

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.06.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.06.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/299927**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.10.2004**
(Věstník č. 10/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2002/020044**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2003/000910**

(21) Číslo dokumentu:

2004-67

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

C 12 N 1/20

C 12 P 17/16

(71) Přihlašovatel:

BIOGAL GYOGYSZERGYAR RT, Debrecen, HU

(72) Původce:

Gulyas Eva, Debrecen, HU
Balogh Gabor, Debrecen, HU
Erdei Janos, Debrecen, HU
Seress Peter, Debrecen, HU

(74) Zástupce:

Čermák Karel jr. JUDr. Ph.D., Národní 32, Praha 1,
11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Metabolicky řízený způsob fermentace pro
výrobu pseudomonové kyseliny**

(57) Anotace:

Je popsán zlepšený způsob fermentace pro přípravu pseudomonové kyseliny A (mupirocinu). Metabolicky řízený způsob fermentace se týká kultivace kmene *Pseudomonas* sp. v médiu submerzním způsobem při teplotě přibližně mezi 20 až 30 °C. Hodnota pH fermentačního média je upravována tak, aby byla přibližně 5,5 až 6,0, a to přidáváním zdroje asimilovatelného uhlíku, minerální soli nebo kyselého či alkalického roztoku do fermentačního média. V důsledku toho výsledná fermentační médium obsahuje zvýšený výtěžek vysoce purifikované pseudomonové kyseliny A jako hlavní složky. Pseudomonová kyselina B jako nežádoucí příměs ve fermentačním médiu je významně snížena.

CZ 2004 - 67 A3

METABOLICKY ŘÍZENÝ ZPŮSOB FERMENTACE PRO VÝROBU PSEUDOMONOVÉ KYSELINY

Odkaz na související přihlášku

Tato přihláška si podle 35 U.S.C. §119 (e) nárokuje prospěch z prozatímní patentové přihlášky Spojených Států č. 60/299 927, podané 21. června, 2001, jejíž obsah je celý zahrnut v tomto textu.

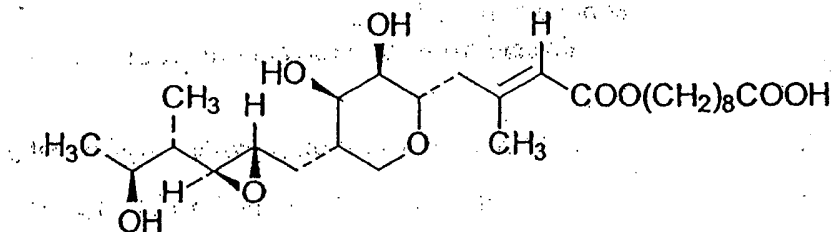
Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká metabolicky řízeného způsobu fermentace pro výrobu pseudomonové kyseliny. Konkrétně se předkládaný vynález týká způsobu fermentace pro výrobu pseudomonové kyseliny A regulací hodnoty pH fermentačního kultivačního média prostřednictvím toho, že se do média přidává dextróza, minerální sůl, jako je například chlorid vápenatý, kyselý roztok nebo alkalický roztok.

Dosavadní stav techniky

Pseudomonová kyselina A, také známá jako mupirocin, představuje hlavní složku pseudomonové kyseliny. Pseudomonová kyselina A byla poprvé objevena autory A. T. Fuller et al. V roce 1971 [Nature, 234, 416, 1971]. Pseudomonová kyselina A má následující chemický název a obchodní názvy: [2S-[2 alpha (E), 3 bleta, 4 bleta, 5 alpha [2R*, 3R* (1R*,2R*)]]]-9-[[3-methyl-1-oxo-4-[tetrahydro-3,4-dihydroxy-5-[[3-(2-hydroxy-1-methylpropyl)oxiranyl]methyl]-2H-pyran-2-yl]-2-butenyl]oxy]-nonanová kyselina, pseudomonová kyselina A, trans-pseudomonová kyselina, BRL-4910A, Bactoderm, Bactroban a Turixin.

Pseudomonová kyselina má topickou antibakteriální terapeutickou aktivitu.



Pseudomonová kyselina A (Mupirocin)

Pseudomonová kyselina A je silné antibiotikum proti Gram(+) baktériím (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*) a některým Gram(-) baktériím (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*) [A. Ward, D. M. Campoli-Richards: *Drugs*, 32, 425-444, 1986]. Má se za to, že mechanismus působení zahrnuje inhibici enzymu isoleucin-tRNA syntázy, který ovlivňuje syntézu peptidů v baktériích [J. Hughes a G. Mellows: *Biochem. Journal*, 191, 209-219, 1980]. Popisy z uvedených literárních odkazů jsou v plném znění zahrnuty formou odkazu.

V současnosti je pseudomonová kyselina vyráběna kultivací *Pseudomonas* sp. Obvyklý dávkovací systém používající tzv. „fed-batch“ technologii zahrnuje zásobování živinami na začátku způsobu fermentace bez regulace pH a koncentrace živin. V důsledku fluktuace hladiny pH a deplece (spotřebování) živin během způsobu fermentace „fed-batch“, výtěžek pseudomonové kyseliny je často snížen. Současné zvýšení množství nežádoucích příměsí často představuje hlavní nevýhodu „fed-batch“ technologie.

Existuje trvalá potřeba zlepšit způsob fermentace pro

přípravu pseudomonové kyseliny, obzvláště zvýšit stupeň čistoty produktu pseudomonové kyseliny A (např. podstatně snížit nežádoucí příměs pseudomonové kyseliny B).

Podstata vynálezu

Podle jednoho aspektu předkládaný vynález poskytuje zlepšený způsob výroby pseudomonové kyseliny obsahující kroky:

- a) přípravy fermentačního média obsahujícího mikroorganismus produkující pseudomonovou kyselinu,
- b) regulace pH fermentačního média a
- c) získání pseudomonové kyseliny z fermentačního média.

Podle dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje účinný způsob výroby pseudomonové kyseliny, která dosahuje vysokého stupně čistoty (tj. poměr nežádoucí příměsi pseudomonové kyseliny B k pseudomonové kyselině A je menší než 3 %). Předkládaný vynález tedy poskytuje zlepšený a ekonomický způsob fermentace pro výrobu zvýšeného výtěžku vysoce purifikované pseudomonové kyseliny A.

Podle dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob fermentace pro výrobu pseudomonové kyseliny s použitím kmene *Pseudomonas sp.* Deponovaného pod číslem kódu NCAIM (P)B 001235 v National Collection of the Agricultural and Industrial Micro-organisms.

Podle dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob fermentace, přičemž pH fermentačního kultivačního média je upraveno tak, aby bylo přibližně 5,5 až 6,0 v průběhu fermentace. Nejvýhodněji je pH fermentačního média regulováno na přibližně 5,7.

Podle dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob

fermentace pro výrobu pseudomonové kyseliny, kde pH je regulováno zásobováním fermentačního kultivačního média zdrojem asimilovatelného uhlíku. Výhodně je zdroj asimilovatelného uhlíku dextróza.

Podle dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob fermentace pro výrobu pseudomonové kyseliny, kde dextróza je udržován v hladině menší než přibližně 0,5 % ve fermentačním médiu během produkční fáze.

Podle dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob fermentace pro výrobu pseudomonové kyseliny, kde fermentační kultura je zásobována roztokem obsahujícím alespoň 0,1% chlorid vápenatý (CaCl_2) během produkční fáze fermentace.

Podle dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob fermentace pro výrobu pseudomonové kyseliny, kde pH fermentačního kultivačního média je regulováno zásobováním fermentačního média alkalickým roztokem a/nebo kyselým roztokem.

Podle dalšího aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob fermentace pro optimální kombinaci zásobování dextrózou a kyselým roztokem. Předkládaný vynález poskytuje optimální kombinaci zásobování dextrózou a kyselinou, která může stimulovat biosyntézu pseudomonové kyseliny během fermentace a zabránit represivnímu účinku nadbytku zdroje uhlíku v médiu.

Podrobný popis vynálezu

Není-li uvedeno jinak, termín "%" se týká % hmotnostního (hmotnost/hmotnost), termín "vvm" označuje „objem vzduchu/objem fermentačního média/minuta“, "HPLC" se týká vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Termín "dextróza" se také týká glukózy.

Jak se v tomto textu používá, termín "submerzní kultura" se týká fermentační kultury, která je tekutá kultura s mícháním a provzdušňováním, termín "fed-batch technologie" se týká způsobu fermentace, kde jedna nebo více složek živin (např. zdroj uhlíku nebo sůl) jsou dodány jako zásoba pouze na začátku fermentačního procesu, "metabolicky řízená" fermentace se týká způsobu fermentace, během kterého je regulována spotřeba zdroje uhlíku nebo dusíku, "produkční fáze" se týká období fermentace, během kterého jsou biosyntetizovány požadované molekuly a "logaritmická fáze" se týká období fermentace, během kterého se mikroorganismus množí logaritmickým způsobem.

Jak se v tomto textu používá, termín "minerální sůl" se týká soli biologicky důležitého prvku a stopového prvku. Výhodně je síran hořečnatý používán jako minerální sůl, která slouží pro regulaci pH a má některé další přídatné účinky. Nejvýhodněji je jako minerální sůl použit chlorid vápenatý.

Jak se v tomto textu používá, termín "asimilovatelný" se týká daného mikroorganismu, který má enzymový systém pro absorpci živin a spotřebu nebo použití nebo rozložení takových živin pro použití v biosyntéze komplexních složek mikroorganismu.

Výhodný mikroorganismus produkující pseudomonovou kyselinu pro provádění způsobu fermentace podle vynálezu je kmen *Pseudomonas* sp. Jiné mikroorganismy produkující pseudomonovou kyselinu zahrnují *Pseudomonas* sp. Progenies, její přírodní varianty a mutanty. Nejvýhodněji je použit kmen *Pseudomonas* sp. Deponovaný pod číslem kódu NCAIM (P)B 001235 v National Collection of the Agricultural and Industrial Micro-organisms.

Výhodně je pH fermentačního média regulováno tak, že pseudomonová kyselina A je zvýšena a pseudomonová kyselina B je snížena (tj. poměr nežádoucí příměsi pseudomonové kyseliny

B k pseudomonové kyselině A je menší než 3 %). Výhodněji je pH fermentačního média regulováno na hladinu pH přibližně mezi 5,2 až 6,2. Nejvýhodněji, pH fermentačního média je pH 5,7.

Výhodně je kmen *Pseudomonas* sp. pěstován v kultivačním médiu submerzním způsobem (submerzní kultura). Výhodně je fermentační kultivace prováděna při teplotě v rozmezí 20 až 30 °C.

Aby se regulovalo pH fermentační kultury, jedno výhodné provedení zahrnuje zásobování zdrojem asimilovatelného uhlíku do fermentačního kultivačního média. Výhodné provedení zdroje asimilovatelného uhlíku je dextróza. V souladu s tím, zásobování dextrózou slouží jako zdroj uhlíku a její meziprodukty a konečné produkty často snižují pH fermentačního média. Nejvýhodněji je zásobování dextrózou je udržováno v hladině menší než přibližně 0,5 % dextrózy ve fermentačním médiu během produkční fáze.

Další výhodná provedení zdroje asimilovatelného uhlíku zahrnují glycerol, rostlinné a živočišné oleje a tuky.

Když je použit glycerol pro zásobování fermentačního kultivačního média jako zdroj asimilovatelného uhlíku, nemá dostatečný účinek na redukci pH fermentačního média. V souladu s tím je často použit kyselý roztok pro současné zásobování fermentačního média, aby byl dosažen optimální účinek. Výhodně kyselé roztoky zahrnují HCl, HNO₃ a H₂SO₄. Nejvýhodněji je kyselý roztok HCl.

Když je pH fermentačního kultivačního média nízké, alkalický roztok je často použit pro zásobování fermentačního média, aby dosáhlo optimální hladiny pH. Výhodně, alkalický roztok použitý pro zásobování fermentačního média zahrnuje NaOH a KOH. Nejvýhodněji je alkalický roztok NaOH.

Další výhodné provedení pro regulaci pH fermentačního

kultivačního média zahrnuje zásobování minerální soli. Výhodně, je pro zásobování fermentačního kultivačního média použit roztok chloridu vápenatého. Výhodněji je použit 0,3-0,8% (hmotnost/hmotnost) roztok chloridu vápenatého. Nejvýhodněji je použit 0,1% (hmotnost/hmotnost) roztok chloridu vápenatého.

Způsob podle vynálezu je detailněji znázorněn v následujících příkladech, které rozsah vynálezu nijak neomezuje.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

	Násadové médium, g/l	Hlavní fermentační médium, g/l
Monohydrát dextrózy	20	20
Sojová mouka	-	50
Glycerin	5	10
Kukuřičný výluh	-	5
Chlorid sodný	0,5	5
Chlorid draselný	0,5	-
Uhličitan vápenatý	4	5
Síran amonný	2	-
Dihydrofosforečnan draselný	0,4	-
Chlorid manganatý x 2H ₂ O	0,03	-
Síran hořečnatý	0,4	-
Slunečnicový olej	2	10
NaOH, HCl	upravení pH	upravení pH
pH před sterilizací	7,0-7,2	6,5±0,3

Kultivace *Pseudomonas sp.* v nasadovém médiu

Nasadové médium (bez dextrózy) bylo připraveno v 60litrové nádobě. Připravené nasadové médium (přibližně 40 litrů) bylo sterilizováno po dobu přibližně 45 minut při teplotě přibližně 120 °C.

Roztok dextrózy byl připraven odděleně. PH roztoku dextrózy bylo upraveno s použitím chlorovodíkové kyseliny na přibližně 4,0-5,0. Roztok dextrózy byl sterilizován po dobu přibližně 25 minut při teplotě přibližně 120 °C. Sterilizovaný roztok dextrózy byl přidán do nasadového média, aby se dosáhlo koncentrace dextrózy 20 gm/l.

Kmen *Pseudomonas sp.* (tj. NCAIM(P)B 001235) byl inokulován do sterilizovaného nasadového média (přibližně 500 ml). Kmen *Pseudomonas sp.* Byl ponechán růst v nasadovém médiu, dokud nedosáhl logaritmické růstové fáze. Kultivace pseudomonas byla prováděna s následujícími parametry:

Teplota: přibližně 25 ± 1 °C,

Hydrostatický tlak: přibližně 400 ± 100 kPa ($0,4 \pm 0,1$ bar),

Rychlost míchání: přibližně 400 ot/min (rpm),

Stupeň provzdušňování: přibližně 0,5 vvm.

Celkový čas na nasadové stádium byl 24 hodin.

Kultivace *Pseudomonas sp.* Ve fermentačním médiu

Hlavní fermentační médium bylo připraveno ve 300 litrové nádobě. Připravené hlavní fermentační médium (přibližně 200 litrů) bylo sterilizováno po dobu přibližně 45 minut při teplotě přibližně 120 °C.

Roztok dextrózy byl připraven odděleně. PH roztoku dextrózy bylo upraveno s použitím chlorovodíkové kyseliny na přibližně 4,0-5,0. Roztok dextrózy byl sterilizován po dobu přibližně 25 minut v přibližně 120 °C. Sterilizovaný roztok dextrózy byl přidán do hlavního fermentačního média.

Poté, co bylo připraveno hlavní fermentační médium, bylo přidáno násadové médium obsahující kmen *Pseudomonas sp.* Po jeho násadovém stádiu. Poměr násadového stádia k hlavnímu fermentačnímu médiu byl přibližně 10 % (hmotnost/hmotnost).

Kultivace fermentačního média byla prováděna s následujícími parametry:

Teplota: přibližně 25±1 °C,

Stupeň provzdušňování: přibližně 0,5-1,0 vvm,

Rychlost míchání: přibližně 300-600 ot/min (rpm), a

Hydrostatický tlak: přibližně 500 kPa (0,5 bar).

Jak rychlost míchání tak stupeň provzdušňování byly upraveny ve výše uvedeném rozsahu, aby se reguloval rozpuštěný kyslík na konstantní hladině 30 % v průběhu celého způsobu fermentace.

Trvání kultivace fermentačního média bylo přibližně 64 hodin. Jestliže nastalo pění média, byl během fermentace do fermentačního média přidán další olej.

VÝTĚŽEK: dosažený výtěžek pseudomonové kyseliny A byl přibližně 2,056 µg/g fermentačního média, jak bylo změřeno prostřednictvím HPLC. Bylo zjištěno, že nežádoucí příměs pseudomonové kyseliny B je přibližně 18 % (hmotnost/hmotnost) pseudomonové kyseliny A.

Určení obsahu a čistoty pseudomonové kyseliny A a pseudomonové kyseliny B:

Určení obsahu a čistoty pseudomonové kyseliny A a pseudomonové kyseliny B bylo založeno na testovací metodě podle USP 24. Test na určení obsahu a čistoty byl prováděn prostřednictvím HPLC, ve které byly vyhodnoceny příslušné koncentrace pseudomonové kyseliny A a pseudomonové kyseliny B, a také hmotnostní poměr pseudomonové kyseliny A a pseudomonové kyseliny B.

Chromatografický systém zahrnoval:

Kolona: LiChrosper 100 RP-18,5 m, 250-4,

Detektor: UV 229 nm,

Rychlost průtoku: 0,7 ml/minuta,

Injekovaný objem: 20 μ l, a

Mobilní fáze: Příprava vhodné směsi s pH 6,3, fosfátový pufr (0,05 M dihydrogenfosforenan sodný) a acetonitril (75: 25).

Standardní roztok:

Navážky pseudomonové kyseliny A a pseudomonové kyseliny B byly vloženy do 100 ml volumetrické baňky, pak následovalo přidání 25 ml acetonitrilu za vzniku směsi, směs byla naředěna fosfátovým pufrem (pH 6,3) a pak byla míchána. Výsledná koncentrace standardů byla přibližně 100 μ g/ml.

Doba: přibližně 15 minut.

Příprava vzorku fermentačního média:

5 ml mupirocinového fermentačního média bylo přeneseno do

10,0 ml volumetrické baňky a naředěno ethanolem (96%),
 ultrasonikováno po dobu 20 minut,
 stočen po dobu 15 minut při 5,000 ot/min (rpm),
 1,0 ml supernatantu byl naředěn 10,0 ml s mobilní fází,
 zfiltrováno přes Millipore filtr (0,45 μ m).

Příklad 2

	Násadové médium, g/l	Hlavní fermentační médium, g/l
Monohydrát dextrózy	20	20
Sojová mouka	-	50
Glycerin	5	10
Kukuřičný výluh	-	5
Chlorid sodný	0,5	5
Chlorid draselný	0,5	-
Uhličitan vápenatý	-	3
Síran amonný	2	-
Dihydrogenfosforečnan draselný	0,4	-
Chlorid manganatý x 2H ₂ O	0,03	-
Síran hořečnatý	0,4	-
Slunečnicový olej	2	10
NaOH, HCl	upravení pH	upravení pH
pH před sterilizací	7,0-7,2	6,5 $\pm$ 0,3

Kultivace *Pseudomonas* sp. v násadovém médiu

Násadové médium (bez dextrózy) byl připraveno v 60 litrové nádobě. Připravené násadové médium (přibližně 40-60 litrů)

bylo sterilizováno po dobu přibližně 45 minut při teplotě přibližně 120 °C.

Roztok dextrózy byl připraven odděleně. Hodnota pH roztoku dextrózy byla upravena s použitím chlorovodíkové kyseliny na přibližně 4,0 až 5,0. Roztok dextrózy byl sterilizován po dobu přibližně 25 minut v přibližně 120 °C. Sterilizovaný roztok dextrózy byl přidán do nasadového média tak, aby koncentrace dextrózy byla 20 gm/l.

Kmen *Pseudomonas sp.* (tj. NCAIM (P) B 001235) byl inokulován do sterilizovaného nasadového média 500 ml. Kmen *Pseudomonas sp.* byl ponechán růst v nasadovém médiu dokud nedosáhl logaritmické růstové fáze. Kultivace *Pseudomonas* byla prováděna s následujícími parametry:

Teplota: přibližně 251 °C,

Hydrostatický tlak: přibližně 40 - 100 kPa (0,4 ± 0,1 bar),

Rychlost míchání: přibližně 400 ot/min (rpm) a

Stupeň provzdušňování: přibližně 0,5 vvm.

Celkový čas na nasadové stádium byl 24 hodin.

Kultivace *Pseudomonas sp.* ve fermentačním médiu

Hlavní fermentační médium bylo připraveno do 300 litrové nádoby. Připravené hlavní fermentační médium (přibližně 200 litrů) bylo sterilizováno po dobu přibližně 45 minut při teplotě přibližně 120 °C.

Roztok dextrózy byl připraven odděleně. Hodnota pH roztoku dextrózy byla upravena s použitím chlorovodíkové kyseliny na přibližně 4,0 - 5,0. Roztok dextrózy byl sterilizován po dobu přibližně 25 minut v přibližně 120 °C. Sterilizovaný roztok dextrózy byl přidán do hlavního fermentačního média tak, aby bylo dosaženo koncentrace 20 gm/l.

Poté, co bylo připraveno hlavní fermentační médium, násadové médium obsahující Kmen *Pseudomonas sp.* po jeho násadovém stádiu bylo přidáno. Poměr násadového stádia k hlavnímu fermentační médiu byl přibližně 10 % (hmotnost/hmotnost).

Kultivace *Pseudomonas sp.* ve fermentačním médiu byla prováděna s následujícími parametry:

Teplota: přibližně 25 ± 1 °C,

Provzdušňování Rychlost: přibližně 0,5-1,0vvm,

Rychlost míchání: přibližně 300-600 ot/min (rpm) a

Hydrostatický tlak: přibližně 50 kPa (0,5 bar).

Jak rychlost míchání tak i stupeň provzdušňování byly upraveny ve výše uvedeném rozsahu tak, aby v průběhu fermentace byla udržována konstantní 30% hladina rozpuštěného kyslíku.

Když fermentační médium dosáhlo pH přibližně 5,5-5,8, pH se začalo zvyšovat. Ve fermentačním médiu bylo pH regulováno na konstantní hladinu přibližně 5,5 až 6,0. Toho bylo dosaženo přidáváním roztoku chlorovodíkové kyseliny do fermentačního média. Doplnovací rychlost kyseliny chlorovodíkové se měnila v závislosti na skutečném pH média.

Doba kultivace ve fermentačním médiu byla přibližně 66 hodin. V průběhu této fermentace byl do fermentačního média přidán další olej, pokud došlo k jakémukoliv pění média.

VÝTĚŽEK: dosažený výtěžek pseudomonové kyseliny byl přibližně 2,251 µg/g fermentačního média podle měření na HPLC. Nežádoucí příměs pseudomonové kyseliny B byla zjištěna přibližně v množství 1,6 % (hmotnost/hmotnost) pseudomonové kyseliny A.

Příklad 3

V tomto příkladu byla příprava nasadového média, hlavního fermentačního média a kultivace kmenu *Pseudomonas* sp. v nasadovém médiu a hlavním fermentačním médiu byly provedeny shodně jako v příkladu 2.

Kultivace ve fermentačním médiu byl také provedena se stejnými parametry kultivace, jak byly definovány v příkladu 2.

Nicméně, hodnota pH fermentačního média v tomto příkladu byla regulována jiným způsobem. Místo toho, aby se do fermentačního média přidávala chlorovodíková kyselina, pH bylo upravováno tím, že se doplňoval roztok dextrózy.

Bylo pozorováno, že když fermentační médium dosáhlo pH přibližně 5,5-5,8, začalo se pH zvyšovat. V tomto příkladu byla hodnota pH regulována na konstantní hladině přibližně 5,5 až 6,0. Toho bylo dosaženo tím, že se doplňoval roztok dextrózy. Doplnovací rychlost roztoku dextrózy do fermentačního média závisela na aktuální hodnotě pH a aktuálním obsahu dextrózy v médiu. Při doplňování dextrózy byla hladina glukózy regulována tak, aby se nezvýšila nad přibližně 0,5 % (hmotnost/hmotnost). Když se pH zvýšilo nad 5,8-6,0 a hladina dextrózy byla vyšší než 0,45 % (hmotnost/hmotnost), hodnota pH se regulovala tak, že se do fermentačního média místo dextrózy přidala chlorovodíková kyselina.

Doba kultivace ve fermentačním médiu byla přibližně 65 hodin. Během fermentace byl přidán další olej, pokud došlo k nějakému pění.

VÝTĚŽEK: dosažený výtěžek pseudomonové kyseliny A byl přibližně 3,021 µg/g fermentačního média, jak bylo změřeno prostřednictvím HPLC. Nežádoucí příměs pseudomonové kyseliny B

byla zjištěna ve výši přibližně 2,9 % (hmotnost/hmotnost) pseudomonové kyseliny A.

Předkládaný vynález není nijak omezen, pokud jde o rozsah nároků, specifickými provedeními popisovanými v textu přihlášky. Různé další modifikace vynálezu, kromě těch, které jsou popsány v textu, budou odborníkům zřejmé na základě předcházejícího popisu a průvodních obrázků. Takové modifikace však spadají do rozsahu připojených nároků.

V popisu jsou citovány různé publikace, které jsou tímto v plném rozsahu zahrnuty formou odkazu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob fermentace pro výrobu pseudomonové kyseliny vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:
 - a) připraví se fermentační médium obsahující mikroorganismus produkující pseudomonovou kyselinu,
 - b) reguluje se pH fermentačního média a
 - c) z fermentačního média se získá pseudomonová kyselina.
2. Způsob fermentace podle nároku 1 vyznačující se tím, že pseudomonová kyselina je pseudomonová kyselina A.
3. Způsob fermentace podle nároku 1 nebo 2 vyznačující se tím, že mikroorganismus produkující pseudomonovou kyselinu je vybrán ze skupiny, kterou tvoří kmen *Pseudomonas sp.*, jeho potomstvo, a přírodní varianta nebo mutantní varianta *Pseudomonas sp.*
4. Způsob fermentace podle nároku 3 vyznačující se tím, že kmen *Pseudomonas sp.* je kmen uložený v Národní Sběrce Zemědělských a Průmyslových Mikroorganismů pod číslem NCAIM (P)B 001235.
5. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3 nebo 4 vyznačující se tím, že fermentace probíhá v submerzní kultuře.
6. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3, 4 nebo 5

vyznačující se tím, že fermentace je udržována při teplotě přibližně 20 °C až 30 °C.

7. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5 nebo 6 vyznačující se tím, že hodnota pH fermentačního média je regulována během produkční fáze fermentace.
8. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6 nebo 7 vyznačující se tím, že hodnota pH fermentačního média je regulována na přibližně 5,7.
9. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 nebo 8 vyznačující se tím, že hodnota pH fermentačního média je regulována tím, že se do fermentačního média přidává zdroj asimilovatelného uhlíku.
10. Způsob fermentace podle nároku 9 vyznačující se tím, že doplňování zdroje asimilovatelného uhlíku je metabolicky řízené.
11. Způsob fermentace podle nároku 9 nebo 10 vyznačující se tím, že zdrojem asimilovatelného uhlíku je dextróza.
12. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nebo 11 vyznačující se tím, že hodnota pH fermentačního média je regulována současným přidáváním zdroje asimilovatelného uhlíku a kyselého roztoku do fermentačního média.

13. Způsob fermentace podle nároku 12 vyznačující se tím, že zdroj asimilovatelného uhlíku je glycerol a kyselý roztok je chlorovodíková kyselina.
14. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nebo 13 vyznačující se tím, že hodnota pH fermentačního média je regulována přidáváním minerální soli do fermentačního média.
15. Způsob fermentace podle nároku 14 vyznačující se tím, že minerální sůl je roztok chloridu vápenatého.
16. Způsob fermentace podle nároku 15 vyznačující se tím, že roztok chloridu vápenatého je přibližně 0,1% až 0,8% (hmotnost/hmotnost).
17. Způsob fermentace podle nároku 15 vyznačující se tím, že roztok chloridu vápenatého je přibližně 0,3% (hmotnost/hmotnost).
18. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nebo 17 vyznačující se tím, že hodnota pH fermentačního média je regulována přidáváním alkalického roztoku do fermentačního média.
19. Způsob fermentace podle nároku 18 vyznačující se tím, že alkalický roztok je vybrán ze skupiny, kterou tvoří hydroxid sodný a hydroxid draselný.

20. Způsob fermentace podle nároku 18 vyznačující se tím, že alkalický roztok je hydroxid draselný.
21. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 nebo 20 vyznačující se tím, že hodnota pH fermentačního média je regulována přidáváním kyselého roztoku do fermentačního média.
22. Způsob fermentace podle nároku 21 vyznačující se tím, že kyselý roztok je vybráný ze skupiny, kterou tvoří kyselina dusičná (HNO_3), kyselina sírová (H_2SO_4) a kyselina chlorovodíková (HCl).
23. Způsob fermentace podle nároku 21 nebo 22 vyznačující se tím, že kyselý roztok je kyselina chlorovodíková.
24. Způsob fermentace podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 nebo vyznačující se tím, že hodnota pH fermentačního média je udržována na hodnotě 5,2 až 6,2.
25. Způsob fermentace podle nároku 1 vyznačující se tím, že poskytuje pseudomonovou kyselinu o čistotě alespoň 82% (hmotnost/hmotnost) pseudomonové kyseliny A vzhledem k pseudomonové kyselině B.
26. Způsob fermentace podle nároku 25 vyznačující se tím, že čistota je alespoň 97%.

27. Pseudomonová kyselina, která byla připravena způsobem podle nároku 26.
28. Způsob fermentace pro výrobu pseudomonové kyseliny vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:
- a) připraví se fermentační médium obsahující mikroorganismus produkující pseudomonovou kyselinu a chlorid vápenatý,
 - b) reguluje se pH fermentačního média tím, že se přidává dextróza a po té v případě potřeby kyselina, a
 - c) z fermentačního média se získá pseudomonová kyselina.
29. Způsob fermentace podle nároku 24 nebo 28 vyznačující se tím, že se hodnota pH reguluje na 5,5 až 6,0.
30. Způsob fermentace podle nároku 11, 28 nebo 29 vyznačující se tím, že při regulaci pH koncentrace dextrózy dosáhne nejvýše 0,5 % (hmot./hmot.).
31. Způsob fermentace podle nároku 28, 29 nebo 30 vyznačující se tím, že se přidá kyselina, když pH dosáhne hodnoty nejméně 5,8 a koncentrace dextrózy je přinejmenším 0,45 % (hmot./hmot.).
32. Způsob fermentace podle nároku 1, 28, 29, 30 nebo 31 vyznačující se tím, že poskytuje pseudomonovou kyselinu o čistotě alespoň 82% (hmotnost/hmotnost) pseudomonové kyseliny A vzhledem k pseudomonové

kyselině B.

33. Způsob fermentace podle nároku 32 vyznačující se tím, že čistota je alespoň 97%.
34. Fermentační médium mikroorganismu produkujícího pseudomonovou kyselinu, které obsahuje 97% hladinu pseudomonové kyseliny A vzhledem k pseudomonové kyselině B, přičemž obě kyseliny jsou v médiu přítomny v důsledku fermentace mikroorganismu.
35. Farmaceutická kompozice pseudomonové kyseliny vyznačující se tím, že obsahuje pseudomonovou kyselinu A a farmaceuticky přijatelné excipienty, přičemž hladina pseudomonové kyseliny A je alespoň 97% (hmot./hmot.) vzhledem k pseudomonové kyselině B.
36. Způsob léčení infekce vnímavé k pseudomonové kyselině u zvířete, vyznačující se tím, že se podává kompozice podle nároku 35.