ND)[2]	NT[3]	NT
25-B1	49 (27)	20 (13)	87 (37)	75 (44)

[1]Титры псевдомицина A указаны в скобках

[2]ND обозначает «не определяется»

[3]NT обозначает «не определяли»

Динамика продукции псевдомицина представлена в табл. 11. При объеме 150 л распределение псевдомициновых факторов, продуцируемых в ходе данной ферментации, составляло 79% A, 10% B и 11% C. Фактор C' продуцировался в следовых количествах.

Таблица 11

Динамика продукции псевдомицина в 150-л ферментере, содержащем среду с измельченным картофелем

Истекшее время ферментации (часы)	Псевдомицины A+B+C (мкг/мл)
0	0
8	0
16	17
24	35
32	45
40	41

В 1000-л ферментере получена сходная динамика продукции псевдомицинов (табл. 12).

Таблица 12

Динамика продукции псевдомицина в 1000-л ферментере, содержащем модифицированную среду с декстрозой картофеля

Истекшее время ферментации (часы)	Псевдомицины A+B+C (мкг/мл)
0	0
4	0
16	5,2
28	5,6
40	5,9
52	5,8
76	6,0
100	6,3

Выводы.

Выход псевдомицинов может быть значительно увеличен за счет контроля таких факторов, как концентрация растворенного кислорода, подбор штамма, и дополнительных изменений состава среды.

Добавление липида и дополнительных ингредиентов.

К среде на основе измельченного картофеля в соответствии с табл. 9 добавляли дополнительные ингредиенты для определения их влияния на продукцию псевдомицина.

Материалы и способы.

К среде на основе измельченного картофеля в соответствии с табл. 9 добавляли дополнительные ингредиенты, такие как липид (например, метилмиристат или соевое масло), фосфат, более высокие кон-

центрации глицина, подкормку гидроокисью аммония и подкормку глюкозой (табл. 13). Выращивание клеток проводили, как описано выше. Противогрибковую активность измеряли, как описано в примере 1.

Результаты.

Результаты данных экспериментов представлены ниже в табл. 13.

Таблица 13

Повышенный выход псевдомицина за счет дополнения среды на основе измельченного картофеля

Добавка	Выход псевдомицинов A+B+C (мкг/мл)
нет	80
метилмиристат (1 г/л)	150
глицин (2 г/л)	110
подкормка гидроокисью аммония (10 мл/час)	110
глицин в концентрации 2 г/л и метилмиристат (1 г/л)	160
глицин (4 г/л)	240
подкормка глюкозой (200 мл/час)	80
глицин (4 г/л), метилмиристат в концентрации 1 г/л) и подкормка глюкозой	287
соевое масло (1 г/л)	150
KH_2PO_4 (0,5 г/л)	60

Выводы.

Добавление в среду глицина и метилмиристата значительно повышает продукцию псевдомицинов P. syringae. Благоприятное действие оказывает также подкормка глюкозой.

Пример 5. Глицин и метилмиристат стимулируют продукцию псевдомицинов.

Действие глицина, метилмиристата и некоторых других компонентов на продукцию псевдомицинов оценивали по их способности обеспечивать повышенную продукцию псевдомицинов.

Материалы и способы.

P. syringae выращивали в 50 мл культуральной среды в 250 мл сосудах. Культивирование инициировали инокуляцией P. syringae MSU 16H и поддерживали при 25°C и 70% влажности в течение 7 дней в инкубаторе. В конце инкубационного периода из сосуда отбирали 4 мл бульона и смешивали с 6 мл метанола, содержащего 0,1% фосфорной кислоты. Считается, что низкий pH стабилизирует псевдомицины. Частичковый материал удаляли фильтрацией или центрифугированием, и псевдомицины определяли ВЭЖХ как описано в примере 1.

Примененная в данном исследовании среда представляла собой бульон декстрозы картофеля (PDB, Difco) с концентрацией 24 г/л в стерилизованной воде (контрольная среда); контрольная среда плюс 2 мл/л раствора минеральных солей Czapek; контрольная среда плюс 1 г/л глицина; контрольная среда плюс 1 мл/л метилмиристата (Sigma); контрольная среда плюс 5 г/л растворимого крахмала (Difco); контрольная среда плюс 2 мл/л раствора минеральных солей Czapek, 1 г/л глицина, и 5 г/л растворимого крахмала и контрольная среда плюс 2 мл/л раствора минеральных солей Czapek, 1 г/л глицина, 1 мл/л метилмиристата и 5 г/л растворимого крахмала.

В тот же день ту же среду применяли для выращивания P. syringae во встряхиваемых сосудах в течение 30 ч при условиях, описанных выше, за исключением встряхивания. Сосуды встряхивали со скоростью 250 об./мин.

В другом эксперименте со встряхиваемыми сосудами контрольную среду сравнивали с контрольной средой, включающей глицин и некоторые другие добавки. Клетки выращивали, как описано выше для встряхиваемых сосудов. Примененными средами были контрольная среда; контрольная среда плюс 1 г/л глицина; контрольная среда плюс 1 г/л глицина и 2 мл/л раствора минеральных солей Czapek; контрольная среда плюс 1 г/л глицина и 5 г/л растворимого крахмала; контрольная среда плюс 1 г/л глицина и 1 мл/л метилмиристата; контрольная среда плюс 1 г/л глицина, 2 мл/л раствора минеральных солей Czapek и 5 г/л растворимого крахмала; и контрольная среда плюс 1 г/л глицина, 2 мл/л раствора минеральных солей Czapek, 1 мл/л метилмиристата и 5 г/л растворимого крахмала.

Результаты.

Результаты, полученные с невстряхиваемыми сосудами, представлены на фиг. 3. Контрольной была среда, примененная G. Strobel из штата Монтана для выращивания P. syringae, как описано выше в работе Harrison et al. J. Gen. Microbiol. Чувствительность в определении псевдомицинов в этом эксперименте составляла 1 мкг/мл. На фиг. 3 показано, что известная среда и условия, взятые из работы G. Strobel, обеспечивают продукцию приблизительно 5 мкг/мл псевдомицина A и неопределимого количества псевдомицинов B и C. Добавление к контрольной среде раствора минеральных солей Czapek приводит к не-

большому увеличению продукции псевдомицина А, до приблизительно 6,5 мкг/мл, при неопределимом уровне псевдомицинов В и С. Добавление к контрольной среде 1 г/л глицина ведет к значительному росту продукции псевдомицина А, до приблизительно 10,5 мкг/мл, и измеримой продукции псевдомицина В (2,5 мкг/мл), но при неопределимом уровне псевдомицина С. Добавление к контрольной среде метилмиристата приводит к значительному увеличению продукции псевдомицина А до 8 мкг/мл и определимой продукции приблизительно 1 мкг/мл каждого из псевдомицинов В и С. Добавление к контрольной среде растворимого крахмала вызывает слабое подавление продукции псевдомицина А при неопределимом уровне псевдомицинов В и С. Резкое, превышающее аддитивное повышение продукции псевдомицинов А, В и С наблюдается при применении контрольной среды плюс раствор минеральных солей Czapek, глицин и растворимый крахмал (фиг. 3). Дальнейшее повышение наблюдается при добавлении метилмиристата к контрольной среде плюс раствор минеральных солей Czapek, глицин и растворимый крахмал (фиг. 3). Для невстряхиваемых сосудов каждая величина представляет собой среднее для 3 культур в сосудах.

Как показано на фиг. 4, сходные результаты получены во встряхиваемых сосудах. Но во встряхиваемых сосудах для получения псевдомицина А на уровне, превышающем минимальный, добавление глицина или метилмиристата является необходимым, а сочетание глицина и метилмиристата вызывает резкое, превышающее аддитивное повышение уровня каждого из псевдомицинов А, В и С. Сходные результаты получаются при сочетаниях ингредиентов, показанных на фиг. 6.

Выводы.

В невстряхиваемых сосудах глицин и/или метилмиристат вызывают значительное повышение продукции псевдомицинов А и В. Метилмиристат стимулирует продукцию псевдомицина С. Во встряхиваемых сосудах для значительной продукции псевдомицина А присутствие глицина или метилмиристата является необходимым. Более того, глицин и метилмиристат проявляют синергизм в стимуляции продукции псевдомицинов А, В и С.

Пример 6. Из метиловых эфиров жирных кислот метилмиристат и метилпальмитат стимулируют продукцию псевдомицинов.

P. syringae культивировали в присутствии метиловых эфиров жирных кислот с различной длиной цепи для того, чтобы показать зависимость стимуляции продукции псевдомицина от длины углеродной цепи.

Материалы и способы.

P. syringae культивировали, как описано в примере 5, со встряхиванием в среде, включающей метиловые эфиры жирных кислот в концентрации 0,1% об./об. в контрольной среде бульона декстрозы картофеля плюс 1 г/л глицина, 2 мл/л раствора минеральных солей Czapek, 5 г/л растворимого крахмала при pH 5,0. Псевдомицины определяли ВЭЖХ, как описано в примере 1.

Результаты.

На фиг. 6 показаны результаты, полученные при инкубации P. syringae с метиловыми эфирами жирных кислот с углеродными цепями с четным количеством углеродных атомов длиной от 6 до 22. В присутствии метиловых эфиров жирных кислот, содержащих в своих цепях от 6 до 12 или от 18 до 22 углеродных атомов, псевдомицины продуцировались на уровне, сходном с полученным в примере 5 при инкубации без метилмиристата (фиг. 6). Значительное повышение продукции псевдомицина наблюдалось для цепей с 14 и 16 углеродными атомами. Метилмиристат является метиловым эфиром жирной кислоты с 14 углеродными атомами. Каждый из метиловых эфиров жирных кислот с 14 и 16 углеродными атомами значительно повышал продукцию каждого из псевдомицинов А, В и С.

Выводы.

Среди исследованных метиловых эфиров жирных кислот метилмиристат вызывает продукцию наибольшего количества псевдомицинов при применении штамма MSU 16H. Примечательно, что присоединенная к пептидному кольцу псевдомицинов жирная цепь содержит 14 атомов углерода. Это позволяет предполагать, что добавляемый метилмиристат может служить в качестве предшественника псевдомицинов.

Пример 7. Процедуры для получения псевдомицинов в масштабе бака со средой, включающей продукт из картофеля.

Для получения псевдомицинов с помощью выращивания P. syringae в масштабе 150 л и 5000 л в среде, содержащей продукт из картофеля, может быть применена среда, разработанная согласно примерам 4 и 5.

Получение с применение 150-л бака для ферментации.

Материалы и способы.

Сосуды для вегетативной стадии, содержащие полную среду для стрептомицетов (CSM, табл. 2), инокулировали замороженной культурой P. syringae и встряхивали со скоростью 250 об./мин и при 25°C в течение 24 ч. Через 24 ч инкубации сосудов вегетативной стадии содержимое этих сосудов инокулировали в сосуды стадии bump. Сосуды стадии bump, содержащие среду CSM, вращали со скоростью 250 об./мин при 25°C. Сосуды стадии bump инокулировали приблизительно 0,45 мл объединенной культуры из трех или четырех сосудов вегетативной стадии. Сосуды стадии bump обычно содержат приблизитель-

но 900 мл CSM в неперегороженном 2,5 л сосуде Tunair™. Для каждого ферментера готовили две культуры стадии bump в сосудах Tunair™. Сосуды стадии bump инкубировали в течение 16 ч.

После этого две культуры стадии bump (1,8 л) объединяли в устройстве для инокуляции. Эти объединенные культуры применяли для инокуляции 115 л среды, описанной в табл. 9, в которую дополнительно добавляли 3 г/л (при конечной концентрации 4 г/л) глицина и 1 г/л масла сои. Данные культуры большого масштаба выращивали при 25°C в течение от трех до четырех дней. Во время этого периода роста концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне 30% от насыщения воздухом за счет встряхивания и контроля воздушной струи. pH поддерживали на уровне 5,2 ± 0,2 добавлением серной кислоты или гидроокиси натрия по мере необходимости. Через восемнадцать часов после начала культивирования в большом масштабе начинали подкормку глюкозой со скоростью 200 мл/ч. Через 20 ч после начала культивирования в большом масштабе начинали подкормку гидроокисью аммония со скоростью 20 мл/ч. Во время данного культивирования выпускное давление газа составляло 5 psig (34,45 кн/м^2). Исходные параметры соответствовали 150 об./мин для встряхивания и 0,5 scfm для воздушного потока. При необходимости добавляли также противопенный агент. Спустя период от трех до четырех дней культивирования в большом масштабе собирали P. syringae. Противогрибковую активность измеряли, как описано в примере 1.

Результаты.

На фиг. 8 и 9 представлены профили нескольких различных параметров ферментации в цикле, проведенном в соответствии с данной процедурой.

Выводы.

С помощью данного способа можно получать псевдомицины в значительных и коммерчески оправданных количествах.

Получение с применением 5000-л бака для ферментации.

Способы, примененные для успешного получения псевдомицинов в масштабе 150 л, были дополнительно масштабированы до 5000 л.

Материалы и способы.

Инокулянт P. syringae готовили, как описано для ферментера в масштабе 150 л. Условия соответствовали описанным выше с модификациями, как описано в табл. 14. Было проведено четыре испытания, из которых первые три были дублированы асептическим переносом инокулированного бульона в стерильный 150-литровый бак. Данные дублирующие циклы служили для исключения различий в составе питательных веществ и стерилизации при сравнении производительности в 150-л и 5000-л ферментерах. Противогрибковую активность измеряли, как описано в примере 1.

Результаты.

В табл. 14 суммированы результаты, полученные в масштабе 5000 л, и проведено их сравнение с дублирующими циклами. Титры в 5000-л баке, по существу, совпадали с полученными в 150-л баке за исключением испытания 1. В испытании 1 встряхивание в 5000-л баке сначала было установлено на уровне 150 об./мин, а затем через 36 ч снижено до 50 об./мин. Уровень клеточного роста составил лишь одну треть от наблюдаемого в дублирующем 150-л баке, а титр псевдомицина A равнялся одной четверти от выявляемого в дублирующем баке. Снижение скорости встряхивания 5000-л бака до 25 об./мин (исходная установка) в последующих испытаниях обеспечивало клеточный рост и титры псевдомицина, сравнимые с наблюдаемыми в дополнительных и отдельном циклах в 150-л баках. Результаты позволяют полагать, что штамм 25-B1 P. syringae чувствителен к смещению.

Таблица 14

Результаты увеличения масштаба до 5000-литрового ферментера (м.д.)

Испытание	5000-л партия	Титр[1]	Дополнительная партия	Титр	Комментарии
1	055CE 7	12	313CA7	45	4 г/л глицина, 0,1 г/л метилмиристата, без контроля pH, без подкормки; в 5000-л баке: высокое DO_2, снижение встряхивания со 150 до 50 об/мин через 36 ч
2	060CE	89	318CA7	77	То же, что и при испытании 1,

	7				но среда включала 1 г/л метилмиристата; в 5000-л баке: встряхивание при 25 об/мин, DO_2 контролировали на уровне 30%
3	063CE 7	50	332CA7	44	Среда как для испытания 1, но включающая 10 г/л измельченного картофеля и карамелизованный бульон. После быстрого падения pH повышали до 5,5 через 24 ч с помощью NH_4OH
4	068CE 7	120	Не получали	135	pH контролировали на уровне 5,2 с помощью NaOH и подкормки гидроокисью аммония, подкармливали также глюкозой, среда как для испытания 1, за исключением наличия в среде масла сои вместо метилмиристата

[1]Титр показывает уровень псевдомицина А в мкг/мл.

Для подкормки ферментеров глюкозой применяли 80% вес/об. раствор глюкозы, а для подкормки аммонием применяли 58% вес/вес раствор гидроокиси аммония.

Выводы.

С помощью данного способа можно получать псевдомицины в значительных и коммерчески оправданных количествах в масштабе 5000 л.

Пример 8. Крупномасштабное выращивание P. syringae и получение псевдомицинов в среде без продуктов из картофеля.

Ферментация P. syringae в среде N21, которая не включает какой-либо из продуктов из картофеля, использованных в средах, описанных в предшествующих примерах, обеспечивает продукцию псевдомицинов на уровне, пригодном для выделения граммовых количеств.

Продукция псевдомицинов во встряхиваемых сосудах со средой N21.

Материалы и способы.

P. syringae культивировали при условиях, описанных в примере 5, за исключением того, что среда не содержала продуктов из картофеля. Эта среда, известная как среда N21, имеет состав, представленный в табл. 15. Для определения действия метилмиристата на продукцию псевдомицина метилмиристат добавляли в концентрации 0,2%.

Таблица 15

Состав среды N21

Ингредиент	Грамм на литр
Сахароза	35
Сульфат аммония	0,5
Первичный кислый глутамат натрия	2
L-Гистидин	2
Глицин	0,5
Растворимый крахмал	5
KH_2PO_4	0,2
Раствор минеральных солей Czapek	2 мл
Дрожжевой экстракт	1
Буфер MES	9,8
Довести pH до 5,2	

Продуцирование псевдомицина несколькими штаммами P. syringae оценивали с применением среды N21 с метилмиристатом или без него. Оцениваемыми штаммами P. syringae были MSU 16H, 25-B1, 67H1 и 7H9-1.

Результаты.

Результаты изучения продуцирования псевдомицинов различными штаммами P. syringae в присутствии или в отсутствие метилмиристата представлены в табл. 16 и на фиг. 9. Эти результаты показывают, что штамм 67H1 продуцирует большее количество каждого из псевдомицинов как в присутствии, так и в отсутствие метилмиристата. Штамм 7H9-1 отличается продукцией псевдомицина B на значительно большем уровне, чем псевдомицина A или C. Метилмиристат стимулировал продукцию псевдомицина каждым из штаммов.

Таблица 16

Продукция псевдомицинов несколькими штаммами P. syringae в присутствии или в отсутствие метилмиристата

Штамм	Метилмиристат	Псевдомицин A мкг/мл	Псевдомицин B мкг/мл	Псевдомицин C мкг/мл
MSU 16 H	-	59	19	12
25-B1	-	66	50	15
67H1	-	334	173	83
7H9-1	-	3	110	0
MSU 16H	+	126	45	27
25-B1	+	154	123	36
67H1	+	390	207	95
7H9-1	+	8,5	222	4,5

Выводы.

Различные штаммы P. syringae продуцируют коммерчески значимые количества псевдомицинов в среде без продуктов из картофеля, и эта продукция стимулируется метилмиристатом.

Продукция псевдомицинов в масштабе 5000 л с применением среды N21.

Способы получения псевдомицинов с применением среды без добавленных продуктов из картофеля были масштабированы до уровня 5000 л.

Материалы и способы.

Продукцию превдомицинов в 5000-л ферментере осуществляли, как описано в примере 7, за исключением того, что примененной средой была среда N21 (табл. 15). К среде N21 добавляли дрожжевой экстракт в концентрации 1 г/л. Примененным штаммом был P. syringae 67H1.

Результаты.

Средние величины из десяти испытаний с 5000-л ферментером представлены в табл. 17.

Таблица 17

Профиль средних количеств псевдомицинов, полученных в десяти циклах с 5000-л ферментером.

Псевдомицин	мкг/мл при сборе
A	243
B	203
C	71
C'	40

Выводы.

Псевдомицины A, B, C и C' можно получать в коммерчески значительных количествах в масштабе 5000 л с применением среды без добавленных продуктов из картофеля.

Пример 9. Дальнейшее упрощение среды для продукции псевдомицинов.

Ферментация P. syringae в среде N21SM приводила к успешной продукции псевдомицинов в отсутствие продуктов из картофеля. Среда на основе N21SM, но лишенная некоторых из ее ингредиентов, также поддерживает продукцию псевдомицинов на значительном уровне.

Материалы и способы.

P. syringae культивировали во встряхиваемых сосудах при условиях, описанных в примере 5, за исключением того, что среда представляла собой описанное ниже. Основа среды, известная как среда CNP, имеет состав, представленный в табл. 18. Добавки проверяли при концентрациях и в сочетаниях, перечисленных ниже (табл. 18).

Таблица 18

Состав среды CNP

Ингредиент	Количество
Глюкоза	20 г/л
KH_2PO_4	0,41 г/л
Раствор минеральных солей Czapek	2 мл
Буфер MES	9,8 г/л
Сульфат аммония	1 г/л
Довести pH до 5,2	

Добавки к среде CNP	
Глутамат	2 г/л
Глицин	0,5 г/л
L-Гистидин	2 г/л
Растворимый крахмал	5 г/л
Дрожжевой экстракт	1 г/л

Продукцию псевдомицинов несколькими штаммами P. syringae оценивали с применением среды CNP с одной или более добавками. Одним из изученных штаммов P. syringae был штамм 25-B1.

Результаты.

Результаты изучения продукции псевдомицинов P. syringae в присутствии или в отсутствие добавок представлены в табл. 19.

Таблица 19

Продукция псевдомицинов P. syringae в среде CNP в присутствии или в отсутствие добавок

		Псевдомицин (мкг/мл)			
Добавка	$ОП_{600}$	A	B	C	C'
Нет	0,221	0	0	0	0
	0,222	0	0	0	0
Глутамат	0,943	82,6	16,3	24,5	5,9
	0,94	87	16,7	25,7	6
Глицин	0,628	0	0	0	0
	0,567	0	0	0	0
Гистидин	0,331	0	0	0	0
	0,354	0	0	0	0
Глутамат, глицин и гистидин	0,984	153	41	44	12
	0,98	149	40	42	12
Глутамат, глицин, гистидин и растворимый крахмал	0,985	134	29	34	9
	0,996	125	34	35	11
Растворимый крахмал	0,28	0	0	0	0
	0,289	0	0	0	0
Дрожжевой экстракт	0,441	40	6	11	2
	0,449	39	6	11	2
Глутамат, глицин, гистидин, растворимый крахмал и дрожжевой экстракт	0,998	215	52	55	17
	1,001	197	52	56	19

Выводы.

Для выращивания P. syringae и продукции коммерчески значительных количеств псевдомицинов могут быть применены различные минимальные среды.

Пример 10. Продукция псевдомицинов A' и B'.

Были разработаны способы ферментации для продукции псевдомицина A' и/или B' в бульоне ферментации штамма Pseudomonas syringae.

Материалы и способы.

Подготовка инокулята: аликвоту клеток, хранившихся в фазе паров жидкого азота, оттаивали и использовали для инокуляции 900-мл порций бульона CSM. Бульон CSM состоял из, г/л: декстрозы - 5, мальтозы - 4, триптического бульона из сои от Difco - 30, дрожжевого экстракта Difco - 3 и $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ - 2. Приблизительно 0,5 мл клеток использовали для инокуляции каждой 900-мл порции среды, содержащейся в двухлитровом сосуде. Сосуды инкубировали при встряхивании в течение 24 ч при 25°C. Содержимое двух сосудов объединяли для инокуляции 150-литрового ферментера, содержащего 115 л стерильного бульона ферментации.

Стадия ферментации: бульон ферментации состоял из, г/л: декстрозы - 20, растворимого крахмала - 5, быстро раздавленного картофеля от Basic American Foods Country Style Potato Pearls - 30, глицина -1, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ - 0,2, KCl - 0,2 и $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ - 0,004 в водопроводной воде. pH доводили до 5,2 перед стерилизацией. Ферментацию проводили при 25°C в течение 68 ч. Растворенный кислород поддерживали на уровне 30% или выше от насыщения воздухом за счет непрерывного контроля воздушного потока и скорости встряхивания импеллером. pH поддерживали между 4,0 и 5,4 посредством добавления либо H_2SO_4, либо NaOH.

Вариации периодических способов: было также найдено, что несколько вариаций простого периодического процесса вызывают продукцию псевдомицинов A' и /или B'. Декстрозу можно подавать в ферментеры, начиная с 24 ч после исходной инокуляции, со скоростью 60 мл/ч. Подкормка может продолжаться в течение всего срока ферментации. В другом варианте применяли процесс, при котором растворенный кислород поддерживается на уровне 5% от насыщения воздухом, начиная с 24 ч после инокуляции, и это продолжается до конца периода ферментации. Поддержание растворенного кислорода на уровне 5% достигалось путем добавления инертного газообразного азота (N_2) к источнику воздуха, подключенного к ферментеру. Во всех случаях газ поступал через единственную погруженную распыляющую трубу с отверстием, расположенным чуть ниже турбины встряхивателя на дне ферментера.

Результаты и выводы.

Продукцию псевдомицина A' и/или B' обеспечивают несколько способов ферментации P. syringae.

Выделение и очистка псевдомицинов A' и B'.

Были разработаны способы выделения и очистки псевдомицинов A' и B' из бульона ферментации штамма Pseudomonas syringae.

Материалы и способы.

После сбора цельный бульон ферментации (4×100 л) фильтровали через керамический фильтр Membralox (0,45 мкм) для получения фильтрата (фракция A) и твердого сгустка (фракция B). Фракцию B (135 л) экстрагировали равным объемом ацетона, содержащего 0,1% ТФУ, в течение 120 мин и давали отстояться. Осветленный ацетоновый экстракт отделяли фильтрацией и затем упаривали под вакуумом для получения водного раствора, фракции C (88 л). Сначала на уравновешенную водой колонку (10 л) смолы HP20ss наносили фракцию A и колонку промывали 15% ацетонитрилом, содержащим 0,1% ТФУ (20 л). После этого на ту же колонку наносили фракцию C и колонку промывали 20 л 15% ацетонитрилом, содержащим 0,1% ТФУ, как описано выше.

После этого колонку элюировали линейным градиентом 15-20% ацетонитрила, содержащего 0,1% ТФУ, в течение 30 мин и 20-35% ацетонитрила, содержащего 0,1% ТФУ, в течение 60 мин со скоростью потока 1 л/мин. Собирали фракции по одному литру. Фракции 6-9 объединяли (4 л) для получения фракции D (24 г). Часть фракции D (≈1 г) хроматографировали на колонку с обращенной фазой (Dynamax C_{18} 41,4 × 250 мм) с применением в качестве подвижной фазы смеси триэтиламмоний-фосфатный буфер (pH 3)-ацетонитрил-метанол (градиентное элюирование от 65:17:18 до 30:35:35 в течение 45 мин со скоростью потока 40 мл/мин). Соответствующие фракции объединяли, объем снижали до 75 мл и повторно хроматографировали на колонке C_{18} как указано выше градиентом от 80:10:10 до 46:27:27 для получения фракции E (113 мг) и фракции F (116 мг). Последующая хроматография фракций E и F на колонке C_{18} (Dynamax 21,4 × 250 мм) дала 45 мг псевдомицина A' и 62 мг псевдомицина B' соответственно.

Результаты и выводы.

Способы ВЭЖХ, сходные с применявшимися для очистки других псевдомицинов, обеспечили очистку псевдомицинов A' и B' из бульона ферментации.

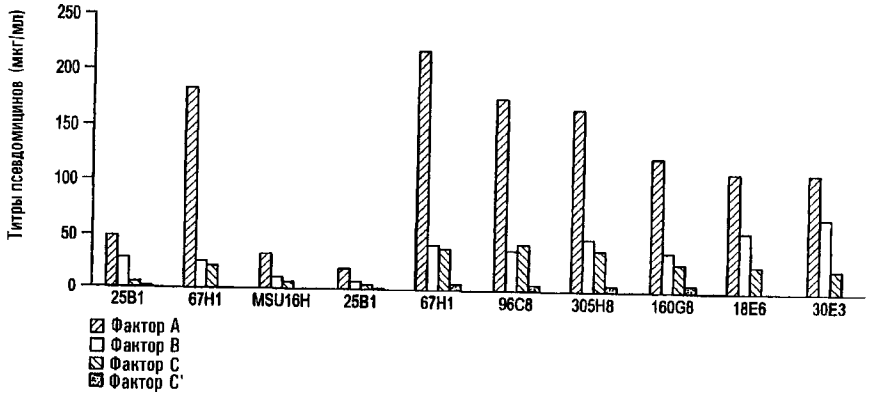
Изобретение было описано со ссылкой на различные частные и предпочтительные осуществления и способы. Следует, однако, понимать, что многие вариации и модификации могут быть произведены в пределах существа и объема изобретения. Все публикации и патентные заявки в данном описании указывают на уровень традиционной техники, к которой относится данное изобретение.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

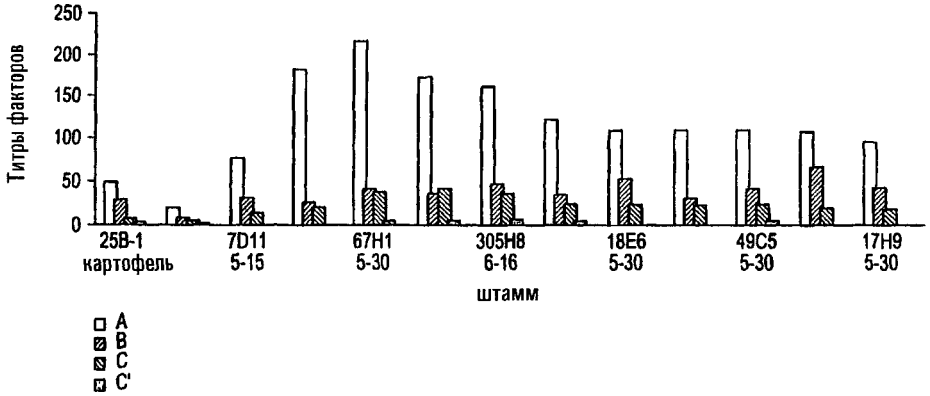
1. Штамм бактерий Pseudomonas syringae 25-B1 (ATCC PTA-1622), продуцирующий один или более псевдомицинов в количестве, превышающем приблизительно 10 мкг/мл.

2. Штамм бактерий Pseudomonas syringae 67H1 (ATCC PTA-1621), продуцирующий один или более псевдомицинов в количестве, превышающем приблизительно 10 мкг/мл.

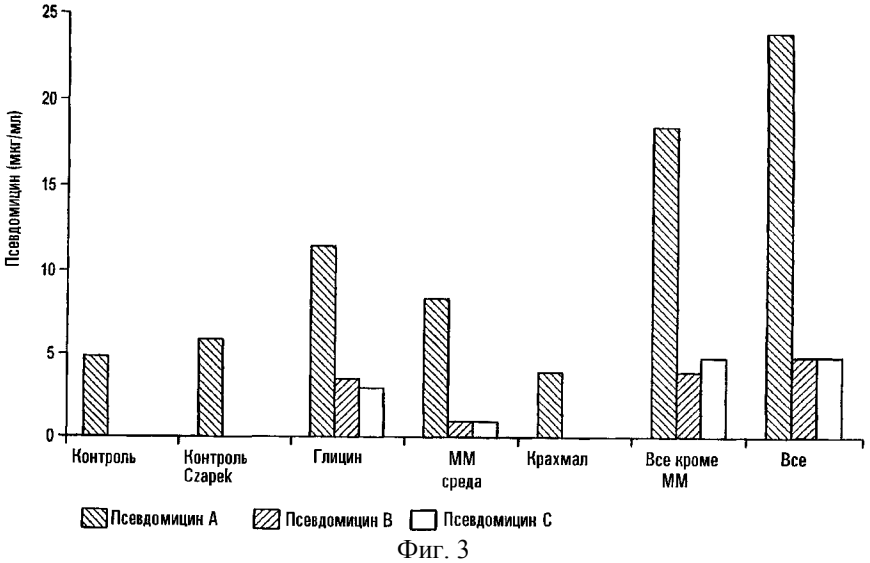
3. Штамм бактерий Pseudomonas syringae 7H9-1 (ATCC PTA-1623), продуцирующий один или более псевдомицинов в количестве, превышающем приблизительно 10 мкг/мл.



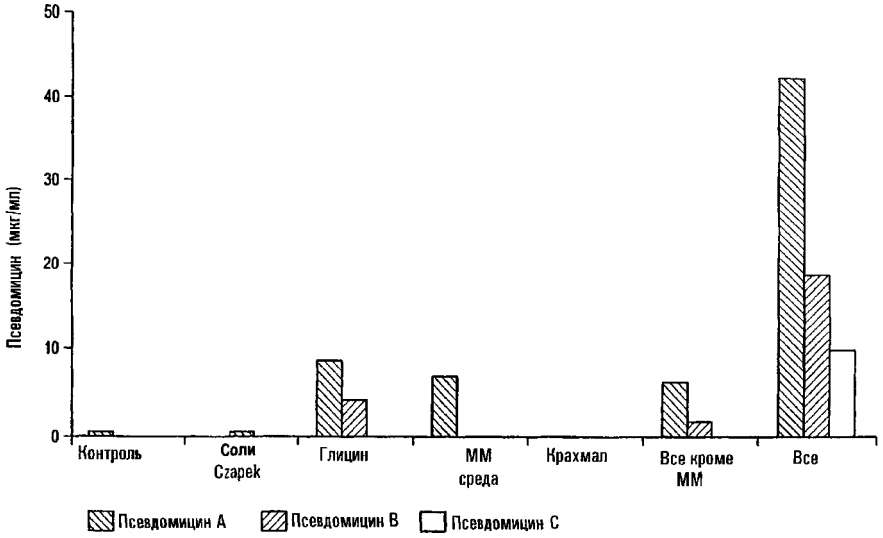
Фиг. 1



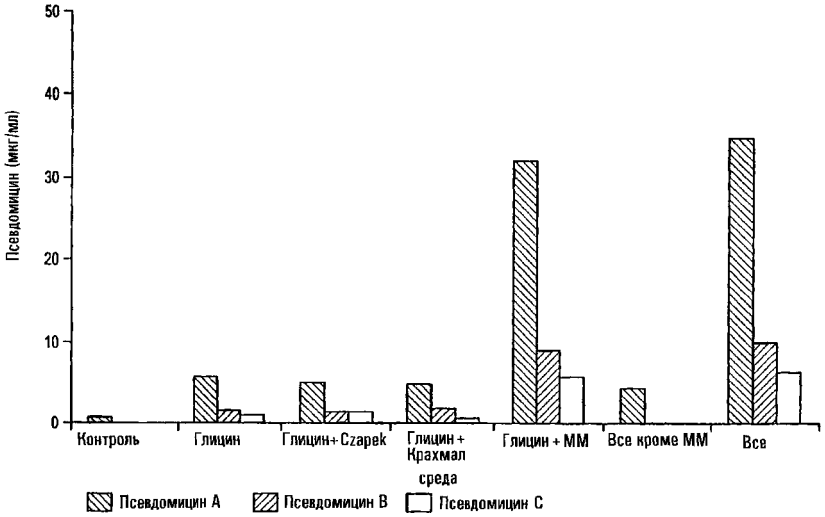
Фиг. 2



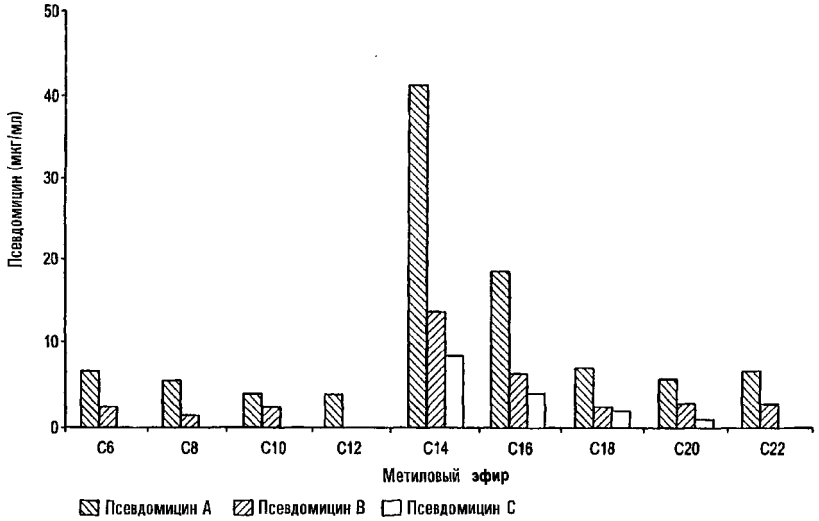
Фиг. 3



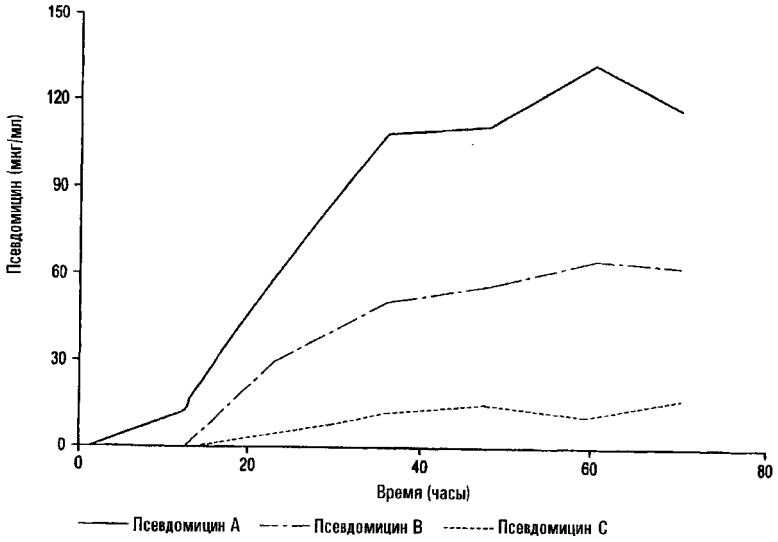
Фиг. 4



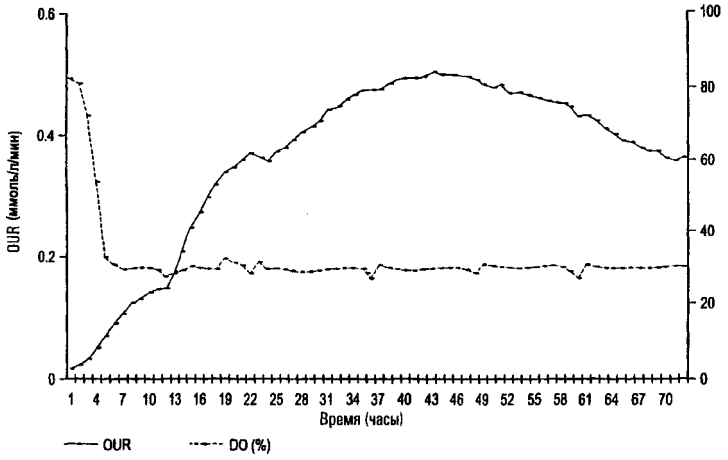
Фиг. 5



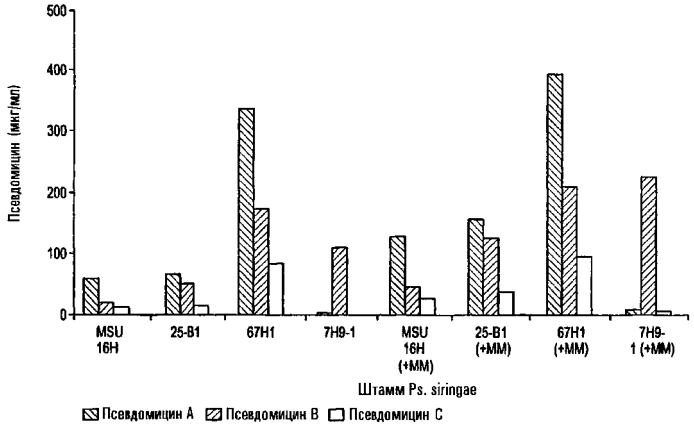
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9