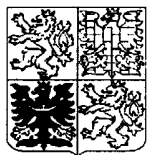


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287 668

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2000 - 1194

(22) Přihlášeno: 12.10.1998

(40) Zveřejněno: 13.09.2000
(Věstník č. 9/2000)

(47) Uděleno: 08.11.2000

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.01.2001
(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: PCT/SK98/00014

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 99/19458

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 12 N 1/14

C 12 P 7/42

C 12 P 7/62

C 12 P 17/06

/(C 12 P 17/06, C 12 R 1:66, C 12 P 7/42, C 12 R 1:66, C 12 P 7/62, C 12 R 1:66)

(73) Majitel patentu:

BIOTIKA A. S., Slovenská Lupča, SK;

(72) Původce vynálezu:

Borošová Gabriela, Banská Bystrica, SK;

Gajdošíková Jana, Banská Bystrica, SK;

Vajcíková Adela, Banská Bystrica, SK;

Vollek Valter, Bratislava, SK;

(74) Zástupce:

Kendereški Dušan, Lidická 51, Brno, 60200;

(54) Název vynálezu:

Nový mutantní kmen *Aspergillus terreus* a způsob fermentace lovastatinu

(57) Anotace:

Postupy klasické mutagenese byl získán nový kmen *Aspergillus terreus* CCM 8236. Je popsán proces aerobní fermentace lovastatinu kmenem *Aspergillus terreus* CCM 8236 ve formě kyseliny v submerzní kultuře v laboratorním měřítku. Příprava inokula probíhá v půdě s nízkým pH. Jako zdroj uhlíku se v produkční půdě využívá směs glukózy a laktózy (poměr 1:22) ve vysoké koncentraci a jako zdroj dusíku Pharmamedia. Na takovéto půdě kmen produkuje více než 2000 mg/l lovastatinu za 170 hodin.

CZ 287668 B6

Nový mutantní kmen *Aspergillus terreus* a způsob fermentace lovastatinu

Oblast techniky

5

Vynález se týká nového kmene mikroorganismu druhu *Aspergillus terreus*, získaného metodou klasické mutagenese (kombinovaným působením fyzikálního a chemického mutagenu), který v optimalizovaném médiu s vhodným zdrojem uhlíku a dusíku produkuje vysoké množství lovastatinu.

10

Dosavadní stav techniky

Lovastatin (MK-803, monakolín K, mevinolin) je sekundární metabolit, který kompetitivně inhibuje enzym 3 – hydroxy – 3 – metylglutaryl – koenzym A/HMG CoA reductázu (EC 1.1.1.34), čímž snižuje endogenní syntézu cholesterolu a tak poskytuje značné množství v terapii hyperlipemie. Důsledkem inhibice MHG CoA reductázy je nejen snížení hladiny cholesterolu v savčích buňkách, ale i indukce cholesterolových receptorů LDL (low density lipoprotein) v játrech, změny v produkci ibuchinonu, izoprenylaci proteinů, syntéze juvenilních hormonů u hmyzu, rostlinných sterolů a pigmentů a fungálních giberelinů. Z chemického hlediska je lovastatin (1S,3S,7S,8S,8aR)-1,2,3,7,8,8a-hexahydro-3,7-dimethyl-8-(2-((2R,4R)-tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2-yl)etyl)-1-naftyl(S)-2-metylbutyrát. Jeho biosyntéza byla u *Aspergillus terreus* ATCC 20542 dokázána pomocí značených substrátů z acetátu polyketidovou dráhou. Přestože přesná struktura klíčových intermediátů mezi acetátem a lovastatinem ještě stále není známa, existuje několik pracovních hypotéz biosyntézy (Wangschal et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2357-2363, 1996). Lovastatin se vyskytuje ve dvou formách: ve formě kyseliny a ve formě laktonu, přičemž biologicky aktivní je kyselinová forma. Od roku 1987 se lovastatin používá ve formě tablet na snižování hypercholesterolemie a na předcházení vzniku ischemické choroby srdce.

30

U.S.Pat. No. 4, 231, 938 a E.P. 0 0022 478 popisují fermentační přípravu lovastatinu a dihydroxymevinolínu produkčním kmenem *Aspergillus terreus* ATCC 20541 a ATCC 20542.

35

U.S.Pat. No. 4,387,242 popisuje fermentační přípravu hypocholesterolemické a hypolipemické látky se strukturou příbuznou lovastatinu tím stejným kmenem *Aspergillus terreus* ATCC 20542.

40

E.P. 0 556 699 se týká procesu přípravy produkčního kmene pro lovastatin z druhu rodu *Aspergillus*, který původně tuto látku neprodukuje (např. *Aspergillus oryzae*). Způsob přípravy takového kmene zahrnuje transformaci protoplastů *A. oryzae* DNA, izolovanou z produkčního kmene *A. terreus*.

45

U.S. Pat. NO. 5,403,728 popisuje mikrobiální proces přípravy lovastatinu ve formě kyseliny i laktonu aerobní fermentací submersní kultury nového druhu *Aspergillus obscurus*.

V patentové literatuře jsou jako produkční kmeny pro lovastatin uváděné i druhy rodu *Monascus* – *M.anka*, *M.purpurous*, *M.ruber*, *M.vitreus*, *M.paxii* (British Patent Specifications Nos. 2,046,737 a 2,049,664).

50

V literatuře se uvádějí i další druhy mikroorganismů, při fermentaci kterých se získávají malá množství lovastatinu. Konkrétně jde o druhy *Phoma* sp. M. 4452, *Doratomyces nanus* IFO 9551, *Gymnoascus umbrinus* IFO 8450 (Endo et al.: J. Antibiot. 39, 1609 – 1610, 1986), *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus saca* a *Pleurotus sapidus* (Gunde – Cimerman, FEMS Mikrobiology Letters 11, 203 – 206, 1993).

- Přestože bylo v patentové literatuře popsáno více kmenů druhu *Aspargillus terreus*, produkujících lovastatin, jeho výtěžnost u patentovaného kmene *A. terreus* ATCC 20542 je poměrně nízká. Nedostatkem je také fakt, že složky fermentačních půd opublikovaných v patentech U.S.Pat. No. 4,231,938, E.P. 0 022478 a U.S.Pat.No. 4,387,242 jsou pro potřeby průmyslové výroby finančně náročné a tím nedostupné.

Podstata vynálezu

- Kombinací použití fyzikálního a chemického mutagenu, které byli aplikované na spory kmene *A. terreus*, byl získán nový mutantní kmen *A. terreus* CCM 8236, který se vyznačuje nadprodukcí lovastatinu. V porovnání s kmenem *A. terreus* ATCC 20542 dosahuje minimálně dvojnásobnou produkci. Inokulační i sporulační půda je složená z dostupných a finančně nenáročných surovin, které jsou běžně využívány při fermentaci sekundárních i primárních metabolitů. Vynález je založený na použití kmene *A. terreus* CCM 8236 na produkci lovastatinu ve formě kyseliny a laktonu, nebo jeho farmaceuticky využitelných solí nebo esterů.

- Původní kmen *A. terreus* s pracovním názvem GB1 poskytl Dr. Vollek. Na základě relativně nejvyšší produkce lovastatinu byl vybrán jako výchozí materiál pro produkční kmen mezi vícero divokými kmeny, identifikovanými také jako *A. terreus*.

Uvedený kmen byl podroben působení fyzikálních a chemických mutagenů s cílem získat produkční kmen pro lovastatin.

- V první fázi šlechtění byl výchozí kmen ovlivněn silným mutagenem N-methyl, N-vitro, N-nitrozoguanidinem (NTG). Vzhledem na zvýšení rezistence mutantů na NTG byli tyto v druhé fázi šlechtění střídavě vystavené působení ultrafialového záření (UV) a NTG. Získané izoláty (pracovně označované písmeny GB a pořadovým číslem) byly testované na výšku produkce lovastatinu. Takovým způsobem byl izolovaný mutant s pracovním označením GB 2033 s výrazně zvýšenou produkcí lovastatinu, který byl deponován v České sbírce mikroorganismů v Brně pod značením CCM 8236. Složení půd – jak sporulačních, tak i inokulačních a produkčních – bylo přizpůsobené pro tento nový kmen.

- Kultivace mikroorganismu, využívaná při fermentačním procesu, kterého se patent týká, probíhá ve třech krocích:

1. sporulace kultury
2. inokulační stupeň
3. produkční stupeň

Pro kvalitu inokula je důležitá rychlá sporulace (v průběhu 4 až 5 dní při 28 °C je kultura kompletně vysporulovaná, spory jsou skořicově hnědé barvy, kolonie jsou ploché, sametového vzhledu bez bílých okrajů, s průměrem cca. 4 cm, lehce smývatelné fyziologickým roztokem s 30 % glycerolu).

Kultivace inokula probíhá při 28 °C při 220 rpm 16 až 20 hodin v půdě s nízkým pH (4,6), které se po dobu kultivace ještě výrazně sníží (3,0 až 3,2). Kvalitní inokulum se vyznačuje následujícími vlastnostmi:

- pelety malé, dobře rozvlákněné
- sediment 20 %
- orientační analytické parametry:

obsah glukózy:	40 g/l
obsah fosforu:	200 mg/l
obsah NH ⁴⁺ :	0,2 g/l
obsah NH ₂ ⁻ :	0,1 g/l

Kultivace produkčního stupně probíhá při 28 °C při 220 rpm 170 až 190 hodin. Produkční půda obsahuje vysokou koncentraci uhlíkatých zdrojů (glukóza a laktóza) v přesně definovaném poměru (1:22) ve prospěch laktózy. Jako zdroj dusíku je nevyhnutelné používat organický zdroj, např. sojovou mouku, inaktivované pekárenské droždí apod. Nejvyšší produkce byly dosahované
 5 na půdě, obsahující jako zdroj dusíku bavlníkovou mouku Pharmamedia. Anorganický dusík v půdě ve formě NN_4^+ má na produkční schopnost kmene výrazně negativní účinek. Stejně se projevuje i posunutí poměru uhlíkatých zdrojů ve prospěch glukózy.

10 Z morfologického hlediska je kultura mikroorganismu peletová, pelety jsou malé (cca 0,2 až 0,5 mm), ke konci fermentace se stávají kompaktními a na okrajích se začínají vytvářet konidiofory. Během optimální fermentace sediment vzroste na 45 až 55 %, pH klesne na 6,0 až 5,8, koncentrace fosforu a zdrojů uhlíku klesne na stopová množství.

15 Po ukončení fermentace se pH fermentační půdy upravuje 40% H_2SO_4 na hodnotu 4,6 až 4,8. Lovastatin se extrahuje z takto upraveného vzorku acetonem (1:1) mícháním v ultrazvuku. Produkce se stanovuje metodou HPLC v izokratickém systému 65% acetonitril a 0,1% H_3PO_4 .

20 V takto uskutečněném baničkovém produkčním testu produkuje nový kmen *A. terreus* CCM 8236 minimálně 200 mg/l lovastatinu.

Identita produktu byla ověřena metodou nukleární magnetické rezonance.

25 Nový kmen *A. terreus* CCM8236 se od výchozího kmene GB1 i od patentovaného kmene ATCC 20542 liší i svými různými schopnostmi na různých zdrojích uhlíku, morfologií kolonií a pigmentací média (tab. 1).

30 Produkční kmen *A. terreus*, který je předmětem vynálezu a byl získaný cestou klasické mutageneze, byl uložený v České sbírce mikroorganismů v Brně pod číslem CCM 8236. Jde o stabilní produkční kmen s produkcí 2000 až 3000 mg/l lovastatinu ve formě kyseliny a laktonu, což představuje cca 130–násobné zvýšení produkce oproti výchozímu kmeni a minimálně dvojnásobně zvýšenou produkci oproti kmeni *A. terreus* ATCC 20542. Pro kvalitu očkovacího materiálu je důležitá rychlá sporulace. Inokulační stupeň probíhá při atypickém pH. Složení kultivačních půd plně odpovídá požadavkům průmyslové výroby, což se týká finančních nákladů i dostupnosti jednotlivých složek.

35

Tab. 1 Morfologická charakteristika kmenů *A. terreus* GB1, CCM 8236 a ATCC 20542 na Czapek – Doxově agaru s různými zdroji uhlíku

Zdroj uhlíku	<i>A. terreus</i> GB1	<i>A. terreus</i> CCM 8236	<i>A. terreus</i> ATCC 20542
Glukóza	Vatovité vzdušné mycélium, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 2,5 až 3 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna bleděhnědá 2. okrajová zóna bílá	Vzdušné mycélium matného vzhledu, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 3 až 4 cm, s třemi zónami: 1. centrální zóna bleděhnědá 2. žlutě zabarvená zóna 3. okrajová zóna bílá	Vzdušné mycélium matného vzhledu, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 3 až 4 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna skořicově hnědá 2. okrajová zóna bílá Rozpustný pigment: hnědý
Fruktóza	Vatovité vzdušné mycélium, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 3,5 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna béžová 2. okrajová zóna bílá	Kolonie pravidelného tvaru s průměrem 3 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna bleděhnědá s matným vzhledem 2. okrajová zóna bílá, vatovitá Rozpustný pigment: žlutý	Vatovité kolonie pravidelného tvaru s průměrem 2 až 3 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna skořicově hnědá 2. okrajová zóna bílá Rozpustný pigment: hnědý
Maltóza	Vatovité vzdušné mycélium, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 3,5 až 4 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna bleděhnědá 2. okrajová zóna bílá	Vzdušné mycélium matného vzhledu, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 3,5 až 4 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna hnědá 2. okrajová zóna bílá Rozpustný pigment: žlutý	Vatovité vzdušné mycélium kolonie pravidelného tvaru s průměrem 3 až 4 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna skořicově hnědá 2. okrajová zóna bílá Rozpustný pigment: hnědý
Laktóza	Vatovité vzdušné mycélium, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 2,5 až 3 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna bleděhnědá 2. okrajová zóna bílá	Kolonie nepravidelného tvaru s průměrem 2 až 2,5 cm, vytváří se jen žluté substrátové mycélium přerůstající půdu.	Kolonie nepravidelného tvaru s průměrem 2 až 2,5 cm v centrální zóně vatovité vzdušné mycélium žlutého zabarvení, v okrajové zóně žluté substrátové mycélium přerůstající půdu.
Sacharóza	Vatovité vzdušné mycélium, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 3 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna bleděhnědá 2. okrajová zóna bílá	Kolonie pravidelného tvaru s průměrem 4 až 4,5 cm, s třemi zónami: 1. centrální zóna hnědá, matného vzhledu 2. vatovitá béžová zóna 3. okrajová zóna plochá, matného vzhledu, skořicově hnědá	Vatovité kolonie pravidelného tvaru s průměrem 1,5 až 2 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna hnědá 2. okrajová zóna bílá
Glycerol	Vatovité vzdušné mycélium, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 3 až 3,5 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna žlutá 2. okrajová zóna bílá	Kolonie lalokovitého tvaru s průměrem 1 až 1,5 cm, mycélium ploché, matného vzhledu, béžového zabarvení	Kolonie lalokovitého tvaru s průměrem 1 až 1,5 cm, mycélium ploché, matného vzhledu, se dvěma zónami: 1. centrální zóna skořicově hnědá 2. okrajová zóna bílá
Škrob	Ploché vzdušné mycélium matného vzhledu, kolonie pravidelného tvaru s průměrem 2,5 až 3 cm, s dvěma zónami: 1. centrální zóna bleděhnědá 2. okrajová zóna bílá	Vzdušné mycélium matného vzhledu, kolonie víceméně pravidelného tvaru se střapatými okraji s průměrem 2 až 2,5 cm, s třemi zónami: 1. centrální zóna bleděhnědá 2. skořicověhnědá zóna 3. okrajová zóna bílá	Kolonie pravidelného tvaru s průměrem 2 až 3 cm, mycélium matného vzhledu s dvěma zónami: 1. centrální zóna skořicovohnědá 2. okrajová zóna bílá, výrazně ohraničená

5

Přehled obrázků na výkrese

Obr. 1: Schéma mutačního postupu při získání kmene *Aspergillus terreus* CCM 8236.

- 10 Pozn: Uváděný je způsob (UV – ultrafialové světlo, NTG – N-methyl, N-nitro, N-nitrozoguanidin) a doba ovlivnění (v minutách nebo v sekundách), pracovní označení testovaných izolátů (GB1 až GB2050) a produkce lovastatinu na skriningové půdě (mg/l kyseliny formy a mg/l laktonové formy).

Příklad uskutečnění vynálezu**Příklad 1. Mutageneze kmenu *A. terreus* GB1.**

5

Příprava sporové suspenze: souvislý nárůst mycelia, vysporulovaného na sporulační půdě s rajčatovým protlakem (2 %) a ovesnou moukou (2 %) byl smytý 10 ml fyziologického roztoku a 30 % glycerínu (počet spor $3,5 \times 10^7/\text{ml}$)

10 *Ovlivnění NTG*

1 ml sporové suspenze s počtem spor $10^6/\text{ml}$ a 1 ml zásobníku roztoku NTG (konc. 5 mg/ml) s minimálním množstvím dimethylformamidu (přidávaný pro nízkou rozpustnost NTG ve vodě) byl přidán k 8 ml fyziologického roztoku. Koncentrace NTG v takovém roztoku tedy byla 0,5 mg/ml a hustota spor řádově 10^5 spor/ml. Ovlivňování biologického materiálu probíhalo za tmy, stálého míchání a při pokojové teplotě. Každých 10 minut byl odebraný 1 ml vzorku. Vzorek byl rychle scentrifugovaný a ovlivňovací roztok by důkladně odstraněn. Spory byly rozsuspendované v 1,5 ml fyziologického roztoku a znovu scentrifugované. Sediment spor byl rozsuspendovaný v 1 ml fyziologického roztoku a ředěn 10 až 100–krát. Po 200 μl takovéto suspenze bylo vyšetých na Petriho misky se sporulační půdou. Petriho misky byly kultivované 8 dní při 28 °C.

Ovlivnění UV zářením

25 Na Petriho misku se sporulační půdou bylo vyseto 100 μl sporové suspenze s počtem spor řádově 10^5 a $10^4/\text{ml}$. Po přerušení misek při 28 °C 30 min. byly vystavené působení UV světla po dobu 20, 30, 40, 60 a 120 sekund. Zdrojem UV záření byla zářivka Philips s výkonem 30 W. Její vzdálenost od povrchu půdy byla 20 cm. Po ovlivnění byly misky okamžitě umístěné do tmy na dobu 1 h. (zabránilo se průběhu fotoreaktivace). Byly kultivované po dobu 8 dní při 28 °C.

30

Monokolonie s průměrem cca 4 cm, smyté 2 ml fyziologického roztoku s 30 % glycerínu, byly při testované na produkci lovastatinu. Prvotním kritériem pro výběr mutantů do produkčního testu byla kvalita sporulace a rychlost růstu mycelia. Vybrané kolonie byly použité k stríngovém produkčním testu.

35

Příklad 2: Skrínigový produkční test

Vybrané monoizoláty byly testované na produkční schopnost na půdě s následujícím složením:

40

Laktóza	100 g/l
Sojová mouka	20 g/l
NaNO ₃	3 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
45 KCl	0,5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/l
pH	6,8

50

Skrínigová produkční půda byla očkovaná 1 ml sporové suspenze s počtem spor řádově 10^7 spor/ml.

Produkce byla stanovena po 120 hodinách kultivace při 28 °C a 220 rpm metodou HPLC.

Kmen <i>A. terreus</i>	Produkce (kyselina+lakton) [mg/l]
GB1	0,6 + 3,1
ATCC 20542	200,1 + 4,8
CCM 8236	402,2 + 11,8

5 Příklad 3: Produkční test v laboratorním měřítku

1. Sporulace

Složení sporulační půdy:

Rajčatový protlak	20 g/l
Ovesná mouka	20 g/l
Agar	20 g/l
pH	6,5

Vizuální a mikroskopické hodnocení sporulace

- 65. hodina: Mycelium bílé barvy souvisle narostené po celém povrchu, kultura začíná sporulovat a získává žlutavé zabarvení. Pod mikroskopem viditelné septované mycelium s vyrůstajícími konidioforami.
- 96. hodina: Kultura už kompletně vysporulovaná, mycelium skořicové barvy. Dobře vyvinuté konidiofory s lehce se uvolňujícími spory.

Vysporulovaná kultura byla smytá fyziologickým roztokem s 30 % glycerolu. Takto připravenou sporovou suspenzi je možné uchovávat při 4 °C po dobu 30 dní bez poklesu produkční schopnosti.

2. Inokulační stupeň

Pro dobrý nárůst inokula je potřebná přítomnost iontů Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} . Potřebný je též nadbytek uhlíkatého zdroje, rozpustného fosforu a dusíku v půdě. Ani jeden z těchto faktorů nesmí být limitujícím. 50 ml inokulační půdy se naočkuje 10 % sporové suspenze a kultivuje se při 28 °C a 220 rpm 20 hodin.

Složení inokulační půdy:

Glukóza	50 mg/l
CSL	10 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g/l
KH_2PO_4	1 g/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l
KCl	0,25 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002 g/l
PPG 2000	0,1 ml/50 ml
pH	bez úpravy (4,6)

sterilizace

40 min 115 °C

3. Produkční stupeň

- 5 Produkční půda se naočkuje 10 % inokula. Fermentace probíhá 170 hodin při 28 °C a 220 rpm. Produkce lovastatinu se stanovuje metodou HPLC.

Tab. 2. Vliv poměru laktózy a glukózy v produkční půdě na produkci lovastatinu.

Kmen	Poměr uhlikatých zdrojů [glukóza:laktóza]					
	22:1			1:22		
	pH	sediment	prod. [mg/l]	pH	sediment	prod. [mg/l]
		[%]	kys + lact		[%]	kys + lact
ATCC 20542	6,5	45	23 + 4	3,4	45	43 + 14
CCM 8236	6,3	48	55 + 8	2,4	46	114 + 8

10

Pozn.: Jako zdroj dusíku byla použita sójová mouka a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tab. 3a. Vliv dusíkatého zdroje v produkční půdě na produkci lovastatinu.

Kmen	Zdroj dusíku					
	sójová mouka + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			sójová mouka		
	pH	sediment	prod. [mg/l]	pH	sediment	prod. [mg/l]
		[%]	kys + lact		[%]	kys + lact
ATCC 20542	3,4	45	43 + 14	6	45	1005 + 0
CCM 8236	2,4	46	114 + 8	5,9	55	1986 + 0

15

Tab. 3b. Vliv dusíkatého zdroje v produkční půdě na produkci lovastatinu.

Kmen	Zdroj dusíku					
	bavlníková mouka + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			bavlníková mouka		
	pH	sediment	prod. [mg/l]	pH	sediment	prod. [mg/l]
		[%]	kys + lact		[%]	kys + lact
ATCC 20542	2,9	46	105 + 15	6	45	1347 + 0
CCM 8236	3,4	45	202 + 16	5,8	48	2248 + 0

Pozn. Jako zdroj uhlíku byly použité glukóza a laktóza v poměru 1:22.

20

Z výsledků pokusů v tabulce vyplývá, že přítomnost síranu amonného v půdě na začátku produkčního stupně má výrazně negativní vliv na produkční schopnost. Stejný efekt má i posunutí poměru zdrojů uhlíku ve prospěch glukózy. Produkce lovastatinu je za takovýchto podmínek dokonce nižší než produkce v skринingové půdě. Výsledky pokusů též dokazují, že

25 volba organického zdroje dusíku je důležitá. Ve všech testovaných půdách nový kmen *A. terreus* CCM 8236 produkovat přibližně o 100 % více lovastatinu než kmen *A. terreus* ATCC 20542.

Na základě prezentovaných experimentů bylo složení produkční půdy optimalizované.

Optimalizovaná produkční půda má sloužení:

	Glukóza	5 g/l
	Laktóza	110 g/l
5	CSL 50%	5 g/l
	Bavlníková mouka	21 g/l
	KH ₂ PO ₄	1 g/l
	CaCO ₃	5 g/l
	PPG 2000	2 ml/l
10	Pitná voda	do 1 l
	pH	7,0

Na půdě s takovýmto sloužením byla dosažena průměrná produkce lovastatinu 2665 mg/l (n = 7), maximální dosažená produkce byla 3042 mg/l lovastatinu.

15

Průmyslová využitelnost

Nový vysokoprodukční kmen mikroorganismu *Aspergillus terreus* CCM 8236 je možné využít při průmyslové výrobě lovastatinu, jeho solí a esterů.

20

25

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kmen *Aspergillus terreus* CCM 8236, produkující vysoké množství lovastatinu, který byl získán metodami klasické mutagenese.

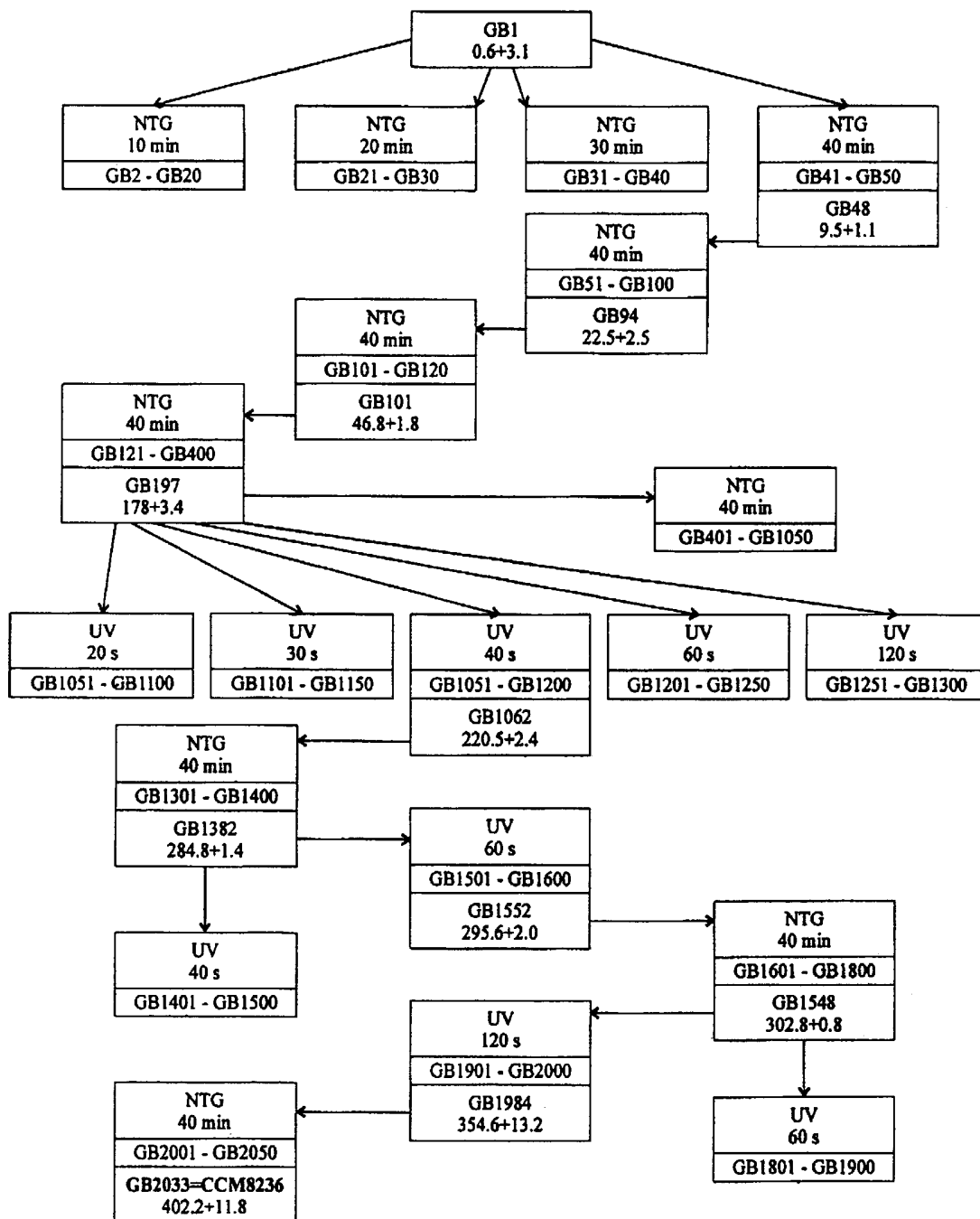
30

2. Způsob fermentační přípravy lovastatinu ve formě kyseliny nebo kaltonu, anebo jeho farmaceuticky využitelných solí anebo esterů, **vyznačující se tím**, že se kultivuje kmen *Aspergillus terreus* CCM 8236 v inokulační půdě s pH v rozmezí 4,5 až 4,7 a v produkční půdě, ve které je jako zdroj uhlíku použita kombinace glukózy a laktózy ve vzájemném poměru 0,5 až 0,7 glukózy a 11 až 15 % laktózy a jako komplexní zdroj je použita bavlníková nebo sojová mouka, přičemž koncentrace volných amoniakálních iontů je 0 až 0,07 g/l.

35

40

1 výkres

Obr. 1. Schéma mutačního postupu při získání kmenu *Aspergillus terreus* CCM 8236