73.118/PA

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

03 00363

Eljárás pszeudomonsav A előállítására mikrobiológiai eljárás segítségével (Az adatlapról)

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás pszeudomonsav A előállítására azzal jellemezve, hogy a következő lépésekből áll: legalább egy nitrogén- vagy szénforrást tartalmazó táptalajon, elárasztott, levegőztetett körülmények között pszeudomonsav A bioszintézisére képes *Pseudomonas* baktériumtörzset növesztenek, majd fermentálják a *Pseudomonas* tenyészetett, hogy pszeudomonsav A képződjön; ahol a *Pseudomonas* baktériumtörzs a NCAIM(P)B 001235 nyilvántartási számon a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél Budapest, Magyarország letétbe helyezett *Pseudomonas* fajhoz tartozó 19/26 számú új baktériumtörzs vagy annak mutánsa, illetve variánsa.

A találmány tárgya továbbá a NCAIM(P)B 001235 nyilvántartási számon a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél Budapest, Magyarország letétbe helyezett *Pseudomonas* fajhoz tartozó 19/26 számú új baktériumtörzs és annak biológiailag tiszta tenyészete.

73.118/PA
P03P00363

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY
Nemzetközi Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

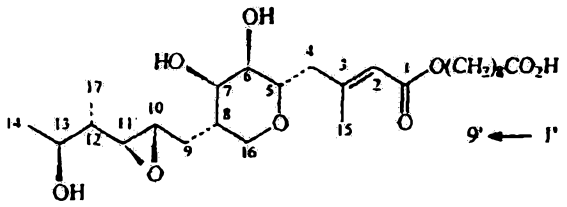
A2

Eljárás pszeudomonsav A előállítására mikrobiológiai eljárás segítségével.

A találmány tárgya egy mikrobiológiai eljárás a pszeudomonsav A (mupirocin) antibiotikum előállítására.

A mupirocinként is ismert pszeudomonsav A egy antibiotikum, amely növekedést gátló hatással rendelkezik főleg a Gram pozitív baktériumokkal (például *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pnemoniae, Klebsiella pneumoniae*) és néhány Gram-negatív baktériummal (például *Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae*) [A. Ward, D.M. Campoli-Richards, Drugs 32, 425-444 (1986)] szemben, és a gátláshoz szükséges minimális koncentráció a 0,02-0,5 mg/dm^3 tartományban van. A pszeudomonsav A az izoleucin-tRNS-szintetáz enzim gátlásán keresztül hat a patogén baktériumok peptid-szintézisére [J. Hughes and G. Mellows, Biochem J. 191, 209-219, (1980)]. Az antibiotikum előnyös tulajdonsága, hogy az emberre és az állatokra nézve nagyon alacsony toxicitással bír és az Ames-teszt esetében negatív. A pszeudomonsav A-t különféle készítményekben jelenleg a humán terápiában használják bőrfertőzések (például impetigo (heveny, gyulladásos, gennyes hólyagocskákkal járó bőrbetegség), bőrgennyesedés), orr és belső-fül fertőzések, pattanás, égések, bőrkiütés, pikkelysömör kezelésére, a fekélyesedés esetében a másodlagos fertőzések kezelésére és a kórházi fertőzések megelőzésére.

A pszeudomonsav A kémiai szerkezetét 9-{4[5S(2S,3S-epoxi-5S-hidroxi-4S-metilhexil)-3R,4R-dihidroxi-tetrahidro-piran-2S-il]-3-metil-buti-2(E)-enoiloxi}-nonánsavként [E.B. Chain és G. Mellows, J.C.S. Chem. Comm. 847-848 (9174); R.G. Alexander, J.P. Clayton, K. Luk, N.H. Roges, T.J. King, J.C.S. Perkin I. 561-565 (1978)] határozták meg, amint azt az (I) általános képlet is leírja:



(I)

Ismert, hogy a *Pseudomonas fluorescens* képes pszeudomonsav A-t termelni. A GB 1,395,907 számú nagy-britanniai szabadalmi leírás alapján a *Pseudomonas fluorescens* NCIB 10586 törzs képes pszeudomonsav A-t és annak a C_2 és C_3 szénatomok között cisz helyzetben lévő kettős kötést tartalmazó izomerjét és pszeudomonsav B-t tartalmazó pszeudomonsav-komplexet bioszintetizálni. A komponensek aránya 4,5:4,5:1. A JP 52-70083 japán szabadalmi leírás alapján, azonban a *Pseudomonas fluorescens* Y-11633 törzs pszeudomonsav A-t, pszeudomonsav B-t és további két ismeretlen szerkezetű komponenst 9:0,5:0,5 arányban tartalmazó pszeudomonsav-komplex bioszintézisére képes.

A találmány tárgya eljárás pszeudomonsav A előállítására, ahol a pszeudomonsav A-t bioszintetizálni képes *Pseudomonas* baktériumtörzset elárasztott, levegőztetett körülmények között legalább egy szerves nitrogén- vagy szén-forrást tartalmazó közegben tenyésztjük, és a *Pseudomonas* tenyészetet úgy fermentáljuk, hogy pszeudomonsav A képződjön. Előnyösen a Pseudomonas baktéri-

H-3123

umtörzs az NCAIM(P)B 001235 nyilvántartási szám alatt a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél (Budapest, Magyarország) letétbe helyezett 19/26 számú *Pseudomonas* fajhoz tartozó baktériumtörzs, vagy annak pszeudomonsav A-t termelő mutánsa vagy változata.

A találmány tárgya továbbá egy olyan elárasztott, levegőztetett körülmények között pszeudomonsav A-t bioszintetizálni képes *Pseudomonas* tenyészet, amely lényegében egy új, 19/26 számú *Pseudomonas* fajhoz tartozó baktériumtörzsből áll.

A találmány tárgya továbbá az új, 19/26 számú *Pseudomonas* fajhoz tartozó baktériumtörzs biológiailag tiszta tenyészete.

Az 1. ábra a 19/26 számú *Pseudomonas* faj [NCAIM(P)B 001235] által termelt pszeudomonsav-komplex HPLC kromatogramja.

A baktérium által termelt mikrobaellenes antibiotikumok keresése során 20000 mikroorganizmust izoláltunk a gombák növekedésének megakadályozása végett 10 µg/ml candicint és 5 µg/ml cikloheximidet tartalmazó agar táptalajon.

Az izolált baktériumtörzsek rázatott lombikos tenyészetének antibakteriális hatékonyságát vizsgáltuk különféle Gram-pozitív és Gram-negatív teszt-mikroorganizmusokon és azok rezisztens változatain a terápiás gyakorlatban előforduló antibiotikumok esetében. Az antibiotikum rezisztens teszt-mikroorganizmusok alkalmazásával az antibakteriális antibiotikumok felismerését a hatás új módozataival akartuk elősegíteni.

A fent ismertetett vizsgálatok során a „19/26 számú törzs"-ként jelölt baktérium izolátumot választottuk ki. Eredetileg ezt a szervezetet egy Argentínában gyűjtött talajmintából nyertük ki. A szervezettől származó fermentlé jelentős antibiotikus ha-

tással rendelkezett a *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* SMITH, a penicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* 1110, számtalan *Streptococcus pneumoniae* törzs, *Streptococcus pyogenes* A 115 ROBB, *Alcaligenes Faecalis* 140001, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, a meticillin- és aminoglükozid-rezisztens *Staphylococcus aureus* MRSA 119OR és a megszámlálhatatlan *Mycoplasma pneumoniae* és *Haemophilus influenzae* törzsekkel szemben. A későbbiekben izoláltuk a 19/26 számú törzs antibakteriális anyagcsere termékét annak fermentléjéből és a kémiai szerkezetvizsgálat eredményeként azt találtuk, hogy az azonos a pszeudomonsav A-val.

Ugyanakkor ezt a kiválasztott pszeudomonsav A-t termelő baktériumtörzset rendszertani vizsgálatoknak vetettük alá. Először egy előzetes összehasonlító vizsgálatot végeztünk a kiválasztott közeli rokonságot mutató baktériumtörzsekkel Bio-Mérieux ATB Expression berendezést alkalmazva ID 32 GN szalaggal. Az utóbbi vizsgálat alkalmas az adott ismeretlen baktériumtörzs viszonylag gyors (például faji szinten) rendszertani azonosítására, ha a diagnosztikai tulajdonságai a kívánt magas mértékű fenetikus (mesterséges rendszerezés szerinti) hasonlóságot képesek mutatni az olyan igazi törzsek legalább egyikével, amelyek a berendezés adatbázisában szerepelnek. A vizsgálandó ismeretlen baktériumtörzs szénforrás-hasznosítási spektruma határozható meg e készülékkel 32 vizsgálatban 14 különböző cukorral, illetve 14 szerves savval, amelyeket növekedési faktorok komplexével kiegészített minimális táptalajhoz adtunk. A hasznosítási vizsgálat kiértékelésének eredményeit beoltás és 48 óra inkubá-

ciós idő után kaptuk a kifejlődött mikrokulturák automata turbidimetriás mérésének segítségével, ahol a növekedési intenzitásokat (reakciók) +, -, illetve ? jelek jelölik. Az egyidejűleg vizsgált biokémiai tesztek eredményeit a felszereléshez kapott programmal értékeljük ki. A 19/26 számú törzs így kapott fiziológiai-biokémiai adatait összevetettük azokkal a baktériumtörzsekkel, amelyek az adatbázisban fel voltak sorolva (ebben az esetben e törzsek teljes száma 114 volt, és ezek közül 14 tartozott különböző *Pseudomonas* fajokhoz: *Pseudomonas aeruginosa I és II, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas fluorescens I és II, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas mesophilica, Pseudomonas pickettii, Pseudomonas pseudomallei, Pseudomonas vesicularis, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas diminuta, Pseudomonas putida, és Pseudomonas stutzeri*). Az összehasonlító vizsgálat végeredményeként a 19/26 számú törzsről kimutattuk, hogy a Pseudomonas nemzetség tagja.

A 19/26 számú törzs nemzetség szintjén történő sikeres azonosítását követően klasszikus taxonómiai vizsgálati eljárás segítségével a törzset megpróbáltuk fajok szintjén azonosítani.

A 19/26 számú törzs tenyészetei megfelelő táptalajon 0,6-1,1-től 1,3-4,0 μ méretű nem-spórás Gram-negatív pálcikák alakjában képesek sokszorozódni. Ezek poláris ostorokkal aktív mozgásra képesek. Ezek az obligát aerob kemoorganotróf pálcikák a glükózt csak oxidatív úton képesek bontani. Nem képesek fermentálni és képtelenek terminális elektronakceptorként nitrátokkal lélegezni, de pozitív kataláz-reakciót mutatnak. Egyszerű szintetikus táptalajon nem hoznak létre látható telepeket és szaporításukhoz mindig szükség van növekedési faktorokra. Optimális

körülmények között növesztve a telepeik arginin-dihidroláz-pozitívak, fluoreszcens festékeket termelnek, de a poli-β-hidroxi-butirát jelenléte és felhalmozódása a sejtekben nem kimutatható.

A 19/26 számú törzs további tulajdonságai: 41°C-on telepeik fejlődése nem megfigyelhető; nem termelnek levánt szacharózból, nem hidrolizálják a zselatin és a keményítőt, oxidáz-pozitívak, és nem hasznosítják a glükózt, 2-keto-glükonátot, trehalózt és a mezo-inozitolt kizárólagos szénforrásként.

E diagnosztikai tulajdonságok összessége világosan elkülöníti a 19/26 számú *Pseudomonas* törzset a *P. aeruginosa, P. fluorescens, P. chlororaphis, P. aureofaciens, P. syringae, P. viridiflava, P. cichorii, P. stutzeri, P. mendocina, P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes* és *P. putida* fajoktól. A 19/26 törzs tenyésztése csak az élesztő extraktummal (0,2-1,0 %), kukorica-áztatófolyadékkal vagy más szerteágazó növekedési faktort tartalmazó komplex természetes táplálékkal elkészített táptalajon végezhető el.

E különleges diagnosztikai tulajdonságok alapján a 19/26 számú törzs egy olyan szervezetnek tekinthető, amely az úgynevezett "nem-jellegzetes *Pseudomonas* fajokhoz" tartozik. Az ilyen „nem-jellegzetes Pseudomonas fajok" a jövőben egy újonnan létrehozott bakteriális besorolásba tartozhatnak (N.J. Palleroni, „Pseudomonaceae", Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1, 141-219, szerkesztette: N.R. Krieg és J.G. Holt, Baltimore: Williams and Wilkins, 1984).

A 19/26 törzset 1996 július 16.-án NCAIM(P)B 001235 nyilvántartási számon helyeztük letétbe a Mezőgazdasági és Ipari Mikro-

organizmusok Nemzeti Gyűjteményénél (Budapest, Magyarország).

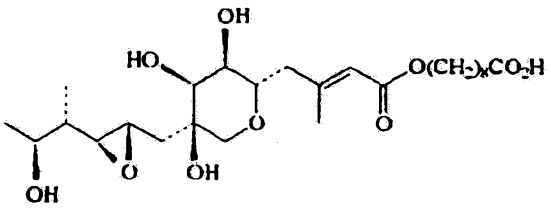
A találmány szerinti előnyös eljárás alapján az NCAIM(P)B 001235 nyilvántartási számon letétbe helyezett 19/26 számú *Pseudomonas* fajhoz tartozó baktérium törzset alkalmazzuk az alapjában véve tiszta pszeudomonsav A előállítására. A kiválasztott törzs nitrogén-forrásként peptont, marhahús-extraktumot, kukoricaáztató-folyadékot, élesztő extraktumot, kazeint és szójabablisztet használhat. A fenti nitrogén-források mellett szénforrások, például glükóz, glicerin és napraforgóolaj alkalmazható különböző kombinációkban.

Jóllehet a természetes eredetű táptalaj komponensek ásványi savakat tartalmaznak, előnyös néhány ásványi só (például ammónium, kálcium, vas, cink, réz, magnézium, mangán, nátrium vagy kálium-sók) adagolása is az alap táptalajhoz. Előnyös a magnézium-szulfát, mangán-diklorid, vas-szulfát, cink-klorid, réz(II)-szulfát, ammónium-szulfát, kálium-dihidrogén-foszfát, nátrium-klorid és kalcium-karbonát.

A törzs fenntartása pepton-kazein tartalmú 4°C-os ferde agar táptalajon végezhető, kéthetente frissen cserélve. A pszeudomonsav A termelékenység fenntartása érdekében a törzs a tenyészet gyorsfagyasztásával vagy liofilizált alakban tárolható.

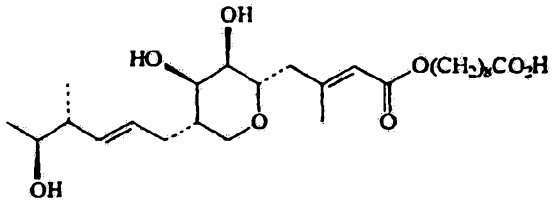
A fermentáció során a *Pseudomonas* fajhoz tartozó 19/26 számú törzset egy megfelelő táptalajba oltjuk, majd elárasztva és levegőztetett fermentációs körülmények között tenyésztjük. A táptalaj pH-ját előnyösen semleges értékre (7,0 körüli), a tenyésztés hőmérsékletét 20°C-30°C-ra, előnyösen 24°C-26°C-ra állítjuk be. A fermentációs körülményektől függően az antibiotikum terme-

lékenységének maximális értéke 50-60 óra után érhető el. A fermentáció során képződő pszeudomonsav-komplex alapjában véve tiszta pszeudomonsav A-t tartalmaz, jóllehet a bioszintézis eredményeként a (II) általános képletű pszeudomonsav B



(II)

és a (III) általános képletű pszeudomonsav C



(III)

kis mennyisége is képződik.

A pszeudomonsav antibiotikum komplex antibakteriális aktivitását agar-diffúziós mikrobiális eljárással határozzuk meg. A táptalaj egy marhahús-extraktumot, peptont, glükózt tartalmazó agar, amelynek a pH-ja 6,5 és a teszt organizmus a *Bacillus subtilis* ATCC 6633. A mikrobiológiai eljárással kapott aktivitás érték elsősorban a pszeudomonsav A mennyiségét jelzi, mivel a többi pszeudomonsav komponens mennyisége nagyon kicsi, és az A komponenshez képest a teszt mikroorganizmussal szembeni sajátos aktivitásuk, különösen a B komponens esetében jelentősen gyengébb.

A fermentáció során a pszeudomonsav A és a fermentlében lévő kisebb mennyiségű kísérő komponensek pontos mennyiségét nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) határozzuk meg, melynek során az etanollal kétszeresre hígított fermentlé ultrahang-

gal kezelt és centrifugált mintájának felülúszóját tanulmányozzuk (készülék: LKB 2248 pumpa, LKB 2141 UV detektor (222 nm-en használtuk), oszlop: Nucleosil C_8 10 µm (BST), eluens: acetonitril és 0,1 M $NH_4H_2PO_4$ oldat 35:65 arányú elegye(pH: 5,0), áramlási sebesség: 1,2 ml/perc, retenciós idők: pszeudomonsav A (PSA) 8,5 perc, pszeudomonsav B (PSB) 6,0 perc, és a pszeudomonsav C (PSC) 22,5 perc).

A *Pseudomonas* fajhoz tartozó 19/26 számú törzs által bioszintetizált pszeudomonsav antibiotikum komplex HPLC kromatogramja az 1. ábrán látható. A kromatogram azt mutatja, hogy a 19/26 számú törzs fermentációjával kapott pszeudomonsav-komplex alapjában véve tiszta pszeudomonsav A. A pszeudomonsav B és a pszeudomonsav C komponensek teljes mennyisége 5 % alatt van. Ezáltal nyilvánvalóvá válik, hogy a *Pseudomonas* fajhoz tartozó 19/26 számú törzs kedvezőbb összetételben képes bioszintetizálni az antibiotikumot, mint a korábban közreadott pszeudomonsav-komplexet termelő *Pseudomonas fluorescens* törzsek. Ez a tény előnyös az ipari termelés számára.

A találmány szerinti eljárást a következő példák segítségével mutatjuk be. Azonban a találmányt nem kívánjuk ezek korlátozásaként értelmezni.

PÉLDÁK

A *Pseudomonas* fajhoz tartozó 19/26 számú törzset PCA betűkkel jelzett ferde agar táptalajon tartottuk fenn. A PCA táptalaj összetétele a következő volt:

marhahús-extraktum	3 g
pepton	5 g
agar	15 g

1000 ml-ig desztillált vízzel felhígítva. A táptalaj pH-ja 7,0-7,2 között volt.

A beoltott ferde agart 25°C-on 24 órán át inkubáltuk, és a sejteket 5 ml normál sóoldatban szuszpendáltuk (a sejtszám a szuszpenzióban 10^9-10^{10}/ml). A kapott szuszpenzió 1 ml-ét oltottuk be 100 ml I-21-gyel jelölt 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban sterilizált oltótáptalajba. Az I-21-gyel jelölt táptalaj összetétele a következő volt:

Glükóz	10 g
Glicerin	5 g
Kukoricaáztató-folyadék	3 g
Ammónium-szulfát	2 g
Kálium-dihidrogén-foszfát	0,4 g
Magnézium-szulfát-víz (1:7)	0,4 g
Mangán-diklorid-víz (1:2)	0,03 g
Kalcium-karbonát	4 g
Napraforgóolaj	2 g

1000 ml-ig csapvízzel hígítva. A táptalaj pH-ját a sterilizálás előtt 7,0-re állítottuk be.

A beoltott táptalajt tartalmazó lombikot egy rázatólapon rázattuk (260 ford./perc, 10 cm-es amplitudó) 25°C-on 18-20 órán keresztül. Ezután a rázatott tenyészet 50 ml-ét (1%-os) egy 10 literes fermentor kádban lévő 5 liter, E-5-tel jelzett, 121°C-on 45 percig sterilizált táptalajba oltottuk be. Az E-5 táptalaj összetétele a következő volt:

Glükóz*	50 g
Glicerin	50 g
Szójababliszt	100 g

Kukoricaáztató-folyadék	15 g
Nátrium-klorid	25 g
Kalcium-karbonát	25 g
Napraforgóolaj	10 g

5 l-ig csapvízzel hígítva. (* A glükózt 50 %-os oldatban 0 percig sterilizáltuk, majd a táptalajba az oldóanyaggal együtt adagoltuk.) A táptalaj pH-ját 7,0-ra állítottuk be a sterilizálás előtt.

A tenyészetet 50-60 órán kevertettük és levegőztettük. A tenyészet hőmérséklete 25°C, a keverés sebessége 500 ford./perc, a levegőáram sebessége 200 l/óra volt. habzásgátló anyagként napraforgóolajat használtunk minimális mennyiségben (20-30 ml/fermentor).

A pszeudomonsav-komplex bioszintézise a fermentáció 8-10. órájában kezdődött és a maximális antibiotikum koncentrációt a tenyésztés 55-60 órájában tapasztaltuk.

A pszeudomonsav A izolálását a fermentléből a következők szerint hajtottuk végre: A fermentáció befejezése után a kapott 4,5 liter fermentlét centrifugáltuk, a felülúszó (4,06 liter) pH-ját 4,5-re állítottuk be híg (20 %-os) kénsavval). A megsavanyított folyadékot ezután kétszer extraháltuk 2,03 liter etil-acetáttal. A fázisokat elválasztottuk és egy éles sávot hoztunk létre az emulgeálható szerves fázisból centrifugálás segítségével. Az összekevert extraktumot vákuum alatt bepároltuk. A kapott nyersterméket (2,45 g) 25 ml kloroform-metanol-99,5 %-os ecetsav 93:5:2 arányú elegyében oldottuk fel, és a kapott oldatot 245 g Kieselgel 60-ból (részecskeméret 0,063-0,2 mm; Reanal) készített oszlopra (hosszúság:átmérő = 28,5) vittük fel a fenti

oldószer eleggyel. Az elució során 50 ml-es frakciókat gyűjtöttünk és a frakciók pszeudomonsav A tartalmát Kieselgel 60 adszorbenst (DC-Alufolien: 105554, Merck) és kloroform-metanol-99,5 % ecetsav (90:8:2) előhívó oldószer elegyet alkalmazva vékonyréteg-kromatográfiával vizsgáltuk. A Kieselgel 60 oszlopról eluált 34-50 frakciók tartalmaztak pszeudomonsav A-t. Ezeket a frakciókat összesítettük (850 ml), és ezalatt lehűtött 280 ml vizet adtunk a kapott oldathoz. Ezután az oldat pH-ját 4,5-re állítottuk be 1N vizes nátrium-hidroxid-oldattal. A szerves oldatot elválasztottuk a vizes fázistól, majd a vizes fázist 280 ml kloroformmal extraháltuk. Az összekevert extraktumot vákuum alatt bepároltuk, így tiszta pszeudomonsav A-t nyertünk.

A kisebb komponensek közül a pszeudomonsav C az azt tartalmazó 14-15 oszlopkromatográfiás frakciókból, míg a pszeudomonsav B az azt tartalmazó 54-es frakcióból nyerhető vissza tiszta alakban a fent leírt eljárás segítségével.

Az izolált pszeudomonsav komponensek spektroszkópiás jellemzését a fent bemutatott (I) szerkezeti képlet számozási rendszerét alkalmazva határoztuk meg.

A pszeudomonsav A spektroszkópiás jellemzése:

Ultraibolya spektrum (10 µg/ml, 95%-os etanol oldatban): λ_{max}=222 nm.

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

Infravörös spektrum (KBr): γ_{OH} 3483 és 3306, $\gamma_{C=O}$ 1728 ($COOCH_2$), 1720 (COOH) cm^{-1}.

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

δ (ppm), (integrál), multiplicitás	Csatolási állandó (Hz)	Jelölés

5,75 (1H)q	$^4J_{2.15}$=1,1	2-H
4,08 (2H)t	$^3J_{8'.9'}$=6,4	9'-H_2
3,72-3,93 (4H)m		5-H; 7-H; 13-H; 16-H_a
3,55 (1H)dd	$^2J_{16a.16b}$=11,8; $^3J_{16b.8}$=2,6	16-H_b
3,48 (1H)dd	$^3J_{5.6}$=8,4; $^3J_{6.7}$=3,2	6-H
2,82 (1H)td	$^3J_{9.10}$=6,3; $^3J_{10.11}$=2,3	10-H
2,74 (1H)dd	$^3J_{10.11}$=2,3; $^3J_{11.12}$=7,8	11-H
2,60 (1H)dd	$^3J_{4a.4b}$=14,5; $^3J_{4a.5}$=2,7	4-H_a
2,28-2,36 (3H)m		4-H_b; 2'-H_2
2,20 (3H)d	$^4J_{2.15}$=1,1	15-H_3
2,02 (1H)m		8-H
1,61-1,76 (6H)m		9-H_2; 3'-H_2; 8'-H_2
1,33-1,43 (9H)m		12-H; 4'-H_2; 5'-H_2; 6'-H_2; 7'-H_2
1,22 (3H)d	$^3J_{13.14}$=6,4	14-H_3
0,94 (3H)d	$^3J_{12.17}$=7,0	17-H_3

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

δ (ppm)	Jelölés	δ (ppm)	Jelölés
177,8s	C-1'	42,7t,d	C-9, C-12
166,9s	C-1	39,4d	C-8
156,0s	C-3	33,9t,t	C-9, C-2'
117,7d	C-2	31,6t	C-4'*
74,9d	C-5	28,9t	C-5'*
71,4d	C-13	28,8t	C-6'*
70,4d	C-7	28,5t	C-8'*
69,0d	C-6	25,9t	C-7'
65,3t	C-16	24,6t	C-3'

63,9t	C-9′	20,8q	C-14
61,3d	C-11	19,1q	C-15
55,6d	C-10	12,7g	C-17

* felcserélhető jelölések

Kémiai ionizációs (CI) tömegspektrum:

Jellemző spektrális adatok:

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

A pszeudomonsav B spektroszkópiás jellemzése:

Ultraibolya spektrum (10 µg/ml, 95%-os etanol oldatban): λ_{max}=222 nm.

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

Infravörös spektrum (film): γ_{OH} 3418, $\gamma_{C=O}$ 1713 ($COOCH_2$, COOH)cm^{-1}.

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

δ (ppm), (integrál), multiplicitás	Csatolási állandó (Hz)	Jelölés
5,68 (1H)s		2-H
4,02 (2H)t	$^3J_{8'.9'}$=6,6	9′-H_2
3,7 (2H)m		7-H; 13-H
3,55 (1H)td	$^3J_{4a,5}$=3$J_{5,6}$=9,3; $^3J_{4b.5}$=1,8	5-H
3,41 (2H)dd	$^2J_{16a.16b}$=11,0	16-H_2
3,24 (1H)dd	$^3J_{5.6}$=9,3; $^3J_{6.7}$=2,8	6-H
2,92 (1H)td	$^3J_{9.10}$=5,6; $^3J_{10.11}$=2,0	10-H
2,69 (1H)dd	$^3J_{10.11}$=2,0; $^3J_{11.12}$=7,2	11-H
2,62 (1H)dd	$^2J_{4a.4b}$=14,5; $^3J_{4a.5}$=1,9	4-H_a

2,20 (2H)t	$^3J_{2'.3'}$=7,4	2'-H_2
2,14 (3H)br.s		15-H_3
2,10 (1H)dd	$^2J_{4a.4b}$=14,5; $^3J_{4b.5}$=9,3	4-H_b
1,85 (1H)dd	$^2J_{9a.9b}$=14,3; $^3J_{9a.10}$=5,3	9-H_a
1,20-1,68 (14H)m		9-H_b; 12-H; 3'-H_2; 4'-H_2; 5'-H_2; 6'-H_2; 7'-H_2; 8'-H_2
1,14 (3H)d	$^3J_{13.14}$=6,4	14-H_3
0,88 (3H)d	$^3J_{12.17}$=7,1	17-H_3

Kémiai ionizációs (CI) tömegspektrum:

Jellemző spektrális adatok:

m/z	RI(%)	Jelölés
517	100	$(M+H)^+$
343	70	$(M+H-OH/CH_2/_8COOH)^+$

A pszeudomonsav C spektroszkópiás jellemzése:

Ultraibolya spektrum (10 µg/ml, 95%-os etanol oldatban): λ_{max}=222 nm.

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

Infravörös spektrum (film): γ_{OH} 3435, $\gamma_{C=O}$ 1713 ($COOCH_2$, COOH) cm^{-1}.

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

δ (ppm), (integrál), multiplicitás	Csatolási állandó (Hz)	Jelölés
5,69 (1H)s		2-H
5,25-5,50(2H)m		10-H; 11-H
4,00 (2H)t	$^3J_{8'.9'}$=6,5	9'-H_2
3,88 (1H)dd	$^3J_{6.7}$=3$J_{7.8}$=3,0	7-H
3,78 (1H)dd	$^2J_{16a.16b}$=11,8; $^3J_{16a.8}$=2,6	16-H_a
3,68 (1H)dd	$^3J_{4b.5}$=2,5; $^3J_{5.6}$=9,0	5-H

3,55 (1H)qd	$^3J_{12.13}=^3J_{13.14}=6,3$	13-H
3,49 (1H)dd	$^2J_{16a.16b}=11,8$; $^3J_{16b.8}=2,0$	$16\text{-}H_b$
3,41 (1H)dd	$^3J_{5.6}=9,0$; $^3J_{6.7}=3,0$	6-H
2,58 (1H)dd	$^2J_{4a.4b}=13,8$; $^3J_{4a.5}=2,5$	$4\text{-}H_a$
2,20 (2H)t	$^3J_{2'.3'}=7,4$	$2'\text{-}H_2$
2,00-2,30 (4H)m		$4\text{-}H_b$; $9\text{-}H_2$; 12-H
2,10 (3H)m		$15\text{-}H_3$
1,78 (1H)m		8-H
1,45-1,65 (4H)m		$3'\text{-}H_2$; $8'\text{-}H_2$
1,15-1,35 (8H)m		$4'\text{-}H_2$; $5'\text{-}H_2$; $6'\text{-}H_2$; $7'\text{-}H_2$
1,08 (3H)d	$^3J_{13.14}=6,3$	$14\text{-}H_3$
0,92 (3H)d	$^3J_{12.17}=6,8$	$17\text{-}H_3$

Kémiai ionizációs (CI) tömegspektrum:

Jellemző spektrális adatok:

m/z	RI(%)	Jelölés
485	30	$(M+H)^+$
287	60	$(M+H\text{-}OH/CH_2/_8COOH)^+$

Jóllehet a találmány bizonyos előnyös megvalósításait ismertettük a leírásban, szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmányhoz tartozónak kell tekinteni a találmány alapgondolatából és oltalmi körétől való eltérés nélkül végrehajtható változatokat és módosításokat is. Ennek megfelelően a találmány terjedelmét csak annyiban kívánjuk korlátozni, amennyiben a mellékelt igénypontok és a törvény által alkalmazható szabályok tükrében szükséges.

43121

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás pszeudomonsav A előállítására azzal jellemezve, hogy a következő lépésekből áll:

legalább egy nitrogén- vagy szénforrást tartalmazó táptalajon, elárasztott, levegőztetett körülmények között pszeudomonsav A bioszintézisére képes *Pseudomonas* baktériumtörzset tenyésztünk, és

fermentáljuk a *Pseudomonas* tenyészetett, hogy pszeudomonsav A képződjön;

ahol a *Pseudomonas* baktériumtörzs a NCAIM(P)B 001235 nyilvántartási számon a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél Budapest, Magyarország letétbe helyezett *Pseudomonas* fajhoz tartozó 19/26 számú baktériumtörzs.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Pseudomonas* baktériumtörzs a NCAIM(P)B 001235 nyilvántartási számon a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél Budapest, Magyarország letétbe helyezett *Pseudomonas* fajhoz tartozó 19/26 számú baktériumtörzs pszeudomonsav A-t termelő mutánsa vagy variánsa.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy további lépésként a pszeudomonsav A-t izoláljuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a legalább egy nitrogén- vagy szénforrást a glükóz, glicerin, napraforgóolaj, kazein, szójababliszt, pepton, marhahús extraktum, kukoricaáztató-folyadék és az élesztő extraktum közül választjuk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a

táptalaj legalább egy ásványi sót tartalmaz.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a legalább egy ásványi sót az ammónium-, kalcium-, vas-, cink-, réz-, magnézium-, mangán-, nátrium-, kálium-sók, és ezek keverékei közül választjuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a legalább egy ásványi sót az ammónium-szulfát, kalcium-karbonát, vas-szulfát, cink-klorid, réz(II)-szulfát, magnézium-szulfát, mangán-diklorid, nátrium-klorid és kálium-dihidrogén-foszfát, és ezek keverékei közül választjuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációt 20°C és 30°C között végezzük.

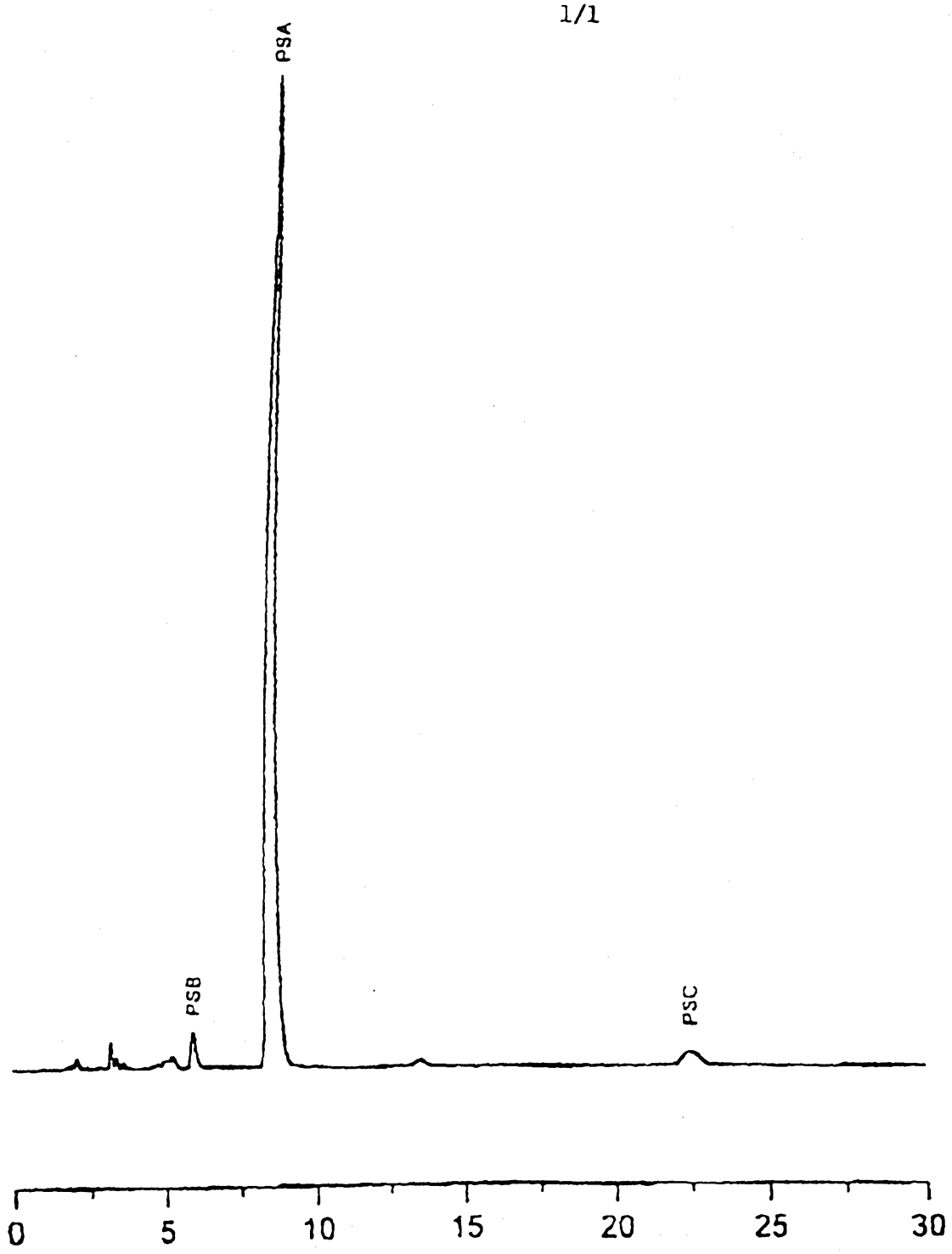
9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációt 24°C és 26°C között végezzük.

10. A pszeudomonsav A-t elárasztott, levegőztetett körülmények között bioszintetizálni képes *Pseudomonas* tenyészet, azzal jellemezve, hogy főként az NCAIM(P)B 001235 nyilvántartási számon a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél Budapest, Magyarország letétbe helyezett *Pseudomonas* fajhoz tartozó új, 19/26 számú baktériumtörzsből áll.

11. Az NCAIM(P)B 001235 nyilvántartási számon a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél Budapest, Magyarország letétbe helyezett *Pseudomonas* fajhoz tartozó 19/26 számú új baktériumtörzs biológiailag tiszta tenyészete.

A meghatalmazott:

Parragh Gáborné dr.
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099



Retenciós idő (perc)