SZENT ISTVÁN EGYETEM

MIKOFENOLSAV MIKROBIOLÓGIAI ELŐÁLLÍTÁSA, A TERMELŐ MIKROORGANIZMUS JELLEMZÉSE

Doktori értekezés

Kónya Attila

Gödöllő

2001

SZENT ISTVÁN EGYETEM

MIKOFENOLSAV MIKROBIOLÓGIAI ELŐÁLLÍTÁSA, A TERMELŐ MIKROORGANIZMUS JELLEMZÉSE

Doktori értekezés

Kónya Attila

Gödöllő

2001

A doktori iskola neve: Biológiai Doktori Iskola

tudományága: biológiatudomány

vezetője: Dr. Tuba Zoltán
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Növénytani és Növényélettani Tanszék

témavezető: Jekkel Antalné dr.
tudományos osztályvezető
Gyógyszerkutató Intézet Kft., Mikrobiológiai Osztály
Dr. Hornok László
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Mikrobiológiai Tanszék

....

Dr. Tuba Zoltán
a doktori iskola vezetője

Jekkel Antalné dr. és
Dr. Hornok László
témavezető

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS 1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 5
2.1. A mikofenolsav kutatásának története 5
2.2. A mikofenolsav bioszintézise 6
2.3. Mikofenolsav származékok 12
2.4. Szervátültetések, mikrobiológiai eredetű immunszuppresszív hatóanyagok 14
2.5. Szekunder metabolitok mikrobiológiai előállítása 18
2.6. Pulzáló gélelektroforézis módszer 24
3. ANYAG ÉS MÓDSZER 28
3.1. A gombatörzsek származása és leírása 28
3.2. Táptalajok és oldatok 28
3.3. Módszerek 33
4. EREDMÉNYEK 39
4.1. Mikofenolsav bioszintetizáló képességgel rendelkező mikroorganizmus törzs izolálása 39
4.2. A törzs mikofenolsav bioszintetizáló képességének fejlesztése 39
4.2.1. A törzs genetikai fejlesztése 40
4.2.2. A fermentációs körülmények optimalizálása 45
4.2.3. A számítógépes program leírása 47
4.2.4. A táptalajkomponensek koncentrációjának optimalizálása 48
4.3. Laboratóriumi fermentációk 53
4.4. Mikofenolsav származékok előállítása 58
4.5. A törzsek kariotipusának vizsgálata 60
4.6. Új tudományos eredmények 67
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 69
6. ÖSSZEFOGLALÁS 71
ABSTRACT 75
IRODALOMJEGYZÉK 79
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS 89

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BSA:	bovine albumin
CoA:	koenzim A
EDTA:	etiléndiamin tetraecetsav
FKPB:	FK-506 kötő fehérje
HMG-CoA:	hidroximetil-glutaril koenzim A
IMP:	inozin-monofoszfát
IMPDH:	inozin-monofoszfát dehidrogenáz
Mb:	megabázis
MES:	2-[N-Morfolino]etánszulfonsav
MNNG:	N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin
PMSF:	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PPG	polipropilén-glikol
RAPD:	random amplified polymorphic DNA
SAHC:	S-adenozil-homocisztein
SAM:	S-adenozil-metionin
SDS:	lauril-szulfát nátrium só
TRIS:	Tris[hidroximetil]aminometán

1. BEVEZETÉS

A penicillin felfedezése és gyógyászati alkalmazása megnyitotta a kaput a mikrobiológiai eredetű hatóanyagok kutatása számára. A penicillin felfedezését követően kezdődött kutatások során a legkülönbözőbb biológiai aktivitással rendelkező, mikrobiológiai eredetű hatóanyagokat izoláltak. 1992-ig mintegy 12000 antibiotikumot írtak le, melyek közül kb. 150-et alkalmaznak a humán terápiában (Neu 1992.). A mikrobiológiai eredetű hatóanyagok gyógyászati szempontokon kívül gazdasági szempontból is jelentősek. A mikroorganizmusok felhasználásával előállított antibiotikumok éves forgalma 30 milliárd dollár, ezen kívül a más farmakológiai aktivitással rendelkező hatóanyagok éves forgalma is eléri az 1 milliárd dollárt (Demain 2000). Az elmúlt évtizedek során bebizonyosodott, hogy a mikroorganizmusok a hasznos hatóanyagok kivételesen gazdag forrásai, és minden valószínűség szerint a további kutatások újabb mikrobiológiai eredetű gyógyszerek kifejlesztéséhez vezetnek.

A mikroorganizmusok által bioszintetizált hatóanyagoknak mind a kémiai szerkezete mind a biológiai aktivitása rendkívül változatos. Több mint 50 éve a természetes hatóanyagok kutatásának elsődleges célja gyógyszerek kifejlesztése humán betegségek kezeléséhez. Bár a legnagyobb sikereket az antibakteriális terápia területén érték el különböző antibiotikumokkal, mint például a penicillinek és cefalosporinok, a gombaellenes és daganatellenes terápiákhoz is izoláltak értékes hatóanyagokat. Az utóbbi években a screening programokat kiterjesztették más farmakológiai aktivitással rendelkező természetes eredetű hatóanyagok kutatásának irányába is. Ilyen területek például a koleszterinszint csökkentő vagy az immunrendszert befolyásoló hatóanyagok.

Az immunrendszerre ható anyagok közül az immunszuppresszív hatású anyagok kutatása a sikeres szervátültetések végzése szempontjából nélkülözhetetlen. Az első sikeres szervátültetést már a 20. század közepén elvégezték, azonban a szervátültetések elterjedését az immunszuppresszív hatású anyagok felfedezése tette lehetővé. A szervátültetésen átesett betegeknek életük végéig szedniük kell immunszuppresszív hatású gyógyszereket az átültetett szerv kilökődésének

megakadályozására. A ciklosporin A, az első mikrobiológiai eredetű, szelektív immunszuppresszív hatással rendelkező hatóanyag adott lendületet mind a szervátültetéseknek, mind az immunszuppresszív hatású anyagok kutatásának. A ciklosporin A felfedezése után több immunszuppresszív hatóanyagot izoláltak. Az egyik ilyen a gombák által bioszintetizált mikofenolsav, amelynek hatása a többi immunszuppresszív hatású anyaggal összehasonlítva egészen eltérő biokémiai mechanizmusokon alapul.

Értékes hatóanyagokat bioszintetizáló mikroorganizmusok izolálása céljából folytattunk screening programot, amelynek keretében izoláltunk egy mikofenolsavat bioszintetizáló gomba törzset. Osztályunkon korábban ipari eljárást dolgoztak ki az immunszuppresszív hatású ciklosporin A mikrobiológiai előállítására, ezért célul tűztük ki egy a mikofenolsav ipari előállítására alkalmas fermentációs eljárás kidolgozását az izolált gomba törzs felhasználásával.

A különböző mikrobiológiai eredetű hatóanyagok előállításán kívül a mikroorganizmusokkal végzett biotranszformációs eljárások is nagy múltra tekintenek vissza. Az első nagy sikereket szteroidok mikrobiológiai átalakításával érték el, majd később más hatóanyagok biokonverziójával is állítottak elő az eredeti vegyületeknél értékesebb hatóanyagokat. Az izolált hatóanyagok aktivitása ugyanis fokozható illetve káros mellékhatásai csökkenthetők a molekula kismértékű változtatásával, például hidroxilezéssel, metilálással. A változtatások végrehajthatók kémiailag és mikrobiológiai úton is. A screening programok ezirányú célja a molekula megfelelő átalakításához szükséges enzimrendszerrel rendelkező mikroorganizmusok izolálása. Megvizsgáltuk a mikofenolsav mikrobiológiai átalakításának lehetőségét, kedvezőbb farmakológiai tulajdonságokkal rendelkező származékok előállítása céljából. Ebből a célból screening programot indítottunk mikofenolsav biokonverziójára képes mikroorganizmusok izolálására.

A nyolcvanas években a mikroorganizmusok örökítő anyagának vizsgálatára kifejlesztettek egy újabb hatékony technikát, a pulzáló gélelektroforézist. A technika

felhasználásával agaróz gélben történő futtatással a gombák nagy méretű kromoszómái is elválaszthatók, így kimutathatók az egyes törzsek között meglevő különbségek, kromoszóma polimorfizmusok. Célul tűztük ki a pulzáló gélelektroforézis technika alkalmazásával a mikofenolsav termelő törzsünk elektroforetikus kariotipusának meghatározását. Vizsgálataink között szerepelt a talajmintából izolált és a törzsfejlesztés során előállított mutánsok elektroforetikus kariotipusában esetlegesen meglevő különbségek kimutatása. Összehasonlítottuk továbbá az általunk izolált illetve a szakirodalomban leírt mikofenolsavat bioszintetizáló törzsek elektroforetikus kariotipusát.

Kitűzött célok:

1. Ipari megvalósításra alkalmas mikrobiológiai eljárás kidolgozása mikofenolsav előállítására
    - A talajmintából izolált fonalas gomba törzs mikofenolsav bioszintetizáló képességének fejlesztése mutációs-szelekciós módszerekkel
    - A fermentációs táptalaj összetételének optimalizálása
    - A fermentációs körülmények optimalizálása rázatott lombikos körülmények között
    - A fermentációs körülmények optimalizálása laboratóriumi fermentorban

2. Mikofenolsav származékok előállítása mikrobiológiai úton
    - Screening program végzése mikofenolsav biokonverziójára alkalmas mikroorganizmusok izolálása céljából
    - A mikofenolsav biokonverziójával előállított termékek fermentléből történő elkülönítése, szerkezetük meghatározása
    - A mikofenolsav biokonverziójával előállított termékek biológiai aktivitásának vizsgálata

3. Kariotipus vizsgálatok
    - A mikofenolsav bioszintézisére képes gomba törzs kariotipusának meghatározása pulzáló gélelektroforézis technika alkalmazásával
    - Az eredeti törzs izolátum és a genetikai fejlesztése során izolált mutáns törzsek elektroforetikus kariotipusának összehasonlítása
    - Az általunk izolált illetve a szakirodalomban leírt mikofenolsav bioszintetizáló törzsek elektroforetikus kariotipusának összehasonlítása

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A mikofenolsav kutatásának története

A penicillin felfedezését követően az 1940-es években a mikrobiológiai eredetű antibiotikumok intenzív kutatása kezdődött. Az antibiotikumok kutatásának egy korai eredménye volt az a felfedezés, hogy a *Penicillium brevicompactum* gombafaj egyik törzse *Staphylococcus aureus* növekedését gátló hatóanyagot bioszintetizált (Wilkinson 1943). Az aktív hatóanyagot a vizsgálatokat követően egy már ismert molekulával, a mikofenolsavval azonosították (Florey 1946 és Abraham 1945), amelyet 1893-ban egy olasz orvos Bartolomeo Gosio fedezett fel (Gosio 1893 és Gosio 1896). Gosio azt tapasztalta, hogy az általa tisztított és kristályosított anyag gátolja az antrax baktérium növekedését. Ennek alapján írta Florey (1946), hogy a mikofenolsav az első gombák által bioszintetizált, kristályosított antibiotikum. Szerkezeti képletét 1952-ben határozták meg (Birkinshaw 1952).

A mikofenolsavnak számos biológiai aktivitását kimutatták. Felfedezését követően először antibakteriális hatását írták le, azonban az ezirányú kísérleteket abbahagyták, miután felfedezték, hogy *Staphylococcus aureus* törzsek gyorsan rezisztensé váltak mikofenolsavval szemben (Florey 1946 és Abraham 1945). Később, 1968-ban antifungális hatását is kimutatták. *Cryptococcus neoformans* és *Blastomyces dermatitidis* törzsek növekedését már kis koncentrációban is gátolja, míg *Candida albicans* és *Coccidiodes immitis* törzsek kevésbé voltak érzékenyek a mikofenolsavra (Williams 1968). Leírták antifungális hatását *Trichophyton* törzsekkel szemben is (Noto 1969). 1968-tól kezdődően az antifungális és az antibakteriális tulajdonságán kívül más biológiai aktivitását is leírták. Vírusellenes hatást figyeltek meg majom vese sejtvonalon *Herpes simplex*, kanyaró és New castle kór vírussal szemben, azonban nem tapasztaltak hatást egérben *Herpes simplex* és influenza vírussal szemben. Csirkékben a Rous sarcoma vírus fejlődését 94%-ban gátolták mikofenolsav orális alkalmazásával (Ando 1968). Az in vitro vírus ellenes hatást felfüggesztette guanin, guanozin, GMP vagy dezoxi-GMP adagolása (Williams 1968, Cline 1969). A mikofenolsav tumor növekedés

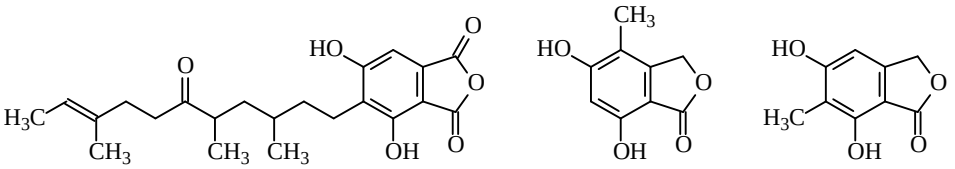
gátló hatását 1969-ben írták le, amit intenzív állatkísérletek követtek (Sweeney 1972a, 1972b). A mikofenolsav rákellenes hatásának kutatásában klinikai kísérleteket is végeztek, azonban betegeknél csak gyenge hatást tapasztaltak. Szintén folytattak klinikai vizsgálatokat psoriásis kezelésére orálisan alkalmazott mikofenolsavval, amelyekben kedvező eredményeket kaptak (Jones 1975, Marinari 1977, Spatz 1978).

Mitsui és Suzuki (1969) írta le, hogy a mikofenolsav egerekben csökkentette a birka eritrocitákkal szembeni immunválaszt, és felvetették egy esetleges humán immunszuppresszáns alkalmazás lehetőségét. 1982-ben Allison és Eugui a Syntex intézetében kutatási programot indított immunszuppresszánsok vizsgálatára (Allison 1993a, 1993b, 1996). Az akkoriban forgalomban levő immunszuppresszáns hatású gyógyszereknek (ciklofoszfamid, azatioprin, ciklosporin) mellékhatásai voltak, mint például a toxicitás vagy a megnövekedett érzékenység vírusos fertőzésekkel szemben. Allison és Eugui egy olyan immunszuppresszáns hatású hatóanyagot akartak kifejleszteni, amelyre a T és B limfociták érzékenyebbek, mint más sejttípusok. A figyelmük a mikofenolsavra irányult és azt tapasztalták, hogy erősen gátolja a humán limfociták mitogén stimulálásra adott válaszát (Eugui 1991). Kedvezőbb felszívódási tulajdonságokkal rendelkező mikofenolsav származékok keresése vezetett a mikofenolsav morfolinoetil-észteréhez, amelyet a Syntex gyógyszergyár 1995-ben forgalomba is hozott CellCept néven. 1995 és 1998 között több mint 50000 veseátültetésen átesett betegnél alkalmazták. Alkalmazták továbbá szív és máj átültetéseket követően, valamint rheumatoid arthritis kezelésében is.

2.2. A mikofenolsav bioszintézise

A felfedezése óta eltelt időben több a *Penicillium* genusba tartozó törzs fermentlevéből is izoláltak mikofenolsavat. Leírták *Penicillium glaucum* (Jones 1975), *P. brevicompactum* (Clutterbuck 1932), *P. stoloniferum* (Alsberg 1913), *P. echinulatum*, *P. roqueforti* (Lafont 1979) és *P. viridicatum* (Burton 1949) mikofenolsav bioszintetizáló képességét is.

Mikofenolsav bioszintézisét csak a *Penicillium* genuszba tartozó fajok esetén írták le, azonban mikofenolsavhoz hasonló szerkezetű anyagokat más fonalas gombák fermentlevéből is izoláltak (1. ábra).

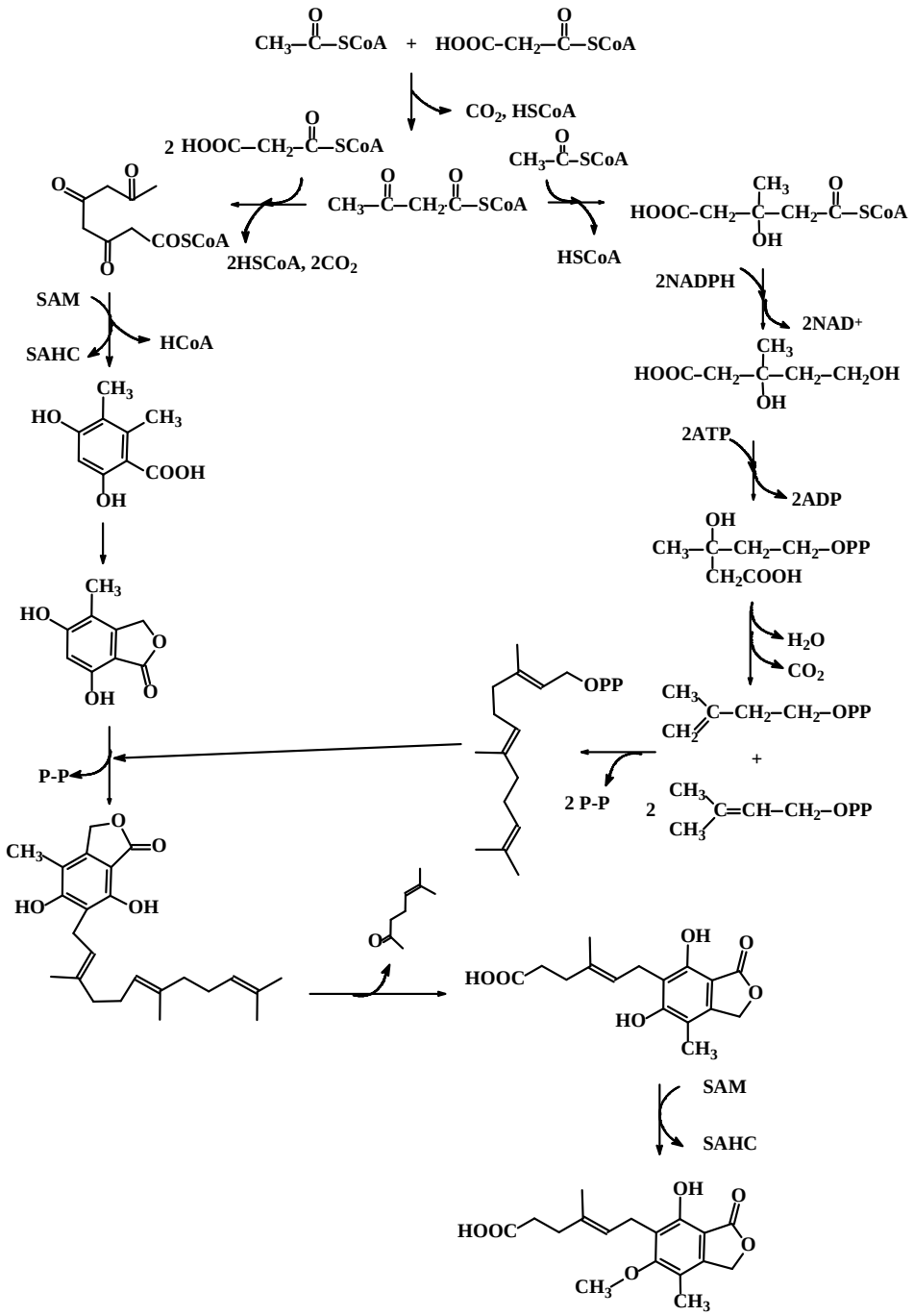


Memnoniella echinata Aspergillus flavus Alectoria nigricans

1. ábra. Mikofenolsavhoz hasonló szerkezetű anyagok és a bioszintetizáló mikroorganizmusok (Hinkley 1999, Bently 2000)

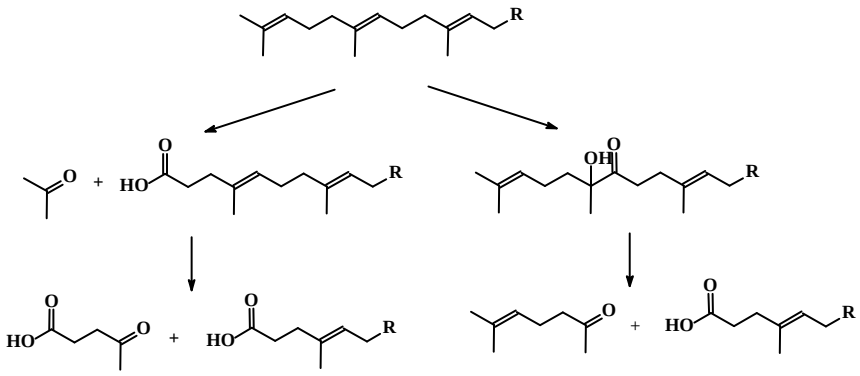
A mikofenolsav bioszintézisét *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* törzs felhasználásával vizsgálták behatóan. A mikofenolsav bioszintézise atipikus az antibiotikumok között. Míg sok szekunder metabolit a növekedés befejeződése után az idiofázisban képződik, addig a mikofenolsav bioszintézise a növekedéssel párhuzamosan történik (Nulton 1978).

A mikofenolsav bioszintézis útjának felderítéséhez először radioaktív kísérleteket végeztek. Különböző radioaktívan jelölt, feltételezett prekurzorokat adagoltak *Penicillium brevicompactum* törzs tenyészetéhez, majd megvizsgálták a képződött mikofenolsav radioaktivitását. Ezekből az eredményekből vontak le következtetéseket arra vonatkozóan, hogy a feltételezett, adagolt prekurzor belépett-e a mikofenolsav bioszintézis útba vagy sem (Canonica 1970, Canonica 1971, Canonica 1972, Money 1971, Bedford 1973, Bowen 1977, Birch 1958a, Birch 1958b). A kísérletekben kapott eredményeket később kiegészítették egyes bioszintézis intermediereknek a tenyészetből történő izolálásával és szerkezetazonosításával (Nulton 1976). Az eredményekből állították össze a mikofenolsav bioszintézisének feltételezett útját. A szekunder metabolitok bioszintéziséért felelős két fő útvonal, a poliketid és az izoprenoid szintézis út is szerepet játszik a mikofenolsav képződésében (2. ábra).



2. ábra. A mikofenolsav bioszintézise

A mikofenolsav molekula aromás magja a poliketid szintézis úton, míg a héttagú oldallánc az izoprenoid szintézis úton képződik. A bioszintézis során két metilcsoport S-adenozil-metionin felhasználásával épül be a molekulába (Muth 1975, Bentley 2000). Egy tipikus acetát-polimalonát kondenzáció, metilálás és ciklizálódás vezet az aromás 5-metil-orsellinsav szerkezet kialakulásához. A lakton-képződést követi a farnezil-oldallánc beépülése a molekulába. A farnezil-láncból a 3. ábrán látható két lehetséges úton alakulhat ki a mikofenolsav molekula 7 tagú oldallánca.



3. ábra. A farnezil-oldallánc rövidülésének két feltételezett útvonala

Az egyik elképzelés szerint a farnezil-oldallánc a két kettős kötésnél oxidatív úton elhasad és aceton valamint levulinsav felszabadulásával alakul ki a végleges oldallánc. Ezt erősíti meg az a tény, hogy az aceton és a levulinsav jelenlétét is kimutatták *Penicillium brevicompactum* tenyészetében (Nulton 1978). A farnezil-oldalláncból az aceton felszabadulása után maradó 12 tagú oldallánccal rendelkező mikofenolsav bioszintézis intermediert is izolálták a fermentléből (Colombo 1982).

A másik elképzelés szerint a farnezil-oldallánc a középső kettős kötésnél egy direkt oxidációval hasad. Az elképzelés alapja, hogy a hidroxil-csoportot tartalmazó intermedier mikofenolsavvá alakul a tenyészetben izotópos nyomkövetési kísérletek alapján. Az elképzelés hiányossága, hogy a hidroxiketon-intermediert és a lehasadó

láncot a tenyészetből nem sikerült izolálni, ami esetleg magyarázható ezen molekulák gyors továbbalakulásával (Nulton 1978).

A bioszintézis út befejező lépése a hidroximetil-csoport kialakulása, amelybe a metil-csoport S-adenozil-metioninból épül be.

Bartman és munkatársai szilárd agar táptalajon vizsgálták a mikofenolsav bioszintézisét. Megállapították, hogy a tenyészetben a légmicélium megjelenésével egyidőben kezdődött a mikofenolsav bioszintézise. Amikor a törzset két dialízis membrán között növesztették, sem légmicélium sem mikofenolsav nem képződött a tenyészetben. Ha erről a tenyészetről eltávolították a felső membránt mind a légmicélium mind a mikofenolsav képződés megindult. A tenyészetet megvizsgálva azt tapasztalták, hogy a mikofenolsav nagy része a légmicéliumban van jelen. Megállapították, hogy szilárd tenyészetben a légmicélium képzés és a mikofenolsav bioszintézise között összefüggés lehet (Bartman 1981, Bird 1982).

Engel és munkatársai különböző, a tejipar által használt *Penicillium roqueforti* törzsek mikofenolsav termelő képességét vizsgálták. 80 megvizsgált *P. roqueforti* törzs közül 19 mikofenolsav termelő képességét tudták bizonyítani (Engel 1982). Shimada és mtsai. (2000) hasonló vizsgálatok alapján különböző sajtokról izolált 37 *P. roqueforti* törzs közül 16 törzs mikofenolsav bioszintetizáló képességét igazolták.

Boysen és mtsai. (1996) *Penicillium roqueforti* fajcsoportba tartozó törzseket rendszereztek RAPD technika és szekunder metabolit termelő képességük alapján. Eredményeik alapján a *P. roqueforti* fajt három fajba (*P. roqueforti, P. carneum, P. paneum*) különítették el. Közülük mikofenolsavat egyedül a *P. carneum* fajba sorolt törzsek bioszintetizáltak.

Ozaki és munkatársai *Penicillium brevicompactum ATCC 16024* törzsből különböző aminósav auxotróf és antibiotikum rezisztens mutánsokat állítottak elő, hogy nagyobb mikofenolsav bioszintetizáló képességgel rendelkező törzseket kapjanak. Legkedvezőbb eredményeket clofibrate, cerulenin és monofluoroecetsav rezisztens törzsekkel kaptak. A clofibrate és a cerulenin a hidroxi-metil-glutaril(HMG)-koenzim A reduktáz és HMG-CoA szintáz enzimek inhibitorai. Ez a két enzim szerepet játszik a szterinek bioszintézisében, amellyel a farnezil-koenzim A kialakulásáig a mikofenolsav

héttagú oldalláncának bioszintézise is megegyezik. Feltételezik, hogy a rezisztencia kialakulásában a két enzim mennyiségének növekedése játszik szerepet, ami a mikofenolsav képződés szempontjából is kedvező. A monofluoroecetsav az akonitáz enzimet gátolja monofluorocitrát képződése miatt. Feltételezhető, hogy a monofluoroecetsav rezisztens mutánsban megemelkedett a citrát ciklus aktivitása. Ennek következtében megemelkedett a sejtekben az ATP koncentrációja, ami magasabb mikofenolsav bioszintetizáló képességhez vezetett. Különböző aminósavakat adagolva a tenyészetekhez megállapították, hogy a metionin 0,5% koncentrációban a mikofenolsav termelést 40%-al csökkentette. Ezért előállítottak egy metionin auxotróf törzset, amely 0,1% metionin jelenlétében kétszer annyi mikofenolsavat termelt, mint a kiindulási törzs. Előállítottak glutamin auxotróf mutánsokat is, amelyek közül néhány törzs szintén magasabb koncentrációban termelt mikofenolsavat, mint a kiindulási törzs (Ozaki 1987).

Muth és munkatársai a mikofenolsav bioszintézis utolsó lépését, a hidroximetil-csoport kialakulását vizsgálták. A metilcsoport beépüléséért felelős S-adenozilmetionin:demetilmikofenolsav O-metiltranszferáz enzimet tisztították és jellemezték. Az enzim aktivitása szempontjából a legkedvezőbb a 27-28°C-os hőmérséklet. Az enzim működését gátolta a Mg^{2+}-ion és az etanol. Az enzimet kompetitív módon gátolta a reakció két végterméke az S-adenozil-homocisztein és a mikofenolsav. Az enzim aktivitása a fermentáció elején, mintegy 20 órás korban a legmagasabb, majd a tenyésztés 45. órájára az aktivitás lecsökken a maximum 10-20%-ára. A szerzők szerint az aktivitás csökkenéséért nem a felhalmozódó mikofenolsav felelős (Muth 1975).

Detroy és munkatársai *Penicillium stoloniferum* és *P. brevicompactum* törzsek mikofenolsav termelő képessége illetve a törzsekből izolálható mikovírusok közötti összefüggést vizsgálták. Mikofenolsav bioszintézisére képes törzsekből nem tudtak vírusszerű képleteket izolálni, míg a mikofenolsav bioszintézisére nem képes törzsek vírusszerű képleteket tartalmaztak. A mikofenolsavat nem termelő törzsek tenyészetéhez adagolt mikofenolsav csökkentette a tenyészetből izolálható vírusszerű képletek mennyiségét. A kísérletek alapján azt a következtetést vonták le, hogy a sejtekben a mikofenolsav visszaszorítja a vírusszerű képletek jelenlétét (Detroy 1973).

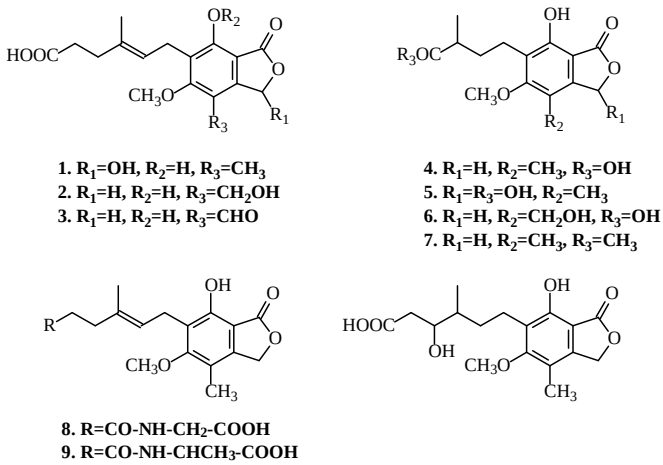
2.3. Mikofenolsav származékok

Egyes hatóanyagok aktivitása növelhető illetve toxicitása csökkenthető különböző származékaik (pl. hidroxilezés, metilálás, glükozilálás) előállításával. Különböző származékok előállíthatók szintetikus kémiai és mikrobiológiai úton is. A hatóanyagokból előnyösebb hatású származékok mikrobiológiai úton történő előállítására számos példa található a szakirodalomban. A *Penicillium* genusba tartozó törzsek által bioszintetizált kompaktin a koleszterin bioszintézisben szerepet játszó HMG-CoA reduktáz enzim inhibitora, azonban toxicitása miatt nem került forgalomba. Hidroxilezett származékát a pravasztatint kompaktinnal kezelt kutyák vizeletéből izolálták. Miután bebizonyosodott a kompaktinnál előnyösebb tulajdonsága, mikrobiológiai úton is előállították (Serizawa 1983).

A Merck gyógyszergyár kutatói az immunszuppresszív hatású FK-506-ból mikrobiológiai úton állítottak elő különböző demetilezett származékokat. Ezen származékok közül egyesek az FK-506-nál nagyobb aktivitással rendelkeznek (Chen 1992).

Osztályunkon korábban a HMG-CoA reduktáz inhibitor mevinolinból állítottunk elő származékokat mikrobiológiai úton. *Absidia coerulea* törzs felhasználásával két származékot állítottunk elő. Az egyik származékban a mevinolin oldallánca hiányzott és egyúttal egy hidroxilezés is bekövetkezett. A másik anyag a mevinolin dihidroxi-származéka volt. A két hatóanyag HMG-CoA reduktáz enzim gátló aktivitását megvizsgáltuk, amely hasonlónak bizonyult a mevinolinéhoz (Jekkel 1997).

Mikofenolsav különböző származékait izolálták a bioszintetizáló mikroorganizmusok fermentlevéből valamint előállították szintetikus úton és biokonverzióval is. A mikofenolsav származékainak mind mikrobiológiai mind kémiai úton történő előállításával foglalkozott Jones (1970).



4. ábra. Jones által előállított mikofenolsav származékok

Több mint 500 mikroorganizmust vizsgáltak meg, amelyek közül 21 mikroorganizmus rendelkezett mikofenolsav biokonverziós képességgel. A 21 mikroorganizmus között baktériumok (pl. *Bracleococcus cinnabarinus*) és sugárgombák (pl. *Streptomyces* fajok) is voltak, legnagyobb számban azonban gombák fordultak elő. Többek között *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus carbonarius*, *Mucor rammanianus* és *Hypomyces rosellus* törzsekkel sikerült mikofenolsav származékokat előállítaniuk. Az előállított származékok közül látható néhány a 4. ábrán. Jones és munkatársai a származékokat előállították, azonban biológiai aktivitásukat nem vizsgálták.

Nelson és munkatársai (1990) kutatásokat indítottak a mikofenolsavnál nagyobb aktivitással rendelkező analógok előállítására. 12 származéknak, amelyek az oldalláncban különböztek egymástól, megvizsgálták a mitogén indukálta humán limfocita proliferáció gátló hatását valamint az analógok közül tizenegynek az inozin-monofoszfát-dehidrogenáz gátló hatását is. A publikáció szerint biztató eredményeket kaptak, amelyek alapján tovább folytatják a különböző oldallánccal rendelkező analógok kutatását.

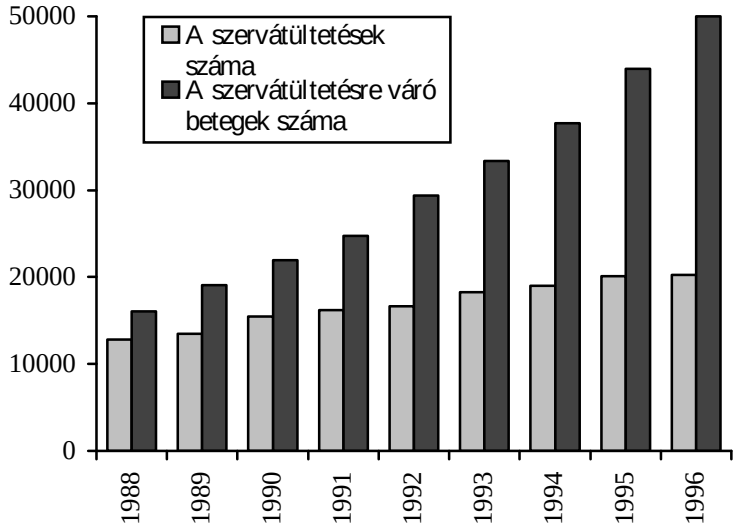
1996-ban Nelson munkatársaival újabb származékokat állított elő. Ezúttal a mikofenolsav aromás magját változtatták és az analógoknak a rekombináns inozin-

monofoszfát-dehidrogenáz gátló valamint mitogén indukálta humán limfocita proliferáció gátló hatását vizsgálták meg. Eredményeik alapján a lakton-gyűrű és a molekula aromás magján található metil-csoport esszenciális az aktivitáshoz. Egy származék, amelyben az aromás magon található hidroximetil-csoportot etil-csoportra cserélték le, a mikofenolsavhoz képest kétszer-háromszor aktívabbnak bizonyult in vivo és in vitro vizsgálatokban is.

Allison és Eugui 1982-ben immunszuppresszáns hatású anyagok vizsgálatára indítottak kutatási programot. Mikofenolsav származékok vizsgálata során szintetikus úton állították elő a morfolinoetil-észter származékot, amelynek orális adagolás esetén kedvezőbb volt a szervezetben a hasznosulása. A morfolinoetil-észter származék forgalomba hozatalát 1995-ben engedélyezték az Amerikai Egyesült Államokban CellCept® néven.

2.4. Szervátültetések, mikrobiológiai eredetű immunszuppresszív hatóanyagok

A szervátültetések története a 18. századra nyúlik vissza, amikor is az első komolyabb kísérleteket végezték mind állatokon mind embereken. Az évek során elvégzett kísérletek eredményeként a 20. század közepére lehetővé vált sikeres szervátültetések végrehajtása. Az első sikeres veseátültetést 1954-ben végezték az Egyesült Államokban. Napjainkra a vese, máj, szív, hasnyálmirigy és tüdőátültetések az orvosi beavatkozások elfogadott részévé váltak. A nagyobb számú szervátültetés elvégzését és a hosszabb túlélési időt az immunszuppresszív hatású anyagok felfedezése tette lehetővé, amelyeket a szervátültetésen átesett betegeknek életük végéig kell szedniük a beültetett szerv kilökődésének megakadályozására. Az Amerikai Egyesült Államokban elvégzett szervátültetések számának 1988 és 1996 közötti változása látható az 5. ábrán. A szervátültetések számának nagyobb mértékű emelkedését egyelőre a rendelkezésre álló donorok száma korlátozza. Ha megoldódik az átültethető szervek mennyiségének növelése, a szervátültetések újabb lendületet kapnak, és az immunszuppresszív hatású gyógyszerekre is még nagyobb igény lesz.

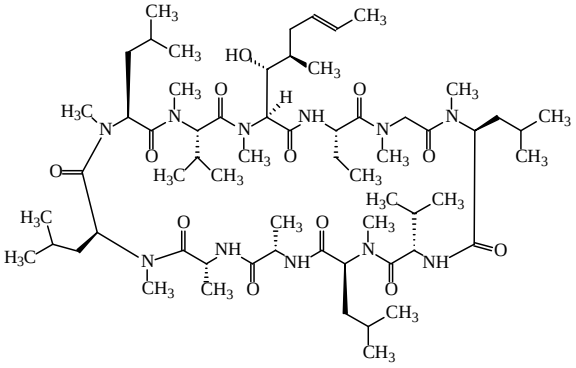


5. ábra. Szervátültetések száma az Amerikai Egyesült Államokban

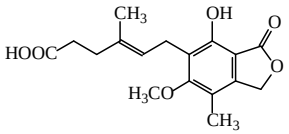
A hatékony screening programok felhasználásával több immunszuppresszív hatású mikrobiális eredetű hatóanyagot is leírtak. Az első szelektív, az immunreakciót csökkentő hatóanyagot, a ciklosporin A-t 1970-ben izolálták mint gyenge antifungális vegyületet (Borel 1976). Immunszuppresszív hatását 1972-ben írták le, majd a vizsgálatokat követően 1983-ban engedélyezték a forgalomba hozatalát az Egyesült Államokban. A kutatásokat továbbra is folytatták a kevesebb mellékhatással rendelkező, szelektívebb hatású immunszuppresszáns anyagokat bioszintetizáló mikroorganizmusok izolálása céljából. Ennek eredményeként izolálták *Streptomyces* fajok fermentlevéből az FK-506-ot (Kino 1987a, 1987b) és a rapamycint (Vezina 1975) (6. ábra).

A ciklikus oligopeptid ciklosporin A elsősorban a T sejtekre hat. A hidrofób jellegű molekula átdiffundál a sejtmembránon a citoplazmába és a cis-trans peptidil-prolil izomerázhoz, a ciklofilin fehérjéhez kötődik (Handschumacher 1984). A ciklosporin-ciklofilin komplex a kalcineurinhoz kötődik és gátolja annak foszfatáz aktivitását. Gátolja limfocitákban bizonyos citokinek (pl. interleukin-2, interleukin-3) képződését (Shevach 1985). A makrociklusos lakton FK-506 hatása hasonlít a

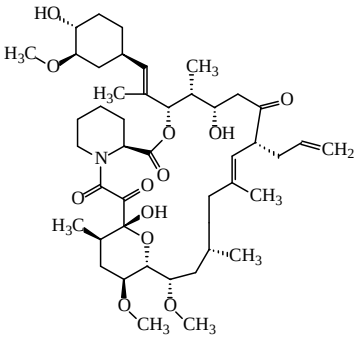
ciklosporinéra, szintén a kalcineurin aktivitását gátolja (Kino 1993). Aktivitását azonban a szintén cis-trans peptidil prolil aktivitással rendelkező FKBP-12 (FK-506 kötő fehérje) fehérjéhez kapcsolódva fejti ki (Ochiai 1987). Az FK-506-hoz hasonló szerkezetű rapamycin a hatását szintén az FKBP-12 fehérjéhez való kötődés útján fejti ki (Sabatini 1994).



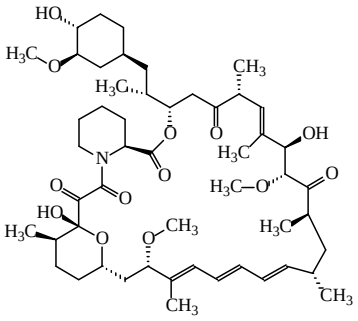
Ciklosporin



Mikofenolsav



FK-506



Rapamycin

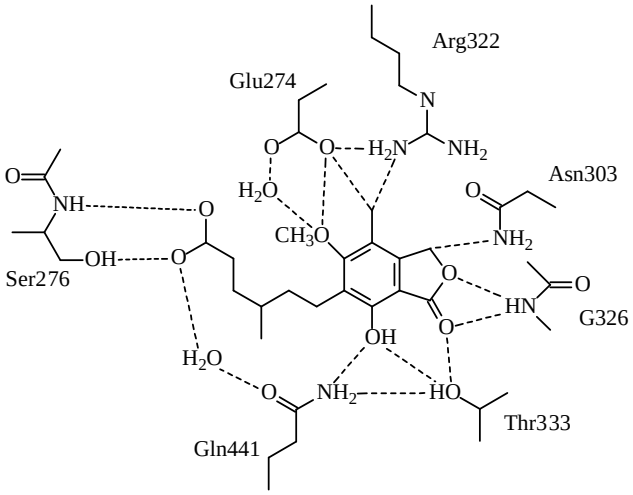
6. ábra. Mikrobiológiai eredetű immunszuppresszív hatóanyagok

Az átültetett szerv kilökődését okozó immunválasz csökkenthető a limfociták proliferációjának gátlásával is. A proliferáció DNS szintézist igényel, ezért hatásosan

gátolható a purin nukleozid monofoszfátok bioszintézisének gátlásával. Purin monofoszfátok két úton képződhetnek. Az egyik de novo bioszintézis, melynek során egyszerű metabolitokból a kulcs intermedier inozin-5'-monofoszfát (IMP) képződik, majd ez alakul tovább adenozin-5'-monofoszfáttá (AMP) és guanozin-5'-monofoszfáttá (GMP). Az IMP-ból az inozin-monofoszfát dehidrogenáz katalizálta lépésben xantozin-5'-monofoszfát képződik, majd ebből a következő lépésben guanozin-5'-monofoszfát. A másik lehetséges útvonalon a katabolikus folyamatok során felszabaduló purin bázisok 5-foszfo-α-D-ribofuranozil-difoszfát felhasználásával nukleozid-monofoszfáttá alakulnak. Ezt a folyamatot a guanin foszfo-ribozil transzferáz enzim katalizálja. A limfocitákból a purin-monofoszfátok második bioszintézis útja hiányzik, ezért proliferációjuk a de novo bioszintézistől függ, így a de novo GMP bioszintézis gátlása hatékonyan gátolhatja az immunválaszt.

A mikofenolsav vizsgálata során már korán felfigyeltek arra, hogy a vírusellenes hatása felfüggeszthető guanin, guanozin vagy GMP adagolásával (Williams 1968), ezért feltételezték, hogy a mikofenolsav a guanozin metabolizmusára hat. A további vizsgálatok alapján megállapították, hogy a mikofenolsav az inozin-monofoszfát dehidrogenáz enzim (IMPDH) inhibitora (Franklin 1970). Az IMPDH gátlásával csökken a XMP, a GMP és más guanin származékok koncentrációja, ezért a DNS szintézis is csökken a de novo purin-monofoszfát bioszintézistől függő sejtekben, pl. a limfocitákban. Mikofenolsav tehát a limfocitákban gátolja a DNS szintézist és ezzel együtt a proliferációjukat, ami immunszuppresszív hatáshoz vezet.

Megvizsgálták a mikofenolsav és az IMPDH enzim kapcsolatát. Az enzim kötődési hellyel rendelkezik az IMP és a működéséhez szükséges NAD részére. A mikofenolsav az IMP kapcsolódása során kialakuló XMP-Enzim intermedier NAD kötő helyéhez kapcsolódik (7. ábra).



7. ábra. Mikofenolsav és az IMPDH enzim kapcsolata

A mikofenolsav fenolos hidroxil-csoportja hidrogénkötést létesít az enzim thr333 és gln441 aminósavjaival, amely aminósavakat normális körülmények között a reakcióban szerepet játszó vízmolekula stabilizál. A mikofenolsav molekula többi része a NAD nikotinamid részének kötéséért felelős helyre esik (Sintchak 1996).

2.5. Szekunder metabolitok mikrobiológiai előállítása

Egy bizonyos biológiai aktivitással rendelkező hatóanyag mikrobiológiai előállítására alkalmas eljárás kidolgozásának első lépése a bioszintézisre képes mikroorganizmus törzs kiválasztása. Ehhez egy megfelelő screening programot kell kidolgozni, amely alkalmas az aktivitással rendelkező anyag detektálására. A rendszernek egyszerre kell érzékenynek és szelektívnek lennie, mivel a mikroorganizmusok tenyészetei különböző primer és szekunder metabolitok különösen összetett keverékei, amelyekben a metabolitok koncentrációja a nanogram per milliliter és a miligram per milliliter nagyságrendek között változhat. Ebből is látható, hogy a természetes eredetű hatóanyagok utáni kutatás nagymértékben különbözik a szintetikus

kémiai screen programoktól, ahol rendszerint egyszerre egy hatóanyag van jelen a vizsgálatokban.

A mikroorganizmusok folyékony vagy szilárd táptalajon növeszthetők az általuk termelt hatóanyagok vizsgálatához. Mivel a mikroorganizmusok különböző hatóanyagokat termelhetnek folyékony és szilárd közegben és a hatóanyagok ipari méretű előállítása süllyesztett tenyészetben történik, ezért a screening programokban a mikroorganizmusokat célszerű süllyesztett körülmények között tenyészteni.

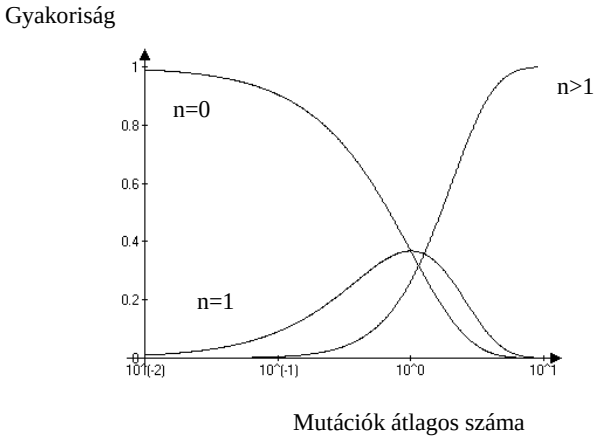
A screening tesztek alapulhatnak (i) állatokon, (ii) sejteken és (iii) szubcelluláris preparátumokon végzett vizsgálatokon is. A legtöbb információt az állatokon végzett in vivo tesztek szolgáltatnák, azonban ezzel a módszerrel csak kevés számú mintát lehet megvizsgálni nagy költséggel. A legtöbb screening program tehát sejteket vagy szubcelluláris preparátumokat alkalmazó teszteket tartalmaz (White 1982). A baktérium ellenes és gomba ellenes tesztek könnyen kivitelezhetők, azonban a különböző farmakológiai aktivitással rendelkező hatóanyagok vizsgálata már bonyolultabb. Gomba ellenes tesztek alkalmazásával azonban egyéb farmakológiai aktivitású hatóanyagok is izolálhatók. Több mikrobiológiai eredetű hatóanyagot először mint antifungális hatású metabolitot fedeztek fel. A *Penicillium* fajok által termelt koleszterinszint csökkentő kompaktint először antifungális hatóanyagként írták le (Brown 1976). Szintén antifungális tulajdonsága alapján izolálták először a ciklosporin A-t, amely később immunszuppresszáns aktivitása alapján nyert gyógyászati alkalmazást (Borel 1976). A keresett hatóanyagra érzékeny gomba törzs alkalmazásával alacsony költséggel lehet nagy számú mikrobiológiai eredetű mintát megvizsgálni, majd az antifungális aktivitású minták a költségesebb tesztekben vizsgálhatók tovább. A megfelelő tesztek beállítása után különböző élőhelyekről származó mintákból izolált több ezer mikroorganizmus megvizsgálása szükséges az értékes hatóanyagot bioszintetizáló törzs megtalálásához.

Az izolált mikroorganizmus legtöbbször nagyon alacsony koncentrációban állítja elő a hatóanyagot, ezért a termelésre alkalmas eljárás kidolgozása során fontos lépés az izolált törzs genetikai fejlesztése. Egyre több, a szekunder metabolitok bioszintézisében részt vevő gént azonosítanak és izolálnak, azonban az ipari eljárások kifejlesztésénél nem nélkülözhető a random mutagenezis. Ennek egyik oka, hogy az

antibiotikumok bioszintézisében sok gén játszik szerepet, amelyek szerkezetéről, szerepéről, szabályozásáról a legtöbb esetben keveset tudnak. A primer metabolikus útvonalakban szerepet játszó enzimek, amelyek prekurzorokkal, kofaktorokkal látják el a szekunder metabolikus útvonalakat, szintén bonyolítják a helyzetet. Ezen folyamatok részletes ismeretének hiányában egy eljárás kidolgozása nem nélkülözheti a random mutagenezissel történő termelő képesség fejlesztést. A módszer a következő folyamatok ismételt alkalmazásán alapul: (i) a mikroorganizmus sejt populációjában genetikai variabilitás indukálása, (ii) a populációból sok egyedi mutáns levizsgálása kis térfogatú fermentációkban, (iii) a hatóanyag koncentrációjának meghatározása a tenyészetekben a fejlesztett törzs azonosításához. Mindegyik fejlesztett törzs a továbbiakban kiindulási törzsként vehet részt egy újabb mutáció indukálás, fermentáció, analizálás ciklusban. Az eljárást először Thom (1939) írta le az irodalomban, amelyet azután különböző laboratóriumokban fejlesztettek tovább. Többek között ezen módszer alkalmazásával *Penicillium chrysogenum* penicillin termelését a kiindulási 0.06 mg/ml szintről 26 mg/ml szintre növelték. A mikroorganizmus törzs sejt populációjának genetikai variabilitása növelhető random mutagenezis alkalmazásával, melyhez különböző fizikai és kémiai mutagének állnak rendelkezésre. Fizikai mutagénként radioaktív és ultraibolya sugárzás alkalmazható. Kémiai mutagénként számos vegyület bevált a gyakorlatban, de legelterjedtebb a hidroxilamin, metil-metánszulfonát, etil-metánszulfonát és az N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin. Az alkalmazott mutagén dózisának megválasztásától nagymértékben függ a törzsfejlesztés hatékonysága. A szekunder metabolitok bioszintézisét befolyásoló mutációk hatása általában kedvezőtlen, különösen a magas termelő képességgel rendelkező törzsek esetében. Ezért a mutagén kezelés során alkalmazott dózist úgy kell megválasztani, hogy az egy mutációt hordozó törzsek aránya maximális legyen, mivel egy másodlagos mutáció nagy valószínűséggel kedvezőtlen hatással lenne a bioszintézisre. A mutagén kezelést követően a populációban a mutációk számának eloszlását a Poisson egyenlet írja le:

$$P = \frac{m^x e^{-m}}{x!}$$

ahol P az x mutációt hordozó sejtek aránya sejtenként átlagosan m mutáció esetén.



8. ábra. Mutációk eloszlása a populációban

Az egyenlet grafikus ábrázolásából (8. ábra) kitűnik, hogy akkor optimális a mutagenezis, vagyis maximális az egy mutációt hordozó sejtek aránya (n=1), amikor a mutációk átlagos száma 1 és a mutációt nem hordozó sejtek (n=0) aránya 37%. Ekkor az egy mutációt hordozó sejtek aránya szintén 37%. A mutációk átlagos számának mérése azon a megfigyelésen alapul, hogy az antibiotikum bioszintézisre hatással levő legtöbb mutáció csökkenti a termelő képességet. Ezért a mutációt nem hordozó törzsek (P_0) a kontrollal megegyező mennyiségű antibiotikumot termelnek, míg a mutációt hordozó törzsek ennél kevesebbet bioszintetizálnak (a kontrollnál több antibiotikumot termelő törzsek aránya nagyon alacsony). Ezek alapján a mutációk számának gyakorisága (m) akkor egy, ha a mutagén kezelést túlélő törzsek között a kontrollal megegyező mennyiségű antibiotikumot termelők aránya 37%. A mutációk átlagos száma a mutagén kezelés során alkalmazott dózissal szabályozható, amelynek pontos beállításától nagymértékben függ a törzsfejlesztés hatékonysága. A 8. ábrán az is látható, hogy a túl magas dózisban alkalmazott mutagén ágens nagyobb mértékben csökkenti az egy mutációt hordozó sejtek arányát, mint a túl alacsony dózisban alkalmazott mutagén (Demain 1986). A mutagén kezelés megfelelő dózisának meghatározása után nagyszámú mutáns törzs termelőképességét szükséges megvizsgálni egy jobb bioszintetizáló képességgel rendelkező törzs izolálásához.

A szekunder metabolitok magas koncentrációban történő előállításához a fermentációs körülmények és a fermentációs táptalaj optimalizálása is szükséges. Egy fermentációs folyamat elképzelhető egy rendszernek, amely bemenő paramétereket, kimenő változókat és egy transzformációs függvényt tartalmaz. A bemenő paraméterek (pl. fermentációs paraméterek, táptalajkomponensek) pontosan szabályozhatók, a kimenő változók elemzéséből pedig megállapítható a rendszer minősége. Az optimalizáció a szabályozható paraméterek azon kombinációjának meghatározása, amelyben a kimenő változók szintje a legkedvezőbb (Wehrlé 1997). A fermentációs körülmények optimalizálására több módszer alkalmazható. A hagyományos módszer alapján egy paraméter szintjét addig változtatjuk, amíg az előállítandó hatóanyag koncentrációjában egy helyi optimumhoz jutunk. Ekkor egy másik paraméter szintjét változtatjuk egy újabb helyi optimum eléréséig majd ezt folytatjuk tovább, így a változók hatása egymástól függetlenül vizsgálható. Ez a módszer nagyon idő- és költség igényes a nagyszámú kísérlet miatt, valamint rossz eredményre vezethet, ha a különböző változók befolyásolják egymás hatását. Előnyösebb megközelítés alapján a változók szintjét egyszerre változtatják, ezért egy-egy kísérlet egyszerre nyújt információt az összes vizsgált változó hatásáról, valamint a változók közötti kölcsönhatásokról. A változók hatásának egymástól független kiértékelését (ortogonalitás) a kísérleti terv matematikai tulajdonságai teszik lehetővé (Kemény 1990). Az optimalizálási módszerekben a független változókat faktoroknak, a beállított értékeiket pedig szinteknek nevezik. A módszerek alkalmazhatóságának egyik alapvető feltétele, hogy a faktorok szintjeit a vizsgált intervallumhoz képest pontosan lehessen beállítani. Speciális kísérleti terveket és a hozzájuk szükséges matematikai hátteret Box 1951-ben publikált. A leírt teljes kísérleti terv a vizsgálandó tartományban n^2+1 mérési pontot tartalmaz, ahol n a vizsgálandó faktorok száma. A teljes kísérleti terv úgynevezett csillagpontos tervre egészíthető ki további mérési pontokkal, amelyek túlnyúlnak a teljes terv által lefedett területen. A kísérleti tervek egyes beállításaiban kapott mérési eredményekre nem lineáris regresszióval egy függvény illeszthető, és a számított regressziós koefficiensekből kiszámolható az optimum felé mutató irány. A regressziós függvény ábrázolásából az optimum helye pontosan megállapítható.

Regressziószámításon alapuló módszerekkel több különböző eljárást optimalizáltak. Linko (1993) és munkatársai *Alcaligenes autrophus* poli-β-hidroxibutirát termelését vizsgálták regressziószámításon alapuló módszerrel. Rymowicz és munkatársai (1993) *Yarrowia lipolytica* citromsav termelését fejlesztették hasonló módszer alkalmazásával. *Agrobacterium rhizogenes* felhasználásával genetikailag transzformált *Catharanthus roseus* nagy mennyiségben állít elő különböző indol alkaloidokat. Regressziószámítással optimalizálva a táptalajkomponensek koncentrációját sikerült az indol termelést 50%-kal növelni (Toivonen 1991). Chen (1981) alkohol fermentációját optimalizálta Box és Wilson által leírt kísérleti terv és matematikai kiértékelés alkalmazásával. A módszerrel az alkohol koncentrációját növelni a fermentációs időt pedig csökkenteni tudta.

A fermentációs táptalaj illetve a rázatott lombikos körülmények között vizsgálható paraméterek (fermentációs idő, hőmérséklet, stb.) optimalizálása után a szekunder metabolitok előállítására alkalmas eljárás kidolgozása kevertetett fermentációs körülmények között folytatódik.

2.6. Pulzáló gélelektroforézis módszer

A gombák genomjának tanulmányozásához egy hatékony technika a pulzáló gélelektroforézis, amely alkalmazásával nagyméretű DNS molekulák, pl. gombák kromoszómái választhatók el agaróz gélben. Először *Saccharomyces cerevisiae* kromoszómák elválasztására alkalmazták (Schwarz és Cantor 1984, Carle és Olson 1984), majd később számos más gomba esetében használták sikerrel a technikát. Az 1. táblázatban néhány gomba törzs látható, amelyeknek a kromoszómáit ezzel a technikával vizsgálták.

1. táblázat. Gomba törzsek vizsgálata pulzáló gélelektroforézissel

Faj	Kromoszómák		Hivatkozás
	száma	mérete (Mb)	
Aspergillus nidulans	8	2,9-5,0	Brody 1989.
Sclerotinia sclerotiorum	16	1,5-4,0	Fraissinet-Tachet 1996.
Alternaria alternata	9-11	0,4-5,7	Akamatsu 1999.
Mucor circinelloides	8-10	2,3-8,1	Nagy 1994.
Ustilago hordei	13	0,24-2,2	McCluskey 1990.
Tolypocladium inflatum	8	1,05-6,6	Stimberg 1992.
Beauveria nivea	8-10	0,9-6,6	Stimberg 1992.
Cephalosporium acremonium	8	2,9-5,0	Skatrud 1989.
Neurospora crassa	7	4,0-12,0	Orbach 1988.
Fusarium solani	12	2,08-6,08	Nazareth 1994.
Aspergillus oryzae	8	2,8-7,0	Kitamoto 1994.
Cercospora kikuchii	8	2,0-5,5	Hightower 1995.
Schizophyllum commune	6	1,2-5,1	Horton 1991.
Acremonium chrysogenum	8	2,88-6,01	Walz 1991.

Pulzáló gélelektroforézis technikával több, a *Penicillium* genusba tartozó faj kromoszómáit is tanulmányozták. A vizsgált fajok esetében kapott eredmények a 2.

táblázatban láthatók. Látható, hogy a *Penicillium* genuszba tartozó fajok változatos kromoszómaszámmal rendelkeznek, a vizsgált törzsek esetében a kromoszómaszám 4 és 10 között változott. Az elválasztott kromoszómák méretéből számított genom mérete szintén variábilis. A különböző irodalmi hivatkozásokban a *Penicillium* fajok genomjának mérete 23 és 39 Mb között változott.

2. táblázat. *Penicillium* genuszba tartozó fajok vizsgálata pulzáló gélelektroforézissel

Faj	Kromoszómák		Genom mérete (Mb)	Hivatkozás
	száma	mérete (Mb)		
P. paxilli	6	2,5-6,0	23,4	Itoh 1994.
P. janthinellum	8-10	2,0-8,0	39-46	Kayser 1991.
P. notatum	4	5,4-10,8	32,1	Fierro 1993.
P. chrysogenum	4	6,8-10,4	34,1	Fierro 1993.
P. nalgiovense	4	4,1-9,1	26,5	Farber 2000.

A pulzáló gélelektroforézis alkalmas a kromoszóma polimorfizmus vizsgálatára is. Azonos fajba tartozó különböző földrajzi helyekről származó törzs izolátumok között gyakran mutatnak ki kromoszóma polimorfizmust. Bostock és munkatársai (1993) 15 különböző *Candida albicans* izolátumot vizsgáltak meg és 14 különböző kariotipusba sorolták az izolátumokat.

Plummer és munkatársai (1993) ausztráliai *Leptosphaeria maculans* izolátumok kariotipusa között mutattak ki különbséget.

Fierro (1993) *Penicillium chrysogenum* törzsek kariotipusát vizsgálta a penicillin termelésük függvényében. Megvizsgálta az eredetileg izolált NRRL 1951 jelű törzset, az AS-P-78 jelű, penicillint magasabb koncentrációban termelő törzset, illetve az npe10 jelű penicillint nem termelő törzset. Megállapította, hogy a penicillin bioszintézisért felelős gének az I. kromoszómán helyezkednek el, amelynek mérete az NRRL 1951 jelű törzs esetén 10.4 Mb. A deléciós mutáns npe10 jelű törzsben az I. kromoszóma mérete 10.2 Mb-nak adódott. A penicillin szintézisért felelős géneket több példányban tartalmazó, penicillint magas koncentrációban előállító AS-P-78 jelű törzs I.

kromoszómájának mérete 11.0 Mb. A szerzők a penicillin bioszintézisért felelős DNS szakaszokban történt változásokat a kromoszómák méretében is ki tudták mutatni.

A pulzáló gélelektroforézissel történő vizsgálatok első és egyik legfontosabb lépése a megfelelő mintaelőkészítés. A DNS felszabadítása a sejtekből minden esetben alacsony dermedéspontú agarkockákban történik, amelyekben elkerülhető a kromoszómák széttöredeződése. A legtöbb esetben protoplasztokat képeznek a vizsgálandó faj tenyészetéből, amelyeket belekevernek a lágy agarba, majd hagyják megdermedni. McCluskey és munkatársai a kromoszómákat nem protoplasztokból, hanem az agarba dermesztett spórákból illetve micéliumból szabadították fel (McCluskey és mtsai. 1990).

Az elektroforézis során a kromoszómák elválasztását több paraméter befolyásolja.

1. Agaróz koncentráció. Az agaróz koncentráció befolyásolja az elválasztható DNS molekulák méretét valamint a kapott foltok élességét. A 3 Mb-nál kisebb DNS molekulák elválasztására 1% agaróz koncentráció alkalmas. A 3 Mb-nál nagyobb kromoszómák elválasztására 0,5-0,9% agaróz koncentráció használható. Az agaróz koncentrációjának csökkentése azonban a kapott foltokat diffúzabbá teszi.
2. Hőmérséklet. A DNS molekulák mozgására a hőmérséklet is hatással van. Magasabb hőmérsékleten gyorsabb a kromoszómák mozgása a gélben, azonban a foltok élessége csökken a nagyobb diffúzió miatt.
3. Kapcsolási idő. A pulzáló gélelektroforézis során a molekulákat mozgató feszültség iránya váltakozik, miközben a DNS molekulák átrendeződnek a gélben. Az irányváltások közötti kapcsolási idő nagysága befolyásolja a DNS molekulák mozgását. A nagyobb molekuláknak több időre van szükségük az átrendeződésre, ezért kevesebb idejük marad az egyes ciklusokban a haladásra, mint a kisebb molekuláknak. Ezért nagyobb kromoszómák elválasztásához hosszabb kapcsolási idő szükséges.
4. Feszültség. A kisebb DNS molekulák mozgása gyorsabb nagyobb feszültség alatt, azonban ezzel a foltok élessége is csökken. Nagyobb DNS molekulák elválasztásához

azonban a feszültség csökkentése szükséges. Túlságosan magas feszültség esetén a nagyobb DNS molekulák be sem lépnek az agaróz gélbe.

5. Futtatási idő. Az elválasztást legegyértelműbben a futtatási idő befolyásolja. Az elválasztáshoz szükséges futtatási időt a DNS molekulák mozgási sebessége határozza meg.
6. Feszültség irányok által bezárt szög. Két irány vektor esetén az 1 Mb-nál kisebb DNS molekulák elválasztása független a vektorok által bezárt szögtől (Clark 1988). A bezárt szög csökkentése azonban az 1 Mb-nál nagyobb kromoszómák elválasztását kedvezően befolyásolja.

Egy adott gomba törzs kromoszómáinak sikeres elválasztásához a paramétereknek a fenti általános szabályok figyelembe vételével történő kísérletes optimalizálása szükséges.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A gombatörzsek származása és leírása

A *Penicillium waksmani 482* jelű törzset egy Indiából származó talajmintából izoláltuk. A *Penicillium waksmani 2196* és *3131* jelű törzsek a 482 jelű törzs mutánsai, melyek a mikofenolsavat magas koncentrációban bioszintetizálják. A 9/14 jelű törzset szintén a 482 jelű törzsből állítottuk elő mutagén kezeléssel. A 9/14 jelű törzs egy piridoxin igényes, mikofenolsavat nem bioszintetizáló mutáns törzs.

A *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* jelű törzs a szakirodalomban leírt mikofenolsavat bioszintetizáló törzs.

3.2. Táptalajok és oldatok

MS jelű agar táptalaj

malátakivonat	10	g
élesztőkivonat	4	g
glükóz	4	g
agar	20	g
csapvíz	1000	ml
pH 6,5		

MY jelű agar táptalaj

glükóz	10	g
élesztőkivonat	4	g
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,5	g
KH_2PO_4	0,46	g
K_2HPO_4	1	g
$(NH_4)_2SO_4$	1,5	g
agar	20	g
csapvíz	1000	ml
pH 6,0		

SA jelű táptalaj

glükóz	40	g
pepton	10	g
csapvíz	1000	ml
pH 6,0-ra állítva		

SB jelű táptalaj

glükóz	40	g
$(NH_4)_2SO_4$	2,8	g
karbamid	0,6	g
KH_2PO_4	4	g
$CaCl_2$ x $7H_2O$	0,6	g
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,2	g
$FeSO_4$ x $7H_2O$	0,01	g
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	2,8	mg
$MnSO_4$ x H_2O	3,2	mg
$CoCl_2$ x $6H_2O$	4	mg
csapvíz	1000	ml
pH 6,0-ra állítva		

SC jelű táptalaj

malátakivonat	30	g
csapvíz	1000	ml
pH 6,0		

SD jelű táptalaj

húskivonat	8	g
glükóz	10	g
élesztőkivonat	1	g
TWEEN 80	1	ml
csapvíz	1000	ml
pH 6,0-ra állítva		

MI jelű inokulum táptalaj

glükóz	40	g
kazein hidrolizátum	5	g
$NaNO_3$	3	g
KH_2PO_4	2	g
KCl	0,5	g
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,5	g
$FeSO_4$ x $7H_2O$	0,01	g
csapvíz	1000	ml
pH 6,0		

MT4 jelű fermentációs táptalaj

glükóz	80	g
tripkazin	10	g
csapvíz	1000	ml
pH 7,0		

MTM jelű fermentációs táptalaj

glükóz	20	g
tripkazin	10	g
csapvíz	1000	ml
pH 7,0		

MBG jelű táptalaj

glicerin	30	g
glükóz	10	g
élesztőkivonat	6	g
$NaNO_3$	2	g
$MgSO_4$ x $7H_2O$	1	g
csapvíz	1000	ml

pH 6,5

NKM puffer

NaCl	0,35	M
KCl	0,35	M
MES	20	mM

desztillált vízzel, pH 6,0

ONKM puffer

NaCl	0,35	M
KCl	0,35	M
MES	20	mM
ditiotreitol	10	mM

desztillált vízzel, pH 6,0

MNKM puffer

NaCl	0,35	M
KCl	0,35	M
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,1	M
MES	20	mM

desztillált vízzel, pH 6,0

TE puffer

EDTA	50	mM
TRIS-HCl	10	mM

desztillált vízzel, pH 7.5

TBE puffer

TRIS-HCl	90	mM
bórsav	90	mM
EDTA	2	mM

desztillált vízzel, pH 8,3

NKET puffer

NaCl	0,35	M
KCL	0,35	M
EDTA	50	mM
TRIS-HCl	10	mM

desztillált vízzel, pH 7,0

PF puffer

EDTA	0,5	M
TRIS-HCl	10	mM
SDS	1	%
proteináz-K	1	mg/ml

desztillált vízzel, pH 8,5

TEP puffer

EDTA	100	mM
TRIS-HCl	50	mM
PMSF	0,1	mM

desztillált vízzel, pH 7,0

TMN puffer

TRIS-HCl	10	mM
$MgCl_2$ x $6H_2O$	10	mM
NaCl	50	mM
desztillált vízzel, pH 7,0		

REM puffer

TRIS-HCl	10	mM
$MgCl_2$ x $6H_2O$	10	mM
ditiotreitol	1	mM
NaCl	50	mM
BSA	100	µg/ml
desztillált vízzel, pH 7,5		

REH puffer

TRIS-HCl	50	mM
$MgCl_2$ x $6H_2O$	10	mM
ditiotreitol	1	mM
NaCl	100	mM
BSA	100	µg/ml
desztillált vízzel, pH 7,5		

A táptalajokat és az oldatokat 121°C-on 25 percig sterilizáltuk.

3.3. Módszerek

A törzsek fenntartása

A törzs MS jelű ferdeagar tenyészetéről 5 ml steril desztillált vízzel mostuk le a spórákat. Ezen spóraszuszpenzió 0,1 ml-ével oltottunk be MS jelű ferdeagar táptalajt. A tenyészeteket 7 napig növesztettük 25°C-on, majd a kinőtt tenyészeteket 4°C-on tároltuk legfeljebb 3 hónapig.

Mutagén kezelés N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidinnal

A gombatörzs ferdeagar tenyészetéről lemosott spórákat N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidint 0,75-1 mg/ml-es desztillált vizes vagy 0,1 M foszfát pufferes (pH 8,0) oldatában szuszpendáltuk fel. A mutagén kezelést 28°C-on végeztük 10-50 percig. A spórákat lecentrifugáltuk, mostuk pufferrel, majd felszuszpendáltuk steril fiziológiás sóoldatban és MS jelű agar táptalajt tartalmazó Petri csészékre szélesztettük.

Mutagén kezelés etil-metán-szulfonáttal és metil-metán-szulfonáttal

A gombatörzs ferdeagar tenyészetéről lemosott spórákat etil-metán-szulfonát vagy metil-metán-szulfonát 0,3%-os desztillált vizes oldatában szuszpendáltuk fel. A mutagén kezelést 28°C-on végeztük 60-180 percig. A spórákat lecentrifugáltuk, mostuk, majd felszuszpendáltuk steril fiziológiás sóoldatban és MS jelű agar táptalajt tartalmazó Petri csészékre szélesztettük.

Mutagén kezelés hidroxilaminnal

A gombatörzs ferdeagar tenyészetéről lemosott spórákat hidroxilamin 300-400 mM desztillált vizes oldatában szuszpendáltuk fel. A mutagén kezelést 28°C-on végeztük 60-120 percig. A spórákat lecentrifugáltuk, mostuk, majd felszuszpendáltuk steril fiziológiás sóoldatban és MS jelű agar táptalajt tartalmazó Petri csészékre szélesztettük.

Mutagén kezelés ultraibolya besugárzással

A gombatörzs ferdeagar tenyészetéről 5 ml steril fiziológiás sóoldattal lemostuk a spórákat. A spóraszuszpenziót 10-150 másodpercig sugároztuk be ultraibolya fénnyel, majd MS jelű agar táptalajt tartalmazó Petri csészékre szélesztettük.

Mutáns törzsek vizsgálata mikrotiter lemezeken

Mikrotiter lemezek lyukait megtöltöttük 280-280 µl MTM jelű folyékony táptalajjal. Újabb mikrotiter lemezek lyukait megtöltöttük 250-250 µl MY jelű agar táptalajjal. A mutagén kezelést követően kinőtt telepekről beoltottunk MTM jelű táptalajjal készült

mikrotiter lemezeket a vizsgálathoz és ezzel párhuzamosan MY jelű agar táptalajjal készült mikrotiter lemezeket is a törzsek fenntartásához. A lemezeket 25°C-on inkubáltuk 14 napig. A növesztést követően újabb mikrotiter lemezekre szétmértünk 50-50 µl 2%-os $FeCl_3$ oldatot, majd hozzáadtunk 150-150 µl fermentlevet az MTM jelű táptalaj felszínén kinőtt telepek alól. A $FeCl_3$ a mikofenolsavval sötétbarna színreakciót adott, amelynek intenzitását 600 nm-en olvastuk le. A vizsgált törzsek 30%-át, amelyek a legintenzívebb színreakciót adták, az MY jelű agar táptalajjal készített mikrotiter lemezekről átoltottuk MS jelű ferdeagar táptalajra, majd a mikofenolsav bioszintetizáló képességüket megvizsgáltuk rázatott lombikos körülmények között is.

A törzsek tenyésztése rázatott lombikos körülmények között

A törzsek ferdeagar tenyészetéről 5 ml steril desztillált vízzel mostuk le a spórákat. Az így kapott spóraszuszpenzióval oltottunk be 500 ml-es Erlenmeyer lombikban sterilezett 100 ml MI jelű inokulum táptalajt. A tenyészetet 3 napig növesztettük 25°C-on síkrázógépen rázatva (250 rpm, 2,5 cm kitérés). Az így kapott inokulum tenyészet 5 ml-ével oltottunk be 500 ml-es Erlenmeyer lombikban sterilezett 100 ml MT4 jelű fermentációs táptalajt. A tenyésztést síkrázógépen (250 rpm, 2,5 cm kitérés), 25°C-on végeztük 7 napig, majd meghatároztuk a tenyészetek mikofenolsav tartalmát.

Táptalajoptimalizálás

A fermentációs táptalaj komponenseit a Box és Wilson által leírt kísérleti terv és regressziószámítás felhasználásával optimalizáltuk. A mérési eredményekre az alábbi regressziós egyenletet illesztettük:

$$Y = b_0 + \sum_j b_j x_{ji} + \sum_{j<k} b_{jk} x_{ji} x_{ki} + \sum_j b_{jj} x_{ji}^2$$

A regressziós koefficienseket a következő egyenletek alapján számítottuk ki:

$$b_0 = b'_0 - \sum b_{jj} \overline{x_j^2} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} y_i - \sum b_{jj} \overline{x_j^2}$$

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^{N} x_{ji} y_i}{\sum_i x_{ji}^2}$$

$$b_{jk} = \frac{\sum_i x_{ji} x_{ki} y_i}{\sum_i \left(x_{ji} x_{ki}\right)^2}$$

$$b_{jj} = \frac{\sum_i x'_{ji}\, y_i}{\sum_i \left(x'_{ji}\right)^2} = \frac{\sum_i \left(x_{ji}^2 - \overline{x_j^2}\right) y_i}{\sum_i \left(x_{ji}^2 - \overline{x_j^2}\right)^2}$$

ahol *i* a kísérleti beállítások száma, *j* a vizsgált faktorok száma, *x* a faktorok kódolt szintje, *y* az adott kísérleti beállításnál mért mikofenolsav koncentráció

A törzsek tenyésztése laboratóriumi fermentorban

A törzsek ferdeagar tenyészetéről 5 ml steril desztillált vízzel mostuk le a spórákat. Az így kapott spóraszuszpenzióval oltottunk be 3000 ml-es Erlenmeyer lombikban sterilezett 500 ml MI jelű inokulum táptalajt. A tenyészetet 3 napig növesztettük 25°C-on síkrázógépen rázatva (250 rpm, 2,5 cm kitérés). Az így kinőtt inokulum tenyészet 250 ml-ével oltottunk be laboratóriumi fermentorban sterilezett 5000 ml MT4 jelű fermentációs táptalajt. A fermentort 400 fordulat/perc keveréssel, 100 liter/óra alsó levegő-bevezetéssel működtettük 27°C-on 10 napig.

Mikofenolsav koncentráció meghatározása fermentléből vékonyréteg kromatográfiával

A fermentlé mintákat négyszeresére hígítottuk metanollal, alaposan összekevertük, majd hagytuk leülepedni. A felülúszóból Hamilton tűvel 5 µl-t cseppentettünk fel Alugram SIL G/UV_{254} vékonyréteg lemezre. Futtatóelegyként benzol:etilacetát:ecetsav=25:25:0,5 arányú keverékét használtuk. Futtatás után a lemezeket 254 nm hullámhosszon értékeltük ki BIO-RAD Fluor-S MultiImager denzitométer felhasználásával.

Mikofenolsav koncentráció meghatározása fermentléből HPLC módszerrel

A fermentleveket négyszeresére hígítottuk metanollal, majd a mintákat lecentrifugáltuk. Az analízishez a centrifugált hígított minták felülúszóját használtuk. A vizsgálatokat LKB izokratikus rendszerrel, Nucleosil C_{18} 5 μm (BST) töltetű oszlopokon (előtét oszlop: 40x4 mm, analitikai oszlop: 250x4,6 mm) végeztük. Az oszlopra 10 μl mintát injektáltunk, eluensként acetonitril-foszforsavval pH = 2-es értékre állított víz 60:40 arányú keverékét használtuk. Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt, a detektálást 238 nm-en végeztük. A mikofenolsav retenciós ideje 15,8 perc volt.

Kromoszómapreparátum készítése

A gombatörzs ferdeagar tenyészetéről 5 ml steril desztillált vízzel lemosott spórákkal oltottunk be 100 ml MBG jelű táptalajt. A tenyészetet 24 óráig növesztettük síkrázógépen (250 rpm, 2,5 cm kitérés) 25°C-on. Ezt követően a tenyészetet G3-as üvegszűrőn leszűrtük. A micéliumokat kétszer mostuk desztillált vízzel és kétszer NKM jelű pufferrel. A micéliumokat ONKM jelű pufferben felszuszpendáltuk és 30°C-on 1 órán keresztül rázatva inkubáltuk. Az inkubálást követően a micéliumokat ismét leszűrtük és háromszor mostuk MNKM jelű pufferrel. A micéliumokat 0,25% Novozym234 enzimet tartalmazó MNKM jelű pufferben szuszpendáltuk fel és az emésztést 2-2,5 órán keresztül végeztük 30°C-on. A protoplasztképződést mikroszkóppal ellenőriztük. Az emésztést követően a protoplasztokat lecentrifugáltuk (1000 ford/perc, 15 perc), majd kétszer mostuk NKM jelű pufferrel. A protoplasztokat 45°C-on felszuszpendáltuk 0,8% agarózzal kiegészített és felolvasztott NKET jelű pufferben és a szuszpenziót a plugokat kialakító formákba mértük szét. Dermedést követően a plugokat PF jelű pufferbe helyeztük és 48 órán keresztül 50°C-on inkubáltuk a sejtek feltárásához. Miután a kromoszómákat feltártuk, a plugokat TE pufferrel mostuk és TE pufferben tároltuk 4°C-on.

Kromoszómák elválasztása pulzáló gélelektroforézissel

A futtatásokat 0,5 x TBE pufferben végeztük 10°C-on, az Eredmények című fejezetben leírt paraméterekkel BIO-RAD CHEF-DR III készülékkel. A futtatás után a géleket 0,5

μg/ml etidium-bromid oldatban festettük 30 percig. A festést követően desztillált vízben mostuk a géleket 60 percig, majd a kiértékelést BIO-RAD Fluor-S MultiImager készülékkel végeztük.

Plugok emésztése restrikciós endonukleázokkal

A plugokat TEP pufferben szobahőmérsékleten 24 óráig, majd TE pufferben 48 óráig inkubáltuk. Az inkubálást TMN pufferben folytattuk 24 óráig 4°C-on, miközben négyszer cseréltük a puffert. Az emésztést 0,5 ml térfogatban végeztük HindIII, SpeI, NheI és XbaI enzimek esetében REM pufferben, PstI és NotI enzimek esetében REH pufferben. Az emésztést 70 U enzimmel végeztük 37°C-on 18 óráig.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Mikofenolsav bioszintetizáló képességgel rendelkező mikroorganizmus törzs izolálása

Intézetünkben screening programot folytattunk mikrobiológiai eredetű, biológiailag aktív hatóanyagokat termelő mikroorganizmusok izolálása céljából. Különböző földrajzi helyekről gyűjtött talajmintákból izoláltunk mikroorganizmusokat. A mikroorganizmusokat rázatott lombikos körülmények között tenyésztettük négyféle (SA, SB, SC és SD) táptalajon, majd megvizsgáltuk a mikroorganizmusok tenyésztésével előállított fermentlevek antibakteriális, antifungális és xantin-oxidáz gátló hatását. Az antifungális aktivitás meghatározása során a fermentleveknek *Candida albicans*, *Aspergillus niger* és *Torulopsis utilis* teszt organizmusok növekedésére kifejtett gátló hatását vizsgáltuk agardiffúziós módszer alkalmazásával. A screening programban mintegy 9000 különböző törzs izolátum fermentlevét vizsgáltuk meg. Egy indiai talajmintából származó fonalas gomba törzs fermentlevéből, amely erős antifungális aktivitást mutatott mindhárom tesztorganizmussal szemben, mikofenolsavat izoláltunk. A fonalas gomba törzset a *Penicillium* genuszba soroltuk be. A törzs részletes taxonómiai vizsgálatát Szabó István Mihály akadémikus úr végezte, és a törzset a *Monoverticillata* szekcióba tartozó *Penicillium waksmani* fajjal azonosította. A szakirodalomban található mikofenolsav bioszintetizáló képességgel rendelkező összes törzs a *Penicillium* genusz *Asymmetrica* szekciójába tartozik, tehát az általunk izolált törzs az első *Monoverticillata* szekcióba tartozó faj, amely mikofenolsav bioszintetizáló képességgel rendelkezik.

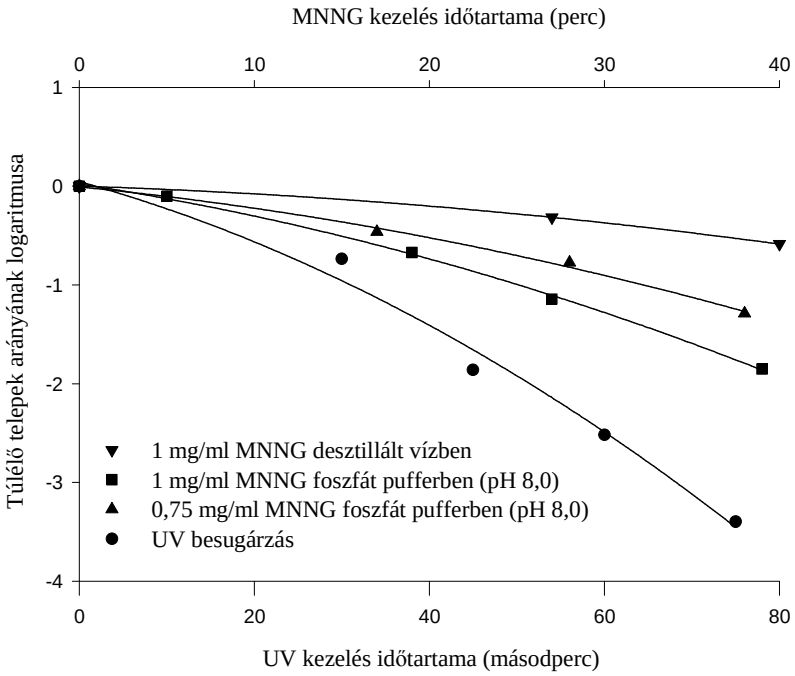
4.2. A törzs mikofenolsav bioszintetizáló képességének fejlesztése

A talajmintából izolált törzs mintegy 100 mg/l mikofenolsavat termelt, ezért az ipari megvalósításra alkalmas eljárás kidolgozásához szükséges volt a termelő képesség

fokozása. A bioszintetizáló képességet a törzs genetikai fejlesztésével illetve a fermentációs körülmények optimalizálásával növeltük.

4.2.1. A törzs genetikai fejlesztése

A bioszintetizáló képességet mutációs-szelekciós kísérletekben fokoztuk fizikai és kémiai mutagének alkalmazásával. Fizikai mutagén ágensként ultraibolya besugárzást, kémiai mutagénként N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidint, hidroxilamint, metil-metán-szulfonátot és etil-metán-szulfonátot alkalmaztunk. A mutagénekkel különböző dózisokban, különböző időtartamig végeztünk kezeléseket az optimális mutációs ráta megállapítására. Az ultraibolya besugárzással és a N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidinnel végzett kezelésekben mért pusztulási görbék a 9. ábrán láthatók.

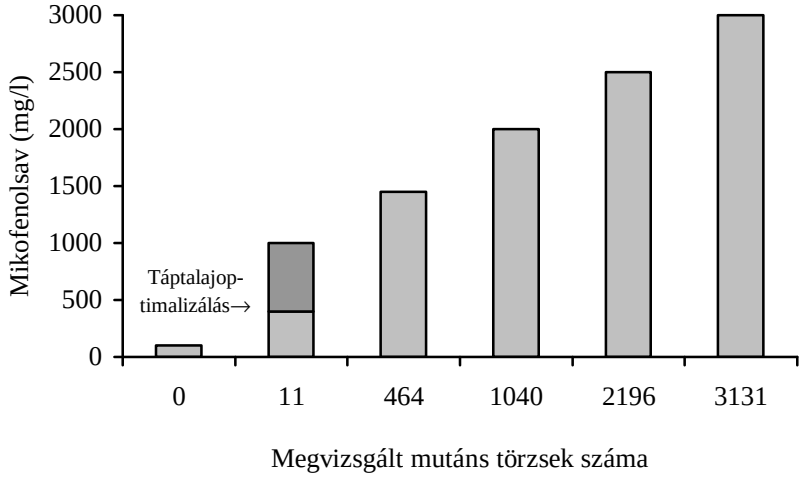


9. ábra. Pusztulási görbék.

A mutagén kezelést követően a túlélő telepeket véletlenszerűen izoláltuk és mikofenolsav bioszintetizáló képességüket rázatott lombikos körülmények között vizsgáltuk meg. A törzsfejlesztés hatékonyságának növelése érdekében egy gyors és alacsony költséggel járó módszert dolgoztunk ki mutáns törzseknek a rázatott lombikos vizsgálatok előtti szűrésére. A módszer alapja a mikofenolsav színreakciója Fe^{3+} ionokkal. A mutagén kezelést követően a kinőtt törzsek mikofenolsav bioszintetizáló képességét mikrotiter lemezeken vizsgáltuk meg. Ha a törzset nem megfelelő körülmények között tenyésztettük, akkor mikofenolsav mellett magas koncentrációban bioszintetizált trihidroxi-melleint is (11. ábra). A $FeCl_3$-al lejátszódó reakcióért a mikofenolsavban található aromás gyűrű felelős, amely a trihidroxi-melleinben is jelen van ezért a mikofenolsav kimutatását zavarná. Emiatt a módszer kidolgozása során olyan tenyésztési körülményeket kellett keresni, ahol a trihidroxi-mellein bioszintézise lecsökken. A rázatott lombikos körülmények között használt MT4 jelű táptalajban 8% glükózt használtunk. Ezen a táptalajon azonban a mikrotiter lemezeken végzett tenyésztések során erőteljes trihidroxi-mellein termelést tapasztaltunk. A glükóz koncentrációjának 2%-ra történő lecsökkentésével azonban sikerült a trihidroxi-mellein bioszintézisét visszaszorítani. A mikofenolsav bioszintézise lassabb a mikrotiter lemezeken, ezért a fermentációs időt megnöveltük 7 napról 14 napra. A módszer kidolgozása során a tenyészetek mikofenolsav tartalmát vékonyréteg kromatográfiával kapcsolt denzitometriával meghatároztuk és ezt hasonlítottuk össze a $FeCl_3$-al kapott színreakció intenzitásával. A fermentációs körülményekben történt fentebb leírt változtatásokat követően erős korrelációt kaptunk a vékonyréteg kromatográfiával kapott mikofenolsav koncentráció és a színreakció intenzitása között. A mikrotiter lemezeken levizsgált törzsek 30%-át, amelyek a legnagyobb intenzitású színreakciót adták, továbboltottuk és a mikofenolsav bioszintetizáló képességüket rázatott lombikos körülmények között is megvizsgáltuk. A mikrotiter lemezeken végzett előszűréssel a levizsgált törzsek száma megsokszorozható és az alacsony mikofenolsav bioszintetizáló képességgel rendelkező mutáns törzsek még a rázatott lombikos körülmények közötti vizsgálatok előtt kiszűrhetők.

A rázatott lombikos fermentációt követően a fermentlevek mikofenolsav tartalmát vékonyréteg kromatográfiával vizsgáltuk meg (Szabó 1998), majd a fermentlevek 20%-át, amelyek a legmagasabb koncentrációban tartalmaztak mikofenolsavat, HPLC módszerrel is analizáltuk. Azon mutáns törzsek termelőképességét, amelyek a kontroll törzsnél magasabb koncentrációban termeltek mikofenolsavat, ismételten megvizsgáltuk. Ha a magasabb bioszintetizáló képesség reprodukálható volt, akkor a szelekció eredményeként kiválasztott mutáns törzs termelőképességét fejlesztettük tovább.

A törzsfejlesztés folyamán mintegy 7000 törzs rázatott lombikos körülmények közötti megvizsgálásával sikerült az eredetileg izolált, 100 mg/l mikofenolsavat termelő törzs termelőképességét 2000-2500 mg/l szintre növelni. A törzsfejlesztés folyamata a 10. ábrán látható.

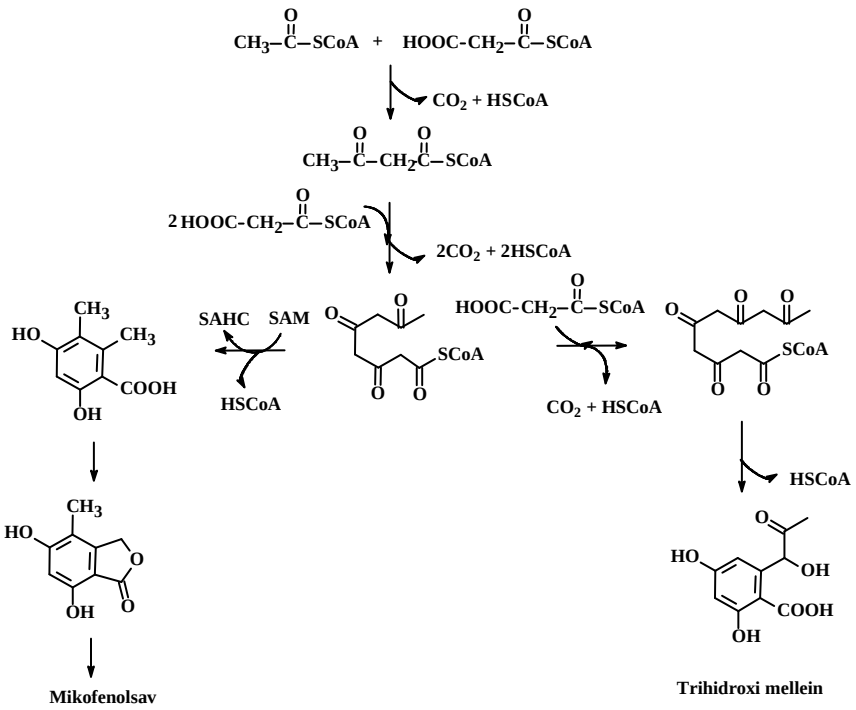


10. ábra. A törzsfejlesztés folyamata

A mutációs-szelekciós kísérletekben a magasabb mikofenolsav bioszintetizáló képességgel rendelkező törzseken kívül a mikofenolsav bioszintézisében sérült mutáns törzseket is sikerült izolálnunk.

A. A 9/14 jelű mutáns törzset a 482 jelű törzsből állítottuk elő ultraibolya besugárzással végzett mutagén kezeléssel. A törzs piridoxint igényel a

növekedéséhez, valamint nem termel mikofenolsavat. Mikofenolsavat nem tudtunk kimutatni a tenyészetben piridoxin adagolás hatására sem, ezért a termelő képesség elvesztése nem a mikofenolsav bioszintézis esetleges piridoxin igényének a következménye. A mutáns törzs tenyészete trihidroxi-melleint tartalmaz, míg a mikofenolsav bioszintézisének az aromás mag kialakulását követő köztitermékei nem mutathatók ki. Ezek alapján a trihidroxi-mellein és a mikofenolsav bioszintézise már az aromás gyűrű kialakulása előtt szétválik. A trihidroxi-mellein feltételezett bioszintézis útja a 11. ábrán látható.

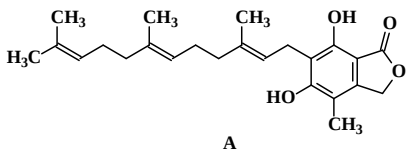


11. ábra. A trihidroxi-mellein feltételezett bioszintézisútja

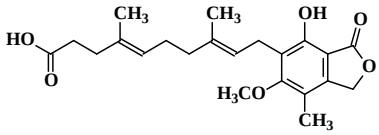
Japán kutatók izoláltak mikofenolsavat nem, de trihidroxi-melleint bioszintetizáló, szintén a *Penicillium* genuszba tartozó gomba törzset tengeri üledék mintából. A trihidroxi-melleint vizes oldatban történő forralással átalakították acetoftalidinná,

amely gátolta a sejtciklust emlős sejt tenyészetekben. Ezért a trihidroxi-mellein vagy valamely származéka szóba jöhet esetleges tumor gátló hatóanyagként (Cui 1996).

B. Az SP1 jelű mutáns törzset a 3131 jelű törzsből állítottuk elő. A törzs a mikofenolsav bioszintézisének egy késői szakaszában, a hét tagú oldallánc kialakulásáért felelős enzimekben sérült. A tenyészetből mikofenolsav mellett a 12. ábrán látható bioszintézis intermedierek izolálhatók nagy mennyiségben. Az "A" jelű termék a mikofenolsav bioszintézisében leírt (2. ábra) farnezil-oldallánccal rendelkező intermedier. Az "A" jelű termék oldalláncának rövidülésével alakul ki a mikofenolsav 7 tagú oldallánca. A "B" jelű izolált molekula feltételezhetően ezen folyamat egyik köztiterméke. A szakirodalomban megjelent közlemények szerint a mikofenolsav aromás magján levő hidroximetil-csoport kialakulása a bioszintézis utolsó lépése, amelyet egy metiláz enzim katalizál S-adenozil-metionin felhasználásával. A mutáns törzs által előállított mikofenolsav származékok közül a farnezil-oldallánccal rendelkezőn valóban nincs jelen a hidroximetil-csoport. A "B" jelű termék aromás magján található hidroxil-csoporton azonban végbement a metilezés. Ezek szerint a metilezést katalizáló enzimnek a farnezil-oldallánccal rendelkező intermedier valóban nem szubsztrátja, azonban az oldallánc rövidülése során kialakuló intermedierek már metileződhetnek.



A



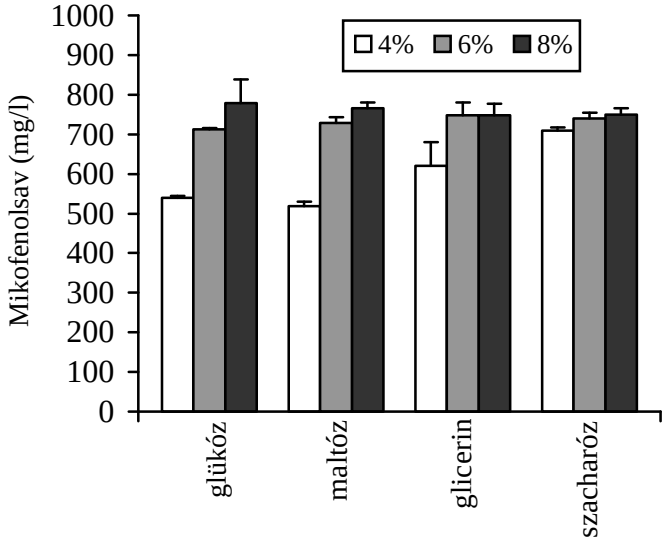
B

12. ábra. Az SP1 jelű mutáns törzsből izolált bioszintézis intermedierek

A törzsfejlesztés során izolált, a mikofenolsav bioszintézisében sérült törzsek a mikofenolsav bioszintézisének egy későbbi biokémiai, genetikai vizsgálatában hasznosíthatók.

4.2.2. A fermentációs körülmények optimalizálása

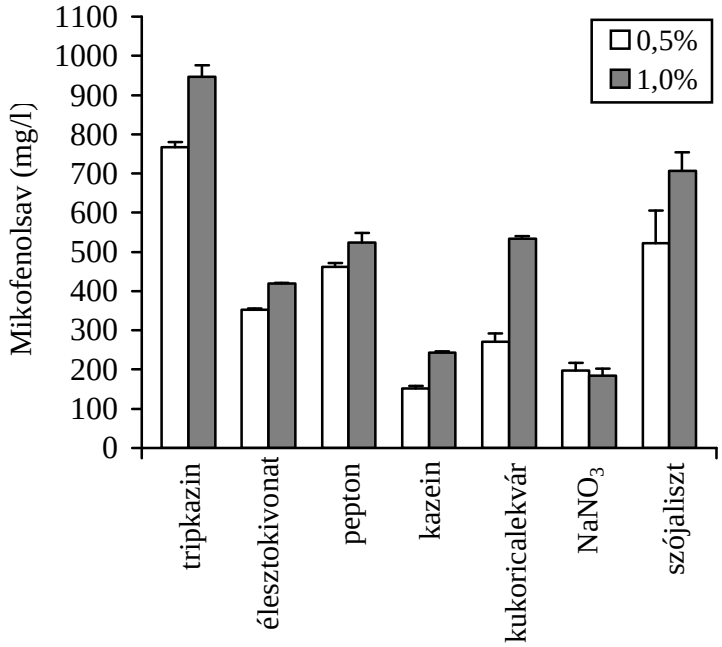
A fermentációs körülmények optimalizálását a táptalaj összetételének vizsgálatával kezdtük. A screening programban a törzs SA jelű táptalajon (4% glükóz, 1% pepton) előállított tenyészetéből izoláltuk a mikofenolsavat. Az optimalizálást ezen összetételű táptalajból kiindulva kezdtük. Megvizsgáltuk a különböző szénforrásoknak a mikofenolsav termelésére kifejtett hatását. 1% peptont tartalmazó táptalajt egészítettünk ki különböző szénforrásokkal 4, 6 és 8% koncentrációban. Hét napig 25°C-on végzett fermentációt követően a tenyészetek mikofenolsav koncentrációját HPLC módszerrel határoztuk meg. Az egyes szénforrások jelenlétében végzett tenyésztések eredményeként mért mikofenolsav koncentrációk láthatók a 13. ábrán.



13. ábra. Különböző szénforrásoknak a mikofenolsav termelésre kifejtett hatása.

Az ábrán látható, hogy a szénforrások minőségének nem volt hatása a mikofenolsav bioszintézis mértékére, csak a szénforrások koncentrációja befolyásolta a termelést. A további kísérletekhez a glükózt, mint olcsó szénforrást választottuk.

Megvizsgáltuk a mikofenolsav bioszintézisét különböző nitrogén forrásokat tartalmazó táptalajokon. 6% glükózt tartalmazó alaptáptalajt egészítettünk ki különböző szerves és szervetlen nitrogén forrásokkal 0,5 illetve 1% végkoncentrációban. 25°C-on 7 napig végzett fermentációkat követően meghatároztuk a tenyészetek mikofenolsav tartalmát, amelyek a 14. ábrán láthatók.



14. ábra. Mikofenolsav termelés különböző nitrogén forrásokat tartalmazó táptalajokon.

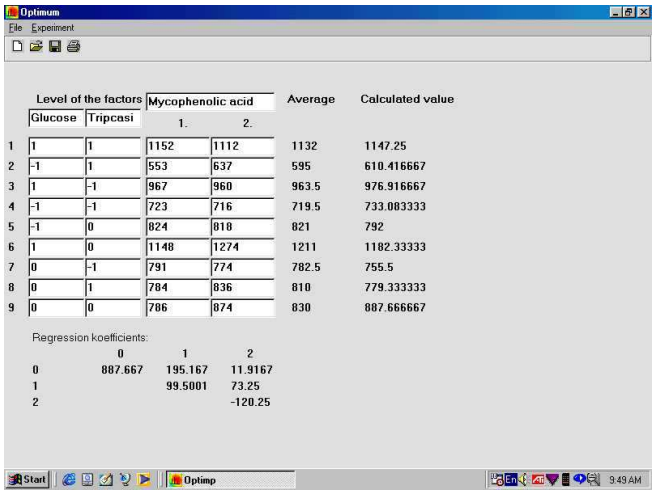
A fonalas gomba törzs a mikofenolsavat legnagyobb koncentrációban a tripkazint, mint nitrogén forrást tartalmazó táptalajon termelte, ezért a további kísérletekhez tripkazint

választottuk nitrogén forrásnak. Végeztünk fermentációkat olyan táptalajokon is, amelyek több szén illetve nitrogén forrást tartalmaztak egyidejűleg, azonban nem kaptunk magasabb mikofenolsav termelést.

A továbbiakban a glükóz és a tripkazin koncentrációjának a mikofenolsav bioszintézisére kifejtett hatását vizsgáltuk meg. A vizsgálatokhoz regressziószámítást és a Box és Wilson által leírt statisztikai módszert használtuk az általunk írt számítógépes program felhasználásával.

4.2.3. A számítógépes program leírása

Az optimalizáláshoz szükséges számítások elvégzéséhez az Optimum programot Borland Pascal és Delphi nyelven írtuk Windows 9x operációs rendszerekhez. A program felhasználható különböző folyamatokban szerepet játszó paraméterek optimalizálására és a kísérletek tervezésére (15. ábra).



15. ábra. Az Optimum program

A program a kísérlettervezéshez teljes és csillagpontos kísérleti terveket tartalmaz 2, 3 és 4 faktor vizsgálatához. A kísérleti tervek alapértelmezésben a faktorok

kódolt szintjeit tartalmazzák de a megfelelő adatok megadásával a program átszámolja azokat koncentráció értékekre.

A program a kísérlet kiértékeléséhez a javasolt vagy más ortogonális kísérleti terv alapján elvégzett vizsgálatok eredményeit kéri. A megadott eredményekből az Anyagok és módszerek fejezetben leírt egyenletek alapján kiszámolja a regressziós koefficienseket. A program megadja az elvégzett kísérleti terv mérési pontjaiban a regressziós egyenlet alapján számolt értékeket, amelyek összehasonlíthatók a mért értékekkel. A program F-próbával ellenőrzi a számolt függvény illeszkedését a mért értékekre. A megadott eredmények a kísérlet jellemzőivel együtt (dátum, faktorok neve, optimalizálandó neve) kinyomtathatók illetve elmenthetők. Az eredmények könnyebb értelmezését segíti a számított regressziós függvény grafikus ábrázolása. Az ábrázolás szintvonalas (tetszőleges számú szintvonallal) és színskálás módszerrel történhet. A program a számolt regressziós egyenletet ábrázolja a kísérleti terv által lefedett tartományban. Kiválasztható, hogy a vizsgált faktorok közül melyik kettő függvényében történjen az ábrázolás. A program megadja az ábrázolt tartományban a függvény maximumát és a tengelyekhez rendelt faktoroknak a maximumhoz tartozó értékeit. Az ábrázolt függvények kinyomtathatók valamint Windows Bitmap (.bmp) formátumban elmenthetők és más alkalmazásokba illeszthetők.

A számítógépes programot illetve az optimalizációs módszert több témában is sikerrel alkalmaztuk a termelőképesség fokozására (Kónya 1998).

4.2.4. A táptalajkomponensek koncentrációjának optimalizálása

A glükóz és a tripkazin koncentrációjának a mikofenolsav termelésre kifejtett hatásának vizsgálatát az 3. táblázatban látható kétfaktoros, ortogonális, csillagpontos kísérleti terv felhasználásával végeztük. A glükóz koncentrációjának alap szintje 6%, a tripkaziné 1% volt. A glükóz koncentrációját ±1%-kal, a tripkazin koncentrációját ±0.25%-kal változtattuk. Az adott beállításokkal végzett fermentációk esetén mért mikofenolsav koncentrációk a 3. táblázatban láthatók.

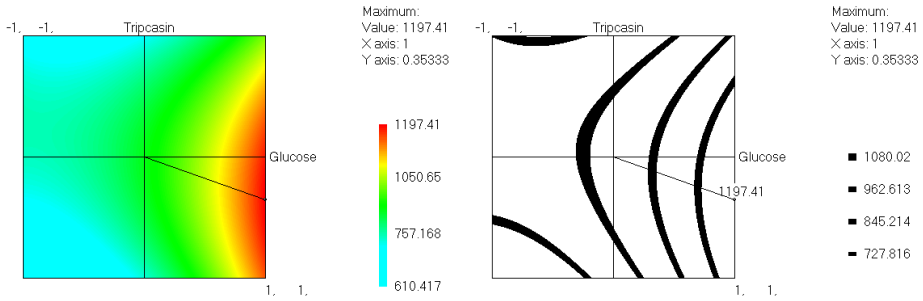
3. táblázat. A kísérleti terv a táptalajkomponensek koncentrációjának optimalizálásához

Glükóz		Tripkazin		Mikofenolsav (mg/l)
Kódolt szint	Koncentráció (%)	Kódolt szint	Koncentráció (%)	
+1	7	+1	1.25	1132 ± 20
-1	5	+1	1.25	595 ± 42
+1	7	-1	0.75	963 ± 4
-1	5	-1	0.75	719 ± 4
-1	5	0	1.0	821 ± 3
+1	7	0	1.0	1211 ± 63
0	6	-1	0.75	782 ± 9
0	6	+1	1.25	810 ± 26
0	6	0	1.0	830 ± 44

Az eredmények alapján számolt regressziós egyenlet a következő volt:

$$Y = 887.6 + 195.2x_1 + 11.9x_2 + 99.5(x_1)^2 - 120.25(x_2)^2 + 73.2x_1x_2$$

A regressziós egyenlet színskálás és szintvonalas grafikus ábrázolása a 16. ábrán látható.



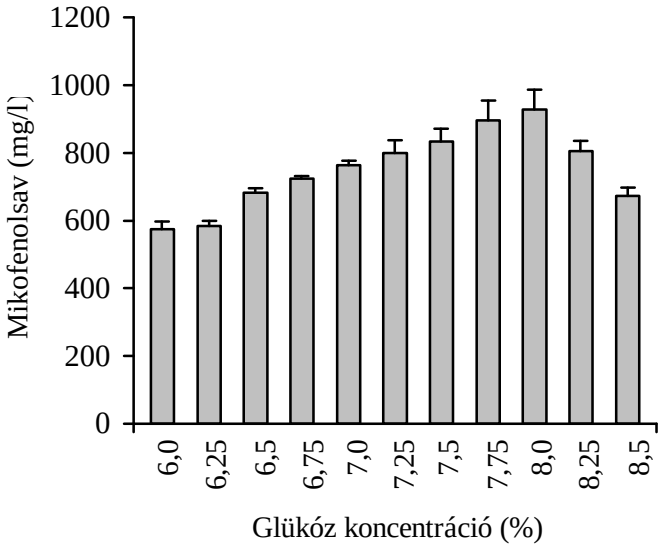
16. ábra. A számított regressziós függvény grafikus ábrázolása

Az ábrázolt függvényből is látszik, hogy a mikofenolsav bioszintézis optimumához a glükóz koncentrációját növelni kellett. A regressziós koefficiensek felhasználásával az alábbi táblázatban látható módon kiszámoltuk, hogy az egyes táptalajkomponensek

koncentrációját milyen mértékben kell változtatni ahhoz, hogy a mikofenolsav bioszintézise szempontjából optimálisak legyenek.

	Glükóz	Tripkazin
Alapszint	6 %	1 %
Lépés	1 %	0.25 %
Regressziós koeff.	195.2	11.9
Lépés x regr. koeff.	195.2	2.9
Új lépés	0.25 %	0.0037 %

A glükóz koncentrációjának minden 0,25%-os növelésével egyidejűleg a tripkazin koncentrációját 0,0037%-kal kellett volna növelni. Ez azonban olyan kis mértékű növelés, hogy az 1% tripkazin koncentráció optimálisnak tekinthető. A táptalajkomponensek optimális koncentrációjának eléréséhez csak a glükóz koncentrációját növeltük 0.25%-os lépésekben. Az egyes beállításoknál mért mikofenolsav koncentrációk a 17. ábrán láthatók, amelyről leolvasható, hogy a mikofenolsav bioszintézise szempontjából optimális összetételű táptalajban a glükóz koncentrációja 8%.

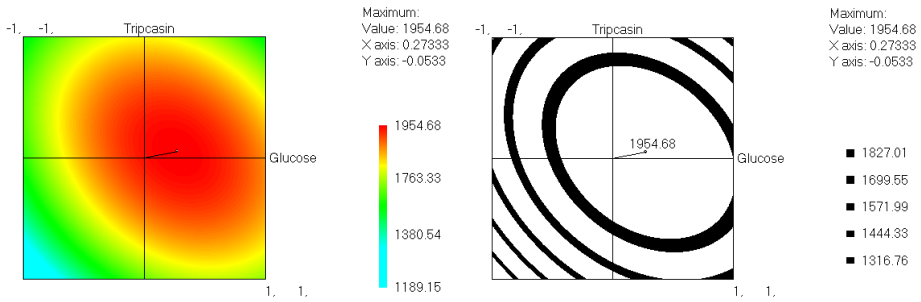


17. ábra. Mikofenolsav bioszintézise glükózt különböző koncentrációban tartalmazó táptalajokon

A törzsfejlesztés egy későbbi szakaszában izolált 3131 számú mutáns törzs felhasználásával megvizsgáltuk, hogy a törzs genetikai változásával módosult-e a mikofenolsav optimális bioszintéziséhez szükséges fermentációs táptalaj összetétele. A 4. táblázatban látható ortogonális, csillagpontos kísérleti tervet használtuk. A glükóz alapkoncentrációja 8%, a tripkazin koncentrációja 1% volt. A glükóz koncentrációját ±2%-kal, a tripkazin koncentrációját ± 0,3%-kal változtattuk. A mérési eredmények a 4. táblázatban láthatók.

4. táblázat. A kísérleti terv a táptalajkomponensek koncentrációjának optimalizálásához az optimum közelében

Glükóz		Tripkazin		Mikofenolsav (mg/l)
Kódolt szint	Koncentráció (%)	Kódolt szint	Koncentráció (%)	
+1	10	+1	1.3	1696 ± 25
-1	6	+1	1.3	1071 ± 38
+1	10	-1	0.7	1624 ± 53
-1	6	-1	0.7	1493 ± 48
-1	6	0	1.0	1774 ± 10
+1	10	0	1.0	1752 ± 30
0	8	-1	0.7	1742 ± 42
0	8	+1	1.3	1750 ± 28
0	8	0	1.0	1855 ± 32



18. ábra. A táptalajkomponensek koncentrációjának a mikofenolsav termelésre kifejtett hatása az optimum közelében

A mérési pontok alapján számolt regressziós egyenlet ($Y = 1936,7 + 122,3x_1 - 56,8x_2 - 214(x_1)^2 - 231(x_2)^2 + 123,3x_1x_2$) grafikus ábrázolásából (18. ábra) látható, hogy a mikofenolsav termelés szempontjából optimális összetételű táptalaj komponenseinek korábban számolt koncentrációi a fejlesztett törzs esetében is megfelelőek.

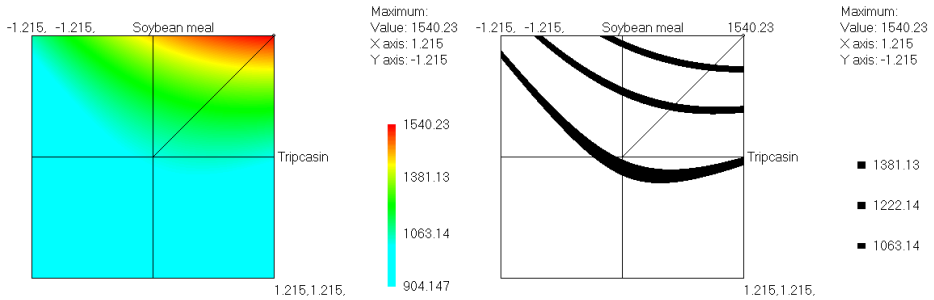
Korábban vizsgáltuk a mikofenolsav termelést több nitrogén forrásnak a fermentációs táptalajban történő egyidejű használata esetén. Akkor nem tapasztaltuk a mikofenolsav termelés növekedését. Lehetséges azonban, hogy a nitrogén forrásokat nem megfelelő koncentrációban alkalmaztuk, ezért megvizsgáltuk a tripkazin és a második legkedvezőbb nitrogén forrás, a szójaliszt (14. ábra) koncentrációjának a mikofenolsav termelésre kifejtett hatását egyidejű alkalmazásuk esetén. Három faktoros, ortogonális, csillagpontos tervet használtunk. A kísérleti terv és az egyes beállítások esetén mért mikofenolsav koncentrációk a 5. táblázatban láthatók.

5. táblázat. Kísérleti terv három táptalajkomponens koncentrációjának optimalizálására

Glükóz		Tripkazin		Szójaliszt		Mikofenolsav
k. sz.	konc. (%)	k. sz.	konc. (%)	k. sz.	konc. (%)	(mg/l)
+1	8	+1	1.2	+1	0.9	976 ± 167
-1	6	+1	1.2	+1	0.9	898 ± 46
+1	8	-1	0.6	+1	0.9	972 ± 73
-1	6	-1	0.6	+1	0.9	912 ± 19
+1	8	+1	1.2	-1	0.1	1596 ± 241
-1	6	+1	1.2	-1	0.1	1202 ± 40
+1	8	-1	0.6	-1	0.1	1097 ± 134
-1	6	-1	0.6	-1	0.1	997 ± 39
-1.215	5.8	0	0.9	0	0.5	890 ± 9
+1.215	8.2	0	0.9	0	0.5	1112 ± 52
0	7	-1.215	0.54	0	0.5	959 ± 5
0	7	+1.215	1.26	0	0.5	997 ± 82
0	7	0	0.9	-1.215	0.01	1438 ± 30
0	7	0	0.9	+1.215	0.99	988 ± 9
0	7	0	0.9	0	0.5	1117 ± 53

A számított regressziós egyenlet ($Y=1077.5+82.3x_1+67.6x_2-153.3x_3-43(x_1)^2-58.3(x_2)^2+100.6(x_3)^2+39.1x_1x_2-44.5x_1x_3-89.2x_2x_3$) grafikus ábrázolása a 19. ábrán

látható. A mikofenolsav koncentrációját a tripkazin és a szójaliszt kódolt szintjének függvényében ábrázoltuk.



19. ábra. Szójaliszt és tripkazin koncentrációjának a mikofenolsav termelésre kifejtett hatása

A regressziós koefficiensekből illetve a grafikus ábrázolásból is megállapítható, hogy a szójaliszt 0.5%-os koncentrációját csökkenteni, a tripkazin 0,9%-os koncentrációját pedig növelni kell az optimum elérése érdekében. A fermentációs táptalajban a tripkazin mellett alkalmazott szójaliszt csökkentette a mikofenolsav termelést. A kísérletek eredményei alapján a mikofenolsav bioszintetizáló törzset 8% glükóz és 1% tripkazin összetételű fermentációs táptalajon tenyészettük.

4.3. Laboratóriumi fermentációk

A mikrobiológiai eredetű hatóanyagok ipari előállítása legtöbbször süllyesztett kevertetett körülmények között történik, ezért a mikofenolsav ipari előállítására alkalmas eljárás kidolgozását laboratóriumi fermentorokban folytattuk. Osztályunkon INEL BR92 típusú, 5 liter hasznos térfogatú laboratóriumi üvegfermentorokkal dolgoztunk. A fermentorok a fermentációs paraméterek: keverés, levegőbevezetés, hőmérséklet, a fermentlé pH-ja illetve az oldott oxigén koncentráció mérésére és szabályozására képesek. A mért adatokat megadott időközökben regisztrálják.

Meghatároztuk az egyes fermentációs paramétereknek az optimális értékét a mikofenolsav bioszintézise szempontjából. Kiindulási paramétereknek 400 ford/perc

keverést, 100 l/óra alsó levegőbevezetést és 25°C hőmérsékletet választottunk. A fermentorokat egyenként 2 darab flat-blade típusú keverőlapáttal szereltük fel. 5 és 10 cm átmérőjű lapátok álltak rendelkezésünkre, amelyeket különböző kombinációkban építettük be a fermentorokba. Az 6. táblázatban látható a keverőelemeknek a mikofenolsav termelésre kifejtett hatása.

6. táblázat. A keverőelemek átmérőjének hatása a mikofenolsav termelésre

Alsó keverőelem átmérője	Felső keverőelem átmérője	Mikofenolsav termelés (mg/l)
5 cm	5 cm	480
10 cm	5 cm	1180
10 cm	10 cm	1450

A kisebb keverőelemmel végzett fermentációkban alacsonyabb mikofenolsav termelést tapasztaltunk. A törzs erőteljes növekedése következtében a fermentáció második napjára a fermentlé annyira besűrűsödött, hogy a kisebb keverőelemek még magasabb fordulatszámon sem tudták megfelelően átkeverni. Ennek következtében az oldott oxigén koncentrációja lecsökkent, ami a mikofenolsav bioszintézisét kedvezőtlenül befolyásolta.

Két 10 cm átmérőjű keverőlapátot beépítve megvizsgáltuk a keverés fordulatszámának a mikofenolsav termelésre kifejtett hatását. A vizsgálatokban 300, 400 és 500 ford/perc keverést alkalmaztunk. Az egyes fordulatszámokkal működtetett fermentorokban mért mikofenolsav koncentrációk a 7. táblázatban láthatók.

7. táblázat. Keverés sebességének hatása a mikofenolsav termelésre

Keverés (rpm)	mikofenolsav (mg/l)
300	340
400	1300
500	490

A legmagasabb mikofenolsav koncentrációt 400/perc fordulatszámú keverést alkalmazva kaptuk. 300/perc fordulatszámú keverés mellett a 10 cm átmérőjű keverőelemek sem voltak alkalmasak a nagy sűrűségű fermentlé átkeverésére. A keverés fordulatszámát 500/perc értékre növelve a keverőelemek széttördelték a gomba törzs micéliumait, ezzel a mikofenolsav termelés csökkenését okozva. A további vizsgálatokat 400/perc fordulatszámú keverést alkalmazva végeztük.

Megvizsgáltuk a fermentorba bevezetett levegő mennyiségének a mikofenolsav termelésre kifejtett hatását. Az eddig alkalmazott 100 liter/óra levegőbevezetést megemeltük 150 illetve 200 liter/óra értékre, azonban a bevezetett levegő mennyiségének növelése nem eredményezte a mikofenolsav termelés növekedését, ezért továbbra is 100 liter/óra alsó levegőbevezetést alkalmaztunk.

Rázatott lombikos körülmények között nem tapasztaltunk különbséget a mikofenolsav termelésben a 25 és a 28°C-on végzett fermentációk esetén. Laboratóriumi fermentorban is megvizsgáltuk a hőmérsékletnek a mikofenolsav termelésre kifejtett hatását. A 25, 27 és 28 °C-on végzett fermentációk végén mért mikofenolsav koncentrációk a 8. táblázatban láthatók.

8. táblázat. Hőmérséklet hatása a mikofenolsav termelésre

Hőmérséklet	Mikofenolsav (mg/l)
25°C	1360
27°C	1670
28°C	1140

A vizsgált hőfokok közül a magasabb mikofenolsav termelést 25 és 27°C-on kaptuk. A továbbiakban több fermentációt indítva összehasonlítottuk a mikofenolsav bioszintézis mértékét 25 és a 27°C-on. 25°C-on 13 fermentációt végeztünk, amelyekben a mikofenolsav termelés 1280 ± 150 mg/l volt. Ezzel szemben a 27°C-on végzett 31 fermentációban mért mikofenolsav koncentrációk átlaga 1650 mg/l volt 280 mg/l

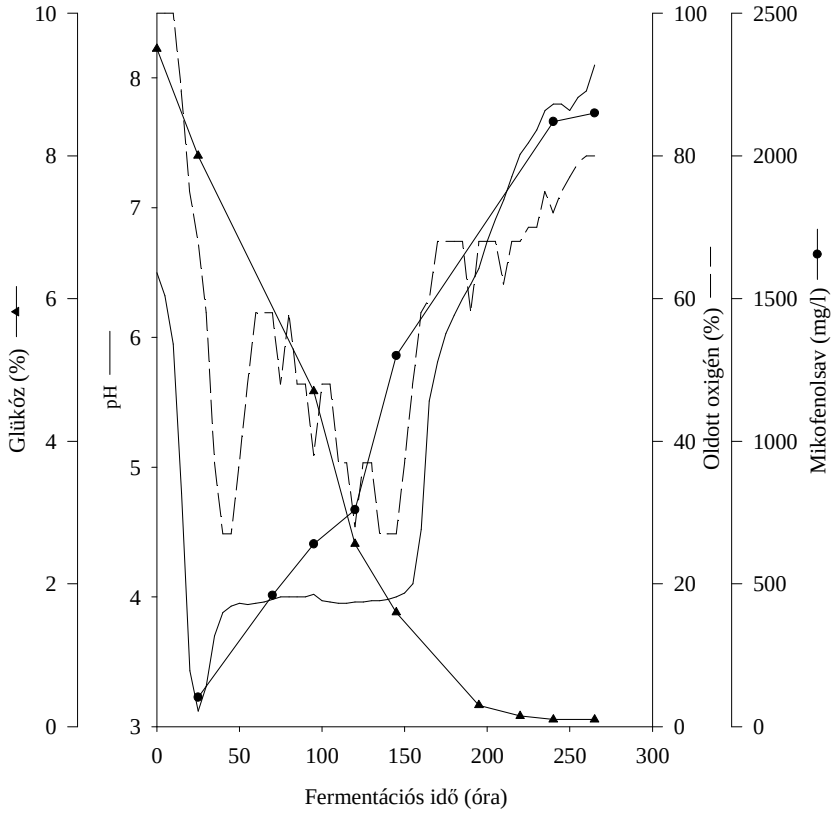
szórással. A mért értékekből látszik, hogy 27°C-on a gomba törzs a mikofenolsavat szignifikánsan magasabb koncentrációban bioszintetizálja. A 27°C-on végzett fermentáció további előnye, hogy a gomba törzs által a mikofenolsav mellett bioszintetizált trihidroxi-mellein koncentrációja lecsökkent. 25°C-on a fermentáció végére a mikofenolsavval kb. azonos mennyiségben képződik trihidroxi-mellein, míg 27°C-on a mikofenolsav koncentrációjának kb. 10%-ában bioszintetizálja azt a gomba törzs.

A fenti kísérletekben 5 literes hasznos térfogatú laboratóriumi fermentorokban optimalizáltuk a fermentációs paramétereket, amelyek alapján a mikofenolsav előállítására az alábbi eljárást dolgoztuk ki.

Penicillium waksmani 3131 jelű törzs 7 napig 25°C-on növesztett MS jelű ferdeagar tenyészetéről 5 ml steril desztillált vízzel lemostuk a spórákat. Ezzel a 10^8 db spórát tartalmazó spóraszuszpenzióval oltottunk be 3000 ml-es Erlenmeyer lombikban 121°C-on 25 percig sterilezett 500 ml MI jelű inokulum táptalajt. Az inokulum tenyészetet 25°C-on 3 napig növesztettük 250 rpm fordulatszámú, 2,5 cm kitérésű síkrázó gépen. Az így kapott inokulum tenyészet 250 ml-ével oltottunk be 5000 ml, laboratóriumi fermentorban 121°C-on 35 percig sterilezett, 0,1% PPG2000-el kiegészített A4 jelű fermentációs táptalajt. A fermentort 27°C-on 400/perc fordulatszámú keveréssel, 100 liter/óra alsó levegőbevezetéssel üzemeltettük 10 napig. A fermentlé bepárlódását az 5. napon a fermentorba adagolt 500 ml steril desztillált vízzel kompenzáltuk.

A 20. ábrán egy az előzőekben leírt eljárás szerint végzett tipikus fermentáció paramétereinek lefutása látható. A pH-t és az oldott oxigén koncentrációt a fermentorba helyezett elektródokkal on line mértük. A mikofenolsav koncentrációját a naponta kivett mintákból HPLC-vel, a glükóz koncentrációját ugyancsak a kivett mintákból törésmutató mérés alapján határoztuk meg. A fermentáció első 24 órája alatt a tenyészet pH-ja a kiindulási 7,0 értékről leesett 3,0-3,5 értékre. A következő 24 óra alatt a pH felemelkedett 4,0 értékre, majd a fermentáció 6-7. napjáig ezen az értéken maradt. A tenyészetből ekkorra fogyott el a glükóz a törésmutató mérése alapján. Ezt követően a

pH meredeken emelkedni kezdett és a tenyésztés 10. napjára elérte a 8-as értéket. A mikofenolsav bioszintézise a fermentáció legelején megkezdődött, azonban az intenzív mikofenolsav termelés a pH emelkedésével egyidejűleg történt. A mikofenolsav koncentrációja a fermentlében a fermentáció 10. napjára elérte a 2000-2100 mg/l értéket.

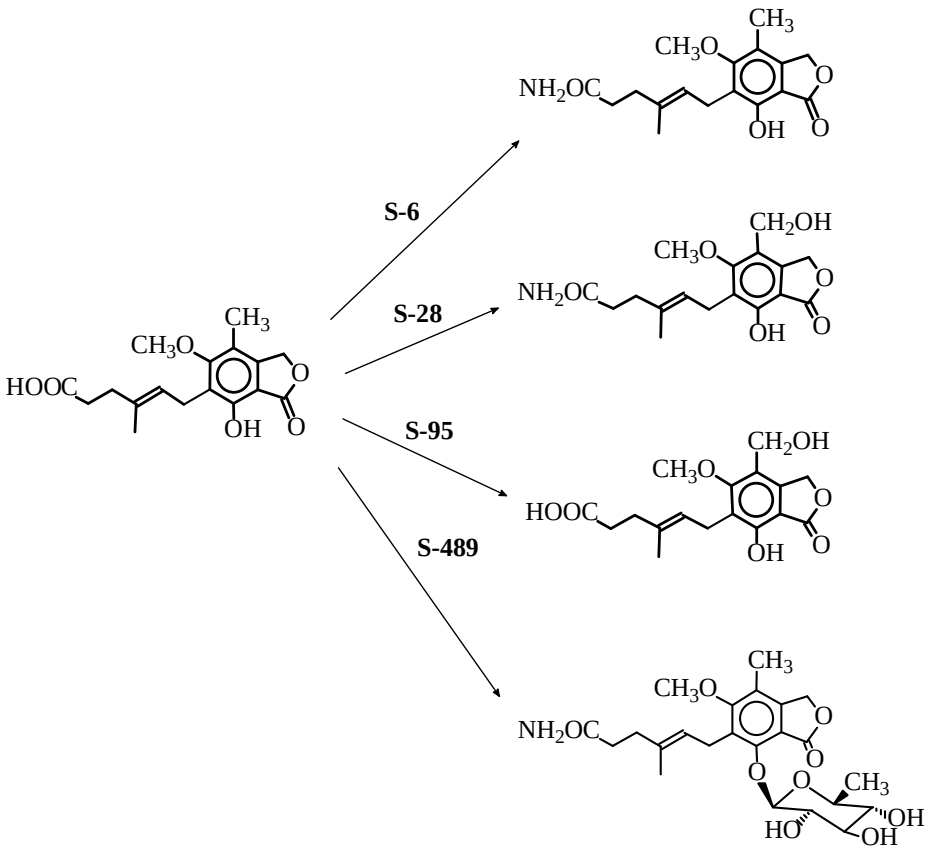


20. ábra. Laboratóriumi fermentációkban a mért paraméterek változása

A kidolgozott eljárás alkalmas arra, hogy alapját képezze egy nagyobb térfogatban végzendő fermentációs eljárás kidolgozásának. Az elvégzett kísérletek eredményeit magyar és világ szabadalmi bejelentésekben foglaltuk össze (Kónya 1999, Kónya 2000).

4.4. Mikofenolsav származékok előállítása

A mikofenolsavból mikrobiológiai úton állítottunk elő különböző származékokat azzal a céllal, hogy a mikofenolsavnál kedvezőbb hatású vegyületeket kapjunk.



21. ábra. Mikofenolsav mikrobiológiai úton előállított származékai

Egy screening program keretében az osztályunk törzsgyűjteményében található, illetve talajmintákból frissen izolált mikroorganizmusokat vizsgáltunk meg, hogy rendelkeznek-e mikofenolsav átalakító képességgel. A mikroorganizmusokat folyékony táptalajra oltottuk, majd a tenyésztés 3. napján a kinőtt tenyészetekhez mikofenolsavat adagoltunk 100 mg/l koncentrációban. Hét nap további tenyésztést követően a fermentleveket vékonyréteg kromatográfiás illetve HPLC módszerrel vizsgáltuk meg. A tenyészetekből a mikofenolsavhoz hasonló ultraibolya spektrummal rendelkező vegyületeket izoláltuk és szerkezetüket azonosítottuk. A több ezer mikroorganizmusra kiterjedő program keretében a mikofenolsav négy származékát sikerült izolálnunk (21. ábra).

Mind a négy származékot *Streptomyces* genusba tartozó törzsek felhasználásával állítottuk elő. Mikofenolsavból a *Streptomyces sp. S-6* jelű törzs mikofenolsav-amidot, a *Streptomyces sp. S-95* jelű törzs a hidroximetil-mikofenolsavat, a *Streptomyces resistomycificus S-28* jelű törzs hidroximetil-mikofenolsav-amidot, a *Streptomyces sp. S-489* jelű törzs ramnozil-mikofenolsav-amidot állított elő (Jekkel 2001). A származékok biológiai aktivitását croton olaj okozta fül-ödéma tesztben vizsgáltuk meg egerekben, összehasonlítva más vegyületekkel. Az eredmények a 9. táblázatban láthatók.

9. táblázat. Mikofenolsav származékok biológiai hatása

Kezelés	Kontrollhoz viszonyított gátlás (%)
dexametazon (0,1%)	60-70
hidrokortizon (1%)	60-70
mikofenolsav (5%)	30-40
mikofenolsav Na só (5%)	30-40
hidroximetil-mikofenolsav (5%)	nincs hatás
mikofenolsav-amid (5%)	30-35
hidroximetil-mikofenolsav-amid (5%)	nincs hatás
ramnozil-mikofenolsav-amid (5%)	20-30

Az eredményekből látható, hogy a mikofenolsav-amid és a ramnozil-mikofenolsav-amid hatása a mikofenolsav aktivitásához hasonló, ezért a két vegyület más módszerekkel történő további vizsgálata szükséges.

A mikofenolsav aromás magján található metil-csoport hidroxilezése viszont az aktivitás teljes elvesztésével járt. Ez az eredmény egybevág Nelson közleményével (1996), amely szerint a molekula aromás magján található metil-csoport esszenciális az aktivitáshoz.

4.5. A törzsek kariotipusának vizsgálata

Vizsgálatokat végeztünk a mikofenolsav termelő *Penicillium waksmani* törzs kariotipusának meghatározására pulzáló gélelektroforézis technika felhasználásával. A pulzáló gélelektroforézis kísérletek sikere szempontjából különösen fontos a megfelelő mintaelőkészítés. A törzsekből tenyészeteket állítottunk elő, amelyekből protoplasztokat képeztünk. A protoplasztokat megolvasztott agarba kevertük, majd hagytuk megdermedni. A sejteket az így elkészített agarkockákban, plugokban tártuk fel. A DNS-t tartalmazó plugokban megfelelő mennyiségű, ép, nem töredezett kromoszómának kellett lenni, hogy a futtatás után kiértékelhető képet kapjunk. Ennek eléréséhez megfelelő mennyiségű protoplasztot kellett előállítani. Tapasztalataink alapján egy plugnak minimum 10^7 db protoplasztot kellett tartalmaznia, hogy a feltárást követően megfelelő mennyiségű ép kromoszóma álljon rendelkezésre.

Első lépésként a protoplasztképzést optimalizáltuk. A tenyészet életkora döntő fontosságú a protoplasztképzés szempontjából. A túl fiatal tenyészet kevés protoplaszt képzésre alkalmas micéliumot és sok, még ki nem csírázott spórát tartalmazott, amelyekből bonyolult a protoplasztképzés. Az idős micéliumokat tartalmazó tenyészetből képzett protoplasztok viszont gyorsan lizáltak. Kísérleteink alapján protoplaszt képzésre legalkalmasabb a 36-48 órás tenyészet.

A plugok előállítását követően a futtatásokhoz BIO-RAD CHEF-DR III futtató rendszert használtunk, az elkészült géleket etidium-bromidos festést követően BIO-RAD

Fluor-S MultiImager készülékkel értékeltük ki. A kromoszómák elválasztását 0.5 x TBE pufferben, 0,8%-os agaróz gélben, 10°C-on végeztük a 10. táblázatban látható futtatási paraméterekkel:

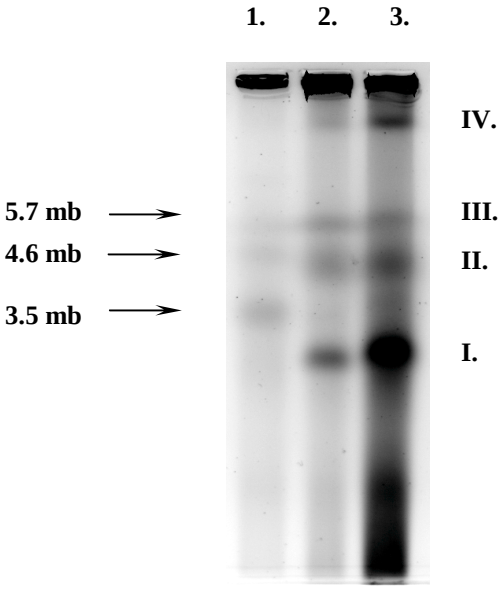
10. táblázat. Pulzáló gélelektroforézis paraméterek a kromoszómák elválasztásához

ciklus	kapcsolási idő (másodperc)	futtatási idő (óra)	feszültség grádiens (V/cm)	szög (°)
1	500	30	3	106
2	1200	30	2	96
3	1500	30	2	100
4	1800	30	2	106
5	2400	48	1,5	106

Az első futtatásokat 14°C-on végeztük, azonban a hőmérséklet 10°C-ra csökkentésével a kromoszómáknak a gélben, futtatás közben történő degradációját vissza tudtuk szorítani. Az első ciklusban a magasabb feszültség grádiens következtében az ép kromoszómák lassabban, míg a DNS törmelék gyorsabban mozog a gélben. A törmelék így a kromoszómák előtt futva kevésbé zavarja a gél kiértékelését. A 22. ábrán a talajmintából izolált *Penicillium waksmani* törzs kariotipusa látható.

Több független kromoszóma izolálás és futtatás alapján a talajmintából izolált *Penicillium waksmani* törzs eddig elválasztott kromoszómáinak a mérete:

Jel	méret (Mb)
I	3,0 ± 0,3
II	4,7 ± 0,35
III	5,8 ± 0,4
IV	10,5 ± 0,2
Σ	24,0

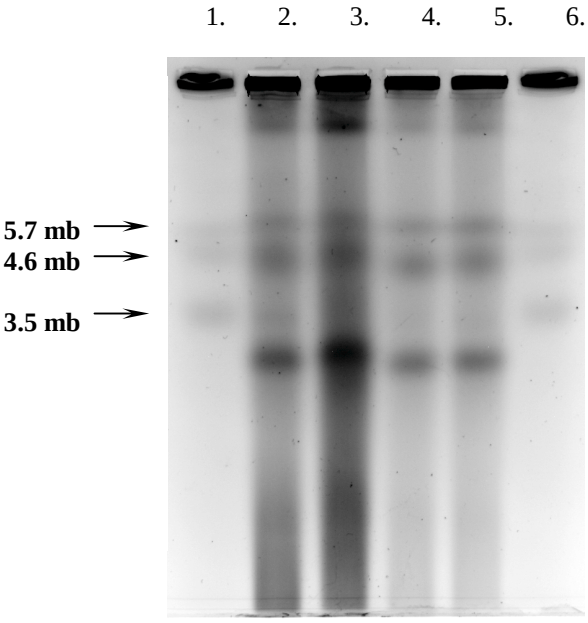


22. ábra. *Penicillium waksmani* törzs kariotipusa (1. sáv: *S. pombe* standard, 2,3.sáv: *Penicillium waksmani* két független minta előkészítéssel)

Az 22. ábrán látható, hogy az I. kromoszóma sokkal intenzívebb jelet adott a gélben, mint a többi kromoszóma, ezért elképzelhető, hogy a törzs két 3 Mb méretű kromoszómát tartalmazott. A törzs genomjának mérete 24, illetve ha két 3 Mb méretű kromoszómával számoltunk, akkor 27 Mb-nak adódott. Az irodalomban leírtak alapján a *Penicillium* genusba tartozó fajok genomjának mérete 23-40 Mb, így elképzelhető, hogy a mikofenolsav termelő törzsünk rendelkezik egy, még eddig el nem választott kromoszómával.

Fierro és mtsai (1993) különbséget tudtak kimutatni a kromoszómák méretében az eredetileg izolált, penicillint termelő *Penicillium chrysogenum* törzs és a törzsfejlesztés során előállított mutáns törzsek kariotipusai között. A kromoszómák méretében talált különbségeket összefüggésbe tudták hozni a penicillin termelésben meglevő különbségekkel. Megvizsgáltuk, hogy az eredeti, talajmintából izolált

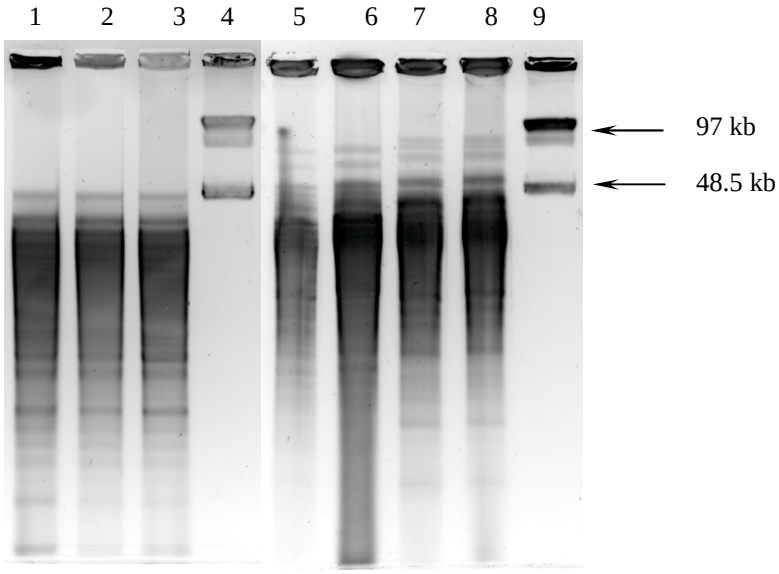
Penicillium waksmani törzs és a törzsfejlesztés során izolált mutáns törzsek kariotipusa között kimutatható-e különbség.



23. ábra. *Penicillium waksmani* törzsek kariotipusa (1., 6. sáv: *S. pombe* standard, 2.sáv: 482, 3. sáv: 2196, 4. sáv: 9/14, 5. sáv: 3131)

A 23. ábrán az eredeti izolált *Penicillium waksmani* törzs, valamint a 2196, 9/14 és a 3131 jelű mutáns törzsek kariotipusa látható. A vizsgált törzsek elválasztott kromoszómái azonos méretűnek bizonyultak, tehát a törzsfejlesztés során a mikofenolsavat bioszintetizáló törzs genomjában bekövetkezett változások nem mutathatók ki a kromoszómák méretének vizsgálatával.

Ugyancsak megpróbáltuk a törzsfejlesztés során a mutáns törzsekben keletkezett különbségeket a restrikciós fragment mintázatukban kimutatni. A különböző mutáns törzsekből készített kromoszóma preparátumokat restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd a futtatást követően összehasonlítottuk a mintázatokat.

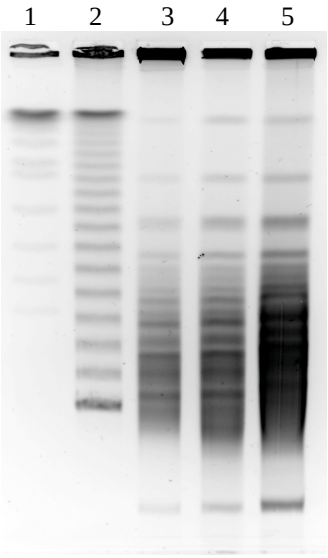


24. ábra. A vizsgált törzsek restrikciós fragment mintázata. (4., 9. sáv: Lambda ladder standard, 1.sáv: 482 törzs, XbaI, 2. sáv:3131 törzs, XbaI, 3. sáv: 9/14 törzs, XbaI, 5. sáv:3131 törzs, NheI, 6. sáv:482 törzs, NheI, 7. sáv: 3131 törzs SpeI, 8.sáv: 482 törzs SpeI)

Először 6 bázis felismerőhellyel rendelkező enzimekkel emésztettük a kromoszóma preparátumokat. A restrikciós endonukleázok közül XbaI, NheI, SpeI, AsfI, HindIII, EcoRI, EcoRV és MluI enzimeket használtunk. Az enzimekkel történt emésztés után 0.5-100 kb méretű fragmenteket kaptunk. A fragmenteket pulzáló gélelektroforézissel választottuk el, amelyben 1% agaróz koncentrációt, 10°C hőmérsékletet, 5V/cm feszültség grádienst, 1-6 másodperc kapcsolási időt, 120°-os feszültség irány váltakozást és 9 óra futtatási időt használtunk paramétereknek. A 24. ábrán példaként az XbaI, NheI és az SpeI enzimekkel történt emésztés és a gélelektroforézis után kapott mintázatok láthatók.

Nyolc bázis felismerőhellyel rendelkező restrikciós endonukleázok közül NotI enzimet használtunk. Az emésztéssel 40-760 kb méretű fragmenteket kaptunk. A fragmentek elválasztását pulzáló gélelektroforézissel végeztük, 1% agaróz koncentráció,

10°C hőmérséklet, 6V/cm feszültség grádiens, 10-65 másodperc kapcsolási idő, 120°-os feszültség váltakozás és 17 óra futtatási idő paraméterekkel. A futtatás eredményeként kapott fragment mintázatok a 25. ábrán láthatók.

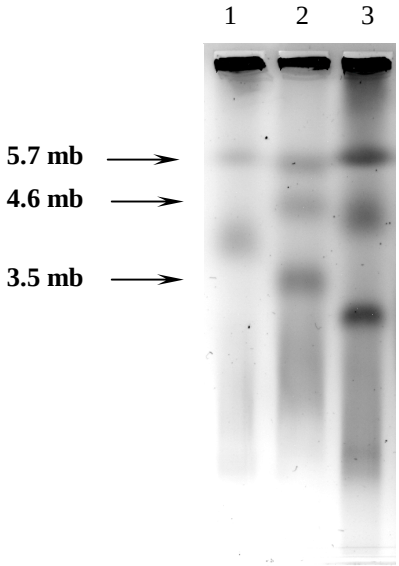


25. ábra. A vizsgált törzsek restrikciós fragment mintázata. (1. sáv: *Saccharomyces cerevisiae* standard, 2. sáv: Lambda ladder standard, 3.sáv: 482 törzs, 4. sáv:3131 törzs, 5. sáv: 2196 törzs)

Az eredeti, talajmintából izolált *Penicillium waksmani* törzs és a törzsfejlesztés során izolált különböző mutáns törzsek között a restrikciós fragment mintázatok vizsgálatával sem tudtunk különbségeket kimutatni.

Összehasonlítottuk az általunk izolált *Penicillium waksmani* törzs elektroforetikus kariotipusát az irodalomban leírt egyéb mikofenolsav termelő törzs kariotipusával. A szakirodalomban legtöbbet a *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* törzset vizsgálták, ezért ezt a törzset választottuk az összehasonlító vizsgálathoz. Az általunk izolált törzs vizsgálatakor a minta-előkészítéshez kidolgozott módszer a

Penicillium brevicompactum ATCC 9056 törzs esetén is megfelelőnek bizonyult. A kromoszómák elválasztásához a 10. táblázatban látható paramétereket használtuk.



26. ábra. Mikofenolsav termelő *Penicillium* törzsek kariotipusa (1. sáv: *P. brevicompactum ATCC 9056*, 2. sáv: *S. pombe* standard, 3. sáv: *Penicillium waksmani*)

A *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* törzs két kromoszómáját tudtuk elválasztani a 3-10 Mb mérettartományban. A kisebbik kromoszóma 4.1 Mb, a nagyobbik 5.7 Mb méretűnek adódott. A 26. ábrán a két vizsgált törzs kariotipusa látható. A törzsek a vizsgált mérettartományban mind a kromoszómák számában, mind azok méretében erősen különböznek egymástól. A kromoszómák vizsgálatával kapott eredmény megerősíti a taxonómiai vizsgálat eredményét, miszerint az általunk izolált törzs kromoszóma szinten is különbözik a szakirodalomban vizsgált *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* jelű törzstől.

4.6. Új tudományos eredmények

1. Egy screening program keretében izoláltunk egy, a *Penicillium waksmani* fajba sorolható gomba törzset, amely 100 mg/l mikofenolsavat termelt. A *Monoverticillata* szekcióba tartozó fajok közül az általunk izolált *Penicillium waksmani* törzs az első, amelyről leírták a mikofenolsav bioszintetizáló képességet.
2. A törzs genetikai fejlesztésével és a fermentációs körülmények optimalizálásával eljárást dolgoztunk ki a mikofenolsav laboratóriumi fermentorban történő előállítására, amellyel 2000 mg/l koncentrációban tudtunk mikofenolsavat előállítani.
3. Számítógépes programot írtunk különböző fermentációs paraméterek regresszió számításon alapuló optimalizálásához.
4. A törzs genetikai fejlesztése során izoláltunk a mikofenolsav bioszintézisében sérült mutáns törzseket is.
5. Mikrobiológiai úton, *Streptomyces* törzsekkel a mikofenolsav négy származékát állítottuk elő. A farmakológiai vizsgálatok alapján a mikofenolsav-amid és a ramnozil-amid származék a mikofenolsavéhoz hasonló aktivitást mutatott. A hatástani vizsgálatok megerősítették, hogy a mikofenolsav aromás magján található metil-csoport esszenciális a vegyület aktivitásához, hidroxilezése pedig az aktivitás elvesztésével jár.
6. Meghatároztuk a mikofenolsav termelő *Penicillium waksmani* törzs elektroforetikus kariotipusát pulzáló gélelektroforézis technika alkalmazásával. A törzs kromoszómáinak mérete: 3,0, 4,7, 5,8 és 10,5 Mb. A törzs genomjának mérete az elválasztott kromoszómák alapján 24-27 Mb.
7. Összehasonlítottuk az általunk izolált törzs és az irodalomban vizsgált mikofenolsav termelő *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* jelű törzs elektroforetikus kariotipusát. A *P. brevicompactum ATCC 9056* törzs esetében a 10 Mb alatti tartományban két kromoszómát sikerült elválasztanunk, melyek mérete: 4,1 és 5,7 Mb. Az elektroforetikus kariotipusok vizsgálata megerősítette

a taxonómiai vizsgálatok eredményeként kapott faji szintű különbséget a vizsgált két törzs között.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A különböző biológiai aktivitással rendelkező, mikrobiológiai eredetű gyógyszerek előállítása több évtizedes múltra tekint vissza. Az újonnan izolált, mikroorganizmusok által bioszintetizált hatóanyagokról folyamatosan megjelenő közlemények azt mutatják, hogy a mikrobiológiai eredetű hatóanyagok a jövőben is nagy szerepet fognak játszani a gyógyászatban. A legtöbb mikrobiológiai eredetű hatóanyagot az antibiotikumok között találjuk, azonban más betegségek kezelésében is elterjedten alkalmazzák azokat. Az egyik ilyen alkalmazási terület az immunszuppresszív terápia, amelyet a szervátültetéseket követően alkalmaznak a beültetett szerv kilökődésének megakadályozására. Mivel a szervátültetések száma évről-évre növekszik, fontos a különböző mikrobiológiai eredetű immunszuppresszív hatóanyagok kutatása. Az egyik újabban a terápiába bevezetett gyógyszer hatóanyag a mikrobiológiai eredetű mikofenolsavnak a morfolinoetil-észter származéka.

Az Intézetünkben folytatott screening program keretében talajmintából izoláltunk egy mikofenolsav bioszintézisére képes gomba törzset. A munkánk egyik célja a gomba törzs felhasználásával mikofenolsav ipari előállítására alkalmas eljárás kidolgozása volt. A talajmintából izolált gomba törzs a taxonómiai vizsgálatok alapján a *Penicillium* genusz *Monoverticillata* szekciójába a *Penicillium waksmani* fajba sorolható be. A szakirodalomban eddig csak a *Penicillium* genusz *Asymmetrica* szekciójába tartozó fajokról volt ismert a mikofenolsav bioszintetizáló képesség. Ezért az általunk izolált gomba törzs bizonyítja, hogy a mikofenolsav bioszintetizáló képesség nem korlátozódik az *Asymmetrica* szekcióba tartozó fajokra.

Az ipari eljárás kidolgozása során a törzs mikofenolsav bioszintetizáló képességet fokoztuk mutációs szelekciós eljárással illetve a fermentációs táptalajt és körülményeket optimalizáltuk. A kidolgozott eljárás alapján 5 literes hasznos térfogatú laboratóriumi fermentorban 2000 mg/l koncentrációban tudunk mikofenolsavat előállítani. Az eljárás alkalmas arra, hogy alapját képezze a léptéknövelésnek, a mikofenolsav ipari, nagyobb térfogatú fermentorokban történő előállításához. A mutációs-szelekciós kísérletekben a mikofenolsavat magasabb koncentrációban bioszintetizáló mutáns törzseken kívül a bioszintézisben sérült mutánsokat is izoláltunk,

amelyek a mikofenolsav képződésének egy későbbi biokémiai, genetikai vizsgálatában hasznosíthatók. Az egyik mutáns a mikofenolsav bioszintézisének elején, az aromás mag kialakulását megelőző lépések egyikében, a másik mutáns a mikofenolsav oldalláncának kialakulásában sérült.

Egyes mikrobiológiai eredetű hatóanyagok biokonverziójával előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező származékokhoz lehet jutni. Ezért kísérleteket végeztünk a mikofenolsav mikrobiológiai módosításával. Ennek eredményeként különböző *Streptomyces* fajok felhasználásával mikofenolsav-amidot, hidroximetil-mikofenolsavat, hidroximetil-mikofenolsav-amidot és a mikofenolsav-amid ramnozil-származékát állítottuk elő. A származékok farmakológiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy az amid-származék és a ramnozil-származék aktivitása a mikofenolsavéhoz hasonló volt, míg a metil-csoport hidroxilezésével előállított származékok elvesztették aktivitásukat. Ez megerősíti a szakirodalomban leírtakat, miszerint a mikofenolsav aromás magján található metil-csoport esszenciális az aktivitáshoz. A továbbiakban érdemes az előállított származékokat más tesztekben is megvizsgálni illetve érdemes a screening programot folytatni újabb mikofenolsav származékok izolálása céljából.

Pulzáló gélelektroforézis technika alkalmazásával meghatároztuk az általunk izolált mikofenolsav bioszintetizáló *Penicillium waksmani* törzs kariotipusát. A vizsgálatokban a törzs négy kromoszómáját sikerült elválasztani, amelyek méretét 3, 4,7, 5,8, és 10,5 Mb-nak számoltuk. A 3 Mb méretű kromoszóma sokkal erősebb foltot adott a gélben, ezért elképzelhető, hogy a törzs két 3 Mb méretű kromoszómát tartalmaz. Az eddig elválasztott kromoszómák mérete alapján a törzs genomjának mérete 24-27 Mb. A szakirodalomban vizsgált, a *Penicillium* genuszba tartozó fajok genomjának mérete alapján elképzelhető, hogy a törzs tartalmaz még egy, eddig el nem választott kromoszómát. Összehasonlítottuk az általunk izolált *P. waksmani* és a szakirodalomban elterjedten használt mikofenolsav bioszintetizáló *P. brevicompactum ATCC 9056* jelű törzs kariotipusát. A *P. waksmani* négy kromoszómájával szemben ugyanabban a mérettartományban a *P. brevicompactum ATCC 9056* törzs két kromoszómáját tudtuk kimutatni, melyek mérete 4,1 és 5,7 Mb-nak adódott. Ez az eredmény megerősíti a taxonómiai vizsgálatokat, miszerint a két törzs különbözik egymástól.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikroorganizmusok, és közöttük is a fonalas gombák gazdag tárháza a különböző biológiai aktivitással rendelkező hatóanyagoknak. Egy, a *Penicillium* genuszba tartozó fajok által termelt szekunder metabolit a mikofenolsav, amelynek több különböző biológiai aktivitását leírták a felfedezése óta eltelt időben. Közölték antibakteriális, antifungális, vírusellenes, tumorgátló és immunszuppresszív hatását is. A különböző aktivitások a mikofenolsav inozin monofoszfát dehidrogenáz enzim gátló hatására vezethetők vissza, amellyel a guanozin bioszintézist és ezzel a sejtosztódást gátolja. Gyógyászati alkalmazást immunszuppresszív hatása alapján nyert, a szervátültetéseket követően az új szerv kilökődésének elkerülése céljából. Mivel a szervátültetések száma évről évre növekszik, ezért fontos a különböző immunszuppresszív hatású anyagok kutatása, hatékonyabb illetve kevesebb mellékhatással járó kezelések eléréséhez.

Több mint 8000 mikroorganizmusra kiterjedő screening programot folytattunk különböző biológiai aktivitással rendelkező hatóanyagok izolálása céljából. A screening program keretében a mikroorganizmusok fermentleveinek az antifungális aktivitását is megvizsgáltuk. Egy széles spektrumú antifungális aktivitással rendelkező fermentléből izoláltuk a mikofenolsavat, amelyet egy indiai talajmintából izolált fonalas gomba törzs bioszintetizált. Az új törzs izolátum a taxonómiai vizsgálatok alapján a *Penicillium waksmani* fajba sorolható be. A szakirodalomban több, a *Penicillium* genuszba tartozó faj mikofenolsav bioszintetizáló képességét leírták, azonban *Penicillium waksmani* fajba tartozó törzsről még nem közölték a mikofenolsav bioszintetizáló képességet. A *Penicillium waksmani* faj a *Penicillium* genuszon belül a *Monoverticillata* szekcióba sorolható be, míg a szakirodalomban leírt összes mikofenolsav termelő mikroorganizmus a *Penicillium* genusz *Asymmetrica* szekciójába tartozik. Az általunk izolált törzs az első mikofenolsav bioszintetizáló képességgel rendelkező faji szintű képviselője a *Penicillium* genusz *Monoverticillata* szekciójának.

Az izolált *P. waksmani* törzs felhasználásával kezdtük el a mikofenolsav ipari előállítására alkalmas fermentációs eljárás kidolgozását. A mikofenolsav bioszintetizáló

képességet a törzs genetikai fejlesztésével illetve a fermentációs paraméterek optimalizálásával fokoztuk. A törzsfejlesztésben több mutagén ágenst is kipróbáltunk, azonban a mikofenolsav bioszintetizáló képesség növelése szempontjából leghatékonyabbnak az ultraibolya fénnyel történő besugárzás és az N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidinnel történt kezelés bizonyult. A mutagén kezeléseket követően a mutáns törzsek mikofenolsav bioszintetizáló képességét rázatott lombikos körülmények között vizsgáltuk meg. A hatékonyság fokozása érdekében kifejlesztettünk egy gyors előszűrési módszert mikrotiter lemezeken, amellyel a gyenge mikofenolsav termelő mutáns törzseket még a rázatott lombikos kísérletek előtt ki tudtuk szűrni. A törzsfejlesztés során mintegy 7000 mutáns törzs mikofenolsav bioszintetizáló képességét vizsgáltuk meg. A mikofenolsavat magasabb koncentrációban bioszintetizáló törzsek mellett izoláltunk a mikofenolsav bioszintézisében gátolt mutáns törzseket is. A 9/14 jelű törzs a mikofenolsav bioszintézisének az elején, az aromás gyűrű záródása előtti lépések egyikében szenvedett mutációt. E törzs egyben auxotróf is, piridoxint igényel a növekedéséhez. Az SP1 jelű törzs a mikofenolsav bioszintézisének a végén, a farnezil-oldallánc beépülését követő lépésekben szenvedett mutációt. Ennek következtében a farnezil-oldallánc rövidülésének feltételezett köztitermékei izolálhatók a fermentléből.

Az eredeti törzs izolátum genetikai fejlesztése mellett a fermentációs paramétereket is optimalizáltuk a termelőképesség növelése céljából. A mikofenolsav bioszintézise szempontjából legkedvezőbb szén- és nitrogén források kiválasztása után a táptalajkomponensek koncentrációját regressziószámítással és a Box és Wilson által leírt módszerrel optimalizáltuk. A számítások elvégzéséhez Pascal illetve Delphi nyelven számítógépes programot írtunk, amelyet más eljárások kidolgozása során is sikerrel alkalmaztunk. A program a számítások eredményét grafikusan is ábrázolja, ami megkönnyíti az eredmények értékelését. A kísérletekben a 8% glükózt és 1% tripkazint tartalmazó táptalaj bizonyult a mikofenolsav bioszintézise szempontjából optimálisnak.

A rázatott lombikos körülmények között elvégzett kísérleteket követően az eljárás kidolgozását 5 literes hasznos térfogatú laboratóriumi fermentorokban folytattuk, amelyekben meghatároztuk a mikofenolsav bioszintéziséhez legkedvezőbb fermentációs paramétereket.

A törzsfejlesztéssel és a fermentációs paraméterek optimalizálásával kidolgozott eljárás eredményeként laboratóriumi fermentorban 2000 mg/l koncentrációban tudtunk mikofenolsavat előállítani.

Széles körben alkalmazott módszer, hogy hatóanyagokból a hatás fokozása és a mellékhatások csökkentése érdekében különböző származékokat képeznek. Származékok mind mikrobiológiai, mind szintetikus úton előállíthatók. A mikofenolsavból mikrobiológiai úton állítottunk elő származékokat. A mikofenolsavból, mint szubsztrátból a *Streptomyces* genuszba tartozó törzsekkel mikofenolsav-amidot, hidroximetil-mikofenolsavat, hidroximetil-mikofenolsav-amidot és a mikofenolsav-amid ramnozil származékát állítottuk elő. A származékok biológiai aktivitását patkány fül ödéma tesztekben vizsgáltuk meg. Az amid-származék és a ramnozil-származék aktivitása a mikofenolsavéhoz hasonló volt, míg a metil-csoport hidroxilezésével előállított származékok elvesztették aktivitásukat. Az amid és a ramnozil-származékok aktivitását a továbbiakban más tesztekben is összehasonlítjuk a mikofenolsav aktivitásával.

Vizsgálatokat végeztünk a talajmintából izolált mikofenolsavat bioszintetizáló *Penicillium waksmani* törzs kariotipusának megállapítására pulzáló gélelektroforézis technikával. A megfelelő minőségű kromoszómapreparátum készítéséhez először a protoplasztképzés paramétereit optimalizáltuk. A protoplasztképzés paramétereinek megfelelő beállításával sikerült elérni, hogy egy-egy plug 10^7-10^8 protoplasztot tartalmazott, melyeknek feltárását, majd a gélelektroforézist követően értékelhető elválasztást kaptunk. Több független mintaelőkészítési és gélelektroforézis kísérlet eredménye alapján a törzs 4 kromoszómáját sikerült elválasztani. A kromoszómák mérete 3, 4,7, 5,8, és 10,5 Mb-nak adódott. A genom mérete az elválasztott kromoszómák méretéből számolva 24 Mb. A 3 Mb méretű kromoszóma sokkal erősebb jelet adott a többinél a gélben, ezért elképzelhető, hogy két 3 Mb méretű kromoszómával rendelkezik a törzs és így a genom mérete 27 Mb. A szakirodalomban a *Penicillium* genusz különböző fajainak vizsgálata során leírt genom méretek alapján feltételezhető, hogy az általunk vizsgált törzs rendelkezik egy további, még el nem választott kromoszómával is. Összehasonlítottuk az eredeti, talajmintából izolált törzs kariotipusát a törzsfejlesztés során előállított, mikofenolsavat magasabb koncentrációban előállító

illetve a mikofenolsav bioszintézisben sérült mutánsok kariotipusával. Különböző paraméterekkel végzett pulzáló gélelektroforézis futtatásokkal sem tudtunk különbséget kimutatni az eredeti és a mutáns törzsek elektroforetikus kariotipusa között, azaz a vizsgált törzsekben történt mutációk nem kimutathatók a kromoszómák szintjén.

Az általunk izolált törzs kariotipusát összehasonlítottuk a szakirodalomban legtöbbet vizsgált mikofenolsav termelő *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* jelű törzs kariotipusával. A *Penicillium brevicompactum* törzs két kromoszómáját sikerült elválasztani a 3-10 Mb mérettartományban, amelyek mérete 4,1 és 5,7 Mb. A két vizsgált törzs kariotipusa mind a kromoszómák számában mind azok méretében különbözött, ami megerősítette a taxonómiai vizsgálatokat, miszerint az általunk izolált, mikofenolsav termelő törzs különbözik a szakirodalomban elterjedten alkalmazott *Penicillium brevicompactum* törzstől.

ABSTRACT

Microorganisms are a rich source of valuable, biologically active compounds. Some species of the *Penicillium* genus biosynthesize mycophenolic acid, which has a wide range of biological activity. Its antibacterial, antifungal, antiviral, antitumour and immunosuppressive effects has been described. The origin of the different effects is the inhibition of the enzyme inosine monophosphate dehydrogenase by mycophenolic acid. Inhibition of the enzyme decreases the biosynthesis of guanosine and, therefore, reduces the rate of cell proliferation. Mycophenolic acid is used in human therapy as an immunosuppressive drug to prevent the rejection of different organs after transplantation. Because the number of transplantations has been increasing, it is important to investigate such compounds to increase their effects and decrease the side effects.

A screening program has been carried out to isolate microorganisms able to biosynthesize compounds with different biological effects. In this program the antifungal activity of the fermentation broth of 8000 microorganisms has also been investigated. Mycophenolic acid was isolated from a fermentation broth with an antifungal effect. It was produced by a fungal strain isolated from a soil sample found in India. According to taxonomical investigations the fungal strain was identified as an isolate of the *Penicillium waksmani* species, belonging to the *Monoverticillata* section. All species described in the literature as mycophenolic acid producers belong to the *Asymmetrica* section. The species, isolated by us, is the first species of the *Monoverticillata* section with a mycophenolic acid biosynthesizing capacity.

We have developed a fermentation process for the industrial production of mycophenolic acid. The strain's biosynthetic ability to produce mycophenolic acid was improved by genetic modification and by the optimization of the fermentation parameters. Although several mutagenic agents were applied in the strain improvement process, the most efficient methods were irradiation with ultraviolet light and treatment with N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin. After the mutagenic treatments the biosynthetic capacity of the mutant strains was studied under shaken flask

circumstances. We had developed a fast and cost effective pre-screening method in microtiter plates to select the strains with improved mycophenolic acid production. In the strain improvement process more than 7000 strains were examined. In addition to isolating strains with better mycophenolic acid producing capabilities we also isolated strains with block mutations in the genes responsible for mycophenolic acid biosynthesis. One of the latter strains No. 9/14 was a mutant at one of the steps prior to closing the aromatic ring of mycophenolic acid. This strain is auxotroph, it required pyridoxine for growth. Another strain of this type No. SP1 had mutation at a step after the incorporation of the farnesyl side chain in mycophenolic acid. Because of the mutation the intermediates resulting from the shortening of the farnesyl side chain could be isolated from the fermentation broth.

To improve mycophenolic acid production fermentation parameters were also optimized. After selection of the most advantageous carbon and nitrogen sources in the fermentation broth, their concentrations were also optimized using regression analysis and the method described by Box and Wilson. For the calculations we wrote a computer program in Pascal and Delphi programming language. Our program was also successfully used for the development of other fermentation processes. It calculated the regression coefficients and allowed the graphical presentation of the calculated equations. The most advantageous fermentation broth for mycophenolic acid production was found to contain 8% glucose and 1% tripcasin.

After the shaken flask experiments investigations were continued in laboratory fermentors. Having determined the optimum fermentation parameters we developed a fermentation process for the 5 liter scale preparation of mycophenolic acid under agitated-aerated circumstances.

After strain improvement and the optimization of fermentation parameters our fermentation method was able to produce around 2000 mg/l concentrations of mycophenolic acid in 5 liter useful volume laboratory fermentors.

In some cases, the effectiveness of biologically active compound can be increased and the side effects decreased by preparing derivatives from the original compound. They can be prepared by synthetic or microbiological methods. We used

some strains of the *Streptomyces* genus. The strain *Streptomyces resistomycificus S-28* was able to produce hydroxy-mycophenolamide, *Streptomyces sp. S-6* transformed the mycophenolic acid into mycophenolamide, *Streptomyces sp. S-95* transformed mycophenolic acid into hydroxy-mycophenolic acid and *Streptomyces sp. S-489* produced the rhamnosyl derivative of the hydroxy-mycophenolic acid. In pharmacological tests, the effectiveness of the amide and the rhamnosyl amide derivatives was similar to that of mycophenolic acid. The hydroxymethyl derivatives lost their activity. The effectiveness of the amide and rhamnosyl derivatives will also be investigated in further pharmacological tests.

Using pulsed field gel electrophoresis, we investigated the electrophoretic karyotype of the mycophenolic acid producer *Penicillium waksmani* strain isolated from a soil sample. For the preparation of fair quality chromosome samples we first optimized the parameters of the protoplast preparation. Under optimized conditions, we managed to achieve 10^7-10^8 protoplasts/plug concentrations. We separated 4 chromosomes of the strain. The sizes of the chromosomes were 3, 4.7, 5.8 and 10.5 Mb, the size of the genome was 24 Mb as calculated from the sizes of the chromosomes. The strain seems to have two chromosomes of 3 Mb size, since this band was more intense in the gel than the other bands, and therefore the size of the genome might be 27 Mb. It is also possible that the strain isolated by us may have another, unresolved chromosome, because the size of the genome of the *Penicillium* species investigated, was shown, in the literature, to be larger than 30 Mb. We compared the electrophoretic karyotypes of the wild type strain isolated from soil, and different mutant strains isolated in the strain improvement process. We examined mutant strains of higher mycophenolic acid producing capacity and mutant strains unable to biosynthesize mycophenolic acid. No differences were found in the electrophoretic karyotypes of the different strains. The differences between the strains studied were not detectable on the level of chromosomes.

We compared the electrophoretic karyotype of our strain with that of the *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* strain, on which data are available in the literature. We separated two chromosomes of the *P. brevicompactum ATCC 9056* strain in the range between 3 and 10 Mb. One of the chromosomes was of 4.1 Mb, the other

one was of 5.7 Mb. The karyotypes of the two investigated strains differed in the number and in the size of the chromosomes. This finding confirmed the results of the taxonomical investigation according to which the strain isolated by us is different from the *P. brevicompactum ATCC 9056* strain.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Abraham, E.P. (1945) Effect of mycophenolic acid on the growth of Staphylococcus aureus in heart broth. *Biochemical Journal* 39: 398-408.
2. Akamatsu, H., Taga, M., Kodama, M., Johnson, R., Otani, H. and Kohmoto, K. (1999) Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. *Current Genetics*. 35: 647-656.
3. Allison, A.C., Eugui, E.M. (1993a) Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunological Reviews* 136: 5-28.
4. Allison, A.C., Eugui, E.M. (1993b) Mycophenolate mofetil, a rationally designed immunosuppressive drug. *Clinical Transplants* 7:96-112.
5. Allison, A.C., Eugui, E.M. (1996) Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clinical Transplants* 10: 77-84.
6. Alsberg, C.L. and Black, O.F. (1913) Biochemical and toxicological investigations of Penicillium puberulum and Penicillium stoloniferum. Bulletin No. 270. U.S. Department of Agriculture, Bureau of Plant Industry, Washington, D.C.
7. Ando, K., Suzuki, S., Tamura, G. and Arima, K. (1968) Antiviral activity of mycophenolic acid. Studies on antiviral and antitumor antibiotics. IV. *The Journal of Antibiotics* 21: 649-652.
8. Bartman, C.D., Doerfler, D.L., Bird, B.A., Remaley, A.T., Peace, J.N. and Campbell, I.M. (1981) Mycophenolic acid production by *Penicillium brevicompactum* on solid media. *Applied and Environmental Microbiology.* 41: 729-736.
9. Bedford, C.T., Knittel, P., Money, T., Phillips, G.T. and Salisbury, P. (1973) Biosynthesis of mycophenolic acid. *Canadian Journal of Chemistry* 51: 694-697
10. Bently, R. (2000) Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chemical Reviews* 100: 3801-3825
11. Birch, A.J., English, R.J., Massy-Westropp, R.A. and Smith, H. (1958a) Studies in relation to biosynthesis. Part XV. Origin of the terpenoid structures in

mycelianamide and mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society* January: 369-375

12. Birch, A.J., English, R.J., Massy-Westropp, R.A., Slaytor, M. and Smith, H. (1958b) Studies in relation to biosynthesis. Part XIV. The origin of the nuclear methyl groups in mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society* January: 365-368
13. Bird, B.A. and Campbell, I.M. (1982) Disposition of mycophenolic acid, brevinamide A, asperphenamate, and ergosterol in solid cultures of *Penicillium brevicompactum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 345-348.
14. Birkinshaw, J. H., Raistrick, H. and Ross, D.J. (1952) Studies in the biochemistry of micro-organisms. 86. The molecular constitution of mycophenolic acid, a metabolic product of Penicillium brevi-compactum Dierckx. Part 3. Further observation on the structural formula for mycophenolic acid. *Biochemical Journal* 50: 630- 634
15. Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U. and Stahelin, H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocyte agent. *Agents and Actions.* 6: 468-475.
16. Bostock, A., Khattak, M.N., Matthews, R. and Burnie, J. (1993) Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. 139: 2179-2184.
17. Bowen, L., Clifford, K.H. and Phillips, G.T. (1977) Biosynthesis of mycophenolic acid. The synthesis of 6-farnezyl-5,7-dihydroxy-4-methylphthalide in cell free preparation from Penicillium brevicompactum. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 24: 949-950
18. Box, G.E.P. and Wilson, K.B. (1951) On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* 13: 1-38.
19. Boysen, M., Skouboe, P., Frisvad, J. and Rossen, L. (1996) Reclassification of the Penicillium roqueforti group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology-UK.* 142: 541-549.

20. Brody, H. and Carbon, J. (1989) Electrophoretic karyotype of Aspergillus nidulans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6260-6263.

21. Brown, A.G., Smale, T.C., King, T. J., Hasenkamp, R. and Thompson, R.H. (1976) Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*.: 1165-1170.

22. Burton, H.S. (1949) Antibiotics from penicillia. *British Journal of Experimental Pathology.* 30: 151.

23. Canonica, L., Kroszczynski, W., Ranzi, B.M., Rindone, B. and Scolastico C. (1970) The biosynthesis of mycophenolic acid. *Chemical Communications* December: 1357

24. Canonica, L., Kroszczynski, W., Ranzi, B.M., Rindone, B. and Scolastico C. (1971) The biosynthesis of mycophenolic acid. *Chemical Communications* March: 257

25. Canonica, L., Kroszczynski, W., Ranzi, B.M., Rindone, B., Santaniello, E and Scolastico C. (1972) Biosynthesis of mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1.* 21: 2639-2643

26. Carle, G.F. and Olson, M.V. (1984) Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 12: 5647-5664.

27. Chen, S.L. (1981) Optimization of batch alcoholic fermentation of glucose syrup substrate. *Biotechnology and Bioengeneering.* 23: 1827-1836.

28. Chen, T.S., Arison, B.H., Wicker, L.S., Inamine, E.S. and Monaghan, R.L. (1992) Microbial transformation of immunosuppressive compounds. I. Desmethylation of FK506 and immunomycin (FR 900520) by Actinoplanes sp. ATCC 53771. *The Journal of Antibiotics* 45: 118-123.

29. Clark, S.M., Lai, E., Birren, B.W. and Hood, L. (1988) A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogeneous electric fields. *Science*. 241: 1203-1205.

30. Cline, J.C., Nelson, J.D., Gerzon, K., Williams, R.H. and DeLong, D.C. (1969) In vitro antiviral activity of mycophenolic acid and its reversal by guanine-type compounds. *Applied Microbiology*. 18: 14-20.

31. Clutterbuck, P.W., Oxford, A.E., Raistrick, H. and Smith, G. (1932) The metabolic products of the Penicillium brevi-compactum series. *Biochemical Journal* 24: 110-114

32. Colombo, L., Gennari, C., Potenza, D. and Scolastico, C. (1982) 6-Farnesyl-5,7-dihydroxy-4-methylphthalide oxidation mechanism in mycophenolic acid biosynthesis. *Journal of the Chemical Society, Perkin Perkin Transactions 1*. 365-373

33. Cui, C., Ubukata, M., Kakeya, H., Onose, R., Okada, G., Takahashi, I., Isono, K. and Osada, H. (1996) Acetophthalidin, a novel inhibitor of mammalian cell cycle, produced by a fungus isolated from a sea sediment. *The Journal of Antibiotics.* 49: 216-219.

34. Demain, A. (2000) Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* 18: 499-514.

35. Demain, A.L. and Solomon, N.A. (1986) Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

36. Detroy, R.W., Freer, S.N. and Fennel, D.I. (1973) Relationship between the biosynthesis of virus-like particles and mycophenolic acid in *Penicillium stoloniferum* and *Penicillium brevi-compactum*. *Canadian Journal of Microbiology* 19: 1459-1462.

37. Engel, G., Ernst von Milczewski, K, Prokopek, K. and Teuber, M. (1982) Strain-specific synthesis of mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* in blue-veined cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 42: 1034-1040

38. Eugui, E.M., Almquist, S.J., Muller, C.D. and Allison, A.C. (1991) Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scandinavian Journal of Immunology* 33: 161-173.

39. Farber, P. and Geisen, R. (2000) Karyotype of Penicillium nalgiovense and assignment of the penicillin biosynthetic genes to chromosome IV. *International Journal of Food Microbiology.* 58: 59-63.

40. Fierro, F., Gutiérrez, S., Díez, B. and Martín, J.F. (1993) Resolution of four large chromosomes in penicillin-producing filamentous fungi: the penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 Mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 Mb) in *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and General Genetics* 241: 573-578.

41. Florey, H.W., Gilliver, K., Jennings, M.A., and Sanders, A.G. (1946) Mycophenolic acid: An antibiotic from Penicillium breicompactum. *Lancet* 1:46-49.

42. Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P. and Fèvre, M. (1996) Molecular karyotype of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Genetics.* 29: 496-501.

43. Franklin,T.J. (1970) 1203328 számú Egyesült Királyság beli szabadalmi bejelentés.

44. Gosio, B.G.R. (1893) *Accad. Med. Torino* 61: 484

45. Gosio, B.G.R. (1896) Ricerche Batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. *Revista di Igiene e Sanita Pubblica Ann* 7: 825-868.

46. Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J. and Speicher, D.W. (1984) A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226: 544-547.

47. Hightower, R.C., Callahan, T.M. and Upchurch, R.G. (1995) Electrophoretic karyotype of *Cercospora kikuchii*. *Current Genetics.* 27: 290-292.

48. Hinkley, S.F., Fettinger, J.C., Dudley, K. and Jarvis, B.B. (1999) Memnobotrins and memnoconols: novel metabolites from Memnoniella echinata. *The Journal of Antibiotics.* 52: 988-997.

49. Horton, J.S. and Raper, C.A. (1991) Pulsed-field gel electrophoretic analysis of *Schizophyllum commune* chromosomal DNA. *Current Genetics.* 19: 77-80.

50. Itoh, Y., Johnson, R. and Scott, B. (1994) Integrative transformation of the mycotoxin-producing fungus, *Penicillium paxilli*. *Current Genetics.* 25: 508-513.

51. Jekkel A., Barta I., Kónya A., Sütő J., Boros S., Horváth Gy. and Ambrus G. (2001) Microbiological transformation of mycophenolic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11:423-426.

52. Jekkel A., Kónya A., Ilkőy É., Boros S., Horváth Gy and Sütő J. (1997) Microbial conversion of mevinolin. *The Journal of Antibiotics* 50: 750-754

53. Jones, D.F., Moore, R.H. and Crawley, G.C. (1970) Microbial modification of mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society* (C): 1725-1737.

54. Jones, E.L., Epinette, W.W., Hackney, V.C., Menendez, L. and Frost, P. (1975) Treatment of psoriasis with oral mycophenolic acid. *Journal of Investigative Dermatology* 65: 537-542.

55. Kayser, T. and Schulz, G. (1991) Electrophoretic karyotype of cellulolytic *Penicillium janthinellum* strains. *Current Genetics.* 20: 289-291.

56. Kemény S. és Deák A. (1990) Mérések tervezése és eredményeik értékelése. Műszaki Könyvkiadó, Budapest.

57. Kino, T. and Goto, T. (1993) Discovery of FK-506 and update. *Annals of the New York Academy of Sciences* 685: 13-21.

58. Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. and Imanaka, H. (1987a) FK-506, A novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of Antibiotics* 40: 1249-1255.

59. Kino, T., Hatanaka, H., Miyata, S., Inamura, N., Nishiyama, N., Yajima, T., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. and Ochiai, T. (1987b) FK-506, A novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *The Journal of Antibiotics* 40: 1256-1265.

60. Kitamoto, K., Kimura, K., Gomi, K. and Kumagai, C. (1994) Electrophoretic karyotype and gene assignment to chromosomes of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58: 1467-1470.

61. Kónya A., Jekkel A., Barta I., Somogyi Gy., Ambrus G., Horváth Gy., Mózesné Sütő J., Szabó I.M., Szabó A., Salát J. and Boros S. (1999) Eljárás mikofenolsav és származékai előállítására. P9903226 számú magyar szabadalmi bejelentés.

62. Kónya A., Jekkel A., Barta I., Somogyi Gy., Ambrus G., Horváth Gy., Mózesné Sütő J., Szabó I.M., Szabó A., Salát J. and Boros S. (2000) Process for the preparation of mycophenolic acid and derivatives thereof WO 01/21607 számú szabadalmi bejelentés

63. Kónya A., Jekkel A., Sütő J. and Salát J. (1998) Optimization of Compactin Fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20: 150-152.

64. Lafont, P., Debeaupuis, J.P., Gaillardin, M. and Payen, J. (1979) Production of mycophenolic acid by Penicillium roqueforti strains. *Applied and Environmental Microbiology* 37: 365-368

65. Linko, S., Vaheri, H. and Seppälä, J. (1993) Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* on different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39: 11-15.

66. Marinari, R., Fleischmajer, R., Schragger, A.H. and Rosenthal, A.L. (1977) Mycophenolic acid in the treatment of psoriasis: long-term administration. *Archives of Dermatology* 113: 930-932.

67. McCluskey, K., Russel, B.W. and Mills, D. (1990) Electrophoretic karyotyping without the need for generating protoplast. *Current Genetics.* 18: 385-386.

68. Money, T., Bedford, C.T., Fairlie, J.C., Knittel, P. and Phillips, G.T. (1971) Sequence studies in biosynthesis; mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society D.* 7: 323-324

69. Muth, W.L. and Nash, C.H. (1975) Biosynthesis of mycophenolic acid: purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: demethylmycophenolic acid O-methyltransferase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8: 321-327

70. Nagy Á., Vágvölgyi Cs., Balla É. and Ferenczy L. (1994) Electrophoretic karyotype of *Mucor circinelloides*. *Current Genetics.* 26: 45-48.

71. Nazareth, S.W. and Brushi, C.V. (1994) Electrophoretic karyotype of *Fusarium solani*. *Microbiology*. 140: 1373-1375.

72. Nelson, P.H., Carr, S.F., Devens, B.H., Eugui, E.M., Franco, F., Gonzalez, C., Hawley, R.C., Loughhead, D.G., Milan, D.J., Papp, E., Patterson, J.W., Rouhafza, S., Sjogren, E.B., Smith, D.B., Stephenson, R.A., Talamas, F.X., Waltos, A.-M.,

Weikert, R.J. and Wu, J.C. (1996) Structure-activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase by nuclear variants of mycophenolic acid. *Journal of Medicinal Chemistry* 39:4181-4196.

73. Nelson, P.H., Eugui, E.M., Wang, C.C. and Allison, A.C. (1990) Synthesis and immunosuppressive activity of some side-chain variants of mycophenolic acid. *Journal of Medicinal Chemistry* 33: 833-838.

74. Neu, H.C. (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1073

75. Noto, T, Sawada, M., Ando, K. and Koyama, K. (1969) Biological properties of mycophenolic acid. *The Journal of Antibiotics* 22: 165-169.

76. Nulton, C.P., Campbell, I.M. (1978) Labeled acetone and levulinic acid are formed when [^{14}C]acetate is being converted to mycophenolic acid in *Penicillium brevicompactum*. *Canadian Journal of Microbiology* 24: 199-201.

77. Nulton, C.P., Naworal, J.D., Campbell, I.M and Grotzinger, E.W. (1976) A combined radiogas chromatograph/mass spectrometer detects intermediates in mycophenolic acid biosynthesis. *Analytical Biochemistry* 76: 219-233

78. Ochiai, T., Nakajima, K., Nagata, M., Hori, S., Asano, T. and Isono, K. (1987) Studies of the induction and maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. *Transplantation.* 44: 734-738

79. Orbach, M.J., Vollrath, D., Davis, R.W. and Yanofsky, C. (1988) An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* 8: 1469-1473.

80. Ozaki, H, Ishihara, M., Kida, T., Yamanaka, S. and Shibai, H. (1987) Mycophenolic acid production by drug-resistant and methionine or glutamic-acid requiring mutants of *Penicillium brevicompactum*. *Agricultural and Biological Chemistry.* 51: 2509-2514.

81. Plummer, K.M. and Howlett, B.J. (1993) Major chromosomal length polymorphism are evident after meiosis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics*. 24: 107-113.

82. Rymowicz, W., Kautola, H., Wojtatowicz, M., Linko, Y. and Linko, P. (1993) Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in

repeated batch and continuous air-lift bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 39: 1-4.

83. Sabatini, D.M., Erdjument Bromage, H., Lui, M. A mammalian protein that binds to FKBP12 in rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78: 35-43.

84. Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37: 67-75.

85. Serizawa, N., Nakagawa, K., Hamano, K., Tsujita, Y., Terahara, A. and Kuwano, H. (1983) Microbial hydroxylation of ML-236B (compactin) and monacolin K (MB-530B). *The Journal of Antibiotics* 36: 604-607.

86. Shevach, E.M. (1985) The effect of cyclosporin A on the immune system. *Annual Review of Immunology* 3: 397-423.

87. Shimada, T. and Ichinoe, M. (2000) Production of toxic metabolites by Penicillium strains isolated from mold-ripened cheese. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan.* 41: 126-132.

88. Sintchak, M.D., Fleming, M.A., Futer, O., Raybuck, S.A., Chambers, S.P., Caron, P.R., Murcko, M.A. and Wilson, K.P. (1996) Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell.* 85: 921-930.

89. Skatrud, P.L. and Queener, S.W. (1989) An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. *Gene.* 78: 331-338.

90. Spatz, S., Rudnicka, A. and McDonald, C.J. (1978) Mycophenolic acid in psoriasis. *British Journal of Dermatology* 98: 429-435.

91. Stimberg, N., Walz, M., Schörgendorfer, K. and Kück, U. (1992) Electrophoretic karyotyping from *Tolypocladium inflatum* and six related strains allows differentiation of morphologically similar species. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 37: 485-489.

92. Sweeney, M.J., Gerzon K., Harris, P.N., Holmes, R.E., Poore, G.A. and Williams, R.H. (1972a) Experimental antitumor activity and preclinical toxicology of mycophenolic acid. *Cancer Res.* 32: 1795-1802.

93. Sweeney, M.J., Hoffman, D.H. and Esterman, M.A. (1972b) Metabolism and biochemistry of mycophenolic acid. *Cancer Research* 32: 1803-1809.

94. Szabó A., Barta I., Kónya A., Jekkel A. and Ambrus G. (1998) Densitometric determination of mycophenolic acid and related compounds. 10th International Symposium on Instrumental Planar Chromatography, Visegrád

95. Thom, C. and Steinberg, R. (1939) The chemical induction of genetic change in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 25: 329-335.

96. Toivonen, L., Ojala, M. and Kauppinen, V. (1991) Studies on the optimization of growth and indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology and Bioengeneering* 37: 673-680.

97. Vezina, C., Kudelski, A. and Sehgal, S.N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics* 28: 721-726

98. Walz, M. and Kück, U. (1991) Polymorphic karyotypes in related *Acremonium* strains. *Current Genetics*. 19: 73-76.

99. Wehrlé, P. (1997) Experimental designs and statistical tools to optimise the use of excipients. *European Pharmaceutical Review.* November 21-29

100. White, R.J. (1982) Microbiological models as screening tools for anticancer agents: potentials and limitations. *Annual Review of Microbiology* 36: 415-433.

101. Wilkinson, W.H. and Harris, G.C.M. (1943) Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. II. Preliminary examination of a second 100 fungal species. *British Journal of Experimental Pathology.* 24: 141-143.

102. Williams, R.H., Boeck, L.D., Cline, J.C., DeLong, D.C., Gerzon, K., Gordee, R.S., Gorman, M., Holmes, R.E., Larsen, S.H., Lively, D.H., Matthews, T.R., Nelson, J.D., Poore, G.A., Stark, W.M. and Sweeney, M.J. (1968) Fermentation, isolation, and biological properties of mycophenolic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8: 229-233.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Jekkel Antalné dr.-nak támogatásáért és szakmai útmutatásáért. Köszönetemet fejezem ki Dr. Ambrus Gábornak a munkámhoz nyújtott szakmai segítségért.

Köszönöm Törökné Szilágyi Erzsébetnek a labormunkában nyújtott segítséget, amellyel a kísérletek elvégzéséhez hozzájárult.