(19) REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) SI 20079 A

(12) PATENT

(21) Številka prijave: 9920002
(22) Datum prijave: 19.03.1999

(51) MPK[6]: C12P 17/06, C12P 7/42, C12P 7/62, C12R 1:66, A61P 7/00

(45) Datum objave: 30.04.2000
(30) Prednostna pravica:
20.03.1998 HU 9800619

(86) Mednarodna patentna prijava:
19.03.1999 WO PCT/HU99/00021
(87) Objava mednarodne patentne prijave:
WO 99/49072, 30.09.1999

(72) Izumitelji: SERESS Peter, H-4033 Debrecen, HU;
BALOGH Gabor, H-4032 Debrecen, HU;
OLAH Antal, H-4031 Debrecen, HU;
CSEKE Laszlo, H-4032 Debrecen, HU

(73) Nosilec: BIOGAL GYOGYSZERGYAR RT., Pallagi 13, H-4042 Debrecen, HU

(74) Zastopnik: ITEM, poslovno svetovanje, d.o.o., Resljeva 16, 1000 Ljubljana, SI

(54) METABOLIČNO KONTROLIRANI FERMENTACIJSKI POSTOPEK ZA IZDELAVO HIDROKSI KISLINE LOVASTATINA

(57) Postopek za proizvodnjo mevinolina z mikroorganizmom v fermentacijskem postopku, ki ima začetno stopnjo gojitve in glavno fermentacijsko stopnjo, ki vključuje: a) kultiviranje biomase mikroorganizma v začetni stopnji gojitve, da se pridobi inokulum; b) prenašanje inokuluma v fermentacijski medij v glavni fermentacijski stopnji; in, c) vzdrževanje pogojev stabilnega stanja v glavni fermentacijski stopnji, s tem producirajoč fermentacijsko juho, ki vsebuje mevinolin. Prednostno se pogoji stabilnega stanja vzdržujejo v glavni fermentacijski stopnji z enim ali več dovajanji virov organskega ogljika; z uravnavanjem vsebnosti glukoze in/ali celotnega reduktivnega sladkorja; z dovajanjem virov organskega dušika; z uravnavanjem pH; z uravnavanjem nivoja pene; z uravnavanjem mase fermentacijske juhe z odvzemi in dovajanji; in z uravnavanjem nivoja raztopljenega kisika.

SI 20079 A

METABOLIČNO KONTROLIRANI FERMENTACIJSKI POSTOPEK ZA IZDELAVO HIDROKSI KISLINE LOVASTATINA

Področje izuma

Ta izum se na splošno nanaša na biosintezo sredstev, ki znižujejo holesterol. Bolj specifično se izum nanaša na biosintezo mevinolina, sredstva, ki znižuje holesterol, z določenimi mikroorganizmi.

Ozadje izuma

Mevinolin (lovastatin; monacolin K; β,δ-dihidroksi-7[1,2,6,7,8,8a-heksahidro-2,6-dimetil-8-(2-metil-butiriloksi)-naftalen-1-il]-heptanojske kisline δ-lakton) je eden od najbolj pomembnih znanih sredstev, ki znižujejo holesterol. Mevinolin, kot se tu uporablja, vsebuje tako oblike laktona kot nevezane hidroksi kisline.

Njegova odprta oblika hidroksi kisline je močan inhibitor encima 3-hidroksi-3-metil-glutarilkoencima A reduktaze, ki katalizira tvorbo mevalonske kisline, nekega zgodnjega intermediata biosinteze holesterola. Mevinolin je posebno ugoden, ker se kot posledica njegove uporabe ne morejo akumulirati biosintetični intermediati s toksičnim steroidnim ogrodjem, ki se tvorijo pri kasnejši stopnji biosinteze. Mevinolin povečuje število LDL receptorjev na površini celične membrane, ki odstranjujejo LDL holesterol, ki cirkulira v krvi, s tem povzročajoč znižanje nivoja holesterola v krvni plazmi.

Navadno se aktivna sestavina pridobi s pomočjo fermentacije. GB 2046737 opisuje, da se aktivna sestavina lahko pridobi z nekaterimi sevi, ki spadajo v rod Monascus, npr. z M. ruber 1005, kultiviranim med 7 in 40 °C. Kot gojitveni medij je bila uporabljena vodna raztopina glukoze, peptona, koruzne namakalne tekočine in amonijevega klorida. Fermentacija se je vršila v teku 10 dni v aerobnih pogojih, dobili pa so 87 mg mevinolina iz filtrata 5 litrov juhe.

U.S. Patent št. 4,294,926 razkriva biosintezo mevinolina prednostno z uporabo mikroorganizmov pod deponiranima številkama ATCC 20541 ali 20542, ki spadajo v rod Aspergillus terreus, na gojitvenem mediju, ki vsebuje ogljikove hidrate, npr. glukozo, fruktozo, maltozo kot vir ogljika, vire dušike, npr. kvas, hidroliziran kvas, hidroliziran kazein, koruzno

namakalno tekočino; in mineralne soli, npr. kalcijev karbonat, magnezijev sulfat, kobaltove, železove(II), manganove(III) soli pri temperaturi 20-37 °C. Podobni postopki so opisani v US Patentu št. 4,420,491, 4,342,767, 4,319,039 in 4,294,846, kjer se fermentacije izvajajo v teku 3-5 dni na medijih, ki vsebujejo 1-6 % ogljikovih hidratov in 0,2-6 % virov dušika.

Nemški patent št. 4,402,591 razkriva biosintezo mevinolina z mikroorganizmi, ki spadajo v rod Pleurotus, npr. Pleurotus ostreatus, P. sapidus, P. saca, pri 25-35 °C, v teku kultivacijskega časa 7-14 dni, na površinskih ali v submerznih kulturah.

Kanadski patent št. 2,129,416 razkriva pripravo mevinolina ali v posebnem primeru, mevastatina, z mikroorganizmom, ki spada v rod Coniothyrium, npr. pod deponirano številko Coniothyrium fuckelii ATCC 74227, na gojitvenem mediju, ki vsebuje 3-15 % glukoze, 0,5-4 % peptona, 0,5-5 % amilaze, 0,2-1 % amonijevega sulfata, 0,01-0,1 % magnezijevega sulfata, 0,05-0,2 % protipenilnega sredstva, 0,2-1,5 % L-izolevcina, 0,2-1,5 % L-aspartinske kisline v območju pH 5-6. V skladu s primeri je bila koncentracija aktivne sestavine juhe v obsegu 19-430 mg/liter.

Madžarski patent št. HU 208,997 razkriva uporabo holotipskega seva Aspergillus obscurus, oštevilčenega kot MV-1, deponiranega pod številko NCAIM(P)F 001189. Fermentacija se prednostno izvaja na mediju, ki vsebuje kvasni izvleček in/ali pepton in/ali kazein kot vir(e) dušika in glukozo in/ali maltozo ali saharozo kot vir(e) ogljika. Aktivnost juhe pri koncu kultivacije v laboratorijskem obsegu je med 400-850 mg/liter.

Prej omenjena diskusija dokazuje, da je bilo razvojno delo pri biosintezi mevinolina osredotočeno bolj na odkrivanje novih mevinolin producirajočih mikroorganizmov, kot na razvoj fermentacijskega postopka samega. Več referenc razkriva, da se fermentacije lahko izvajajo na običajnih in znanih medijih, z uporabo tako površinskih kultivacij kot kultivacij v trdnem stanju. Šaržnim podobni postopki so bili uporabljeni, kjer so bile karakteristike postopkov odvisne od začetnih pogojev. Vendar so tehnične omejitve, npr. vzdrževanje najbolj ustreznega nivoja sestavin, optimalna oskrba z raztopljenim kisikom in pH itd, otežkočile izvajanje kontinuirnih korektivnih akcij, da bi se zagotovili bolj ugodni pogoji. Dani mikroorganizem zahteva med glavno fermentacijsko fazo, odvisno od njegovega metabolizma, različne pogoje/sestavo medijev, da bi se dobila optimalna rast in produkcija aktivne sestavine. Sedanji izumitelji so iz njihovih poskusov zaključili, da je v začetni gojitvi in v

začetku glavne fermentacije količina aktivne biomase zelo majhna in spremenljiva. Na ta način so dobitki fermentacij relativno nizki in spremenljivi. Dobitki, doseženi na koncu fermentacij, ki so bili odvisni od poteka na sevu, niso presegali koncentracije mevinolina 850 mg/liter. Sedanji izumitelji so izvedli podrobno analizo celotnega postopka fermentacije od začetne stopnje gojitve (v angl. orig.: seed culture stage) skozi vse do konca fermentacije. Ugotovili so, da je v pripravljalni stopnji začetne gojitve, tako v primeru znanih medijev kot postopkov izvedbe, količina biomase prenizka. Zato med glavno fermentacijo metabolizem mikroorganizma in gojitev nista ustrezna.

Predmeti izuma

En predmet predloženega izuma je torej izboljšati učinkovitost mevinolin producirajočega fermentacijskega postopka s forsiranjem produkcijske zmožnosti mikroorganizma s pomočjo spreminjanja pogojev in izvajanja fermentacij.

Drug predmet predloženega izuma je zagotoviti v eni od obeh ali obeh stopnjah, začetni in glavni fermentacijski stopnji, najbolj primerne kemične in fiziološke pogoje za metabolizem z mikroorganizmom.

Nadaljnji predmet predloženega izuma je, zagotoviti v eni od obeh ali obeh stopnjah, začetni in glavni fermentacijski stopnji, najbolj primerne kemične in fiziološke pogoje za metabolizem z mikroorganizmom z vzdrževanjem v pogoju stabilnega stanja, hitrost rasti in potem v teku daljšega časa, maksimalno hitrost tvorbe proizvoda.

Povzetek izuma

Ti in drugi predmeti tega izuma so v eni izvedbi predloženega izuma doseženi z zagotavljanjem postopka za proizvodnjo mevinolina z mikroorganizmom v fermentacijskem postopku, ki ima začetno stopnjo gojitve in glavno fermentacijsko stopnjo, pri čemer omenjeni postopek obsega:

a) kultiviranje biomase mikroorganizma v omenjeni začetni stopnji gojitve, da se pridobi inokulum;

b) prenašanje omenjenega inokuluma v fermentacijski medij v omenjeni glavni fermentacijski stopnji;

in,

c) vzdrževanje pogojev stabilnega stanja v omenjeni glavni fermentacijski stopnji, s tem producirajoč fermentacijsko juho, ki vsebuje mevinolin.

V prednostni izvedbi predloženega izuma se pogoji stabilnega stanja v glavni fermentacijski stopnji vzdržujejo z enim ali več dovajanji virov organskega ogljika; z uravnavanjem vsebnosti glukoze in/ali celotnega reduktivnega sladkorja; z dovajanjem organskih in/ali anorganskih virov dušika; z uravnavanjem pH; z uravnavanjem nivoja pene; z uravnavanjem mase fermentacijske juhe z odvzemi in dovajanji; in z uravnavanjem nivoja raztopljenega kisika. Prednostno se fermentacijski proces izvaja v submerzni gojitvi mikroorganizma in pri temperaturi v območju od okoli 24 °C do 30 °C. V posebno prednostni izvedbi predloženega izuma je mikroorganizem vrsta Aspergillus. V še drugih prednostnih izvedbah predloženega izuma je vir organskega ogljika izbran iz skupine, ki je sestavljena iz glukoze, hidroliziranega škroba in rastlinskega olja; vsebnost glukoze se vzdržuje pri pod okoli 0,2 % od 60. ure glavne fermentacijske stopnje; viri dušika so izbrani iz skupine, ki je sestavljena iz koruzne namakalne tekočine in amonijevega hidroksida; pH se uravnava tako, da je v območju od okoli 5,2 do okoli 7,0, prednostno od okoli 5,2 do okoli 6,2, z dovajanjem virov ogljika in/ali baze; nivo pene se uravnava z dodatkom snovi za uravnavanje nivoja pene, pri čemer je snov prednostno sintetična snov ali rastlinsko olje; in nivo raztopljenega kisika se uravnava prednostno z mešanjem in/ali prezračevanjem fermentacijske juhe. V še drugi prednostni izvedbi predloženega izuma se inokulum prenese iz začetne stopnje gojitve v glavno fermentacijsko stopnjo, ko se pH začetne stopnje gojitve poveča, potem ko je dosegel svojo minimalno vrednost.

Podroben opis izuma

Izumitelji so odkrili, da se optimalna biosinteza mevinolina lahko izvaja z uravnavanjem enega ali več določenih procesnih parametrov, faz in/ali spremenljivk v eni od obeh ali obeh, začetni stopnji gojitve in glavni fermentacijski stopnji biosintetskega procesa.

Izumitelji so ugotovili, da med začetno fazo gojitve ti procesni parametri, faze in/ali spremenljivke vključujejo oskrbovanje mikroorganizmov s potrebnimi komponentami medija v obliki, ki se da zlahka asimilirati in v najbolj primerni koncentraciji ter podaljšanje kultivacijskega časa za okoli 10 do okoli 25 %.

Izumitelji so ugotovili, da zato, da bi dosegli pogoj stabilnega stanja med glavno fermentacijsko stopnjo, ti parametri postopka, faze in/ali spremenljivke vključujejo uravnavanje vsebnosti glukoze in/ali celotnega reduktivnega sladkorja, vzdrževanje virov ogljika na primernem minimalnem nivoju, dovajanje virov organskega in/ali anorganskega dušika, uravnavanje pH, uravnavanje nivoja pene, uravnavanje mase juhe z odvzemi in dovajanjem in uravnavanje nivoja raztopljenega kisika s spreminjanjem hitrosti mešanja in/ali prezračevanja.

Da bi optimirali biosintezo mevinolina, ni potrebno, da se vsak od zgoraj omenjenih procesnih parametrov, faz in/ali spremenljivk, za bodisi začetno fazo gojitve ali za glavno fermentacijsko stopnjo, naravnava simultano. Vendar bo v prednostni izvedbi predloženega izuma biosinteza mevinolina obsegala vsakega od zgoraj omenjenih procesnih parametrov, faz in/ali spremeljivk. V takšni prednostni izvedbi se lahko izvaja izboljšan metabolično kontroliran postopek fermentacije mevinolina, pri katerem se pogoj stabilnega stanja, t.j., konstanten pH, koncentracija glukoze, raztopljen kisik, viskoznost, volumen, itd., lahko doseže hitro in ki se lahko vzdržuje za dolgo dobo ob zagotavljanju dobitka, ki visoko presega rezultate znanih postopkov.

Določene prednosti se lahko v začetni stopnji gojitve uresničijo z naravnavanjem enega ali več zgoraj omenjenih procesnih parametrov, faz in/ali spremenljivk v tej stopnji. Te prednosti vključujejo, npr. zmanjšanje potrebe za čas, da se doseže pogoj "stabilnega stanja", za okoli 20-30 %, s povečanjem števila rastnih centrov in rastjo aktivne biomase v bolj koristni morfološki obliki, ki ima za posledico bolj ugodne pogoje za kultivacijo mikroorganizma. Kot rezultat teh prednosti in podaljšanega časa kultivacije se koncentracija aktivne biomase skoraj podvoji.

Določene prednosti se lahko realizirajo v glavni fermentacijski stopnji z naravnavanjem enega ali več zgoraj omejenih procesnih parametrov, faz in/ali spremenljivk v tej stopnji. Te prednosti vključujejo, npr. hitrejšo in manj fluktuirajočo rastno fazo in hitro nastajanje stopnje stabilnega stanja, ki se lahko vzdržuje za dolgo dobo. Te prednosti imajo za posledico znatno povečano aktivnost fermentacije.

Kot sledi, je v eni izvedbi predloženi izum usmerjen k fermentacijskem postopku za izdelavo mevinolina s sevom, ki spada v rod Aspergillus, v submerzni kulturi, pri pH med 5,2 in 7,0, pri

temperaturi znotraj 24 in 30 °C, na mediju, ki vsebuje vire ogljika in dušika, ki se dajo asimilirati in mineralne soli, pri čemer se uporablja metabolično kontroliran postopek v glavni fermentacijski fazi, da bi se vzdrževala gojitev v stopnji "stabilnega stanja". Pri tej izvedbi se prednostno uravnava celotni reduktivni sladkor. V začetku glavne fermentacije se prednostno dovajajo viri organskega ogljika, npr. glukoza, hidroliziran škrob in rastlinsko olje. Prednostno se nivo koncentracije glukoze vzdržuje pod 0,2 % od 60. ure fermentacije. V teku postopka se dovajajo viri dušika, kot na primer koruzna namakalna tekočina in raztopina amonijevega hidroksida. pH se prednostno vzdržuje v območju od okoli 5,2-6,2 z dovajanjem vira ogljika in/ali baze, npr. amonijevega hidroksida in/ali natrijevega hidroksida. Nivo pene fermentorja se tudi lahko uravnava z dovajanjem rastlinskega olja, npr. sončničnega olja in/ali sojinega olja in/ali sintetičnega protipenilnega sredstva, v juho. Raztopljen kisik se prednostno uravnava s spreminjanjem hitrosti mešanja in/ali hitrosti prezračevanja. V teku fermentacije se izvede en ali več odvzemov.

V prednosti izvedbi se glavni gojitveni medij inokulira z začetno kulturo, ki ima naslednjo sestavo:

Sestavina	Količina (m/v %)
glukoza	2-6
fosforjeva kislina	0,002-0,006
kisli kazein	0,2-0,8
koruzna namakalna tekočina	1,5-5
sončnično olje	0,05-0,18
polipropilen glikol	0,05-0,18
pankreatin*	0,002-0,008

*4 kratna aktivnost po Ph.Hg.VII.

Gojitveni medij z gornjo sestavo se dopolni z regularno uporabljenimi mikro in makroelementnimi solmi, npr. anorganskimi solmi natrija, kalija, magnezija in železa. Glavni gojitveni medij se inokulira z začetno kulturo, katere kultivacijski čas je podaljšan za 10-25 %. Pri stopnji prenašanja začetne kulture je pH v fazi povečanja po njegovi minimalni vrednosti.

Za fermentacijo se uporablja prednostno sev Aspergillus obscurus ali njegova različica ali

njegov mutant ali bolj prednostno holotipski sev Aspergillus obscurus n. sp. MV-1, deponiran pod številko kode NCAIM(P)F 001189.

Začetna kultura se inokulira v sterilen glavni fermentacijski medij s podaljšanim kultivacijskim časom, pri naraščajoči fazi pH po njegovi minimalni vrednosti. V glavni fermentacijski stopnji se lahko vzdržuje pogoj "stabilnega stanja" z maksimalno hitrostjo produkcije aktivne sestavine v teku dolgega časa z dovajanjem virov ogljika in dušika, da bi se zadovoljila potreba za hranili; z uravnavanjem koncentracije glukoze, da se prepreči nezaželeno zgoščevanje kulture in pretiran prirastek v biomasi; z uravnavanjem hitrosti mešanja in hitrosti prezračevanja v skladu s potrebo po kisiku; s kombiniranjem uravnavanja nivoja pene s potrebo po virih ogljika s primerno snovjo za oba namena, npr. zmes rastlinskega olja in sintetičnega sredstva; z vzdrževanjem pH med območjem od okoli 5,2-6,2 z dovajanjem vira ogljika, npr. glukoznega sirupa ali baze; in z izvajanjem enega ali več odvzemov, ko se doseže maksimalni delovni volumen fermentorja ali ko se doseže dovolj ekonomična koncentracija mevinolina, da se izvede obdelava, ki spada v zadnji del postopka.

Z uporabo teh elementov se lahko dobi prilagodljiv, obvladljiv fermentacijski postopek, ki je, odvisno od življenjskega ciklusa, sposoben zagotavljati dobro kondicionirano kostantno okolje za mikroorganizem.

V skladu z zgoraj opisano prednostno izvedbo dajejo postopki predloženega izuma dobitke, ki presegajo tiste od znanih postopkov, uporabljajo znatno manj surovine in energije, zmanjšujejo količino okolje onesnažujočega odpadnega materiala glede na maso enote aktivne snovi in bolje izkoriščajo fermentor.

V naslednjih Primerih primerjamo biosintezo mevinolina v skladu s postopkom, opisanim v HU 208997 (Primerjalni Primer 1), s postopkom v skladu s prednostno izvedbo predloženega izuma (Primer 2).

Primerjalni Primer 1:

Biosinteza mevinolina v skladu z HU 208997

V 600 litrski posodi pripravimo medij za začetno gojitev z naslednjo sestavo:

Sestavina	Količina (%)
glukoza	4,0
kazeinski pepton	0,5
$NaNO_3$	0,3
KH_2PO_4	0,2
KCl	0,05
$MgSO_4*7H_2O$	0,05
$FeSO_4*7H_2O$	0,001

Cepljenje inokuluma smo izvedli s suspenzijo spor seva Aspergillus obscurus s številom spor $6,5 \times 10^9$. Parametri procesa začetne gojitve so bili, kot sledi:

Parameter	Vrednost
Volumen	400 litrov
Temperatura	27 °C
Hitrost prezračevanja	20 normalnih m^3/h
Notranji tlak:	0,5 bar
Hitrost mešanja:	320 obratov/min

Prenašanje začetne kulture v glavni fermentacijski medij smo napravili v skladu s standardnim postopkom, pri starosti 36 ur, ko je bil pH v njegovi padajoči stopnji pri 5,6. Centrifugiran pakiran celični volumen biomase (PCV) je bil 14 %.

Zgornjo začetno kulturo smo inokulirali v glavni fermentacijski medij, označen MEF-03, pri 10 % deležu inokulacije (v angl. orig.: inoculation rate). Sestava glavnega fermentacijskega medija je bila, kot sledi:

Sestavina	Količina (%)
Monohidrat dekstroze	1,0
Kisli kazein	0,2
Koruzni škrob	8
Sojina moka	1,5
Koruzna namakalna tekočina (50 %)	1
Natrijev klorid	1
Kalijev dihidrogen fosfat	0,2
Natrijev glutamat	1,2
Sončnično olje	0,16
Polipropilenglikol	0,16
Pankreatin*	0,002
Encim BAN 240	0,007
$CaCl_2$	0,02
Kalijev hidroksid	za uravnavanje pH

*4 kratna jakost po Ph.Hg.VII.

Volumen pri času 0: 500 litrov.

Fermentacijo smo izvajali v teku 7 dni. Hitrosti prezračevanja in mešanja sta, kot sledi:

Prezračevanje*	Hitrost mešanja*
18-25 normalnih m^3/h	180-320 obratov/min

*Raztopljen kisik vzdržujemo nad 40 % vrednosti nasičenja.

Med tekom fermentacije dovajamo štiri 50 kg porcije encimatsko utekočinjenega koruznega škroba v skladu s planom pri starosti 50, 73, 90 in 108 ur.

<u>Podatki za proizvodnjo aktivnih sestavin:</u>

Fermentacijski čas: 164 ur. Aktivnost, izmerjena s HPLC: 927 mg/kg. Količina juhe: 580 kg. Kot posledica zgornjega je količina fermentirane aktivne sestavine 0,58 tone*927 g/tono/1000/1 m^3 = 0,54 kg/m^3 celotnega volumna.

Primer 2

Biosinteza mevinolina z dovajanjem glukoznega sirupa in virov dušika in z uravnavanjem pH z natrijevim hidroksidom ali amonijevim hidroksidom

V 600 litrski posodi pripravimo medij za začetno gojitev z naslednjo sestavo:

Sestavina	%
glukoza	4,0
kazeinski pepton	0,5
koruzna namakalna tekočina (50 %)	3,0
$NaNO_3$	0,3
KH_2PO_4	0,2
KCl	0,05
$MgSO_4*7H_2O$	0,05
$FeSO_4*7H_2O$	0,001
pankreatin*	0,005
polipropilenglikol	0,1
sončnično olje	0,1

*4 kratna jakost po Ph.Hg.VII.

Cepljenje smo naredili s suspenzijo spor seva Aspergillus obscurus s številom spor 6,5 x 10^9. Parametri postopka začetne gojitve so bili enaki, kot pokazani v Primerjalnem Primeru 1.

Vendar je bilo prenašanje začetne kulture opravljeno različno od prenašanja, opisanega v Primerjalnem Primeru 1. Starost pri prenašanju je bila 40 ur. pH je dosegel minimalno vrednost (pH 4,9) in prenašanje je bilo v stopnji, ko je pH začel naraščati in je dosegel okoli 5,0. Potemtakem se je pH povečal okoli 0,1 od njegove minimalne vrednosti. Centrifugirani pakirani celični volumen biomase (PCV) je bil 24 %.

Zgornjo začetno kulturo smo inokulirali v glavni fermentacijski medij pri 10 % deležu inokulacije. Sestava glavnega fermentacijskega medija je bila naslednja:

Sestavina	Količina (%)
koruzni škrob	8
glukozni sirup*	1,0
kisli kazein	0,2
sojina moka	1,5
koruzna namakalna tekočina (50 %)	1
natrijev klorid	1
kalijev dihidrogen fosfat	0,2
natrijev glutamat	1,2
sončnično olje	0,16
polipropilenglikol	0,16
pankreatin**	0,002
kalijev hidroksid	za uravnavanje pH

* v obliki 25 % glukoznega sirupa smo dovedli 25 kg.

** 4 kratna jakost po Ph.Hg.VII.

Fermentacijo smo izvajali v teku 13 dni. Hitrosti prezračevanja in mešanja sta bili, kot sledi:

Prezračevanje*	Hitrost mešanja*
min. 12, maks. 32 normalnih m^3/h	min. 220, maks. 400 obratov/min

* Raztopljen kisik smo vzdrževali nad 40 % vrednosti nasičenja s postopkom s prednostjo prezračevanja.

V teku fermentacije je vzdrževanje raztopljenega kisika zelo pomembno. V najbolj intenzivni stopnji se to lahko doseže z uporabo hitrosti prezračevanja 25-32 normalnih m^3/h in hitrosti mešanja s 300-400 obrati na minuto.

Med glavno fermentacijsko stopnjo je bila temperatura 27±2 °C, notranji tlak je bil 0,4 bar, čas kultivacije pa je bil 309 ur.

V teku fermentacije smo dovajali naslednja hranila:

1. Hidroliziran koruzni škrob (glukozni sirup) pripravimo z encimatskim obdelovanjem in

obdelovanjem s klorovodikovo kislino in dovajamo. Surovine, uporabljene za pripravo glukoznega sirupa so bile, kot sledi: 25 % koruznega škroba, 0,3-0,4 % $CaCl_2$, 0,1-0,2 % amilaznega encima (BAN) in 1 % koncentrirane klorovodikove kisline. Dovajanje glukoznega sirupa se je začelo v stopnji naraščanja pH po njegovi minimalni vrednosti (5,0) v starosti 45 ur in pri pH vrednosti 5,6. Dovajanje smo izpeljali kontinuirano ob vzdrževanju pH v območju med 5,4 in 5,8. Minimalna hitrost dovajanja je bila 0,5 litrov/uro in maksimalna hitrost dovajanja je bila 5 litrov/uro.

2. Za uravnavanje pH smo dovajali raztopino NaOH ali NH_4OH, kadar je pH padel pod 5,5 poleg minimalne hitrosti dovajanja glukoznega sirupa.

3. Koruzno namakalno tekočino (1 %) smo dovajali pri starosti 100 ur fermentacije (nanaša se na volumen pri času 0).

Podatki za proizvodnjo aktivne sestavine:

Čas fermentacije: 309 ur. Aktivnost izmerjena s HPLC: 2868 mg/kg. Količina juhe: 680 kg. Kot posledica zgornjega je količina fermentirane aktivne sestavine 0,68 tone*2868 g/tono/1000/1 m^3 = 1,95 kg/m^3 celotnega volumna.

Primer 3

Biosinteza Mevinolina z dovajanji, nadzorovanjem in odvzemi

Holotipski sev Aspergillus obscurus n. sp. MV-1 kultiviramo na sterilnem mediju za inokulum z naslednjo sestavo:

Sestavina	%
glukoza	4,0
fosforjeva kislina	0,0035
kisli kazein	0,5
koruzna namakalna tekočina (50 %)	3,0
$NaNO_3$	0,3
KH_2PO_4	0,2
KCl	0,05
$MgSO_4*7H_2O$	0,05

$FeSO_4*7H_2O$	0,001
sončnično olje	0,1
polipropilen glikol	0,1
pankreatin*	0,005
natrijev hidroksid	za uravnavanje pH
klorovodikova kislina	za uravnavanje pH

*4 kratna jakost po Ph.Hg.VII.

Med stopnjo inokuluma smo uporabili naslednje procesne parametre:

Parameter	Vrednost
Volumen	8 m^3
Hitrost mešanja	120 obratov/min
Prezračevanje	400±50 normalnih m^3/h
Notranji tlak	0,4±0,1 bar
Temperatura	27±2 °C

Inokulum smo prenesli potem, ko je njegov pH dosegel svojo minimalno vrednost (pH 4,8) in ko je bila vrednost 0,1 enote nad minimumom, t.j., ko je pH dosegel vrednost 4,9. Centrifugirani pakirani celični volumen biomase (PCV) je bil 24 %. Pri 8 % deležu prenosa smo zgornji inokulum prenesli v glavni fermentacijski medij z naslednjo sestavo:

Sestavina	Količina (%)
Sojina moka	1,28-1,57
vsota koruznega ali pšeničnega škroba	9
kisli kazein	0,20
koruzna namakalna tekočina (50%)	0,857-1,14
natrijev klorid	1,0
kalijev dihidrogen fosfat	0,2
natrijev glutamat	1,14-1,20
kalcijev klorid	$3,8x10^{-3}$

encim BAN	$2,2x10^{-3}$
sončnično olje	0,10
polipropilenglikol	0,10
pankreatin*	$2,0x10^{-3}$
kalijev hidroksid ali klorovodikova kislina	za uravnavanje pH

*4 kratna jakost po Ph.Hg.VII.

Med glavno fermentacijsko stopnjo so bili uporabljeni naslednji procesni parametri:

Parameter	Vrednost
Notranji tlak	0,2±0,05 bar
Temperatura	27±2 °C
Hitrost mešanja	60-85 obratov/min
Hitrost prezračevanja	1000-4000 normalnih m^3/min

Dovajalne snovi

1. Snov za vir ogljika: okoli 40 ton hidroliziranega škroba, razkrojenega v veliki meri do glukoze (glukozni sirup), pripravljenega v 25 % obliki, dovajamo kontinuirano. Surovine, uporabljene za pripravo glukoznega sirupa so naslednje: 25 % kuruznega ali pšeničnega škroba, 0,3 % kalcijevega klorida, 0,3 % encima BAN 240 in okoli 2 % klorovodikove kisline.
2. Snov za vir dušika: Uporabljamo koruzno namakalno tekočino (50 %) za pripravo v 1 % količini, ki se nanaša na fermentacijski volumen v času 0, v 5 m^3 sterilnega volumna.
3. Baza za uravnavanje pH. Za uravnavanje pH uporabljamo nesterilizirano 25-30 % raztopino natrijevega hidroksida ali amoniaka.

Dovajanje

1. Glukozni sirup: Dovajanje začnemo pri okoli 50 urah v stopnji naraščanja pH po njegovi prvi minimalni vrednosti. Glukozni sirup dovajamo, da bi uravnavali pH v območju med 5,4 in 5,8. Dovajanje glukoze izvajamo v obliki odmerkov ali kontinuirno. Glukozni sirup dovajamo pri hitrosti v območju 0-1000 kg/uro, prednostno v območju od 150-500 kg/uro. Če

minimalnega pH ni bilo mogoče vzdrževati celo pri minimalni hitrosti dovajanja glukoznega sirupa, je bilo za uravnavanje pH potrebno dovajanje baze.

2. Koruzna namakalna tekočina: Koruzno namakalno tekočino dovajamo v enem odmerku pri okoli 100 urah. Nadaljnje odmerke lahko dovajamo, če je potrebno.

3. NaOH ali NH_4OH: Dovajali smo bazo in izvajali uravnavanje pH, če je, poleg minimalne hitrosti dovajanja glukoznega sirupa, pH padel pod 5,5.

Nivo pene smo uravnavali z dovajanjem zmesi sončničnega olja: PPG pri razmerju 95:5, da volumen pene ne bi presegel 25 % od delovnega volumna fermentorja.

Odvzeme iz fermentorja smo izvajali pri starostih 112, 138, 178, 204 ur s spravilom 4 m^3 juhe 4 krat.

Podatki za proizvodnjo aktivne sestavine:

Čas fermentacije: 226 ur. Aktivnost izmerjena s HPLC (matični del): 1825 mg/kg. Aktivnost pospravljenega pridelka (z odvzemi): 1788 mg/kg. Kot posledica zgornjega je količina fermentirane aktivne sestavine 95 ton*1788 g/tono/1000/105 m^3 celotnega volumna.

PATENTNI ZAHTEVKI

1. Fermentacijski postopek za izdelavo mevinolina s sevom, ki spada v rod Aspergillus, v submerzni gojitvi, pri pH med 5,2 in 7,0, pri temperaturi znotraj 24 in 30 °C, v mediju, ki vsebuje vire ogljika in dušika, ki se dajo asimilirati, in mineralne soli, pri čemer se v glavni fermentacijski fazi uporablja metabolično kontrolirani postopek, da bi se gojitev vzdrževala v stopnji "stabilnega stanja".

2. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer se celotna reduktivna vsebnost uravnava v teku glavne fermentacijske faze.

3. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer se vir organskega dušika dovaja v teku glavne fermentacijske faze.

4. Postopek iz zahtevka 3, pri čemer se kot vir ogljika dovaja glukoza.

5. Postopek iz zahtevka 4, pri čemer se vsebnost glukoze z dovajanjem, od starosti 60 ur do konca fermentacije, zadržuje pod 0,2 %.

6. Postopek iz zahtevka 3, pri čemer se kot vir ogljika dovajata hidroliziran škrob in/ali rastlinsko olje.

7. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer se vir dušika dovaja v teku glavne fermentacijske faze.

8. Postopek iz zahtevka 7, pri čemer se kot vir dušika dovajata koruzna namakalna tekočina in/ali amonijev hidroksid.

9. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer se pH v teku glavne fermentacijske faze uravnava med 5,2 in 6,2.

10. Postopek iz zahtevka 9, pri čemer se uravnavanje pH vrši z dovajanjem vira ogljika in/ali baze.

11. Postopek iz zahtevka 10, pri čemer se za dovajanje baze lahko uporabljata amonijev hidroksid in/ali hidroksid alkalijske kovine.

12. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer se v fermentorju uravnava pena.

13. Postopek iz zahtevka 12, pri čemer se uravnavanje pene vrši z rastlinskim oljem in sintetičnim sredstvom.

14. Postopek iz zahtevka 13, pri čemer je rastlinsko olje sončnično olje in/ali sojino olje.

15. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer se hitrost mešanja in/ali hitrost prezračevanja uravnavata v skladu z nivojem raztopljenega kisika.

16. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer se delna spravila vršijo v teku glavne fermentacijske faze.

17. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer se inokulacija glavne fermentacijske faze vrši s kulturo mikroorganizma Aspergillus, kultivirane na naslednjem mediju za začetno gojitev:

glukoza	2-6 m/v %
fosforjeva kislina	0,002-0,006 m/v %
kisli kazein	0,2-0,8 m/v %
koruzna namakalna tekočina, 50 %	1,5-5 m/v %
sončnično olje	0,05-0,18 m/v %
polipropilen glikol	0,05-0,18 m/v %
pankreatin, 4 kratna aktivnost po Ph.Hg.VII.	0,002-0,008 m/v %

dopolnjenem z vodo in pravilno apliciranimi mikro- in makroelementnimi solmi (npr. anorganskimi solmi natrija, kalija, magnezija in železa).

18. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer se prenos začetne kulture v glavno fermentacijo izvaja z uporabo 10-25% podaljšanega kultivacijskega časa, ki se nanaša na regularen čas in/ali v fazi naraščanja pH po njegovi minimalni vrednosti.

19. Postopek iz zahtevka 1, pri čemer je uporabljeni mikroorganizem sev Aspergillus

obscurus, njegova različica ali njegov mutant.

20. Postopek iz zahtevka 19, pri čemer je za fermentacijo uporabljeni mikroorganizem holotipski sev Aspergillus obscurus n. sp. MV-1, deponiran pod številko kode NCAIM(P)F 001189.

21. Postopek za proizvodnjo mevinolina z mikroorganizmom v fermentacijskem postopku z začetno stopnjo gojitve in glavno fermentacijsko stopnjo, pri čemer omejeni postopek obsega:

a) kutiviranje biomase mikroorganizma v omenjeni začetni stopnji gojitve, da se pridobi inokulum;

b) prenašanje omenjenega inokuluma v fermentacijski medij v omenjeni glavni fermentacijski stopnji;

in,

c) vzdrževanje pogojev stabilnega stanja v omenjeni glavni fermentacijski stopnji, s tem producirajoč fermentacijsko juho, ki vsebuje mevinolin.

22. Postopek iz zahtevka 21, pri čemer se pogoji stabilnega stanja v glavni fermentacijski stopnji vzdržujejo z enim ali več dovajanji virov organskega ogljika; z uravnavanjem vsebnosti glukoze in/ali celotnega reduktivnega sladkorja; z dovajanjem virov organskega in/ali anorganskega dušika; z uravnavanjem pH; z uravnavanjem nivoja pene; z uravnavanjem mase fermentacijske juhe z odvzemi in dovajanji; in z uravnavanjem nivoja raztopljenega kisika.

23. Postopek iz zahtevka 22, pri čemer se pogoji stabilnega stanja v glavni fermentacijski stopnji vzdržujejo z uravnavanjem vsebnosti glukoze in/ali celotnega reduktivnega sladkorja.

24. Postopek iz zahtevka 22, pri čemer se pogoji stabilnega stanja v glavni fermentacijski stopnji vzdržujejo z dovajanjem virov organskega in/ali anorganskega dušika.

25. Postopek iz zahtevka 22, pri čemer se pogoji stabilnega stanja v glavni fermentacijski stopnji vzdržujejo z dovajanjem virov organskega ogljika.

26. Postopek iz zahtevka 25, pri čemer se omenjeni vir organskega ogljika izbere iz

skupine, ki je sestavljena iz glukoze, hidroliziranega škroba in rastlinskega olja.

27. Postopek iz zahtevka 26, pri čemer je omenjeni vir organskega ogljika glukoza.

28. Postopek iz zahtevka 27, pri čemer se vsebnost glukoze vzdržuje pri pod okoli 0,2 % od 60. ure glavne fermentacijske stopnje.

29. Postopek iz zahtevka 24, pri čemer so viri dušika izbrani iz skupine, ki je sestavljena iz koruzne namakalne tekočine in amonijevega hidroksida.

30. Postopek iz zahtevka 22, pri čemer se pogoji stabilnega stanja v glavni fermentacijski stopnji vzdržujejo z uravnavanjem pH.

31. Postopek iz zahtevka 30, pri čemer se pH vzdržuje v območju od okoli 5,2 do okoli 7,0.

32. Postopek iz zahtevka 31, pri čemer se pH vzdržuje v območju od okoli 5,2 do okoli 6,2.

33. Postopek iz zahtevka 30, pri čemer se pH uravnava z dovajanjem virov ogljika in/ali baze.

34. Postopek iz zahtevka 33, pri čemer je baza izbrana iz skupine, ki je sestavljena iz amonijevega hidroksida in hidroksida alkalijske kovine.

35. Postopek iz zahtevka 22, pri čemer se pogoji stabilnega stanja v glavni fermentacijski stopnji vzdržujejo z uravnavanjem nivoja pene.

36. Postopek iz zahtevka 35, pri čemer se nivo pene uravnava z dodajanjem snovi za uravnavanje nivoja pene.

37. Postopek iz zahtevka 36, pri čemer je snov za uravnavanje nivoja pene sintetična snov.

38. Postopek iz zahtevka 36, pri čemer je snov za uravnavanje nivoja pene rastlinsko olje.

39. Postopek iz zahtevka 38, pri čemer je rastlinsko olje izbrano iz skupine, ki je sestavljena iz sončničnega olja in/ali sojinega olja.

40. Postopek iz zahtevka 22, pri čemer se pogoji stabilnega stanja v glavni fermentacijski stopnji vzdržujejo z uravnavanjem nivoja raztopljenega kisika.

41. Postopek iz zahtevka 40, pri čemer se nivo raztopljenega kisika uravnava z mešanjem in/ali prezračevanjem fermentacijske juhe.

42. Postopek iz zahtevka 21, ki nadalje obsega periodično spravilo količin fermentacijske juhe med glavno fermentacijsko stopnjo.

43. Postopek iz zahtevka 21, pri čemer se fermentacijski proces izvaja v submerzni gojitvi mikroorganizma.

44. Postopek iz zahtevka 21, pri čemer se fermentacijski proces izvaja pri temperaturi v območju od okoli 24 °C do okoli 30 °C.

45. Postopek iz zahtevka 21, pri čemer se inokulum prenese iz začetne stopnje gojitve v glavno fermentacijsko stopnjo, ko se pH začetne stopnje gojitve povečuje potem, ko je dosegel svojo minimalno vrednost.

46. Postopek iz zahtevka 21, pri čemer je omenjeni mikroorganizem vrsta Aspergillus.

47. Postopek iz zahtevka 46, pri čemer je omenjeni mikrooganizem sev Aspergillus obscurus ali različica ali mutant od tega.

48. Postopek iz zahtevka 47, pri čemer je omenjeni mikroorganizem holotipski sev Aspergillus obscurus n. sp. MV-1, deponiran pod številko kode NCAIM(P)F 001189.

49. Postopek iz zahtevka 46, pri čemer se med začetno stopnjo gojitve biomasa mikrooganizma goji na mediju, ki vsebuje 2-6 m/v % glukoze, 0,002-0,006 m/v % fosforjeve kisline, 0,2-0,8 m/v % kislega kazeina, 1,5-5 m/v % koruzne namakalne tekočine (50 %), 0,05-0,18 m/v % sončničnega olja, 0,05-0,18 m/v % polipropilen glikola, 0,002-0,008 m/v %

pankreatina (4 kratna aktivnost po Ph.Hg.VII.), vodo in mikro-in makroelementne soli.

50. Postopek iz zahtevka 49, pri čemer so omenjene mikro- in makroelementne soli izbrane iz skupine, ki je sestavljena iz natrijevih, kalijevih, magnezijevih in železovih soli in njihovih zmesi.