

KIVONAT**Metabolizmus kontrollált fermentációs eljárás
pszeudomonsav előállítására**

A találmány tárgya javított fermentációs eljárás pszeudomonsav A (mupirocin) előállítására. A metabolikusan kontrollált fermentációs eljárás szerint *Pseudomonas* sp. törzset tenyésztnek sülteszett kultúrában kb. 20-30 C között.

A fermentációs táptalaj pH-ját kb. 5,5-6 körülire szabályozzák asszimilálható szénforrás, ásványi só és savas/lúgos oldat adagolásával.

Ennek megfelelően az eredményül kapott fermentációs táptalaj megnövekedett kihozattal tartalmaz nagy tisztaságú pszeudomonsavat, mint fő komponenst. A pszeudomonsav B szennyező a fermentációs táptalajban jelentősen csökkent.

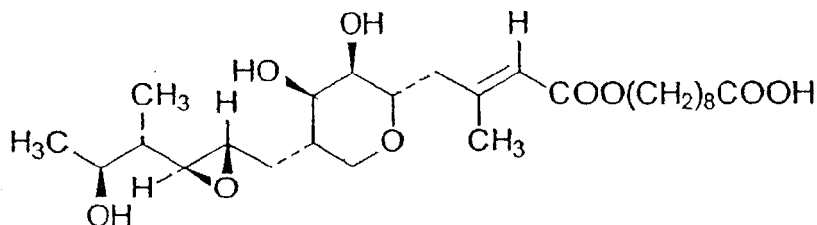
Metabolizmus kontrollált fermentációs eljárás pszeudomonsav előállítására

A TALÁLMÁNY TÁRGYA

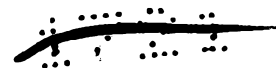
Jelen találmány a pszeudomonsav előállításának metabolikusan kontrollált fermentációs eljárását írja le. Különösen, jelen találmány egy olyan pszeudomonsav A előállítására vonatkozó fermentációs eljáráshoz vezetett, ahol a fermentációs táptalaj pH szintjét dextróz, ásványi só, mint a CaCl_2 , savas oldat, vagy alkalikus oldat szabályozza.

A TALÁLMÁNY HÁTTERE

A pszeudomonsav A, amely mupirocinként is ismert, a pszeudomonsav fő komponenseként határozható meg. A pszeudomonsav A-t elsőként A.T. Fuller és társai fedezték fel 1971-ben [Nature 234, 416, (1971)]. A pszeudomonsavnak a következő kémiai neve és kereskedelmi nevei vannak: [2S-[2 alfa (E), 3 béta, 4 béta, 5 alfa [2R*, 3R* (1R*, 2 R*)]]]-9-[[3-Metil-1-oxo-4-[tetrahydro-3,4-dihidroxi-5-[[3-(2-hidroxi-1-metilpropil)oxiranil]metil]-2H-piran-2yl]-2-butenil]oxi]nonanionos sav, pszeudomonsav A, transz-pszeudomonsav, BRL-4910A, Bactoderm, Bactroban és Turixin. A pszeudomonsavnak topikus antibakteriális terápiás hatása van.



Pszeudomonsav A (Mupirocin)



A pszeudomonsav A egy potens antibiotikum a Gram (+) baktériumok (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*) és néhány Gram (-) baktérium (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*) ellen A. Ward, D.M. Campoli-richards: *Drugs* 32, 425-444 (1986)]. A hatásmechanizmusa feltételezhetően magába foglalja az isoleucin-tRNS-szintetáz enzim gátlását, ami a baktérium fehérjeszintézisét befolyásolja [J. Hughes and G. Mellows: *Biochem. Journal* 191, 209-219 (1980)]. Mindezek teljes egészükben be vannak építve referenciaként.

Jelenleg a pszeudomonsavat a *Pseudomonas* sp. tenyésztésével állítják elő. Hagyományos fed batch technológia tartalmazza a tápanyagokat a fermentációs eljárás elején pH- és tápanyag koncentráció szabályozás nélkül. A fed batch fermentáció alatti pH-szint és a tápanyag-fogyás ingadozása miatt, a pszeudomonsav-hozam gyakran csökken. A fed batch technológia fő hátránya a vele járó megnövekedett mennyiségű szennyeződés.

Folyamatosan szükséges a pszeudomonsav fermentációs előállításának fejlesztése, különösen a pszeudomonsav A termék tisztaságának fokozása miatt (pl: a pszeudomonsav B szennyeződés jelentős csökkentése).

A TALÁLMA NY ÖSSZEFOGLALÁSA

Egyrészt jelen találmány a pszeudomonsav előállítására biztosít egy fejlesztett eljárást, amely az alábbi lépésekből áll:

- a) pszeudomonsavat előállító baktériumot tartalmazó fermentációs táptalaj előállítása
- b) a fermentációs táptalaj pH-jának szabályozása; és
- c) a fermentációs táptalajból a pszeudomonsav kinyerése.

Másrészt, jelen találmány magas tisztaságú pszeudomonsav előállítására képes hatékony eljárást biztosít (pl. a pszeudomonsav B szennyeződés a pszeudomonsav A-hoz viszonyítva kevesebb, mint 3%). Ennél fogva, jelen találmány egy továbbfejlesztett és gazdaságos fermentációs eljárást biztosít a tisztább és magasabb hozamú pszeudomonsav A előállítására.



Másrészt, jelen találmány a pszeudomonsav előállítására olyan fermentációs eljárást ismertet, ahol a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM(P)B001235 szám alatt letétbe helyezett *Pseudomonas* sp. törzset használják.

Másrészt, jelen találmány olyan fermentációs eljárást ismertet, ahol a fermentációs táptalaj pH-ja 5.5-6.0 között szabályozott az egész fermentáció alatt. Legelőnyösebben a fermentációs elegy pH-ja 5.7.

Másrészt, jelen találmány a pszeudomonsav előállítására olyan fermentációs eljárást ismertet, ahol a pH, a fermentációs táptalajhoz adott asszimilálható szénforrás adagolásával szabályozott. Előnyösen az asszimilálható szénforrás dextróz.

Másrészt, jelen találmány a pszeudomonsav előállítására olyan fermentációs eljárást ismertet, ahol a dextróz szintjét a fermentációs elegyben körülbelül 0.5 % alatt tartják az előállítás fázisában.

Másrészt, jelen találmány a pszeudomonsav előállítására olyan fermentációs eljárást ismertet, ahol a fermentációs táptalajhoz kevesebb, mint 0.1 % kalcium-kloridot tartalmazó oldatot adagolnak a fermentáció előállítási fázisában.

Másrészt, jelen találmány a pszeudomonsav előállítására olyan fermentációs eljárást ismertet, ahol a fermentációs táptalaj pH-ját a fermentációs elegyhez adott lúgos oldattal és/vagy savas oldattal szabályozzák.

Másrészt, jelen találmány fermentációs eljárást ismertet a dextróz és a savas oldat optimális adagolásának felhasználásával. Jelen találmány dextróz és sav adagolásával optimális kombinációt biztosít, ami a pszeudomonsav bioszintézist növelni tudja a fermentáció alatt és elkerülhető a táptalajban lévő többlet szénforrások repressziós hatása.

A TALÁLTMÁNY RÉSZLETES LEÍRÁSA

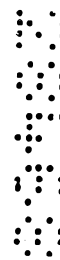
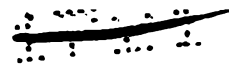
Ha más kikötés nincs, a „%”jelzés a tömeg/tömeg %-ra utal, a „vvm” a levegő térfogata/ a fermentációs elegy térfogata / perc-re utal, a „HPLC” a magas nyomású folyadék kromatográfiát jelenti. A dextróz megjelölés glükózra is vonatkozik.

Az itt alkalmazottak szerint, a „süllyesztett táptalaj” olyan fermentációs táptalajra utal, ami folyékony táptalaj keveréssel és levegőztetéssel; a „fed batch technológia” arra a fermentációs eljárásra utal, ahol egy vagy több tápanyagkomponenst (pl. szénforrás, vagy só) adnak csak a fermentációs eljárás elején; a „metabolikusan kontrollált” fermentáció olyan fermentációs eljárásra utal, amely során a szén- és nitrogénforrás csökkenés szabályozott; a „termelési fázis” a fermentáció azon periódusára utal, amikor a célmolekulák szintetizálódnak; a „logaritmikus fázis” a fermentáció azon periódusa, amikor a mikroorganizmus szaporodása a logaritmikus fázisban van.

Az itt alkalmazott „ásványi só” kifejezés, biológiailag fontos sóra és nyomelemre utal. Előnyösebben ásványi sóként magnézium-szulfátot használnak, melynek szerepe a pH szabályozása és még néhány járulékos hatás. Legelőnyösebben, kalcium-kloridot használnak ásványi sóként.

Az itt alkalmazott „asszimilálható” kifejezés, arra az adott mikroorganizmusra utal, amelynek enzimszisztemje van a tápanyagok felvételére és elfogyasztására vagy felhasználására, vagy lebontásra olyan tápanyagoknak, amelyeket a mikroorganizmus felhasznál komplex alkotórészeinek bioszintézisére.

Előnyös pszeudomonsav előállító mikroorganizmus, amellyel a találmány szerinti fermentációs eljárását is végre lehet hajtani a *Pseudomonas* sp. törzs. Alternatív pszeudomonsav előállító mikro-organizmusok a *Pseudomonas* leszármazottjai, természetes variánsai és mutánsai. Legelőnyösebben ez a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményébe NCAIM(P)B 001235 szám alatt letétbe helyezett *Pseudomonas* sp. törzs.



Előnyösen, a fermentációs táptalaj pH-ját úgy szabályozzuk, hogy a pszeudomonsav A szintje növekedjen és pszeudomonsav B szintje csökkenjen (pl. a pszeudomonsav B szennyeződés aránya a pszeudomonsav A szintjére vonatkoztatva kevesebb mint 3 %). Előnyösebben, a fermentációs elegy pH-ja kb. 5.2-6.2 közöttire szabályozott. Legelőnyösebben a fermentációs elegy pH-ja 5.7.

Előnyösen, a *Pseudomonas* sp.-t sülyesztett táptalajban növesztik. Előnyösen, a fermentációs táptalajt 20-30 °C-on tartják.

A fermentációs táptalaj pH-szabályozásának egyik előnyös lehetősége a fermentációs táptalajhoz adott asszimilálható szénforrás. Előnyösen az asszimilálható szénforrás dextróz. Következésképpen, a szénforrásként alkalmazott dextróz és annak közti- és végtermékei gyakran csökkentik a fermentációs táptalaj pH-ját. Legelőnyösebben, a dextrózádagolás, kisebb, mint 0.5 %-os dextróz szintet tart fenn a fermentációs táptalajban a produkciós fázisban.

Másik kedvelt asszimilálható szénforrás a glicerol, a növényi- és állati olajok és zsírok.

A glicerolnak, mint a táptalaj asszimilálható szénforrásának, nincs számottevő pH-csökkentő hatása a fermentációs táptalajra nézve. Ezért gyakran adnak a fermentációs elegyhez savas oldatot, hogy elérjék az optimális hatást. Előnyösen, a savas oldatok HCl, HNO₃ és H₂SO₄. Legelőnyösebben a savas oldat HCl.

Amikor a fermentációs táptalaj pH-ja alacsony, az optimális pH-szint elérésére gyakran adnak a fermentációs táptalajhoz lúgos oldatot, ami lehet NaOH és KOH. Legelőnyösebben a lúgos oldat NaOH.

Másik előnyös lehetőség a fermentációs táptalaj pH-jának szabályozására az ásványi só adagolás. Előnyösen, kalcium-klorid oldatot használnak a fermentációs táptalajhoz történő adagolásra. Előnyösebben, 0.1-0.8 %-os (t/t) kalcium-klorid oldatot használnak. Legelőnyösebben 0.3 %-os (t/t) kalcium-klorid oldatot használnak.

A találmányhoz kapcsolódó eljárást részletesen az alábbi, nem korlátozó példákkal ismertetjük.

1. példa

	Előfermentációs táptalaj	Fő fermentációs táptalaj
	(gram/liter)	(gram/liter)
Dextróz-monohidrát	20	20
Szójabab liszt	-	50
Glicerín	5	10
Kukoricafehérje	-	5
Nátrium-klorid	0.5	5
Kálium-klorid	0.5	-
Kalcium-karbonát	4	5
Ammónium-szulfát	2	-
Kálium-dihidrogén-foszfát	0.4	-
Mangán-klorid x 2H ₂ O	0.03	-
Magnézium-szulfát	0.4	-
Napraforgóolaj	2	10
NaOH, HCl	pH beállítás	Ph beállítás
pH a sterilizáció előtt	7.0-7.2	6.5±0.3

A Pseudomonas sp. kultúra az előfermentációs táptalajban

A (dextrózmentes) előfermentációs táptalajt 60 literes tartályban készítettük el. Az előállított előfermentációs táptalajt (kb. 40 liter) körülbelül 45 percig sterilizáltuk körülbelül 120 °C-on.

A dextróz oldatot külön készítettük el. A dextróz oldat pH-ját sósavval állítottuk be kb. 4.0-5.0-ra. A dextróz oldatot körülbelül 25 percig, 120 °C-on sterilizáltuk.

A sterilizált dextróz oldatot hozzáadtuk az előfermentációs táptalajhoz, hogy az elérje a 20 g/l dextróz koncentrációt.

A *Pseudomonas* sp. törzset (pl. NCAIM (P)B 001235) leoltottuk a sterilizált előfermentációs táptalajra (kb. 500ml). A *Pseudomonas* sp. törzs az előfermentációs táptalajban a logaritmikus növekedési fázis eléréséig növekedett.

A *Pseudomonas* növesztését a következő paraméterek között valósítottuk meg:

Hőmérséklet: kb. 25 ± 1 °C;

Csúcsnyomás: kb. 0.4 ± 0.1 bar;

Keverési sebesség: kb. 400 rpm;

Levegőztetési arány: kb. 0.5 vvm.

A csíráállapot teljes időtartama 24 óra volt.

A *Pseudomonas* sp. kultúra a fermentációs táptalajban

A fő fermentációs táptalajt 300 literes tartályban készítettük el. Az előállított fő fermentációs táptalajt (körülbelül 200 liter) körülbelül 45 percig, körülbelül 120 °C-on sterilizáltuk.

A dextrózoldatot külön állítottuk elő. A dextróz oldat pH-ját sósavval állítottuk be körülbelül 4.0-5.0 közöttire. A dextróz oldatot körülbelül 25 percig, körülbelül 120 °C-on sterilizáltuk. A sterilizált dextróz oldatot a fő fermentációs táptalajhoz adtuk.

Miután a fő fermentációs táptalaj elkészült, hozzáadtuk az előfermentációs táptalajt, ami tartalmazta a csírafázisa után hozzáadott *Pseudomonas* sp. törzset. Az előfermentációs táptalaj aránya a fő fermentációs táptalajhoz kb. 10 % volt (t/t).

A fermentációs táptalaj szaporítását a következő paraméterek jellemzik:

Hőmérséklet: körülbelül 25 ± 1 °C;

Levegőztetési arány: körülbelül 0,5-1 vvm;

Keverési sebesség: körülbelül 300-600rpm; és

Csúcsnyomás: körülbelül 0,5 bar.

Mind a keverési sebességet, mind a levegőztetési arányt a fent leírt tartományba állítottuk be, azért, hogy kontrollálhassuk a feloldódott oxigén szintjét és a fermentációs eljárás alatt végig 30 %-on tartsuk azt.

A fermentációs táptalaj szaporításának időtartama körülbelül 64 óra volt. A fermentációs eljárás során a fermentációs táptalajhoz olajat adtunk, amikor az elegyben habképződés volt.

HOZAM: Az elért pszeudomonsav A hozam HPLC-vel mérve megközelítően $2,056 \mu\text{g}/\text{gram}$ fermentációs táptalaj. A pszeudomonsav B szennyeződést 18 %-ra (t/t) becsültük a pszeudomonsav A-hoz viszonyítva.

A pszeudomonsav A és pszeudomonsav B tartalom és tisztaság meghatározása:

USP 24 elemzési módszeren alapult a pszeudomonsav A és pszeudomonsav B tartalom és tisztaság meghatározása. A meghatározást HPLC-vel végeztük, amellyel az adott pszeudomonsav A és pszeudomonsav B koncentrációt meghatároztuk csakúgy, mint a pszeudomonsav A és pszeudomonsav B t/t arányát.

A kromatográfiás rendszer leírása:

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

Detektor: UV 229 nm;

Áramlási sebesség: 0,7 ml/perc;

Injektálási térfogat: 20 μl ; és

Mozgó fázis: Készítsen egy megfelelő keveréket pH 6,3 foszfát pufferből (0,05 M monobázikus nátrium-foszfát) és acetonitrilből (75:25).

Standard oldat

100 ml-es tartályba bemértük a Pszeudomonsav A-t és Pszeudomonsav B-t, amikhez 25 ml acetonitrilt adtunk, az elkészített keveréket felhígítottuk foszfát pufferrel (pH 6,3) majd összekevertük. A standardok végkoncentrációja kb. 100 µg/ml volt.

Futtatási idő: körülbelül 15 perc.

Minta preparálása a fermentációs táptalajból:

A mupirocinos fermentációs táptalajt (5 ml) egy 10 ml-es mérőedénybe tettük és etil-alkohollal (96 %) hígítottuk;

20 percig ultrahangoztuk;

15 percig 5,000 rpm-en centrifugáltuk;

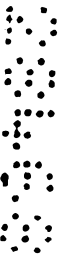
A felülúszót (1,0ml) 10,0 ml-re hígítottuk a mozgó fázissal;

Millipore filteren (0,45 mikron) szűrtük át.

2. példa

	Előfermentációs táptalaj, (gram/liter)	Fő fermentációs táptalaj, (gram/liter)
Dextróz-monohidrát	20	20
Szójabab liszt	-	50
Glicerín	5	10
Kukoricalékvár	-	5
Nátrium-klorid	0,5	5
Kálium-klorid	0,5	-
Kalcium-klorid	-	3
Kalcium-karbonát	4	4
Ammonium-szulfát	2	-
Kálium-dihidrogén-foszfát	0,4	-
Mangán-klorid x 2H ₂ O	0,03	-

Magnézium-szulfát	0,4	-
Napraforgó olaj	2	10
NaOH, HCl	pH beállítás	pH beállítás
Sterilizáció előtti pH:	7,0-7,2	6,5±0,3



Pseudomonas sp. kultúra az előfermentációs táptalajban

Az előfermentációs táptalajt (dextrózmentes) 60 literes tartályban készítettük el. Az előállított előfermentációs táptalajt (körülbelül 40 liter) körülbelül 45 percig, kb. 120 °C-on sterilizáltuk.

A dextróz oldatot külön állítottuk elő. A dextróz oldat pH-ját sósav hozzáadásával állítottuk be körülbelül 4,0-5,0 közöttre. A dextróz oldatot körülbelül 25 percig, megközelítőleg 120 °C-on sterilizáltuk. A sterilizált dextróz oldatot az előfermentációs táptalajhoz adtuk, így a dextrózkoncentráció 20 g/l.

A *Pseudomonas* sp. törzset (pl. NCAIM(P)B 001235) a sterilizált előfermentációs táptalajra (500 ml) oltottuk. A *Pseudomonas* sp. törzset addig engedték nőni az előfermentációs táptalajban, amíg el nem érte a logaritmus növekedési fázisát. A *Pseudomonas* növesztését a következő paraméterek között végeztük:

- Hőmérséklet: kb. 25±1°C;
- Csúcsnyomás: kb. 0,4±0,1 bar;
- Keverési sebesség: kb. 400 rpm; és
- Levegőztetési arány: kb. 0,5 vvm.

A teljes csírázási idő körülbelül 24 óra volt.

Pseudomonas sp. kultúra a fermentációs táptalajban

A fő fermentációs táptalajt egy 300 literes tartályban készítettük el. Az előállított fő fermentációs táptalajt (körülbelül 200 liter) körülbelül 45 percig és körülbelül 120°C-on sterilizáltuk.

A dextróz oldatot külön állítottuk elő. A dextróz oldat pH-jának beállítását sósav hozzáadásával végeztük körülbelül 4,0-5,0 közé. A dextróz oldatot körülbelül 25 percig, körülbelül 120 °C-n sterilizáltuk. A sterilizált dextróz oldatot hozzáadtuk a fő fermentációs táptalajhoz, így 20 g/l-es koncentrációt értünk el.

Miután elkészítettük a fő fermentációs táptalajt, hozzáadtuk a csírástádium utáni előfermentációs táptalajt, ami a *Pseudomonas* sp. törzset tartalmazta. A csíráállapot aránya a fő fermentációs táptalajhoz körülbelül 10 % (t/t).

A *Pseudomonas* sp. növesztése a fermentációs táptalajban a következő paraméterek között valósult meg:

Hőmérséklet: körülbelül $25 \pm 1^\circ\text{C}$;

Levegőztetési arány: körülbelül 0,5-1,0 vvm;

Keverési sebesség: körülbelül 300-600 rpm; és

Csúcsnyomás: körülbelül 0,5 bar.

Mind a keverési sebességet, mind a levegőztetési arányt a fent említett tartományba állítottuk be, hogy az oldott oxigén szintjét a fermentáció során végig 30 %-on tudjuk tartani.

Amikor a fermentációs táptalaj elérte a pH körülbelül 5,5-5,8-at, a pH elkezdett emelkedni. A fermentációs táptalaj pH-ja végig 5,5-6,0 között szabályozott. Ezt azáltal értük el, hogy sósav oldatot adtunk a fermentációs elegyhez. Az elegy aktuális pH-jától függ a sósav hozzáadása.

Körülbelül 66 óra volt a növesztés ideje a fermentációs elegyben. Ha az elegyben habképződés volt, olajat adunk a fermentációs elegyhez.

HOZAM: Az elért pszeudomonsav-hozam körülbelül $2,251 \mu\text{g}/\text{gram}$ fermentációs elegy, amit HPLC segítségével mértünk meg. A pszeudomonsav B szennyeződés körülbelül 1,6 % (t/t) a pszeudomonsav A-ra vonatkoztatva.

3. példa

Ebben a példában az előfermentációs táptalaj, a fő fermentációs táptalaj előállítás és a *Pseudomonas* sp. törzs növesztése az előfermentációs táptalajon és a fő fermentációs táptalajban a 2. számú példában leírtaknak megfelelően történt.

A fermentációs elegy növesztése szintén a 2. számú példában leírtak szerint történt. Azonban ebben a példában, a fermentációs elegy pH-ját más módszerrel szabályoztuk. Ahelyett, hogy a fermentációs elegyhez sósavat adtunk volna, itt a pH szabályozására a dextróz oldat adagolását választottuk.

Megfigyeltük, hogy amikor a fermentációs elegy eléri az 5,5-5,8 körüli pH-t, a pH elkezd emelkedni. Ebben a példában a pH-t 5,5-6,0 között szabályoztuk. Ezt úgy értük el, hogy dextrózt oldatot adagoltunk hozzá. A dextróz oldat hozzáadásának gyakorisága a fermentációs elegyhez az aktuális pH-tól és az elegy dextróztartalmától függött. A dextróz hozzáadása során, a glükóz szint nem emelkedhetett 0,5 %-nál magasabbra (t/t). Amikor a pH 5,8-6,0 fölé emelkedett és a dextróz szint magasabb volt mint 0,45% (t/t), a pH-t a fermentációs elegyhez adott sósav hozzáadásával szabályoztuk dextróz helyett.

A fermentációs elegy növekedési időtartama körülbelül 65 óra volt. A fermentációs eljárás alatt, habképződés esetén olajat adtunk az elegyhez.

HOZAM: Az elért pszeudomonsav A hozam körülbelül 3,021 µg/gram fermentációs elegy volt, amit HPLC-vel mértünk. A pszeudomonsav B szennyeződés körülbelül 2,9%-a (t/t) a pszeudomonsav A-nak.

Jelen találmány nincs korlátozva az itt leírt specifikus megvalósításokra. A találmánynak számos módosítása lehet nyilvánvalóan kezdve azokkal, amelyeket itt leírtak, folytatva azokat, amelyeket előző leírásból továbbfejlesztnek és a vele járó elképzelésekből. Ilyen változtatások az igénypontok oltalmi körébe tartoznak. Különféle közleményekre hivatkozunk itt, ezek teljes egészükben referenciaként vannak megemlítve.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Fermentációs eljárás pszeudomonsav előállítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépésekből áll:
 - a) fermentációs elegy előállítása, amely pszeudomonsav előállítására képes micro-organizmust tartalmaz;
 - b) a fermentációs elegy pH-jának szabályozása; és
 - c) a fermentációs elegyből a pszeudomonsav kinyerése.
2. Az 1. igénypont szerinti fermentációs eljárás azzal jellemezve, hogy a pszeudomonsav pszeudomonsav A.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a pszeudomonsav előállításra képes micro-organizmust a *Pseudomonas* sp. törzsből, azok leszármazottaiból, természetes variánsukból és mutánsukból álló csoportból választjuk ki.
4. A 3. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Pseudomonas* sp. törzs az NCAIM(P)B 001235 számon deponált a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményébe.
5. Az 1, 2, 3 vagy 4. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentáció süllyesztett kultúra.
6. Az 1, 2, 3, 4 vagy 5. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentáció körülbelül 20 °C-30 °C között megy végbe.
7. Az 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációs elegy pH-ja fermentáció előállítási fázisa alatt szabályozott.
8. Az 1, 2, 3, 4, 5, 6 vagy 7. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációs elegy pH-ja 5,7 körülire szabályozott.

9. Az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, vagy 8. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációs elegy pH-ja az elegyhez adott asszimilálható szénforrás által szabályozott.
10. A 9. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy az asszimilálható szénforrás adagolása metabolikusan kontrollált.
11. A 9. vagy 10. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy az asszimilálható szénforrás dextróz.
12. Az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 vagy 11. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációs elegy pH-ját a fermentációs elegyhez adott asszimilálható szénforrással és savas oldattal szabályozzuk.
13. A 12. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy az asszimilálható szénforrás glicerol és a savas oldat sósav.
14. Az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 vagy 13. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációs elegy pH-ját a fermentációs elegyhez adott ásványi sóval szabályozzuk.
15. A 14. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy az ásványi só kalcium-klorid oldat.
16. A 15. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy, a kalcium-klorid oldat körülbelül 0,1 %-0,8 %-os (t/t).
17. A 15. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a kalcium-klorid oldat kb. 0,3 % (t/t)-os.
18. Az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 vagy 17. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációs elegy pH-ját a fermentációs elegyhez adott lúgos oldattal szabályozzuk.

19. A 18. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a lúgos oldat nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid.
20. A 18. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a lúgos oldat kálium-hidroxid.
21. Az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 vagy 20. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy fermentációs elegy pH-ját a fermentációs elegyhez adott savas oldattal szabályozzuk.
22. A 21. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a savas oldat salétromsav (HNO_3), kénsav (H_2SO_4) és sósav (HCl) valamelyike.
23. A 21. vagy 22. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a savas oldat sósav.
24. Az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 vagy 23. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációs elegy pH-ja kb. 5,2-6,2 közöttre szabályozott.
25. Fermentációs eljárás pszeudomonsav előállítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépésekből áll:
- a) fermentációs elegy előállítása, amely pszeudomonsav előállítására képes mikro-organizmust és kalcium-kloridot tartalmaz;
 - b) a fermentációs elegy pH-jának szabályozása dextróz illetve sav hozzáadásával ha szükséges; és
 - c) a fermentációs elegyből a pszeudomonsav kinyerése.
26. A 24. vagy 25. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a pH-t kb. 5,5-6 között tartjuk.
27. A 11, 25 vagy 26. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a pH szint szabályozása magába foglalja a kb. 0,5 %-os (t/t) maximális dextrózsintet.

28. A 25, 26 vagy 27. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a savat akkor adagoljuk, amikor a pH legalább kb. 5,8 és a dextróz szint legalább 0,45% (t/t) körüli.
29. Az 1, 25, 26, 27 vagy 28. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy az eljárás termékének pszeudomonsav tartalma legalább 82 % (t/t)-os tisztaságú pszeudomonsav A a pszeudomonsav B-hez viszonyítva.
30. A 29. igénypont szerinti fermentációs eljárás, azzal jellemezve, hogy a tisztaság legalább kb. 97 %-os.
31. A 30. igénypont szerinti eljárással előállított pszeudomonsav.
32. Pszeudomonsavat termelő micro-organizmust tartalmazó fermentációs elegy, azzal jellemezve, hogy legalább 97 % (t/t) körüli pszeudomonsav A-t tartalmaz a pszeudomonsav B-hez viszonyítva, amiben a pszeudomonsav A-t és B-t a micro-organizmus fermentációjával állítják elő.
33. Pszeudomonsavat tartalmazó gyógyszerészeti összetétel, amely pszeudomonsav A-t és gyógyászati szempontból megfelelő excipienst tartalmaz, azzal jellemezve, hogy a pszeudomonsav A mennyisége legalább kb. 97 % (t/t) a pszeudomonsav B-hez viszonyítva.
34. Eljárás infekció gyanús megbetegedés kezelésére állatokban azzal jellemezve, hogy a 33. igénypontnak megfelelő gyógyászati készítményt alkalmazzuk.

Alma TRI-PATENT KFT
4032 Debrecen,
Kartács u. 36.