

P02000919



73.332/SZE

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY** A2

KIVONAT

PSZEUDOMICIN ELŐÁLLÍTÁSA *PSEUDOMONAS SYRINGAE*
TENYÉSZETEKKEK

A jelen találmány tárgya eljárás egy vagy több pszeudomicin származék előállítására, (I) általános képletű pszeudomicineket előállító *Pseudomonas syringae* tenyészetekkel, amely képletben R jelentése lipofil csoport.

fel: I. Spret

Fredrik.

73.332/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabványügyi Testület
H-1067 Budapest, Andrássy út 143.
Telefon: 34-2-9800, Fax: 34-24-323

ÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A2

PSZEUDOMICIN ELŐÁLLÍTÁSA *PSEUDOMONAS SYRINGAE* TENYÉSZETEKSEL

A jelen találmány tárgya eljárás egy vagy több pszeudomicin származék előállítására, továbbá egy vagy több pszeudomicin származékot termelő *Pseudomonas syringae* tenyészetek.

A gombás fertőzések jelentős számban okozói a megbetegedéseknek, az életminőség romlásának, és különösen immunbetegségben szenvedő egyének esetében az ember halálozási arányának. A gombás fertőzések gyakorisága embernél az utóbbi 20 évben nagymértékben nőtt. Ennek oka részben az, hogy megnőtt a legyengült, vagy szervátültetés, rák kemoterápia, AIDS, életkor és egyéb hasonló betegségek vagy kóros állapotok következtében legyengült vagy elpusztított immunrendszerű egyének száma. Az ilyen betegek hajlamosak olyan patogén gombás betegségekre, amelyek a népességben elterjedtek, de azokat a jól működő immunrendszer ellenőrzés alatt tartja. Ezek a patogének nehezen kezelhetők, mert a létező gombaellenes hatóanyagok egy része nagymértékben mérgező, más részük csak a gomba működését gátolja. Például, a poliének gombaölőszerek, de mérgezőek; míg az azolok sokkal kevésbé mérgezőek, de csak gátolják a gomba növekedését. Fontosabb azonban, hogy a közelmúltban olyan *Candida* törzsekről számoltak be, amelyek azolokkal és poliénekkal szemben ellenállóak, így igen korlátozott a szóbanforgó törzsek elleni terápiás kezelés lehetősége.

Az újszerű gombaellenes anyagok egy csoportja, a pszeudomicinek egyes betegek gombás fertőzéseinek kezelésében nagyon ígéretesek (lásd ezzel kapcsolatban Harrison, L., és mások,



"Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity"

[„Pszeudomicinek, a *Pseudomonas syringae* által termelt újszerű, szélesspektrumú gombaellenes hatással rendelkező újszerű peptid vegyületcsoport"], *J. Gen. Microbiology*, **137** (12), 2857-65 (1991) közleményt, valamint az 5,576,298 és 5,837,685 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentéseket). A pszeudomicinek *Pseudomonas syringae* izolátumokból származó természetes anyagok. A *P. syringae* a növényekkel együtt élő baktériumok egy nagy csoportja, amelyek számos biológiailag aktív anyag, mint például a bacitracin és a sziringomicinek forrásai. A *P. syringae* természetes törzsei, és transzpozonnal átalakított mutáns alakjai gombaellenes hatású vegyületeket termelnek. A *P. syringae* MSU 174 jelű vad típusú törzsének transzpozonnal átalakított, regulációs (szabályozási) mutáns alakja, ami MSU 16H (ATCC 67028) néven ismert, többféle pszeudomicint termel. Elválasztották és kémiaiilag jellemezték a pszeudomicin A, B, C és C' alkotórészeket, és kimutatták, hogy azok szélesspektrumú gombaellenes hatással rendelkeznek, és többek között a növényekben és az emberben előforduló fontos gombás betegségek ellen hatásosak. A pszeudomicinek szerkezetileg rokonok a sziringomicinnel, de különböznek attól, és a *P. syringae* izolátumok egyéb gombaellenes anyagaitól. A pszeudomicin A, B, C, C' peptid része L-Ser-D-Dab-L-Asp-L-Lys-L-Dab-L-aThr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl)-csoportnak felel meg, melynek láncvégi karboxil csoportja az N-terminális szerin OH-csoportjával makrogyűrűt zár be. Az analógok az N-acil oldallánc alapján különböztethetők meg, azaz, a pszeudomicin A N-acil-csoportja 3,4-dihidroxitetradekanoát, a pszeudomicin B N-acil-csoportja 3-hidroxitetradekanoát, a pszeudomicin C N-acil-csoportja 3,4-dihidroxihexadekanoát, és a pszeudomicin C' N-acil-



- csoportja 3-hidroxi-hexadekanoát (lásd ezzel kapcsolatban Ballio, A., és mások, "Novel bioactive lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae*: the pseudomycins", *FEBS Letters*, **355**(1), 96-100, (1994) valamint Coiro, V.M., és mások, "Solution conformation of the *Pseudomonas syringae* MSU 16H phytotoxic lipodepsipeptide Pseudomycin A determined by computer simulations using distance geometry and molecular dynamics from NMR data", *Eur. J. Biochem.*, **257**(2), 449-456 (1998) közleményét).

Annak ellenére, hogy növekszik a gombás fertőzések gyakorisága, és a pszeudomicinek ígéretesek, a pszeudomicinek előállítása kereskedelmi mennyiségben nehézkesnek bizonyult. A pszeudomicinek előállítására szolgáló, közleményekben szereplő eljárásokat mozgatás és keverés nélkül, drága burgonya-szőlőcukor táptalaj alkalmazásával végzik. Az ilyen tenyészetekben jellemzően laboratóriumi vizsgálatokra elegendő, kis mennyiségű pszeudomicin termelődik olyan koncentrációban, amely nagy méretben, vagy kereskedelmi méretekben való termelésre nem alkalmas. Szintén nem alkalmas körülbelül egy liternél nagyobb méretben való alkalmazásra a mozgatás nélküli tenyészet, mert a tápanyagok és gázok, különösen az oxigén diffúziója, és a megfelelő sejtnövekedés fenntartása nehezen valósítható meg.

Szükség van egy olyan eljárásra a pszeudomicin előállításban, amelyben a *P. syringae* alkalmazása olyan méretben és koncentrációban valósul meg, amely alkalmas a pszeudomicinek, mint gombaellenes anyagok állatok, ember, vagy növények fertőzései elleni alkalmazásra.

A jelen találmány tárgya mikroorganizmusok alkalmazása valamely gombaellenes anyag, mint például egy vagy több pszeudomicin származék előállítására szolgáló eljárásban. Az eljárásban *Pseudomonas syringae* sejtenyészetet három vagy



kevesebb aminosavat tartalmazó táptalajon tenyésztünk, majd a tenyészetből kinyerünk egy vagy több pseudomicin összetevőt. A három vagy kevesebb aminosav lehet többek között glutaminsav, glicin, hisztidin vagy ezek keveréke. Az egyik megvalósításban, a *P. syringae* sejtenyészet glicint, és adott esetben lipidet, burgonyából származó terméket vagy ezek kombinációját tartalmazó táptalajon tartjuk, a pH pedig 4 - 6,5, amíg egy vagy több pseudomicin származék körülbelül legalább 10 µg/ml, előnyösebben körülbelül több, mint 40 µg/l koncentrációban termelődik. Az eljárás különösen alkalmas egy vagy több pseudomicin származék előállítására olyan méretben, amelyben a kinyert egy vagy több pseudomicin származék állatok, ember vagy növények gombaellenes kezelésére alkalmas hatóanyag. Továbbá, a jelen találmány tárgya a fent leírt eljárással termelt pseudomicinek.

A jelen találmány tárgya továbbá a *P. syringae* törzsek olyan biológiailag tisztított tenészetei, amelyek pseudomicinek termelésére alkalmasak. A *P. syringae* törzsek lehetnek vad típusú, környezeti forrásokból, többek között növényekből, mint például árpafélékből, citrusfélékből, orgonafélékből stb. izolált törzsek; az ilyen környezeti izolátumokból kiválasztott törzsek; és az ilyen törzsek mutáns alakjai. Az előnyös környezeti izolátumok növényekből származnak. Az előnyös *P. syringae* tulajdonságai többek között, hogy képesek burgonyából származó terméket nem tartalmazó, vagy minimális táptalajon egy vagy több pseudomicin származék termelésére; képesek a pseudomicinek jelentős, például körülbelül legalább 10 µg/l koncentrációban termelni; képesek a pseudomicinek kívánt arányának termelésére; és/vagy képesek egy vagy több gomba növekedésének gátlására.



A jelen találmány szerint a *P. syringae* három vagy kevesebb aminosavat, és adott esetben lipidet, burgonyából származó terméket vagy ezek kombinációját tartalmazó táptalajon hosszantartó növekedést és anyagcserét mutat, amíg körülbelül legalább 10 µg/ml koncentrációban egy vagy több pseudomicin származék termelődik. Előnyösebben, a *P. syringae* törzs körülbelül 40 µg/ml - körülbelül 700 µg/ml koncentrációban termel egy vagy több pseudomicin származékot, legelőnyösebben körülbelül 200 µg/ml koncentrációban termel pseudomicin A-t, vagy körülbelül legalább 100 µg/ml koncentrációban termel pseudomicin B-t.

Az eljárás egyik előnyös megvalósításában egy *P. syringae* törzs szakaszos (részletekben adagolt tápanyag-mennyiség alkalmazásával létrehozott) vagy folyamatos (a tápanyagok folyamatos adagolásával létrehozott) tenyésztési körülmények közötti növekedése során egy vagy több pseudomicin származék termelődik. A *P. syringae* tenyészetek elegendő ideig és elegendő sűrűségben növekednek ahhoz, hogy megnöveljék a pseudomicin termelést. A tenyészet pH-ját előnyösen körülbelül 4 - körülbelül 6,5, előnyösebben 4,5 - 5,5 közötti értéken tartjuk, hogy biztosítsuk a pseudomicin stabilitását.

Meghatározások

A "pseudomicin" kifejezés jelentése a jelen találmányban (I) általános képletű vegyület, amely képletben R jelentése lipofil csoport. A pseudomicin A, A', B, B', C, C' vegyületek olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyekben R jelentése a következő:

Pszudomicin A R = 3,4-dihidroxi-tetradekanoil

Pszudomicin A' R = 3,4-dihidroxi-pentadekanoát,



Pszeudomicin B	R = 3-hidroxi-tetradekanoil
Pszeudomicin B'	R = 3-hidroxi-tetradekanoát
Pszeudomicin C	R = 3,4-dihidroxi-hexadekanoil
Pszeudomicin C'	R = 3-hidroxi-hexadekanoil

Az 1. ábra N21SM vagy burgonyagyöngy táptalajon ~67 órán át tenyésztett több *P. syringae* törzs pszeudomicin A, B, C és C' termelésének szintjeit mutatja.

A 2. ábra N21SM táptalajon, palackokban ~67 órán át tenyésztett több *P. syringae* törzs pszeudomicin A, B, C és C' termelésének szintjeit mutatja.

A 3. ábra nem rázott palackokban, hozzáadott sókat, glicint, metil-mirisztátot és/vagy oldható keményítőt tartalmazó burgonya-szőlőcukor táptalajon tenyésztett *P. syringae* MSU 16H törzs pszeudomicin A, B és/vagy C termelését mutatja.

A 4. ábra pszeudomicin termelést mutat a 3. ábránál leírt körülmények között, azzal a különbséggel, hogy a palackokat rázzuk.

Az 5. ábra pszeudomicin termelést mutat glicin tartalmú táptalaj, és a 4. ábránál leírt rázott palackok alkalmazása mellett. Ezek az eredmények szemléltetik a glicin és metil-mirisztát pszeudomicin termelést serkentő hatásában mutatkozó szinergizmust (együtthatást).

A 6. ábra burgonya-szőlőcukrot, glicint, sókat és oldható keményítőt, és 0,1 v/v% koncentrációban a közeghez adagolt különböző zsírsav metil-észtereket tartalmazó táptalajon tenyésztett MSU 16H jelű *P. syringae* törzs pszeudomicin A, B, és/vagy C termelését mutatja. A zsírsavak mindegyike telített, a sávok alatti számok pedig a szénlánc hosszát mutatják.



A 7. ábra a pszeudomicin faktor tartalmát mutatja 150 literes fermentálásban. Az oldott oxigén koncentrációját a keverés és a légáram számítógépes szabályozásával 30%-on tartottuk. A glükóz adagolását 18 óra elteltével kezdtük meg, 200 ml/h sebességgel, az ammónium-hidroxid adagolását a 20. órában 20 ml/h sebességgel. Ebben a fermentációban nem tapasztaltunk pszeudomicin C' termelést.

A 8. ábra az oxigénfogyasztást és az oldott oxigént mutatja abban a 150 literes fermentációban, amelynek pszeudomicin termelése a 7. ábrán látható.

A 9. ábra a hozzáadott, burgonyából származó termékeket nem tartalmazó, és metil-mirisztátot tartalmazó vagy nem tartalmazó táptalajon, rázott palackokban tenyésztett különböző *P. syringae* törzsek pszeudomicin A, B, és/vagy C termelését mutatja.

Pseudomonas syringae

A *Pseudomonas syringae* csoportba számos, általában a növényekkel kapcsolatban levő baktérium tartozik. Több *P. syringae* növényi patogén, míg mások csak gyengén patogének, vagy korhadéklakók. Sok különböző *P. syringae* izolátum egy vagy több olyan citotoxikus anyagot termel, amelyek segítik a baktérium túlélését a természetben, ahol gombákkal és más baktériumokkal kell versengeniük. A *P. syringae* által termelt citotoxikus anyagok többek között gombaellenes anyagok, mint például pszeudomicinek, sziringomicinek, a sziringotoxinok és a sziringosztatinok.

Egy vagy több pszeudomicint termelő *P. syringae* törzsek önmagukban ismertek. Például, az MSU 174 jelű (egy Montanabeli árpaföldről elkülönített) vad típusú törzs, és ennek Tn905 jelű transzpozonnal átalakított (MSU 16H jelű) mutáns alakjának leírása



G. Strobel és mások, 1996 november 19.-én közzétett 5,576,298 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésében; Harrison és mások, "Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity", *J. Gen. Microbiology* **137**, 2857-2865 (1991); és Lamb és mások, "Transposon mutagenesis and tagging of fluorescent pseudomonas: Antimycotic production is necessary for control of Dutch elm disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6447-6451 (1987) című közleményében szerepel. MSU 174 és MSU 16H jelű tenyészetek megtalálhatók a Montana Állami Egyetemen (Bozeman, Montana, USA), és beszerezhetők az American Type Culture Collection (Amerikai Törzs Tenyészet Gyűjtemény, Parklawn Drive, Rockville, MD, USA). Az ebben a bekezdésben említett közleményekre a jelen találmány részeként hivatkozunk.

A jelen találmány tárgya többek között olyan *P. syringae* törzs, izolátum és biológiailag tisztított tenyészet, amely több, mint körülbelül 10 µg/ml, előnyösen körülbelül legalább 10 µg/ml és körülbelül 900 µg/ml közötti, előnyösebben körülbelül 800 µg/ml és körülbelül 900 µg/ml közötti mennyiségben termel egy vagy több pszeudomicin származékot. A mikroorganizmus biológiailag tisztított tenyészete előnyösen MSU 16H, 25-B1, 67H1, 7H9-1M vagy 7D11-6 jelű *Pseudomonas syringae* törzs, vagy ezen törzsek pszeudomicint termelő mutáns alakja, változata, izolátuma vagy rekombináns alakja. Az MSU 174 és MSU 16H jelű tenyészeteket a fent idézett hivatkozásokban leírt módon állítottuk elő.

Az egy vagy több pszeudomicin származék termelésére alkalmas *P. syringae* törzs környezeti forrásokból, többek között növényekből, mint például árpafélékből, citrusfélékből, orgonafélékből stb., vagy olyan forrásokból, mint például a talaj, víz, levegő, por stb. izolálható. Az előnyös törzset növényekből



izoláljuk. A környezeti forrásból izolált *P. syringae* törzseket vad típusnak is nevezhetjük. A "vad típus" kifejezés jelentése a jelen találmányban a *P. syringae* természetes populációiban természetes módon előforduló domináns genotípus (azaz, a természetben előforduló, és nem laboratóriumban előállított törzsek vagy izolátumok). Mint ahogy más mikroorganizmusok, a jelen találmányban alkalmazott pseudomicin termelő tenyészetek, a *P. syringae* törzsei is, mint például az MSU 174, MSU 16H, MSU 206, 25-B1 és 7H9-1 jelű törzsek, változékonyak. Így ezen törzsek utódtörzsei, például a rekombinánsok, mutánsok és változatok a szakmában jól ismert eljárásokkal állíthatók elő.

A *P. syringae* mutáns törzsei is alkalmasak egy vagy több pseudomicin származék termelésére. A "mutáns" kifejezés a jelen találmányban valamely törzs fenotípusának olyan hirtelen bekövetkező, öröklődő változására utal, amely lehet spontán, vagy előidézhetik ismert mutagén anyagok, többek között sugárzás, és különböző vegyi anyagok. A jelen találmány szerinti mutáns *P. syringae* törzsek előállíthatók különféle mutagén hatások, többek között sugárzás; mint például ultraibolya fény, vagy röntgensugárzás; kémiai mutagének, helyspecifikus mutagenesis, és transzpozonnal közvetített mutagenesis alkalmazásával. Kémiai mutagének például az etil metán-szulfonát (EMS), diepoxi-oktán, N-metil-N-nitro-N'-nitrozo-guanin (NTG), és salétromossav.

A jelen találmány szerinti pseudomicint termelő mutáns *P. syringae* törzsek úgy állíthatók elő, hogy a baktériumokat olyan mennyiségű mutagén anyaggal kezeljük, amely elég hatásos ahhoz, hogy egy vagy több pseudomicin származékot túltermelő mutánsok, egyéb pseudomicin származékokhoz képest túlsúlyban levő egy pseudomicin származékot, például pseudomicin B-t termelő mutánsok, vagy előnyös növekedési körülmények között



egy vagy több pseudomicin származékot termelő mutánsok keletkezzenek. Míg az alkalmazott mutagén anyag fajtája és mennyisége változhat, egy előnyös eljárásban NTG-oldatokat 1-től 100 µg/ml-ig terjedő koncentráció szintekig sorozatban hígítunk. A jelen találmány szerint előnyös mutánsok azok, amelyek a pseudomicin B-t túltermelik, és a minimálisnak meghatározott táptalajon is növekednek. A mutánsok egy vagy több pseudomicin származékot túltermelnek, előnyösen körülbelül legalább 10 µg/ml és körülbelül 900 µg/ml közötti, előnyösebben körülbelül 800 µg/ml és körülbelül 900 µg/ml közötti koncentrációban.

A környezeti izolátumokból, mutáns törzsekből és a *P. syringae* egyéb kívánt törzseiből kiválaszthatók a kívánalmaknak megfelelő növekedési szokásoknak, növekedési táptalaj, szénforrás, növekedési körülmények, és aminosavigény jellemzőknek megfelelő törzsek. Előnyösen, a pseudomicin termelő *P. syringae* törzset a minimálisnak meghatározott táptalajon, például N21 táptalajon való növekedése alapján, és/vagy az alapján választjuk ki, hogy egy vagy több pseudomicin származékot nagyobb, mint körülbelül 10 µg/ml koncentrációban termel-e. Az előnyös törzsekre egy vagy több pseudomicin származék termelése jellemző olyan táptalajon, amely három vagy kevesebb aminosavat, és adott esetben lipidet, vagy burgonyából származó terméket, vagy ezek kombinációját tartalmazza.

A rekombináns törzsek a *P. syringae* törzsek átalakításával a szakmában jól ismert eljárásokkal fejleszthetők ki. A *P. syringae* törzsek rekombináns DNS technológia alkalmazásával olyanná alakíthatók, hogy az általuk termelt antibiotikumok mellett további géntermékeket is előállítsanak. Például, a törzsek egy olyan rekombináns vektorral átalakíthatók, amely olyan antibiotikummal szembeni ellenállóképességet ad, ami ellen a törzsek



rendesen érzékenyek. Az így nyert transzformált változatok nem csak pseudomicineket termelnek, hanem azt az ellenállóképességet adó enzimet is, amely lehetővé teszi a transzformált sejtek kiválasztását a vad típusú sejtek közül. Továbbá, hasonló eljárások alkalmazásával a meglévő törzsekbe a belső pseudomicin bioszintéziséért felelős génnek többszörös másolata ültethető be, nagyobb pseudomicin hozam elérése érdekében. A 25-B1, 67H1 és 7H9-1 jelű *P. syringae* törzseknek a pseudomicin túltermelés tulajdonságát megtartó utódai, azaz a természetes és létrehozott változatai, mutáns és rekombináns alakjai a jelen találmány részét képezik.

Pseudomicinek

A pseudomicin elnevezés a jelen találmányban a gombaellenes anyagok csoportjának olyan tagjaira vonatkozik, amelyek a *Pseudomonas syringae* baktériumból származnak. A pseudomicinek lipodepsziptidek, egy vagy több szokatlan aminosavat tartalmazó olyan gyűrűs peptidek, amelyekhez egy vagy több hidrofób zsírsavlánc kapcsolódik. Részletesebben, a pseudomicinek olyan lipodepszinonapeptidek, amelyek lakton kötéssel záruló gyűrűs peptid részt, és nem szokványos aminosavakat, azaz 4-klór-treonint, 3-hidroxi-aszparaginsavat, dehidro-2-amino-vajsavat és 2,4-diamino-vajsavat tartalmaznak. Feltetelezzük, hogy a szokatlan aminosavaknak szerepük van a pseudomicinek biológiai tulajdonságai, mint a szérumbeli stabilitás, és a gombaölőképesség kialakításában. A pseudomicin származékok többek között a pseudomicin A, a pseudomicin A', a pseudomicin B, a pseudomicin B', a pseudomicin C és a pseudomicin C'. Ezen pseudomicinek mindegyike ugyanazt a



gyűrűs peptid alapvázat tartalmazza, az ehhez a vázhoz kapcsolódó hidrofób oldalláncban különböznek.

A pseudomicin A, A', B, B', C és C' típusok mindegyikét izolálták, tisztították, szerkezetüket többek között aminosav szekvencia meghatározással, NMR és tömegspektrometriás eljárásokkal jellemezték. A pseudomicin A, B, C és C' leírása G. Strobel és mások, 1996. november 19-én közzétett 5,576,298 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésében; Harrison és mások, "Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity", *J. Gen. Microbiology* **137**, 2857-2865 (1991) közleményében; és Ballio és mások, "Novel bioactive lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae*: the pseudomycins", *FEBS Lett.* **355**, 96-100 (1994) közleményében szerepel. A pseudomicin A' és B' leírása Palaniappan Kulanthaivel és mások PCT/US00/08727 számú, "Pseudomycin Natural Products" című, a jelen találmánnyal egyidőben bejelentett egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésében szerepel, ezen anyagok előállítására a példákban kitérünk. A több pseudomicin származék által mutatott gombaellenes hatást a Tn 903 jelű transzpozont viselő *P. syringae* törzsnek tulajdonítják, amely transzpozon többek között olyan tulajdonságokat kódol, mint a kanamicin rezisztencia. A Tn 903 jelű transzpozon bázissorrendje, és az azzal végzett átalakítási eljárások ismertek. Lásd ezzel kapcsolatban Oka és mások, "Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn 903", *J. Mol. Biol.* **147**, 217-226 (1981) közleményét. Az ebben a bekezdésben említett hivatkozásokra a jelen találmány részeként hivatkozunk.

A pseudomicinek szerkezete és tulajdonságai változók. Az előnyös pseudomicin A, B, C és C' számos gomba ellen



hatásos, és általában elfogadható a toxicitásuk is. A pszeudomicin B a többi előnyös pszeudomicinhez képest bizonyos gombák ellen hatásosabb, és toxicitási szintje alacsonyabb. Így a pszeudomicin B alkalmazása a jelenlegi eljárások szempontjából előnyösebb. Mindegyik pszeudomicinben nonapeptid gyűrű található, melynek aminosavsorrendje Ser-Dab-Asp-Lys-Dab-aThr-Dhb-HOAsp-CIThr (szerin; 2,4-diamino-vaajsav; aszparaginsav; lizin; 2,4-diamino-vaajsav; allo-treonin; dehidro-2-amino-vaajsav; 3-hidroxi-aszparaginsav; 4-klór-treonin), részletesebben L-Ser-D-Dab-L-Asp-L-Lys-L-Dab-L-aThr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl), amelyben a CIThr-csoport karboxilcsoportja és a szerin hidroxilcsoportja zárja a gyűrűt, lakton kötéssel. A pszeudomicinek az N-terminális szerin amincsoportjához kapcsolódó lipofil csoport természetében különböznek. A szerin amincsoportja a pszeudomicin A-ban a 3,4-dihidroxi-tetra-dekanoil-csoport, a pszeudomicin B-ben a 3-monohidroxi-tetradekanoil-csoport, a pszeudomicin C-ben a 3,4-dihidroxi-hexadekanoil-csoport, és a pszeudomicin C'-ben a 3-monohidroxi-hexadekanoil-csoport karboxilcsoportjával képez amid-kötést. A szerin karboxilcsoportja a gyűrű Dab-csoportjával képez amidkötést.

A pszeudomicinek biológiai hatása

A pszeudomicinek számos biológiai hatással rendelkeznek, ilyen többek között különböző gombák, mint például növények és állatok patogén gombái elleni gombaölő hatás. Részletesebben, a pszeudomicinek olyan gombák ellen hatásos anyagok, amelyek a hiányos immunrendszerű egyéneknél opportunisztikus fertőzéseket okoznak. Ilyen a *Candida* nemzetség számos faja, többek között a *C. parapsilosis*, a *C. albicans*, a *C. glabrata*, a *C. tropicalis* és a *C. krusei*. Más nemzetségek is ide



· sorolhatók, például a *Cryptococcus neoformans*, az *Aspergillus fumigatus* és a *Histoplasma capsulatum*. A pszeudomicinek kívánatos, és előnyös biológiai hatása, különösen patogén gombák esetében, inkább a gombaölő hatás, mint a növekedés gátlása.

A pszeudomicinek számtalan növényi patogén gomba ellen is toxikusnak bizonyultak, ilyenek többek között a *Rhynchosporium secalis*, a *Ceratocystis ulmi*, a *Rhizoctonia solani*, a *Sclerotinia sclerotiorum*, a *Verticillium alboatrum*, a *Verticillium dahliae*, a *Thielaviopsis basicola*, a *Fusarium oxysporum* és a *Fusarium culmorum* (lásd ezzel kapcsolatban Harrison, L., és mások, "Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity", *J. of General Microbiology*, 7, 2857-2865 (1991) közleményét). Kimutatták továbbá, hogy az MSU 16H jelű *P. syringae* törzs a szilfavész kórokozójával, a *Ceratocystis ulmi* nevű fajjal fertőzött szilfáknak nagyobb védettséget ad, mint a vad típusú törzsek (lásd ezzel kapcsolatban Lam és mtsai, *Proc. Natl. Sci. USA*, 84, 6447-6451 (1987) közleményét).

A *Pseudomonas syringae* tenyésztése

A "vizes tápközeg" kifejezés jelentése a jelen találmányban vízbázisú, a jelen találmányban szereplő mikro-organizmusok tenyésztéséhez szükséges ásványi sókat, szerves vegyületeket és azok sóit tartalmazó készítmény. Az előnyös tápközeg hatásos mennyiségben tartalmaz három vagy kevesebb aminosavat, előnyösen glutaminsavat, glicint, hisztidint vagy ezek kombinációját. Az egyik megvalósításban a közeg hatásos mennyiségű glicint, és adott esetben egy vagy több burgonyából származó terméket és lipidet tartalmaz. A glicin egyszerű aminosav, vagy aminosavak keveréke, mint például hidrolizált



fehérje formájában is jelen lehet. Alkalmas lipidek többek között a szójaolaj, 14 vagy 16 szénatomos alifás láncú zsírsavak, és 14 vagy 16 szénatomos alifás láncú zsírsavészterek. Előnyös zsírsavészterek többek között a metil-palmitát és a metil-mirisztát, előnyösen a metil-mirisztát. Alkalmas burgonyából származó termékek többek között a burgonya-szőlőcukor táptalaj, burgonya-dextrin, burgonyafehérje, és a kereskedelemben kapható kevert burgonyapüré por. A tápközegben előnyös ásványi sók többek között a rendszerint sejtenyészetekben és erjesztésnél alkalmazott sókeverékek, mint például a Czapek-féle ásványi só, ami kálium-kloridot, magnézium-szulfátot és vas(II)szulfátot tartalmaz. A tápközegben előnyös szerves vegyületek többek között a glükóz vagy a szacharóz, vagy adott esetben a keményítő; vagy egyéb szerves vegyületek. A közeg pH-ja előnyösen körülbelül 4-6,5, előnyösebben körülbelül 4,5-5,7, legelőnyösebben körülbelül 5,2.

Bár nem jellemző, hogy a táptalaj alkotórészeinek mennyisége kritikus lenne a baktériumok tenyésztése, vagy egy vagy több pseudomicin származék termelése szempontjából, a tápanyagok bizonyos koncentrációja előnyös. A glicin mennyisége előnyösen körülbelül 0,1 g/l és körülbelül 10 g/l közötti, előnyösebben körülbelül 0,3 g/l és körülbelül 3 g/l közötti, legelőnyösebben körülbelül 1 g/l. A lipid mennyisége előnyösen körülbelül 1 g/l és körülbelül 10 g/l közötti mennyiségű olaj, például szójaolaj, előnyösebben körülbelül 0,5 g/l és körülbelül 2 g/l közötti mennyiségű szójaolaj. A zsírsav vagy zsírsav-észter mennyisége előnyösen körülbelül 0,5 g/l és körülbelül 5 g/l közötti. A zsírsav-észter előnyösen metil-mirisztát, melynek mennyisége körülbelül 0,1 és körülbelül 10 g/l közötti, előnyösen körülbelül 0,3 g/l és körülbelül 3 g/l közötti, előnyösebben körülbelül 1 g/l. A burgonyából származó termékek mennyisége előnyösen körülbelül



12 g/l és körülbelül 36 g/l közötti, előnyösebben körülbelül 24 g/l burgonyacukrot tartalmazó táptalaj; körülbelül 5 g/l és körülbelül 50 g/l közötti, előnyösebben körülbelül 30 g/l kereskedelembe kapható kevert burgonyapüré por; körülbelül 1 g/l és körülbelül 30 g/l közötti, előnyösen körülbelül 20 g/l burgonya-dextrin; és/vagy körülbelül 1 g/l és körülbelül 10 g/l közötti, előnyösen körülbelül 4 g/l burgonyafehérje. A tápközegekben levő ásványi sók, mint például a kálium-klorid mennyisége előnyösen körülbelül 0,02 és körülbelül 2 g/l közötti, előnyösebben körülbelül 0,2 g/l; a magnézium-szulfát előnyösen heptahidrát formában van jelen, mennyisége előnyösen körülbelül 0,02 és körülbelül 2 g/l közötti, előnyösebben körülbelül 0,2 g/l; a vas(II)szulfát előnyösen heptahidrát formájában van jelen, mennyisége előnyösen körülbelül 0,4 és körülbelül 40 mg/l közötti, előnyösebben körülbelül 4 mg/l; stb. Az adott esetben jelen levő keményítő mennyisége előnyösen körülbelül 0,5 és körülbelül 50 g/l közötti, előnyösebben körülbelül 5 g/l. A glükóz előnyösen körülbelül 2 és körülbelül 80 g/l közötti, előnyösebben körülbelül 20 g/l mennyiségben van jelen. A szacharóz előnyösen körülbelül 2 és körülbelül 80 g/l közötti, előnyösebben körülbelül 30 g/l mennyiségben van jelen.

A *P. syringae* törzsek tenyésztése jellemzően a szóbanforgó közegben, a pH, a hőmérséklet, és hasonló paraméterek ellenőrzött vagy szabályozott értékei mellett történik. A *P. syringae* tenyésztése, és egy vagy több pseudomicin származék termelése körülbelül 15°C és körülbelül 35°C, előnyösen körülbelül 20°C és körülbelül 30°C, előnyösebben körülbelül 22°C és körülbelül 27°C közötti, legelőnyösebben körülbelül 25°C hőmérsékleten történik. A *P. syringae* tenyésztése, és egy vagy több pseudomicin származék termelése körülbelül 4 és körülbelül 7, előnyösebben körülbelül 4 és körülbelül 6, előnyösebben



körülbelül 4,5 és körülbelül 5,5 közötti pH mellett történik. A *P. syringae* jellemző esetben 37°C feletti, vagy 10°C alatti hőmérsékleten, illetve 9 feletti, vagy 4 alatti pH mellett jellemzően nem növekszik.

Eljárás pseudomicin termelésére

Egy vagy több pseudomicin származéknak vad típusú vagy mutáns *P. syringae* törzzsel történő előállítására céljából a mikroorganizmust keverés mellett három vagy kevesebb, hatásos mennyiségű aminosavat tartalmazó táptalajon tenyésztjük. A három vagy kevesebb aminosav előnyösen glutaminsav, glicin, hisztidin vagy ezek kombinációja. Egy előnyös megvalósításban, az aminosav többek között glicin, adott esetben egy vagy több burgonyából származó termék és lipid mellett. A tenyésztést olyan körülmények között végezzük, amelyek hatásosak a *P. syringae* növekedése és a kívánt pseudomicin vagy pseudomicinek termelése szempontjából. Hatásos körülmények többek között a körülbelül 22°C és körülbelül 27°C közötti hőmérséklet, és a körülbelül 36 óra és körülbelül 96 óra közötti időtartam. A jelen találmányban leírt közegben tenyésztett *P. syringae* növekedési sejtsűrűsége elérheti a 10-15 g/l száraz tömeget, teljes pseudomicin termelése legalább 10 µg/ml, előnyösen legalább körülbelül 40 µg/ml, előnyösebben körülbelül 500 µg/ml, vagy több.

A pseudomicin termelés szempontjából előnyös, ha a *P. syringae* tenyészet közegének oxigéntartalmát ellenőrzés alatt tartjuk. Az oxigén koncentrációját előnyösen a telített értéknek körülbelül 5%-a és körülbelül 50%-a között, előnyösebben körülbelül 30% értéken tartjuk. A közeg oxigéntartalma levegő, tiszta oxigén, vagy oxigéntartalmú gázkeverék bekeverésével



állítható be. Továbbá, az oxigén kicserélődési arány a keverés szabályozásával változtatható.

A pszeudomicin termelés szempontjából előnyös, ha a *P. syringae* tenyészet közegének pH-ját ellenőrzés alatt tartjuk. A pszeudomicinek lúgos kémhatásnál bomlékonyak, a bomlás jelentős lehet, ha a tenyésztési közeg pH-ja több, mint 12 órán át körülbelül 6 felett van. A tenyésztési közeg pH-ját előnyösen kisebb, mint körülbelül 6, előnyösebben kisebb, mint körülbelül 5,5, legelőnyösebben 4,0 feletti értéken tartjuk. A pH-t előnyösen körülbelül 5 és körülbelül 5,4 közötti, előnyösebben körülbelül 5,0 és körülbelül 5,2 értékek között tartjuk. Bár ez nem korlátozza a jelen találmányt, feltételezéseink szerint a pszeudomicin bomlását lúgos kémhatáson a lakton gyűrű kinyílása, és kloridion lehasadása okozza.

A *P. syringae* szakaszos tenyészetben egy vagy több pszeudomicin származék termelésére képes. A pszeudomicin termelést azonban elősegíti a glükóz, és adott esetben a pH beállítására szolgáló sav vagy bázis, például ammónium-hidroxid szakaszos, vagy félig folytonos adagolása. A *P. syringae* pszeudomicin termelése tovább növelhető olyan folyamatos adagolású eljárásokkal, amelyekben a glükóz, és adott esetben a pH beállítására szolgáló sav vagy bázis, mint például ammónium-hidroxid adagolása automatikusan történik.

A *P. syringae* alkalmazásával egy vagy több pszeudomicin származék nagy mennyiségben termelhető. Így egy vagy több pszeudomicin származék teljes mennyisége legalább körülbelül 200 µg/ml és körülbelül 900 µg/ml, előnyösen körülbelül 600 µg/ml és körülbelül 900 µg/ml, előnyösebben körülbelül 800 µg/ml és körülbelül 900 µg/ml értékek között van. Pszeudomicin A termelés esetén a termelt pszeudomicin A teljes mennyisége



előnyösen legalább körülbelül 10 µg/ml és körülbelül 400 µg/ml közötti, előnyösebben körülbelül 300 µg/ml és körülbelül 400 µg/ml közötti, legelőnyösebben körülbelül 350 µg/ml és körülbelül 400 µg/ml közötti. Pszeudomicin B termelés esetén a termelt pszeudomicin B teljes mennyisége előnyösen legalább körülbelül 10 µg/ml és körülbelül 300 µg/ml közötti, előnyösebben körülbelül 200 µg/ml és körülbelül 300 µg/ml közötti, legelőnyösebben körülbelül 250 µg/ml és körülbelül 300 µg/ml közötti. Pszeudomicin C termelés esetén a termelt pszeudomicin C teljes mennyisége előnyösen legalább körülbelül 5 µg/ml és körülbelül 100 µg/ml közötti, előnyösebben körülbelül 5 µg/ml és körülbelül 50 µg/ml közötti, legelőnyösebben körülbelül 10 µg/ml és körülbelül 50 µg/ml közötti. Pszeudomicin C' termelés esetén a termelt pszeudomicin C' teljes mennyisége előnyösen legalább körülbelül 1 µg/ml és körülbelül 50 µg/ml közötti, előnyösebben körülbelül 10 µg/ml és körülbelül 50 µg/ml közötti, legelőnyösebben körülbelül 30 µg/ml és körülbelül 50 µg/ml közötti.

A jelen találmányban leírt körülmények között tenyésztett *P. syringae* törzs kiválasztása hatással lehet a termelt pszeudomicin termelésére és eloszlására. Például, az MSU 16H és 67 H1, és hasonló törzsek mindegyike főként pszeudomicin A-t, emellett pszeudomicin B-t és C-t termel, jellemzően közelítőleg 4:2:1 arányban. A 67 H1 jelű törzs és hasonló törzsek azonban az MSU 16H jelű törzshöz képest jellemzően 3-5-szörös mennyiségben termelnek pszeudomicineket. A 25-B1 jelű törzs, és hasonló törzsek az MSU 16H és 67 H1 jelű törzsekhez képest több pszeudomicin B-t és kevesebb pszeudomicin C-t termelnek. A 7H9-1 jelű, és hasonló törzsek abban különböznek más törzsektől, hogy főként pszeudomicin B-t, és azoktól eltérően nagyobb mennyiségű pszeudomicin B-t termelnek. Ez a törzs például a



pszeudomicin B-t 10-szeres mennyiségben képes termelni a pszeudomicin C-hez vagy pszeudomicin A-hoz képest.

A pszeudomicinek, vagy azok keverékei a szakmában ismert eljárások bármelyikével kimutathatók, meghatározhatóak, izolálhatóak és/vagy tisztíthatók. Például, a pszeudomicin aktivitás szintje valamely táptalajon, vagy elkülönített vagy tisztított készítményben valamely gomba, például *Candida* elleni hatás alapján határozható meg. Számos eljárást ismerünk a pszeudomicinek előállítására és elemzésére. Például, egy vagy több pszeudomicin származék kromatográfiás eljárással, például HPLC eljárással izolálható és tisztítható.

A jelen találmány szerinti eljárással előállított pszeudomicinek gyógyászatilag elfogadható sóik formájában is izolálhatóak. A "gyógyászatilag elfogadható" kifejezés jelentése a jelen találmányban a fent leírt vegyületek olyan sói, amelyek az élő szervezetre lényegében nem mérgezők. Jellemző gyógyászatilag elfogadható sók többek között a jelen találmány szerinti vegyületek és szervesetlen vagy szerves sav vagy szervesetlen bázis reagáltatásával előállított sók. Az ilyen sók savaddíciós és bázisaddíciós sókként ismertek.

Savaddíciós sók előállításánál alkalmazott savak többek között olyan szervesetlen savak, mint például a sósav, hidrogén-bromid, hidrogén-jodid, kénsav és foszforsav, és olyan szerves savak, mint például a p-toluol-szulfonsav, a metán-szulfonsav, az oxálsav, a p-bróm-fenil-szulfonsav, a szénsav, a borostyánkősav, a citromsav, a benzoésav és az ecetsav. Ilyen gyógyászatilag elfogadható sók például a szulfát, a piroszulfát, a hidrogén-szulfát, a szulfit, a hidrogén-szulfit, a foszfát, a mono-hidrogén-foszfát, a dihidrogén-foszfát, a metafoszfát, a pirofoszfát, a klorid, a bromid, a jodid, az acetát, a propionát, a dekanóát, a kaprilát, az akrilát, a

formiát, az izobutirát, a kaproát, a heptanoát, a propiolát, az oxalát, a malonát, a szukcinát, a szuberát, a szebacát, a fumarát, a maleát, a butin-1,4-dioát, a hexin-1,6-dioát, a benzoát, a klór-benzoát, a metil-benzoát, a dinitro-benzoát, a hidroxibenzoát, a metoxibenzoát, a ftalát, a szulfonát, a xilol-szulfonát, a fenil-acetát, a fenil-propionát, a fenil-butirát, a citrát, a laktát, a γ -hidroxibutirát, a glikollát, a tartarát, a metán-szulfonát, a propán-szulfonát, az 1-naftalin-szulfonát, a 2-naftalin-szulfonát, és a mandelát sók. Előnyös gyógyászatilag elfogadható savaddíciós sók az olyan szerves savakkal képzett sók, mint például a sósav és a hidrogén-bromid, és az olyan szerves savakkal képzett sók, mint például a maleinsav és a metán-szulfonsav.

A bázisaddíciós sók többek között az olyan szerves bázisok származékai, mint például az ammónium- vagy az alkáli- vagy alkáliföldfém-hidroxidok, a karbonátok és a hidrogén-karbonátok. A jelen találmány szerinti sók előállításához alkalmazhatók többek között például a nátrium-hidroxid, a kálium-hidroxid, az ammónium-hidroxid, a kálium-karbonát, a nátrium-karbonát, a nátrium-hidrogén-karbonát, a kálium-hidrogén-karbonát, a kalcium-hidroxid és a kalcium-karbonát. Különösen előnyösek a kálium- és a nátriumsók.

Lényeges felismerés, hogy a jelen találmány bármely sójának részét képező adott ellenion természete nem kritikus természetű, amennyiben maga a só gyógyászatilag elfogadható, és amíg az ellenion következtében a só egészének nincsenek nemkívánatos tulajdonságai.

A jelen találmány jobb megérthetőségét szolgálják az alábbi példák. A példák a jelen találmány különös megvalósításait szemléltetik, és azok semmilyen módon nem korlátozzák a jelen találmány oltalmi körét.



PÉLDÁK

A letétben hozzáférhető biológiai alapanyagok

Az MSU 16H jelű *P. syringae* törzs nyilvánosan hozzáférhető az American Type Culture Collection (Parklawn Drive, Rockville, MD, USA) gyűjteményből, ATCC 67028 hozzáférési számon. A 25-B1, 7H9-1 és 67 H1 jelű *P. syringae* törzseket 2000. március 23.-án helyeztük letétbe az American Type Culture Collection gyűjteménybe, hozzáférési számuk a következő:

25-B1	PTA-1622
7H9-1	PTA-1623
67 H1	PTA-1621

1. Példa -- A pszeudomicinek meghatározása és tisztítása

A pszeudomicinek kimutatása és mennyiségi meghatározása a gombaellenes hatás alapján

A pszeudomicin vagy pszeudomicinek keverékének jelenléte vagy mennyisége valamely készítmény gombaellenes hatásának mérésével határozható meg. A gombaellenes hatás in vitro meghatározása úgy történik, hogy szabványos agar higítási teszt, vagy korong diffúziós teszt alkalmazásával kimutatjuk a készítmény legkisebb gátló koncentrációját (minimum inhibitory concentration, MIC). Az egy vagy több pszeudomicin származékot tartalmazó készítmény lehet sejtenyészetből készült kivonat, vagy nagyobb tisztítási fokú keverék. A gombaellenes hatás meghatározásában használt gomba jellemzően a *C. albicans*. A gombaellenes hatást akkor tekintjük jelentősnek, ha 50 µl vizsgálati készítmény *Candida albicans* x657 tenyésztettel beoltott agarlemezeken 10-12 mm átmérőjű gátlási zónákat eredményez.

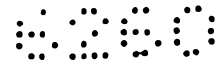


A pseudomicinek kimutatása és mennyiségi meghatározása HPLC eljárással

A feltételezések szerint az egy vagy több pseudomicin származékot tartalmazó mintát először egyenértéknyi mennyiségű acetonitrillel, vagy másfélszeres térfogatú 0,1 térfogat-%-os metanol/ortofoszforsav keverékkel kirázzuk, majd szűréssel vagy centrifugálással tisztítjuk. A tisztított keveréket 60°C hőmérsékletű Zorbax 300SB-C8 oszlopon (3,5 µm-es részecskék, 5,0 x 0,46 cm, MacMod katalógusszám 865973-906) 2 ml/perc áramlási sebességgel kromatografáljuk. Az oszlopot A mozgó fázis (25 mmólos nátrium-foszfát, 7,74 g/l oktán-szulfonsav és 10%-os vizes acetonitril-oldat, pH=6,5) és B mozgó fázis (25 mmólos nátrium-foszfát, 7,74 g/l oktán-szulfonsav és 60%-os vizes acetonitril-oldat, pH=6,5) grádienssel leoldjuk. A pseudomicinek izolálását és mennyiségi meghatározását 10 perces időtartamban 28%-os kezdeti, és 38%-os végső koncentrációjú B mozgó fázissal végezzük. A pseudomicin A-t jellemzően körülbelül 10,2 percnél (612 másodperc), a pseudomicin B-t 10,98 percnél (659 másodperc), a pseudomicin C-t 11,5 percnél (691 másodperc), a pseudomicin B'-t 9,6 percnél (576 másodperc), és a pseudomicin C'-t 12,17 percnél (730 másodperc) oldjuk le. A pseudomicineket 214 nm hullámhosszon mutatott elnyelésük alapján mutatjuk ki, minőségi meghatározásukat az UV csúcsok egyesítésével végezzük. A pseudomicinek mindegyikének azonosítását és mennyiségi meghatározását ismert összehasonlító anyagok alkalmazásával végeztük.

A pseudomicinek tisztítása keveréssel működő fermentorokból

150 literes, 1000 literes vagy egyéb típusú fermentorból származó táptalajt a sejtek eltávolítása céljából szűrjük. A szűrletet



HP-20SS oszlopra töltjük, hogy kinyerjük a pszeudo-micineket. Az oszlopot 0,1%-os trifluoro-ecetsavat tartalmazó 15-30%-os acetonitrillel mossuk, miközben összegyűjtjük a részeket. A pszeudomicineket tartalmazó részeket Amberchrom CG300-sd oszlopra töltjük. A pszeudomicin A-t 22-30% acetonitilt tartalmazó 0,2%-os (pH=4,8) nátrium-acetát pufferrel oldjuk le. A pszeudomicin B-t, C-t és C'-t 25-35% acetonitrilt tartalmazó 0,2%-os (pH=4,8) nátrium-acetát pufferrel oldjuk le. UV elnyelése alapján a pszeudomicin A 85% tisztaságú. A pszeudomicin A-t C18 fordított fázisú HPLC oszlopra töltjük, és 30-60%-os acetonitrilt tartalmazó 0,2%-os trifluoro-ecetsavval leoldjuk. A leoldott anyag UV/NMR vizsgálat alapján jobb, mint 95% tisztaságú.

2. Példa -- A *Pseudomonas syringae* elválasztása, jellemzése és mutagenézise

A nagyobb mennyiségű pszeudomicin termelés céljából végzett első lépésként kiválasztunk *P. syringae* környezeti izolátumokat, majd előállítjuk azok mutáns alakjait. Ezt követően, ezen izolátumokban és mutánsokban vizsgáljuk azokat a tényezőket, amelyek javítják a pszeudomicin termelést, és a tápközeget.

Anyagok és eljárások

Az MSU 174 és MSU 16-H jelű törzseket G. Strobel és mások 1996 november 19.-én közzétett 5,576,298 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésében; Harrison és mások, "Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity", *J. Gen. Microbiology* **137**, 2857-2865 (1991); és Lamb és mások, "Transposon mutagenesis and tagging of fluorescent pseudomonas: Antimycotic production is necessary for control of Dutch elm



disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6447-6451 (1987) című közleményében leírt módon izoláljuk és jellemezzük. Az ebben a bekezdésben említett hivatkozásokra a jelen találmány részeként hivatkozunk.

Az ilyen vad típusú törzsekből és transzpozonnal átalakított mutáns alakokból kémiai mutagenézissel további törzseket hozunk létre. A mutagén hatásnak kitett törzsek többek között az MSU 174, MSU 16H és 25-B1 jelű törzsek. A mutagenizálandó törzset burgonyából származó terméket tartalmazó közegen tenyésztjük, majd az 1-metil-3-nitro-1-nitrozo-guanidin (NTG vagy MNNG) kémiai mutagént 0, 1, 2, 4, 16 vagy 32 µg/ml koncentrációban tartalmazó közegbe osztjuk szét. Ezeket a sejteket azután további vizsgálatok és kiválasztás céljából lefagyasztjuk.

A kívánt növekedési tulajdonságok és/vagy pszeudomicin termelés alapján kiválasztjuk a mutagén hatásnak kitenni kívánt sejteket. A kémiai mutagén hatásnak kitett *P. syringae* sejteket, például a mutagén hatásnak kitett 25-B1 jelű törzset kiolvasztjuk, majd 6 sejt/ml sűrűségben N21SM közegbe hígítjuk (lásd az 1. táblázatot). Ez a közeg időnként egy vagy több kiválasztott alkotórészt, például különböző koncentrációkban foszfátot tartalmaz. A mutagén hatásnak kitett sejtek 50 µl térfogatát 96 lyukú, kerek fenekű mikrotiter lemezre osztjuk szét, átlag 0,3 sejt/lyuk sűrűséggel.. A lyukakba rendszerint szilikonolajat töltünk, hogy csökkentsük a párolgást. A lemezeket rázás közben 25°C-on 6-12 napig inkubáljuk.

1. Táblázat -- Az N21SM közeg összetétele

	GRAMM/LITER
ALKOTÓRÉSZ	



glükóz	20
ammónium-szulfát	0,5
mononátrium-glutamát vagy L-glutamin-sav	2
L-hisztidin	2
glicin	0,5
oldható keményítő	5
KH ₂ PO ₄	0,2
Czapek-féle ásványi só oldat	2 ml
MES puffer	9,8
pH beállítása 5,0-re	

Az inkubálást követően minden lyukból kiveszünk jellemzően 5 µl térfogatú részletet, sorozatban (például 1:56, 1:196, 1:320, 1:686, és/vagy 1:1715 arányban) hígítjuk, majd *Candida albicans* elleni hatását folyadékot tartalmazó mikrotiter lemez alkalmazásával végzett biológiai meghatározással értékeljük. A lemezeket éjszakán át 37°C-on inkubáljuk, majd a lyukakat a *C. albicans* növekedés gátlása alapján pontozzuk. Kiválasztjuk azokat a törzseket, amelyek szélsőséges (például 1:320, 1:686, és/vagy 1:1715 arányú) hígítások mellett gátlást eredményeztek, és azokat CSM közegre oltjuk (lásd a 2. táblázatot), majd 25°C-on 1-3 napig tenyésztjük.

2. Táblázat: Teljes Streptomyces
táptalaj (Complete Streptomyces
Medium, CSM)

alkotórész	koncentráció (g/l)
glükóz	5



maltóz	4
Difco Tryptic szója	30
táptalaj	
Difco	3
élesztőkivonat	
MgSO ₄ x7H ₂ O	2
pH beállítás nincs	

A kiválasztott törzseket tartósítjuk, 13 ml N21SM közeget tartalmazó erjesztő palackokba oltjuk, és 25°C-on körülbelül 66 órán át tenyésztjük. Ebből az erjesztésből kiveszünk egy mintát, ezt a mintával egyenlő mennyiségű acetonitrillel 1 órán át kirázzuk, centrifugáljuk, és a pseudomicinek 1. példa szerinti HPLC elemzéséhez dekantáljuk. A pseudomicint megfelelő mennyiségben, jellemzően 10 µg/ml-nél nagyobb koncentrációban termelő törzseket újból izoláljuk, fermentáljuk, és előkészítjük a nagyobb méretben történő tenyésztéshez.

A közeg és a növekedési körülmények hozamra és a pseudomicinek eloszlására gyakorolt hatását is vizsgáltuk. A közeg több összetevőjét statisztikai alapon felállított kísérlet-sorozatban egyidejűleg változtattuk. Ezen kísérletek során kiválasztottuk azt a meghatározott kémiai összetételű közeget, amely nem tartalmaz burgonyából származó terméket, foszfát tartalma meghatározott, megnövelt tisztaságú, és amelyben a *P. syringae* növekedése magas értéket ér el.

Eredmények

A fent leírt eljárások alkalmazásával számos olyan törzset állítottunk elő, amelyek pseudomicin termelése intenzív, főként egyetlen pseudomicin származékot termelnek, és/vagy



minimális táptalajon is növekednek. Az egy vagy több pseudomicin származékot megnövekedett mennyiségben termelő törzseket, és a 13 ml-es erjesztéssel előállított pseudomicinek eloszlását mutatjuk be a 3. táblázatban. A 2. és 3. ábrákon egyes mutáns törzsekre vonatkozó, burgonya közeg és N21SM közeg alkalmazásával termelt pseudomicinek eloszlása és mennyisége látható.

3. Táblázat - A pseudomicin termelés és/vagy minimális táptalajon mutatott növekedés alapján kiválasztott törzsek

törzs	PSZEUDOMICIN ($\mu\text{g/ml}$)				sejt-sűrűség (OD_{600})	$\frac{\text{PSA}+\text{PSB}}{\text{OD}_{600}}$	$\frac{\text{PSB}}{\text{PSA}}$
	A	B	C	C'			
30 E3	109	69			0,759	234	0,64
40G11	81	66			0,818	179	0,82
7H9-1	3,3	60,4			0,744	86	18,58
75F8	65	57			0,884	137	0,88
18 E6	111	57			0,855	196	0,51
8 E3	38,47	55,07			0,830	113	1,43
305H8	165,0	48	39	7	0,762	280	0,29
17H9	96	46			0,769	185	0,48
67H1-1	216,9	44,2	39,9	5,8	0,817	320	0,20
49C5	110	43			0,804	190	0,39
67H1	197	42			0,817	293	0,21
67H1-6	225,9	42,1	40,2	4,8	0,791	339	0,19
67H1-6	216,4	41,5	38,6	5	0,797	324	0,19
Törzs	PSZEUDOMICIN ($\mu\text{g/ml}$)				Sejt-sűrűség (OD_{600})	$\frac{\text{PSA}+\text{PSB}}{\text{OD}_{600}}$	$\frac{\text{PSB}}{\text{PSA}}$
	A	B	C	C'			
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
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
Törzs	PSZEUDOMICIN (µg/ml)				Sejt-sűrűség (OD ₆₀₀)	<u>PSA+PSB</u> OD ₆₀₀	<u>PSB</u> PSA
	A	B	C	C'			
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
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
Törzs	PSZEUDOMICIN (µg/ml)				Sejt-sűrűség (OD ₆₀₀)	<u>PSA+PSB</u> OD ₆₀₀	<u>PSB</u> PSA
	A	B	C	C'			
6A4	25,7	4,0			0,865	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			0,386	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
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
Törzs	PSZEUDOMICIN (µg/ml)				Sejt-sűrűség (OD ₆₀₀)	$\frac{PSA+PSB}{OD_{600}}$	$\frac{PSB}{PSA}$
	A	B	C	C'			
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	
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	
16E5	0	0			0,224	0	
277H4	0,0	0	0	0	0,123	0	

Következtetések

A jelen találmányban leírt kiválasztási eljárások és feltételek hatásosak olyan *P. syringae* törzsek előállításánál, amelyek minimális táptalajon növekednek, és egy vagy több pszeudomicin származékot megnövekedett mennyiségben termelnek. Találtunk olyan törzseket és körülményeket, amelyek esetén változik a termelt pszeudomicinek eloszlása. A minimális táptalaj alacsonyabb szárazanyag tartalma és megnövekedett tisztasága a



közeg gyorsabb szűrését és a sejtsűrűség pontosabb meghatározását teszi lehetővé.

3. Példa -- Kísérletek a pseudomicin termelés növelésére ismert tenyésztési körülmények alkalmazásával

Pseudomicin termelés álló vagy rázott lombikos tenyészetekben

A pseudomicinek nagy méretben történő termelése céljából végzett első lépésként a *P. syringae* tenyésztés, és a pseudomicin termelés ismert laboratóriumi méretű eljárásait kellett reprodukálni.

Anyagok és eljárások

Az MSU 16H jelű *P. syringae* törzset mozgatás nélkül (álló vagy statikus tenyészetben), illetve 250 ml-es rázott lombikokban 25°C-on, a 4. táblázatban leírt tápoldatban 1-10 napig tenyésztjük. Ez az oldat hasonló a Harrison és mások *J. Gen. Microbiol.* (lásd alább) által alkalmazott tápoldathoz. A 4. táblázat szerinti tápanyagokat tartalmazó, de burgonya-szőlőcukor táptalajt nem tartalmazó üvegedényeket összehasonlításként *P. syringae* oltóanyaggal oltjuk be. Egy további, burgonyából származó termékek alkalmazásával végzett kísérletben a burgonya-szőlőcukor táptalajt 20 g/l glükóz-oldatot és 4 g/l-es Alburex burgonyafehérjét tartalmazó táptalajjal, vagy 20 g/l-es glükóz-oldatot és 20 g/l-es Avebe burgonya-dextrint tartalmazó táptalajjal helyettesítjük. A gombaellenes hatást az 1. példa szerint mérjük.

4. Táblázat – Burgonya-szőlőcukrot és adalékanyagokat tartalmazó táptalaj (Potato Dextrose Broth Plus Additives Medium, PBM Medium)



összetevő	koncentráció
Difco burgonya-szőlőcukor táptalaj	24 g/l
oldható keményítő	5 g/l
glicin	1 g/l
Czapek-féle ásványisó oldat (lásd az 5. táblázatot)	2 ml/l
MES puffer	9,8 g/l
pH beállítása 5,0 értékre	

5. Táblázat -- Czapek-féle ásványisó-oldat

összetevő	mennyiség
A rész	
KCl	100 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	100 g
ioncserélt víz	900 ml
B rész	
FeSO ₄ x7H ₂ O	2 g
HCl (1 normál)	2 ml
ioncserélt víz	98 ml
A B részt lassan adjuk hozzá az A részhez; addig keverjük, amíg az oldat letisztul	

Eredmények

A *P. syringae* törzseket a 4. táblázat szerinti burgonya-szőlőcukor táptalajon tenyésztve, a gombaellenes hatás körülbelül 10,5-29 µg/ml pseudomicin termelésnek megfelelő értékeket ért el. Ha a burgonya-szőlőcukor táptalajt glükózt és Alburex burgonyafehérjét tartalmazó közeggel, vagy glükózt és Avebe burgonya-szőlőcukrot tartalmazó közeggel helyettesítettük, ilyen körülmények között az álló lombikos tenyészetek gombaellenes



hatása körülbelül 30 µg/ml pszeudomicin termelésnek felelt meg. Az ilyen körülmények között, burgonyából származó termékeket nem tartalmazó tápoldatban tenyésztett álló palackokban nem mutatkozott gombaellenes hatás.

A pszeudomicin termelés időfüggvénye azt mutatta, hogy a burgonya-szőlőcukor táptalajon (potato dextrose broth, PDB) inkubált tenyészetek esetén mind az álló (lásd a 6. táblázatot), mind a 250/min fordulatszámon rázott (lásd a 7. táblázatot) lombikokban termelődött pszeudomicin. A rázott lombikokban az inkubálási idő korai szakaszában termelődtek pszeudomicinek, de azok eltűntek, amikor a tenyészet pH-ja elérte a 7,5, vagy ennél nagyobb értéket. A teljes pszeudomicin termelés csúcspontjánál, álló tenyészetben a pszeudomicinek eloszlása a következő volt: 77% A, 11% B és 12% C. A teljes pszeudomicin termelés csúcspontjánál, rázott tenyészetben a pszeudomicinek eloszlása a következő volt: 67% A, 24% B és 9% C.

6. Táblázat -- A pszeudomicin termelés az idő függvényében, PHB
közeget tartalmazó álló lombikokban

inkubálási idő (óra)	a tenyészet pH-ja	pszeudomicin A+B+C (µ g/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

7. Táblázat -- A pseudomicin termelés az idő függvényében, PHB
közeget tartalmazó rázott lombikokban

inkubálási idő (óra)	a tenyészet pH-ja	pseudomicin A+B+C (μ g/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

A burgonya-dextrin táptalajon végzett inkubálások esetén, a pseudomicin termelés időfüggvénye alapján mind az álló, mind a 250/min fordulatszámon rázott lombikokban keletkeztek pseudomicinek (lásd a 8. táblázatot). A tenyésztés megkezdése előtt a pH-t 5,0-re állítottuk be, majd az MSU 16H jelű



törzset sterilizált táptalaj 50 ml-es adagjaira oltottuk. Néhány, az utóbbi táptalajt tartalmazó rázott lombikban a pH érték 6,0 alatt maradt, és csak kis pszeudomicin veszteséget tapasztaltunk. Az álló tenyészet teljes pszeudomicin termelésének csúcspontján a pszeudomicinek eloszlása a következő volt: 70% A, 16% B és 14% C. A rázott tenyészet teljes pszeudomicin termelésének csúcspontján a pszeudomicinek eloszlása a következő volt: 62% A, 19% B és 19% C.

8. Táblázat -- A pszeudomicin termelés az idő függvényében, burgonya-szőlőcukor táptalajt tartalmazó rázott lombikokban

inkubálási idő (óra)	pszeudomicin A+B+C az álló lombikokban (µg/ml)	pszeudomicin A+B+C a rázott lombikokban (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

Következtetések

A pszeudomicin termeléshez ismert, laboratóriumi méretű eljárásokat alkalmaztuk. Az ismert termelési eljárás reprodukálásához alapvetőek a burgonyából származó termékek. A burgonya-szőlőcukor táptalajt helyettesítheti burgonyafehérjét, vagy burgonya-dextrint tartalmazó táptalaj.

Pszeudomicin termelés fermentorokban levő álló vagy kevert tenyészetekben

A nagyobb mennyiségű pseudomicin termelés céljából végzett második lépésként kísérleteket hajtottunk végre a *P. syringae* tenyésztés és pseudomicin termelés ismert, laboratóriumi méretű módszereinek 150 literes tartályokban történő megvalósítására.

Anyag és módszer

Az MSU 16H jelű *P. syringae* törzset mozgatás mellett vagy anélkül 150 literes tartályokban, 5,2 pH-jú, a 4. táblázat szerinti tápoldatban 25°C-on legfeljebb 10 napig tenyésztjük. A 150 literes tartály keverése 75-150/min fordulatszámon történő keverést, és 0,5 SCFM áramlási aránnyal történő légbefúvást jelent. Az egyik, burgonyából származó termékek változtatásával végzett kísérletben a burgonya-szőlőcukor táptalajt glükózt és Alburex burgonyafehérjét tartalmazó közeggel, vagy glükózt és Avebe burgonya-dextrint tartalmazó közeggel helyettesítjük. A gombaellenes hatást az 1. példa szerint mérjük.

Eredmények

A nem mozgatott tartályban levő tenyészetben a *P. syringae* igen kis növekedést mutatott, és gombaellenes hatás, vagy pseudomicin nem volt kimutatható. Ha a 150 literes tartályt kis sebességgel kevertük, és a szóbanforgó körülmények között kismértékű légbefúvást alkalmaztunk, a *P. syringae* szintén igen kis növekedést mutatott, és gombaellenes hatás, vagy pseudo-micin szintén nem volt kimutatható. Ha a glükózt és Alburex burgonyafehérjét tartalmazó táptalajt, vagy a glükózt és burgonya-dextrint tartalmazó táptalajt burgonya-szőlőcukor táptalajjal helyettesítettük, a *P. syringae* termelés szintén igen kis növekedést mutatott, és



gombaellenes hatás, vagy pseudomicin szintén nem volt kimutatható.

Következtetés

Az álló *P. syringae* tenyésztéssel történő pseudomicin előállítás ismert módszere 150 literes méretben nem működött.

4. Példa -- A pseudomicin termelés sikeres emelése az ismert tenyésztési körülmények és közeg módosításával

Vizsgáltuk a *P. syringae* tenyésztés ismert körülményei változtatásainak hatását a pseudomicin termelésre.

Az oxigén-koncentráció szabályozása

Anyag és módszer

A *P. syringae* törzset a 3. példa szerinti körülmények között, burgonya-szőlőcukor táptalajon (PDB) tenyésztjük, az oxigén-koncentráció szabályozása mellett. Egy további, burgonyából származó termékek alkalmazásával végzett kísérletben a 9. táblázat szerinti burgonyagyöngy táptalajt (Potato Pearl Medium, PPM) a 4. táblázat szerinti táptalajjal helyettesítjük, és szabályozzuk az oxigén-koncentrációt. A Basic American Foods cégtől származó Classic Country Style Potato Pearls® márkanevű burgonyagyöngyöt alkalmazunk.

Az oldott oxigén koncentrációját a tenyésztés első 24 órájában 30% értéken tartjuk, egyes kísérletekben pedig a tenyésztés hátralevő 72 órájában 5% értékre csökkentjük. Az oldott oxigén-koncentrációt úgy tartjuk 5% értéken, hogy csökkentjük a légbefúvás sebességét, vagy a tartályba fújt levegőbe nitrogéngázt keverünk. Értékeljük ezen körülmények MSU16H jelű, és a mutáns 25-B1 jelű törzs növekedésére gyakorolt hatását. A gombaellenes



hatás mérését, és a pszeudomicin A szintek meghatározását az 1. példa szerint végezzük.

9. Táblázat -- Burgonyagyöngy táptalaj (PPM)

összetevő	menyiség
glükóz	20 g/l
burgonyagyöngy	30 g/l
oldható keményítő	5 g/l
glicin	1 g/l
Czapek-féle ásványisó-oldat	2 ml/l
pH beállítása 5,2-re	

A módosított burgonyagyöngy táptalajon mutatott pszeudomicin termelés időfüggvényének meghatározásához egy 150 literes fermentort megtöltünk 2,3 kg glükózzal, 575 g oldható keményítővel, 3,45 kg, a Basic American Foods cégtől származó Country Style márkanevű burgonyagyöngyös instant burgonyapüré porral, 115 g glicinnel, 23 g magnézium-szulfát heptahidrátal, 23 g kálium-kloriddal, 0,46 g vas(II)-szulfát heptahidrátal és 115 l vízzel. A pH-t 5,0 értékre állítjuk be. A fermentort gőzzel sterilizáljuk és lehűtjük, majd 1,8 liter 25-B1 jelű törzzsel beoltjuk. A fermentort 150/perc fordulatszámon keverjük, a légáramlást 0,5 SCFM (0,14 vvm. [$\cong 14158 \text{ cm}^3/\text{perc}$]) értékre állítjuk be. A keverés és a légáramlás beállítása kísérlet során automatikusan történik oly módon, hogy az oldott oxigén-koncentráció a telített érték 30%-a legyen. A hőmérsékletet 25°C-on szabályozzuk. A tenyészet pH-ját 30%-os kénsav hozzáadásával 5,5, vagy kisebb értékre állítjuk be.

Még nagyobb méretű kísérlethez egy 1000 literes fermentort 24,0 kg Difco PDB-vel, 5,0 kg oldható keményítővel, 1,0 kg glicinnel, 200 g magnézium-szulfát heptahidrátal, 200 g kálium-



kloriddal, 4 g vas(II)-szulfát heptahidráttal és 1000 liter vízzel töltünk meg. A pH-t 5,0 értékre állítjuk be. A fermentort 50 liter 16 órás MSU 16H jelű törzzsel oltjuk be. A hőmérsékletet 25°C-on, az oldott oxigén-koncentrációt keveréssel és légbefúvással a telített érték 30%-án tartjuk. A pH-t 30%-os kénsav hozzáadásával úgy állítjuk be, hogy nem lépje túl az 5,5 értéket.

Eredmények

150 literes tartályban történő tenyésztés során, az oxigéntartalom ellenőrzése mellett gombaellenes hatás jelentkezett (lásd a 10. táblázatot). Ha az oxigéntartalmat nitrogéngázzal dúsított befűjt levegővel állítottuk be, ez nagyobb mennyiségű pszeudomicin termelést eredményezett. Ha a 25-B1 jelű mutáns *P. syringae* törzset MSU 16H jelű törzzsel helyettesítettük, mind a mikroorganizmus növekedése, mind a gombaellenes hatás körülbelül a kétszeresére növekedett (lásd a 10. táblázatot). Ha a 9. táblázat szerinti tápközeget a 4. táblázat szerinti közeggel helyettesítettük, a növekedés és gombaellenes hatás további körülbelül kétszeres növekedését értük el.

10. Táblázat -- A pszeudomicinek termelése két, burgonyából származó terméket tartalmazó táptalajon, az oxigéntartalom szabályozása mellett

törzs	összes pszeudomicin és pszeudomicin A koncentráció ¹ (µg/ml)
-------	---



	PDB közeg nitrogén befúvással	PDB közeg nitrogén befúvás nélkül	PPM közeg nitrogén befúvással	PPM közeg nitrogén befúvás nélkül
MSU 16H	21 (8)	12 (ND) ²	NT ³	NT
25-B1	49 (27)	20 (13)	87 (37)	75 (44)

¹ zárójelben a pseudomicin A koncentrációja

² az ND jelentése: nem határoztuk meg

³ az NT jelentése: nem vizsgáltuk

A pseudomicin termelés az idő függvényében a 11. táblázatban látható. A 150 literes fermentációnál ebben a kísérletben tapasztalt pseudomicin eloszlás a következő volt: 79% A, 10% B és 11% C. A pseudomicin C' igen kis mennyiségben termelődött.

11. Táblázat -- A pseudomicin termelés az idő függvényében, burgonyagyöngy táptalajt tartalmazó 150 literes fermentorban

eltelt fermentálási idő (óra)	pseudomicin A+B+C (µg/ml)
0	0
8	0
16	17
24	35
32	45
40	41

Az 1000 literes fermentorban végzett kísérletben a pseudomicin termelés időfüggvénye hasonló volt (12. táblázat).

12. Táblázat

eltelt erjesztési idő (óra)	pseudomicin 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

Következtetések

A pszeudomicin hozam jelentősen növelhető olyan tényezők szabályozásával, mint például az oldott oxigén koncentrációja, a kiválasztott törzs, és a táptalaj összetétele.

A táptalaj kiegészítése lipidekkel és további összetevőkkel

A 9. táblázat szerinti burgonyagyöngy táptalajt további összetevőkkel egészítettük ki, hogy meghatározzuk ezek hatását a pszeudomicin termelésre.

Anyag és módszer

A 9. táblázat szerinti burgonyagyöngy táptalajt további összetevőkkel, például lipidekkel (például metil-mirisztát vagy szójaolaj), foszfáttal, nagyobb mennyiségű glicinnel, ammónium-hidroxid adagolásával, és glükóz adagolásával egészítettük ki (13. táblázat). A sejtek tenyésztését a fenti körülmények között végeztük. A gombaellenes hatást az 1. példa szerint mértük.

Eredmények

A fenti kísérletek eredményei az alábbi, 13. táblázatban láthatók.

13. Táblázat -- Megnövekedett pseudomicin hozam kiegészített burgonyagyöngy táptalajon

kiegészítő anyag	pseudomicin A+B+C hozam (µg/ml)
nincs	80
metil-mirisztát (1 g/l)	150
glicin (2 g/l)	110
ammónium-hidroxid hozzáadás (10 ml/óra)	110
glicin (2 g/l) és metil-mirisztát (1 g/l)	160
glicin (4 g/l)	240
glükóz adagolás (200 ml/óra)	80
glicin (4 g/l), metil-mirisztát (1 g/l) és glükóz hozzáadás	287
szójaolaj (1 g/l)	150
KH ₂ PO ₄ (0,5 g/l)	60

Következtetések

A táptalaj kiegészítése glicinnel és metil-mirisztáttal jelentősen növeli a *P. syringae* pseudomicin termelését. Előnyös a glükóz hozzáadása is.

5. Példa -- A glükóz és a metil-mirisztát serkentik a pseudomicin termelést

A nagyobb pseudomicin termelés érdekében vizsgáltuk a glicin, metil-mirisztát és több más összetevő hatását a pseudomicin termelésre.

Anyag és módszer

A *P. syringae* baktériumokat 50 ml tenyésztési közeget tartalmazó 250 ml-es lombikban tenyésztjük. Az MSU 16H jelű *P. syringae* oltóanyaggal indított tenyészetet 25°C-on, 70% páratartalom mellett, rázás nélkül 7 napig inkubátorban tartjuk. Az inkubálási idő leteltével a lombikból kivett 4 ml táptalajt 0,1%-os foszforsavat tartalmazó 6 ml metanollal keverjük. Feltételezzük, hogy az alacsony pH stabilizálja a pseudomicineket. A szilárd részeket szűréssel vagy centrifugálással eltávolítjuk, a pseudomicineket az 1. példa szerinti HPLC eljárással mutatjuk ki.

A jelen vizsgálatban alkalmazott közegek: burgonya-szőlőcukor táptalaj (PDB, Difco) sterilizált vízben készült 24 g/l koncentrációjú oldata (összehasonlító közeg); 2 ml/l koncentrációban Czapek-féle ásványisó oldatot tartalmazó összehasonlító közeg; 1 g/l koncentrációban glicint tartalmazó összehasonlító közeg; 1 ml/l koncentrációban metil-mirisztátot (Sigma) tartalmazó összehasonlító közeg; 5 g/l koncentrációban oldható keményítőt (Difco) tartalmazó összehasonlító közeg; 2 ml/l koncentrációban Czapek-féle ásványisó oldatot, 1 g/l koncentrációban glicint és 5 g/l koncentrációban oldható keményítőt tartalmazó összehasonlító közeg; és 2 ml/l koncentrációban Czapek-féle ásványisó-oldatot, 1 g/l koncentrációban glicint, 1 ml/l koncentrációban metil-mirisztátot és 5 g/l koncentrációban oldható keményítőt tartalmazó összehasonlító közeg.

A vizsgálat napján a *P. syringae* baktériumokat ugyanazon a táptalajon tenyésztjük 30 órán át, a fent leírt körülmények között, de rázott lombikokban. A lombikokat 250/perc fordulatszámmal rázzuk.

Egy másik, rázott lombikok alkalmazásával végzett kísérletben az összehasonlító közeget glicint és több más



adalékanyagot tartalmazó táptalajjal hasonlítottuk össze. A sejteket a fenti, rázott lombikokra leírt eljárással tenyésztjük. Az alkalmazott közegek: összehasonlító közeg; 1 g/l koncentrációban glicint tartalmazó összehasonlító közeg; 1 g/l koncentrációban glicint és 2 ml/l koncentrációban Czapek-féle ásványisó oldatot tartalmazó összehasonlító közeg; 1 g/l koncentrációban glicint és 5 g/l koncentrációban oldható keményítőt tartalmazó összehasonlító közeg; 1 g/l koncentrációban glicint és 1 ml/l koncentrációban metil-mirisztátot tartalmazó összehasonlító közeg; 1 g/l koncentrációban glicint, 2 ml/l koncentrációban Czapek-féle ásványisó oldatot és 5 g/l koncentrációban oldható keményítőt tartalmazó összehasonlító közeg; és 1 g/l koncentrációban glicint, 2 ml/l koncentrációban Czapek-féle ásványisó-oldatot, 1 ml/l koncentrációban metil-mirisztátot és 5 g/l koncentrációban oldható keményítőt tartalmazó összehasonlító közeg.

Eredmények

A nem rázott lombikokkal elért eredményeket a 3. ábra mutatja. Az összehasonlító közeg a Montana állambeli G. Strobel és mások által alkalmazott, *P. syringae* tenyésztésére szolgáló közeg, amelynek leírása Harrison és mások *J. Gen. Microbiol.* cikkében (lásd alább) szerepel. A pseudomicinek kimutatási határa ebben a kísérletben körülbelül 1 µg/ml. A 3. ábrán látható, hogy a G. Strobel munkájában szereplő, ismert közeg és körülmények alkalmazásával a pseudomicin A termelés körülbelül 5 µg/ml, a pseudomicin B és C termelés pedig nem kimutatható. Ha az összehasonlító közeget Czapek-féle ásványisó oldattal egészítjük ki, a pseudomicin A termelés enyhén nő, körülbelül 6,5 µg/ml értékre, a pseudomicin B és C termelés pedig nem kimutatható. Ha az összehasonlító közeget 1 g/l glicinnel egészítjük ki, a



- pszeudomicin A termelés jelentősen, körülbelül 10,5 $\mu\text{g/ml}$ értékre nő, a pszeudomicin B termelés kimutatható (2,5 $\mu\text{g/ml}$), de nincs kimutatható pszeudomicin C termelés. Ha az összehasonlító közeget metil-mirisztáttal egészítjük ki, a pszeudomicin A termelés jelentősen, körülbelül 8 $\mu\text{g/ml}$ értékre nő, és a pszeudomicin B és C termelés egyaránt körülbelül 1 $\mu\text{g/ml}$. Ha az összehasonlító közeget oldható keményítővel egészítjük ki, a pszeudomicin A termelés enyhén visszaesik, a pszeudomicin B és C termelés nem kimutatható. Czapek-féle ásványisó oldatot, glicint és oldható keményítőt tartalmazó összehasonlító közeg alkalmazása esetén a pszeudomicin A, B és C termelés jelentős, nagymértékű növekedése figyelhető meg (3. ábra). További növekedés tapasztalható, ha a Czapek-féle ásványisó oldatot, glicint és oldható keményítőt tartalmazó összehasonlító közeget metil-mirisztáttal egészítjük ki. A nem rázott lombikok esetén minden eredmény 3 lombikra kapott eredmények átlaga.

A 4. ábrán látható, hogy rázott lombikok esetén hasonló eredményeket kaptunk. Rázott lombikok esetén azonban ahhoz, hogy a pszeudomicin A termelés a minimálisnál nagyobb legyen, lényeges glicin vagy metil-mirisztát hozzáadása, és a glicin és metil-mirisztát kombinációja a pszeudomicin A, B és C termelés jelentős, az additívnál nagyobb növekedését okozza. Hasonló eredmények figyelhetők meg a 6. ábra szerinti kombinációk és összetevők alkalmazásával.

Következtetések

Nem rázott lombikok esetén a glicin és/vagy metil-mirisztát egyaránt a pszeudomicin A és B termelés jelentős emelkedését okozza. A metil-mirisztát serkenti a pszeudomicin C termelését. Rázott lombikok esetén, jelentős pszeudomicin A



termeléshez glicin vagy metil-mirisztát jelenléte szükséges. Továbbá, a pseudomicin A, B és C termelés serkentését tekintve a glicin és a metil-mirisztát szinergista (egymás hatását fokozó) hatása figyelhető meg.

6. Példa -- A zsírsav metil-észterek közül a metil-mirisztát és a metil-palmitát serkentik a pseudomicin termelést

A *P. syringae* baktériumokat különböző lánc hosszúságú zsírsav metil-észterek jelenlétében tenyésztjük, annak bizonyítása céljából, hogy a pseudomicin termelés a szénlánc hosszúságától függ.

Anyag és módszer

A *P. syringae* baktériumokat az 5. példa szerint, rázás mellett, 0,1 v/v% koncentrációban a zsírsavak metil-észtereit, 1 g/l koncentrációban glicint, 2 ml/l koncentrációban Czapek-féle ásványisó oldatot, 5 g/l koncentrációban oldható keményítőt tartalmazó, 5,0 pH-jú táptalajon tenyésztjük. A pseudomicineket az 1. példa szerinti HPLC eljárással mutatjuk ki.

Eredmények

A 6. ábra a *P. syringae* inkubálások eredményeit mutatja, 6-22 szénatomszámú, páros számú szénatomos zsírsavak metil-észtereinek jelenlétében. Az 5. példa szerint, metil-mirisztát nélkül végzett inkubálás eredményeihez hasonló pseudomicin mennyiségeket a 6-12 vagy 18-22 szénatomszámú láncokat viselő zsírsav metil-észterek alkalmazásával értünk el. A pseudomicin termelés jelentős emelkedése tapasztalható a 14 és 16 szénatomszámú láncok esetén. A metil-mirisztát a 14 szénatomos zsírsav metil-észtere. A 14 és 16 szénatomos zsírsav metil-ész-



- terek mindegyike jelentősen növeli a pseudomicin A, B és C mindegyikének termelését.

Következtetések

MSU 16H jelű törzs alkalmazása esetén a vizsgált zsírsav metil-észterek közül a metil-mirisztát okozza a legnagyobb pseudomicin termelést. Lényeges körülmény, hogy a pseudomicinek peptid gyűrűjéhez kapcsolódó zsírsavlánc 14 szénatomos. Ez arra enged következtetni, hogy a hozzáadott metil-mirisztát lehet a pseudomicinek egyik kiindulási anyaga.

7. Példa – Tartály méretű pseudomicin termelésre szolgáló eljárások, burgonyából származó termék alkalmazásával

A 4. és 5. példák szerint összeállított közeg alkalmazható, ha a *P. syringae* baktériumokat 150 literes és 1000 literes méretben, burgonyából származó terméket tartalmazó közegben tenyésztjük.

Pseudomicin termelés 150 literes fermentorban

Anyag és módszer

Teljes streptomyces közeget (CSM, 2. táblázat) tartalmazó növekedési (*vegetative stage*) lombikokat fagyasztott *P. syringae* tenyészzettel beoltjuk, majd 25°C-on 250/perc fordulatszámon 24 órán át rázzuk. A növekedési lombikok 24 órás inkubálása után azok tartalmával szaporító (*bump stage*) lombikokat oltunk be. A CSM közeget tartalmazó szaporító lombikokat 25°C-on, 250/perc fordulatszámon forgatjuk. A szaporító lombikokat három vagy négy növekedési lombikból származó, egyesített tenyészzettel oltjuk be. A szaporító lombikok jellemzően körülbelül 900 ml CSM közeget tartalmaznak, sima, 2,5 literes Tunair®



- lombikban. Minden fermentort két szaporító tenyészetet tartalmazó Tunair® lombikokkal szerelünk fel. A szaporító lombikokat 16 órán át inkubáljuk.

Ezután két, 1,8 l teljes térfogatú szaporító tenyészetet inkubációs berendezésben (bazooka) egyesítünk. Ezekkel az egyesített tenyészetekkel oltjuk be a 9. táblázat szerinti, 4 g/l koncentrációban (3 g/l koncentrációjú) glicinnel és 1 g/l koncentrációban szójaolajjal kiegészített, 115 l térfogatú közeget. Ezeket a nagy méretű tenyészeteket 25°C-on három-négy napig tenyésztjük. A tenyésztési idő alatt az oldott oxigén koncentrációját keveréssel és a levegő áramoltatásával a telített érték 30%-án tartjuk. A pH-t szükség szerint kénsav vagy nátrium-hidroxid hozzáadásával $5,2 \pm 0,2$ értéken tartjuk. A nagy méretű tenyésztés megkezdése után 18 órával 200 ml/óra sebességű glükóz adagolást indítunk el. A nagy méretű tenyésztés megkezdése után 20 órával 20 ml/óra sebességű ammónium-hidroxid adagolást indítunk el. A tenyésztés során a visszafojtott nyomás 34 kPa. A keverés kezdeti értéke 150/perc, a légáramlás körülbelül 14158 normál cm³/perc [0,5 scfm]. A tenyészethez szükség szerint habképződést gátló anyagot is adunk. A nagy méretű tenyésztés harmadik-negyedik napján összegyűjtjük a *P. syringae* baktériumokat. A gombaellenes hatást az 1. példa szerinti eljárással mérjük.

Eredmények

A 8. és 9. ábrán a jelen eljárással folytatott kísérlet több különböző fermentációs paraméterének eloszlásai láthatók.

Következtetések

A jelen eljárással a pszeudomicin jelentős, kereskedelmi mennyiségben állítható elő.



Pszeudomicin termelés 5000 literes fermentorban

A 150 literes méretű pszeudomicin termelés eredményes eljárásait tovább nagyítottuk, 5000 literes méretre.

Anyagok és eljárások

A *P. syringae* oltóanyagot a fentebb leírt 150 literes méretű fermentálásnál alkalmazott eljárással állítjuk elő. A tenyésztés körülményei megfelelnek a 150 literes méretű tenyésztés fent leírt körülményeinek, a 14. táblázatban szereplő módosításokkal. Négy kísérletet hajtunk végre, amelyekből az első három esetén a 150 literes steril tartályban párhuzamos fermentációt végeztünk, a beoltott táptalaj steril körülmények között történő átvitelével. A steril átvittel végrehajtott párhuzamos fermentáció arra szolgál, hogy a 150 literes és 5000 literes fermentorok teljesítményének összehasonlítása során kiküszöböljük a tápanyag kiegészítés és a sterilizálás változó paramétereit. A gombaellenes hatást az 1. példa szerint mérjük.

Eredmények

A 14. táblázat összefoglalja az 5000 literes méretkel elért eredményeket, és összehasonlítja azokat a párhuzamos fermentálások eredményeivel. Az 5000 literes tartályban elért koncentrációk az 1. kísérlet kivételével alapvetően megegyeztek a 150 literes tartályban elért koncentrációkkal. Az 1. kísérletben az 5000 literes tartály keverését kezdetben 150/perc, majd a 36. órában 50/perc értékre csökkentettük. A sejtek növekedése a 150 literes tartályban végzett párhuzamos fermentációban elért értéknek mindössze 1/3-a volt, a pszeudomicin A tartalom pedig a párhuzamos érték 1/4-e. Az ezt követő kísérletekben az 5000



- literes tartály keverését 25/perc (kezdeti) értékre csökkentettük, ennek eredményeként a sejtek növekedése és a pszeudomicinek arányai összehasonlíthatók voltak a steril párhuzamos kísérletek és az önállóan működtetett 150 literes tartályok esetén elért eredményekkel. Az adatokból arra lehet következtetni, hogy a 25-B1 jelű *P. syringae* törzs érzékeny a nyíró igénybevételre.

14. Táblázat -- Az 5000 literes fermentorral elért eredmények
(PPM)

kísérlet	5000 l-es sarzs	tarta- lom ¹	párhuza- mos sarzs	tarta- lom	megjegyzés
1	055CE7	12	313CA7	45	4 g/l glicin, 0,1 g/l metil-mirisztát, a pH nem ellenőrzött, adalék nélkül; az 5000 literes tartályban: magas DO ₂ koncentráció, a keverés csökkentése a 36. órában a kezdeti 150/perc értékről 50/perc értékre
2	060CE7	89	318CA7	77	az 1. kísérlettel azonos, de a közeg 1 g/l metil-mirisztátot tartalmaz; az 5000 literes tartályban a keverést 25/perc fordulatszámon, a DO ₂ értéket 30% szinten szabályozzuk

a 14. táblázat folytatása

3	063CE7	50	332CA7	44	A közeg az 1. kísérlet szerinti, de 10 g/l burgonyagyöngyöt és karamellizált táptalajt tartalmaz. A pH gyors csökkenését követően azt a 24. órában NH ₄ OH-dal 5,5 értékre növeljük.
---	--------	----	--------	----	---



4	068CE7	120	nem végez-tük el	135	a pH-t NaOH és NH ₄ OH adagolással 5,2 értéken tartjuk, glükóz adagolással, a közeg az 1. kísérlet szerinti, de metil-mirisztát helyett szójaolajat tartalmaz
---	--------	-----	------------------------	-----	--

¹ A tartalom pszeudomicin A koncentrációt (µg/ml) jelent.

A glükóz adagolása a fermentorokba 80 vegyes%-os glükózoldat hozzáadását, az ammónia adagolása 58 súly%-os ammónium-hidroxid hozzáadását jelenti.

Következtetések

A jelen eljárás 5000 literes méretben történő alkalmazásával jelentős, kereskedelmi mennyiségben állítható elő pszeudomicin.

8. Példa -- *P. syringae* tenyésztése és pszeudomicin termelése nagy méretben, burgonyából származó termékeket nem tartalmazó táptalajon

Ha a *P. syringae*-t olyan N21 táptalajon tenyésztjük, amely nem tartalmaz az előző példákban szereplő, burgonyából származó termékeket, grammnyi mennyiségű pszeudomicin termelése valósítható meg.

Pszeudomicin termelés rázott lombikokban, N21 táptalajon

Anyagok és eljárások

A *P. syringae* baktériumokat az 5. példa szerinti körülmények között tenyésztjük, azzal a különbséggel, hogy a közeg nem tartalmaz burgonyából származó terméket. Az N21 közeg néven ismert közeg összetétele a 15. táblázatban látható. A



- közeget 0,2% koncentrációban metil-mirisztáttal egészítettük ki, hogy meghatározzuk a metil-mirisztát hatását a pseudomicin termelésre.

15. Táblázat -- Az N21 közeg összetétele

ÖSSZETEVŐ	GRAMM/LITER
szacharóz	35
ammónium-szulfát	0,5
mononátrium-glutamát	2
L-hisztidin	2
glicin	0,5
oldható keményítő	5
KH ₂ PO ₄	0,2
Czapek-féle ásványisó oldat	2 ml
élesztőkivonat	1
MES puffer	9,8
pH beállítása 5,2 értékre	

Több *P. syringae* törzs pseudomicin termelését értékeltük metil-mirisztátot tartalmazó, vagy nem tartalmazó N21 közeg alkalmazása mellett. A vizsgált *P. syringae* törzsek a következők voltak: MSU 16H, 25-B1, 67H1 és 7H9-1.

Eredmények

A metil-mirisztát jelenlétében, vagy hiányában tenyésztett több *P. syringae* törzs pseudomicin termelésével kapcsolatos vizsgálati eredményeket mutatja a 16. táblázat és a 9. ábra. Az eredményekből látható, hogy a 67H1 jelű törzs metil-mirisztát jelenlétében, vagy hiányában is nagyobb mennyiségben termeli



- mindegyik pseudomicin származékot. A 7H9-1 jelű törzs abban különbözik a többitől, hogy a pseudomicin A-nál vagy C-nél jóval nagyobb mennyiségben termel pseudomicin B-t. A metil-mirisztát minden törzsnél serkentette a pseudomicin termelést.

16. Táblázat -- Néhány *P. syringae* törzs pseudomicin termelése metil-mirisztát jelenlétében és hiányában

törzs	metil- -mirisztát	pseudomicin A µg/ml	pseudomicin B µg/ml	pseudomicin C µg/ml
MSU 16 H	-	59	19	12
25-B1	-	66	50	15
67H1	-	334	173	83
7H9-1	-	3	110	0
MSU 16H	+	126	45	27
25-B1	+	154	123	36
67H1	+	390	207	95
7H9-1	+	8,5	222	4,5

Következtetések

Különféle *P. syringae* törzsek burgonyából származó terméket nem tartalmazó közegben kereskedelmi mennyiségben termelnek pseudomicineket, amely pseudomicin termelés metil-mirisztáttal serkenthető.

Pseudomicin termelés 5000 literes méretben, N21 táptalajon

A burgonyából származó termékeket nem tartalmazó táptalajjal végzett pseudomicin termelés eljárásait 5000 literes méretre nagyítottuk.



Anyag és módszer

A pszeudomicin előállítását 5000 literes fermentorban a 7. példa szerinti eljárással végezzük, azzal a különbséggel, hogy N21 táptalajt alkalmazunk (15. táblázat). Az N21 táptalajt 1 g/l koncentrációban élesztőkivonattal egészítjük ki. 67H1 jelű *P. syringae* törzset alkalmazunk.

Eredmények

Tíz 5000 literes fermentorban végzett kísérlet eredményeinek átlagértékeit mutatja a 17. táblázat.

17. Táblázat -- Tíz 5000 literes fermentorban kapott pszeudomicin mennyiségek átlagértékeinek eloszlása

pszeudomicin	µg/ml begyűjtésnél
A	243
B	203
C	71
C'	40

Következtetések

A pszeudomicin A, B, C és C' 5000 literes méretben, burgonyából származó termékeket nem tartalmazó táptalaj alkalmazásával kereskedelmi szempontból jelentős mennyiségben termelhető.

9. Példa -- A pszeudomicin termelés közegének további egyszerűsítése

A *P. syringae* burgonyából származó termékeket nem tartalmazó N21SM közegben végzett tenyésztése során ered-



- ményes pseudomicin termelést tapasztaltunk. Az N21SM alapú, de annak bizonyos összetevőit nem tartalmazó közegben is jelentős mennyiségű pseudomicin termelhető.

Anyagok és eljárások

A *P. syringae* törzset rázott lombikokban, az 5. példa szerinti körülmények között tenyésztjük, azzal a különbséggel, hogy a közeg összetételét az alábbiakban írjuk le. A CNP közeg néven ismert alapközeg összetétele a 18. táblázatban látható. A vizsgált adalékanyagok alkalmazott koncentrációját és kombinációit lásd az alábbiakban (18. táblázat).

18. Táblázat -- A CNP közeg összetétele

ÖSSZETEVŐ	MENNYISÉG
glükóz	20 g/l
KH ₂ PO ₄	0,41 g/l
Czapek-féle ásványisó oldat	2 ml
MES puffer	9,8 g/l
ammónium-szulfát	1 g/l
pH beállítása 5,2-re	

A CNP KÖZEG ADALÉKANYAGAI	
glutamát	2 g/l
glicin	0,5 g/l
L-hisztidin	2 g/l
oldható keményítő	5 g/l
élesztőkivonat	1 g/l



Néhány *P. syringae* törzs pseudomicin termelését értékeltük, egy vagy több felsorolt adalékanyagot tartalmazó, vagy nem tartalmazó CNP közeg alkalmazása esetén. Az egyik értékelt törzs a 25-B1 jelű *P. syringae* törzs volt.

Eredmények

A *P. syringae* adalékanyagokkal, vagy anélkül kapott pseudomicin termelésének eredményeit mutatja a 19. táblázat.

19. Táblázat -- Az adalékanyagokat tartalmazó, vagy nem tartalmazó CNP közegben tenyésztett *P. syringae* pseudomicin termelése

adalékanyag	OD ₆₀₀	Pseudomicin (µg/ml)			
		A	B	C	C'
nincs	0,221	0	0	0	0
	0,222	0	0	0	0
glutamát	0,943	82,6	16,3	24,5	5,9
	0,94	87	16,7	25,7	6
glicin	0,628	0	0	0	0
	0,567	0	0	0	0
hisztidin	0,331	0	0	0	0
	0,354	0	0	0	0
glutamát, glicin és hisztidin	0,984	153	41	44	12
	0,98	149	40	42	12

a 19. táblázat folytatása

glutamát, glicin, hisztidin és oldható keményítő	0,985	134	29	34	9
	0,996	125	34	35	11
oldható keményítő	0,28	0	0	0	0
	0,289	0	0	0	0
élesztőkivonat	0,441	40	6	11	2



	0,449	39	6	11	2
glutamát, glicin, hisztidin, oldható keményítő és élesztőkivonat	0,998	215	52	55	17
	1,001	197	52	56	19

Következtetések

A *P. syringae* tenyésztésére, és kereskedelmi szempontból jelentős pseudomicin termelésre számos különböző minimális táptalaj alkalmazható.

10. Példa

Pseudomicin A' és B' termelése

Olyan tenyésztési eljárást dolgoztunk ki, amelyben egy *Pseudomonas syringae* törzs a táptalajban pseudomicin A'-t és/vagy B'-t termel.

Anyagok és eljárások

Az oltóanyag előállítása: Folyékony nitrogén gőzfázisában tartott, sejteket tartalmazó felülúszó mintát felengedünk, majd ezzel beoltunk két adag 900 ml CSM táptalajt. A CSM táptalaj összetétele (g/l): glükóz (5), maltóz (4), Difco Tryptic Soy Broth (30), Difco élesztőkivonat (3) és magnézium-szulfát heptahidrát (2). A kétliteres lombikokban levő két adag 900 ml táptalajt körülbelül 0,5 ml térfogatú sejtszuszpenzióval oltjuk be. A lombikokat rázás mellett 25°C-on 24 órán át inkubáljuk. A két lombik egyesített tartalmát 150 literes fermentorban levő 115 liter steril fermentációs táptalajra oltjuk.

Fermentációs szakasz: A fermentációs táptalaj összetétele (g/l): szőlőcukor (20), oldható keményítő (5), Basic American Foods Country Style Burgonyagyöngy instant burgonyapüré (30), glicin (1), magnézium-szulfát heptahidrát (0,2), kálium-klorid (0,2)



- és csapvízben készült vas(II)-szulfát heptahidrát (0,004). A pH-t a sterilizálás előtt 5,2 értékre állítjuk be. A fermentálást 25°C-on 68 óráig végezzük. Az oldott oxigén koncentrációját a légáramlás és a keverő lapátjának fordulatszáma folytonos szabályozásával a telített érték 30%-án, vagy afelett tartjuk. A pH-t kénsav vagy nátrium-hidroxid hozzáadásával 4,0-5,4 értékek között tartjuk.

Változatok az adagolási eljárásokban: Az egyszerű szakaszos adagolási eljáráshoz képest számos olyan változatot találtunk, amelyek alkalmasak pszeudomicin A' és/vagy B' termelésére. A szőlőcukor a beoltás megkezdését követő 24. órától 60 ml/óra sebességgel adagolható. Az adagolás a fermentálás folyamán végig folytatható. Másik eljárás szerint a folyamatban az oldott oxigén koncentrációját a beoltást követő 24. órától a fermentálási folyamat befejeződéséig a telítési érték 5%-án tartjuk. Az oldott oxigén koncentrációját úgy tartjuk 5% értéken, hogy a fermentorba vezető légáramba semleges nitrogéngázt (N₂) keverünk. A gázt minden esetben egy egyszerű, süllyesztett bekeverő csövön keresztül adagoljuk a fermentorba, amely cső nyílása éppen a fermentor alján levő keverőlapát alatt található.

Eredmények és következtetések

A *P. syringae* alkalmazásával több fermentációs eljárásban termelődik pszeudomicin A' és/vagy B'.

A pszeudomicin A' és B' izolálása és tisztítása

Kidolgoztuk a pszeudomicin A' és B' *Pseudomonas syringae* törzs táptalajából való izolálására és tisztítására szolgáló eljárásokat.

Anyagok és eljárások



A begyűjtést követően a teljes fermentációs táptalaj mennyiségét (4x100 ml) 0,45 μm lyukátmérőjű Membralox kerámiaszűrőn szűrjük, így szűrletet (A rész) és szilárd szuszpenziót (B rész) kapunk. A 135 l térfogatú B részt 0,1% trifluoro-ecetsavat tartalmazó, egyenlő térfogatú acetonnal kirázzuk 120 percig, majd állni hagyjuk. A tiszta acetonos szerves részt szűréssel elkülönítjük, majd az acetont csökkentett nyomáson elpárologtatjuk, így 88 ml C részt kapunk. Elsőként az A részt gyantával töltött, vízzel átitatott 10 l HP20ss oszlopra töltjük, majd az oszlopot 0,1% trifluoro-ecetsavat tartalmazó 15%-os acetonnitrillel mossuk. Ezután a C részt ugyanerre az oszlopra töltjük, majd az oszlopot az előzőekhez hasonlóan 20 l, 0,1% trifluoro-ecetsavat tartalmazó 15%-os acetonnitrillel mossuk.

Az oszlopot ezután 30 percen keresztül 15 és 20% között egyenletesen változó koncentrációjú, 0,1% TFA-t tartalmazó acetonnitrillel, majd 60 percen keresztül 20-35% között egyenletesen változó koncentrációjú, 0,1% TFA-t tartalmazó, 1 l/perc áramlási sebességű acetonnitrillel leoldjuk. Egy liternyi részeket gyűjtünk össze. A 6-9. részeket (4l) egyesítjük, így 24 g D részt kapunk. A D rész egy részét (~1 g) fordított fázisú oszlopon (Dynamax C₁₈ 41,4 X 250 mm) pH=3 trietil-ammónium-fosztát puffer és acetonitril-metanol mozgófázis alkalmazásával kromato-grafáljuk (a leoldás során a 40ml/perc áramlási sebességű oldó-szer aránya 45 percen keresztül 65:17:18 és 30:35:35 között változik). A megfelelő részeket egyesítjük, a térfogatot 75 ml-re csökkentjük, majd az előzőekhez hasonlóan C₁₈ oszlopon, 80:10:10 és 46:27:27 között változó arányokkal újból kroma-tografáljuk, így 113 mg E részt, és 116 mg F részt kapunk. Az E és F részek további, C₁₈ oszlopon (Dynamax 21,4 X 250 mm) történő kromatografálása 45 mg pszeudomicin A'-t és 62 mg pszeudomicin B'-t eredményez.



Eredmények és következtetések

A fermentációs táptalajból más pszeudomicin származékok tisztítási eljárásaihoz hasonló HPLC eljárással eredményesen tisztítottuk a pszeudomicin A'-t és B'-t.

A jelen találmányt különféle specifikus és előnyös megvalósítások és eljárások segítségével írtuk le. Nyilvánvaló azonban, hogy a jelen találmány szellemében és annak oltalmi körén belül számos változtatás és módosítás végezhető. Valamennyi, a jelen találmány részletes leírásában szereplő közlemény és szabadalmi bejelentés a jelen találmány részét képezi.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy vagy több pseudomicin származék előállítására, amely eljárás a következő lépéseket tartalmazza:

egy vagy több pseudomicin származék kinyerése a szóbanforgó táptalajból.

biológiailag tiszta *Pseudomonas syringae* tenyészet fermentálása olyan táptalajon, amelyben az aminosav glutamát, vagy glutamát, glicin és hisztidin keveréke, pH-ja körülbelül 4 és körülbelül 6,5 közötti, amíg egy vagy több pseudomicin származék legalább 10 µg/ml koncentrációban termelődik; és

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó aminosav glutamát, glicin és hisztidin keveréke.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a táptalaj oldható keményítőt tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó aminosav glicin, és a szóbanforgó táptalaj lipidet, burgonya-dextrint vagy ezek kombinációját tartalmazza.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó lipid szójaolaj, 16 szénatomos zsírsav, 16 szénatomos zsírsav észtere, 14 szénatomos zsírsav, vagy 14 szénatomos zsírsav észtere.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó lipid metil-mirisztát vagy metil-palmitát.



7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pH kisebb, mint körülbelül 6,0.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pH körülbelül 5,5.

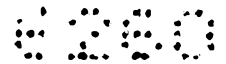
9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó tenyésztés során az oldott oxigén koncentrációját körülbelül 5% és körülbelül 30% értékek között tartjuk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó tenyésztést glükóz, ammónium-hidroxid vagy ezek kombinációjának hozzáadása mellett végezzük.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó pH-t ammónium-hidroxid adagolásával 5,0 és 5,7 értékek között tartjuk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó táptalaj glükózt vagy szacharózt, ammónium-szulfátot, foszfátot, Czapek-féle ásványisó oldatot és MES puffert tartalmaz, és a szóbanforgó pH körülbelül 5,2.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó egy vagy több pseudomicin származék pseudomicin A, pseudomicin A', pseudomicin B, pseudomicin B', pseudomicin C, pseudomicin C', vagy azok keveréke.



- 14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó egy vagy több pseudomicin származék pseudomicin B.
- 15. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó *Pseudomonas syringae* vad típusú törzs, transzpozonnal átalakított mutáns törzs, vagy kémiai mutációval létrehozott mutáns törzs.
- 16. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó *Pseudomonas syringae* árpaféléből, citrusféléből vagy orgonaféléből származó környezeti izolátum.
- 17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó *Pseudomonas syringae* MSU 16H, MSU 174, MSU 206 jelű, vagy ezekből származtatott törzs.
- 18. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó *Pseudomonas syringae* 25-B1 (ATCC PTA-1622), 67H1 (ATCC PTA-1621), vagy 7H9-1 (ATCC PTA-1623) jelű törzs.
- 19. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó *Pseudomonas syringae* törzset a 25-B1 (ATCC PTA-1622) jelű törzsből származtatják.
- 20. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a 25-B1 (ATCC PTA-1622) jelű törzset kémiai mutációval hozzuk létre, és a mutánsokat kiválogatjuk.

21. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó egy vagy több pseudomicin származék legalább 300 µg/ml koncentrációban termelődik.

22. Az 1. igénypont szerinti eljárással előállított pseudomicin.

23. Olyan biológiailag tiszta, 25-B1 (ATCC PTA-1622), 67H1 (ATCC PTA-1621), 7H9-1 (ATCC PTA-1623) jelű *Pseudomonas syringae* törzs, vagy ezek pseudomicin termelő mutánsa vagy változata, amely nagyobb, mint körülbelül 10 µg/ml koncentrációban termel egy vagy több pseudomicin származékot.

24. Eljárás egy vagy több pseudomicin származék előállítására, amely eljárás a következő lépéseket tartalmazza:

Egy vagy több pseudomicin származékot nagyobb, mint körülbelül 10 µg/ml koncentrációban termelő, biológiailag tiszta, MSU 16H, MSU 174, MSU 206, 25-B1 (ATCC PTA-1622), 67H1 (ATCC PTA-1621), 7H9-1 (ATCC PTA-1623) jelű *Pseudomonas syringae* törzs, vagy ezek pseudomicin termelő mutáns alakja vagy változata tenyésztése glükózt, KH_2PO_4 -ot, Czapek-féle ásványisó oldatot, MES puffert, ammónium-szulfátot és aminosavakat tartalmazó táptalajon,

amely eljárásban a szóbanforgó aminosav glutamát, vagy glutamát, glicin és hisztidin keveréke,

amely eljárásban, abban az esetben, ha a szóbanforgó aminosav glutamát, glicin és hisztidin keveréke, akkor a táptalaj adott esetben oldható keményítőt tartalmazhat,

amely eljárásban a szóbanforgó közeg pH-ja körülbelül 4 és körülbelül 6,5 közötti,

amely eljárásban a szóbanforgó tenyésztést körülbelül 15 és körülbelül 35°C hőmérséklet között, az oxigén-koncentrációnak a telített érték körülbelül 5 és körülbelül 50%-a közötti értéke mellett végezzük, amíg egy vagy több pszeudomicin származék legalább körülbelül 10 µg/ml koncentrációban termelődik; és

egy vagy több pszeudomicin származék kinyerése a szóbanforgó tenyészetből.

25. Eljárás egy vagy több pszeudomicin származék előállítására, amely eljárás a következő lépéseket tartalmazza:

Egy vagy több pszeudomicin származékot nagyobb, mint körülbelül 10 µg/ml koncentrációban termelő, biológiailag tiszta, MSU 16H, MSU 174, MSU 206, 25-B1 (ATCC PTA-1622), 67H1 (ATCC PTA-1621), 7H9-1 (ATCC PTA-1623) jelű *Pseudomonas syringae* törzs, vagy ezek pszeudomicin termelő mutáns alakja vagy változata tenyésztése 20 g/l koncentrációban glükózt, 0,41 g/l koncentrációban KH_2PO_4 -ot, 2 ml Czapek-féle ásványisó oldatot, 9,8 ml MES puffert, 1 g/l koncentrációban ammónium-szulfátot és aminosavakat tartalmazó táptalajon,

amely eljárásban a szóbanforgó aminosav 2 g/l koncentrációjú glutamát, vagy 2 g/l koncentrációjú glutamát, 0,5 g/l koncentrációjú glicin és 2 g/l koncentrációjú hisztidin keveréke,

amely eljárásban, abban az esetben, ha a szóbanforgó aminosav glutamát, glicin és hisztidin keveréke, akkor a táptalaj adott esetben, 5 g/l koncentrációjú oldható keményítőt tartalmazhat,

amely eljárásban a szóbanforgó közeg pH-ja 5,2,

amely eljárásban a szóbanforgó tenyésztést körülbelül 15 és körülbelül 35°C közötti hőmérsékleten, az oxigén-koncentrációnak a telített érték körülbelül 5 és körülbelül 50%-a közötti értéke mellett

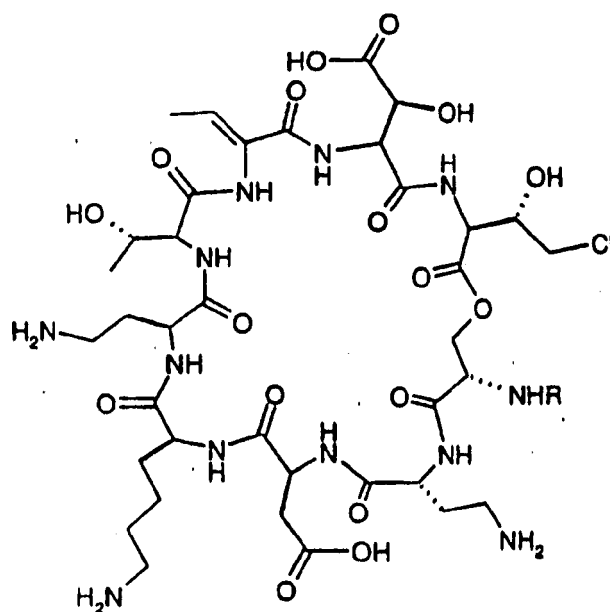
végezzük, amíg egy vagy több pszeudomicin származék legalább körülbelül 10 µg/ml koncentrációban termelődik; és

egy vagy több pszeudomicin származék kinyerése a szóbanforgó tenyészetből.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.C. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1061 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

Szentpéteri Ádám



(I)