[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00806262.5

[51] Int. Cl[7]
C12N 1/20
C07K 7/06
C12P 17/14
//(C12P17/14,C12R1:38)
(C12N1/20,C12R1:38)

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1206343C

[22] 申请日 2000.4.14 [21] 申请号 00806262.5
[30] 优先权
[32] 1999.4.15 [33] US [31] 60/129431
[86] 国际申请 PCT/US2000/008728 2000.4.14
[87] 国际公布 WO2000/063345 英 2000.10.26
[85] 进入国家阶段日期 2001.10.15
[71] 专利权人 伊莱利利公司
地址 美国印第安纳州
[72] 发明人 M·D·希尔顿
小 R·J·斯特罗贝尔
P·J·B·米勒 D·N·托马斯
A·R·科克肖特 B·G·格特曼
J·R·伊斯特里德格
C·A·坎特维尔
审查员 黄 磊

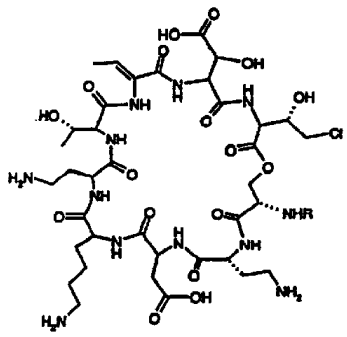
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗 宏 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 41 页 附图 9 页

[54] 发明名称 利用丁香假单胞菌制备假单胞霉素

[57] 摘要

描述了制备一或多种假单胞霉素的方法，包括培养可生产一或多种假单胞霉素的丁香假单胞菌的方法，而这些假单胞霉素都含有通式(I)，其中的 R 指亲脂性基团。



(I)

ISSN1008-4274

1.丁香假单胞菌菌株*(Pseudomonas syringae)*25-B1（ATCC PTA-1622）、菌株67H1(ATCC PTA-1621)或菌株7H9-1(ATCC PTA-1623)的生物学的纯培养物。

利用丁香假单胞菌制备假单胞霉素

发明领域

本发明涉及生产一或多种假单胞霉素的方法，以及培养可生产一或多种假单胞霉素的丁香假单胞菌（Pseudomonas syringae）的方法。

发明背景

真菌感染是引起人类，尤其是在患有免疫缺陷的人中引起疾病、生活质量降低以及死亡重要原因。在过去的 20 年里真菌感染的发生有很大的增加。这部分要归因于患有由器官移植、癌症的化学治疗、AIDS、年龄以及其他的类似紊乱或病情引起的免疫系统削弱或毁坏的病人的增加。这些病人易于受真菌病原的攻击，而这些病原是通过数量众多的菌体来作用，而这些菌体又是在正常发挥功能的免疫体系的监控之下的。这些病原是很难控制的，原因在于现存的抗真菌药物不是高毒性的就是仅仅抑制真菌的活性。例如，多烯烃是杀真菌的，但却是有毒性的；而吡咯类毒性很小但却是仅仅抑制真菌的。更重要的，最近有报道出现假丝酵母的抗多烯烃和吡咯类的菌株，这就严重限制了对这些菌株的治疗方案的选择。

一类新的抗真菌药物—假单胞霉素（psendomycin）在治疗多种患有真菌感染的病人上展示出了希望。（见如 Harrison, L., et al., "Pseudomycins, a family of novel peptidcs from 丁香假单胞菌 possessing broad-spectrum antifungal activity,." J. Gen. Microbiology, 137(12), 2857-65 (1991) and US Patent Nos. 5,576,298 and 5,837,685）。假单胞霉素是从丁香假单胞菌分离株中得到的天然产物。丁香假单胞菌是一大族与植物相联系的细菌，它们是多种具有生物活性的物质如杆菌肽和丁香霉素的来源物质。丁香假单胞菌的天然菌株及由转座子突变产生的突变体可产生具有生物活性的化合物。P. syringae MSU 174 的野生型菌株的一株由转座子突变产生的突变株 MSU16H (ATCC 67028) 可产生多种假单胞霉素。已经对假单胞霉素 A、B、C 及 C′ 进行了分离和化学特性鉴定，结果表明它有广谱抗真菌活性，这包括抵抗人体内和植物体内的重要真菌

抗原的活性。假单胞霉素在结构上与从丁香假单胞菌中分离到的丁香霉素和其他的抗真菌物质相关连，但它与他们相比却是截然不同的物质。假单胞霉素 A、B、C 及 C′ 肽段与 L-Ser-D-Dab-L-Asp-L-Lys-L-Dab-L-aThr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-LThr(4-Cl)相对应的部分与羧基末端在 N-末端 Ser 的-OH 上闭合成大环。这些类似物以 N—酰基侧链来区分，例如假单胞霉素 A 是由 3,4-二羟基十四烷酸盐进行 N-酰基化；假单胞霉素 B 是由 3—羟基十四烷酸盐进行酰基化的；假单胞霉素 C 是由 3,4-二羟基十六烷酸盐进行酰基化的，而假单胞霉素 C′ 是通过 3—羟基十六烷酸盐来进行酰基化的。(见如 Ballio, A., et al., "Novel bioactive lipodepsipeptides ftom 丁香假单胞菌：the pseudomycins," FEBS Letters, 355(1), 15 96-100, (1994) and Coiro, V.M., et al., "Solution conformation of the 丁香假单胞菌 MSU 16H phytotoxic lipodepsipeptide pseudomycin A determined by computer simulations using distance geometry and molecular dynamics from NMR data," Eur. J. Biochem., 257(2), 449-456 (1998).)

尽管真菌感染流行和利用假单胞霉素进行治疗的希望都在增加，但商业规模的假单胞霉素生产存在着很多的问题。已经出版的那些生产假单胞霉素的方法是在以昂贵的马铃薯葡萄糖为培养基、在不用摇动和搅拌的情况下培养的。一般来讲，这些培养方法可生产少量的、可用于实验室研究的假单胞霉素，而其浓度是不适合于大规模或商业规模的生产。现有的方法也不适合于大约 1 升以上规模的生产，在这样的规模生产中对营养物质、气体尤其是氧气进行扩散以保证细胞的充分生长是一个问题。

现在需求的是一种可以利用 P. Syringae 来生产商业规模的、可进行商业应用的假单胞霉素，从而将其作为抗真菌药物来抵抗动物、人类及植物的真菌感染。

发明概述

本发明提供了利用微生物来生产抗真菌药物如一或多种假单胞霉素的方法。这些方法包括利用含有三种或少于三种氨基酸的培养基培养丁香假单胞菌，以及从培养物中回收一或多种假单胞霉素。这三种或少于三种的氨基酸包括谷氨酸、甘氨酸、组胺酸以及他们的组

合。在一种实施方案中，丁香假单胞菌是在含有甘氨酸及任选脂质、马铃薯产品或其组合之一的培养基中、在 pH 大约 4 到 6.5 的条件下进行培养，直至一或多种假单胞霉素的浓度至少为大约 10 μg/ml.，优选大于大约 40 μg/mL. 这种培养方法尤其对在一定规模条件下生产一或多种假单胞霉素有用，而这样的规模是可充分用于回收作为动物、人类或植物抗真菌药物的假单胞霉素的。此外，本发明也提供了利用上述方法制备的假单胞霉素。

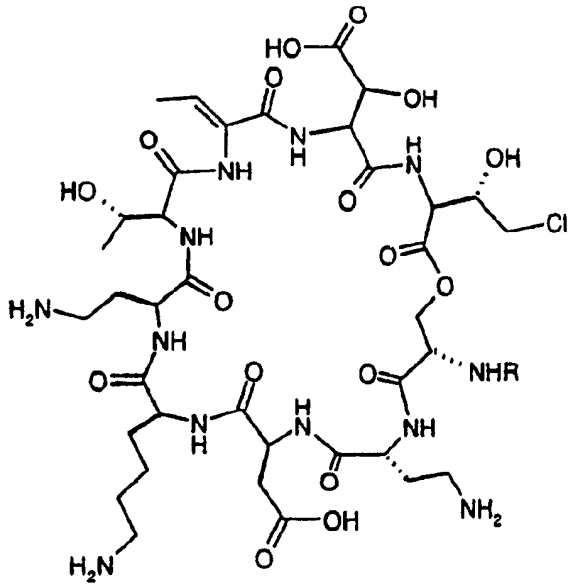
本发明还涉及丁香假单胞菌菌株的生物纯化培养物，这些培养物对于生产假单胞霉素非常有用。丁香假单胞菌菌株可以是从环境资源，包括植物，如大麦类植物、柑橘类植物、丁香类植物等等中分离到的的野生型菌株；也可以是从环境分离物中筛选的菌株，以及这些菌株的突变株。优选的环境分离物是植物。优选的丁香假单胞菌的特征包括能在不含马铃薯产品的培养基上或基本培养基上生长并产生一或多种假单胞霉素的能力；可产生明显量的假单胞霉素；至少大约是 10μg/ml，产生所需的分布（distribution）的假单胞菌素和/或抑制一或多种真菌。

按照本发明，丁香假单胞菌能够在含有三种或少于三种氨基酸及从油脂、马铃薯产品和他们的组合中任选一种的培养基上生长，直至产生的一或多种假单胞霉素的浓度至少约有 10 μg/mL.优选的是丁香假单胞菌菌株产生的一或多种假单胞霉素的浓度约为 40 μg/mL 一700μg/mL，而最优选的是大约 200 μg/mL 的 假单胞霉素 A 或至少大约 100 μg/mL 的 假单胞霉素 B。

在本方法的一种优选实施方案中，通过分批培养或连续培养丁香假单胞菌生产了一或多种假单胞霉素。丁香假单胞菌要有足够的生长时间和浓度来提高假单胞霉素的产量。优选的是培养物的 pH 保持在约为 4—6. 5，更优选的是 4. 5—5. 5，这样可以保持假单胞霉素的稳定性。

定义

此处所用到的名词“假单胞霉素”指含有式 I 的化合物:



I

其中 R 是亲脂性基团。假单胞霉素化合物 A，A′，B，B′，C，C′ 是由上式 I 来代表的，其中的 R 定义如下。

假单胞霉素 A R = 3,4-二羟基十四烷酰

假单胞霉素 A' R = 3,4-二羟基十五烷酸盐

假单胞霉素 B R = 3-羟基十四烷酰

假单胞霉素 B' R = 3—羟基十二烷酸盐

假单胞霉素 CR = 3,4-二羟基十六烷酰

假单胞霉素 C' R = 3-羟基十六烷酰

图表简述

图 1 图解通过在 N21SM 或马铃薯珍珠培养基中培养几株丁香假单胞菌菌株约 67 小时而生产的假单胞霉素 A，B，C，C′ 水平。

图 2 图解通过在装有 N21SM 的瓶中培养几株丁香假单胞菌菌株约 67 小时而生产的假单胞霉素 A，B，C，C′ 水平。

图 3 图解利用丁香假单胞菌菌株 MSU16H，在装有含有马铃薯葡萄糖肉汤的培养基和这种培养基加成盐、甘氨酸、肉豆蔻酸甲酯、和/或可溶性淀粉的培养基的不摇动摇瓶中生产假单胞霉素。

图 4 图解在图 3 的情况下假单胞霉素的生产水平，不同的只是摇动摇瓶。

图 5 图解利用含有甘氨酸培养基和图 4 中的摇瓶来生产假单胞霉素。这些结果表明甘氨酸和肉豆蔻酸甲酯在刺激假单胞霉素生产方面

有协同作用。

图 6 图解利用丁香假单胞菌 MSU16H 菌株，在添加有多种浓度为 0. 1% v/v 的多种脂肪酸甲基酯，并且含有马铃薯葡萄糖肉汤、甘氨酸、盐及可溶性淀粉的培养基中生产假单胞霉素 A，B 和/或 C。脂肪酸都是饱和的，方块下的数字表示其碳链的长度。

图 7 图解在 150 升发酵条件下的假单胞霉素因素测定。通过计算机控制的搅拌和空气流动调节来将溶解氧控制在 30% 。从 18 小时开始以 200 ml/h 的速度补加葡萄糖，而从 20 小时开始以 20 ml/h 的速度开始补加氢氧化氨。在此类发酵中没有检测到假单胞霉素 C。

图 8 图解在图 7 中的发酵产生假单胞菌素条件下的氧的吸收和溶解氧变化。

图 9 图解在利用不含添加的马铃薯产品及含有或不含肉豆蔻酸甲酯的摇瓶中，发酵培养多种丁香假单胞菌生产假单胞霉素 A，B 和/或 C。

发明详述

丁香假单胞菌

丁香假单胞菌（pseudomonas syringae）包括一系列的一般与植物相关联的细菌。一些丁香假单胞菌是植物病原，而另一些仅仅是弱病原或是腐生物。丁香假单胞菌的多种不同分离物可产生一或多种细胞毒素物质，而这些细胞毒素物质可帮助他们在必须与真菌和其他细菌竞争的野生环境中存活下去。丁香假单胞菌产生的细胞毒素物质包括抗真菌物质如假单胞霉素、丁香霉素、丁香假单孢菌毒素（syringotoxin）及 syringostatin。

可产生一或多种假单胞霉素的丁香假单胞菌分离株在本领域中是已知的。例如，野生型菌株 MSU174（从 Montana 的大麦田中分离到）及其利用 Tn905 进行的转座子突变产生的突变株在美国专利 No. 5,576,298 中有描述，而这项专利是在 1996 年 11 月发布给 G. Strobel 等的；在 Harrison 等在 J. Gen. Microbioloev 137, 2857-2865 (1991)上的文章"pseudomycin, a family of novel peptides from 丁香假单胞菌 possessing broad-spectrum antifungal activity,"中 以及在Lamb等在Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6447-645 上的文章"Transposon mutagenesis and tagging

of fluorescent pseudomonas; and Antimycotic production is necessary for control of Dutch elm disease;'中也有讨论。MSU 174 和 MSU 16H 的培养物存放在 Montana State University (Bozeman, Montana, USA)，也可从 the American Type Culture Collection (Parklawn Drive, Rockville, MD, USA)获得。本段引用的已公开的文献在此处引用作为参考。

本发明包括一株菌株、一种分离物及丁香假单胞菌的一种生物纯化培养物，而此培养物可产生一或多种产量大于 10 μg/mL 假单胞霉素，优选至少约 10 μg/mL—900 μg/mL 假单胞霉素，更优选的是 800 μg/mL— 900 μg/mL 假单胞霉素。优选的是微生物的生物纯化分离物是由丁香假单胞菌菌株 MSU 16H、25-B1、67H1,、7H9-1，或 7D11-6 或假单胞霉素生产突变株、变体分离物或这些菌株的重组体。已经如上述文献所述得到了 MSU 174 和 MSU 16H 培养物。

适于生产一或多种假单胞霉素的丁香假单胞菌可从包括植物如大麦类植物、柑橘类植物、丁香类植物等等的环境资源中分离得到，也可从如土壤、水、空气、尘埃等资源中分离得到。正如此处所用的，“野生型”指在丁香假单胞菌自然存在的正常群体的显性基因型（如在自然中发现的、而不是通过实验室操作产生的丁香假单胞菌分离物或菌株）。如其他的生物体一样，应用于本发明的假单胞霉素产生培养物的特性，丁香假单胞菌菌株如 MSU 174, MSU 16H, MSU 206, 25-B1 及 7H9-1 也是变化的。因此，这些菌株的子代如重组体、变异菌株或变体可通过本领域中的技术人员熟知的方法来获得。

丁香假单胞菌的变异菌株也适于生产一或多种假单胞霉素。此处所用的“突变”指显性菌株发生的意外的可遗传变化，它可自发的产生或通过包括辐射及多种化学物质在内的诱变物质诱导产生。本发明中的丁香假单胞菌突变株可通过包括辐射如紫外线或 X-射线在内的多种诱变物质来获得，也可通过化学诱变剂、定点诱变以及转座子介导的诱变来获得。化学诱变剂的例子有甲基磺酸乙酯(EMS)、二环氧辛二酸酯、 N-甲基-N-亚硝基-N'-亚硝基胍 (NTG)以及亚硝酸。

通过利用可有效产生突变株的量的诱变物质处理丁香假单胞菌就可得到本发明中的丁香假单胞菌的假单胞霉素生产突变株，这些突变株可超量生产一或多种假单胞霉素，可产生一种假单胞菌素如假单

胞霉素 B，其产量超过其他的假单胞霉素，或在有利的生长条件下生产一或多种假单胞霉素。虽然所用诱变剂的种类和量可变化，但优选的方法是将 NTG 系列稀释到 1— 100 μg/ml 的水平。本发明中优选的诱变剂是那些可超量生产 1 —100 μg/ml 假单胞霉素 B，而又可在极限培养基（minimal defined medium）上生长的物质。这些突变株超量生产一或多种假单胞霉素，优选的是产量从至少大约 10 μg/ml 到大约 900 μg/ml，更优选的是从大约 800 μg/ml 到 900 μg/ml。

可通过生长特征、生长介质、营养源、碳源、生长条件以及氨基酸需求对环境分离物、突变菌株以及丁香假单胞菌的其他有用菌株进行筛选。优选的是筛选那些不仅可在极限培养基如 N21 培养基生长，而且和/或能生产一或多种最低水平大约大于 10 μg/ml 假单胞霉素的丁香假单胞菌 假单胞霉素生产菌株。在含有三种或少于三种氨基酸及油脂、马铃薯产品或他们的一种组合中的任一种的培养基上生长时，优选的菌株表现出了可产生一或多种假单胞霉素的特征。

利用本领域中的技术人员熟知的方法转化丁香假单胞菌菌株，这样就可以得到其重组菌株。利用重组 DNA 技术就可将丁香假单胞菌转化为可表达这些菌株产生的抗生素以外的多种基因产物。例如，利用一种重组载体转化这些菌株，从而可给予这些菌株对未转化前通常对其敏感的抗生素的抗性。因而，得到的转化体不仅可产生多种假单胞霉素，而且可产生给予其抗性的酶，而又可通过这种酶从野生型细胞中筛选转化后的菌株。此外，利用相似的技术，可将现有的菌株进行修饰从而引入内源假单胞霉素生物合成基因的多拷贝，这样就可以获得更高的假单胞霉素产量。后代如保留有假单胞霉素超量生产特性的丁香假单胞菌菌株 25-B1、67H1 和 7H9-1 的天然或诱导变体、突变菌株和重组体，他们是本发明的组成部分。

假单胞霉素

正如此处所用到的，假单胞霉素指从丁香假单胞菌中分离到的一族抗真菌物质中的一或多个成员。假单胞霉素是 lipodepsipeptide，也即含有一或多种不常见氨基酸和一或多种附加有疏水或脂肪酸侧链的环状多肽。明确的讲，假单胞霉素是脂缩酚九肽（lipodepsinonapeptide），而此脂缩酚九肽不仅含有通过内

酯键闭和的环状肽部分，而且含有不常见氨基酸 4-氯苏氨酸、3- 羟基天冬氨酸、 去水-2-氨基丁酸、 2,4-二氨基丁酸。我们认为这些不常见氨基酸参与了假单胞霉素的生物特性，如在血清中的稳定性和他们的杀伤作用。假单胞霉素包括假单胞霉素 A、 假单胞霉素 A'、假单胞霉素 B、假单胞霉素 B'、 假单胞霉素 C 和 假单胞霉素 C'。这些假单胞霉素含有相同的环状多肽核，但他们那些粘连到环状多肽核上的侧链不同。

已经纯化分离到假单胞霉素 A、 A'、 B、 B'、 C 和 C'，并且应用包括氨基酸测序、NMR 和质谱在内的方法确定其结构特性。假单胞霉素 A、A'、B、B'、C 和 C'在 1996 年 11 月 19 日授予 G- Strobel 等的、美国专利号为 NO. 5, 576, 298 的专利中；在 Harrison 等在 J. Gen. Microbioloev 137, 2857-2865 (1991) 上的文章 "Pseudomycins, a family of novel peptides from 丁香假单胞菌 possessing broad-specwm antifungal activity," 以及 Ballio 等在 FEBS Lett. 355, 96-100 (1994)上的文章 "Novel bioactive lipodepsipeptides from 丁香假单胞菌: the pseudomycins 中有讨论。假单胞霉素 A'和 B'在 Palaniappan Kulanthaivel 等与本专利同时提交的、美国专利申请序列号为 No. PCT/USOO/08727 的专利中有描述，这项专利的名称为假单胞霉素天然产物，在实施例部分有其例示。由这几种假单胞霉素产生的抗真菌活性可追因于含有转座子 Tn 903 的丁香假单胞菌，而此转座子可编码包括卡那霉素抗性在内的多种因子。Tn 903 序列和对其进行基因操作的方法是已知的。Oka et al., "Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn 903;' J. Mol. Biol. 147, 217-226 (1981)。本段别引用的每一篇文献在此处明确指出在本发明中引用作为参考。

这些假单胞霉素在结构和性质上有所不同。优选的假单胞霉素 A、B、C 和 C'表现出可抗广谱范围的真菌的活性，也表现了普遍可接受的毒性。相对于其他的优选假单胞霉素 ，假单胞霉素 B 表现出对特定真菌的更强的抗性和更低的毒性。因此，对本发明中的方法来讲，优选的是假单胞霉素 B. 每一种假单胞霉素 含有一种环状的九肽环，此九肽环含有 Ser-Dab-Asp-Lys-Dab-aThr-Dhb-HOAsp-ClThr (丝氨酸；2,4-二氨基天冬氨酸、 天冬氨酸、赖氨酸、 2,4-二氨基

丁酸、别苏氨酸（allo Threonine）、 脱氢-2-氨基丁酸、 3-羟基天冬氨酸、4- 氯苏氨酸），更特别的是 L-Ser-D-Dab-L-Asp-L-Lys-L-Dab-L-aThr-Z-Dhb-L Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl)，ClThr 的羧基和丝氨酸的羟基形成内酯键以闭和此环。这些假单胞霉素在亲脂基团的性质上有所不同，而这些亲脂基团是结合到丝氨酸的 N-末端氨基上的。丝氨酸的 N-末端氨基在假单胞霉素 A 中与 3,4-二羟基十四烷酰残基、在假单胞霉素 B 中与 3-单羟基十四烷酰残基、在假单胞霉素 C 中与 3,4-二羟基十六烷酰残基、在假单胞霉素 C'中与 3-羟基十六烷酰残基分别形成肽键。丝氨酸的羧基在环中的 Dab 形成肽键。

假单胞霉素的生物活性

一种假单胞霉素可表现多种生物活性，包括杀伤多种真菌，如植物和动物的真菌病原。尤其是假单胞霉素是活性的抗真菌药物，他可抗引起免疫损伤个体偶然感染的真菌。这些真菌包括念珠菌属的多个种，这些种包括近平滑念珠菌、 白色念珠菌、 C. Glabrata、 C. tropicalis 和 C. Krusei。他们也包括其他的属如新型隐球菌、 烟曲霉及夹膜组织胞浆菌。杀伤而不是抑制真菌，尤其是真菌抗原的生长是假单胞霉素渴望的生物活性，也是优选的生物活性。

也已证明假单胞霉素对较广范围的植物病原真菌有毒力，这些植物病原真菌包括 Rynchosporium secalis、Ceratocystis ulmi、Rhizocronia solani、 Sclerotinia sclerioriorum、 Verticillium albo-atrum、 Verticillium dahliae、Thielaviopis basicola、Fusarium oxysporum 及 Fusarium culmorum.（见 Harrison, L., et al.,"假单胞霉素 s, a family of novel peptides from 丁香假单胞菌 possessing broad-spectrum antifungal activity,"J. of General Microbiology, 7, 2857-2865 (1991).）。此外，已经证明 P. syringae MSU 16H 在感染有 Cerarocystic ulmi 的榆树中更具有保护性，而 Cerarocystic ulmi 感染正是 Dutch 榆树病的原因所在。(见如 Lam et al, Proc. Natl. Sci. USA, 84, 6447-6451 (1987)).

丁香假单胞菌的生长

正如本发明所描述的，“水性营养介质”指基于水的组合物，这些组合物包括本发明中的微生物生长所必须的矿物和有机化合物以

及他们的盐。优选的营养介质含有有效剂量的三种或少于三种的氨基酸，优选的是谷氨酸、甘氨酸、组胺酸或其组合。在一种实施方案中，其介质含有有效剂量的甘氨酸以及从一或多种马铃薯产品和油脂中任选的一种物质。甘氨酸可以是单独的氨基酸或以氨基酸混合物如水解蛋白质的组分方式提供的。合适的油脂包括大豆油、含有 14 或 16 个碳的脂肪族碳链的脂肪酸以及含有 14 或 16 个碳的脂肪族碳链的脂肪酸酯。优选的脂肪酸酯包括棕榈酸甲酯和肉豆蔻酸甲酯，优选的是肉豆蔻酸甲酯。合适的马铃薯产品包括马铃薯葡萄糖肉汤、马铃薯糊精、马铃薯蛋白以及商业流通的马铃薯泥混合食品。营养介质中优选的矿质包括普遍用于细胞培养和发酵的盐混合物，如含有 KCI、MgSO4 和 FeSO4 的.Czapek 矿物盐。营养介质中优选的有机化合物包括葡萄糖、蔗糖以及可随意的包含可溶性淀粉；其他类似的有机化合物也可包括在内。培养基的 pH 优选约为 4— 6.5 更优选的为大约 4.5 — 5.7，最优选的为大约 5.2。

虽然营养肉汤中每一种成分的量一般来讲对细菌的生长或一或多种假单胞霉素的生产并不很关键，但特定水平的营养物是有利的。甘氨酸的优选量为大约 0.1 g/L — 10 g/L，更优选的大约为 0.3 g/L —3 g/L，最优选的大约为 I g/L。油脂的优选量为大约 1 g/L — 10 g/L 的油制品，如大豆油，更优选的大约为 0.5 g/L— 2 g/L 的大豆油 。优选的脂肪酸或脂肪酸酯的量大约为 0.5 g/L—5 g/L。一种优选的脂肪酸酯为肉豆蔻酸甲酯，用量为大约 0.1 —10 g/L，优选的为大约 0.3 g/L — 3 g/L，更优选的为大约 1 g/L。马铃薯产品的优选量包括大约 12 g/L —36 g/L,更优选的为大约 24 g/L 的马铃薯葡萄糖肉汤；大约 5 g/L— 50 g/L，更优选的大约为 30 g/L 的商业上流通的马铃薯泥混合物；大约 1 g/L — 30 g/L,的马铃薯糊精，优选为大约 20 g/L；和/或大约 1 g/L —10 g/L 的马铃薯蛋白，优选的为大约 4 g/L 的马铃薯蛋白。优选的营养介质含有矿质质，这些矿质质包括如大约 0.02 — 2 g/L 的 KCL，优选的为大约 0.2 g/L；$MgSO_4$，优选 MgSO4 · $7H_2O$，浓度大约为 0.02— 2 g/L，更优选大约为 0.2 g/L；FeSO4，优选 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$，浓度大约为 0.4 — 40 mg/L，更优选大约 4 mg/L，等等。如果有培养基中含有可溶性淀粉，优选量为大约 0.5 — 50 g/L，更优选的大约为 5 g/L。含有的葡萄糖的

优选量为大约 2 —80 g/L，更优选的大约为 20 g/L。含有的蔗糖的优选量为大约 2 — 80 g/L,更优选的大约为 30 g/L。

丁香假单胞菌一般在本发明所描述的培养基中生长，这些培养基又有可控制或可调节的 pH、 温度等等。丁香假单胞菌可在大约 15℃—35℃的温度下生长并产生一或多种假单胞霉素，优选的温度为大约 20 — 30℃，更优选的大约为 22 —27℃，最优选的大约为 25℃。丁香假单胞菌可在大约为 4—7 的 pH 下生长并产生一或多种假单胞霉素，优选的 pH 为大约 4—6，更优选的大约为 4.5 —5.5。一般来讲，在温度高于 37℃或低于 10℃时、或在 pH 大于 9 或小于 4 时丁香假单胞菌一般不能生长。

假单胞霉素的生产方法

为了利用丁香假单胞菌的野生型或突变菌株生产一或多种假单胞霉素，则就得在含有有效剂量的三种或少于三种氨基酸的水合营养介质中搅拌培养这些微生物。这三种或少于三种的氨基酸优选谷氨酸、甘氨酸及组胺酸或他们的组合。在一优选的实施方案中，氨基酸包括甘氨酸以及从一或多种马铃薯产品和油脂中任选的一种物质。在最有利于丁香假单胞菌生长和产生所要的假单胞霉素或多种假单胞霉素的条件下培养丁香假单胞菌。有效的条件包括温度为大约 22 —27℃，培养时间大约为 36—96 小时。当在如本发明所述的介质培养时，丁香假单胞菌可生长至细胞密度为 10-15 g/L 干重，并且产生的假单胞霉素总量至少为大约 10 μg/mL，优选的至少为 大约 40μg/mL，更优选的大约为 500 μg/mL 或更多。

在丁香假单胞菌的培养中控制培养基中氧的浓度有利于生产假单胞霉素。优选的是氧水平在大约 5%—50%的饱和浓度，更优选的是 30%的饱和浓度。喷射空气、纯氧气或含有氧气的混合气体可调节培养基中氧气的浓度。此外，调节震荡频率也可调节氧气的转移速率。

在丁香假单胞菌的培养中控制培养基的 pH 有利于生产假单胞霉素。假单胞霉素在碱性 pH 下不稳定，并且如果培养基在 pH 大约大于 6 的条件下持续超过 12 个小时，假单胞霉素就会有显著的降解。优选的培养基 pH 应保持在至少 6 以下，更优选的是在 5.5 以下，最优选的是大于 4. pH 优选的保持在大约 5—5.4，更优选的是大约 5.0—5.2。虽然这并不限于本发明，但我们认为假单胞霉素在碱性 pH 下

的降解要归因于内酯环的打开以及 Cl^- 的去除。

丁香假单胞菌在分批培养的条件下能产生一或多种假单胞霉素。然而，补料分批培养或半连续补加葡萄糖和酸或碱如氢氧化氨中的任一种来控制 pH 就可以提高假单胞霉素的产量。通过利用连续补料培养的方法就可以进一步提高利用丁香假单胞菌生产假单胞霉素的产量，在这样的条件下 ，葡萄糖和酸或碱如氢氧化氨的任一种物质是自动添加以便控制其 pH 的。

利用丁香假单胞菌可生产具有相当产量的一或多种假单胞霉素。也就是说，这一或多种假单胞霉素的总产量至少为大约 200 μg/mL — 900 μg/mL，优选的是大约 600 μg/mL— 900 μg/mL，更优选的是大约 800 μg/mL — 900 μg/mL。对于生产假单胞霉素 A 来讲，优选的总产量至少为大约 10 μg/mL — 400 μg/mL，更优选的是大约 300 μg/mL—400 μg/mL，最优选的大约为 350 μg/mL — 400 μg/mL。对于生产假单胞霉素 B 来讲，优选的总产量至少为大约 10 μg/mL — 300 μg/mL，更优选的是大约 200 μg/mL—300 μg/mL，最优选的大约为 250 μg/mL — 300 μg/mL。对于生产假单胞霉素 C 来讲，优选的总产量至少为大约 5 μg/mL —100 μg/mL，更优选的是大约 5μg/mL —50 μg/mL，最优选的大约为 10 μg/mL —50 μg/mL。对于生产假单胞霉素 C'来讲，优选的总产量至少为大约 1 μg/mL —50 μg/mL，更优选的是大约 10 μg/mL—50 μg/mL，最优选的大约为 30 μg/mL — 50 μg/mL。

在本发明所述的培养条件下，丁香假单胞菌菌株的选择能影响特定假单胞霉素的产量分配以及这些假单胞霉素的生产。例如 MSU16H 菌株、67H1 菌株及其他类似菌株不仅主要生产假单胞霉素 A，而且产生假单胞霉素 B 和 C，其比率一般为 4: 2: 1。然而，67H1 菌株及其类似菌株生产的假单胞霉素一般要比 MSU16H 菌株生产的多大约 3—5 倍。与 MSU16H 菌株和 67H1 菌株相比，25—B1 及其类似菌株能生产较多的假单胞霉素 B，而生产较少的假单胞霉素 C。7H9-1 菌株及其类似菌株的特色在于主要生产假单胞霉素 B，并且产量较其他菌株高。例如这株菌株生产的假单胞霉素 B 较其生产的假单胞霉素 A 或 C 高出 10 倍。

利用任何本领域中的技术人员熟知的方法就可对假单胞霉素或

假单胞霉素混合物进行检测、分离和/或纯化。例如，利用抗真菌如抗念珠菌的抗真菌作用就可以对肉汤中的假单胞霉素活性水平、或分离到的、或纯化到的组合物的活性水平进行确定。已有多种已知的制备和分析假单胞霉素的方法。例如，可利用色谱如 HPLC 对一或多种假单胞霉素进行分离和纯化。

可将利用本发明中的方法制备的假单胞霉素以药物上可接受的盐的形式分离出来。此处所用的名词‘药物上可接受的盐’指上文所述的那些对活体基本无毒性的化合物的盐。典型的药物上可接受的盐包括通过本发明中的化合物与无机或有机酸或无机碱反应制备得到的盐。这些样叫做酸加成盐和碱加成盐。

通常用于形成酸加成盐的酸是无机酸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸和磷酸，以及有机酸如 p-甲苯磺酸、 甲基磺酸、草酸、 对溴苯磺酸、碳酸、丁二酸、柠檬酸、安息香酸和乙酸。着牙膏内的药物学上可接受的盐的实施例有硫酸盐、 焦硫酸盐、硫酸氢盐、 亚硫酸盐、 重亚硫酸盐、 磷酸盐、 一氢磷酸盐、二氢磷酸盐、 偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、醋酸盐、丙酸盐、 癸酸盐、 辛酸盐、丙烯酸盐、 甲酸盐、 异丁酸盐、 己酸盐、 庚酮酸盐、propiolate, 草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、 辛二酸盐、癸二酸盐、延胡索酸盐、马来酸盐、 丁基-1,4-二元醇酸、 己基-1,6-二元醇酸、安息香酸盐、 氯代安息香酸盐、甲基安息香酸盐、 二硝基安息香酸盐、 羟基安息香酸盐、甲氧基安息香酸盐、邻苯二甲酸盐、 磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、 phenylpropionate、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、γ羟基丁酸盐、乙醇酸盐、 酒石酸盐、甲基磺酸盐、 丙基磺酸盐、 萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐和扁桃酸盐。优选的药物学上可接受的酸加成盐是那些与矿物酸如盐酸和氢溴酸形成的盐，以及那些与有机酸如马来酸和甲基磺酸形成的盐。

碱加成盐包括那些源于无机碱的盐，如铵或碱或碱土金属的氢氧化物、碳酸盐及重碳酸盐。这些碱在制备本发明中的盐时非常有用，这些碱包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化氨、碳酸钾、碳酸钠、重碳酸钠、重碳酸钾、氢氧化钙及碳酸钙。形成的钾和钠盐尤其优选。

应该认识到作为本发明中的盐的组成部分的平衡离子不必具有什么重要的性质，只要这种盐整体上是药物学上可接受的、并且只要平衡离子并不给予整体上的盐以不需要的性质就可以了。

在下面的实施例帮助下会更好的理解本发明。这些实施例是打算用来代表本发明中特定的实施方案的，但他们并没有限制发明的范围。

实施例

保藏的生物材料

丁香假单胞菌 MSU16H 菌株可以从 the American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, MD, USA 获得，其保藏号为 No. ATCC 67028。P. syringae 菌株 25-B 1、 7H9-1 和 67 Hl 于 2000 年 3 月 23 日保存在 the Ametican Type Culture Collection，其保藏号如下:

25-BI 保藏号 No. PTA-1622

7H9-1 保藏号 No. PTA-1623

67 Hl 保藏号 No. PTA-1621

实施例 1 假单胞霉素的确定和和纯化

通过抗真菌活性对假单胞霉素进行检测定和定量

通过测定制剂的抗真菌活性就可以确定假单胞霉素的存在及其量。可在体内通过标准的琼脂稀释测定法或杯碟扩散检测法来确定制剂的最低抑菌浓度（MIC），进而确定抗真菌活性。一或多种假单胞霉素的制剂可以是细胞培养物的提取物或更纯的混合物。应用于检测抗真菌活性的典型真菌是白色念珠菌。当待检测制剂能在接种有白色念珠菌 x657 的琼脂盘上产生直径为 10-12 mm 抑菌圈时，我们就认为抗真菌活性显著的。

通过 HPLC 对假单胞霉素进行检测和定量

首先将含有一或多种假单胞霉素的样品利用等体积的乙腈或 1.5 体积的甲醇/磷酸（0.1% v/v）进行提取，然后通过过滤或离心将其澄清。然后将此澄清的混合物通过 Zorbax 300SB-C8 色谱柱(3.5 μm 颗粒，5.0 x 0.46 cm，MacMod catalog no.865973-906)，流速 2 ml/min，柱温 60℃。用流动相 A 梯度（25 mM 磷酸钠、7.74 g/L 磺酸辛烷及 10% 乙腈的水溶液， pH 6.5)和流动相 B 梯度(25 mM 磷酸

钠、7.74 g/L 磺酸辛烷和 60% 乙腈 的水溶液， pH 6.5)对柱子进行洗脱。利用 28%—38%的流动相 B 对假单胞霉素进行分离和定量，时间为 10 分钟。一般来讲，假单胞霉素 A 在 10.2 分钟 (612 秒)时洗脱出，假单胞霉素 B 在 10.98 分钟 (659 秒)，假单胞霉素 C 在 11.5 分钟 (691 秒)，假单胞霉素 B' 在 9.6 分钟 (576 秒)，而假单胞霉素 C'在 12.17 分钟 (730 秒)洗脱出来。假单胞霉素通过在 240nm 处的吸收进行检测，结合紫外吸收峰进行定量。每种假单胞霉素的已知标准可作为鉴定和定量的标准。

从搅拌式发酵罐中纯化假单胞霉素

将 150 升、1000 升或其他发酵罐中的肉汤过滤以除去细胞。将滤出液通过 HP-20SS 柱以获得假单胞霉素因子。在用含有 0.1%三氯乙酸的 15%—30% 乙腈冲洗柱子时收集各部分洗脱液。将含有假单胞霉素的洗脱液通过 Amberchrom CG300-sd 柱。因子 A 选用用 0.2%乙酸钠配制的 22%—30% 乙腈（pH4.8）洗脱。因子 B、C 和 C'用在用 0.2%乙酸钠配制的 25%—35% 乙腈（pH4.8）洗脱。因子 A 纯度为 85%（紫外吸收法）。将 A 通过 C_{18} 反相 HPLC 柱，用含有 0.2%三氟乙酸的 30%—60% 乙腈进行洗脱。洗脱后的材料纯度大于 95%（UV/NMR）。

实施例 2—对丁香假单胞菌进行分离、鉴定和诱变

作为作向大批量生产假单胞霉素的第一步，就要对丁香假单胞菌的环境分离物进行筛选，产生突变株。然后以可提高假单胞霉素的生产和培养基的因素为标准对这些突变株和分离物进行研究。

材料与方法

如在 1996 年 11 月 19 日颁发的、专利申请人为 G. Strobel 等的美国专利号为 NO.5,576,298 的专利中；及 Harrison 等在 J. Gen. Microbioloey 137, 2857-2865 (1991)上的文章‘假单胞霉素，从丁香假单胞菌得到一族具有广谱抗真菌活性的新颖肽段’的文章中；以及 Lamb 等在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6447-6451 (1987)上的文章‘转座子诱变和荧光假单胞菌标记：抗真菌剂的生产对于控制 Dutch 榆树疾病是必要的’中所描述的对 MSU174 菌株和 MSU16-H 菌株进行分离和鉴定。本段引用的文献的已公开内容在本文中引用以做参考。

其他的菌株源自这样的野生型和通过化学诱变得到的转座子突

变株。经过诱变的菌株包括 MSU174，MSU16H 及 25-B1。进行诱变之前的菌株生长在含有马铃薯产品的培养基中，然后将此培养基分为含有 0、1、2、4、16 或 32μg/ml 的化学诱变剂 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(NTG 或 MNNG)的培养基。然后将这些细胞冷冻保存，以备进一步的筛选和选择。

通过所需的生长条件和/或假单胞霉素产量对诱变的细胞进行选择。将丁香假单胞菌经化学诱变的细胞如诱变后的 25-B1 细胞解冻，然后将其加到 N21SM 培养基中稀释到 6 个细胞/ml（表 1）。有时这些培养基中含有一或多个待选择的成分，例如不同浓度的磷酸。将 50μl 诱变后的细胞分散到 96 孔微量滴定板的一个孔中，以此来传递靶细胞使其平均浓度为 0.3 个细胞/孔。一般来讲，向每一个孔添加硅树脂油可最大限度的减少蒸发。将此滴定板置于 25℃下震荡培养 6-12 天。

表 1 N21SM 培养基组成

成分	g/L
葡萄糖	20
硫酸铵	0.5
谷氨酸单钠或 L-谷氨酸	2
L-组氨酸	2
甘氨酸	0.5
可溶性淀粉	5
KH_2PO_4	0.2
Czapek 矿物盐溶液	2mL
MES 缓冲液	9.8
调 pH 为 5.0	

培育结束后，从每孔中取出部分，一般是 5ul 进行系列稀释（如 1:56，1:196，1:320，1:686，和/或 1:1715），并且利用液体滴定板生物测定法来评估其抗白色念珠菌的活力。将滴定板在 37℃下培育过夜，然后对白色念珠菌生长点抑制进行评价。将在最大稀释（如 1:320，1:686，和/或 1:1715)时能产生抑制的菌株挑选出来，培育在 CSM 培养基（标）中，25℃下生长 1-3 天。.

表 2 链霉素完全培养基（CSM）

成分	浓度(g/L)
葡萄糖	5
麦芽糖	4
Difco Tryptic Soy Broth	30
Difco 酵母浸膏	3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2
不调 pH	

保存选出的菌株，并且将其接种到含有 13ml N21SM 培养基的发酵瓶中，在 25℃下生长大约 66 个小时。将其一部分从发酵瓶中取出，然后用与这些取出部分相同体积的乙腈抽提 1 小时，离心，并且将其轻轻倒入其他容器，按照实施例 1 中所述对假单胞霉素进行 HPLC 分析。将可产生合适水平的假单胞霉素，一般是大于 10μg/ml 的菌株进行重新筛选、重新发酵，为大规模的生长作好准备。

按照他们对假单胞霉素生产和分配的影响也对培养基和培养条件进行筛选。在利用统计分析方法设计的系列实验中，培养基的几种组分同时变化。这些实验是为了选择对化学成分进行限定的培养基，这些培养基缺乏一种马铃薯产品、含有限定水平的磷酸盐、含有提高的透明度以及有高水平的丁香假单胞菌生长。

结果

通过上述的方法可得到多株表现高水平的假单胞霉素产量、主要产生单独的一种假单胞霉素、和/或可在最少量的培养基上生长等特点。可产生高水平的假单胞霉素的菌株以及从 13ml 发酵液中获得的假单胞霉素的分配在表 3 中有示。对特定突变株来讲，利用马铃薯培养基和 N21SM 培养基获得的假单胞霉素的分布及水平在图 2 和 3 中有示。

表 3 对生产假单胞霉素的和/或在极限培养基上生长的菌株的选择

菌株	假单胞霉素(μg/mL)				细胞密度	PSA+PSB	PSB
	A	B	C	C'	(OD_{600})	OD_{600}	PSA
30E3	109	69			0.759	234	0.64
40G11	81	66			0.818	179	0.82

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

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

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

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

菌株	假单胞霉素(μg/mL) A	B	C	C'	细胞密度 (OD_{600})	PSA+PSB / OD_{600}	PSB / PSA
37B11	2.2	0	0	0	0.158	14	
215B1	2.2	0	0	0	0.500	4	
25B-1	8.4	0	3.1				
25B-1	7.6	0	3.1				
269A7	4.6	0	0	0	0.08	58	
7G3	0	0	0		0.729	0	
17C1	0	0	0		0.171	0	
13B10	0	0	0		0.103	0	
10C4	0	0	0		0.682	0	
9B6	0.0	0.0			0.338	0	
7A9	0.0	0.0			0.509	0	
52H7	0	0			0.828	0	
41A6	0	0			0.583	0	
16 E5	0	0			0.224	0	
277H4	0.0	0	0	0	0.123	0	

结论

此处公开的筛选方法和标准，对筛选不仅可在极限培养基上生长而且又能产生高水平的一或多种假单胞霉素的丁香假单胞菌是有效的。已经发现特定的菌株和生长环境可改变产生的假单胞霉素的分配。在这些极限培养基中，较少的固含物和增加的透明度使得培养基过滤加快，以及可更好的确定细胞浓度。

实施例 3----利用已知的培养条件尝试增加假单胞霉素生产规模

在摇瓶中静置或搅拌培养生产假单胞霉素

作为大规模生产假单胞霉素的第一步，有必要重复已知实验室规模的丁香假单胞菌生长和假单胞霉素生产方法。

材料和方法

利用表 4 所述的营养溶液，在 25℃下，在含有 250ml 摇瓶中不搅拌（静置的或静置的培养）或搅拌培养丁香假单胞菌的 MSU16H 菌

株。这种营养溶液与上文提及的 Harrison 等在 J. Gen. Microbiol. 上的文章中所用的溶液相似。将丁香假单胞菌接种体添加到含有表 4 中的营养物质、但缺少马铃薯葡萄糖的肉汤中，以此作为对照。在对源自马铃薯的营养物的附加检测中，就以葡萄糖（20g/l）和马铃薯蛋白(Alburex)（4 g/L）培养基或葡萄糖(20 g/I.）和马铃薯糊精(Avebe)（20 g/L)培养基代替马铃薯葡萄糖肉汤。如实施例 1 中所述进行抗真菌活力测定。

表 4 加添加剂的马铃薯右旋糖肉汤培养基（PDB 培养基）

组分	浓度
Difco 马铃薯右旋糖肉汤	24g/L
可溶性淀粉	5g/L
古氨酸	1g/L
Czapek 矿物盐溶液	2mL/L
MES 缓冲液	9.8g/L
调 pH 至 5.0	

表 5 Czapek 矿物盐溶液

成分	量
A 部分	
KCl	100g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100g
Deionized H_2O	900mL
B 部分	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2g
HCl(1N)	2mL
去离子水	98mL
将 B 部分缓慢加入 A 部分中，浓合至溶液澄清	

结果

当在表 4 所示的马铃薯右旋糖（potato dextrose）肉汤培养基中培养丁香假单胞菌时，所产生的抗真菌活力以假单胞霉素浓度表示为大约 10.5－29μg/ml。在以葡萄糖和马铃薯蛋白(Alburex)培养基

或葡萄糖和马铃薯糊精培养基(Avebe)代替马铃薯右旋糖培养基时，静置摇瓶培养条件下产生的抗真菌活力为大约 30 μg/mL。在上述的培养条件下，在缺少马铃薯产品的营养溶液中静置培养时没有观察到抗真菌活性。

对于在马铃薯右旋糖肉汤培养基（PDB）中培养来讲，假单胞霉素生长的时间过程表明静置摇瓶中的培养（表 6）和在转速为 250rpm 的搅拌摇瓶中的培养（表 7）都有假单胞霉素产生。在培育过程中，搅拌摇瓶中产生假单胞霉素较早，但在培养环境的 pH 升到 7.5 或更大时假单胞霉素因子就消失了。在静置培养的假单胞霉素总产量最高点，假单胞霉素的分配为 77%A、11%B 和 12% C。在搅拌培养的假单胞霉素总产量最高点，假单胞霉素的分配为 67%A、24%B 和 9% C。

表 6 在含有 PDB 培养基的静置摇瓶中假单胞霉素生产的各时间段

培育时间（小时）	培养物pH	假单胞素霉A+B+C (μg/mL)
0	5.1	0
8	5.9	0
24	5.5	0
48	5.5	4
72	5.6	7
96	5.7	14.5
120	5.5	19.5
168	4.9	21.5
192	4.6	23
312	4.9	29

表 7 在含有 PDB 培养基的搅拌摇瓶中假单胞霉素生产的各时间段

培育时间（小时）	培养物pH	假单胞素霉A+B+C (μg/mL)
0	5.1	0
8	5.3	0
24	5.0	4.5
32	4.6	9.0
40	4.9	10.5
48	7.5	6.5
56	7.9	0.5
72	8.3	0.5
80	8.3	0.5

对于在马铃薯糊精培养基中培养来讲，假单胞霉素生长的时间过

程表明静置摇瓶中的培养和在转速为 250rpm 的搅拌摇瓶中的培养（表 8）都有假单胞霉素产生。将 pH 调节到 5.0，并且将 MSU16H 菌株接种到 50ml 无菌培养基中来启动其生长。在这些搅拌摇瓶培养基中，只有某些培养基的 pH 在 6.0 以下，只有一小部分的假单胞霉素损失是显著的。在静置培养的假单胞霉素总产量最高点，假单胞霉素的分配为 70%A、16%B 和 14% C。在搅拌培养的假单胞霉素总产量最高点，假单胞霉素的分配为 62%A、19%B 和 19% C。

表 8 在含有马铃薯糊精培养基的搅拌摇瓶中生产假单胞霉素的各时间段变化

培养时间(小时)	静置摇瓶中的假单胞霉素 (A+B+C in μg/mL)	振荡摇瓶中的假单胞霉素 (A+B+C in μg/mL)
0	0	0
8	0	0
24	11	13.5
48	22.5	15.5
72	28.5	11
96	28.5	10

结论

将已知的在实验室规模中应用的方法用于生产假单胞霉素。马铃薯产品对于重复这些已知的实验室生产方法是必需的。含有马铃薯蛋白和马铃薯糊精的培养基可替代马铃薯右旋糖培养基。

在发酵罐中静置或搅拌培养生产假单胞霉素

作为迈向大规模生产假单胞霉素的第二步，对已知的实验室规模培养丁香假单胞菌及生产假单胞霉素的方法在 150 升发酵罐中做了尝试。

材料和方法

调节表 4 所示的营养溶液至 pH5.2，在搅动或不搅动的情况下，在 150 升发酵罐中 25℃下培养丁香假单胞菌菌株 MSU16H 10 天。150 升发酵罐搅动包括在 75－150rpm 转速下搅拌及以 0.5SCFM 的流速喷射空气。在一个对马铃薯衍生的营养物质进行的实验中，用葡萄糖和马铃薯蛋白(Alburex)培养基或葡萄糖和马铃薯糊精(Avebe)培养基代替马铃薯右旋糖肉汤培养基。抗真菌活性测定如实施例 1 中所述。

结果

在不搅动条件下的发酵罐培养中有很少的丁香假单胞菌生长，并且检测不到抗真菌活性或假单胞霉素的水平。在这样的条件下，对150升发酵罐进行低速搅拌以及低速喷射空气流时只有很少量的丁香假单胞菌生长，并且也没有检测到抗真菌活性或假单胞霉素的水平。用葡萄糖和马铃薯蛋白(Alburex)培养基或葡萄糖和马铃薯糊精(Avebe)培养基代替马铃薯肉汤培养基，结果也是只有很少量的丁香假单胞菌生长的检测不到的抗真菌活性水平或假单胞霉素水平。

结论

已知的利用丁香假单胞菌静置培养生产假单胞霉素的方法不适用于150升的规模。

实施例4—利用对已有培养条件和培养基更改过的培养条件和培养基成功的实现了假单胞霉素的扩大生产

对改变已有的丁香假单胞菌培养条件在假单胞霉素生产上产生的影响进行了检测。

控制氧浓度

材料和方法

应用马铃薯右旋糖肉汤（PDB）培养基，在实施例3所述的条件下，在150升发酵罐中控制氧的浓度来培养丁香假单胞菌。在另外一个对马铃薯产品的替代实验中， 用表9的马铃薯珍珠培养基（PPM）代替了表4的培养基，并且对氧气的浓度进行了控制。此处所用的马铃薯珍珠是从Basic American Foods购得的Classic Country Style Potato Pearls®.

在培养的前24个小时将溶解氧的浓度控制在30%，然后在特定时期将其降低到5%并保持72小时。通过降低喷射速度或在喷射入罐体的空气中混合入氮气来将溶解氧的浓度保持在5%。通过MSU16菌株和25-B1突变株的生长来评价这些条件。如实施例1中所描述的那样对抗真菌活性和假单胞霉素 A水平进行测定。

表 9 马铃薯珍珠培养基（PPM）

成分	量
葡萄糖	20g/L
马铃薯珍珠	30g/L
可溶性淀粉	5g/L
甘氨酸	1g/L
Czapek 矿物盐溶液	2mL/L
调节 pH 为 5.2	

在利用改性的马铃薯珍珠培养基来确定假单胞霉素产生时段的实验中，发酵罐中装入了右旋糖(2.3 kg)、可溶性淀粉(575 g)、Basic American Foods Country Style Potato Pearls I 速溶马铃薯泥 (3.45 kg)、甘氨酸(115 g)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (23 g)、 KCI (23 g)， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.46 g)，以及 115 L 水。PH 调节为 5.0。在蒸汽灭菌且冷却后将 25-B1 菌株的种子培养物(1.8 升)接种到发酵罐中。发酵罐的搅动速度设定在 150rpm，空气流速设定在 0.5SCFM (0.14vvm)。在保持溶解氧浓度为 30%饱和浓度的过程中搅动速度和空气流速是自动调节的。培养温度控制在 25℃，通过添加 30%的硫酸保持 pH 在 5.5 以下。

对于更大规模的培养，1000 升发酵罐中装有 Difco PDB (24.0 kg)、可溶性淀粉 (5.0 kg)、甘氨酸 (1.0 kg)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (200g)、KCI (200g)， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (4 g)，以及 1000 L 水。PH 调节为 5.0。将 50 升 MSU16H 菌株的种子培养物接种到发酵罐中。培养温度控制在 25℃，通过搅拌和喷射空气将溶解氧浓度保持在 30%的饱和浓度或更高。通过添加 30%的硫酸控制 pH 以使其不超过 5.5。

结果

在对氧气的浓度进行了控制后（表 10），在 150 升发酵罐的培养物中产生了抗真菌活性。通过在喷射的空气中添加氮气来控制氧浓度导致可高水平的假单胞霉素产生。用丁香假单胞菌 25-B1 突变株替代 MSU16H 使微生物的生长和抗真菌活性几乎提高了一倍(表 10)。用表 9 中的培养基替代表 4 的培养基进一步几乎将微生物的生长和假单胞霉素产量提高了一倍。

表 10 利用两种马铃薯培养基，在控制氧浓度的情况下生产假单胞霉素

菌株	以 μg/mL 表示的 A[1] 总滴定度和假单胞霉素			
	喷射N_2的PDB	不喷射N_2的PDB	喷射N_2的PPM	不喷射N_2的PPM
MSU 16H	21 (8)	12 (ND)[2]	NT[3]	NT
25-B1	49 (27)	20 (13)	87 (37)	75 (44)

[1] 假单胞霉素A滴定度为括号中所示
[2] ND表示不确定
[3] NT表示未检测

假单胞霉素产生的时段在表 1 中有示。在 50 升发酵罐发酵的时段中，所产生的假单胞霉素因子的分配为 79%A、10%B 和 11% C。

表 11 在含有马铃薯珍珠培养基的 150L 发酵罐中生产的假单胞霉素的各时间段

已完成的发酵时间（小时）	假单胞霉素 A+B+C (μg/mL)
0	0
8	0
16	17
24	35
32	45
40	41

在 1000 升发酵罐培养过程中也得到了相似的假单胞霉素产生时段（表 12）。

表 12 在含有已变化的马铃薯右旋糖培养基的 1000L 发酵罐中生产假单胞霉素的各时间段

已完成的发酵时间（小时）	假单胞霉素 A+B+C (μg/mL)
0	0
4	0
16	5.2
28	5.6
40	5.9
52	5.8
76	6.0
100	6.3

结论

通过对一些因素如溶解氧浓度、菌株选择、及培养基组成的进一步改变可显著提高假单胞霉素的产量。

添加油脂及额外成分

向表 9 中的马铃薯珍珠培养基中添加额外成分来确定他们对假单胞霉素生产的影响。

材料和方法

向表 9 的马铃薯珍珠培养基中添加额外成分如油脂（如肉豆蔻酸甲酯或大豆油）、磷酸盐、较高浓度的甘氨酸、补加氢氧化氨和补加葡萄糖（表 13）。细胞生长的测定如上述。按照实施例 1 中所述对抗真菌活性进行测定。

结果

这些实验的结果如下表 13 所示。

表 13 在对马铃薯珍珠培养基进行添加的情况下的假单胞霉素产量增加

补加物	假单胞霉素产量 A+B+C(μg/mL)
无	80
甲基肉豆蔻酸盐(1 g/L)	150
甘氨酸（2g/L）	110
补加 NH_4OH(10mL/hr)	110
2 g/L 甘氨酸和 1 g/L 甲基肉豆蔻酸盐	160
甘氨酸(4 g/L)	240
补加葡萄糖(200 mL/hr)	80
甘氨酸（4 g/L），甲基肉豆蔻酸盐至 1 g/L 和补加葡萄糖	287
大豆油（1 g/L）	150
KH_2PO_4（0.5g/L）	60

结论

向培养基中添加甘氨酸和肉豆蔻酸甲酯可显著增加丁香假单胞菌的假单胞霉素产量.

实施例 5—甘氨酸和肉豆蔻酸甲酯刺激假单胞霉素的生产

确定了甘氨酸、肉豆蔻酸甲酯以及其他几种成分对假单胞霉素产生的影响，看他们是否会提高假单胞霉素的水平。

材料与方法

在装有 50 毫升培养基的 250 毫升摇瓶中培养丁香假单胞菌。这种培养是以接种丁香假单胞菌 MSU16H 到培养基中为开端的，然后保持温度 25℃、湿度 70%，在培养箱中不振动的情况下培养 7 天。在培养的最后阶段，从摇瓶中取出 4 毫升肉汤与 6 毫升含有 0.1%磷酸的甲醇混合。我们认为低 pH 可稳定假单胞霉素。通过过滤或离心将颗粒状物质除掉，通过实施例 1 中所述的 HPLC 法确定假单胞霉素。

本研究中所用的培养基为用无菌水配制的 24 克/升马铃薯右旋糖肉汤培养基(PDB, Difco)(对照培养基); 对照培养基中添加 2 ml/L Czapek 矿物盐溶液; 对照培养基添加 1 g/L 甘氨酸; 对照培养基添加 lmI/L 肉豆蔻酸甲酯(Sigma); 对照培养基添加 5 g/L 可溶性淀粉 (Difco); 对照培养基添加 2 mL/L Czapek 矿物盐溶液、, 1 g/L 甘氨酸和 5 g/L 可溶性淀粉; 对照培养基添加 2 ml/L Czapek 矿物盐溶液、 1 g/L 甘氨酸、 lmI/L 肉豆蔻酸甲酯和 5g/L 可溶性淀粉 .

在与上一批摇瓶相同的时间培养上另外一批丁香假单胞菌，培养时间为 30 小时，其他条件与上述的相同，只是没有进行搅拌培养，转速为 250rpm。

在另一搅拌摇瓶实验中，上述的对照培养基生长情况与含有甘氨酸和另外几种添加剂的对照培养基相对比。如上所述对细胞进行搅拌培养。应用的培养基是对照培养基; 对照培养基添加 1 g/L 甘氨酸; 对照培养基添加 1 g/L 甘氨酸和 2 mI/l Czapek 矿物盐溶液; 对照培养基添加 1 g/L 甘氨酸和 5 g/L 可溶性淀粉 ; 对照培养基添加 1 g/l. 甘氨酸和 1 mL/L 肉豆蔻酸甲酯; 对照培养基添加 1 g/L 甘氨酸、 2 mL/L Czapek 矿物盐溶液及 5 g/L 可溶性淀粉; 以及对照培养基添加 1 g/L 甘氨酸、 2 mL/L Czapek 矿物盐溶液、1 ml/L 肉豆蔻酸甲酯和 5 g/L 可溶性淀粉.

结果

通过非震荡摇瓶获得的结果如图 3 所示. 对照培养基是选用

Montana State 的 G. Strobel 等培养丁香假单胞菌时所用的培养基，这在上文 Harrison 等在 J. Gen. Microbiol. 上的文章中有描述。本实验中假单胞霉素的检测限为 1μg/ml。图 3 说明了 G. Strobel 所用的培养基和培养条件，G. Strobel 的培养生产出了大约 5μg/ml 的假单胞霉素 A，但检测不到假单胞霉素 B 和 C 的水平。向对照培养基中添加 Czapek 矿物盐使得假单胞霉素 A 产量微增到 6.5μg/ml，但假单胞霉素 B 和 C 仍检测不到。向对照培养基中添加 1g/l 甘氨酸使得假单胞霉素 A 产量显著增到 10.5μg/ml，可检测到假单胞霉素 B（2.5μg/ml），但检测不到假单胞霉素 C。向对照培养基中添加肉豆蔻酸甲酯使得假单胞霉素 A 产量显著增到 8μg/ml，可检测到 1μg/ml 的假单胞霉素 B 和 C。向对照培养基中添加可溶性淀粉使得假单胞霉素 A 产量轻微衰退，假单胞霉素 B 和 C 检测不到。应用对照培养基添加 Czapek 矿物盐溶液、甘氨酸和可溶性淀粉使得假单胞霉素 A、B 和 C 产量的增加比在对照培养基中添加任何单独的添加剂都显著和巨大（图 3）。当肉豆蔻酸甲酯添加到已添加有 Czapek 矿物盐溶液、甘氨酸和可溶性淀粉的对照培养基中时收到了进一步的提高（图 3）。对于非搅拌摇瓶来讲，每一结果都是 3 个摇瓶培养基的平均值。

正如图 4 所示，在震荡摇瓶培养中获得了相似的结果。然而，在震荡摇瓶培养中，添加甘氨酸和肉豆蔻酸甲酯是获得高于最低产量的假单胞霉素 A 所必需的，甘氨酸和肉豆蔻酸甲酯的结合可大幅度的、并且较单独添加剂在假单胞霉素 A、B 和 C 产量增加方面更大的产量增加。对各种结合和各个成分的实验也收到了相似的结果，如图 6 所示。

结论

在非震荡摇瓶培养实验中，甘氨酸和/或肉豆蔻酸甲酯各引起了假单胞霉素 A、B 和 C 产量的显著增加。肉豆蔻酸甲酯刺激了假单胞霉素 C 的产生。在搅拌摇瓶培养中，甘氨酸和肉豆蔻酸甲酯是显著提高假单胞霉素 A 的产量产量所必需的。此外，甘氨酸和肉豆蔻酸甲酯在刺激假单胞霉素 A、B 和 C 的生产方面具有协同作用。

实施例 6—脂肪酸甲酯之中，肉豆蔻酸甲酯和棕榈酸甲酯对假单胞霉素生产的刺激

在有不同链长的脂肪酸甲酯存在下培养丁香假单胞菌，它们表现

出了在依赖碳链长度基础上的对假单胞霉素生产的提高。

材料与方法:

丁香假单胞菌如实施例 5 所述而培养，在一种包含浓度为 0.1%v/v，浓度的脂肪酸甲酯的对照马铃薯右旋糖肉汤培养物中，补充了 1g/L 甘氨酸，2mL/L Czapek 无机盐溶液，5g/L 可溶性淀粉，pH5.0 的培养基中搅拌培养。如实施例 1 所述由 HPLC 测定假单胞菌素。

结果

图 6 表明在含有从 6 到 12 的偶数碳原子的脂肪酸甲酯存在下对丁香假单胞菌培养的结果。各种假单胞霉素的水平与实施例 5 中在不含肉豆蔻酸甲酯的情况下的结果相似，而肉豆蔻酸甲酯是通过在其碳链上含有 6-12 或 18-22 个碳原子的脂肪酸甲酯制备得到的。在含有 14 和 16 碳的脂肪酸甲酯存在下假单胞霉素产量有显著增加。肉豆蔻酸甲酯是含有 14 个碳原子的脂肪酸甲酯。含有 14 和 16 个碳原子的脂肪酸甲酯都可显著增加假单胞霉素 A、B 和 C 的产量。

结论

在对脂肪酸甲酯进行的检测实验中，应用 MSU16H 菌株时肉豆蔻酸甲酯产生了最大量的各种假单胞霉素。值得注意的是结合到假单胞霉素肽环上的脂肪链含有 14 个碳原子。这表明添加的肉豆蔻酸甲酯可用做假单胞霉素的前体。

实施例 7—利用含有马铃薯产品的培养基在发酵罐规模下生产假单胞霉素的方法

对于通过丁香假单胞菌的生长来产生假单胞霉素，实施例 4 和实施例 5 中完善的培养基可用于在含有马铃薯产品的培养基中进行的 150 升和 5000 升规模的发酵。

应用 150 升发酵罐进行生产

材料与方法

营养体阶段的摇瓶装有完全的链霉素培养基（CSM，表 2），向其中接种经冷藏的丁香假单胞菌培养物，在 25℃、250rpm 下搅拌 24 小时。在 24 小时的营养体摇瓶培养之后，摇瓶培养物用于接种 bump-stage 摇瓶。bump-stage 摇瓶中含有 CSM 培养基，并且在 25℃、250rpm 下搅拌。从汇聚了 3 或 4 个营养体阶段摇瓶培养物的混

合培养物中取 0.45 毫升接种 bump-stage 摇瓶。bump-stage 摇瓶一般是含有 900 毫升 CSM 培养基且没有遮流板的 2.5 升 Tunair™ 摇瓶。两个 2.5 升 Tunair™ 摇瓶培养物用于一个发酵罐的接种。bump-stage 摇瓶要培养 16 小时。

随后，将两瓶 bump-stage 摇瓶培养物（总共 1.8 升）在一个接种用火箭筒中结合。这些混合过的培养物用于接种 115 升如表 5 所述的、添加有额外的 3 g/L (总共 4 gJL)甘氨酸 和 1 g/L 大豆油的培养基。这些大规模的培养物要在 25℃下生长 4 天。在这段生长时间内，通过控制搅拌和空气流速将溶解氧控制在 30%饱和空气浓度。通过添加硫酸或氢氧化钠将 pH 控制在 5.2±0.2。大规模培养开始后 18 个小时，以 200ml/h 的速度流加葡萄糖。大规模培养开始后 20 个小时以 20ml/h 的速度流加氢氧化氨。在培养期间，压力是 5psig。搅拌的起始设定是 250rpm，空气流速的起始设定是 0.5 scfm。如果需要，也可添加抗泡沫剂。在完成了 4 天培养中的 3 天大规模培养之后就可以收取丁香假单胞菌。如实施例 1 所述进行抗真菌活性检测。

结果

在利用这种方法进行的同一批发酵中的几个发酵因子情况如图 8 和 9 所示。

结论

通过这种方法可以制得产量显著的和商业上可行的假单胞霉素。

利用 5000 升发酵罐进行生产

将成功进行了 150 升规模发酵的方法进一步扩大到 5000 升规模发酵。

材料与方法

丁香假单胞菌接种物的制备如上文在 150 升发酵罐规模中相同。5000 升发酵条件与上文 150 升发酵罐规模的发酵条件相似，所做的改动如表 14 中所示。进行的 4 次尝试，前 3 次通过无菌转移已接种的肉汤到 150 升无菌发酵罐中而作为了附属部分。好些附属物用于在 150 升发酵罐和 5000 升发酵罐间进行对比时消除营养物组成因素和灭菌因素。如实施例 1 所述进行抗真菌活性测定。

结果

表 14 总结了从 5000 升发酵的结果，以及怎样与附属发酵进行比较。除了第一次尝试外，对 5000 升发酵的浓度测定基本上与 150 升发酵相似，在第一次尝试中，5000 升发酵罐的搅拌转速开始设定在 150rpm，随后在 36 小时时降低到 50rpm。细胞生长水平是附属 150 升发酵的三分之一，假单胞霉素 A 浓度是附属 150 升发酵的四分之一。在随后的尝试中将 5000 升发酵的搅拌转速降低到 25rpm（起始设定），造成了与附属发酵和单独的 150 升发酵具可比性的细胞生长水平和假单胞霉素 A 浓度。数据表明丁香假单胞菌菌株 25—B1 对搅拌敏感。

表 14 扩大规模到 5000L 发酵罐（PPM）的生产结果

试验号	5000L Lot	滴定度	附属罐	滴定度	备注
1	005CE7	12	313CA7	45	4 g/L 甘氨酸 0.1%甲基肉豆蔻酸盐、不控制 pH，不补加；在 5000L 罐；DO_2 高，在 36hr 时将搅拌从 150rpm 降至 50rpm
2	060CE7	89	318CA7	77	除了培养基含有 1g/L 甲基肉豆蔻酸盐外与 1 相同；5000L 罐；搅拌 25rpm；DO_2 控制在 30％
3	063CE7	50	332CA7	44	培养基如 1，只是含有马铃薯珍珠(10g/L)和已糖化的肉汤，在 pH 迅速下降后，在 24 小时用 NH_4OH 将其调至 5.5.
4	068CE7	120	来进行	135	用补加的 NaOH 和 NH_4OH 将 pH 控制在 5.2，也添加葡萄糖；培养基如 1，只是在其中含有大豆油而不是甲基肉豆蔻酸酯

[1]滴定度指以μg/mL 计量的假单胞霉素

采用 80％w/v 的葡萄糖溶液进行葡萄糖进料，采用 58％w/w 氢氧化氨溶液进行氨进料

结论

通过 5000 升发酵罐发酵可以制得产量显著的和商业上可行的假单胞霉素.

实施例 8—丁香假单胞菌的大规模生长和应用缺乏马铃薯产品的培养基进行假单胞霉素生产

利用不含上述实施例中的培养基所含的马铃薯产品的 N21 培养基来发酵丁香假单胞菌，这样的条件下产生的假单胞霉素水平适于对以克计的数量的分离.

在振动摇瓶和 N21 培养基中生产假单胞霉素

材料与方法

在实施例 5 中所述的条件下培养丁香假单胞菌，只是其培养基不含马铃薯产品。这种培养基叫做 N21 培养基，含有表 15 中所示的组合物。为了确定肉豆蔻酸甲酯对假单胞霉素生产的影响，肉豆蔻酸甲酯是以 0.2%的浓度添加的.

表 15 N21 培养基的组成

成分	g/L
蔗糖	35
硫酸铵	0.5
谷氨酸单钠	2
L－组氨酸	2
甘氨酸	0.5
可溶性淀粉	5
KH_2PO_4	0.2
Czapek 矿物盐浓液	2mL
酵母浸膏	1
MES 缓冲液	9.8
调节 pH 为 5.2	

利用含有和不含肉豆蔻酸甲酯的 N21 培养基来评价几株丁香假

单胞菌的假单胞霉素生产。接受评价的菌株是 MSU 16H、25-B1、67H1 和 7H9-1。

结果

利用多种丁香假单胞菌菌株，在含有和不含肉豆蔻酸甲酯情况下的假单胞霉素生产研究结果如表 6 和图 9 所示。这些结果表明不管在含有还是在不含有肉豆蔻酸甲酯的情况下，67H1 菌株产生的每一种假单胞霉素都较高。7H9-1 菌株因为产生的假单胞霉素 B 要比假单胞霉素 B 或 C 高得多而与众不同。对每一株菌株来讲，肉豆蔻酸甲酯可刺激假单胞霉素的产生。

表 16 在含有或不含甲基肉豆蔻酸盐的条件下利用几株 p. syringae 菌株生产假单胞霉素

菌株	肉豆蔻酸甲酯	假单胞霉素 A	假单胞霉素 B	假单胞霉素 C
MSU 16H	-	59	19	12
25-B1	-	66	50	15
67H1	-	334	173	83
7H9-1	-	3	110	0
MSU 16H	+	126	45	27
25-B1	+	154	123	36
67H1	+	390	207	95
7H9-1	+	8.5	222	4.5

结论

在缺乏马铃薯产品的培养基中，不同的丁香假单胞菌菌株产生了具有在商业应用上具有显著水平的假单胞霉素，并且这些产物是由肉豆蔻酸甲酯刺激产生的。

利用 N21 培养基在 5000 升发酵罐规模下生产假单胞霉素

将应用不添加马铃薯产品的培养基生产假单胞霉素的方法放大到 5000 升水平。

材料与方法

在 5000 升发酵罐中的假单胞霉素生产如实施例 7 中所示进行，不同发只是培养基是应用 N21F 培养基（表 15）。这种 N21 培养基中

添加有 1g/l 的酵母浸膏. 菌株选用丁香假单胞菌 67H1.

结果

从 10 次 5000 升发酵罐尝试得到的平均值如表 7 所示。

表 17 在 10 次 5000 升发酵罐试验中获得的假单胞霉素的平均量

假单胞霉素	μg/mL at Harvest
A	243
B	203
C	71
C'	40

结论

应用不含额外的马铃薯产品的培养基，在 5000 升发酵罐规模上可生产在商业应用上具有显著数量的假单胞霉素 A、B、C 和 C′ 。

实施例 9——进一步简化假单胞霉素生产用培养基

在不含马铃薯产品的情况下，应用培养基 N21SM 可成功的发酵丁香假单胞菌生产假单胞霉素。基于 N21SM 培养基、但又缺乏某些组分的培养基也能生产显著水平的假单胞霉素。

材料与方法

在实施例 5 所示的条件下，在摇瓶中培养丁香假单胞菌，只是选用的培养基如下所述。基础培养基，叫做 CNP 培养基，含有表 18 所示的组合物成分。对添加剂的浓度和其结合进行的检测，如下表所列（表 18）。

表 18CNP 培养基组成

成分	量
葡萄糖	20g/L
KH_2PO_4	0.41g/L
Czapek 矿物盐溶液	2mL
MES 缓冲液	9.8g/L
硫酸铵	1g/L
调节 pH 到 5.2	

向 CNP 培养基中添加以添加剂	
谷氨酸盐	2g/L
甘氨酸	0.5g/L
L-组氨酸	2g/L
可溶性淀粉	5g/L
酵母浸膏	1g/L

利用含有和不含一或多种添加剂的 CNP 培养基对几株丁香假单胞菌的假单胞霉素生产进行了评价。

结果

在含有或不含添加剂的情况下，对几株丁香假单胞菌生产假单胞霉素的情况的研究如表 19 中所示。

表19在含或不含添加剂的CNP培养基中利用P.syringae生产假单胞霉素

假单胞霉素（μg/L）

添加剂	OD_{600}	A	B	C	C'
无	0.221	0	0	0	0
	0.222	0	0	0	0
谷氨酸盐	0.943	82.6	16.3	24.5	5.9
	0.94	87	16.7	25.7	6
甘氨盐	0.628	0	0	0	0
	0.567	0	0	0	0
组氨酸	0.331	0	0	0	0
	0.354	0	0	0	0
谷氨酸盐,甘氨酸和组氨酸	0.984	153	41	44	12
	0.98	149	40	42	12
谷氨酸盐、甘氨酸、组氨酸和可溶性淀粉	0.985	134	29	34	9
	0.996	125	34	35	11
可溶性淀粉	0.28	0	0	0	0
	0.289	0	0	0	0
酵母浸出膏	0.441	40	6	11	2
	0.449	39	6	11	2
谷氨酸盐、甘氨酸、组氨酸、可溶性淀粉和酵母浸出膏	0.998	215	52	55	17
	1.001	197	52	56	19

结论

多种最少量的培养基可用于丁香假单胞菌的生长和产生在商业应用上具有显著水平的假单胞霉素。

实施例10- 假单胞霉素A′和B′的制备

发展了从丁香假单胞菌菌株的发酵肉汤中制备假单胞霉素A′和/或B′的方法。

材料与方法

接种体的制备：将保存在液氮的气相中的部分细胞解冻，并且利用他们去接种各为 900 毫升的两部分 CSM 肉汤。CSM 肉汤组成为（g/l）：右旋糖（5）、麦芽糖（4）、Difco 酪氨酸大豆肉汤 (30)、Difco 酵母浸膏（3）、以及 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2)。大约 0.5 毫升细胞用于接种盛在 2 升摇瓶中的 900 毫升培养基。在 25℃下摇瓶搅拌培养 24 小时。将两摇瓶的培养物混合后接种到盛在 150 升发酵罐中的 115 升无菌发酵肉汤中。

发酵阶段：发酵肉汤组成为（g/l）：右旋糖(20)、可溶性淀粉(5)、 Basic American Foods Country Style Potato Pearls 速溶马铃薯泥 (30)、甘氨酸(1)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2)、KCl (0.2)和 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.004)，溶于自来水中。在灭菌前将 pH 调节为 5.2。在 25℃下发酵培养 68 小时。通过连续调节空气流速和推进搅拌速率来将溶解氧控制在 30%或高于 30%空气饱和度。通过添加硫酸和氢氧化钠将 pH 保持在 4.0 和 5.4 之间。

批量发酵方法的变化：简单批量发酵有几种变化也能用来生产假单胞霉素 A′ 和/或 B′ 。在发酵开始后 24 小时以 60 毫升/小时的速度向发酵罐中添加右旋糖。这样的添加可在整个发酵过程中都持续进行。另外，有一种方法可用于将从接种后 24 小时开始将溶解氧控制在 5%的空气饱和度，这样的溶解氧浓度一直持续到发酵结束。通过向输送到发酵罐的空气中添加惰性气体来将溶解氧控制在 5% 。一般情况下，气体一般是通过在底部搅拌窝轮下面带有开口的简单沉没式喷射管来传输的。

结果和结论

利用着几种发酵方法读从丁香假单胞菌制得了假单胞霉素 A′ 和/或 B′ 。

分离和纯化假单胞霉素 A′ 和 B′

发明了一些方法来从丁香假单胞菌菌株发酵肉汤中分离和纯化假单胞霉素 A′ 和 B′ 。

材料与方法

将发酵完成后的全部发酵肉汤（4X100 升）通过 Membralox 瓷过滤器 (0.45 um)，得到了滤过液（A 部分）和固体泥浆 B 部分）。将 B 部分（135 升）用含有 0.1%TFA 的等体积丙酮抽提 120 分钟使其澄

清．将清澈的丙酮抽提液通过过滤进行分离，然后在真空中使其蒸发为水溶液从而产生 C 部分（88 毫升）．首先，将 A 部分倒入一 HP20ss 树脂柱(10 L)中，用水压实，并且用含有 0.1%TFA 的 15% 乙腈（20 升）溶液冲洗柱子．随后将 C 部分倒入同一个柱子中，如前述用 20 升 0.1%TFA 的 15% 乙腈溶液冲洗柱子．

然后用含有 0.1%TFA 的 15-20% 乙腈溶液梯度洗脱柱子 30 分钟，以及用含有 0.1%TFA 的 20-35% 乙腈溶液梯度洗脱 60 分钟，流速为 1 升/分钟．收集各部分的馏分收集物．将 6-9 部分（4 升）合并为组分 D（24 克）．将 D 部分的一部分（大约为 1 克）通过装有反相柱 (Dynamax C_{18} 41.4 X 250 mm)的色谱柱，此色谱柱是利用三乙胺磷酸缓冲液（pH3）—乙腈—甲醇做流动相（65: 17: 18—30: 35: 35 梯度洗脱 45 分钟，流速为 40ml/min）将合适的馏分合并，体积便减少为 75 毫升，并且如前述将其重新过 C_{18} 色谱柱，通过 80: 10: 10—46: 27: 27 的梯度洗脱得到组分 E（113mg）和组分 F（116mg）..进一步将组分 E 和 F 通过 C_{18} 色谱柱(Dynamax C_{18} 41.4 X 250 mm)，分别得到 45mg 假单胞霉素 A′ 和 62mg 假单胞霉素 B′ .

结果和结论

HPLC 法在从发酵肉汤中分离假单胞霉素 A′ 和 B′ 上与那些用于纯化其他假单胞霉素的方法相似。

已经对本发明中与多种特别的和优选的实施方案及技术有关的方面进行了描述。然而，我们应该明白，在本发明的精神和范围内可以有不同的变化和修正。在这方面，所有的出版物和专利申请都是本专利所属领域中的一般技术水平的指示物。

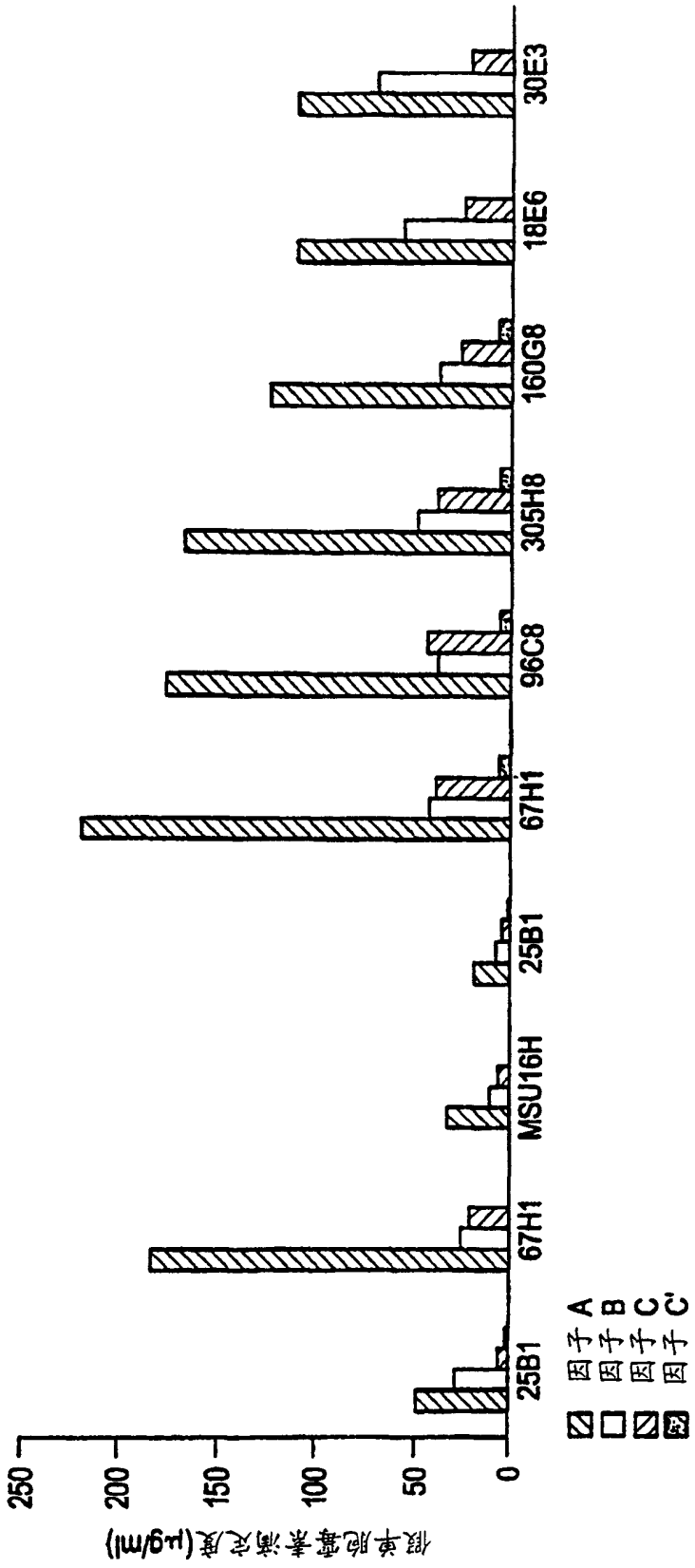

假单胞霉素滴定度(μg/ml)
250
200
150
100
50
0
25B1
67H1
MSU16H
25B1
67H1
96C8
305H8
160G8
18E6
30E3
因子A
因子B
因子C
因子C'

图 1

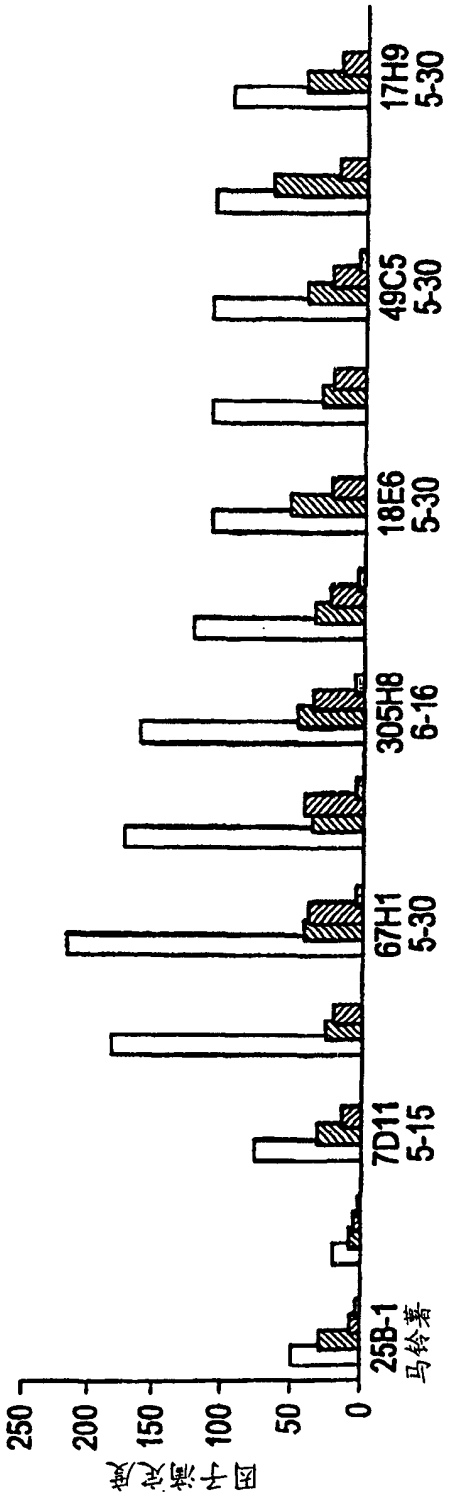

250
200
150
100
50
0
菌落定量
25B-1
马铃薯
7D11
5-15
67H1
5-30
305H8
6-16
18E6
5-30
49C5
5-30
17H9
5-30
菌株
A
B
C
C'

图 2

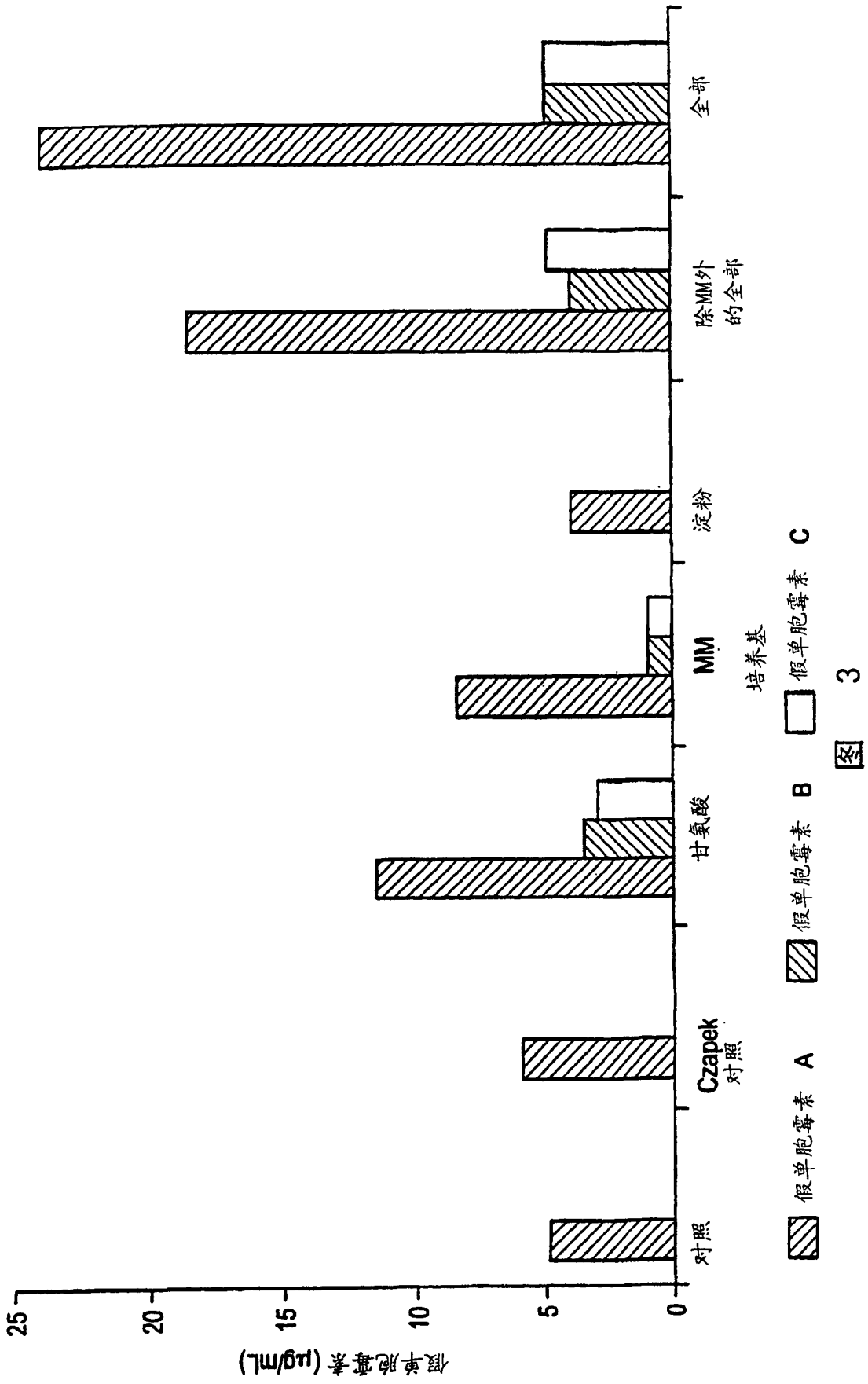

假单胞霉素 (μg/mL)
25
20
15
10
5
0
对照
Czapek
对照
甘氨酸
MM
淀粉
除MM外
的全部
全部
培养基
假单胞霉素 A
假单胞霉素 B
假单胞霉素 C

图 3

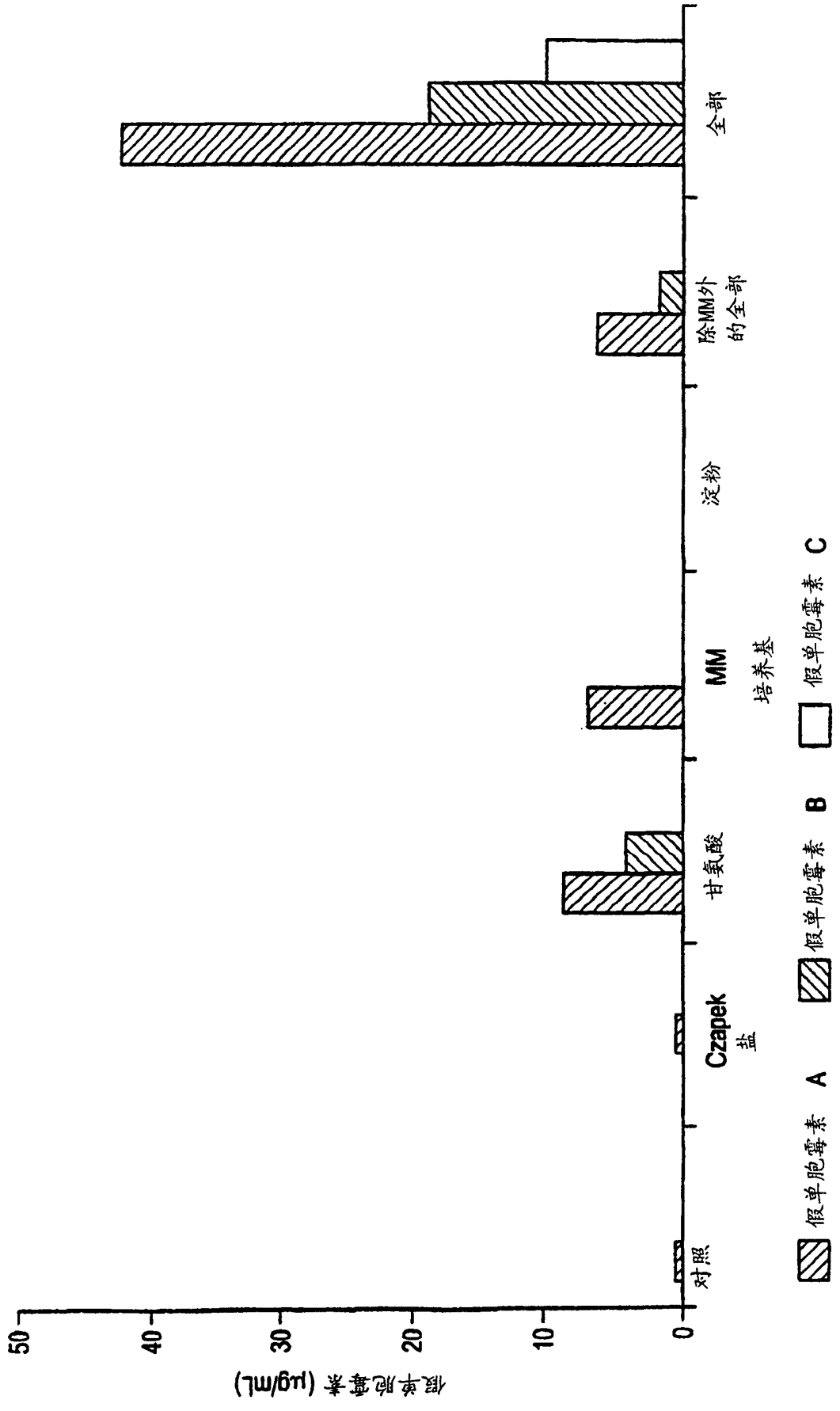

假单胞霉素 (μg/mL)
50
40
30
20
10
0
对照
Czapek
盐
甘氨酸
MM
培养基
淀粉
除MM外
的全部
全部
假单胞霉素 A
假单胞霉素 B
假单胞霉素 C

图 4

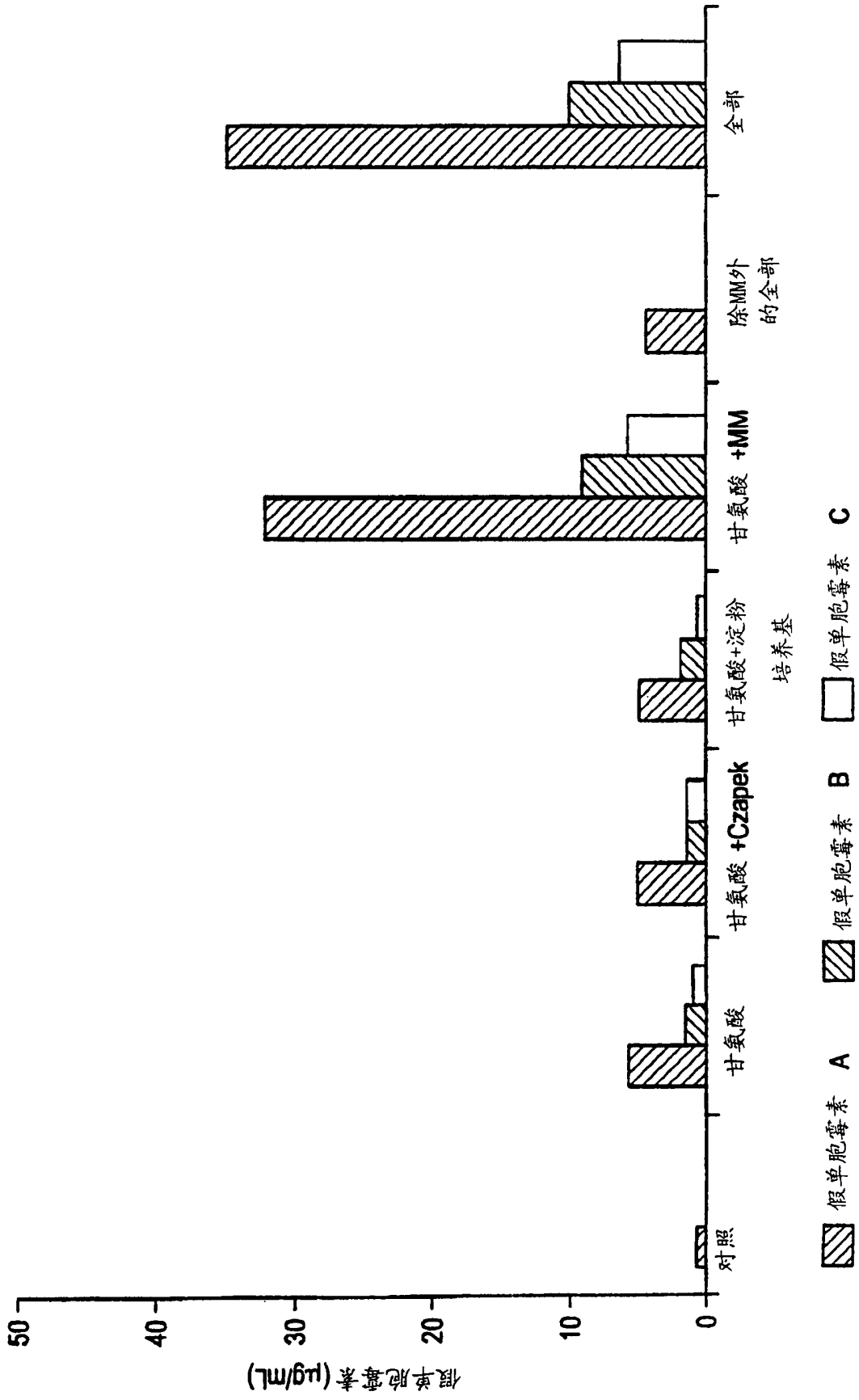

假单胞霉素 (μg/mL)
50
40
30
20
10
0
对照
甘氨酸
甘氨酸 +Czapek
甘氨酸+淀粉
甘氨酸 +MM
除MM外的全部
全部
培养基
假单胞霉素 A
假单胞霉素 B
假单胞霉素 C

图 5

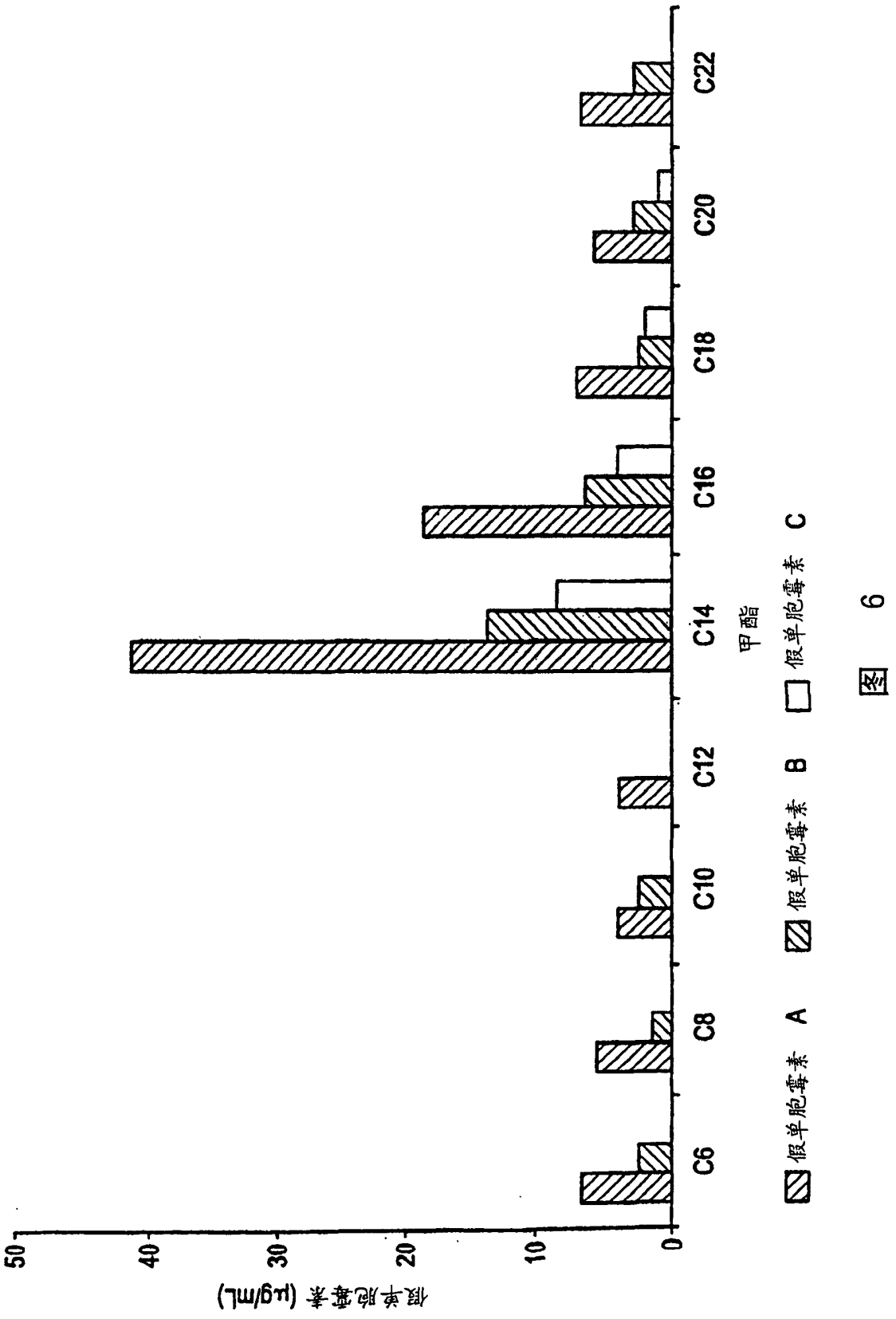

假单胞霉素 (μg/mL)
50
40
30
20
10
0
C6
C8
C10
C12
C14
C16
C18
C20
C22
甲酯
假单胞霉素 A
假单胞霉素 B
假单胞霉素 C

图 6

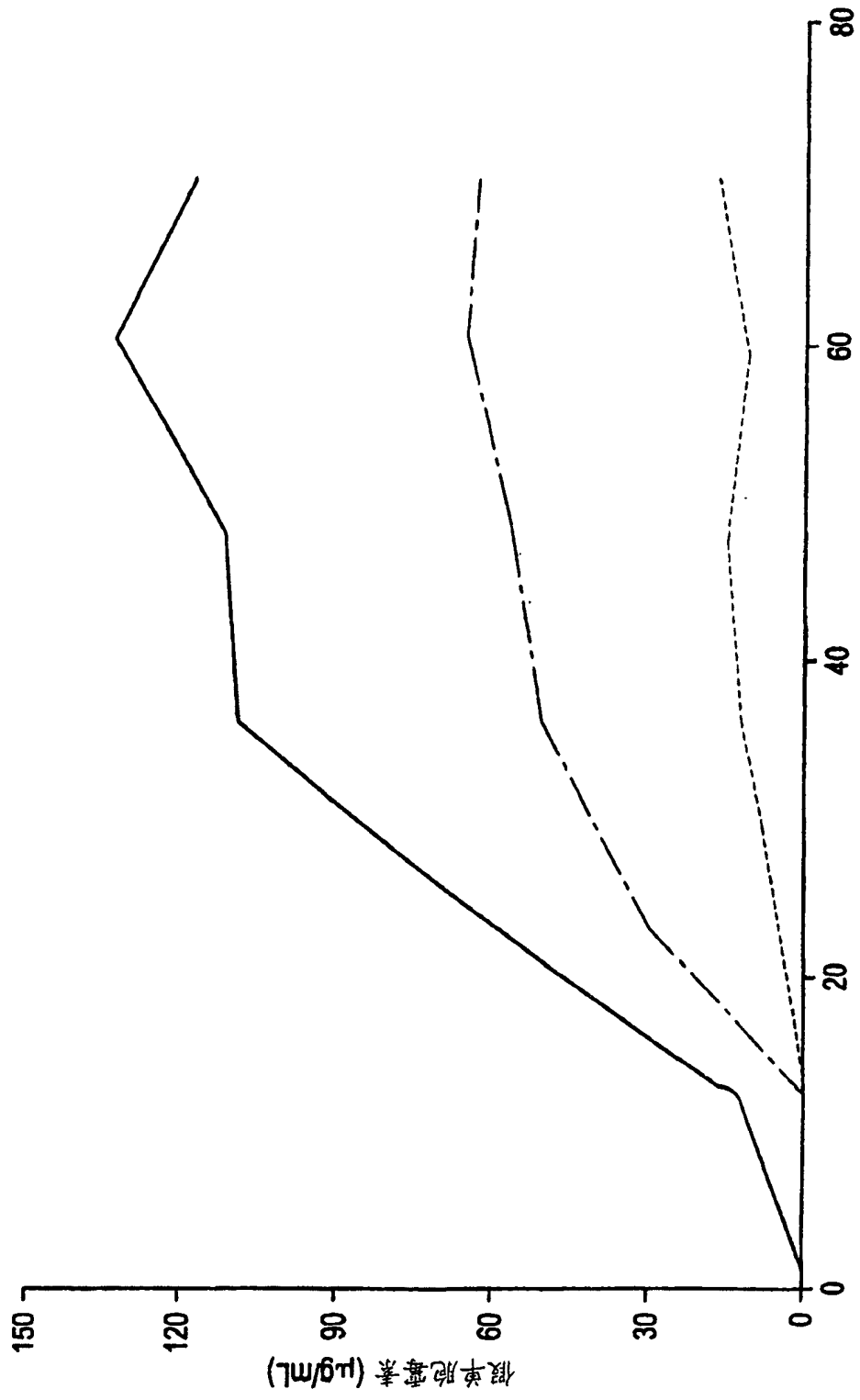

假单胞霉素 (μg/mL)
150
120
90
60
30
0
0
20
40
60
80
时间 (小时)
假单胞霉素 A
假单胞霉素 B
假单胞霉素 C

图 7

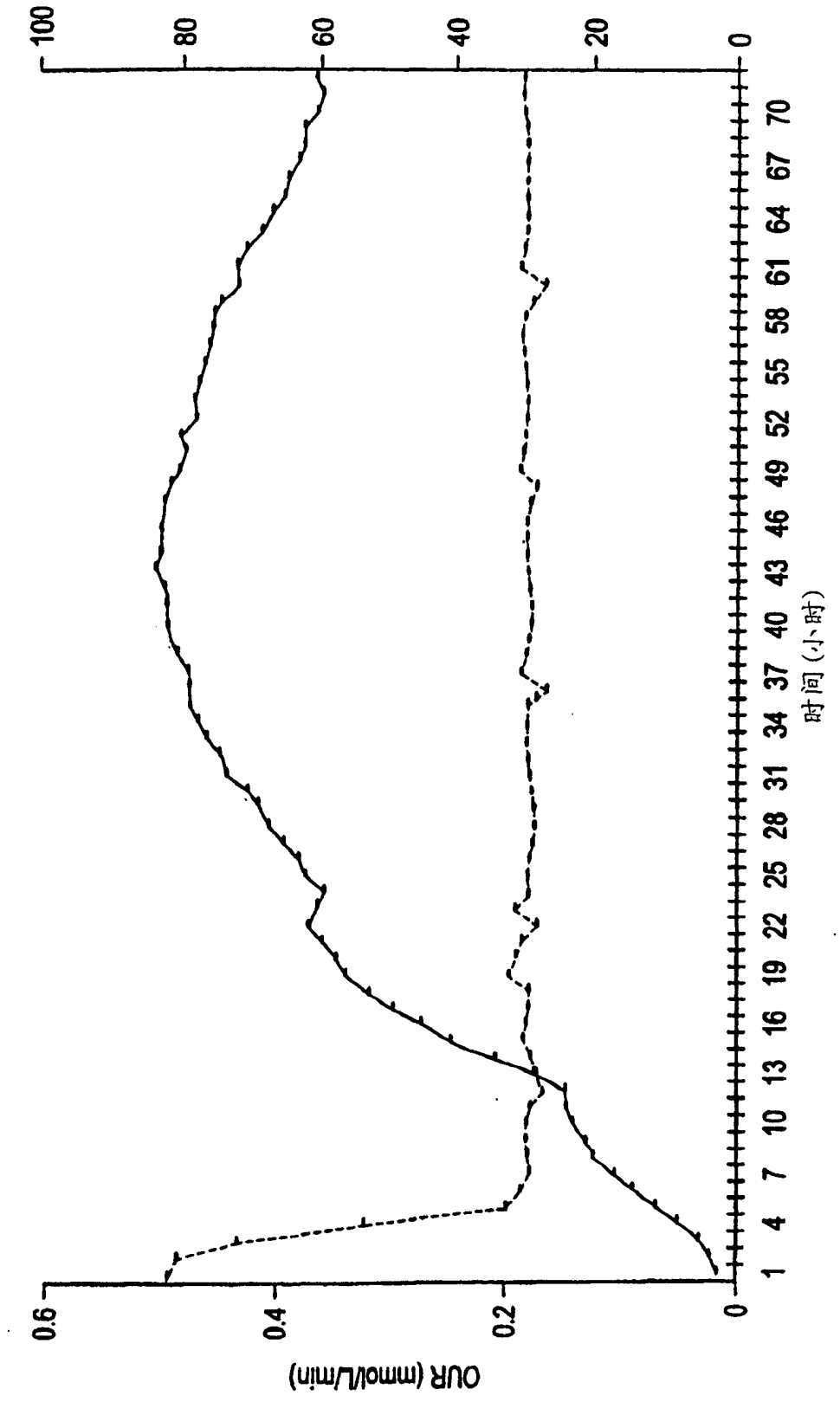

OUR (mmol/L/min)
0.6
0.4
0.2
0
100
80
60
40
20
0
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58 61 64 67 70
时间(小时)
OUR
DO(%)

图 8

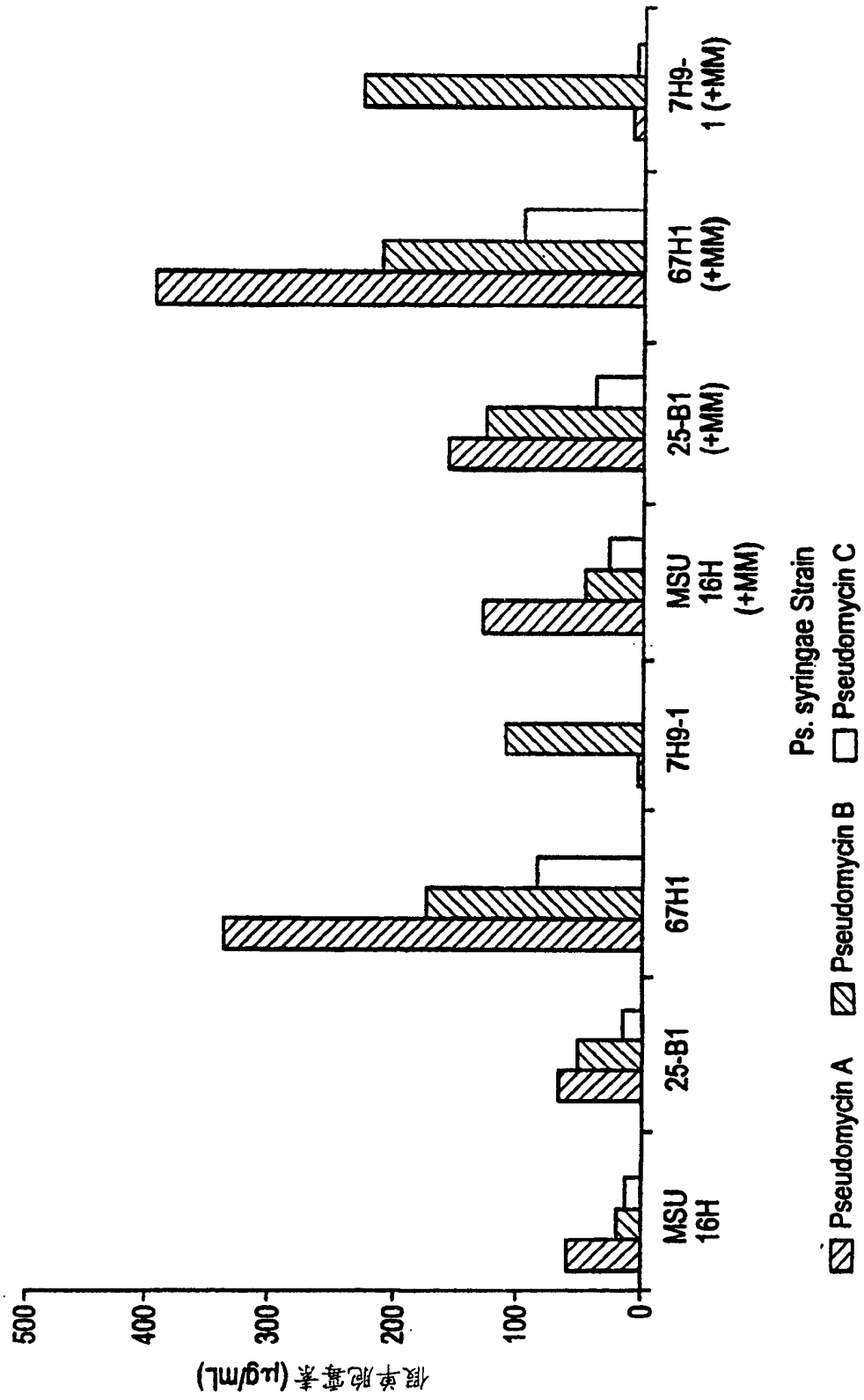

假单胞霉素 (μg/mL)
500
400
300
200
100
0
MSU 16H
25-B1
67H1
7H9-1
MSU 16H (+MM)
25-B1 (+MM)
67H1 (+MM)
7H9-1 (+MM)
Ps. syringae Strain
Pseudomycin A
Pseudomycin B
Pseudomycin C

图 9