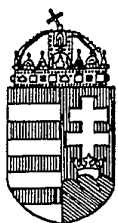


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 567 B

(21) A bejelentés száma: 1266/87
(22) A bejelentés napja: 1987. 03. 20.
(30) Elsőbbségi adatok:
842 330 1986. 03. 21. US
890 670 1986. 07. 25. US
(83) Letétbe helyezés: NRRL B-18043; NRRL B-18044;
NRRL B-18045; NRRL B-18046; NRRL B-18047

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/67

C 12 N 15/76

C 12 P 19/62

(40) A közzététel napja: 1987. 11. 30.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 01. 28. SZKV 92/01

(72) Feltalálók:

Cox, Karen Leigh, Martinsville, Indiana (US)

Fishman, Scott Eric, Indianapolis, Indiana (US)

Hershberger, Charles Lee, New Palestine, Indiana (US)

* Seno, Eugene Thomas, Indianapolis, Indiana (US)

(73) Szabadalmaz:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana (US)

(54) Eljárás fokozott antibiotikum termelő mikroorganizmusok előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás antibiotikum, antibiotikum-előanyag vagy az antibiotikum gyógyászati szempontból elfogadható sójának előállítására, melynek során az antibiotikumot vagy előanyagát termelő mikroorganizmust az adott antibiotikum bioszintézisút enzimeinek vagy sebességkorlátozó enzimének DNS génszakaszát hordozó vektorral transzformálják, a transzformált mikroorganizmust asszimilálható szénforrást, nitrogénforrást és szervesen sokat tartalmazó táptalajon aerob körülmények között tenyésztik, és az említett antibiotikum bioszintézisgént a mikroorganizmus megnövelt antibiotikum-termelő képességét biztosító fermentációs körülmények között kifejezik.

HU 204 567 B

A találmány tárgya új eljárás antibiotikumot előállító mikroorganizmus antibiotikum-termelő képességének fokozására. Az eljárás magában foglalja a gazdamikroorganizmus olyan DNS-szekvenciával történő transzformálását, amely annak a génterméknek a kifejeződését kódolja, amelyik a kívánt antibiotikum bioszintetikus útjának sebességkorlátozója. A találmány tárgyat képezik továbbá az antibiotikum bioszintézis géntermékeit kódoló DNS-szekvenciák, a rekombináns DNS kifejeződés vektorai, és maga a transzformált gazdamikroorganizmus is.

A találmány a rekombináns DNS-technológia első és lényegében ipari célzatú felhasználását képviseli olyan antibiotikumot termelő mikroorganizmusoknál, mint amilyenek például a sztreptomicéták. A találmány előzményeinél a rekombináns DNS-technológia a legtöbb esetben specifikus polipeptideknek *Escherichia coli*-ban, vagy bizonyos esetekben, emlős sejtekben történő kifejezésére korlátozódott. Ezek az előre mu-tató törekvések heterológ géntermékek, például humán inzulin A és B lánc, humán proinzulin, humán növekedési hormon, humán protein-C, humán szövet plazminogén aktivátor, borjú növekedési hormon és néhány más, potenciális értékű anyag viszonylag egyszerű kifejezésére irányultak. Ezekben az esetekben a heterológ gén kifejeződése többé-kevésbé független módon zajlik, és az operatív bioszintetikus utakkal nem lép kapcsolatba, azokban nem vesz részt vagy nem módosítja azokat. A találmányban szereplő rekombináns DNS-technológiát felhasználhatjuk adott bioszintézist javítására azzal a céllal, hogy az antibiotikumot vagy antibiotikum-előanyagok termelését fokozzuk.

A sztreptomicétáknál és más antibiotikum-termelő mikroorganizmusoknál a legtöbb rekombináns DNS-technológia a klónozó vektorok kifejlesztésére korlátozódik. Ezeket a kezdeti kísérleteket tartalmazza Reusser 4 332 898 lajstromszámú USA szabadalmi leírása, Manis és munkatársai 4 273 875, 4 332 900, 4 338 400 és 4 340 674 lajstromszámú USA szabadalmi leírásai. Ezek a korai beszámolók sztreptomicéta transzformációt és erre vonatkozó kitanítást nem tartalmaznak. Antibiotikum-termelő mikroorganizmusokhoz használt nagyobb hatékonyságú, javított vektorokkal foglalkozik például Fayerman és munkatársai a 4 513 086 lajstromszámú USA szabadalmi leírásában, Nakatsukasa és munkatársai a 4 513 085 és a 4 416 994 lajstromszámú USA szabadalmi leírásban. Ezek a javított vektorok sztreptomicéták szelektálhatóságára alkalmas markereket tartalmaznak, felhasználhatók sok fontos *Streptomyces* törzs transzformációjához és megfelelő eszközt nyújtanak bonyolultabb génlónozási kísérletek elvégzésére.

Egyik ilyen kísérletről nemrég Hopwood és munkatársai számoltak be [Nature, 314: 642 (1985)]. Noha Hopwood és munkatársai új antibiotikus pigmentek termeléséről írnak, a közlemény nem irányul az antibiotikum-termelés növelésére, vagy az adott gazdasejt bioszintetikus hatékonyságának fokozására, hanem az aktinorodin pigment génjeinek egyik *Streptomyces* törzsből egy másikba való átvitelével foglalkozik.

A jelen találmány különös jelentősége, hogy sztreptomicétáknál és más antibiotikumot termelő törzseknél olyan rekombináns DNS-technológiát nyújt, ami ipari célzatú. Különösen kívánatos, hogy a sztreptomicétákra fejlesszünk ki módszereket, minthogy a gyógyászatban fontos antibiotikumoknak több, mint a felét ezek a mikroorganizmusok termelik. A jelen találmány ilyen módszereket szolgáltat, és lehetővé teszi, hogy antibiotikum-termelő mikroorganizmusok termelőképességét fokozzuk, valamint új antibiotikumokat vagy antibiotikum-előanyagokat állítsunk elő.

Az alábbiakban meghatározzuk a szabadalomban használt kifejezéseket:

Antibiotikum – olyan, mikroorganizmusok által előállított anyag, mely akár természetes állapotában, akár kémiaiilag korlátozottan módosítva gátolja vagy megakadályozza más mikroorganizmusok vagy eukarióta-sejtek növekedését, vagy előli azokat.

Antibiotikum bioszintézisgén – olyan DNS-szakasz, mely egy enzimet vagy az enzim kifejeződését szabályozó terméket kódol, mely enzim, olyan enzimátikus reakcióhoz szükséges, ami a primer metabolitot az antibiotikum közttermékévé – mely ugyancsak lehet antibiotikus hatású –, esetleg magává az antibiotikumá alakítja.

Antibiotikum bioszintézisgénjeinek és azoknak a biokémiai reakcióknak a teljes készlete, amelyek ahhoz a folyamat-hoz szükségesek, mely során a primer metabolit az antibiotikum előanyagaivá, majd az antibiotikumá alakul.

Antibiotikum-termelő mikroorganizmusok – bármely mikroorganizmus – ideértve az *Actinoplanes*, *Actinomadura*, *Bacillus*, *Cephalosporium*, *Micromonospora*, *Penicillium*, *Nocardia* és *Streptomyces* nemzetségeket, noha a fogalmat nemcsak ezekre korlátozva –, mely vagy antibiotikumot termel, vagy olyan géneket tartalmaz, amelyek, ha kifejeződnek, antibiotikum termelődik.

Antibiotikum rezisztenciagén – DNS-szakasz, mely egy adott antibiotikummal szemben rezisztenciát kódol. ApR – ampicillin-rezisztens fenotípus vagy az ezt eredményező gén.

Gazdasejt – az a mikroorganizmus, ideértve ennek életképes protoplasztját is, ami rekombináns DNS klónozó vektorral transzformálható.

NMR – neomicin-rezisztens fenotípus vagy az ezt eredményező gén.

Az antibiotikum bioszintézisútjának működése – az antibiotikum bioszintézisgének és a primer metabolitok antibiotikumá történő átalakításához szükséges, a bioszintézisgénekkel kapcsolatos reakciók kifejeződése.

Rekombináns DNS klónozó vektor – bármelyik szelektálható és önállóan replikálódó vagy kromoszómában beépülő hordozó – ideértve a plazmidokat és a fágokat, noha a fogalmat nemcsak ezekre korlátozva –, ami DNS-molekulákból áll, melyhez további DNS kapcsolható vagy kapcsolt.

rep – az ábrákon a *Streptomyces* plazmid replikációs origója.

Restrikciós fragmens – bármilyen lineáris DNS-szakasz, ami egy vagy több restrikciós enzim működése következményeként keletkezik.

Szenzitív gazdasejt – gazdasejt, beleértve az életképes protoplasztot is, ami egy adott antibiotikum jelenlétében az antibiotikummal szembeni rezisztenciát biztosító gén nélkül nem képes növekedni.

Transzformáns – transzformáción átesett gazdasejt, ideértve annak életképes protoplasztját is.

Transzformáció – DNS bevitelle a gazdasejtbe, ideértve annak életképes protoplasztját is, melynek következtében a gazdasejt genotípusa megváltozik.

tsr – tiosztrepton-rezisztens fenotípus vagy az ezt eredményező gén.

Az ábrákon lerajzolt plazmid- és kromoszómatérképek közel részarányosak. A tilozin bioszintézisgénjei azonban, noha kapcsolatosak, egy nagy DNS-szakaszon elszórva találhatók, ezért a tilozin bioszintézisgéneket tartalmazó nagy DNS-szakasznak csak kis szakaszain részletezzük a restrikciós helyeket. A térkép nem szükségszerűen tartalmazza egy adott restrikciós enzim valamennyi hasítóhelyét. A térképen vonalszakaszokkal jelzett egyes gének elhelyezkedését deléciós térképezéssel állapítottuk meg, ezért az adott gén pontos elhelyezkedése csak közelítőleg igaz.

1. ábra – tilozin bioszintézisútja.

2. ábra – a pHJL280 plazmid restrikciós helyei és funkciós térképe.

3. ábra – a pHJL284 plazmid restrikciós helyei és funkciós térképe.

4. ábra – a pHJL309 plazmid restrikciós helyei és funkciós térképe.

5. ábra – pHJL311 plazmid restrikciós helyei és funkciós térképe.

6. ábra – a pHJL315 plazmid restrikciós helyei és funkciós térképe.

7. ábra – a tilozin bioszintézisgén kromoszomális szerveződése.

A találmány tárgya eljárás az antibiotikum-termelő mikroorganizmus antibiotikumot vagy antibiotikum-előanyagot termelő képességének fokozására, mely abból áll, hogy az antibiotikumot vagy annak előanyagát bioszintetizáló mikroorganizmust olyan DNS klónozó vektorral vagy annak olyan részével transzformáljuk, mely a bioszintetikus út sebességkorlátozó enzimét vagy más géntermékét kódoló antibiotikum vagy antibiotikum-előanyag bioszintézisgént tartalmaz, és a transzformáns olyan körülmények között tenyésztjük, mely megfelel a sejt növekedésnek, az antibiotikum vagy az előanyag bioszintézisgén kifejeződésének és az antibiotikum vagy előanyag termelésének, feltéve, hogy a tenyésztési körülmények a mikroorganizmus megnövekedett antibiotikum-termelő képességének megnyilvánulását biztosítják.

A találmány foglalkozik az érintett antibiotikum bioszintézisgénjeivel. Tárgyat képezik továbbá a rekombináns DNS klónozó vektorok; a génekkel és vektorokkal transzformált, antibiotikumot vagy antibiotikum-előanyagot termelő mikroorganizmusok.

A találmány további tárgya eljárás antibiotikum, antibiotikum-előanyag vagy ezek gyógyászati szempontból elfogadható sóinak előállítására, mely magában foglalja, hogy a bioszintetikus úton antibiotikumot vagy előanyagát termelő mikroorganizmust, melyet DNS klónozó vektorral vagy annak egy részével transzformáltunk, asszimilálható szén-, nitrogénforrásokat és szervesen sókat tartalmazó táptalajban aerob fermentációs körülmények között tenyésztünk, mely fermentációs körülmények között a DNS klónozó vektorban vagy annak egy részletében levő, az antibiotikum bioszintetikus útjának sebességkorlátozó enzimét vagy géntermékét kódoló antibiotikum bioszintézisgén kifejeződik, feltéve, hogy a mikroorganizmus megnövekedett antibiotikum-termelő képességének megnyilvánulását a fermentációs körülmények biztosítják.

A találmányban szereplő módszerek valamennyi antibiotikum-termelő mikroorganizmusoknál széles körben alkalmazhatók. Az alábbiakban egy nem teljességre törekvő táblázatban olyan antibiotikum-termelő törzseket sorolunk fel, amelyek esetében a találmányunk alkalmazható.

I. táblázat
Aminociklitol antibiotikumot termelő
mikroorganizmusok

mikroorganizmus	antibiotikum
Bacillus	
különféle fajok	különféle aminociklitolok
Micromonospora	
különféle fajok	gentomicinek
Saccharopolyspora	
különféle fajok	különféle aminociklitolok
Streptomyces	
albogriseolus	neomicinek
albus var.	metamicin
metamycinus	
aquacanus	N-metil-higromicin B
atrofaciens	higromicinek
bikiniensis	sztreptomycin
bluensis var.	bluenzomicin
bluensis	
canus	ribozil-paromamin
catenulae	katenulin
chrestomyceticus	aminozidin
crystallinus	higromicin A
erythrochromogenes	sztreptomycin
var. narutoensis	
eurocidicus	A16316-C
fradiae	hibrimicinek és neomicinek
fradiae var. italicus	aminozidin
galbus	sztreptomycin
griseus	sztreptomycin
griseoflavus	MA 1267
hofuensis	szeldomicin komplex
hygroscopicus	higromicin, leukanidin és
	higrolidin

mikroorganizmus	antibiotikum
<i>Streptomyces</i>	
<i>hygroscopicus</i> forma	glebomicin
<i>glebosus</i>	
<i>hygroscopicus</i> var.	validamicinek
<i>limoneus</i>	
<i>hygroscopicus</i> var.	szpektinomycin
<i>sagamiensis</i>	
<i>kanamyceticus</i>	kanamicin A és B
<i>kasugaensis</i>	kazugamicinek
<i>kasugaspinus</i>	kazugamicinek
<i>lavendulae</i>	neomicin
<i>lividus</i>	lividomicinek
<i>mashuensis</i>	sztreptomycin
<i>microsporeus</i>	SF-767
<i>netropsis</i>	LL-AM31
<i>noboritoensis</i>	higromicinek
<i>olivaceus</i>	sztreptomycin
<i>olivoreticuli</i> var.	deztomicin A
<i>cellulophilus</i>	
<i>poolensis</i>	sztreptomycin
<i>rameus</i>	sztreptomycin
<i>ribosidificus</i>	SF-733
<i>rimofaciens</i>	deztomicin A
<i>rimosus</i> forma	paramomicin és katenuin
<i>paramomycinus</i>	
<i>spectabilis</i>	spektinomycin
<i>tenebrarius</i>	tobramicin és apramicin
<i>Streptoverticillium</i>	
<i>flavopersicus</i>	spektinomycin

II. táblázat
Anzamicin antibiotikumot termelő
mikroorganizmusok

mikroorganizmus	antibiotikum
<i>Micromonospora</i>	
különféle fajok	különféle anzamicinek
<i>Nocardia</i>	
<i>mediterranei</i>	rifamicin
<i>Streptomyces</i>	
<i>collinus</i>	anzatrienek és naftomicinek
<i>diastochromogenes</i>	anzatrienek és naftomicinek
<i>galbus</i> subsp.	naftomicin B
<i>griseosporeus</i>	
<i>hygroscopicus</i>	herbimicin
<i>hygroscopicus</i> var.	geldamicin
<i>geldanus</i> var. nova	
<i>nigellus</i>	21-hidroxi-25-demetil-25- -metil-tio- -proto sztreptovaricin
<i>rishiriensis</i>	mikotriének
sp. E/784	aktamicin és mikotriének
sp. E88	mikotriének
<i>spectabilis</i>	sztreptovaricinek
<i>tolypophorous</i>	tolimicin

III. táblázat
Antraciklin és kinon antibiotikumot termelő
mikroorganizmusok

5	mikroorganizmus	antibiotikum
	<i>Streptomyces</i>	
	<i>caespitosus</i>	mitomicin A, B és C
	<i>coelicolor</i>	aktinorodin
10	<i>coeruleorubidicus</i>	daunomicin
	<i>cyaneus</i>	ditriszarubicin
	<i>flavogriseus</i>	cianociklin A
	<i>galilaeus</i>	aklacinomicin A, auramicinek és szulfurmicinek
15	<i>lusitanus</i>	naftiridomicin
	<i>peuceticus</i>	daunomicin és adriamicin
	<i>violochromogenes</i>	arugomicin MM 4550 és MM 13902
20	<i>cattleya</i>	tienamicin
	<i>chartreusis</i>	SF 1623 és cefamicin A és B

IV. táblázat
 β -laktám antibiotikumot termelő mikroorganizmusok

	mikroorganizmus	antibiotikum
	<i>Agrobacterium</i>	különféle β -laktámok
	<i>Cephalosporium</i>	
	<i>acremonium</i>	penicillinek és cefalosporinok
	<i>Chromobacterium</i>	különféle β -laktámok
	<i>Gluconobacter</i>	különféle β -laktámok
35	<i>Nocardia</i>	
	<i>lactamadurans</i>	cefamicin C
	<i>uniformis</i>	nokardicin
	<i>Penicillium</i>	
	<i>chrysogenum</i>	különféle penicillinek és más β -laktámok
40	<i>Serratia</i>	különféle β -laktámok
	<i>antibioticus</i>	kvalukinsav
	<i>argenteolus</i>	aszparenomicin A
45	<i>Streptomyces</i>	
	<i>cinnamomensis</i>	cef a micin A és B
	<i>clavuligerus</i>	PA-32413-I, cefamicin, A 16886A, penicillin cefalosporin, klavulinsav és más klavámok
50	<i>fimbriatus</i>	cefamicin A és B
	<i>flavovirens</i>	MM 4550 és MM 13902
	<i>flavus</i>	MM 4550 és MM 13902
	<i>fulvoviridis</i>	MM 4550 és MM 13902
	<i>griseus</i>	cefamicin A és B és karpetimicin A és B
55	<i>halstedii</i>	cefamicin A és B
	<i>heteromorphus</i>	C2081X és cefamicin A és B
	<i>hygroscopicus</i>	deacetoxi-cefalosporin C
	<i>lipmanii</i>	cetamicin, penicillin N, 7-metoxi-cefalosporin C,
60		

VII. táblázat

Nukleozid antibiotikumot termelő mikroorganizmusok

mikroorganizmus	antibiotikum
<i>Corynebacterium michiganense</i> pv. rathayi	tunikamicin analógok
<i>Nocardia candidus</i>	pirazofurin
<i>Streptomyces antibioticus</i>	ara-A
<i>Streptomyces chartreusis</i>	tunikamicin
<i>Streptomyces griseoflavus</i> var. thuringiensis	sztreptoviridanok
<i>Streptomyces griseolus</i>	szinefungin
<i>Streptomyces lysosuperificus</i>	tunikamicin

VIII. táblázat

Peptid antibiotikumokat termelő mikroorganizmusok

mikroorganizmus	antibiotikum
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	aktaplanin
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	teikoplamin
<i>Bacillus various species</i>	bacitracin, polimixin és kolisztin
<i>Nocardia candidus</i>	A-35512 és avoparcin
<i>Nocardia lurida</i>	risztocetin
<i>Nocardia orientalis</i>	vankomicin
<i>Streptomyces antibioticus</i>	aktinomicin
<i>Streptomyces aureus</i>	tiosztrepton
<i>Streptomyces canus</i>	amfomicin
<i>Streptomyces eburosporeus</i>	LL-AM374
<i>Streptomyces haranomachiensis</i>	vankomicin
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	prisztinamicin
<i>Streptomyces roseosporus</i>	lipopeptidok, például A21978 C
<i>Streptomyces toyocaensis</i>	A47934
<i>Streptomyces virginiae</i>	A41030

IX. táblázat

Poliéter antibiotikumot termelő mikroorganizmusok

mikroorganizmus	antibiotikum
<i>Actinomadura</i> különféle fajok	különféle poliéterek
<i>Actinomadura oligosporus</i>	A80190
<i>Dactylosporangium</i> különféle fajok	különféle poliéterek
<i>Streptomyces albus</i>	A203, A28695A és B és szalinomicin

mikroorganizmus	antibiotikum
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	narazin
<i>Streptomyces bobili</i>	A 80438
<i>Streptomyces cacaoi</i> var. asoensis	lizocellin
<i>Streptomyces chartreusis</i>	A 23187
<i>Streptomyces cinnamomensis</i>	monenzin
<i>Streptomyces conglobatus</i>	jonmicin
<i>Streptomyces eurocidicus</i> var. asterocidicus	laidlomicin
<i>Streptomyces flaveolus</i>	CP 38936
<i>Streptomyces gallinarius</i>	RP 30504
<i>Streptomyces griseus</i>	grizorixin
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	A218, emerid, DE 3936, A120 A, A 28695A és B, eritromicin és dianemicin
<i>Streptomyces lasaliensis</i>	lazarocidin
<i>Streptomyces longwoodensis</i>	lizocellin
<i>Streptomyces mutabilis</i>	S-11743a
<i>Streptomyces pactum</i>	A80438
<i>Streptomyces ribosidificus</i>	lonomicin
<i>Streptomyces violaceoniger</i>	nigericin
<i>Streptoverticillium</i> különféle fajok	poliéterek

30 A találmányt a legjobban az antibiotikumot termelő mikroorganizmusoknak olyan génekkel történő transzformációjával szemléltethetjük, mely gének a primer metabolitokat antibiotikumokká átalakító kémiai reakciókat katalizáló enzimeket kódolják. Az egyik ilyen enzim a makrocin-O-metil-transzferáz, amelyik a tilozin bioszintézis végső lépését katalizálja. A makrocin-O-metil-transzferázt kódoló ty1F génnel transzformált tilozintermelő mikroorganizmusok tilozinbioszintézise fokozódik, mert a transzformált sejtekben a ty1F gén termékének mennyisége megnő.

40 A találmány további tárgya eljárás tilozintermelő mikroorganizmus tilozintermelésének vagy tilozin-előanyag termelésének fokozására, mely magában foglalja, hogy a tilozint vagy előanyagát bioszintetikus úton termelő mikroorganizmust, melyet olyan DNS-klónozó vektorral vagy annak részével transzformáltunk, ami a tilozin vagy előanyaga bioszintézisének sebességkorlátozó enzimét vagy géntermékét klónozó bioszintézisgént tartalmaz, a sejtnövekedésnek, a tilozin vagy tilozin-előanyag bioszintézisgén kifejeződés és a tilozin vagy előanyaga termelésének megfelelő körülmények között tenyésztjük, feltéve, hogy a tenyésztési körülmények biztosítják a mikroorganizmus megnövekedett tilozin – vagy tilozin-előanyag – termelőképességének megnyilvánulását.

55 A találmány a mikroorganizmus antibiotikum-termelőképességének fokozására antibiotikum bioszintézisgéneket használ fel. Kis számú antibiotikum bioszintézisgén klónozása, jellemzése és leírása a szakirodalomból ismert. Az antibiotikum bioszintézisgének

izolálásának módszere már kidolgozott, de különösen alkalmas módszert ír le Baltz és munkatársai a 742 349 iktatószámú USA szabadalmi bejelentésben (1985. június 7.), ami azonos a 86304239.6 számú európai szabadalmi bejelentéssel. A szóban forgó tilozin bioszintézisgéneket eredetileg egy λ -génkönyvtárból izoláltuk, ami Fishman és munkatársai [J. Bacteriology 161: 199–206 (1985)] által leírt eljárás szerint készült el.

A tilozin bioszintézisének vázlatos képét az 1. ábrán mutatjuk be; az ábrán a nyilak azokat a lépéseket jelölik,

melyeket egy vagy több tilozin bioszintézisgén terméke katalizál. Az átalakításért felelős gén(ek)e(t) a nyíl felett jeleztük. Az egyes genotípus megjelölések a gének egy adott csoportját jelentik, ami a fenotípust is meghatározza. A találmányban számos expressziós vektorra találunk példát. Ezek a vektorok egy vagy több tilozin bioszintézisgént hordoznak és megkaphatók a Northern Regional Research Laboratories-től (Peoria, Illinois 61604, USA). A X. táblázatban röviden összefoglaljuk a találmány szerinti eljárásban példaként alkalmazott plazmidokat.

X. táblázat
Tilozin bioszintézisgéneket tartalmazó plazmidok

gazdaorganizmus/jelölés	tilozingén(ek)	NRRL katalógus-szám	letébehelyezés ideje	térkép
E.coli K12 HB101/pHJL280	D, E, F, H, J	B-18043	1986. február 18.	2. ábra
E.coli K12 HB101/pHJL284	C, F, J	B-18044	1986. február 18.	3. ábra
E.coli K12 HB101/pHJL309	L, M	B-18045	1986. február 18.	4. ábra
E.coli K12 HB101/pHJL311	C, F, J, K, H	B-18046	1986. február 18.	5. ábra
E.coli K12 JM109/pHJL315	D, E, F, H, J	B-18047	1986. február 18.	6. ábra

Számos olyan *Streptomyces fradiae* törzset leírtak, melyek tilozin bioszintézisgénéi mutációt szenvedtek, és ezért sokkal kevesebb tilozint termelnek, mint az a törzs, melyből származnak. A XI. táblázatban röviden jellemezzük ezeket a törzseket.

XI. táblázat
Tilozin bioszintézisben sérült *Streptomyces fradiae* mutánsok

törzs jele	mutáns gén	*ATCC vagy NRRL katalógusszám
GS15	ty1F	NRRL 18058
GS16	ty1E	ATCC 31664
GS28	ty1F	NRRL 18059
GS33	ty1L	
GS48	ty1D	NRLL 12170
GS52	ty1C	NRRL 18060
GS62	ty1M	
GS76	ty1D	
	ty1H	NRRL 12171
GS85	ty1K	
GS88	ty1J	

* ATCC: American Type Culture Collection (Amerikai törzsgyűjtemény) Rockville, MD 20852, USA

NRRL: Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL 61604, USA.

pHJL280, pHJL284 és a pHJL315 plazmidokat a *Streptomyces fradiae* GS15 és a *Streptomyces fradiae* GS28 törzsek transzformálására használjuk. A GS15 és a GS28 törzseket *S. fradiae* C4 törzsből állítottuk elő nitrozo-guanidines mutagenézissel.

A *S. fradiae* C4 a *S. fradiae* T59235 törzsből (ATCC 19609) mutagenézissel származik. A C4 törzssel összehasonlítva a GS15 törzs szinte nem, a GS28 törzs csak kevés tilozint termel. A GS15 és GS28 törzsek tilozintermelő képességének csökkenése vagy hiánya feltehetően a makrocin-O-metil-transzferázt (MOMT) kódoló ty1F gén mutációjának az eredménye. A makrocinnak tilozinná való átalakulásához szükséges makrocin-O-metil-transzferáz-enzim gyakran van jelen sebességkorlátozó mennyiségben a tilozintermelő törzsekben. A pHJL280, pHJL284 és pHJL315 plazmidok, azáltal, hogy növelik a ty1F bioszintézisgén példányszámát, valamint a tilozin bioszintézisére rendelkezésre álló makrocin-O-metil-transzferáz-enzim koncentrációját, megszüntetik ezt a sebességkorlátozó akadályt. Következésképp a *S. fradiae* GS15/pHJL280, *S. fradiae* GS15/pHJL284, *S. fradiae* GS15/pHJL315, *S. fradiae* GS28/pHJL284, *S. fradiae* GS28/pHJL280 és a *S. fradiae* GS28/pHJL315 törzsek 72 órás fermentáció alatt 2–6-szor több makrocin-O-metil-transzferázt termelnek, mint a C4 törzs és 120-szor többet, mint a GS28 törzs.

A pHJL280 plazmidot felhasználtuk a C4 törzs mutagenézisével kapott *Streptomyces fradiae* GS16, *S. fradiae* GS48, *S. fradiae* GS72 és a *S. fradiae* GS88 törzsek transzformálására is, melyek kimutatható mennyiség alatti tilozint termeltek. A ty1E, demetil-makrocin-O-metil-transzferáz-enzimet, a 6-deoxi-D-allóz bioszintéziséhez vagy addíciójához szükséges ty1D enzimet, a tilakton C-23 metilcsoportjának oxidálásához szükséges ty1H enzimet és a ty1J enzimet a nem transzformált GS16, GS48, GS76 és GS88 törzsek csak sebességkorlátozó mennyiségben vagy hibás enzimként termelik. A nem transzformált GS16, GS48, GS76, illetve a GS88 törzsek a kívánt tilozin antibiotikum helyett

inkább demetil-makrocint, demicinozil-tilozint, 23-deoxi-demicinozil-tilozint és demicinozil-tilozint termel.

A pHJL280 plazmid felhasználása módot ad a tilozinbioszintézis hatékonyságának fokozására, nemcsak azért, hogy egy ép gént szolgáltasson, de a ty1D, ty1E, ty1H és a ty1J bioszintézis gének példányszámának növelésével is, aminek következtében az említett gének által meghatározott termékek intracelluláris mennyisége megnő. A rendelkezésre álló ty1E gén termékének koncentrációja ezért megemelkedik, aminek eredményeként a demetil-makrocín → makrocín → tilozin bioszintetikus folyamatot katalizáló enzim mennyisége megnövekszik. Ugyancsak megnő a ty1D, ty1H és ty1J gének termékeinek rendelkezésre álló koncentrációja, ami a 6-deoxi-D-allóz addíciót és a tilozin-előanyag C-23-as oxidációját katalizáló enzimek mennyiségének emelkedését jelenti. A *Streptomyces fradiae* GS16/pHJL280, *S. fradiae* GS48/pHJL280, *S. fradiae* GS76/pHJL280 és a *S. fradiae* GS88/pHJL280 törzsek 144–168 órás fermentációja alatt lényegesen több tilozin termelődik, mint a nem transzformált, alacsony tilozintermelő képességű mutánsok esetében. A transzformált törzsekben a pHJL280 plazmid által kódolt különleges enzimek szintje magasabb, mint a C4 szülő törzsben, további példát szolgáltatva a találmány szemléltetéséhez. A pHJL280 plazmidot felhasználhatjuk bármilyen olyan mikroorganizmus tilozintermelő képességének fokozására, melyeknél a ty1D, ty1E, ty1F, ty1H vagy ty1J gének (ezek bármilyen kombinációjában) termékei sebességkorlátozó mennyiségben vesznek részt a tilozin-bioszintézisben.

Felhasználhatjuk a pHJL284 plazmidot a *Streptomyces fradiae* GS52, C4 törzsből származó, alacsony tilozintermelő képességű mutáns transzformálására is, mely mutáns a mikaróz bioszintézisét vagy a de-O-metil-laktenocinhoz történő addícióját katalizáló enzimet sebességkorlátozó mennyiségben termeli csak. Ezért a *Streptomyces fradiae* GS52 törzs inkább dezmetizint termel, mint a kívánt tilozin antibiotikumot. Az ép bioszintézis gének bejuttatásával és a ty1C bioszintézis gének példányszámának a növelésével a pHJL284 plazmid fokozza a szintézist. A transzformált törzsben nő a ty1C gén rendelkezésre álló termékének koncentrációja, ami a kívánt addíciós reakciót végző enzim fokozott termelődését eredményezi. A *Streptomyces fradiae* GS52/pHJL284 törzs a 144–168 órás fermentáció alatt a nem transzformált mutánsnál lényegesen több tilozint termel, és a ty1C enzimszintje magasabb, mint a szülő C4 törzsé. A pHJL284 plazmidot felhasználhatjuk a ty1J mutáns *Streptomyces fradiae* GS88 törzs termelésének javítására is, de az eljárás alkalmas valamennyi olyan mikroorganizmus tilozin-bioszintézisének hatékonyabbá tételére, melynek ty1C, ty1F vagy ty1J génterméke (a géntermékek hiányossága szerepelhet bármilyen kombinációban is) a tilozin bioszintézise szempontjából sebességkorlátozó.

A pHJL309 plazmid ty1L és ty1M bioszintézis géneket tartalmaz, ezért a jelen eljárásban alkalmas a ty1L mutáns *Streptomyces fradiae* GS33 és a ty1M mutáns *S. fradiae* GS62 törzs tilozintermelő képességének a

javítására. Az eljárásban a pHJL309 plazmidot felhasználhatjuk bármelyik olyan mikroorganizmus tilozintermelő képességének a fokozására, amelyiknél a ty1L vagy ty1M génterméke (vagy mindkettő) a tilozin bioszintézise szempontjából sebességkorlátozó mennyiségben van jelen.

A pHJL311 plazmid ty1C, ty1F, ty1H, ty1J és ty1K bioszintézis géneket hordoz, ezért eljárásunkban felhasználható a ty1C mutáns *Streptomyces fradiae* GS52, a ty1J mutáns GS88, a ty1F mutáns GS15 és GS28, valamint a ty1K mutáns GS85 törzsek tilozintermelő képességének a javítására. A pHJL311 plazmidot eljárásunkban felhasználhatjuk bármelyik mikroorganizmus tilozintermelő képességének a javítására, melynél a ty1C, ty1F, ty1H, ty1J vagy ty1K gének terméke (ez vonatkozik több géntermék-hiányosságra bármilyen kombinációjára is) a tilozin bioszintézisében sebességkorlátozó mennyiségben szerepel.

A pHJL315 plazmid ty1D, ty1E, ty1F, ty1H és ty1J bioszintézis géneket tartalmaz, ezért eljárásunkban felhasználható a ty1D mutáns *Streptomyces fradiae* GS48, a ty1J mutáns GS88, a ty1E mutáns GS16, a ty1D és ty1H kettős mutáns GS76, a ty1F mutáns GS28 és GS15 törzsek tilozintermelő képességének javítására. Módszerünk szerint a pHJL315 plazmidot felhasználhatjuk bármelyik olyan mikroorganizmus tilozintermelő képességének a javítására, melynél a ty1D, ty1E, ty1F, ty1H vagy ty1J gének terméke (ez vonatkozik több géntermék-hiányosságra bármilyen kombinációjára is) a tilozin bioszintézisében sebességkorlátozó mennyiségben van jelen.

Ezek az eredmények azt szemléltetik, hogy az eljárásunkban szereplő vektorok a nem transzformált mikroorganizmusokhoz képest fokozhatják a tilozintermelő törzsek termelőképességét azáltal, hogy az antibiotikum bioszintézisében sebességkorlátozó mennyiségben szereplő enzim vagy más géntermék koncentrációját megemelik. A plazmid fenntartása, azonban a gazdaságjában néha tetemes energiafelhasználást igényel, olyan energiáért, ami különben az antibiotikum-termeléshez használódhatna fel. Így önállóan replikálódó vektorokkal transzformált bizonyos mikroorganizmusok antibiotikum-termelő képessége ténylegesen csökken, még ha ezek a vektorok növelik is más mikroorganizmusok antibiotikum-termelő képességét. Noha a találmány semmi módon nem kíván elméleti korlátozás alá esni, ez a látszólagos anomália megmagyarázható azzal a ténnyel, hogy ezek az antibiotikumok primer metabolitokból, például acetátból, propionátból, malonil-CoA-ból, metil-malonil-CoA-ból és glükózból keletkeznek specifikus enzimek segítségével. Ezek az enzimek a gyors növekedési szakaszban nincsenek jelen a mikroorganizmusban, és így nem vonják el a szükséges vegyületeket a növekvő sejtből. Amint a táplálkozási viszonyok következtében a növekedés korlátozottá válik, az antibiotikum bioszintézis génei feltehetően aktivizálódnak, miáltal azok az enzimek szintetizálódnak, melyek bizonyos primer metabolitok antibiotikumokká való átalakulását irányítják.

Az antibiotikumok bioszintéziséről azt is feltételezik, hogy a termelő mikroorganizmusoknak nélkülözhetetlen funkciója, minthogy az antibiotikum bioszintézisében gátolt mutánsok életképesek és ugyanúgy növekednek, mint a termelő szülő törzsek. A vad típusú törzsek viszonylag kis mennyiségű antibiotikumot termelnek, ami elegendő ahhoz, hogy szelekciós előnyt nyújtson a mikroorganizmus számára.

A fejlesztés, mely során a természetes állapotban begyűjtött mikroorganizmusból antibiotikumot ipari méretben termelő törzs lesz, a mutációknak és a nagyobb antibiotikum-termelésre történő szelekcióknak többszöri ciklusából áll. Minthogy az antibiotikum bioszintézise a primer metabolitoknak és a sejt energiájának a növekedésétől és sejtműködésétől való elvonással jár, feltételezhetjük, hogy a magasabb antibiotikum-termelés gyakran a mikroorganizmus életképességének kárára történik. Ezért a magasabb antibiotikum-termelés fenntartásához biztosítani kell a sejtek táplálék- és energiaforrásának érzékenyen egyensúlyban tartott megoszlását a növekedést fenntartó sejtműködések és az antibiotikum-termelés között. Következésképpen, az ilyen finoman beállított, magas termelőképességű törzsek rendkívül érzékenyek a sejt fiziológiáját befolyásoló tényezőkkel szemben. Így például önállóan replikálódó, különösen nagy példányszámú plazmid bevitelére gyakran a termelőképesség csökkenéséhez vezet a különben antibiotikumot magas szinten termelő mikroorganizmusoknál. E gátlás mechanizmusa nem világos, de a gátlás az antibiotikum bioszintézisének kezdeti lépéseinél történhet, minthogy ilyen körülmények között nem tapasztalhatjuk az antibiotikum-előanyagok mérhető szintű felgyűlését. Ezenkívül az önállóan replikálódó vektorok elvonhatják a DNS- vagy RNS-szintézis előanyagait vagy, magas példányszámú, lefoglalhatják a DNS-hez kötődő proteineket, például RNS-polimerázt, DNS-polimerázt, polimeráz aktivátorokat vagy génkifejeződés represszorait. Az önállóan replikálódó vektorok alkalmazásának egy további, gyakori korlátozó tényezője a plazmidvesztés. A plazmidban lévő rezisztens markerre történő szelektálás biztosítja a plazmidot tartalmazó, homogén populációt, de ugyanakkor megzavarhatja az antibiotikum-fermentáció már említett érzékeny fiziológiai egyensúlyát. Az instabil plazmidokra való szelektálás előli vagy gátolja azokat a baktériumokat, melyek elvesztették plazmidjukat, de ugyanakkor csökkentett növekedési sebességet eredményezhet.

Az önállóan replikálódó vektorok néha megfigyelhető negatív hatása a mikroorganizmus antibiotikum-termelő képességére a magas termelőképességű törzseknél a legnagyobb, minthogy azok különösen érzékenyen kiegyensúlyozottak a növekedés életfunkcióit és az antibiotikum-termelést illetően. A jelen találmány túlhaladja az önállóan replikálódó plazmid magas termelőképességű törzsekre gyakorolt negatív hatásának korábban fel nem ismert problémáját oly módon, hogy a transzformált gazdasejtek tenyésztésére olyan módszert nyújt, ami megkönnyíti az integrált plazmidot tartalmazó transzformált sejtek azonosítását, továbbá

olyan tulajdonságú vektorokat szolgáltat, ami elősegíti a beépültség kimutatását. Egy beépülést eredményező tenyésztési eljárásnak nagy jelentősége van a szelektált és a szokásos módon feljavított antibiotikum-termelő mikroorganizmusok termelőképességének javítása szempontjából. Az alacsony antibiotikum-termelő képességű mikroorganizmusok, törzsek termelőképességét integráció útján vagy önállóan replikálódó vektorokkal történő transzformációval növelhetjük. Amint az a szakemberek előtt nyilvánvaló, az antibiotikum-termelő képességben a legnagyobb javulás akkor mutatható ki, ha a jelen találmány eljárását alacsony termelőképességű törzseknél alkalmazzuk.

A plazmid DNS integrációja könnyen megvalósítható, ha az adott antibiotikum-termelő törzset vagy mutánsát a szokásos eljárásokkal transzformáljuk, a transzformánsokat szelektáljuk vagy más módon azonosítjuk, majd a sejteket olyan körülmények között tenyésztjük, melyek között a gazdasejtnek nincs szüksége a plazmid DNS-szekvenciához a növekedését vagy szaporodását illetően. Néhány generációnak nem szelektív körülmények között történő tenyésztése után egyes sejtek már nem tartalmaznak szabad plazmid DNS-t, így – szelektálva vagy más módon meghatározva azokat a gazdasejteket, melyekben a plazmid DNS-szekvencia jelen van – azonosíthatjuk azokat, melyeknél a plazmid DNS beépült a kromoszómális (genom) DNS-be. A DNS-vektor beépülését eredményező tenyésztési technika különösen hasznos, amikor olyan vektort használunk, amelyik a transzformált gazdasejtben nem stabil, úgyhogy a vektor fenntartását biztosító szelekciós nyomás nélkül tenyésztve, plazmidmentes szegregánsok keletkeznek. Bibb és munkatársai [Nature, 384: 525–531 (1980)] leírják egy DNS-szekvenciát, ami ahhoz szükséges, hogy a vektor stabilan átöröklődjön. Különböző vektorokat állítottak össze, melyekben hiányzik ez a stabilitási szekvencia.

A találmányunk plazmidjainak megalkotásánál felhasználunk pHLJ210 és pHLJ401 klónozó vektorok példaként nem tartalmazzák ezt a stabilizáló szekvenciát. A pHLJ210 plazmid a 639 566 iktatószámú USA szabadalmi bejelentésben lett közzétéve (1984. augusztus 10.; azonos a 176 199 számú európai közzététellel). A pHLJ401 plazmid a 841 920 iktatószámú USA szabadalmi bejelentésben (1986. március 20.; ami a 763 172 iktatószámú bejelentést – 1985. augusztus 7. – is magában foglaló új bejelentés; azonos a 86306011.7 számú európai szabadalmi bejelentéssel; 1986. augusztus 5.) lett közzétéve. A „nem stabil” kifejezést olyan plazmidokra használjuk, melyeket a transzformált sejtek csak akkor vesztenek el nagy gyakorisággal, ha a sejteket nem a plazmid megmaradását fenntartó szelekciós nyomás alatt tenyésztjük, mert ha szelekciós nyomást alkalmazunk a transzformált sejtekre, a pHLJ210 és a pHLJ401 plazmidok például teljesen stabilak. Ha a gazdasejtet olyan vektorral transzformáljuk, amelyik szelekciós nyomás nélkül is stabil, a vektort nem fogjuk a „nem stabil” vektoroknál tapasztalt nagy gyakorisággal elveszteni, és az integráció megállapítása nehézségekbe fog ütközni, minthogy még a nem szelektív

körülmények között is nagyszámú olyan sejt marad meg, amelyek önállóan replikálódó plazmidot tartalmaznak. Az integránsokra történő szelekciót a későbbiekben részletesebben ismertetjük. Amint a vektor DNS beépül a gazdasejt kromoszomális DNS-ébe, megfigyelhető a gazdasejt antibiotikum-termelő képességének maximális növekedése, mert az önállóan replikálódó plazmid további gátló hatása megszűnik.

A klónozó géneket tartalmazó vektoroknak a termelő mikroorganizmus genomjába való beépülését több módon elérhetjük. Az egyik lehetőség, hogy lizogén bakteriofágot vagy más olyan fágvektort használunk, ami beépül a gazdasejt genomjába. A másik mód, hogy klónozó géneket hordozó plazmid vektort alkalmazunk, és a klónozó szekvencia és a homológ kromoszómaszekvencia közötti egyszeri rekombinációs eseménnyel a genomba integrálódó plazmidra szűrünk. A vektor beépülésének gyakoriságát drámaian megnövelhetjük, ha a gazdasejt genom DNS-ével homológ DNS-szekvenciát adunk a vektorhoz. Az „integráció” vagy „beépülés” kifejezést használjuk egyszeri rekombinációs eseményre, amit Campbell típusú rekombinációként ismerünk, vagy kettős „crossover”-re, ami a vektor és a kromoszóma közötti genetikai információcserét eredményezi. A kettős crossover rekombinációval a vektornak csak egy része integrálódik a kromoszomális DNS-be.

Igy például a klónozó tilozin bioszintézisgéneket (ty1) hordozó plazmid beépülhet a *Streptomyces fradiae* genomjába a plazmid ty1 gén és a genom homológ ty1 gén közötti egyszeri crossoverrel. Egy másik lehetőség, hogy nem ty1 *S. fradiae* DNS-szekvenciát helyezünk a klónozó ty1 génekkel együtt a plazmidba, és a nem ty1 szekvenciának megfelelő lókusznál történő integrációra szűrünk. Ez utóbbi esetben elkerüljük a ty1 szekvenciába történő integráció lehetséges mutagén hatását, de ha kettős crossover rekombináció a kívánt, az antibiotikum bioszintézisgéneket homológ DNS-szekvenciáknak kell szegélyezze.

Hogy elkerüljük a rekombináns plazmidnak (akár önállóan replikálódó, akár beépült) a tilozintermelésre kifejthető potenciálisan hátrányos hatását, felhasználhatjuk a *Streptomyces fradiae*-nak azt a képességét, hogy a tilozin-előanyagokat felveszi a táptalajból és átalakítja tilozinná. Hogy integránsokat kapjunk, egy tilozintermelő törzset pHJL280 plazmiddal transzformáltunk és tenyésztettünk. A tenyészetnek csak egy szubpopulációja, 18%-a volt a pHJL280 plazmid jelenlétére utalóan tiosztrepton rezisztens. Ez a szubpopuláció azonban többszörözött példányszámban tartalmazta a demetil-makrocin-O-metil-transzferáz (DMOMT) és a makrocin-O-metil-transzferáz (MOMT) géneket, és ennek következtében a két enzim szintje kb. kilencszeresre emelkedett. A tenyészet képes volt valamennyi különben felgyűlő demetil-makrocint és makrocint tilozinná alakítani (XIV. táblázat).

Igy elkészítettünk olyan specifikus *S. fradiae* törzset, melyek a sebességkorlátozó gént többszörös példányszámban és az ennek megfelelő enzimet magas szinten tartalmazzák, és ezzel a törzzsel a felgyűlő előanyagot tilozinná alakítjuk. Ezeket az átalakító tör-

zseket különböző módon alkalmazhatjuk: 1. a fermentort az átalakító és a termelő törzzsel egy időben oltjuk be, oly módon, hogy az átalakító és termelő törzs arányában az átalakító törzs kis részt tegyen ki; 2. az átalakító törzset egy más későbbi fermentációs ciklusban lévő termelő törzs tenyészetéhez adjuk hozzá, hogy az előanyagokat átalakítsuk; 3. az átalakító törzset egy másik „reaktorban” tartjuk, és ebbe adagoljuk a termelő törzs terméket tartalmazó fermentlevét; vagy 4. az átalakító törzset oszlopon rögzítjük, és a termelő törzs fermentlevét ezen vezetjük keresztül. A szakemberek előtt nyilvánvaló, hogy a termelő és átalakító tenyészetekre való elkülönüléssel kiküszöböljük a rekombináns plazmidoknak azt a káros hatását, amelyet némelykor a nagy antibiotikum-termelő képességű törzsek termelésére gyakorolnak.

A szétválasztott tenyészeteknek az is előnyük, hogy kiküszöbölhető a vektorstabilitás problémája, mint-hogy az átalakító törzset kis térfogatban is tenyésztjük, az antibiotikus vagy más szelekciós környezet finoman szabályozható és ellenőrizhető, fenntartva ezáltal a plazmidok jelenlétét. Lényegében az átalakító törzs enzimmorásként működik, és ezeket az enzimeket nagy koncentrációban állítjuk elő, körülbelül ugyanazon a módon, mintha rekombináns plazmiddal transzformált *E. coli*-val termelnénk a proteineket.

Természetesen a találmány módszerével az antibiotikumtermelés csak úgy növelhető meg, ha a transzformált DNS tartalmazza a nem transzformált törzs sebességkorlátozó enzimét kódoló gént. Különböző mód-szerek ismeretesek annak megállapítására, hogy az antibiotikum bioszintézisének melyek a sebességkorlátozó lépései. [Seno és Baltz, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21: 759–763 (1982)], de nem szükséges azonosítani a korlátozó lépést, ha bevitelre rendelkezésünkre áll az antibiotikum bioszintézisgénjeinek teljes készlete. Ha nem ismert a sebességkorlátozó enzim, a termelő törzset az antibiotikum bioszintézisgénjeinek teljes készletével transzformáljuk, és ezzel biztosítjuk – bármelyik is a sebességkorlátozó enzim – azt, hogy a transzformált gazdasejtben a sebességkorlátozó enzim koncentrációja magasabb lesz, mint a nem transzformált sejtben. Gyakran azonban tudjuk, hogy melyik a bioszintézis sebességkorlátozó enzime, és a találmány módszerével a mikroorganizmus antibiotikum-termelő képességét úgy fokozzuk, hogy a sebességkorlátozó enzimet kódoló gént tartalmazó vektorral transzformáljuk az illető mikroorganizmust.

Például a GS15 törzs, ami a kimutathatóság alatti mennyiségben termeli a tilozint, és a GS28 törzs, amelyik nagyon kevés tilozint termel, ty1F mutációt tartalmaz, úgyhogy ezeknél a törzseknél a tilozin-bioszintézis sebességkorlátozó lépésének a meghatározása viszonylag egyszerű. A GS15 és a GS28 törzsek szülő-törzse, a *Streptomyces fradiae* C4 törzs erős tilozintermelő, viszonylag nagy mennyiségben halmozza fel a tilozin közvetlen előanyagát a makrocint, melyet a ty1F gén terméke alakít át tilozinná. Más *S. fradiae* törzsek, amelyek még több tilozint termelnek, a C4 törzsnél még nagyobb mennyiségben halmozzák fel a

makrocint. Ezek a megfigyelések azt bizonyítják, hogy az erős tilozintermelő törzseknél a *tylF* gén terméke sebességkorlátozó mennyiségben van jelen. Ezeket a makrocint felhalmozó törzseket olyan vektorral transzformálva, melyek *tylF* gént tartalmaznak, majd izolálva azokat a transzformánsokat, melyek a vektorokat csak integrált formában tartalmazzák, olyan transzformánsokhoz jutunk, melyek a nem transzformált sejtek-nél több tilozint termelnek. A transzformánsokban megfigyelt magasabb tilozintermelés kapcsolatban van a nem transzformált sejtekben felhalmozódó makrocinnennyiséggel. Szakemberek előtt nyilvánvaló, hogy az előzőekben ismertetett módszerrel kapott transzformánsokban a *tylF* gén terméke még mindig lehet sebességkorlátozó mennyiségben jelen, és ebben az esetben a *tylF* gén példányszámának növelésével fokozódnia kell a tilozintermelésnek, vagy a transzformált törzs most egy másik bioszintézisgén termékét tartalmazhatja sebességkorlátozó mennyiségben, amit ugyancsak sebességet nem korlátozóvá emelhetünk a találmányban ismertetett eljárással.

A találmány tárgya eljárás antibiotikum-termelés fokozására az antibiotikum bioszintézisútjának befolyásolásával és rekombináns DNS klónozó vektorok szolgáltatása az eljáráshoz. Példaként a tilozin bioszintetikus útját említjük, mely makrolid típusú antibiotikumot a *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces rimosus* és *Streptomyces hygroscopicus* mikroorganizmusok termelik. A tilozin egy 16 tagú elágazó laktonból (tilonolid) áll, melyhez három cukormolekula (mikaróz, mikaminóz és micinóz) kapcsolódik. A lakton két molekula acetáttól, öt molekula propionáttól és egy molekula butiráttól származik oly módon, hogy egy propionil-S-koenzim-A két malonil-S-koenzim-A molekulával, négy metil-malonil-S-koenzim-A molekulával és egy etil-malonil-S-koenzim-A molekulával kondenzálódik, feltehetően a zsírsav bioszintézissel analóg módon. A lakton kialakulását, a cukrok bioszintézisét és kapcsolódását, valamint a közttermékeknek tilozinná való átalakítását gének által kódolt enzimek sora katalizálja. Ezeket az enzimeket kódoló gének klónozásával lehetőség nyílik a tilozin-bioszintézis módosítására és fokozására, és ezen keresztül szemléltetjük találmányunkat.

A találmány céljából felhasználható, illusztratív tilozin- bioszintézis-gének például a *tylC*, *tylD*, *tylE*, *tylF*, *tylH*, *tylJ*, *tylK*, *tylL* és *tylM*. Ezek közül kiemelkedik a *tylF* gén, minthogy az O-metil-transzferáz-enzimet kódolja, ami a legtöbb tilozintermelő törzs esetében a bioszintézis sebességkorlátozó tényezője. A *Streptomyces fradiae* optimális fermentációs körülményei között a makrocinnem kívánt szintig halmozódik fel, mert a sebességkorlátozó lépést a *tylF* gén terméke katalizálja. Miként az 1. ábrából kitűnik, a *tylF* enzim katalizálja a makrocinnak tilozinná való átalakulását. A *tylF* gén termékének, az O-metil-transzferáznak a túltermelése hatékonyan befolyásolja a tilozin bioszintézisét, ami a megemelkedett antibiotikum-termelésben és ezáltal az alacsonyabb fermentációs költségekben nyilvánul meg.

A szakemberek előtt nyilvánvaló, hogy a találmány nem korlátozódik a pHJL280, pHJL284, pHJL309, pHJL311 vagy a pHJL315 plazmidok alkalmazására. Az ezekben a vektorokban lévő antibiotikum bioszintézisgéneket teljes egészében vagy csak egy részüket illetően kivághatjuk és más rekombináns DNS klónozó vektorokba ligálhatjuk. Így például, ha a pHJL280 plazmidot BamHI és BglII restrikciós enzimekkel hasítjuk, öt ~10,3 kilobázis (kb) ~6,54 kb, ~2,3 kb, ~1,7 kb, illetve ~1,0 kb nagyságú BamHI-BamHI fragmenst, két ~2,9 kb, illetve 2,0 kb nagyságú BamHI-BglII fragmenst és egy ~0,2 kb nagyságú BglII-BglII fragmenst kapunk. A pHJL280 plazmid ~2,9 kb nagyságú BamHI-BglII fragmense tartalmazza a *tylF* gént. A pHJL280 plazmid BglII és EcoRI restrikciós enzimekkel való hasítása négy fragmenst eredményez: ~11,24 kb-ú EcoRI-EcoRI, ~11,5 kb-ú BglII-EcoRI, ~4,0 kb-ú EcoRI- BglII és ~0,2 kb-ú BglII-BglII fragmenseket. A pHJL280 plazmid 4,0 kb nagyságú EcoRI-BglII fragmense tartalmazza a *tylE* gént.

A pHJ1284 plazmidnak BamHI és EcoRI restrikciós enzimekkel történő emésztése három BamHI-BamHI fragmenst eredményez ~9,7 kb, ~2,3 kb, illetve ~1,0 kb nagyságban és négy EcoRI-BamHI fragmenst ~6,24 kb, ~4,3 kb, ~2,3 kb, illetve ~1,1 kb nagyságban. A pHJL284 plazmid ~2,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmense tartalmazza a *tylF* gént. Ha a pHJL284 plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel hasítjuk, két fragmenst kapunk, melyek ~16,4 kb, illetve ~10,54 kb nagyságúak; a 16,4 kb méretű fragmens tartalmazza a *tylF*, *tylC* és *tylJ* géneket. A pHJL311 plazmid ~1,7 kb nagyságú EcoRI-BamHI restrikciós fragmense hordozza a *tylK* gént. A pHJL309 plazmid ~18,5 kb nagyságú EcoRI restrikciós fragmenjében, valamint a ~8,3 kb-ú BamHI-KpnI restrikciós fragmentben vannak a *tylL* és a *tylM* gének.

A *tyl* géneket tartalmazó bármelyik fent említett fragmenst más vektorba ligálhatjuk, olyan vektorhoz jutva, melyek a jelen találmány szerint felhasználhatók. Ilyen vektor lehet például a 4 468 462, 4 513 086, 4 416 994, 4 503 155 és a 4 513 185 számú USA szabadalomban szereplő vektorok vagy a pIJ101, pIJ350, pIJ702 (ATCC 39155), SC P2* (NRRL 1504), pHJL192, pHJL197, pHJL199, pHJL210, pHJL211, pHJL400, pHJL401, pHJL302, pIJ922, pIJ903, pIJ941, pIJ940 és a pIJ916 plazmidok is. Ezek a vektorok replikálódhatnak a *Streptomyces fradiae*-ban és más tilozintermelő törzsekben, így alkalmasak az antibiotikum bioszintézisgéneinek klónozására. Az előzőekben leírt „nem stabil” vektorok előnyösek, ha integrálódó vektorra van szükség.

A találmány célja szempontjából alkalmazható *Streptomyces* törzs például a *S.fradiae*, *S.fradiae* GS52, *S.fradiae* GS48, *S.fradiae* GS16, *S.fradiae* GS28, *S.fradiae* GS15, *S.fradiae* GS76, *S.rimosus* és *S.hygroscopicus*. A *Streptomyces hygroscopicus* és a *S.rimosus* jól ismertek, az American Type Culture Collection (ATCC) törzs gyűjteményben vannak elhelyezve (Rockville, Maryland 20852, USA), ATCC 27438, ATCC 21449, ATCC 15484, ATCC 19040 és ATCC 15420 katalógusszámok alatt

S. hygroscopicus, ATCC 10970 katalógusszámmal *S. rimosus* törzs rendelhető meg. A *Streptomyces*-ek közül a *S. fradiae* GS16, *S. fradiae* GS15 és a *S. fradiae* GS28 az előnyösek, különösen a pHJL280 plazmiddal történő transzformációnál. A *Streptomyces fradiae* ugyancsak jólismert mikroorganizmus és több törzse megrendelhető a Northern Regional Research Laboratories-től (NRRL) (Peoria, Illinois 61604, USA) vagy az ATCC-től a következő katalógusszámokon: NRRL 2702, NRRL2703 és ATCC 19609.

A találmányban szereplő rekombináns plazmidok mindegyike tartalmaz egy vagy több antibiotikum rezisztenciagént. Hacsak nem egy policisztron része, valamilyen nyi antibiotikum bioszintézisgén általában a következő részekből áll: 1. a gén átírását irányító promotor; 2. a mRNS-re átíródó szekvencia, mely majd irányítja az átfordítást (transzlációt); 3. a proteint kódoló rész; 4. az átírást lezáró szekvencia (terminátor). Mindezek az elemek egymástól függetlenül felhasználhatók, és ez lehetővé teszi, hogy a DNS rekombinációs technika segítségével a rekombináns gének nagyszámú változatát elkészíthessük. Így például a *tylF* gén proteinkódoló szakaszát hozzákapszsolhatjuk egy nem *Streptomyces fradiae* génből származó promotorhoz, átfordítást aktiváló szakaszhoz és átírást lezáró szakaszhoz, olyan rekombináns gént állítva így össze, mely működni fog abban a mikroorganiz-

musban, mint gazdaszervezetben, melyből a nem *Streptomyces fradiae* szekvenciák származnak. Az ilyen új gént felhasználhatjuk hibrid antibiotikum előállítására, ha olyan mikroorganizmusba visszük be, mely olyan antibiotikumot vagy antibiotikum közterméket termel, mely nem szerepel a tilozin bioszintetikus útjában, de az új gén termékének szubsztátja. Hasonlóképpen a *tylF* gén promotorát vagy más szabályozó szekvenciáját hozzáköthetjük egy nem tilozin antibiotikum bioszintézisgénjéhez, olyan hibrid gént nyerni, ami a *S. fradiae*-ban működőképes. Ezek szerint az itt leírt plazmidokban szereplő antibiotikum bioszintézisgénnek minden alkotóeleme a találmány fontos részét képezi.

Például a *tylF* gén nukleotid sorrendje meghatározza a *tylF* promotort, ami a találmány fontos részét jelenti. A bázissorrendet (a szokásnak megfelelően csak egyik szálát), melyet mi határoztunk meg, az alábbiakban adjuk meg; a *tylF* gén promotora és az átfordítást irányító szakasza hihetőleg az 1. és 207. bázis közötti rész. A szekvencia a *tylF* gén kódoló szakaszának kezdetével fejeződik be.

A találmány további tárgyát képezi a *tylF* gén alábbiakban megadott bázissorrendje. Bemutatjuk a promotort és az átfordítást irányító szakaszt magában foglaló teljes *tylF* gént:

```

      10      20      30      40
5'-TTC GCG GGA TGG ATG CTG ACC CGG GGG TCG GCC AGC AGC GCC CGG ACG

      50      60      70      80      90
TGA TCT GGC GGG AGA TCA GCC AGA CCG GCG CCC CGT CCC ACA GCT CGG

      100     110     120     130     140
CCC GGG CGA TCG GCT CCT CCG CCC GGA GGG CGG CGT ACT GCT CGG GAG

      150     160     170     180     190
GGC TGA AGG GAC AGG TGC GGG CGA CCG GCC AGG CGA TGC TGC GCC GGC

      200     210     220     230     240
CTG CGG CCC CGT CGG TGT CGT TGG CGC GTG CTG CGG GCA ACA GAA TCC

      250     260     270     280
CCT TTT GTG ACG GGC GGG CGT CCC CGG ACG AGG ACA CGA CTC GCT GCG

      290     300     310     320     330
GCC TCA ACG AAA ACA CCG TGT CCG GTG CCC AGG CCA CGA ACG GTG ACC

      340     350     360     370     380
GGT CTG TGT CAG GTC GCC CGT GGT GAC GGG CTC CGG GGC GGC GGC GCG

      390     400     410     420     430
GGC GGC CGA CCT TGA CAT ACC CGC GGC CGG GCT CCT CGT TCC GGC GCG

      440     450     460     470     480
GCC CGC GCC GAT AGC GTC CGT CCT CAC CGG CTC CGG CGT CCG CGT CCC

```

13

1060 1070 1080 1090 1100
 AAG GAC ACC ATG CCG GCT GCG CCC GTG AAG CAG CTC GCG GTG ATG CGC
 LYS ASP THR MET PRO ALA ALA PRO VAL LYS GLN LEU ALA VAL MET ARG
 175 180 185

1110 1120 1130 1140 1150
 CTG GAC GGC GAC TCC TAC GGC GCC ACC ATG GAT GTG CTC GAC AGC CTG
 LEU ASP GLY ASP SER TYR GLY ALA THR MET ASP VAL LEU ASP SER LEU
 190 195 200

1160 1170 1180 1190 1200
 TAC GAG CGG CTG TCG CCG GGC GGT TAC GTC ATC GTC GAC GAC TAC TGC
 TYR GLU ARG LEU SER PRO GLY GLY TYR VAL ILE VAL ASP ASP TYR CYS
 205 210 215 220

1210 1220 1230 1240
 ATC CCG GCC TGC CGC GAG CCG TGC ACG ACT TCC GCG ACC GGC TCG GCA
 ILE PRO ALA CYS ARG GLU ARG CYS THR THR SER ALA THR GLY SER ALA
 225 230 235

1250 1260 1270 1280 1290
 TCC GCG ACA CGA TCC ACC GGA TCG ACC GCC AGG GCG CTA TTG GCG GCA
 SER ALA THR ARG SER THR GLY SER THR ALA ARG ALA LEU LEU ALA ALA
 240 245 250

1300 1310 1320 1330 1340
 CAG CGG CTG AGT CGT TCC GCC CGA GAG CCC GAC GAG AGC AGG AGA TAT
 GLN ARG LEU SER ARG SER ALA ARG GLU PRO ASP GLU SER ARG ARG TYR
 255 260 265

1350 1360 1370 1380 1390
 GCG AGA CAC GAC GCG CCC GCT CGG CAT TGA GGG AGC GTG GGT GAT CCA
 ALA ARG HIS ASP ALA PRO ALA ARG HIS
 270 275

1400 1410 1420 1430 1440
 GCC GGA GAT CCA TCC GGA CCG GCG CGG CGA GTT CCA CGC GTG GTT CCA

1450 1460 1470 1480
 GAG CCA GCC GAG TTC CGG CGG CTG ACC GGT CAC TCC TTC TCC GTG CCG

1490 1500 1510 1520 1530
 CAG GTC GTC AAT ATC GCG TGT CCC GGA AAG GCG CCG CTG CGG CAT CCA

1540 1550 1560 1570 1580
 CTT CTG CCG AGG TGC CAC CGG GCC GAG GCC AAG TAC AGC GGC GTG TGT

1590 1600 1610 1620 1630
 GCA GGG CGC CGG TGT CGA GGT CGT CGT CGA CGC GCC GGT GTC GAG GTC

1640
 GTC GTC GAC-3'

Az A deoxiadenil-, a G deoxiguanil-, a C deoxicitidil- és a T timidilcsoportot jelent. A struktúráján az 541. bázissal kezdődik és az 1371. bázisnál végződik, az 1372. bázissal kezdődik a lezáró „stop kodon”. A ty1F struktúráján aminosavsorrendjét a megfelelő bázissorrend alatt tüntettük fel. Amint az a szakemberek előtt nyilvánvaló, a genetikai kód degeneráltsága miatt a fent megadott bázissorrenddel azonos értelmű szekvencia ugyanazt a ty1F génterméket fogja eredményezni. Az egyenértékű bázissorrendhez a szakemberek előtt ismert módon juthatunk hozzá (lásd pl. Lubert Stryos; Molecular Design of Life, W. H. Freeman and Co. New York 1989, 99–109. old. és J. D. Watson, J. Tooze és D. T. Kurtz: Recombinant DNA-A Show Course, Scientific American Books, New York; 1983; 233–234. old.). A szekvencia a találmány oltalmi körét nem korlátozza.

A *Streptomyces fradiae*-t többféle körülmény között tenyészthetjük, a különböző táptalajok bármelyikét használva. Szénforrásként előnyös komponens a melasz, glükóz, dextrán és glicerin, nitrogénforrásként például a szójaliszt, aminosavkeverék, pepton. A táptalaj tartalmaz szervesen sokat is, ezek a nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium-, foszfát-, klorid-, szulfát- és hasonló ionokat szolgáltató, kereskedelemben beszerezhető sók lehetnek. Mint más mikroorganizmusok esetében a növekedéshez és fejlődéshez szükséges nyomelemeket is adunk a táptalajhoz. Ezek a nyomelemek általában jelen vannak szennyezésként a táptalaj többi alkotórészében. A *S. fradiae*-t aerob körülmények között tenyésztjük, viszonylag széles, pH=5,5–8 kémhatású tartományban, 25–37 °C hőmérsékleten. Közelebből, a tilozint tilozintermelő törzsek tenyésztésével állíthatunk elő, például olyan *S. fradiae* törzsekkel, melyek a jelen találmány szerinti vektorokat tartalmazzák. Nagyon sokféle táptalaj között válogathatunk, minthogy a mikroorganizmus sokféle energiaforrást képes hasznosítani. A termelés gazdaságossága, az antibiotikumhozam maximalizálása és az egyszerűbb kinyerés szempontjából azonban bizonyos tápközegek előnyösebbek. A tilozintermeléshez felhasználható szénforrás például a glükóz, szukróz, fruktóz, keményítő, glicerin, melasz, dextrin, barnacukor, szilárd kukoricalekvár stb. Előnyös szénforrás a glükóz és a keményítő. Asszimilálható nitrogénforrás például a lenmagliszt, vágóhídi műtrágya, halliszt, gyapotmagliszt, zabliszt, őrölt búza, szójaliszt, marhahúskivonat, peptonok (hús vagy szója), kazein, aminosavak keveréke stb. Előnyös nitrogénforrás a szójaliszt, kazein vagy szárított kukoricalekvár.

A nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium-, magnézium-, kobalt-, szulfát-, klorid-, foszfát-, karbonát-, acetát- és nitrátionokat szolgáltató ásványi sók és a növekedési faktorokat tartalmazó desztillátummaradékok és élesztőkivonat táptalajhoz való adagolása kedvező hatással járhat.

Mint más mikroorganizmusok esetében, a találmányban szereplő mikroorganizmusok táptalajában is jelen kell, hogy legyenek a növekedéshez és fejlődéshez szükséges esszenciális nyomelemek. Ezek a nyo-

melemek általában szennyezésként a táptalaj más alkotórészeiben kellő mennyiségben előfordulnak.

A táptalaj kezdeti kémhatása a pH-értékek között változhat, kívánatos azonban, ha pH=5,5 és 8,0 értékek között van, előnyösen pH=6,5–7,0. Mint más mikroorganizmusok tenyésztésénél is, a közeg kémhatása fokozatosan tolódik el a magasabb pH-értékek felé, és elérheti a pH=7,2–8,0 értéket. A végső pH-érték, legalábbis részben, függ a kezdeti kémhatástól, a táptalajban levő puffertól és a mikroorganizmus tenyésztési idejétől.

Nagymennyiségű tilozin termeléséhez sült, aerob tenyésztet használnak. Viszonylag kisebb mennyiségek előállításához rázott lombikot és felületi tenyészteteket is használhatunk, viszont nagyobb mennyiség termeléséhez steril fermentortankokban a sült aerob tenyésztet az előnyös.

A steril fermentorban levő táptalajt spórázott mikroorganizmus szuszpenzióval oltathatjuk be. Minthogy azonban a spóraszuszpenzióval való oltásánál a növekedés lag periódusa figyelhető meg, ennek elkerülése céljából előnyösebb, ha oltóanyagként vegetatív tenyésztet használnak, így a fermentációs berendezést gazdaságosabban ki tudjuk használni. Következésképpen kívánatos először egy viszonylag kis mennyiségű tápközeget a mikroorganizmus spóráival beoltani, majd az így kapott vegetatív inokulummal oltjuk aszeptikusan be a nagy fermentort. A vegetatív inokulum és a termelőtenyésztet táptalaja lehet azonos vagy különböző.

A mikroorganizmus 25–37 °C hőmérsékleten nő a legjobban. A tilozintermelés optimális hőmérséklete 26–30 °C.

Amint az szokásos, a sült tenyészteten steril levegőt hajtunk keresztül. Az eredményes sejtnövekedéshez és tilozintermeléshez az az előnyös, ha a táptalajterfogat egytizedénél több levegőt vezetünk át percenként. Hatékony növekedést és optimális tilozintermelést kapunk, ha a percenként átvezetett levegő mennyisége legalább a tápközeg terfogatával azonos.

A fermentálé tilozin-koncentrációjának változását könnyen nyomon követhetjük a fermentálás alatt, ha meghatározzuk a tenyésztetből vett minták gátló hatását olyan mikroorganizmusok növekedésére, melyekről ismert, hogy tilozin jelenlétében növekedésük gátolt.

A termelt tilozin mennyiségének maximuma a sült aerob tenyésztetknél és rázott kultúráknál általában 2–7 nap alatt, felületi tenyésztetknél 5–10 nap alatt érhető el.

Ha szükséges, a micéliumot és a nem oldott szilárd anyagot a szokásos módon, például szűréssel vagy centrifugálással eltávolítjuk a fermentáléból. Ha szükséges a kiszűrt vagy centrifugálással elválasztott anyagból a tilozint ismert módon eltávolítjuk adszorpciós vagy extrakciós eljárások alkalmazásával.

A kiszűrt anyagból a tilozint előnyös vízzel nem elegyedő, poláros, szerves oldószerekkel extrahálni. Erre a célra alkalmasak a zsírsavészterek, például etil-acetát vagy amil-acetát; klórozott szénhidrogének, például kloroform, etilén-diklorid vagy triklór-etilén; vízzel nem elegyedő alkoholok például butil-alkohol vagy

amil-alkohol; vízzel nem elegyedő ketonok, például metil-izobutil- keton vagy metil-amil-keton; és más oldószerek, például dietil-éter vagy metil-propil-éter, de alkalmazhatók más, hasonló tulajdonságú oldószerek is. Előnyös extrahálószer a kloroform vagy amil-acetát.

A tilozinnak adszorbcio útján való kinyeréséhez különféle adszorbenseket és ioncserelő gyantákat alkalmazhatunk, például szenet, szilikagélt, alumínium-oxidot, savas jellegű ioncserelő gyantákat, mint amilyen az „XE64” és az „IRC50” (a gyengén savas kationcserelő gyantákat a Rohm et Hass Company árulja), karboxi-metil-cellulózt és Dowex 50-et (erősen savas kationcserelő gyanta, beszerezhető a The Dow Chemical Company-tól). A tilozint a kloroformos, acetonos, benzolos vagy más megfelelő oldószerben levő oldatból a fenti adszorbensek valamelyikével vagy valamilyen hasonló adszorbenssel köthetjük meg. Az adszorbeált tilozint megfelelő elúciós technikával leoldhatjuk az adszorbensről, például az adszorbenst alacsony homológorszámmú alkohollal – metanol, etanol – vagy ezeknek az alkoholoknak és alacsony homológorszámmú ketonoknak – aceton – azonos térfogatú elegyével mossuk.

A szerves oldószeres extraktum közvetlen bepárlásával nyers tilozint nyerünk, de a tilozint tisztíthatjuk is. Ez utóbbi esetben a szerves oldószeres extraktumot csökkentett nyomáson betöményítjük, a betöményített oldatot szénnel színtelenítjük, és a tilozint nem poláros oldószert, például petroléter hozzáadásával lecsapjuk. Az így kapott szilárd, tisztított tilozincsapadék rendszerint amorf. Az amorf csapadékot valamelyik fentebb említett oldószerben kristályosítjuk. A szerves oldószeres extraktumból a tilozint adszorbcios kromatográfiával megköthetjük, majd az adszorbeált tilozint eluáljuk.

A kívánt terméknek a fermentléből történő kinyerése más jólismert módszert is alkalmazhatunk.

Tilozin savadéció sokat képezhetünk ásványi savakkal, például kénsavval, sósavval, salétromsavval, szerves savakkal, például borkősavval, glükonsavval, oxálsavval, ecetsavval. A savadéció sokat úgy állíthatjuk elő, hogy a tilozin szabad bázis oldószerében, például acetonban vagy éterben oldjuk és a megfelelő sav ekvimoláris mennyiségét adjuk az oldathoz. A keletkezett só rendszerint kicsapódik az oldatból. Abban az esetben, ha a só nem válna ki, az oldatot kisebb térfogatra pároljuk be, amiből már kicsapódik, vagy olyan elegyedő oldószert adunk az oldathoz, mely a sót nem oldja.

Az elmondottakat az alábbiakban példákön szemléltetjük. A példák kizárólag szemléltető célzatúak, és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

1. példa

A példában a pHJL280 plazmid izolálását ismertetjük

A) Az E.coli K12 HB101/pHJL280 törzs tenyésztéséhez a törzset liofilizált állapotban az NRRL B-18043 katalógusszámon szerezhethetjük be a Northern Regional Research Laboratories-tól. A liofilizált sejteket 50 µg/ml

ampicillint tartalmazó L-agaros táptalajra kenjük ki, hogy E.coli K12 HB101/pHJL280 egysejttelepeket izolálhassunk. A L-agar összetétele: 10 g Bacto Trypton, 5 g Bac to Yeast Extract, 10 g nátrium-klorid, 2 g glükóz és 15 g agar literenként. Egy ilyen teleppel oltunk be 100 ml L-tápotdatot. Az L-tápotdat összetétele azonos az L-agaréval, de nem tartalmaz agart. A tenyészetet aerob körülmények között inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten egy éjszakán keresztül (kb. 16 óra). Másnap reggel 10 perces, 10 000-szer g-on történő centrifugálással összegyűjtjük a sejteket. Az így kapott kb. 1 g sejtől preparáljuk ki a pHJL280 plazmid DNS-t az alábbiak szerint.

B) A plazmid izolálásához a sejtmasszát 10 ml 25% szukrózt és 10 mM Tris-HCl-et tartalmazó oldatban szuszpendáljuk, melynek kémhatása pH=8,0. 50 mM-os Tris-HCl-pufferben, pH=8,0 készült 10 mg/ml töménységű lizozimoldatból 1 ml-t adunk a sejtuszpenzióhoz, 5 percen keresztül. 4 ml 0,25 mM-os etiléndiamin-tetraecetsav-oldatot, pH=8,0 adunk a szuszpenzióhoz, és az inkubációt a jeges fürdőben további 5 percen át folytatjuk. 16 ml lizáló oldatot adunk a lizozimkezelt sejtekhez és 15 percen keresztül inkubálunk 37 °C hőmérsékleten. A lizáló oldat összetétele: 0,4% deoxi-kolát, 1% Brij58 (Sigma Chemical Co., P.O.Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA), 0,05 M Tris-HCl, pH=8,0 és 0,0625 M etilén-diamin-tetraecetsav.

A sejtlyázumot 25 percig centrifugáljuk 48 000-szer g értéken. A felülúszót egy másik csőbe öntjük, melyhez 0,1 térfogat 3,0 M nátrium-acetát-oldatot, pH=8,0 és 0,64 térfogat izopropil-alkoholt adunk. A DNS-csapadékot 20 000 g értéken centrifugáljuk 10 percen keresztül, majd 0,1 térfogat TE-pufferben visszaoldjuk. A TE-puffer összetétele: 10 mM Tris-HCl, pH=7,8 és 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav. A DNS-oldatot 65 °C hőmérsékleten inkubáljuk, 30 percen keresztül, majd cézium-kloridos és propidium-dijodidos gradiens ultracentrifugálással tisztítjuk. A kapott pHJL280 plazmid DNS-t annyi TE-pufferben oldjuk, hogy az oldat koncentrációja 1 µl/ml körüli legyen. A pHJL280 plazmid restrikciós helyeinek térképét a 2. ábrán mutatjuk be.

2. példa

A példában ismertetjük a pHJL284, pHJL309, pHJL311 és a pHJL315 plazmidok izolálását.

A pHJL284, pHJL309, pHJL311 és a pHJL315 plazmidokat tartalmazó, fagyasztva szárított E.coli törzseket a X. táblázatban felsorolt nyilvántartási számokon szerezhethetjük be a Northern Regio Research Laboratory-ból. A plazmidokat lényegében az 1. példában leírt módszer szerint izolálhatjuk és tisztíthatjuk a liofilizált sejtekből. A restrikciós hasítóhelyek térképeit a 2-6. ábrán mutatjuk be.

3. példa

A példában a Streptomyces fradiae GS28/pHJL280 törzs előállítását ismertetjük.

20 ml triptikáz/szója táptalajt (TSB) beoltunk a Streptomyces fradiae GS28 tenyészettel. 29 °C hőmérsékletű, percnként 260 fordulatszámú vízfürdős inkubátorban növesztjük a tenyészetet egy éjszakán keresztül (16 óra).

A tenyészetet homogenizáló edényben (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) T alakú laborkeverővel homogenizáljuk, majd ultrahangos sejteltávolítóval (Heat Systems Ultrasonics, Inc.) 7 másodpercen át 76 Watt teljesítménynél fragmentáljuk. 20 ml, 0,3% (súly/térfogat) glicerint tartalmazó triptikáz/szója (TSB) táptalajt beoltunk 4 ml homogenizált, fragmentált tenyészzel, és 29 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy éjszakán keresztül. A következő reggelen a tenyészetet homogenizáljuk és újra tenyésztjük a fentiek szerint. A harmadik egy éjszakán át tartó inkubálás után a tenyészetet homogenizáljuk, összegyűjtjük P-oldattal kétszer mossuk. A P-oldat összetétele 103 g szukróz, 0,25 g kálium-szulfát és 2,03 g magnézium-diklorid-6-víz, a végső térfogat ionmentes vízzel 700 ml-re feltöltve. Az oldatot sterilizáljuk és 70 ml-éhez hozzáadunk 10 ml kálium-dihidrogén-foszfát-oldatot (0,05 g KH_2PO_4 /100 ml ionmentes víz), 10 ml kalcium-klorid-oldatot (7,78 g CaCl_2 /100 ml ionmentes víz) és 10 ml 0,25 M 2-[[tris-(hidroxil-metil)-metil]-amino-etánszulfonsav] (TES) oldatot, melynek kémhatása pH=7,2.

A sejtüledéket milliliterenként 1 mg lizozimot (Calbiochem, La Jolla, Ca 92037) tartalmazó 15 ml P-oldatban szuszpendáljuk, 1–1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk, protoplasztot képezve. A protoplasztokat centrifugálással kíméletesen összegyűjtjük, kétszer P-oldattal mossuk, majd 2 ml P-oldatban szuszpendáljuk, és felhasználásig jégén tartjuk. 50 µl heparin-szulfát (Sigma) oldathoz (1 mg heparin-szulfát milliliterenként) hozzáadunk 1 µg pHL280 plazmid DNS-t, és jégén inkubáljuk 10 percen keresztül. Sokkal kevesebb, 5–100 nanogramm, plazmid DNS-t használhatunk a *Streptomyces fradiae* transzformálásához, ha *S. fradiae* gazdasejtéből preparáljuk a plazmidot. A *Streptomyces*-ből történő plazmidizolálásra Hopwood és munkatársai írnak le eljárást (Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual, 1985; John Innes Foundation, Norwich, England). A DNS/heparin oldatot hozzáadjuk 200 µl protoplaszthoz, majd hozzáadunk 0,9 ml 55% PEG 1000-t (polietilén-glikol) (Sigma) tartalmazó P-oldatot, és keverékét gyengéden keverjük szobahőmérsékleten.

A keverék különböző mennyiségeit R2 lemezekre visszük 4 ml lágy-R2-aggarral felülrétegezve. Az R2 lemezeket 30 ml R2 tápközegből készítjük, és 37 °C hőmérsékleten szárítjuk 4 napon át. Az R2 táptalaj összetétele: 103 g szukróz, 0,25 g kálium-szulfát, 2 ml nyomelemoldat, 10,12 g magnézium-klorid-6-víz, 10,0 g glükóz, 2,0 g L-aszparagin, 0,1 g kazaminosav, 22 g agar 700 ml vízben; sterilizálás után az oldathoz hozzáadunk 100 ml kálium-dihidrogén-foszfát-oldatot (0,05 g KH_2PO_4 100 ml ionmentes vízben), 100 ml kalcium-klorid-oldatot (2,22 g CaCl_2 100 ml ionmentes vízben) és 100 ml 0,25 M TES-oldatot, pH=7,2. Az oldat végső kémhatását pH=7,2 értékre állítjuk be. A nyomelemoldat összetétele: 40 mg cink(II)-klorid, 200 mg vas(III)-klorid-6-víz, 10 mg réz(II)-klorid-2-víz, 10 mg magán(II)-klorid-4-víz, 10 mg nátrium-tetraborát-10-víz és 10 mg ammónium(IV)-molibdát-4-víz $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ literenként. A lágy-R2-agar összetétele: 51,5 g szuk-

róz, 5,06 g magnézium-klorid-6-víz, 1,11 g kalcium-klorid, 50 ml 0,25 M TES-oldat, pH=7,2 és 2,05 g agar, a végső térfogat ionmentes vízzel 500 ml-re beállítva. A keveréket gőzben megolvastjuk, 4 ml-es kivételekben szétöntjük és használat előtt autoklávozzuk. Miután a transzformált protoplasztokat a lemezekre vittük, 29 °C hőmérsékleten inkubálunk 24 órán keresztül, majd 25 µl tiosztrepton (E. R. Squibb, Princeton, NJ 08240) oldatot (50 mg tiosztrepton milliliterenként) tartalmazó 4 ml lágy-R2-aggart terítünk a protoplasztokra. A lemezeket addig inkubáljuk 29 °C hőmérsékleten, amíg a regeneráció nem teljes, ehhez 7–14 napra van szükség. Így szelektálódnak a *S. fradiae* GS28/pHL280 transzformánsok.

A *Streptomyces fradiae* GS28/pHL280 törzset tenyésztjük, a mikroorganizmus a nem transzformált *S. fradiae* GS28 törzsnél magasabb szinten termel O-metil-transzferáz-enzimet és tilozint. A makrocin-O-metil-transzferáz aktivitását lényegében Yeh és munkatársai módszerével határozzuk meg [J. Chrom., 288: 157–165 (1984)]. Összehasonlítva a transzformált GS28/pHL280 törzset a nem transzformált GS28 törzsszel, kitűnt, hogy a transzformált törzs 60–100-szoros makrocin-O-metil-transzferáz aktivitással és 14–18-szor magasabb tilozintermeléssel jellemezhető. A tilozintermelést Baltz és Seno [Antimicrobial Agents and Chemotherapy 20: 214–225 (1981)], valamint J. H. Kennedy [J. Chrom., 281: 288–292 (1983)] módszerével határozzuk meg.

30 4. példa

A *Streptomyces fradiae* GS15/pHL280 törzset a 3. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy *S. fradiae* GS28 törzs helyett *Streptomyces fradiae* GS15 törzset használunk. A transzformált törzset 72 órán keresztül tenyésztve, az a nem transzformált *S. fradiae* GS15 törzsnél magasabb szinten termeli a makrocin-O-metil-transzferázt és a tilozint, amit a nem transzformált törzs alig kimutatható szinten termel.

40 5. példa

A *Streptomyces fradiae* GS15/pHL284 törzset a 4. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a pHL280 plazmid helyett pHL284 plazmidot használunk. A transzformált törzs a nem transzformált *S. fradiae* GS15 törzsnél több makrocin-O-metil-transzferázt és tilozint termel.

50 6. példa

A *Streptomyces fradiae* GS16/pHL280 törzset a 3. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a *Streptomyces fradiae* GS28 helyett *S. fradiae* GS16-t használunk. A transzformált törzset tenyésztjük, a törzs a ty1E gén termékét, a demetil-makrocin-O-metil-transzferázt és a tilozint a nem transzformált törzsnél nagyobb mennyiségben állítja elő. A demetil-makrocin-O-metil-transzferáz aktivitását, illetve a tilozintermelést a fentebb említett módszerek szerint határozzuk meg, azzal a különbséggel, hogy szubsztrátként a makrocin helyett demetil-makrocint használunk.

7. példa

A *Streptomyces fradiae* GS76/pHJL280 törzset a 3. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a *Streptomyces fradiae* GS28 törzs helyett *S. fradiae* GS76-ot használunk. A transzformált törzset tenyésztjük, a törzs a ty1D és a ty1H gének termékeit, valamint a tilozint a nem transzformált törzsnél nagyobb mennyiségben állítja elő.

8. példa

A *Streptomyces fradiae* GS48/pHJL280 törzset a 3. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a *S. fradiae* GS28 törzs helyett *Streptomyces fradiae* GS48-at használunk. A transzformált törzset tenyésztjük, a törzs a ty1D gén termékét és a tilozint nagyobb mennyiségben állítja elő, mint a nem transzformált törzs.

9. példa

A *Streptomyces fradiae* GS52/pHJL284 törzset a 3. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a *S. fradiae* GS28 törzs és a pHJL284 plazmid helyett *Streptomyces fradiae* GS52 törzset, illetve

pHJL284 plazmidot használunk. A transzformált törzset tenyésztjük, a törzs a ty1C gén termékét és a tilozint nagyobb mennyiségben állítja elő, mint a nem transzformált törzs.

10. példa

Az alábbi táblázatokban a módszerünk hatékonyságát mutatjuk be, feltüntetve a sebességkorlátozó enzimek fajlagos aktivitását és a megnövekedett tilozintermelést. A táblázatokban szereplő valamennyi transzformáns a 3. példában leírtak szerint nyertük. A XII. és XIII. táblázatban feltüntetett eredményeket olyan tenyészeteknél kaptuk, melyek táptalaja 20 µg/ml tiosztrepton [Baltz és Seno; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 20: 214-225 (1981)]. Megjegyezzük, hogy a XII. és XIII. táblázatban felsorolt transzformált törzsek alacsony tilozintermelő képességűek, vagy a tilozint alig kimutatható mennyiségben termelik, és szelekciós nyomás (tiosztrepton) alatt tenyésztettük őket, hogy a plazmid önállóan replikálódó vektorokként megmaradjon a sejtekben.

XII. táblázat

A ty1F gén termékének, a makrocin-O-metil-transzferáznak (MOMT) fajlagos aktivitása

Kísérlet	törzs	transzformáló plazmid	2. nap ¹	3. nap	4. nap	6. nap
1	GS15	pHJL210 ⁴	0	0	0	0
	GS15	pHJL280	1,14	1,93	nem vizsgált	n. v. (n. v.)
2	C4 ²	nincs	n. v.	0,35	0,16	n. v.
	GS15	pHJL210	0	0	0	0
	GS15	pHJL280	4,2	3,2	2,2	1,8
	C4	nincs	0,8	1,0	0,9	0,9
	T1405 ³	nincs	0,9	1,2	1,5	1,4
3	GS28	nincs	0	0,01	0,03	n. v.
	GS28	pHJL210	0	0	0	n. v.
	GS28	pHJL280	0,8	0,7	1,0	n. v.
	GS28	pHJL284	0,9	1,2	0,9	n. v.
	C4	nincs	0,2	0,6	0,5	n. v.

¹=fermentációs napok száma,

²= a GS15 és GS28 törzse eredeti szülő törzse,

³=C4 törzsből származó törzs,

⁴= az a klónozó vektor, amelyikbe a ty1 géneket beépítettük, hogy megkapjuk a pHJL280 és a pHJL284 plazmidokat.

XIII. táblázat

A ty1E gén termékének, a demetil-makrocin-O-metil-transzferáznak (DMOMT) fajlagos aktivitása

törzs	transzformáló plazmid	2. nap*	3. nap	4. nap
GS16	pHJL210	0	0	0
GS16	pHJL280	1,8	3,7	4,0
GS16	pHJL280	3,8	1,7	3,0
GS16	pHJL284	1,3	1,6	2,2

törzs	transzformáló plazmid	DMOMT fajlagos aktivitás		
		2. nap*	3. nap	4. nap
C4	pHJL210	0,7	1,3	1,5
C4	pHJL210	0,2	1,1	1,9
C4	nincs	0,4	1,5	1,0

* a fermentációs napok száma

A XIV. táblázat eredményeit magas tilozintermelő képességű transzformánsokkal kaptuk, melyeket a transzformáció után tenyésztettünk, hogy integránsokhoz jussunk, azaz olyan transzformánsokhoz, melyeknél a plazmid DNS részben vagy egészen beépült a gazdasejt genomjába. Az integránsok előállítására két módszert alkalmazunk. Az első eljárásban a transzformánsokat szelektív (tiosztrepontot tartalmazó) és nem szelektív szilárd táptalajra oltjuk, és 16 órán át 29 °C hőmérsékleten inkubáljuk, hogy különálló telepekhez jussunk. A nem szelektív táptalajról azokat a különálló telepeket, melyek szelektív táptalajon tiosztrepont-rezisztenciát mutatnak néhányszor átoltjuk, amíg úgy nem találjuk, hogy a különálló telep szelekció nélkül is viszonylag stabil. A másik eljárás szerint a transzformánsokat néhányszor átoltjuk nem szelektív körülmények között, oly módon, hogy egy vattatamponnal a tenyészet felületéről átvisszük a spórákat egy másik lemezre. Néhányszor átoltás után a telepeket nem szelektív folyékony táptalajon (TSB) növesztjük, homogenizáljuk, ultrahanggal fragmentáljuk, hígítjuk és szelektív, illetve nem szelektív szilárd táptalajon kiválogatjuk a viszonylag stabil integránsokat. A szakirodalomban más módszereket is találunk az integránsok nyerésé-

re, a találmányunk nem korlátozódik az integránsok előállításának egy adott módszerére.

A viszonylag stabil integránsokat használjuk a vegetatív tenyészet tápközegének beoltására. A komplex vegetatív táptalaj összetétele: 10 g kukoricalekvár, 3 g kalcium-karbonát, 4,5 g nyers szójaolaj literenként; a kémhatást pH=7,8 értékre állítjuk be nátrium-hidroxiddal. A TSB ugyancsak alkalmas tápközeg. A vegetatív táptalaj nem tartalmaz tiosztrepontot (nincs szelekciós nyomás). 10% vegetatív tenyészetet oltjuk be a fermentációs táptalajba, ami szintén nem tartalmaz tiosztrepontot. A fermentációt 29 °C hőmérsékleten végezzük 260 percenkénti fordulatszámmal 7 napon keresztül. A fermentálé összmakrolid mennyiségének meghatározásához metanol/kloroform eleggyel extrahálunk, 290 nm-en mérjük a fényelnyelést és a kapott értékből standard görbe segítségével állapítjuk meg a koncentrációt. A tilozinfaktorok azonosításához a fermentlevet szilikagéses vékonyréteglemezre cseppentjük, és etil-acetát/dietil-amin, 95:5 futtatórendszerrel kromatografáljuk. Az egyes makrolid-komponensek mennyiségét úgy határozzuk meg, hogy a 290 nm-nél megállapított összmakrolid mennyiséget megszorozzuk a HPLC-vel meghatározott százalékos részesedéssel.

XIV. táblázat

Törzs	Tiosztrepont rezisztencia %	Transzformáló plazmid	DMOMT fajlagos aktivitás	MOMT fajlagos aktivitás	Tilozin*
C4	0	nincs	0,59	0,14	1
C4	9,5	pHJL280	nem vizsgált (n. v.)	n. v.	1,10
C4	5,9	pHJL280	n. v.	n. v.	0,97
T1405	0	nincs	1,0	0,17	1,14
T1405	50	pHJL280	0,91	0,26	1,52
T1405	8,7	pHJL280	n. v.	n. v.	1,21
T1405	11	pHJL280	n. v.	n. v.	1,07
T1405	6,4	pHJL280	n. v.	n. v.	1,21
T1405	18	pHJL280	2,5	0,43	1,60
T1405	4,6	pHJL280	n. v.	n. v.	0,98
T1405	16	pHJL280	n. v.	n. v.	1,07
T1405	12	pHJL280	n. v.	n. v.	1,10
T1405	18	pHJL280	n. v.	n. v.	1,28
T1405	25	pHJL280	n. v.	n. v.	1,28
T1405	56	pHJL280	0,82	0,22	1,45

*-A C4 törzshöz viszonyítva

11. példa

A tilozin előállítását az alábbiak szerint végezzük. A találmányunk szerint előállított, plazmidot hordozó *Streptomyces fradiae* törzs spórás tenyészetéhez úgy jutunk, hogy a mikroorganizmust a következő összetételű táptalajra oltjuk:

élesztő kivonat	1,0 g
marhahúskivonat	1,0 g
hidrolizált kazein („N-Z-Amine-Type A”, Sheffield Chemical Co.)	2,0 g
dextrin	10,0 g
kobalt-klorid-7-víz	20,0 g
agar	20,0 g
víz	1 liter.

A táptalaj kémhatását nátrium-hidroxiddal pH=7,3 értékre állítjuk be.

A ferde agart a kívánt törzs spóráival oltjuk be és öt napon át inkubáljuk 30 °C hőmérsékleten. A spórázott tenyészetet a ferde agaron vízzel fedjük, és óvatosan dörzsölve vizes spóraszuszpenziót készítünk.

Aszeptikus körülmények között 1 ml spóraszuszpenzióval beoltunk 100 ml alábbi összetételű steril vegetatív tápközeget:

glükóz	15 g
szójaliszt	15 g
kukoricafehérje, szilárd	15 g
nátrium-klorid	5 g
kalcium-karbonát	2 g
csapvízzel	1 literre feltöltve.

A beoltott vegetatív táptalajt 30 °C hőmérsékleten inkubáljuk 48 órán keresztül, miközben 5 cm kitérésű rázógépen percnként 114 fordulatszámmal rázatjuk.

Aszeptikus körülmények között 5 ml vegetatív oltótenyészetet 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban beoltunk 100 ml alábbi összetételű termelő táptalajt:

szójaliszt	15 g
kazein	1 g
nyers glükózzirup	20 ml
kalcium-karbonát	2,5 g
nátrium-nitrát	3 g
csapvízzel kiegészítjük	1 literre.

A beoltott tenyészetet 26–28 °C hőmérsékleten inkubáljuk 100 órán keresztül. Az inkubáció alatt a lombikokat 5 cm kitérésű reciprok rázógépen rázatjuk percnként 114 fordulatszámmal. A kiindulási tápközegek kémhatása pH=6,5, ez az érték az inkubációs idő végére általában pH=7,5-re emelkedik.

A fermentléből a micéliumot és más oldhatatlan alkotórészt kiszűrjük. A leszűrt fermentlé tartalmazza a tilozint.

12. példa

A tilozintermelés egy másik változatát a következőképpen végezzük.

A kívánt transzformált mikroorganizmus spórás tenyészetét az alábbi összetételű ferde agaron növesztjük ki:

paradicsompaszta	20 g
előre főzött zabliszt	20 g
agar	15 g
vízzel a térfogat kiegészítve	1 literre.

A ferde agart a mikroorganizmus spóráival oltjuk be, majd 30 °C hőmérsékleten inkubáljuk 9 napon át. Az inkubációs idő után a spórázott tenyészetet vízzel fedjük, és a felület óvatos dörzsölésével spóraszuszpenziót készítünk.

Aszeptikus körülmények között az így kapott spóraszuszpenzió felével 2 literes Erlenmeyer-lombikban beoltunk 500 ml alábbi összetételű steril vegetatív táptalajt:

(kukoricafehérje/élesztő táptalaj I)	
glükóz	15 g
kukoricafehérje, szilárd	5 g
élesztő	5 g
kalcium-karbonát	5 g
vízzel a térfogat kiegészítve	1 literre.

Az inkubációt 28 °C hőmérsékleten végezzük 48 órán át, a lombikokat 5 cm kitérésű reciprok rázógépen rázatva percnként 110 fordulatszámmal.

1,1 liter vegetatív inokulummal aszeptikus körülmények között beoltunk egy 1600 literes fémfermentorban levő 1100 liter fenti összetételű kukoricafehérje/élesztő I táptalajt. Az erős habzás meggátlására a táptalajhoz hozzáadunk 110 ml Antifoam A habzásgátlót (The Dow Corning Company). Ha a fermentáció alatt habzás lépne fel további habzásgátlót adunk a fermentléhez. A beoltott táptalajt 28 °C hőmérsékleten fermentáljuk 24 órán keresztül, eközben a tenyészetet percnként 760 liter steril levegővel levegőztetjük és 40 cm-es lapátú keverővel keverjük percnként 160-as fordulatszámmal.

Egy 7700 literes vas fermentorba 5500 liter alábbi összetételű táptalajt adagolunk:

(kukoricafehérje/szója táptalaj XII)	
glükóz	30 kg
szójaolaj maradék, liszt	15 kg
kukoricafehérje, szilárd	5 kg
nyers szójaolaj	10 kg
kalcium-karbonát	2 kg
nátrium-klorid	5 kg
vízzel a térfogat feltöltve	1000 literre.

A táptalajt beoltjuk 435 liter fermentorban kinövesztett inokulummal. 28 °C hőmérsékleten fermentálunk 4 napon keresztül, és ha habzás lépne fel Larex NO1 habzásgátlót (Swift et Company) adagolunk. A fermentlevet percnként 3630 liter steril levegővel levegőztetjük és 60 cm-es lapátú keverővel kevertetjük percnként 130 fordulatszámmal.

A fermentléhez hozzáadunk 270 kg Silfo-t (diatóma-föld szűrészalék; The Silfo Company), és a keveréket

leszűrjük. A szűrlet kémhatását 20%-os nátrium-hidroxid-oldattal pH=8,5 értékre állítjuk be, majd hozzáadunk 2270 liter kloroformot, 30 percen át kevertetünk, az emulziós kloroformos fázist elválasztjuk. A kloroformos extrahálást, további 2•2270 liter kloroformot, 30 percen át kevertetünk, az emulziós kloroformos fázist elválasztjuk. A kloroformos extrahálást további 2•2270 liter kloroformmal megismétljük. A tilozint tartalmazó kloroformos emulziókat egyesítjük, De Laval szeparátoron átengedve az emulziót megtörjük, és a kloroformos oldatot csökkentett nyomáson 25 literre pároljuk. A szennyezések nagy részét eltávolítjuk oly módon, hogy az oldatot 10 kg aktív szenet (Pittsburgh Coke and Chemical Co.) tartalmazó 15 cm átmérőjű oszlopon engedjük át.

A szénoszlopot 16 liter kloroformmal mossuk, a tilozint tartalmazó kloroformos eluenseket egyesítjük, és csökkentett nyomáson 2 liter térfogatúra pároljuk. A kloroformos koncentrátumot keverés közben lassan hozzáadjuk 20 liter petroléterhez, a keverést még 15 percen át folytatjuk, és a kivált fehér, amorf tilozint kiszűrjük.

Az amorf tilozint 355 ml acetonban oldjuk, a finom csapadékot kiszűrjük, és az acetonos szűrletet lassú keverés mellett 20 liter 5 °C hőmérsékletű vízhez adjuk. A vizes acetonos oldatot szobahőmérsékleten lassan kevertetve hagyjuk, hogy az aceton elpárologjon, miközben a tilozin kikristályosodik. A tilozin kristályokat kiszűrjük, és csökkentett nyomáson szobahőmérsékleten szárítjuk.

Op.: 127–132 °C.

13. példa

A tilozin-tartarát előállításához 5 g kristályos tilozint feloldunk 100 ml acetonban és kevertetés közben 20 ml acetonban oldva hozzáadunk 1,5 g D-borkősavat. Az oldatot hagyjuk szobahőmérsékleten állni, miközben a tilozin-tartarát kikristályosodik az oldatból. A tartarátot szűrővel kinyerjük, acetonnal mossuk és levegőn szárítjuk.

Op.: 140–146 °C.

14. példa

A tilozin-glükonát előállításához 10 ml vízben feloldunk 1,03 g glükono-delta-laktont, az oldatot 2 órán át 85 °C hőmérsékleten tartjuk, miközben a lakton glükonsavvá hidrolizálódik. 15 ml meleg metanolt, majd 10 ml metanolban oldva 5 g tilozint adunk kevertetés közben az oldathoz. Az oldatot hagyjuk egy éjszakán át szobahőmérsékleten állni, majd a metanolt csökkentett nyomáson és szobahőmérsékleten elpároljuk. A metanol előzése után 40 ml vizet adunk a rendszerhez, szűrjük, a szűrletet fagyaszta szárítjuk, a tilozin-glükonátot fehér szilárd anyagként kapjuk meg.

Op.: 114–117 °C.

15. példa

A tilozin-hidroklorid előállításához 200 ml éterben feloldunk 890 mg tilozint. Az éteres keveréket 0,082 ml 12 n sósav hozzáadásával megsavanyítjuk. A kicsapódó tilozin-hidrokloridot kiszűrjük, éterrel mossuk, csökken-

tett nyomáson szárítjuk. A tilozin-hidrokloridot etanol/éter elegyből átkristályosítjuk.

Op.: 141–145 °C.

16. példa

A *Streptomyces fradiae* GS15/pHJL311 törzset a 3. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a *Streptomyces fradiae* GS28 és pHJL280 plazmid helyett *Streptomyces fradiae* GS15-öt és pHJL311 plazmidot használunk. A kapott törzseket tenyészítjük, mely a tilozint a nem transzformált törzsnél nagyobb mennyiségben állítja elő.

17. példa

A *Streptomyces fradiae* GS15/pHJL315 törzset a 3. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a *Streptomyces fradiae* GS28 és pHJL280 plazmid helyett *Streptomyces fradiae* GS15-öt és pHJL315 plazmidot használunk. A kapott törzseket tenyészítjük, mely a tilozint a nem transzformált törzsnél nagyobb mennyiségben állítja elő.

18. példa

A *Streptomyces fradiae* GS28/pHJL284 törzset a 3. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a *Streptomyces fradiae* GS28 és pHJL280 plazmid helyett *Streptomyces fradiae* GS28-at és pHJL284 plazmidot használunk. A kapott törzseket tenyészítjük, mely a tilozint a nem transzformált törzsnél nagyobb mennyiségben állítja elő.

19. példa

A *Streptomyces fradiae* GS52/pHJL311 törzset a 3. példában leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a *Streptomyces fradiae* GS28 és pHJL280 plazmid helyett *Streptomyces fradiae* GS52-t és pHJL311 plazmidot használunk. A kapott törzseket tenyészítjük, mely a tilozint a nem transzformált törzsnél nagyobb mennyiségben állítja elő.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás antibiotikum, antibiotikum-előanyag vagy az antibiotikum gyógyászati szempontból elfogadható sójának előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az antibiotikumot vagy előanyagát termelő mikroorganizmust az adott antibiotikum bioszintézisút enzimeinek vagy sebességkorlátozó enzimének DNS génszakaszát hordozó vektorral transzformáljuk, a transzformált mikroorganizmust asszimilálható szénforrást, nitrogénforrást és szervesen sókat tartalmazó táptalajon aerob körülmények között tenyészítjük, és az említett antibiotikum bioszintézisgént a mikroorganizmus megnövelt antibiotikum-termelő képességet biztosító fermentációs körülmények között kifejezzük. (Elsőbbsége: 1986. 03. 21.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy *Streptomyces*, *Cephalosporium* vagy *Penicillium* mikroorganizmust transzformálunk. (Elsőbbsége: 1986. 03. 21.)

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként egy tilozin-antibiotikumot vagy tilozin- előanyagot termelő, a tilozin bioszintézisút kivitelezésére alkalmas és valamely tilozin bioszintézisgént tartalmazó *Streptomyces* törzset alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1986. 03. 21.)

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a mikroorganizmus *Streptomyces fradiae* mikroorganizmust alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1986. 03. 21.)

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tilozin bioszintézisgénként ty1C, ty1D, ty1E, ty1F, ty1H, ty1J, ty1K, ty1L vagy ty1M gént alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1986. 03. 21.)

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bioszintézisgénként a következő szekvenciájú ty1F gént alkalmazzuk:

```

      10      20      30      40
5'-TTC GCG GGA TGG ATG CTG ACC CGG GGG TCG GCC AGC AGC GCC CGG ACG
      50      60      70      80      90
TGA TCT GGC GGG AGA TCA GCC AGA CCG GCG CCC CGT CCC ACA GCT CGG
      100     110     120     130     140
CCC GGG CGA TCG GCT CCT CCG CCC GGA GGG CGG CGT ACT GCT CGG GAG
      150     160     170     180     190
GGC TGA AGG GAC AGG TGC GGG CGA CCG GCC AGG CGA TGC TGC GCC GGC
      200     210     220     230     240
CTG CGG CCC CGT CGG TGT CGT TGG CGC GTG CTG CGG GCA ACA GAA TCC
      250     260     270     280
CCT TTT GTG ACG GGC GGG CGT CCC CGG ACG AGG ACA CGA CTC GCT GCG
      290     300     310     320     330
GCC TCA ACG AAA ACA CCG TGT CCG GTG CCC AGG CCA CGA ACG GTG ACC
      340     350     360     370     380
GGT CTG TGT CAG GTC GCC CGT GGT GAC GGG CTC CGG GGC GGC GGC GCG
      390     400     410     420     430
GGC GGC CGA CCT TGA CAT ACC CGC GGC CGG GCT CCT CGT TCC GGC GCG
      440     450     460     470     480
GCC CGC GCC GAT AGC GTC CGT CCT CAC CGG CTC CGG CGT CCG CGT CCC
      490     500     510     520
CGC CGG GAC CTG CCA CCT CTC CCG ACC CCG CGA GCC GAT CGA CCC GCT
      530     540     550     560     570
ACT GGA GGA CCC GTG GCA CCT TCC CCG GAC CAC GCC CGC GAT CTC TAC
      VAL ALA PRO SER PRO ASP HIS ALA ARG ASP LEU TYR
      580     590     600     610     620
ATC GAG CTG CTG AAG AAG GTC GTC TCG AAC GTC ATC TAC GAG GAC CCC
ILE GLU LEU LEU LYS LYS VAL VAL SER ASN VAL ILE TYR GLU ASP PRO
      15      20      25
      630     640     650     660     670
ACC CAT GTG GCG GGG ATG ATC ACC GAC GCG TCG TTC GAC CGG ACG TCC
THR HIS VAL ALA GLY MET ILE THR ASP ALA SER PHE ASP ARG THR SER
      30      35      40

```

CGT	GAG	AGC	GGC	GAG	GAC	TAC	CCC	ACG	GTC	GCC	CAC	ACG	ATG	ATC	GGC
ARG	GLU	SER	GLY	GLU	ASP	TYR	PRO	THR	VAL	ALA	HIS	THR	MET	ILE	GLY
45					50				55						60
CTC	AAG	CGT	CTG	GAC	AAT	CTC	CAC	CGG	TGC	CTC	GCG	GAC	GTC	GTG	GAG
LEU	LYS	ARG	LEU	ASP	ASN	LEU	HIS	ARG	CYS	LEU	ALA	ASP	VAL	VAL	GLU
				65					70					75	
770				780				790			800			810	
GAC	GGC	GTC	CCC	GGT	GAC	TTC	ATC	GAG	ACC	GGG	GTG	TGC	CGC	GCG	CCG
ASP	GLY	VAL	PRO	GLY	ASP	PHE	ILE	GLU	THR	GLY	VAL	CYS	ARG	ALA	PRO
			80					85					90		
820				830				840			850			860	
TGC	ATC	TTC	GCC	CGC	GGA	CTG	CTG	AAC	GCG	TAC	GGC	CAG	GCC	GAC	CGC
CYS	ILE	PHE	ALA	ARG	GLY	LEU	LEU	ASN	ALA	TYR	GLY	GLN	ALA	ASP	ARG
	95						100					105			
870				880				890			900			910	
ACC	GTC	TGG	GTC	GCC	GAC	TCC	TTC	CAG	GGC	TTT	CCC	GAG	CTG	ACC	GGG
THR	VAL	TRP	VAL	ALA	ASP	SER	PHE	GLN	GLY	PHE	PRO	GLU	LEU	THR	GLY
	110					115					120				
920				930				940			950			960	
TCC	GAC	CAC	CCG	CTG	GAC	GTC	GAG	ATC	GAC	CTC	CAC	CAG	TAC	AAC	GAG
SER	ASP	HIS	PRO	LEU	ASP	VAL	GLU	ILE	ASP	LEU	HIS	GLN	TYR	ASN	GLU
	125				130					135					140
970				980				990			1000				
GCC	GTG	GAC	CTG	CCC	ACC	AGC	GAG	GAG	ACC	GTG	CGG	GAG	AAC	TTC	GCC
ALA	VAL	ASP	LEU	PRO	THR	SER	GLU	GLU	THR	VAL	ARG	GLU	ASN	PHE	ALA
				145					150					155	
1010				1020				1030			1040			1050	
CGG	TAC	GGG	CTG	CTC	GAC	GAC	AAC	GTC	CGT	TTC	CTG	GCG	GGG	TGG	TTC
ARG	TYR	GLY	LEU	LEU	ASP	ASP	ASN	VAL	ARG	PHE	LEU	ALA	GLY	TRP	PHE
			160					165					170		
1060				1070				1080			1090			1100	
AAG	GAC	ACC	ATG	CCG	GCT	GCG	CCC	GTG	AAG	CAG	CTC	GCG	GTG	ATG	CGC
LYS	ASP	THR	MET	PRO	ALA	ALA	PRO	VAL	LYS	GLN	LEU	ALA	VAL	MET	ARG
	175						180						185		
1110				1120				1130			1140			1150	
CTG	GAC	GGC	GAC	TCC	TAC	GGC	GCC	ACC	ATG	GAT	GTG	CTC	GAC	AGC	CTG
LEU	ASP	GLY	ASP	SER	TYR	GLY	ALA	THR	MET	ASP	VAL	LEU	ASP	SER	LEU
	190					195					200				
1160				1170				1180			1190			1200	
TAC	GAG	CGG	CTG	TCG	CCG	GGC	GGT	TAC	GTC	ATC	GTC	GAC	GAC	TAC	TGC
TYR	GLU	ARG	LEU	SER	PRO	GLY	GLY	TYR	VAL	ILE	VAL	ASP	ASP	TYR	CYS
205					210					215					220

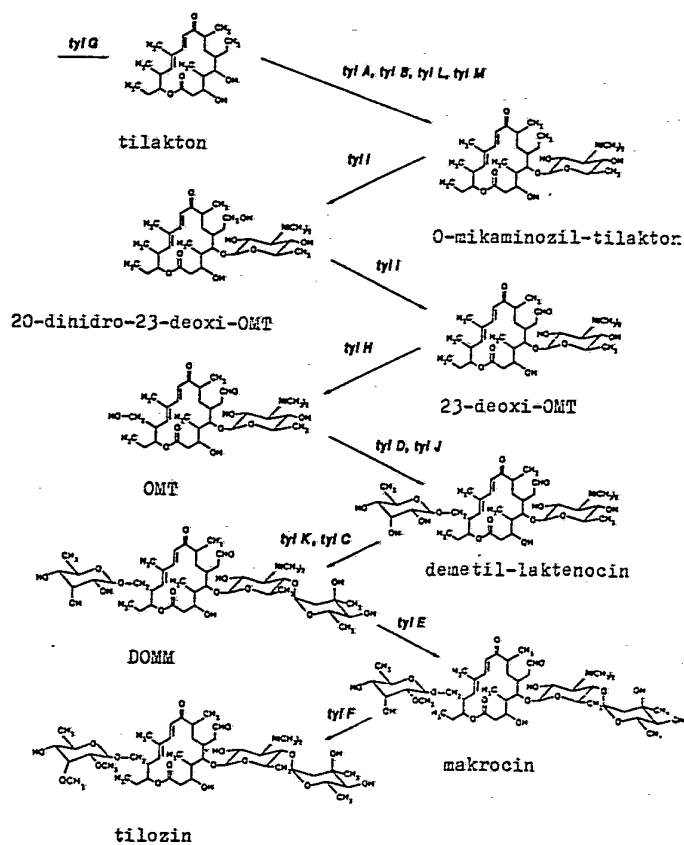
1210 1220 1230 1240
 ATC CCG GCC TGC CGC GAG CGG TGC ACG ACT TCC GCG ACC GGC TCG GCA
 ILE PRO ALA CYS ARG GLU ARG CYS THR THR SER ALA THR GLY SER ALA
 225 230 235
 1250 1260 1270 1280 1290
 TCC GCG ACA CGA TCC ACC GGA TCG ACC GCC AGG GCG CTA TTG GCG GCA
 SER ALA THR ARG SER THR GLY SER THR ALA ARG ALA LEU LEU ALA ALA
 240 245 250
 1300 1310 1320 1330 1340
 CAG CGG CTG AGT CGT TCC GCC CGA GAG CCC GAC GAG AGC AGG AGA TAT
 GLN ARG LEU SER ARG SER ALA ARG GLU PRO ASP GLU SER ARG ARG TYR
 255 260 265
 1350 1360 1370 1380 1390
 GCG AGA CAC GAC GCG CCC GCT CGG CAT TGA GGG AGC GTG GGT GAT CCA
 ALA ARG HIS ASP ALA PRO ALA ARG HIS
 270 275
 1400 1410 1420 1430 1440
 GCC GGA GAT CCA TCC GGA CCG GCG CGG CGA GTT CCA CGC GTG GTT CCA
 1450 1460 1470 1480
 GAG CCA GCC GAG TTC CGG CGG CTG ACC GGT CAC TCC TTC TCC GTG CCG
 1490 1500 1510 1520 1530
 CAG GTC GTC AAT ATC GCG TGT CCC GGA AAG GCG CCG CTG CGG CAT CCA
 1540 1550 1560 1570 1580
 CTT CTG CCG AGG TGC CAC CGG GCC GAG GCC AAG TAC AGC GGC GTG TGT
 1590 1600 1610 1620 1630
 GCA GGG CGC CGG TGT CGA GGT CGT CGT CGA CGC GCC GGT GTC GAG GTC
 1640
 GTC GTC GAC-3'

(Elsőbbsége: 1986. 07. 25.)

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a klónozó vektorként pHJL284, pHJL309, pHJL311 vagy pHJL315 plazmidot alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1986. 03. 21.)

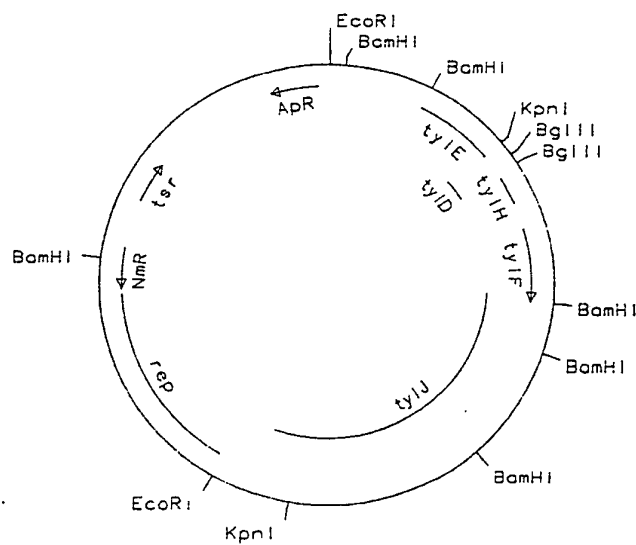
8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a klónozó vektorral transzformált mikroorganiz-

5 musként a *Streptomyces fradiae* GS15/pHJL280, *S. fradiae* GS15/pHJL284, *S. fradiae* GS28/pHJL280, *S. fradiae* GS16/pHJL280, *S. fradiae* GS48/pHJL280, *S. fradiae* GS52/pHJL284 vagy *S. fradiae* GS76/pHJL280 mikroorganizmust alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1986. 03. 21.)

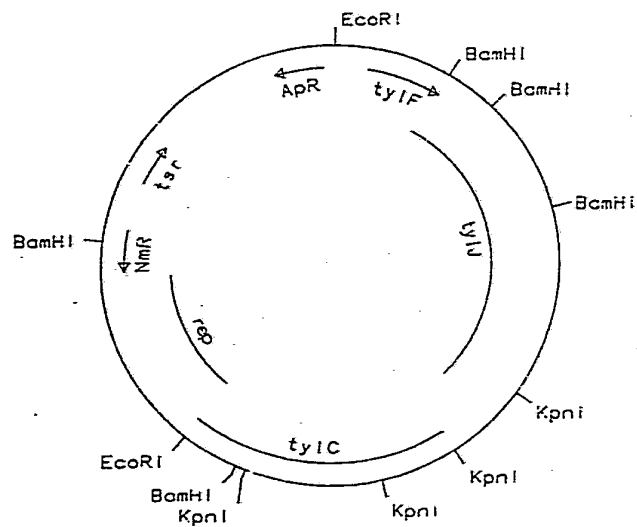


1.ábra

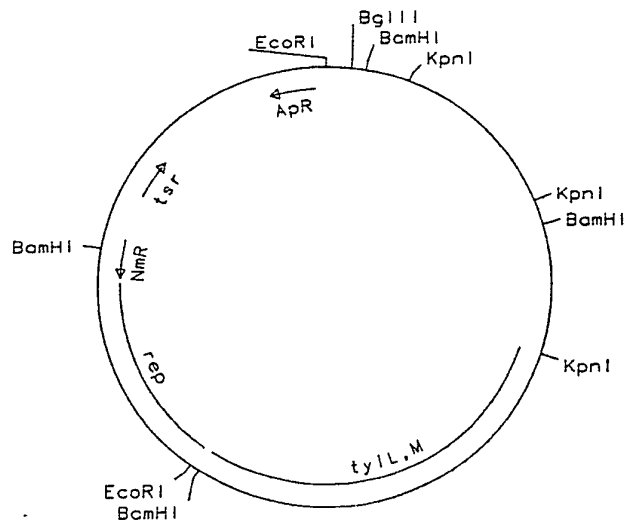
2. ábra



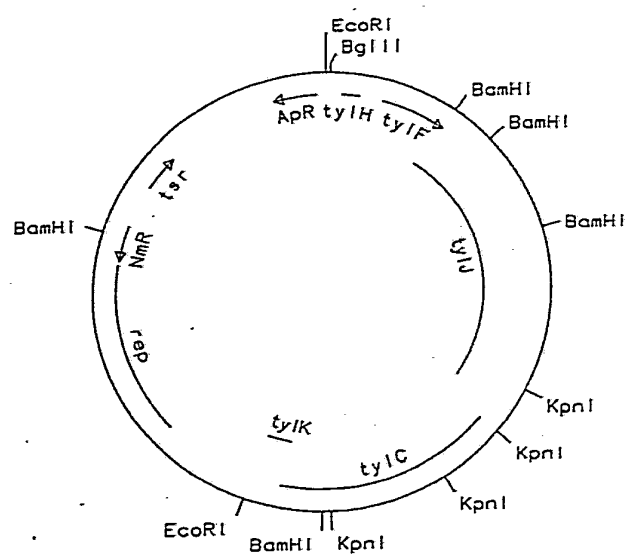
3. ábra



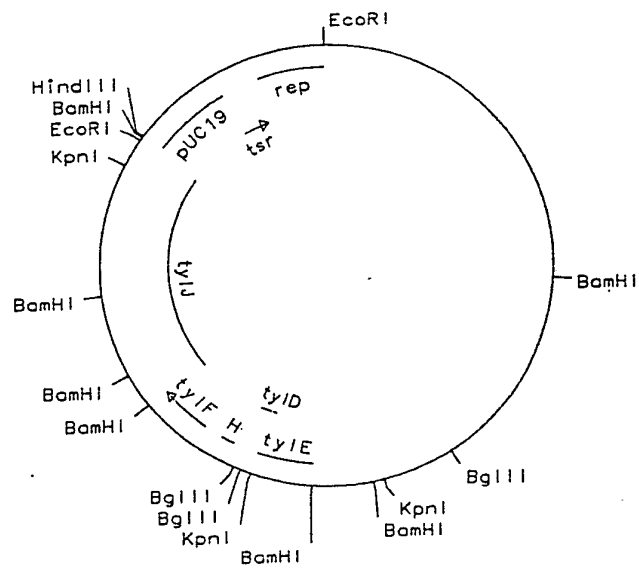
4. ábra



5. ábra



6. ábra





Felelős vezető: Javier Aguilar ügyvezető ig.