(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(21) Broj prijave: HR P20010576A A2

HR P20010576A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.[7]: **C 12 P 17/16**
C 12 P 17/02
C 12 N 1/20

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 31.07.2001.
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.08.2002.
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US00/02880
Datum podnošenja međunarodne prijave 03.02.2000.
(87) Broj međunarodne objave: WO 00/46389
Datum međunarodne objave 10.08.2000.

(31) Broj prve prijave: 60/118,457
60/137,334
(32) Datum podnošenja prve prijave: 03.02.1999.
03.06.1999.
(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
US

(71) Podnositelj prijave: **Biogal Gyogyszergyar Rt., Pallagi 13, 4042 Debrecen, HU**
(72) Izumitelji: **Karoly Albrecht, 44, Mexikol ut, 1145 Budapest, HU**
Gabor Balogh, 11 Santha Kalman u., 4042 Debrecen, HU
Istvan Barta, 10, Kassal u., 1142 Budapest, HU
Janos Erdei, 8, Andahazi u., 4042 Debrecen, HU
Eva Gulyas, 50, Kishegyesi u., 4042 Debrecen, HU
Ildiko Lang, 13, Izabella u., 1077 Budapest, HU
Aniko Tegdes, 11, Vizimolnar u., 1031 Budapest, HU
Valeria Szell, 25/a, Avar u., 1123 Budapest, HU
Istvan Szabo, 11, Bertalan L. u., 1111 Budapest, HU
Magdolna Petroczki, 8, Nyllvesszo u., 1154 Budapest, HU
Jullianna Mozes Nee Suto, 56, Borso u., 1173 Budapest, HU
(74) Punomoćnik: Damir MIJATOVIĆ, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **POSTUPAK ZA PRIPREMU ANTIBIOTIKA PSEUDOMONSKE KISELINE A MIKROBIOLOŠKOM METODOM**

(57) Sažetak: Postupak za pripremu pseudomonske kiseline A uključuje submerzni uzgoj soja bakterije Pseudomonas, sposobnog za biosintezu u osnovi čiste pseudomonske kiseline A fermentacijom u aerobnim uvjetima; prikazana je također izolacija željenog spoja. Osobito, prikazani postupak je naznačen time što uključuje uzgoj bakterije Pseudomonas sp., soja No. 19/26, pohranjenog pod pristupnim brojem No. NCAIM(P)B 001235 u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama, Budimpešta, Mađarska, ili njegovog mutanta ili varijanta koji proizvodi pseudomonsku kiselinu A, na mediju pri temperaturi između oko 20°C i 30°C, koji sadrži izvore organskog dušika i ugljika i, prema prilici, mineralne soli.

HR P20010576A A2

OPIS IZUMA

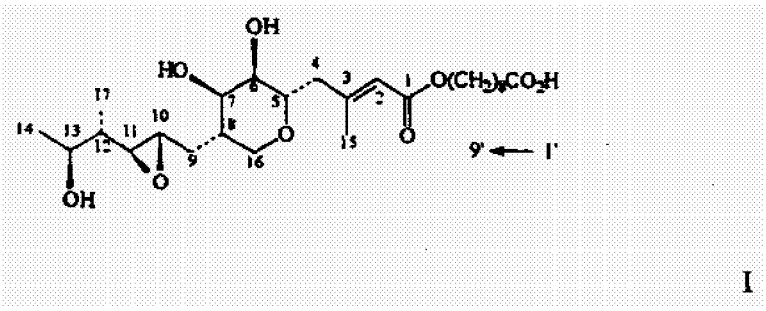
Područje izuma

Ovaj je izum naznačen mikrobiološkom metodom za proizvodnju antibiotika pseudomonska kiselina A (mupirocin).

Osnova izuma

Pseudomonska kiselina A, također poznata kao mupirocin, je antibiotik sa inhibicijskini djelovanjem na rast uglavnom Gram pozitivnih bakterija (npr. *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae)* i nekih Gram negativnih bakterija (npr. *Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae)* [A. Ward, D. M. Campoli-Richards, Drugs 32, 425-444 (1986)] i njegova je inhibicijska koncentracija u rasponu 0.02-0.5 mg/dm^3. Pseudomonska kiselina, inhibirajući enzim izoleucin-tRNA sintazu, utječe na sintezu peptida patogenih bakterija [J. Hughes i G. Mellows, Biochem. J. 191, 209-219 (1980)]. Prednost ovog antibiotika jest da ima nisku toksičnost kako za ljude tako i za životinje i da daje negativan Ames-ov test. Pseudomonska kiselina A se trenutno koristi u humanoj terapiji, u različitim pripravcima, za liječenje kožnih infekcija (npr. impetigo, pyoderma), infekcija nosa i vanjskog uha, akni, opekotina, ekcema, psorijaze, u slučaju ulceracije pri sekundarnim infekcijama, i za prevenciju bolničkih infekcija.

Kemijska struktura pseudomonske kiseline A je utvrđena kao 9-{4[5S(2S,3S-epoksi-5S-hidroksi-4S-metilheksil)-3R,4R-dihidroksi-tetrahidropiran-2S-il]-3-metilbut-2(E)-enoiloksi}nonanska kiselina [E. B. Chain i G. Mellows, J. C. S. Chem. Comm. 847-848 (1974); R. G. Alexander, J. P. Clayton, K. Luk, N. H. Rogers, T. J. King, J. C. S. Perkin I. 561-565 (1978)], kao stoje prikazano formulom (1):



I

Poznato je da *Pseudomonas fluorescens* proizvodi pseudomonsku kiselinu. Prema Britanskom patentu br. 1,395,907, soj *Pseudomonas fluorescens* NCIB 10586 sposoban je sintetizirati kompleks pseudomonske kiseline koji se sastoji od pseudomonske kiseline A i njezinog izomera koji sadrži dvostruku vezu u cis položaju između ugljikovih atoma C2 i C3, te pseudomonske kiseline B. Omjer komponenti je 4.5 : 4.5 : 1. Prema Japanskoj patentnoj prijavi No. 52-70083, međutim, *Pseudomonas fluorescens* Y-11633 soj ima mogućnost sinteze kompleksa pseudomonske kiseline koji se sastoji od pseudomonske kiseline A, pseudomonske kiseline B i drugih dviju komponenti nepoznate strukture u omjeru 9 : 0.5 : 0.5.

Sažetak izuma

Ovaj je izum naznačen time što uključuje postupak pripreme pseudomonske kiseline A obuhvaćajući uzgoj na podlozi koja sadrži najmanje jedan organski izvor dušika i ugljika, u submerznim aerobnim uvjetima, soj bakterije *Pseudomonas* koji može proizvesti pseudomonsku kiselinu, kao i fermentaciju kulture *Pseudomonasa* tako da se sintetizira pseudomonska kiselina A. Poželjno je soj *Pseudomonas* bakterije soj *Pseudomonas* sp. No. 19/26 pohranjen pod oznakom No. NCAIM(P)B 001235 u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama, Budimpešta, Mađarska, ili njegov mutant ili varijant koji proizvodi pseudomonsku kiselinu.

Ovaj je izum također usmjeren na *Pseudomonas* kulturu sposobnu da sintetizira pseudomonsku kiselinu A u submerznim aeriranim uvjetima, koja se u osnovi sastoji od nove bakterije *Pseudomonas* sp., soj No. 19/26.

Izum je također usmjeren na biološki čistu kulturu novog soja bakterije *Pseudomonas* sp. No. 19/26.

Kratki opis crteža

Slika 1. prikazuje HPLC kromatogram kompleksa pseudomonske kiseline proizvedenog pomoću *Pseudomonas* sp. No. 19/26 [NCAIM(P)B 001235].

Detaljan opis izuma

Tijekom traženja bakterije koje proizvode antimikrobne antibiotike, izolirano je 20.000 mikroorganizama na hranjivom agarnom mediju koji je sadržavao 10 g/mL candicina i 5 g/mL cycloheximida kako bi se spriječio rast gljiva.

Antibakterijski učinak izoliranih bakterijskih sojeva iz kulture u tikvici na tresilici ispitivan je na različitim Gram pozitivnim i Gram negativnim mikroorganizmima, kao i njihovim varijantama rezistentnim na antibiotike koji je pojavljuju u liječničkoj praksi. Primjenom test-mikroorganizama rezistentnih na antibiotike željeli smo potaći prepoznavanje antibakterijskih antibiotika sa novim načinom djelovanja.

Tijekom gore opisanih istraživanja odabran je izolat bakterije označen kao "soj No. 19/26". Originalnoj, ovaj je organizam dobiven iz uzorka tla prikupljenog u Argentini. Bujon sa njegovom kulturom imao je značajan antibiotski učinak na *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphyloccocus aureus* SMITH, penicilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* 1110, nenumerirani *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus piogenes* A 115 ROBB, *Alcaligenes faecalis* 140001, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, meticillin- i aminoglukozid-rezistentni *Staphylococcus aureus* MRSA 119OR i dva nenumerirana soja *Mycoplasma pneumoniae,* odnosno *Haemophilus influenzae.* Kasnije je antibakterijski produkt metabolizma soja No. 19/26 izoliran iz bujona sa kulturom i kemijskom strukturnom analizom je nađen spoj identičan pseudomonskoj kiselini A.

Istovremeno ovaj odabrani soj bakterije koji proizvodi pseudomonsku kiselinu podvrgnut je taksonomskim istraživanjima. Prvo je provedeno preliminarno komparativno istraživanje sa odabranim usko srodnim sojevima bakterija primjenom opreme Bio-Mrieux ATB Expression sa DD 32 GN trakom. Ovo je prikladno za relativno brzu (npr. generički nivo) taksonomsku identifikaciju danog nepoznatog soja bakterije ako njegova dijagnostička svojstva pokazuju fenetičku sličnost dovoljno visokog stupnja sa najmanje jednim od autentičnih sojeva koji su uključeni u bazu podataka ugrađenu u opremu. Spektar izvora ugljika koji se mogu koristiti pri istraživanju nepoznatog bakterijskog soja moguće je odrediti sa ovom opremom u 32 testa sa 14 različitih šećera odnosno 14 organskih kiselina, dodatkom u minimalnu podlogu upotpunjenu smjesom faktora rasta. Evaluacija rezultata testa provedena je nakon inokulacije i 48 satne inkubacije automatskim mjerenjem turbiditeta razvijenih mikrokultura, označavajući intenzitet rasta kao +, odnosno -, odnosno ?. Rezultati usporedno provedenih biokemijskih testova obrađeni su programskom podrškom opreme. Dobiveni fiziološko-biokemijski podaci o soju No. 19/26 bili su u korelaciji sa onima za sojeve bakterija koji su navedeni u bazi podataka (ukupan broj takvih sojeva je u ovom slučaju 114, od kojih 14 pripada različitim *Pseudomonas* vrstama: *Pseudomonas aeruginosa I* i *II, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas fluorescens I* i *II, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas mesophilica, Pseudomonas pickettii, Pseudomonas pseudomallei, Pseudomonas vesicularis, Pseudomona scepacia, Pseudomonas diminuta, Pseudomonas putida i Pseudomonas stutzerf).* Temeljem rezultata ovog pokusa korelacije, pokazalo se da soj No. 19/26 pripada rodu *Pseudomonas.*

Nakon uspješne identifikacije na nivou roda, soj No. 19/26 pokušali smo identificirati na nivou vrste pomoću klasičnih taksonomskih metoda istraživanja.

Kultura soja No. 19/26 mogu se razmnožavati na odgovarajućim čvrstim podlogama u obliku nesporulirajućih Gram negativnih štapića, 0.6 - 1.1 prema 1.3 - 4.0 mikrona. Ovi su aktivno pokretni sa polarnim bičevima. Ovi obligatni aerobni kemoorganotrofhi štapići mogu napasti glukozu samo oksidativno. Oni ne mogu fermentirati i nisu u mogućnosti disati sa nitratima kao konačnim akceptorima elektrona, ali pokazuju pozitivnu katalaznu reakciju. Ne razvijaju vidljive kolonije na jednostavnim sintetskim medijima i za razmnožavanju trebaju faktore rasta. Kolonije izrasle pri optimalnim uvjetima su arginindihidrolaza pozitivne, proizvode fluorescentne pigmente, ali prisustvo i nakupljanje poli-β-hidroksibuturata u stanicama ne može se detektirati.

Daljnja svojstva soja No. 19/26 su slijedeća: rast njegovih kolonija nije uočen na 41°C; ne proizvodi levan iz saharoze, ne hidrolizira želatinu ili škrob, oksidaza pozitivan je i ne koristi glukozu, 2-keto-glukonat, trehalozu i mezo-inozitol kao jedini izvor ugljika.

Sva ova dijagnostička svojstva jasno razdvajaju *Pseudomonas* soj No. 19/26 od vrsta *P. aeruginosa, P. syringae, P. viridiflava, P. cichorii, P. stutzeri, P. mendocina, P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes* i P. *putida.* Uzgoj soja No. 19/26 može se provesti samo na podlogama pripremljenim sa dodatkom (0.2 - 1.0 %) kvaščevog ekstrakta, kukuruznog ekstrakta ili ostalih kompleksnih prirodnih hranjiva koja sadrže vrlo raznolike čimbenike rasta.

Na osnovi ovih posebnih dijagnostičkih svojstava soj No. 19/26 može se smatrati organizmom koji pripada takozvanim "netipičnim Pseudomonas vrstama". Takve "netipične Pseudomonas vrste" mogu se u budućnosti uključiti u novo postavljenu bakterijsku taksonomiju (N. J. Palleroni, "Pseudomonaceae", Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, l, 141-219, ed.: N. R. Krieg i J. G. Holt, Baltimore: Wiliams and Wilkins, 1984).

Soj No. 19/26 pohranjen je 16. srpnja 1996 pod ulaznim brojem NCAIM(P)B 001235 u Nacionalnoj zbirci

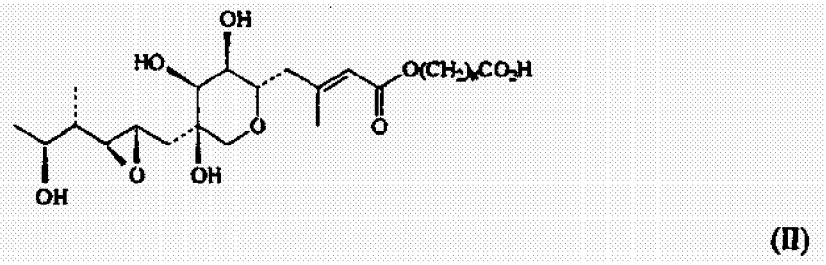
poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama, Budimpešta, Mađarska.

Prema preferiranoj metodi izuma *Pseudomonas* sp., bakterijski soj No. 19/26 pohranjen pod ulaznim brojem No. NCAIM(P)B 001235 koristi se za proizvodnju u osnovi čiste pseudomonske kiseline A. Odabrani soj može koristiti pepton, goveđi ekstrakt, kukuruzni ekstrakt, kvaščev ekstrakt, kazein i podlogu od soje kao izvor dušika. Pored navedenih izvora dušika, izvori ugljika kao glukoza, glicerol i suncokretovo ulje mogu se koristiti u različitim kombinacijama.

Iako komponente podloge prirodnog podrijetla sadrže mineralne soli, korisno je dodati neke mineralne sole (npr. amonijeve, kalcijeve, željezove, cinkove, bakrove, magnezijeve, natrijeve ili kalijeve soli) u podlogu za uzgoj inokuluma. Magnezijev sulfat, manganov klorid, željezov sulfat, cinkov klorid, bakrov(II) sulfat, amonijev sulfat, kalijev dihidrogenfosfat, natrijev klorid i kalcijev karbonat su preporučeni.

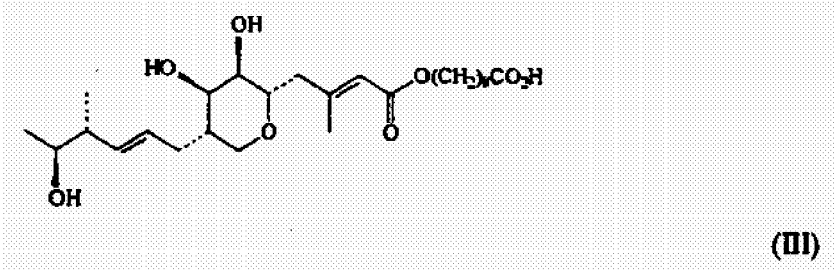
Održavanje soja provodi se na kosom agaru koji sadrži pepton-kazein pri 4°C, precjepljivanjem svaka dva tjedna. Da bi se održala sposobnost proizvodnje pseudomonske kiseline A, soj može biti pohranjen kako dubokim zamrzavanjem kulture, tako i u liofiliziranom obliku.

Za vrijeme fermentacije, *Pseudomonas* sp. No. 19/26 soj je nacijepljen u odgovarajuću podlogu i uzgajan submerzbo u aerobnim uvjetima fermentacije. pH podloge za uzgoj poželjno je podesiti na vrijednost neutralnog (pH = oko 7.0), temperatura uzgoja je oko 20°C i oko 30°C, preporučljivo između oko 24°C i oko 26°C. Ovisno o uvjetima fermentacije maksimalna vrijednost proizvodnje antibiotika može se postići nakon 50-60 sati. Kompleks pseudomonske kiseline nastao tijekom fermentacije uključuje u osnovi čistu pseudomonsku kiselinu A, iako kao rezultat biosinteze mogu nastati manje količine pseudomonske kiseline B prikazane formulom (II)



(II)

i pseudomonske kiseline C prikazane formulom (III).



(III)

Antibakterijska aktivnost antibiotskog kompleksa pseudomonske kiseline određen je mikrobnom metodom difuzije u agaru. Podloga je goveđi ekstrakt-pepton-glukozni agar čiji je pH 6.5 a test organizam je *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Vrijednost za aktivnost dobivena mikrobiološkom metodom predstavlja u prvom redu količinu pseudomonske kiseline A, budući je količina ostalih komponenti pseudomonske kiseline mala, i u usporedbi sa komponentom A, njihova specifična aktivnost prema test mikroorganizmu - posebno u slučaju komponente B - je osjetno manja.

Tijekom fermentacije točna količina pseudomonske kiseline A i pratećih manjih komponenti u fermentacijskom bujonu određena je kromatografijom visoke moći razlučivanja (HPLC), analizom supernatanta dobivenog nakon ultrazvučne obrade i centrifugiranja uzorka bujona razrijeđenog etanolom na dvostruko (aparatura: pumpa LKB 2248, UV detektor LKB 2141 (analiza na 222 nm), kolona Nucleosil C_8 10 μm (BST), eluent smjesa (35:65) acetonitrila i 0.1 M otopine $NH_4H_2PO_4$ (pH 5.0), protok 1.2 mL/min). Vremena retencije: pseudomonska kiselina A (PSA) 8.5 min, pseudomonska kiselina B (PSB) 6.0 min i pseudomonska kiselina C (PSC) 22.5 min.

HPLC kromatogram antibiotskog kompleksa pseudomonske kiseline sintetiziranog pomoću soja *Pseudomonas* sp. No. 19/26 može se vidjeti na Sl. 1. Ovaj kromatogram pokazuje da je kompleks pseudomonske kiseline dobiven fermentacijom kiseline sojem No. 19/26 u osnovi čista pseudomonska kiselina A. Ukupna količina komponenti pseudomonske kiseline B i pseudomonske kiseline C manja je od 5 %. Na taj način postaje očito da je soj *Pseudomonas*

sp. No. 19/26 sposoban sintetizirati antibiotik mnogo povoljnijeg sastava, nego ranije objavljeni sojevi *Pseudomonas fluorescens* koji proizvode kompleks pseudomonske kiseline. Ova je činjenica prednost za industrijsku proizvodnju.

Postupak prema prikazanom izumu prikazan je slijedećim primjerom. Naravno, neće se smatrati daje ovaj izum time ograničen.

Primjer

Soj *Pseudomonas* sp. No. 19/26 održavan je na PC A kosom agaru. Sastav PC A podloge bio je slijedeći:

goveđi ekstrakt	3 g
pepton	5 g
agar	15 g

razrijeđeno destiliranom vodom na 1000 mL. pH podloge bio je 7.0 - 7.2.

Zasijani kosi agar inkubiran je pri 25°C kroz 24 sata i stanice su suspendirane u 5 mL normalne fiziološke otopine (broj stanica u suspenziji: 10^9 - 10^{10}/mL). 1 mL dobivene suspenzije nasađen je u 100 mL podloge za uzgoj sa oznakom 1-21, sterilizirane u Erlenmeyerovoj tikvici od 500 mL. Sastav 1-21 podloge bio je slijedeći:

glukoza	10 g
glicerol	5 g
kukuruzni likvor	3 g
amonijev sulfat	2 g
kalijev dihidrogen fosfat	0.4 g
magnezijev sulfat-voda (1:7)	0.4 g
manganov klorid-voda (1:2)	0.03 g
kalcijev karbonat	4 g
suncokretovo ulje	2 g

razrijeđeno do 1000 mL vodovodnom vodom. pH podloge podešen je na 7.0 prije sterilizacije.

Tikvica sa podlogom za inokulum tresla se na tresilici (260 o/min, amplituda 10 cm) pri 25°C kroz 18 do 20 sati. Nakon toga 50 mL (1 %) uzgojene kulture nacijepljeno je u 5 litara podloge sa oznakom E-5 sterilizirane pri 121°C kroz 45 minuta u fermentoru od 10 L. Sastav podloge E-5 bio je slijedeći:

glukoza*	50 g
glicerol	50 g
sojino brašno	100 g
kukuruzni likvor	15 g
natrijev klorid	25 g
kalcijev karbonat	25 g
suncokretovo ulje	10 g

razrijeđeno do 5 L vodovodnom vodom. (*Glukoza je sterilizirana u 50 %-tnoj otopini 30 min i dodana u podlogu zajedno sa inokulumom.) pH podloge podešen je na 7.0 prije sterilizacije.

Uzgoj je proveden uz miješanje i aeraciju kroz 50 do 60 sati. Temperatura uzgoja bila je 25°C, brzina miješanja 500 o/min, brzina protoka zraka bila je 200 L/sat. Kao otpjenjivač korišteno je suncokretovo ulje u minimalnim količinama (oko 20-30 mL po fermentoru).

Biosinteza kompleksa pseudomonske kiseline započela je između 8 i 10 sata, a najviša koncentracija antibiotika utvrđena je između 55 i 60 sata uzgoja.

Izolacija pseudomonske kiseline A iz fermentacijskog bujona provedena je kako slijedi. Nakon završetka fermentacije, 4.5 litre dobivenog bujona kulture je centrifugirano, pH supernatanta (4.06 litara) je podešen na 4.5 razrijeđenom (20 %-tnom) sulfatnom kiselinom. Zakiseljeni likvor je tada dva puta ekstrahiran sa 2.03 litre etil acetata. Faze su odvojene i centrifugiranjem postignuta oštra granica emulzivnih organskih faza. Spojeni ekstrakti su upareni u vakuumu. Dobiveni sirovi produkt (2.45 g) je otopljen u 25 mL smjese kloroform:metanol:99.5 %-tna octena kiselina (93:5:2) i dobivena otopina je nanesena na kolonu (visina : promjer = 28.5) priređenu sa 245 g Silikagela 60 (veličina čestica: 0.06663 -0.2 mm; Reanal) i sa gore spomenutom smjesom otapala. Elucija je provedena sa spomenutom smjesom otapala. Tijekom elucije sakupljane su frakcije po 50 mL i sadržaj pseudomonske kiseline A u frakcijama je analiziran pomoću tankoslojne kromatografije primjenom Silikagela 60 (DC-alufolije, 105554, Merck) kao adsorbenta i smjese otapala kloroform:metanol:99.5 %-tna octena kiselina (90 : 8 : 2) kao razvijača. Frakcije 34-50 eluirane sa Silikagel 60 kolone sadržavale su pseudomonsku kiselinu. Ove su frakcije spojene (850 mL) i dodano je 280 mL u međuvremenu ohlađene vode. Nakon toga pH otopljene smjese je podešen na 4.5 pomoću 1 N vodene otopine natrij hidroksida. Organska otopina je odvojena od vodene faze, nakon čega je vodena faza ponovo ekstrahirana sa 280 mL kloroforma. Spojeni ekstrakt je uparen u vakuumu i tako se može dobiti čista pseudomonska kiselina A.

Frakcije 14-15 sa kromatografije na koloni sadržavale su pseudomonsku kiselinu C, dok je frakcija 54 sadržavala pseudomonsku kiselinu B, odakle se ove manje komponente mogu dobiti u čistom obliku gore opisanim postupkom.

Spektroskopska karakterizacija izoliranih komponenti pseudomonske kiseline opisana je primjenom sistema numeriranja strukturne formule (I), prikazane gore.

Spektroskopska karakterizacija pseudomonske kiseline A:
Ultraljubičasti spektar (10 μg/mL, u otopini 95 %-tnog etanola): λ_{max} = 222 nm

$$E_{1cm}^{1\%} = 303.6$$

Infracrveni spektar (KBr): ν_{OH} 3483 i 3306, $\nu_{c=0}$ 1728 ($COOCH_2$), 1720 (COOH) cm^{-1}
^{1}H-NMR spektar ($CDCl_3$.δ_{TMS}=0):

δ [ppm] (integral.) mnogostrukost	Konstanta vezanja (Hz)	oznaka
5.75 (1H)q	$^4J_{2.15}$ = 1.1	2-H
4.08 (2H)t	$^3J_{8',9'}$ = 6.4	9'-H_2
3.72-3.93 (4H)m		5-H; 7-H; 13-H; 16-H_a
3.55 (1H)dd	$^2J_{16a,16b}$ = 11.8; $^3J_{16b,8}$ = 2.6	16-H_b
3.48 (1H)dd	$^3J_{5,6}$ = 8.4; $^3J_{6,7}$ = 3.2	6-H
2.82 (1H)td	$^3J_{9,10}$ = 6.3; $^3J_{10,11}$ = 2.3	10-H
2.74 (1H)dd	$^3J_{10,11}$ = 2.3; $^3J_{11,12}$ = 7.8	11-H
2.60 (1H)dd	$^2J_{4a,4b}$ = 14.5; $^3J_{4a,5}$ = 2.7	4-Ha
2.28-2.36 (3H)m		4-H_b; 2'-H_2
2.20 (3H)d	$^4J_{2,15}$ = 1.1	15-H_3
2.02 (1H)m		8-H
1.61-1.76 (6H)m		9-H_2; 3'-H_2; 8'-H_2
1.33-1.43 (9H)m		12-H, 4'-H_2; 5'-H2; 6'-H_2; 7-H_2
1.22(3H)	$^3J_{13,14}$ = 6.4	14-H_3
0.94 (3H)d	$^3J_{12,17}$ = 7.0	17-H_3

^{13}C-NMR spektar ($CDCl_3$ otopina, δ_{TMS} = 0):

δ [ppm]	Oznaka	8 [ppm]	Oznaka
177.8s	C-1'	42.7t,d	C-4, C- 12
166.9s	C-1	39.4d	C-8
156.0s	C-3	33.9t,t	C-9, C-2'
117.7d	C-2	31.6t	C-4'*
74.9d	C-5	28.9t	C-5'*
71.4d	C-13	28.8t	C-6'*
70.4d	C-7	28.5t	C-8'*
69.0d	C-6	25.9t	C-7'
65.3t	C-16	24.6t	C-3'
63.91	C-9'	20.8q	C-14
61.3d	C-11	19.1q	C-15
55.6d	C-10	12.7q	C-17

*zamjenjive oznake

Kemijsko-ionizacijski (CI) maseni spektar:
Karakteristični spektralni podaci:

m/z	R.I. *(%)*	Oznaka
501	100	$[M+H]^+$
327	45	$[M+H\text{-}HO/CH_2/_8COOH]^+$
309	16	$[m/z\ 327\text{-}H_2O]^-$
227	33	$[C_{12}H_{19}O_4]$

Spektroskopska karakterizacija pseudomonske kiseline B:
Ultraljubičasti spektar (10 μg/mL, u otopini 95%-tnog etanola): λ_{max} = 222 nm

$E_{1cm}^{1\%} = 280$

Infracrveni spektar (KBr): ν_{OH} 3418, ν_c=0 1713 ($COOCH_2$), 1720 (COOH) cm^{-1}
^{1}H-NMR spektar ($CDCl_3$.δ_{TMS}=0):

δ [ppm] (integral.) višestrukost	Konstanta vezanja (Hz)	Oznaka
5.68 (1H)s		2-H
4.02 (2H)t	$^3J_{8',9'}$ = 6.6	9'-H_2
3.7 (2H)m		7-H, 13-H
3.55 (1H)td	$^3J_{4a,5}$ = $^3J_{5,6}$ = 9.3; $^3J_{4b,5}$ = 1.8	5-H
3.41 (2H)dd	$^2J_{16a,16b}$ = 11.O	16-H_2
3.24(1H)dd	$^3J_{5,6}$=9.3; $^3J_{6,7}$=2.8	6-H
2.92 (1H)td	$^3J_{9,10}$ = 5.6; $^3J_{10,11}$ = 2.0	10-H
2.69 (1H)dd	$^3J_{10,11}$ = 2.0; $^3J_{11,12}$ = 7.2	11-H
2.62 (1H)dd	$^2J_{4a,4b}$ = 14.5; $^3J_{4a,5}$ = 1.9	4-H_a
2.20 (2H)t	$^3J_{2',3'}$ = 7.4	2'-H_2
2.14(3H)br.s		15-H_3
2.10(1H)dd	$^2J_{4a,4b}$ = 14.5; $^3J_{4b,5}$ = 9.3	4-Hb
1.85(1H)dd	$^2J_{9a,9b}$ = 14.3; $^3J_{9a,10}$ = 5.3	9-Ha
1.20-1. 68 (14H)m		9-H_b; 12-H; 3'-H_2; 4'-H_2; 5'H_2; 6'-H_2; 7'-H_2; 8'-H_2
1.14(3H)d	$^3J_{13,14}$ = 6.4	14-H_3
0.88 (3H)d	$^3J_{12,17}$	17-H_3

Kemijsko-ionizacijski (Cl) maseni spektar:
karakteristični spektralni podaci:

m/z	R.I. (%)	Oznaka
517	100	$[M+H]^+$
343	70	$[M+H-HO/CH_2/_8COOH]^+$

Spektroskopska karakterizacija pseudomonske kiseline C:
Ultraljubičasti spektar (10μg/mL, u otopini 95 %-tnog etanola): λ_{max} = 222 nm

$$E_{1cm}^{1\%} = 307$$

Infracrveni spektar (film): ν_{OII} 3435, $\nu_{c=0}$ 1713 ($COOCH_2$, COOH) cm^{-1}
^{1}H-NMR spektar ($CDCl_3$ δ_{TMS}=0):

δ [ppm] (integral.) višestrukost	Konstanta vezanja (Hz)	Oznaka
5.69 (1H)s		2-H
5.25-5.50 (2H)m		10-H; 11-H
4.00 (2H)t	$^3J_{8',9'}$=6.5	9'-H_2
3.88 (1H)dd	$^3J_{6,7}$=^{3}J=3,0	7-H
3.78 (1H)dd	$^2J_{16a,16b}$=11.8; $^3J_{16a,8}$=2.6	16-H_a
3.68 (1H)dd	$^3J_{4b,5}$=2.5; $^3J_{5,6}$=9.0	5-H
3.55 (1H)qd	$^3J_{12,13}$=$^3J_{13,14}$=6.3	13-H
3.49 (1H)dd	$^2J_{16a,16b}$=11.8; $^3J_{16b,8}$=2.0	16-H_b
3.41 (1H)dd	$^3J_{5,6}$=9.0; $^3J_{6,7}$=3.0	6-H
2.58 (1H)dd	$^2J_{4a,4b}$=13.8; $J_{4a,5}$=2.5	4-H_a
2.20 (2H)t	$^3J_{2',3'}$=7.4	2'-H_2
2.00-2.30 (4H)m		4-H_b;9-H_2;12-H
2.10(3H)m		15-H_3
1.78(1H)m		8-H
1.45-1.65 (4H)m		3'-H_2,8'-H_2
1.1 5-1.35 (8H)m		4'-H_2; 5'-H_3; 6'-H_2; 7'-H_2
1.08(3H)d	$^3J_{13,14}$=6.3	14-H_3
0.92 (3H)d	$^3J_{12,17}$=6.8	17-H_3

Kemijsko-ionizacijski (CI) maseni spektar:
Karakteristični spektralni podaci:

m/z	R.I- (%)	Oznaka
485	30	$[M+H]^+$
287	60	$[M+H\text{-}HO/CH_2/_8COOH]^+$

Iako su ovdje opisane određene preferirane izvedbe izuma, biti će razumljivo upućenima u struku kojima je izum namijenjen, da je moguće načiniti određene promjene i modifikacije opisane primjene bez udaljavanja od biti i djelokruga izuma. Prema tome, namjera je da izum bude ograničen samo do potrebnog stupnja prema postavljenim zahtjevima i važećim zakonskim propisima.

PATENTNI ZAHTJEVI

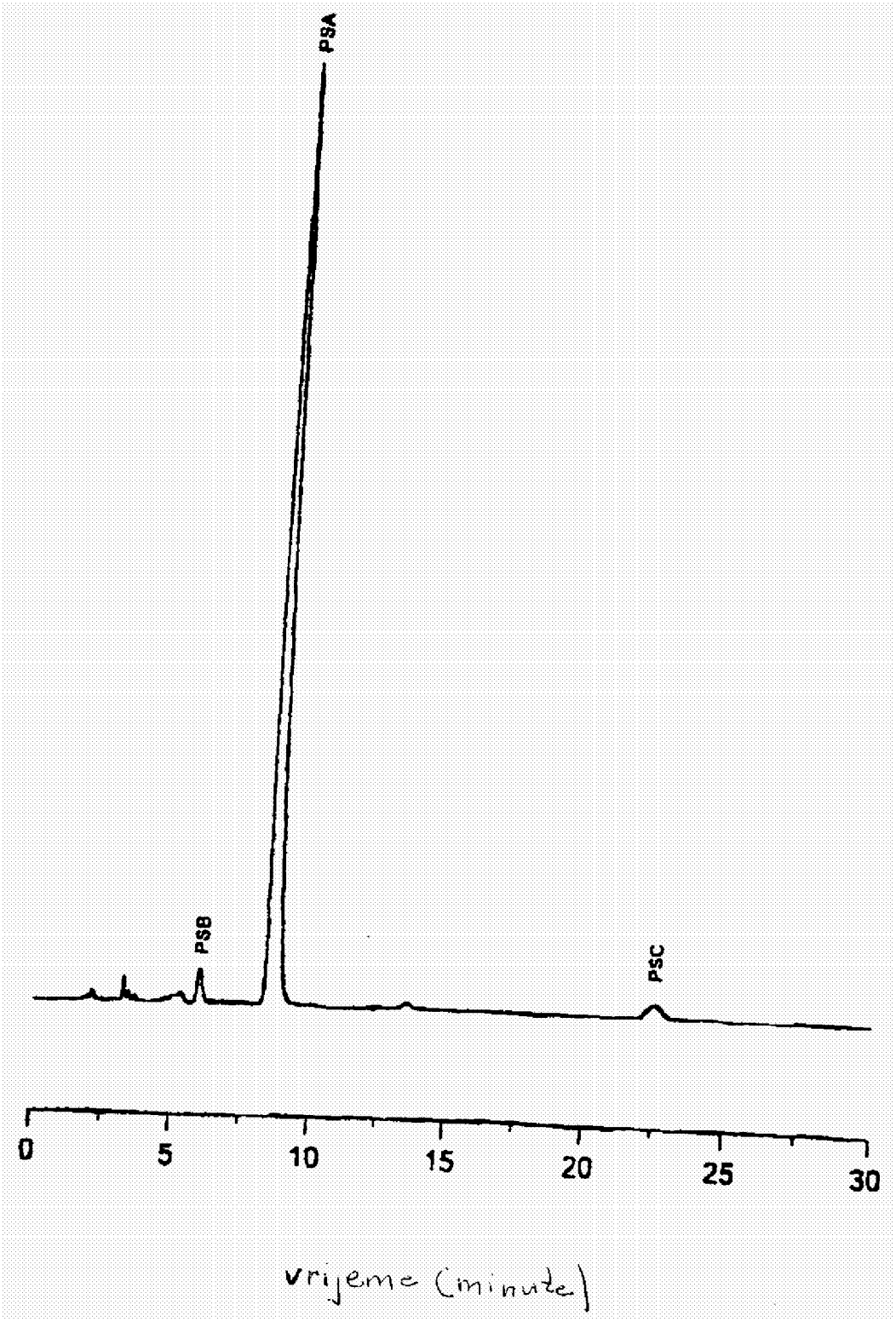
Mi tražimo pravo na:

1. Postupak proizvodnje pseudomonske kiseline A **naznačen time** što uključuje korake:
   - uzgoja na podlozi koja sadrži najmanje jedan izvor organskog dušika ili ugljika, u submerznim aerobnim uvjetima, bakterije *Pseudomonas* soja koja ima sposobnost biosinteze pseudomonske kiseline A i
   - fermentaciju kulture *Pseudomonas* tako da nastaje pseudomonska kiselina A

   gdje je spomenuta *Pseudomonas* bakterija soj bakterije *Pseudomonas* sp. No. 19/26 pohranjen pod brojem No. NCAIM(P)B 001235 u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama, Budimpešta, Mađarska.
2. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time** što je spomenuti soj *Pseudomonas* bakterije mutant ili varijanta bakterije *Pseudomonas* sp. soja No. 19/26 pohranjenog pod brojem No. NCAIM(P)B 001235 u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama, Budimpešta, Mađarska.
3. Postupak prema zahtjevu 1. **naznačen time** što dalje uključuje korak izolacije pseudomonske kiseline A.
4. Postupak prema zahtjevu 1. **naznačen time** što je najmanje jedan izvor organskog dušika ili ugljika odabran iz grupe koju čine glukoza, glicerol, suncokretovo ulje, kazein, sojino brašno, pepton, goveđi ekstrakt, kukuruzni ekstrakt i kvaščev ekstrakt.
5. Postupak prema zahtjevu 1. **naznačen time** što podloga sadrži najmanje jednu mineralnu sol.
6. Postupak prema zahtjevu 5. **naznačen time** što je najmanje jedna mineralna sol odabrana iz grupe koju čine amonijeve, kalcijeve, željezove, bakrove, magnezijeve, manganove, natrijeve i kalijeve soli, ili njihove smjese.
7. Postupak prema zahtjevu 6. **naznačen time** što ja najmanje jedna mineralna sol odabrana iz grupe koju čine amonijev sulfat, kalcijev karbonat, željezov sulfat, cinkov klorid, bakrov II sulfat, magnezijev sulfat, manganov klorid, natrijev klorid i kalijev dihidrogen fosfat, i njihove smjese.
8. Postupak prema zahtjevu 1. **naznačen time** što je fermentacija provedena na temperaturi između oko 20°C i oko 30°C.
9. Postupak prema zahtjevu 8., **naznačen time** što je spomenuta fermentacija provedena na temperaturi između oko 24°C i oko 26°C.
10. Pseudomonas kultura sposobna za biosintezu pseudomonske kiseline A u submerznim aerobnim uvjetima, sastojeći se u osnovi od novog soja bakterije *Pseudomonas* sp, No. 19/26, pohranjenog pod brojem No. NCAIM(P)B 001235 u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama, Budimpešta, Mađarska.
11. Biološki čista kultura novog soja bakterije *Pseudomonas* sp, No. 19/26, pohranjenog pod brojem No. NCAIM(P)B 001235 u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama, Budimpešta, Mađarska.

SAŽETAK

Postupak za pripremu pseudomonske kiseline A uključuje submerzni uzgoj soja bakterije *Pseudomonas,* sposobnog za biosintezu u osnovi čiste pseudomonske kiseline A fermentacijom u aerobnim uvjetima; prikazana je također izolacija željenog spoja. Osobito, prikazani postupak je naznačen time što uključuje uzgoj bakterije *Pseudomonas* sp., soja No. 19/26, pohranjenog pod pristupnim brojem No. NCAIM(P)B 001235 u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama, Budimpešta, Mađarska, ili njegovog mutanta ili varijanta koji proizvodi pseudomonsku kiselinu A, na mediju pri temperaturi između oko 20°C i 30°C, koji sadrži izvore organskog dušika i ugljika i, prema prilici, mineralne soli.


PSA
PSB
PSC
0
5
10
15
20
25
30
vrijeme (minute)