



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20040051A A2

HR P20040051A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **C 12 P 17/16**
C 12 P 17/18

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 19.01.2004.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.10.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US02/20044

Datum podnošenja međunarodne prijave 21.06.2002.

(87) Broj međunarodne objave: WO 03/000910

Datum međunarodne objave 03.01.2003.

(31) Broj prve prijave: 60/299,927

(32) Datum podnošenja prve prijave: 21.06.2001.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

(72) Izumitelji:

Biogal Gyogyszergyar Rt., Pallagi 13, 4042 Debrecen, HU

Gabor Balogh, 33 Olah K., Debrecen, HU

Eva Gulyas, 50, Kishegyesi u., 4042 Debrecen, HU

Janos Erdei, 8 Andahazi, Debrecen, HU

Peter Seress, 12 Pek, Debrecen, HU

(74) Punomoćnik:

Damir MIJATOVIĆ, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

**FERMENTACIJSKI PROCES KONTROLIRAN METABOLIZMOM ZA PROIZVODNJU
PSEUDOMONIČNE KISELINE**

(57) Sažetak: Iznesen je poboljšani fermentacijski proces za preparaciju pseudomonične kiseline A (mupirocin). Metabolički kontroliran fermentacijski proces pruža uzgoj soja *Pseudomonas* sp. u uronjenom mediju pri temperaturi unutar oko 20- 5 30°C. pH fermentacijskog medija se podešava da bude na oko 5.5 - 6.0 unošenjem izvora ugljika koji se može asimilirati, mineralne soli ili kisele / alkalne otopine u fermentacijski medij. U skladu s tim, nastala fermentacijska smjesa ima povećano iskorištenje visoko pročišćene pseudomonične kiseline A kao glavnu komponentu. Pseudomonična kiselina E kao nečistoća u fermentacijskoj smjesi je značajno smanjena.

HR P20040051A A2

OPIS IZUMA**Reference srodne prijave**

- 5 Ova prijava poziva se na privremenu prijavu 35 U.S.C. 119 (e) U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/299,927, predanu 21. 6. 2001., čiji je sadržaj ovdje uključen u svojoj potpunosti.

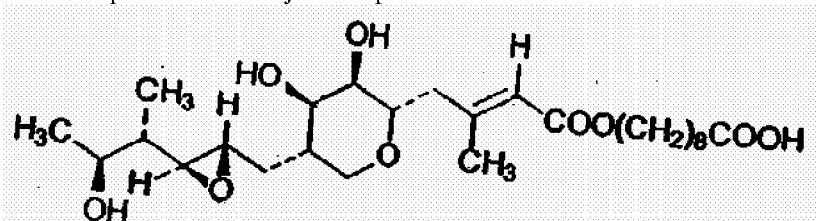
Područje izuma

- 10 Predmetni izum odnosi se na fermentacijski proces kontroliran metabolizmom za preparaciju pseudomonične kiseline. Određenje, predmetni izum je usmjeren na fermentacijski proces za preparaciju pseudomonične kiseline A regulacijom pH razine smjese za fermentacijsku kulturu putem unošenja dekstroze, mineralne soli kao što je kalcij klorid, kisele otopine ili alkalne otopine.

Pozadina izuma

- 15 Pseudomonična kiselina A, također poznata kao mupirocin, predstavlja glavnu komponentu pseudomonične kiseline. Pseudomoničnu kiselinu A otkrili su A. T. Fuller et al. 1971 godine [Nature 234, 416 (1971)]. Pseudomonična kiselina A ima sljedeći kemijski naziv i trgovačko ime: [2S-[2α(E),3β,4β,5α[2R*,3R*(1R*,2R*)]]]-9-[[3-metil-1-okso-4-
20 -[tetrahidro-3,4-dihidroksi-5-[[3*-(2-hidroksi-1-metilpropil)oksiranil]metil]-2H-piran-2-il]-2-butenil]oksi]nonanska kiselina, pseudomonična kiselina A, trans-pseudomonična kiselina, BRL-4910A, Bactoderm, Bactroban i Turixin.

Pseudomonična kiselina ima topičku antibakterijsku terapijsku aktivnost.



25 Pseudomonična kiselina A (Mupirocin)

- Pseudomonična kiselina A je moćan antibiotik protiv gram (+) bakterija (Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae) i nekih gram (-) bakterija (Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae) [A. Ward, D. M. Campoli-Richards: Drugs 32, 425-444 (1986)]. Način djelovanja vjeruje se da
30 uključuje inhibiranje izoleucin-tRNA sintetaza enzima koji djeluje na sintezu peptida kod bakterija [J. Hughes and G. Mellows: Biochem. Journal 191, 209-219 (1980)]. Izlaganje ovih referenci je uključeno putem reference u svojoj potpunosti.

- 35 Sada se pseudomonična kiselina proizvodi uzgajanjem Pseudomonas sp. Uobičajeni postupak "Fed Batch Technology" uključuje unošenje hranjivih tvari na početku fermentacijskog procesa bez reguliranja pH i koncentracije hranjivih tvari. Uslijed fluktuacije razine pH i nedostatka hranjivih tvari za vrijeme "Fed Batch" fermentacijskog procesa, iskorištenje pseudomonične kiseline je često smanjeno. Istovremeno povećanje nečistoća često predstavlja glavni nedostatak "Fed Batch" tehnologije.

- 40 Postoji i neprekidna potreba za poboljšanjem fermentacijskih procesa za preparaciju pseudomonične kiseline, naročito za povećanjem stupnja čistoće produkta pseudomonične kiseline A (npr., značajno smanjujući količinu nečistoća pseudomonične kiseline B).

Sažetak izuma

- 45 Prema jednom aspektu, predmetni izum pruža poboljšani postupak za proizvodnju pseudomonične kiseline koji obuhvaća korake:
- a) pripremanje fermentacijske smjese koja sadrži mikroorganizam koji proizvodi pseudomoničnu kiselinu;
 - b) reguliranje pH fermentacijske smjese, i
 - 50 c) izoliranje pseudomonične kiseline iz fermentacijske smjese.

- Prema drugom aspektu, predmetni izum pruža efikasni postupak za proizvodnju pseudomonične kiseline koji postiže visoku razinu čistoće (tj., omjer pseudomonične B nečistoće prema pseudomoničnoj kiselini A je manje od 3%). Stoga, predmetni izum pruža poboljšani i ekonomični fermentacijski postupak za preparaciju visoko pročišćene
55 pseudomonične kiseline A uz povećano iskorištenje.

Prema drugom aspektu, predmetni izum pruža fermentacijski postupak za proizvodnju pseudomonične kiseline pomoću soja *Pseudomonas* sp. uložnog pod šifrom No. NCAIM (P) B 001235 u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama ("National Collection of the Agricultural and Industrial Microorganisms").

- 5 Prema drugom aspektu, predmetni izum pruža fermentacijski proces pri kojem se pH fermentacijske kulture regulira da bude oko 5.5-6.0 za vrijeme fermentacije. Najviše preferirano, pH fermentacijske smjese se održava na oko 5.7.

Prema drugom aspektu, predmetni izum pruža fermentacijski proces za preparaciju pseudomonične kiseline gdje se pH regulira unošenjem izvora ugljika koji se može asimilirati u podlogu fermentacijske kulture. Preferirano, izvor ugljika koji se može asimilirati je dekstroza.

Prema drugom aspektu, predmetni izum pruža fermentacijski proces za preparaciju pseudomonične kiseline gdje se dekstroza održava na razini manjoj od oko 0.5% u fermentacijskoj smjesi za vrijeme proizvodne faze.

- 15 Prema drugom aspektu, predmetni izum pruža fermentacijski proces za preparaciju pseudomonične kiseline gdje se fermentacijska kultura hrani otopinom koja sadrži najmanje 0.1 % kalcijevog klorida (CaCl_2) za vrijeme proizvodne faze fermentacije.

Prema jednom drugom aspektu, predmetni izum pruža fermentacijski proces za preparaciju pseudomonične kiseline gdje se pH medij a fermentacijske kulture regulira unošenjem alkalne otopine i/ili kisele otopine u fermentacijsku smjesu.

Prema drugom aspektu, predmetni izum pruža fermentacijski proces za optimalnu kombinaciju unošenja dekstroze i kisele otopine. Predmetni izum pruža optimalnu kombinaciju unošenja dekstroze i kiseline koja može stimulirati biosintezu pseudomonične kiseline za vrijeme fermentacije i izbjeći efekt represije uslijed suviška izvora ugljika u smjesi.

Detaljan opis izuma

Ako nije drugačije navedeno, izraz "%" odnosi se na % težine u odnosu na težinu, "vvm" odnosi se na volumen zraka / volumen fermentacijske smjese / minute, "HPLC" odnosi se na visokotlačnu tekućinsku kromatografiju. Izraz "dekstroza" odnosi se također na glukozu.

Kako se ovdje koristi, izraz "uronjena kultura" odnosi se na fermentacijsku kulturu koja je tekuća kultura uz miješanje i propuhivanje zraka; "Fed Batch Technology" odnosi se na fermentacijski proces gdje se jedna ili više hranjiva komponenta (npr., izvor ugljika ili sol) unose samo na početku fermentacijskog procesa, "metabolička kontrola" fermentacije odnosi se na fermentacijski proces za vrijeme kojeg se podešava potrošnja izvora ugljika ili dušika; "proizvodna faza" odnosi se na period fermentacije za vrijeme kojeg se potrebne molekule biosintet i žiraju; i "logaritamska faza" odnosi se na period fermentacije za vrijeme kojeg se mikroorganizam umnožava logaritamskom progresijom.

Kako se ovdje koristi, izraz "mineralna sol" odnosi se na sol biološki važnog elementa i elementa u tragovima. Preferirano, koristi se magnezijev sulfat kao mineralna sol koja djeluje tako da regulira pH i neke druge dodatne efekte. Najviše preferirano, kalcijev klorid se koristi kao mineralna sol.

Kako se ovdje koristi, izraz "koji se može asimilirati" odnosi se na dani mikroorganizam koji ima enzimski sistem za apsorpciju hranjivih tvari i potrošnju ili primjenu ili razgradnju takvih hranjivih tvari za primjenu u biosintezi složenih sastojaka mikroorganizma.

Preferirani mikroorganizam za proizvodnju pseudomonične kiseline za provođenje fermentacijskog procesa izuma je soj *Pseudomonas* sp.. Alternativni mikroorganizmi za proizvodnju pseudomonične kiseline uključuju u potomstvo *Pseudomonas* sp., njegove prirodne varijante i mutante. Najviše preferirano, koristi se soj *Pseudomonas* sp. koji ima šifru No. NCAIM (P) B 001235 uloženu u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama ("National Collection of the Agricultural and Industrial Microorganisms").

Preferirano, pH fermentacijske smjese se regulira tako da se povisi pseudomonična kiselina A a smanji pseudomonična kiselina B (tj., omjer nečistoće pseudomonifine B prema pseudomoničnoj A je manji od 3%). Više preferirano, pH fermentacijske smjese se održava na pH razini između oko 5.2 - 6.2. Najviše preferirano, pH fermentacijske smjese je pH 5.7.

Preferirano, soj *Pseudomonas* sp., se uzgaja u uronjenom medij u za kulturu. Preferirano, fermentacijska kultura se provodi pri temperaturi unutar 20 - 30°C.

Za reguliranje pH fermentacijske kulture, jedna preferirana izvedba uključuje unošenje izvora ugljika koji se može asimilirati u medij fermentacijske kulture. Preferirana izvedba izvora ugljika koji se može asimilirati je dekstroza. U skladu s tim, unošenje dekstroze služi kao izvor ugljika koji se može asimilirati i njegovi intermedijeri i konačni produkti često snižavaju pH fermentacijske smjese. Najviše preferirano, unošenje dekstroze se održava na razini ispod od oko 0.5% dekstroze u fermentacijskoj smjesi za vrijeme proizvodne faze.

Druge preferirane izvedbe izvora ugljika koji se može asimilirati uključuju glicerol, biljna i životinjska ulja i masnoće.

Kada se koristi glicerol za hranjenje medija fermentacijske kulture kao izvor ugljika koji se može asimilirati, on nema dovoljan efekt da snizi pH fermentacijske smjese. U skladu s tim, često se koristi kisela otopina da se istovremeno hrani fermentacijska smjesa kako bi se postigao optimalni efekt. Preferirano, kisele otopine uključuju HCl, HNO₃ i H₂SO₄. Najviše preferirano, kisela otopina je HCl.

Kada je pH medij a fermentacijske kulture nizak, često se koristi alkalna otopina za ishranu fermentacijske smjese da se postigne optimalna pH razina. Preferirano, alkalna otopina koja se koristi za ishranu fermentacijske smjese uključuje NaOH i KOH. Najviše preferirano, alkalna otopina je NaOH.

Druge preferirane izvedbe za reguliranje pH medija fermentacijske kulture uključuje unošenje mineralne soli. Preferirano, otopina kalcijevog klorida se koristi za ishranu medij a fermentacijske kulture. Više preferirano, koristi se 0.1 - 0,8% (wt/wt) otopina kalcijevog klorida. Najviše preferirano, koristi se 0.1% (wt/wt) otopina kalcijevog klorida.

Postupak prema izumu je detalj no ilustriran sljedećim primjerima koji nisu ograničavajući.

Primjer 1

	Nasadni medij, g/litra	Glavni fermentacijski medij, g/litra
Dekstroza monohidrat	20	20
Sojina smjesa	-	50
Glicerol	5	10
Kukuruzna tekuća mješavina	-	5
Natrij klorid	0.5	5
Kalij klorid	0.5	-
Kalcij karbonat	4	5
Amonij sulfat	2	-
Kalij-dihidrogen-fosfat	0.4	-
Mangan klorid x 2H ₂ O	0.03	-
Magnezij sulfat	0.4	-
Suncokretovo ulje	2	10
NaOH, HCl	podešavanje pH	podešavanje pH
pH prije sterilizacije	7.0-7.2	6.5 ± 0.3

Kultura Pseudomonas sp. u nasadnom mediju

Nasadni medij (bez dekstroze) priređen je u posudi od 60 litara. Priređeni nasadni medij (oko 40 - 60 litara) je steriliziran oko 45 min pri temperature oko 120°C.

Otopina dekstroze priređena je odvojeno. pH otopine dekstroze podešen je pomoću kloridne kiseline do oko 4.0 - 5.0. Otopina dekstroze je sterilizirana oko 25 min. pri temperaturi oko 120°C. Sterilizirana otopina dekstroze dodana je u nasadni medij da se postigne koncentracija dekstroze 20 g/L.

Soj Pseudomonas sp. (tj., NCAIM(P) B 001235) je nanesen na sterilizirani nasadni medij (oko 500 ml). Soj Pseudomonas sp. pušten je da raste u nasadnom mediju dok nije dostigao logaritamsku fazu rasta. Uzgoj Pseudomonasa proveden je uz sljedeće parametre:

Temperatura: oko 25 ± 1°C;

Tlak: oko 0.4 ± 0.1 bar;

Brzina miješanja: oko 400 okretaja u minuti (rpm);

Omjer prozračavanja: oko 0.5 vvm.

Ukupno vrijeme faze nasađivanja bilo je 24 sata.

Kultura Pseudomonas sp. u fermentacijskom mediju

Glavni fermentacijski medij je priređen u posudi od 300 litara. Priređeni glavni fermentacijski medij (oko 200 litara) steriliziran je oko 45 min pri temperaturi oko 120°C.

- 5 Otopina dekstroze priređena je odvojeno. pH otopine dekstroze podešen je pomoću kloridne kiseline do oko 4.0 - 5.0. Otopina dekstroze je sterilizirana oko 25 min pri temperaturi oko 120°C. Sterilizirana otopina dekstroze dodana je u glavni fermentacijski medij.

10 Nakon što je priređen glavni fermentacijski medij, dodan je nasadni medij koji sadrži soj *Pseudomonas* sp. nakon nasadnog stupnja. Omjer nasadnog stupnja prema glavnom fermentacijskom mediju bio je oko 10% (wt/wt).

10 Uzgoj fermentacijske smjese proveden je uz sljedeće parametre:

Temperatura: oko $25 \pm 1^\circ\text{C}$;

Omjer provjetravanja: oko 0,5 - 1.0 vvm;

Brzina miješanja: oko 300 - 600 okretaja u min (rpm); i

15 Tlak: oko 0.5 bar.

Brzina miješanja i brzina provjetravanja podešene su unutar gore spomenutog raspona kako bi se održavao otopljeni kisik na konstantnoj razini od 30% za vrijeme cijelog fermentacijskog procesa.

- 20 Trajanje uzgoja fermentacijske smjese bilo je oko 64 sata. Za vrijeme fermentacijskog procesa, dodatno ulje je dodavano u fermentacijsku smjesu ako je došlo do pjenjenja smjese.

25 ISKORIŠTENJE: Postignuto iskorištenje pseudomonične kiseline A bilo je oko 2056 μg /gram fermentacijske smjese kako je mjereno pomoću HPLC. Nečistoća pseudomonična kiselina B procijenjena je na oko 18 % (wt/wt) pseudomonične kiseline A.

Određivanje sadržaja i čistoće pseudomonične A i pseudomonične B:

- 30 Određivanje sadržaja i čistoće za pseudomoničnu A i pseudomoničnu B temeljeno je na metodi probe u USP 24. Određivanje probe provedeno je pomoću HPLC u kojoj su određivane koncentracije pseudomonične A i pseudomonične B kao i omjer wt/wt pseudomonične A i pseudomonične B.

Kromatografski sistem je uključivao:

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

35 Detektor: UV 229 nm;

Brzina protoka: 0.7 ml/min;

Naneseni volumen: 20 μl ; i

Mobilna faza: Prirediti prikladnu smjesu pH 6.3 fosfatnog pufera (0.05 M monobazični natrijev fosfat) i acetonitril (75:25).

40

Standardna otopina:

Odvagane pseudomonična A i pseudomonična B dodane su u volumetrijsku tikvicu volumena 100 ml nakon čega slijedi 25 ml acetonitrila da nastane smjesa, smjesa je razrijeđena fosfatnim puferom (pH 6.3) i onda promiješana. Konačna koncentracija standarda bila je oko 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

45

Trajanje: oko 15 minuta.

Priređivanje uzorka iz fermentacijske smjese:

- 50 Mupirocin fermentacijska smjesa (5 ml) prenesena u 10.0 ml volumetrijsku tikvicu i razrijeđena etil alkoholom (96%);
 Obradivano ultrazvukom 20 minuta;
 Centrifugirano 15 minuta na 5000 rpm;
 Razrijeđen supernatant (1.0 ml) do 10.0 ml mobilnom fazom;
 Filtrirano kroz Millipore filter (0.45 mikrona).

55

Primjer 2

	Nasadni medij, g/litra	Glavni fermentacijski medij, g/litra
Dekstroza monohidrat	20	20
Sojina smjesa	-	50
Glicerin Kukuruzna tekuća mješavina	5	10
Natrij klorid	-	5
Kalij klorid	0.5	-
Kalcij klorid	-	3
Kalcij karbonat	4	4
Amonij sulfat	2	-
Kalij -dihidrogen fosfat	0.4	-
Mangan klorid x 2H ₂ O	0.03	-
Magnezij sulfat	0.4	-
Suncokretovo ulje	2	10
NaOH, HCl	podešavanje pH	podešavanje pH
pH prije sterilizacije	7.0-7.2	6.5 ± 0.3

Kultura Pseudomonas sp. u nasadnom mediju

- 5 Nasadni medij (bez dekstroze) priređen je u posudi od 60 litara. Priređeni nasadni medij (oko 40 - 60 litara) je steriliziran oko 45 min pri temperature oko 120°C.
- 10 Otopina dekstroze priređena je odvojeno. pH otopine dekstroze podešen je pomoću kloridne kiseline do oko 4.0 - 5.0. Otopina dekstroze je sterilizirana oko 25 min pri temperaturi oko 120°C. Sterilizirana otopina dekstroze dodana je u glavni fermentacijski medij pri koncentraciji dekstroze 20 g/L.
- 15 Soj pseudomonas sp. (tj., NCAIM (P) B 001235) inokuliran u steriliziran nasadili medij (500 ml). Soj Pseudomonas sp, pušten je da raste u nasadnom mediju dok nije došao do faze logaritamskog rasta. Uzgoj Pseudomonasa provoden je uz sljedeće parametre:
- Temperatura: oko 25 ± 1°C;
- 20 Tlak: oko 0.4 ± 0,1 bar;
- Brzina miješanja: oko 400 rpm; i
- Omjer provjetravanja: oko 0.5 vvm.
- Ukupno vrijeme faze nasadivanja bilo je 24 sata.

Kultura Pseudomonas sp. u fermentacijskom mediju

- 25 Glavni fermentacijski medij je priređen u posudi od 300 litara. Priređeni glavni fermentacijski medij (oko 200 litara) steriliziran je oko 45 min pri temperaturi oko 120°C.
- Otopina dekstroze priređena je odvojeno. pH otopine dekstroze podešen je pomoću kloridne kiseline do oko 4,0 - 5.0. Otopina dekstroze je sterilizirana oko 25 min. pri temperaturi oko 120°C. Sterilizirana otopina dekstroze dodana je u glavni fermentacijski medij da se postigne koncentracija 20 g/L.
- 30 Nakon što je priređen glavni fermentacijski medij, dodan je nasadni medij koji sadrži soj Pseudomonas sp. nakon nasadnog stupnja. Omjer nasadnog stupnja prema glavnom fermentacijskom mediju bio je oko 10% (wt/wt).
- 35 Uzgoj fermentacijske smjese proveden ja uz sljedeće parametre:
- Temperatura: oko 25 ± 1°C;
- Brzina provjetravanja: oko 0.5 - 1.0 vvm;
- Brzina miješanja: oko 300 - 600 okretaja u min (rpm), - i
- 40 Tlak: oko 0.5 bar.
- Brzina miješanja i brzina provjetravanja podešene su unutar gore spomenutog raspona kako bi se održavao otopljeni kisik na konstantnoj razini od 30% za vrijeme cijelog fermentacijskog procesa.
- Kada je fermentacijska smjesa postigla pH oko 5.5 - 5.8, pH je počeo rasti. Kroz fermentacijsku smjesu pH je reguliran pri konstantnoj razini oko 5.5 - 6.0. Ovo je postignuto dodavanjem otopine kloridne kiseline u fermentacijsku smjesu.
- 45 Brzina nanošenja kloridne kiseline varirala je ovisno o trenutačnom pH smjese.

Trajanje uzgoja fermentacijske smjese bilo je oko 66 sati. Za vrijeme fermentacijskog procesa, dodatno ulje je dodavano u fermentacijsku smjesu ako je došlo do pjenjenja smjese.

ISKORIŠTENJE: Postignuto iskorištenje pseudomonične kiseline A bilo je oko 2251 µg/gram fermentacijske smjese kako je mjereno pomoću HPLC. Nečistoća pseudomonična kiselina B procijenjena je na oko 1.6 % (wt/wt) pseudomonične kiseline A.

Primjer 3

U ovom primjeru preparacija nasadnog medija, glavnog fermentacijskog medija i uzgoj soja *Pseudomonas* sp. u nasadnom mediju i glavnom fermentacijskom mediju provedeni su u skladu s primjerom 2.

Uzgoj fermentacijske smjese također je proveden s istim parametrima kulture kako je definirano u primjeru 2.

Međutim, pH fermentacijske smjese u ovom primjeru bio je podešavan primjenom različitog postupka. Umjesto unošenja kloridne kiseline u fermentacijsku smjesu, pH je reguliran unošenjem otopine dekstroze.

Opaženo je da je pH počeo rasti kada je fermentacijska smjesa postigla pH oko 5.5 - 5.8. U ovom primjeru, pH je reguliran pri konstantnoj razini oko 5.5 - 6.0. Ovo je postignuto dodavanjem otopine dekstroze. Brzina unošenja otopine dekstroze u fermentacijsku smjesu ovisila je o trenutačnom pH i trenutačnom sadržaju u dekstroze u smjesi. Za vrijeme unošenja dekstroze, razina glukoze nije puštena da bude iznad oko 0.5% (wt/wt). Kada se pH povisio iznad 5.8 - 6.0 i razina dekstroze je bila iznad 0.45% (wt/wt), pH je podešen unošenjem kloridne kiseline umjesto dekstroze u fermentacijsku smjesu.

Trajanje uzgoja fermentacijske smjese bilo je oko 66 sati. Za vrijeme fermentacijskog procesa, dodatno ulje je dodavano u fermentacijsku smjesu ako je došlo do pjenjenja smjese.

ISKORIŠTENJE: Postignuto iskorištenje pseudomonične kiseline A bilo je oko 3021 µg/gram fermentacijske smjese kako je mjereno pomoću HPLC. Nečistoća pseudomonična kiselina B procijenjena je na oko 2.9 % (wt/wt) pseudomonične kiseline A.

Predmetni izum ne treba se ograničiti u dometu ovdje opisanim specifičnim izvedbama. Zaista, različite modifikacije izuma dodatno uz one opisane ovdje, postat će očite stručnjacima u području, iz prethodnog opisa i pratećih brojki. Takve modifikacije su namijenjene da budu unutar dometa patentnih zahtjeva. Ovdje su citirane različite publikacije čije iznošenje je uključeno putem reference u svojoj potpunosti.

PATENTNI ZAHTEVI

1. Fermentacijski proces za proizvodnju pseudomonične kiseline **naznačen time** da obuhvaća korake:
 - a) pripremanje fermentacijske smjese koja sadrži mikroorganizam koji proizvodi pseudomoničnu kiselinu;
 - b) reguliranje pH fermentacijske smjese, - i
 - c) izoliranje pseudomonične kiseline iz fermentacijske smjese.
2. Fermentacijski proces prema zahtjevu 1 **naznačen time** da pseudomonična kiselina je pseudomonična kiselina A.
3. Fermentacijski proces prema zahtjevima 1 ili 2 **naznačen time** da se mikroorganizam koji proizvodi pseudomoničnu kiselinu izabere iz skupine koja se sastoji od soja *Pseudomonas* sp., njegovog potomstva, prirodne varijante i mutančne varijante *Pseudomonas* sp..
4. Fermentacijski proces prema zahtjevu 3 **naznačen time** da soj *Pseudomonas* sp. je NCAIM (P) B 001235 uloženi u Nacionalnoj zbirci poljoprivrednih i industrijskih mikroorganizama ("National Collection of the Agricultural and Industrial Microorganisms").
5. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 1, 2, 3 ili 4 **naznačen time** da je fermentacija u uronjenoj kulturi.
6. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 1, 2, 3, 4 ili 5 **naznačen time** da se fermentacija održava pri temperaturi oko 20°C - 30°C.
7. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 1, 2, 3, 4, 5 ili 6 **naznačen time** da se pH fermentacijske smjese regulira za vrijeme proizvodne faze fermentacije.
8. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 1, 2, 3, 4, 5, 6 ili 7 **naznačen time** da se pH fermentacijske smjese održava na oko 5.7.
9. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ili 8 **naznačen time** da se pH fermentacijske smjese regulira unošenjem izvora ugljika koji se može asimilirati u fermentacijsku smjesu.
10. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 9 **naznačen time** da se unošenje izvora ugljika koji se može asimilirati kontrolira metabolički.

11. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 9 ili 10 **naznačen time** da je izvor ugljika koji se može asimilirati dekstroza.
12. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ili 11 **naznačen time** da se pH fermentacijske smjese regulira istovremenim dodavanjem izvora ugljika koji se može asimilirati i kisele otopine u fermentacijsku smjesu.
13. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 12 **naznačen time** da je izvor ugljika koji se može asimilirati glicerol i kiselina otopina je kloridna kiselina.
14. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ili 13 **naznačen time** da se pH fermentacijske smjese regulira dodavanjem mineralne soli u fermentacijsku smjesu.
15. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 14 **naznačen time** da je mineralna sol otopina kalcijevog klorida.
16. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 15 **naznačen time** da je otopina kalcijevog klorida oko 0.1% - 0.8% (wt/wt).
17. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 15 **naznačen time** da je otopina kalcijevog klorida oko 0.3% (wt/wt).
18. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ili 17 **naznačen time** da se pH fermentacijske smjese regulira dodavanjem alkalne otopine u fermentacijsku smjesu.
19. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 18 **naznačen time** da se alkalna otopina izabere iz skupine koja se sastoji od natrijevog hidroksida i kalijevog hidroksida.
20. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 18 **naznačen time** da je alkalna otopina kalijev hidroksid.
21. Fermentacijski proces prema zahtjevima 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ili 20 **naznačen time** da se pH fermentacijske smjese regulira dodavanjem kiselce otopine u fermentacijsku smjesu.
22. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 21 **naznačen time** da se kiselina otopina izabere iz skupine koja se sastoji od nitratne kiseline (HNO_3), sulfatne kiseline (H_2SO_4) i kloridne kiseline (HCl).
23. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 21 ili 22 **naznačen time** da je kiselina otopina kloridna kiselina.
24. Postupak prema patentnim zahtjevima 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ili 23 **naznačen time** da se pH fermentacijske smjese održava između oko 5.2 - 6.2.
25. Fermentacijski proces za proizvodnju pseudomonične kiseline **naznačen time** da obuhvaća korake:
 - a) pripremanje fermentacijske smjese koja sadrži mikroorganizam koji proizvodi pseudomoničnu kiselinu i kalcijev klorid;
 - b) reguliranje pH fermentacijske smjese unošenjem dekstroze nakon čega slijedi kiselina, ako je potrebno; i
 - c) izoliranje pseudomonične kiseline iz fermentacijske smjese.
26. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 24 ili 25 **naznačen time** da reguliranje pH uključuje održavanje pH na oko 5.7 - 6.
27. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 11, 25 ili 26 **naznačen time** da reguliranje pH uključuje maksimalnu razinu dekstroze oko 0.5% (wt/wt).
28. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 25, 26 ili 27 **naznačen time** da se kiselina dodaje kada je pH najmanje oko 5.8 i razina dekstroze je najmanje oko 0.45% (wt/wt).
29. Fermentacijski proces prema patentnim zahtjevima 1, 25, 26, 27 ili 28 **naznačen time** da proces dovodi do nastajanja pseudomonične kiseline čistoće najmanje oko 82% (wt/wt) pseudomonične kiseline A u odnosu na pseudomoničnu kiselinu B.
30. Fermentacijski proces prema patentnom zahtjevu 29 **naznačen time** da je čistoća najmanje oko 97%.
31. Pseudomonična kiselina **naznačena time** da je priređena postupkom prema patentnom zahtjevu 30.
32. Fermentacijska smjesa mikroorganizma koji proizvodi pseudomoničnu kiselinu **naznačena time** da obuhvaća razinu pseudomonične kiseline A u odnosu na pseudomoničnu kiselinu B (wt/wt) najmanje 97%, gdje su pseudomonična kiselina A i B nastale fermentacijom mikroorganizma.
33. Farmaceutska kompozicija **naznačena time** da obuhvaća pseudomoničnu kiselinu A i farmaceutski prihvatljiv ekscipijent, gdje je razina pseudomonične kiseline A najmanje oko 97% u usporedbi s razinom pseudomonične kiseline E (wt/wt).
34. Postupak za liječenje infekcije koja podliježe pseudomoničnoj kiselini u životinji **naznačen time** da obuhvaća davanje farmaceutske kompozicije prema patentnom zahtjevu 33.

SAŽETAK

55. Iznesen je poboljšani fermentacijski proces za preparaciju pseudomonične kiseline A (mupirocin). Metabolički kontroliran fermentacijski proces pruža uzgoj soja *Pseudomonas* sp. u uronjenom mediju pri temperaturi unutar oko 20- 5 30°C. pH fermentacijskog medija se podešava da bude na oko 5.5 - 6.0 unošenjem izvora ugljika koji se može asimilirati, mineralne soli ili kisele / alkalne otopine u fermentacijski medij. U skladu s tim, nastala fermentacijska smjesa ima povećano iskorištenje visoko pročišćene pseudomonične kiseline A kao glavnu komponentu. Pseudomonična kiselina E kao nečistoća u fermentacijskoj smjesi je značajno smanjena.