SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(22) Dátum podania prihlášky: **3. 2. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/118 457**
60/137 334
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **3. 2. 1999**
3. 6. 1999
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 6. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **6/2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US00/02880**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/46389**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1089-2001

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7] :

C12P 17/16,
C12P 17/02,
C12N 1/20

(71) Prihlasovateľ: **BIOGAL Gyógyszergyár RT., Debrecen, HU;**

(72) Pôvodca: **Szell Valeria, Budapest, HU;**
Lang Ildiko, Budapest, HU;
Barta Istvan, Budapest, HU;
Tegdes Aniko, Budapest, HU;
Albrecht Karoly, Budapest, HU;
Mozes nee Suto Julianna, Budapest, HU;
Szabo Istvan M., Budapest, HU;
Petroczki Magdolna, Budapest, HU;
Erdei Janos, Debrecen, HU;
Gulyas Eva, Debrecen, HU;
Balogh Gabor, Debrecen, HU;

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob prípravy antibiotickej kyseliny pseudomonovej A mikrobiologickou cestou**

(57) Anotácia:
Opísaný spôsob prípravy kyseliny pseudomonovej A zahŕňa submerznú kultiváciu kmeňa baktérií radu *Pseudomonas* schopného biosyntézy v podstate čistej kyseliny pseudomonovej A za aeróbnych podmienok fermentáciou; a izoláciu požadovanej zlúčeniny. Postup zahŕňa najmä kultiváciu kmeňa baktérií *Pseudomonas sp.* Č. 19/26 uloženého v NCAIM (P)B pod prírastkovým číslom 001235 alebo jeho mutanta, alebo variantu produkujúceho kyselinu pseudomonovú A pri kultivácii v médiu obsahujúcom zdroje organického dusíka a uhlíka a prípadne minerálne soli pri teplote od približne 20 °C do 30 °C.

SK 1089-2001 A3

PP 1089-2001

Spôsob prípravy antibiotickej kyseliny pseudomonovej A mikrobiologickou cestou

Oblasť techniky

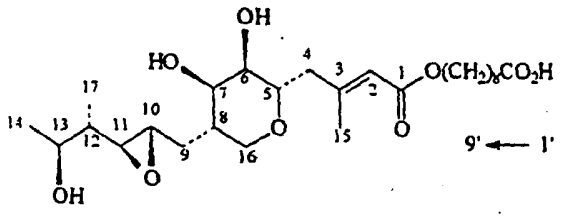
Predložený vynález sa týka mikrobiologickej metódy výroby antibiotickej kyseliny pseudomonovej A (mupirocín).

Doterajší stav techniky

Kyselina pseudomonová A, známa aj ako mupirocín, je antibiotikom, ktoré má inhibičný účinok najmä proti grampozitívnym baktériám (ako je *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae*) a niektorým gramnegatívnym baktériám (ako *Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoae)* [A. Ward, D. M. Campoli-Richards, Drugs 32, 425-444 (1986)] a jej minimálna inhibujúca koncentrácia je v rozpätí 0,02 až 0,5 mg/dm^3. Kyselina pseudomonová A má inhibíciou izoleucín-tRNA syntázového enzýmu vplyv na syntézu peptidov patogénnych baktérií [J. Hughes a G. Mellows, Biochem. J. 191, 209-219, (1980)]. Výhodným znakom tohto antibiotika je to, že je menej toxické pre ľudí aj pre zvieratá a je negatívne v teste Ames. Kyselina pseudomonová A sa v súčasnosti využíva pri liečbe ľudí, v rôznych prostriedkoch, na liečenie kožných infekcií (ako je impetigo, pyoderma), nosných infekcií a infekcií vonkajšieho ucha, akné, popálením, ekzémov, psoriázy, v prípade ulcerácie na liečenie sekundárnych infekcií a na prevenciu nemocničných infekcií.

Chemická štruktúra kyseliny pseudomonovej A sa stanovila ako kyselina 9-{4-[5S(2S,3S-epoxy-5S-hydroxy-4S-metylhexyl)-

-3R,4R-dihydroxytetrahydropyran-2S-yl]-3-metyl-but-2(E)--enoyloxy}nonánová [E. B. Chain a G. Mellows, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 847-848 (1974); R. G. Alexander, J. P. Clayton, K. Luk, N. H. Rpgers, TJ. King, J. C. S. Perkin I. 561-565 (1978)], ako dokladá vzorec (I):



(I)

Je známe, že *Pseudomonas fluorescens* je schopný produkovať kyselinu pseudomonovú A. Podľa britského patentu č. 1 395 907 je kmeň *Pseudomonas fluorescens* NCIB 10586 schopný biosyntetizovať komplex kyseliny pseudomonovej pozostávajúci z kyseliny pseudomonovej A a jej izoméru s dvojitou väzbou v cis-polohe medzi atómami uhlíka C_2 a C_3 a kyseliny pseudomonovej B. Pomer zložiek je 4,5:4,5:1. Podľa japonskej patentovej prihlášky 52-70083 je však kmeň *Pseudomonas fluorescens* Y-11633 schopný biosyntetizovať komplex kyseliny pseudomonovej pozostávajúci z kyseliny pseudomonovej A, kyseliny pseudomonovej B a ďalších dvoch zložiek s neznámou štruktúrou v pomere 9:0,5:0,5.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa týka spôsobu prípravy kyseliny pseudomonovej A zahŕňajúceho kultiváciu kmeňa baktérií *Pseudomonas* schopného biosyntézy kyseliny pseudomonovej A na médiu obsahujúcom aspoň jeden organický zdroj dusíka alebo uhlíka za submerzných aeračných podmienok a fermentáciu kultúry *Pseudomonas* tak, že sa tvorí kyselina pseudomonová A. Kmeňom baktérií *Pseudomonas* je prednostne kmeň baktérie

Pseudomonas sp. č. 19/26 uložený pod ukladacím číslom NCAIM(P)B 001235 v „National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms", Budapešť, Maďarsko, alebo jej mutant alebo variant produkujúci kyselinu pseudomonovú A.

Predložený vynález sa zameriava aj na kultúru *Pseudomonas* schopnú biosyntetizovať kyselinu pseudomonovú A v submerzných aeračných podmienkach, pozostávajúcu v podstate z nového kmeňa baktérií *Pseudomonas sp.* č. 19/26.

Predložený vynález sa ďalej zameriava na biologicky čistú kultúru nového kmeňa baktérií *Pseudomonas sp.* č. 19/26.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 je chromatogram HPLC komplexu kyseliny pseudomonovej produkovaný *Pseudomonas sp.* č. 19/26 [NCAIM(P)B 001235].

Podrobný opis vynálezu:

V priebehu výskumu antimikrobiálnych antibiotík produkovaných baktériami sa izolovalo 20 000 mikroorganizmov na živnom agare obsahujúcom 10 µg/ml kandicínu a 5 µg/ml cykloheximidu, aby sa zabránilo rastu plesne.

Testovala sa antibakteriálna účinnosť izolovaných bakteriálnych kmeňov z kultúry v pretrepávanej banke na rozdielne grampozitívne a gramnegatívne testovacie mikroorganizmy a ich rezistentné varianty pre antibiotiká vyskytujúce sa v liečebnej praxi. Aplikáciou antibioticky rezistentných testovacích mikroorganizmov sme chceli podnietiť rozlíšenie antimikrobiálnych antibiotík s novým typom pôsobenia.

V priebehu vyššie uvedeného výskumu sa vybral izolát baktérií označený ako „kmeň č. 19/26". Pôvodne sa tento organizmus získal zo vzorky pôdy získanej v Argentíne. Jeho kultivačný bujón mal výrazný antibiotický účinok proti *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* SMITH, voči penicilínu rezistentnému *Staphylococcus aureus* 1110, neočíslovanému kmeňu *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes* A 115 ROBB, *Alcaligenes faecalis* 140001, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4671, *Klebsiella pneumononiae* ATCC 10031, voči meticilínu a aminoglykozidu rezistentnému *Staphylococcus aureus* MRSA 1190R a dvom neočíslovaným kmeňom *Mycoplasma pneumoniae* a *Haemophilus influenzae.* Neskoršie sa z tohto kultivačného bujónu izoloval antibakteriálny metabolický produkt kmeňa č. 19/26 a ako výsledok analýzy chemickej štruktúry sa zistilo, že je identická s kyselinou pseudomonovou A.

Súčasne boli vybrané kmene baktérií produkujúce kyselinu pseudomonovú A podrobené taxonomickým štúdiám. Prvý predbežný porovnávací prieskum sa uskutočnil s vybranými veľmi blízko príbuznými bakteriálnymi kmeňmi použitím zariadenia Bio-Mérieux ATB Expression so stripom ID 32 GN. To je vhodné na relatívne rýchlu (napríklad v generickej úrovni) taxonomickú identifikáciu daného neznámeho bakteriálneho kmeňa, ak jeho diagnostikované vlastnosti vykazujú vysoký stupeň fenetickej podobnosti k aspoň jednému z autentických kmeňov, ktoré boli zanesené sa databázy zariadenia. S použitím zdroja uhlíka sa môže stanoviť spektrum neznámeho bakteriálneho kmeňa, ktorý má byť skúmaný, s týmto zariadením v 32 testoch so 14 rôznymi cukrami a 14 organickými kyselinami pridanými do minimálneho kultivačného média doplneného komplexom rastových faktorov. Vyhodnotenie výsledkov testov použitia sa uskutoční po naočkovaní a v priebehu 48 hodín inkubačnej doby prostredníctvom automatického merania zákalov na vyvinutých mikrokultúrach

označujúcich intenzity rastu (reakcie) ako „+" alebo "-„ alebo „?". Výsledky synchrónne študovaných biochemických testov sú hodnotené softwarom zariadenia. Získané fyziologicko-biochemické údaje kmeňa č. 19/26 sa uviedli do korelácie s údajmi bakteriálnych kmeňov, ktoré sú uvedené v zozname databázy (celkový počet každého kmeňa je v tomto prípade 114, medzi nimi 11 patrí k rôznym druhom *Pseudomonas: Pseudomonas aeruginosa I a II, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas fluorescens I a II, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas mesophilica, Pseudomonas piskettii, Pseudomonas pseudomallei, Pseudomonas vesicularis, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas diminuta, Pseudomonas putida* a *Pseudomonas stutzeri)*. Podľa výstupu tohto korelačného experimentu bol kmeň č. 19/26 potvrdený ako člen rodu *Pseudomonas*.

Po úspešnej identifikácii na generickej úrovni kmeňov č. 19/26 sme sa pokúsili identifikovať na úrovni rodu prostredníctvom klasických taxonomických prieskumných metód.

Kultúry kmeňa č. 19/26 sa môžu množiť na vhodnom pevnom médiu vo forme nesporulujúcich gramnegatívnych tyčiniek, 0,6 - 1,1 až 1,3-4,0 mikrónov. Tieto sú aktívne pohyblivé s polárnym bičíkom. Tieto obligatórne aeróbne chemoorganotropné tyčinky môžu atakovať glukózu len oxidačne. Nemôžu fermentovať a nie sú schopné respirácie s nitrátmi ako terminálnymi elektrónovými akceptormi, ale vykazujú pozitívnu katalázovú reakciu. Nevyvíjajú viditeľné kolónie na vzorke syntetického média a na svoje rozmnožovanie vždy vyžadujú rastové faktory. Pri kultivácii za optimálnych podmienok sú ich kolónie pozitívne na argininhydrolázu, produkujú fluorescenčné pigmenty, ale prítomnosť a akumulácia poly-β-hydroxybutarátu v bunkách sa nemôže detegovať.

Ďalšie znaky kmeňa č. 19/26 sú nasledovné:

Rozvoj jeho kolónií sa nepozoroval pri 41 °C; neprodukuje levan zo sacharózy, nehydrolyzuje želatínu a škrob, je pozitívny na oxidázu a nevyužíva glukózu, 2-ketoglukonát, trehalózu a mezoinozitol ako samotný zdroj uhlíka.

Všetky tieto stanovené vlastnosti jasne vydeľujú kmeň *Pseudomonas* č. 19/26 od druhov *P.aeruginosa, P.fluorescens, P. chlororaphis, P.aureofaciens, P. syringae, P. viridiflava, P.cichorii, P. stutzeri, P.mendocina, P.alcaligenes, P.pseudoalcaligenes a P.putida*. Kultivácia kmeňa č. 19/26 sa môže uskutočňovať len na médiu pripravenom s (0,2-1,0%) extraktmi kvasiniek, kukuričnou tekutinou alebo inými komplexnými prírodnými živinami obsahujúcimi veľmi odlišné rastové faktory.

Na základe týchto konkrétnych diagnostikovaných vlastností môže byť kmeň č. 19/26 považovaný za organizmus, ktorý patrí k takzvaným „netypickým druhom *Pseudomonas*". Tieto „netypické druhy *Pseudomonas*" môžu byť v budúcnosti začlenené do novovytvoreného bakteriálneho taxónu (N. J. Palleroni, „Pseudomonaceae", Bergeyś Manual of Systematic Bacteriology, 1 141-219, vyd.: N. R. Krieg a J. G. Holt, Baltimore: Williams a Wilkins, 1984).

Kmeň č. 19/26 bol uložený 16. júla 1996 pod prírastkovým číslom NCAIM(P)B 001235 v zbierke National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms v Budapešti v Maďarsku.

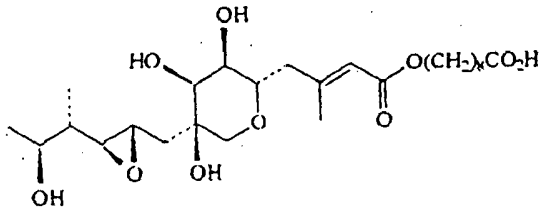
Podľa výhodného postupu vynálezu je *Pseudomonas sp.* bakteriálny kmeň č. 19/26, uložený pod prírastkovým číslom NCAIM(P)B 001235, použitý na výrobu v podstate čistej kyseliny pseudomonovej A. Ako zdroj dusíka môže použiť vybraný kmeň

peptón, hovädzí extrakt, kukuričnú namáčaciu tekutinu, kvasinkový extrakt, kazeínová a sójová potrava. Okrem uvedených zdrojov dusíka sa môžu použiť v rôznych kombináciách zdroje uhlíka, ako je glukóza, glycerol a slnečnicový olej.

Aj keď zložky média prírodného pôvodu obsahujú minerálne soli, je výhodné pridať do inokulačnej kultúry niektoré minerálne soli (ako amónne, vápenaté, soli železa, zinku, medi, horčíka, mangánu, sodné alebo draselné soli). Síran horečnatý, chlorid mangánatý, síran železnatý, chlorid zinočnatý, síran meďnatý, síran amónny, dihydrogenfosforečnan draselný, chlorid sodný a uhličitan vápenatý sa uprednostňujú.

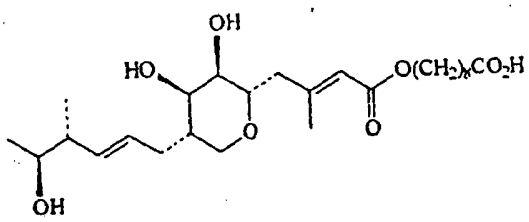
Uchovávanie kmeňa sa uskutočňuje na agarovom médiu obsahujúcom peptón-kazeín pri 4 °C, ktoré sa každé dva týždne mení za čerstvé. Na uchovanie produktivity kyseliny pseudomonovej A sa môže kmeň vhodne uložiť ako hlboko zmrazená kultúra alebo v lyofilizovanej forme.

V priebehu fermentácie sa kmeň *Pseudomonas sp.* č. 19/26 naočkuje do vhodného prostredia a kultivuje za submerzných a aeračných fermentačných podmienok. Hodnota pH kultivačného média je prednostne nastavená na neutrálnu hodnotu (pH približne 7,0), teplota kultivácie medzi približne 20 °C a približne 30 °C, prednostne medzi približne 24 °C a približne 26 °C. V závislosti od podmienok fermentácie sa môže dosiahnuť maximálna hodnota produktivity antibiotika po 50 až 60 hodinách. Komplex kyseliny pseudomonovej vytvorený v priebehu fermentácie obsahuje v podstate čistú kyselinu pseudomonovú A, avšak výsledkom biosyntézy je aj vznik malých množstiev kyseliny pseudomonovej B vzorca (II)



(II)

a kyseliny pseudomonovej C vzorca (III)



(III)

Antibakteriálna aktivita antibiotického komplexu kyseliny pseudomonovej je determinovaná mikrobiálnou metódou agarovej difúzie. Médiom je agar obsahujúci hovädzí extrakt-peptón-glukózu, ktorého pH je 6,5 a testovaným organizmom je *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Hodnota aktivity získaná mikrobiologickou metódou reprezentuje primárne množstvo kyseliny pseudomonovej A, pretože množstvo ďalších zložiek kyseliny pseudomonovej je veľmi malé a vzhľadom na zložku A je ich konkrétna aktivita proti testovaným mikroorganizmom, najmä v prípade zložky B, podstatne slabšia.

V prípade fermentácie sú presné množstvá kyseliny pseudomonovej A a sprievodných menších zložiek vo fermentačnom bujóne stanovené vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou (HPLC), kedy sa supernatant ultrazvukom spracovanej a odstredenej vzorky bujónu zriedi na dvojnásobok etanolom a skúma (zariadenie: čerpadlo LKB 2248, detektor LKB 2141 UV (analýzy pri 222 nm), kolóna: Nucleosil C_8 10 mikrometrov (BST), eluent: zmes (35:65) acetonitrilu a vodného rozoku 0,1M $NH_4H_2PO_4$ (pH 5,0), prietoková rýchlosť 1,2 ml/min). Retenčný čas: kyseliny pseudomonovej A (PSA) je 8,5 min, kyseliny pseudomonovej B (PSB) je 6,0 min; a kyseliny pseudomonovej C (PSC) je 22,5 min.

Chromatogram HPLC antibiotického komplexu kyseliny pseudomonovej biosyntetizovaný kmeňom *Pseudomonas sp.* č. 19/26 je znázornený v tabuľke 1. Tento chromatogram indikuje, že komplex kyseliny pseudomonovej získaný fermentáciou kyseliny

kmeňa č. 19/26 je v podstate čistá kyselina pseudomonová A. Celkové množstvo zložiek kyseliny pseudomonovej B a kyseliny pseudomonovej C je pod 5 %. Týmto spôsobom je zrejmé, že kmeň *Pseudomonas sp.* č. 19/26 je schopný biosyntetizovať antibiotiká v omnoho výhodnejšom zložení ako kmene *Pseudomonas fluorescens* produkujúce komplex kyseliny pseudomonovej publikovanej predtým. Táto skutočnosť je výhodou pre priemyselnú produkciu.

Postup podľa predloženého vynálezu je doložený nasledovnými príkladmi. Avšak predložený vynález by tým nemal byť obmedzený.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad

Kmeň *Pseudomonas sp.* č. 19/26 bol uložený na šikmom agarovom médiu PCA. Zloženie média PCA bolo nasledovné:

hovädzí extrakt	3 g
peptón	5 g
agar	15 g

zriedené na 1000 ml destilovanou vodou. pH média bolo 7,0 až 7,2.

Naočkovaný šikmý agar sa inkuboval pri 25 °C 24 hodín a bunky sa suspendovali v 5 ml normálneho fyziologického roztoku (počet buniek v suspenzii: 10^9 až 10^{10}/ml). Jeden mililiter získanej suspenzie sa naočkoval do 100 ml I-21 označeného naočkovaného kultivačného média sterilizovaného v 500 ml Erlenmayerovej banke. Zloženie média I-21 bolo nasledovné:

glukóza	10 g
glycerol	5 g
kukuričná maceračná kvapalina	3 g
síran amónny	2 g
dihydrogenfosforečnan draselný	0,4 g
síran horečnatý-voda (1:7)	0,4 g

chlorid mangánatý-voda (1:2)	0,03 g
uhličitan vápenatý	4 g
slnečnicový olej	2 g

zriedené na 1000 ml pitnou vodou. pH média je upravené na 7,0 pred sterilizáciou.

Banka obsahujúca naočkované médium sa pretrepávala na pretrepávacom stole (260 ot./min, amplitúda 10 cm) pri 25 °C 18 až 20 hodín. Potom sa 50 ml (1%) pretrepávanej kultúry naočkovalo do 5 litrov média so značkou E-5 sterilizovaného pri 121 °C počas 45 min v 10-litrovej nádobe fermentora. Zloženie média E-5 bolo nasledovné:

glukóza*	50 g
glycerol	50 g
sójová živina	100 g
kukuričná maceračná kvapalina	15 g
chlorid sodný	25 g
uhličitan vápenatý	25 g
slnečnicový olej	10 g

zriedené na 5 litrov pitnou vodou. (*Glukóza bola sterilizovaná v 50% roztoku počas 30 min a pridaná do média spoločne s očkovacím materiálom). pH média bolo upravené na 7,0 pred sterilizáciou.

Kultivácia sa miešala a prevzdušňovala 50 až 60 hodín. Teplota kultivácie bola 25 °C, rýchlosť miešania bola 500 ot./min, prietok vzduchu 200 litrov/hodinu. Ako protipeniace činidlo sa použil slnečnicový olej v minimálnom množstve (približne 20 až 30 ml na fermentor).

Biosyntéza komplexu kyseliny pseudomonovej sa začala v 8. až 10. hodine fermentácie a maximálna koncentrácia antibiotika sa zistila po 55 až 60 hodinách kultivácie.

Izolácia kyseliny pseudomonovej A z fermentačného bujónu sa uskutočnila nasledovným spôsobom: Po ukončení fermentácie sa 4,5 litra získaného kultivačného bujónu odstredilo, potom

sa upravilo pH supernatantu (4,06 litra) na hodnotu 4,5 zriedenou (20%) kyselinou sírovou. Okyslená kvapalina sa potom dvakrát extrahovala 2,03 litra etylacetátu. Fázy sa oddelili a ostrá fáza sa pripravila z emulznej organickej fázy odstredením. Spojený extrakt sa odparil vo vákuu. Získaný surový produkt (2,45 g) sa rozpustil v 25 ml zmesi chloroform-metanol-99,5% kyselina octová (93:5:2) a získaný roztok sa naplnil do kolóny (výška:priemer =28:5) pripravenej z 245 g silikagélu 60 (Kieselgel 60, veľkosť častíc 0,063 až 0,2 mm; Reanal) a vyššie uvedenej zmesi rozpúšťadla. Premývanie prebiehalo s vyššie uvedenou zmesou rozpúšťadiel. V prípade premývania sa 50ml frakcie spojili a obsah kyseliny pseudomonovej A vo frakciách sa analyzoval chromatografiou na tenkej vrstve použitím adsorbentu silikagélu 60 (Kieselgel DC-Alufolien; 105554, Merck) a rozpúšťadlovej zmesi chloroform-metanol-99,5% kyselina octová (90:8:2). Frakcie 34-50 eluované z kolóny Kieselgel 60 obsahovali kyseliny pseudomonovú A. Tieto frakcie sa spojili (850 ml) a za chladenia sa do získaného roztoku pridalo 280 ml vody. Potom sa pH roztoku zmesi upravilo na 4,5 1N vodným roztokom hydroxidu sodného. Organický roztok sa oddelil od vodnej fázy, potom sa vodná fáza znova extrahovala 280 ml chloroformu. Spojené extrakty sa odparili vo vákuu a takto sa mohla získať čistá kyselina pseudomonová A.

Frakcie 14-15 z chromatografie na kolóne obsahovali kyselinu pseudomonovú C, zatiaľ čo frakcia 54 obsahovala kyselinu pseudomonovú B, menšie zložky sa môžu odstrániť do čistej formy vyššie opísanými postupmi.

Spektroskopické charakterizácie izolovaných zložiek kyseliny pseudomonovej sa opísali použitím systému číslovania štruktúrneho vzorca (I) znázorneného vyššie.

Spektroskopická charakterizácia kyseliny pseudomonovej A:

UV spektrum (10μg/ml, v 95% roztoku etanolu): λ_{max}=222 nm

$E^{1\%}_{1cm}$ = 303,6.

IČ spektrum (KBr): νOH 3483 a 3306, $\nu_{C=O}$ 1728 ($COOCH_2$), 1720 (COOH) cm^{-1}.

^{1}H-NMR spektrum ($CDCl_3$, δ_{TMS} = 0):

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

^{13}C-NMR spektrum ($CDCl_3$ roztok, $\delta_{TMS} = 0$):

δ (ppm)	Priradenie	δ (ppm)	Priradenie
177.8 s	C-1'	42.7t,d	C-4, C-12
166.9s	C-1	39.4d	C-8
156.0s	C-3	33.9t,t	C-9, C-2'
117.7d	C-2	31.6t	C-4'*
74.9d	C-5	28.9t	C-5'*
71.4d	C-13	28.8t	C-6'*
70.4d	C-7	28.5t	C-8'*
69.0d	C-6	25.9t	C-7'
65.3t	C-16	24.6t	C-3'
63.9t	C-9'	20.8q	C-14
61.3d	C-11	19.1q	C-15
55.6d	C-10	12.7q	C-17

*zameniteľné priradenie

Chemická ionizácia (CI) hmotnostné spektrum

Charakteristické spektrálne údaje:

m/z	RI(%)	Priradenie
501	100	$(M+H)^+$
327	45	$(M+H-HO/CH_2/_8COOH)^+$
309	16	$(m/z\ 327-H_2O)^+$
227	33	$(C_{12}H_{19}O_4)^+$

Spektroskopická charakterizácia kyseliny pseudomonovej B:

UV spektrum (10µg/ml, v 95% roztoku etanolu): λ_{max}=222 nm

$E^{1\%}_{1cm}$ = 280

IČ spektrum (film): ν_{OH}3418, $\nu_{C=O}$1713 ($COOCH_2$,COOH) cm^{-1}.

^{1}H-NMR spektrum ($CDCl_3$, δ_{TMS} = 0):

δ (ppm) (integrál.),násobnosť	Interakčná konštanta (Hz)	Priradenie
5.68 (1H) s		2-H
4.02 (2H)t	$^3J_{8',9'}$= 6.6	9'-H_2
3.7 (2H)m		7-H,13-H
3.55 (1H)td	$^3J_{4a,5}$= $^3J_{5,6}$ = 9.3;$^3J_{4b,5}$=1.8	5-H
3.41 (2H)dd	$^2J_{16a,16b}$= 11.0	16-H_2
3.24 (1H)dd	$^3J_{5,6}$= 9.3; $^3J_{6,7}$ = 2.8	6-H
2.92 (1H)td	$^3J_{9,10}$= 5.6; $^3J_{10,11}$ = 2.0	10-H
2.69 (1H)dd	$^3J_{10,11}$= 2.0; $^3J_{11,12}$ = 7.2	11-H
2.62(1H)dd	$^2J_{4a,4b}$= 14.5; $^3J_{4a,5}$ = 1.9	4-H_a
2.20 (2H)t	$^3J_{2',3'}$= 7.4	2'-H_2
2.14 (3H)br.s		15-H_3
2.10 (1H)dd	$^2J_{4a,4b}$= 14.5; $^3J_{4b,5}$ = 9.3	4-H_b
1.85 (1H)dd	$^2J_{9a,9b}$= 14.3; $^3J_{9a,10}$ = 5.3	9-H_a
1.20-1.68 (14H)m		9-H_b; 12-H; 3'-H_2; 4'-H_2; 5'-H_2; 6'-H_2; 7'-H_2; 8'-H_2
1.14(3H)d	$^3J_{13,14}$ = 6.4	14-H_3
0.88 (3H)d	$^3J_{12,17}$ = 7.1	17-H_3

Chemická ionizácia (CI) hmotnostné spektrum

Charakteristické spektrálne údaje:

m/z	RI(%)	Priradenie
517	100	$(M+H)^+$
343	70	$(M+H\text{-}HO/CH_2/_8COOH)^+$

Spektroskopická charakterizácia kyseliny pseudomonovej C:

UV spektrum (10µg/ml, v 95% roztoku etanolu): λ_{max}=222 nm

$E^{1\%}_{icm}$ = 307.

IČ spektrum (film): ν_{OH}3435, $\nu_{C=O}$ 1713 ($COOCH_2$,COOH) cm^{-1}.

^{1}H-NMR spektrum ($CDCl_3$, δ_{TMS} = 0):

δ (ppm) (integrál.), násobnosť	Interakčná konštanta (Hz)	Priradenie
5.69 (1H)s		2-H
5.25-5.50 (2H)m		10-H; 11-H
4.00 (2H)t	$^3J_{8',9'}$=6.5	9'-H_2
3.88 (1H)dd	$^3J_{6,7}$=$^3J_{\ldots}$=3.0	7-H
3.78 (1H)dd	$^2J_{16a,16b}$=11.8; $^3J_{16a,8}$=2.6	16-H_a
3.68 (1H)dd	$^3J_{4b,5}$=2.5; $^3J_{5,6}$=9.0	5-H
3.55 (1H)qd	$^3J_{12,13}$=$^3J_{13,14}$=6.3	13-H
3.49 (1H)dd	$^2J_{16a,16b}$=11.8; $^3J_{16b,8}$=2.0	16-H_b
3.41 (1H)dd	$^3J_{5,6}$=9.0; $^3J_{6,7}$=3.0	6-H
2.58 (1H)dd	$^2J_{4a,4b}$=13.8; $^3J_{4a,5}$=2.5	4-H_a
2.20 (2H)t	$^3J_{2',3'}$=7.4	2'-H_2
2.00-2.30 (4H)m		4-H_b; 9-H_2; 12-H
2.10 (3H)m		15-H_3
1.78 (1H)m		8-H
1.45-1.65 (4H)m		3'-H_2; 8'-H_2
1.15-1.35 (8H)m		4'-H_2; 5'-H_2; 6'-H_2, 7'-H_2
1.08 (3H)d	$^3J_{13,14}$=6.3	14-H_3
0.92 (3H)d	$^3J_{12,17}$=6.8	17-H_3

Chemická ionizácia (CI) hmotnostné spektrum

Charakteristické spektrálne údaje:

m/z	RI(%)	Priradenie
485	30	$(M+H)^+$
287	60	$(M+H-HO/CH_2/_8COOH)^+$

Aj keď tu boli opísané niektoré výhodné uskutočnenia vynálezu, odborníkovi vyznajúcom sa v stave techniky je zrejmé, že sa môžu uskutočniť rôzne obmeny a variácie opísaného uskutočnenia bez toho, aby bol opustený duch a rozsah vynálezu. Preto sa predpokladá, že vynález je obmedzený len rozsahom daným pripojenými nárokmi a aplikovateľnými právnymi pravidlami.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob prípravy kyseliny pseudomonovej A, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že zahŕňa kroky:

kultiváciu kmeňa baktérií *Pseudomonas* schopného biosyntézy kyseliny pseudomonovej A na médiu obsahujúcom aspoň jeden organický zdroj dusíka alebo uhlíka za submerzných aeračných podmienok a

fermentáciu kultúry *Pseudomonas* tak, že sa tvorí kyselina pseudomonová A,

pričom uvedeným kmeňom baktérií *Pseudomonas* je kmeň baktérií *Pseudomonas sp.* č. 19/26 uložený pod prírastkovým číslom NCAIM(P)B 001235 v národnej zbierke National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms v Budapešti v Maďarsku.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že uvedený kmeň baktérií *Pseudomonas* je mutant alebo variant kmeňa baktérií *Pseudomonas sp.* č. 19/26 produkujúci kyselinu pseudomonovú A, uložený pod prírastkovým číslom NCAIM(P)B 001235 v národnej zbierke National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms v Budapešti v Maďarsku.

3. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ďalej zahŕňa krok izolácie kyseliny pseudomonovej A.

4. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že uvedený zdroj dusíka alebo uhlíka je zvolený zo súboru zahŕňajúceho glukózu, glycerol, slnečnicový olej, kazeín, sójovú potravu, peptón, hovädzí extrakt, kukuričnú maceračnú tekutinu a kvasinkový extrakt.

5. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že uvedené médium obsahuje aspoň jednu minerálnu soľ.

6. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že uvedená aspoň jedna minerálna soľ je zvolená zo súboru zahŕňajúceho amónnu, vápenatú soľ, soľ železa, zinku, medi, horčíka, mangánu, sodnú a draselnú soľ a ich zmesi.

7. Spôsob podľa nároku 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že uvedená aspoň jedna minerálna soľ je zvolená zo súboru zahŕňajúceho síran amónny, uhličitan vápenatý, síran železnatý, chlorid zinočnatý, síran meďnatý, síran horečnatý, chlorid mangánatý, chlorid sodný a dihydrogenfosforečnan draselný a ich zmesi.

8. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že uvedená fermentácia sa uskutočňuje pri teplote od približne 20 °C do približne 30 °C.

9. Spôsob podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že uvedená fermentácia sa uskutočňuje pri teplote od približne 24 °C do približne 26 °C.

10. Kultúra *Pseudomonas* schopná biosyntézy kyseliny pseudomonovej A za submerzných aeračných podmienok, pozostávajúca v podstate z nového kmeňa baktérií *Pseudomonas* č. 19/26 uloženého pod prírastkovým číslom NCAIM(P)B 001235 v národnej zbierke National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms v Budapešti v Maďarsku.

11. Biologicky čistá kultúra nového kmeňa baktérií *Pseudomonas* č. 19/26 uloženého pod prírastkovým číslom NCAIM(P)B 001235 v národnej zbierke National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms v Budapešti v Maďarsku.

OBR. 1

