

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 736**

51 Int. Cl.:

C12P 17/02 (2006.01)

C07D 305/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2008 PCT/IN2008/000326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09118743**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2008 E 08776671 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2268822**

54 Título: **Proceso de fermentación mejorado para un coeficiente de rendimiento más alto de inhibidor de lipasa respecto al ácido graso consumido**

30 Prioridad:

26.03.2008 IN CH07402008

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.04.2020

73 Titular/es:

**BIOCON LIMITED (100.0%)
20th KM Hosur Road Electronic City
Bangalore 560 100 Karnataka, IN**

72 Inventor/es:

**TIWARI, SANJAY;
NAVEEN KUMAR, CHITTNALLI, RAMEGOWDA;
SATHYANATHAN, DEEPHTY;
GOEL, ANUJ y
IYER, HARISH**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 755 736 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso de fermentación mejorado para un coeficiente de rendimiento más alto de inhibidor de lipasa respecto al ácido graso consumido

Campo de la invención

- 5 [0001] La invención proporciona un proceso para la producción de inhibidores de lipasa mediante un proceso de fermentación mejorado caracterizado por el hecho de que se emplea una alimentación combinatoria de ácido linoleico o sus ésteres o sales derivadas y un ácido graso omega-9, preferiblemente el ácido oleico y/o sus derivados, durante dicho proceso que da como resultado un coeficiente de rendimiento mejorado, la productividad proporciona además facilidad de operación.

10 Antecedentes de la invención

- 15 [0002] La lipstatina es un potente inhibidor irreversible de la lipasa pancreática, un producto natural que se aisló por primera vez a partir de *Streptomyces toxytricini*. (Weibel et. al (1987), "Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing Organism, fermentation, isolation and biological activity", J Antibiotic (Tokyo), 40 (8): 1081-5. PMID 3680018. La lipstatina adquirió una importancia considerable como un producto intermedio clave para la preparación de tetrahidrolipstatina (Orlistat), que es útil en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades asociadas con la obesidad. E. Hochuli, et al describe la química estructural de la lipstatina (Journal of Antibiotics Vol XL, n.º. 8, págs. 1081-1085).

- 20 [0003] Se conocen y se describen el proceso fermentativo para su producción, un proceso para su aislamiento a partir de microorganismos y un proceso para su hidrogenación a tetrahidrolipstatina en la patente de EE.UU. n.º 4,598,089. Esta invención usa una cepa específica de *Streptomyces toxytricini* NRRL 15443 y describe la preparación de un inóculo vegetativo de dos pasos.

- 25 [0004] La EP 0803567 describe un proceso de fermentación de lipstatina con la ayuda de precursores tales como el ácido linoleico, el ácido caprílico y la N-formil-L-leucina o la leucina. La producción de lipstatina se consigue con una fermentación de *Streptomyces*, un proceso que implica la alimentación de ácido linoleico y leucina. Aquí, la leucina se incorpora en la molécula final, mientras que el ácido linoleico forma el esqueleto de la molécula final. Este proceso da típicamente un rendimiento de lipstatina de aproximadamente el 20% (p/p) sobre la cantidad de ácido linoleico alimentado.

[0005] La WO 03/048335 describe otro medio de fermentación que usa aceite en lugar de ácido graso libre para la producción de lipstatina.

- 30 [0006] Consecuentemente, sigue existiendo una necesidad de un proceso de fermentación comercialmente viable de bajo coste que proporcione un soporte nutricional suficiente al microorganismo fermentador para permitir una alta productividad específica de lipstatina a partir de precursores de ácidos grasos o material de partida adecuados.

- 35 [0007] Aparte de la exposición anterior, no se puede extraer nada de la bibliografía sobre el uso de una combinación de ácido linoleico con otro ácido graso omega-9 para mejorar significativamente los niveles de producción de lipstatina. A diferencia de los métodos sugeridos en las referencias citadas anteriormente, los métodos de la presente invención proporcionan la triple ventaja de: (1) permitir mejoras de aproximadamente el 100% en el coeficiente de rendimiento de lipstatina; (2) improvisar la productividad, así como la facilidad de operación (3) produciendo un proceso comercialmente viable que es escalable.

- 40 [0008] Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso comercialmente viable para la producción de lipstatina permitiendo rendimientos más altos, una mejora de aproximadamente el 100% en el coeficiente de rendimiento y proporcionando también facilidad de operación.

Declaración de la invención

[0009] La presente invención está definida por los procesos de las reivindicaciones independientes 1 y 9.

- 45 [0010] La presente invención proporciona un proceso mejorado para la producción fermentativa de lipstatina, que ocurre en el caldo de fermentación mediante la alimentación de una combinación de ácido linoleico y un ácido graso omega-9, preferiblemente el ácido oleico, manteniendo además una concentración residual apropiada de dichos componentes que permiten un aumento en la productividad de lipstatina.

5 [0011] Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un proceso de fermentación por lote alimentado para la producción de lipstatina, tetrahidrolipstatina o N-formil-L-leucina (S)-1-[[[(2S,3S)-3-etil-4-oxo-2-oxetanil]metil]octadecil éster (LOC). El proceso de fermentación por lote alimentado implica una alimentación combinatoria de ácido linoleico o sus ésteres o sales derivadas y al menos un ácido graso omega-9 al microorganismo fermentador, donde el microorganismo pertenece a *Streptomyces* sp.

[0012] En algunas formas de realización de la invención, la alimentación combinatoria de ácido linoleico y ácido oleico contribuye a una mejora de aproximadamente el 100% en el coeficiente de rendimiento de lipstatina producida. La alimentación puede ser o intermitente o concomitante.

10 [0013] Según un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un proceso de fermentación por lote alimentado para producir lipstatina, tetrahidrolipstatina o N-formil-L-leucina (S)-1-[[[(2S,3S)-3-etil-4-oxo-2-oxetanil]metil]octadecil éster (LOC). El proceso de fermentación por lote alimentado comprende las etapas de:

- 15 a. realizar la fermentación de un medio que comprende un microorganismo, una fuente de carbono, una fuente de nutriente limitante y proporcionar las condiciones suficientes para permitir el crecimiento y el mantenimiento de dicho microorganismo, donde el microorganismo pertenece a *Streptomyces* sp;
- b. alimentar posteriormente una combinación de ácido linoleico o sus ésteres o sales derivadas y al menos un ácido graso omega-9 de manera que la concentración residual de ácido linoleico y el ácido graso omega-9 se mantenga en el rango de 0,01-5 g/l y 0,01-10,0 g/l, respectivamente; y
- c. mantener dicha concentración residual de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 en toda la operación de fermentación.

20 [0014] Se describe también un proceso para producir lipstatina que comprende:

- a) realizar la fermentación de un medio que comprende un microorganismo, una fuente de carbono, una fuente de nutriente limitante y proporcionar las condiciones suficientes para permitir el crecimiento y el mantenimiento de dicho microorganismo;
- 25 b) alimentar posteriormente una combinación de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 de manera que la concentración residual de ácido linoleico y el ácido graso omega-9 se mantenga en el rango de 0,01-5 g/l y 0,01-10,0 g/l, respectivamente;
- c) mantener dicha concentración residual de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 en toda la operación de fermentación; y
- d) obtener un rendimiento de conversión mayor del 20% p/p.

30 Descripción detallada de la invención

[0015] La presente invención se refiere a un proceso de fermentación por lote alimentado para la producción de lipstatina, tetrahidrolipstatina o LOC, caracterizado por el hecho de que dicho proceso implica una alimentación combinatoria de ácido linoleico o sus ésteres o sales derivadas y al menos un ácido graso omega-9.

35 [0016] El coeficiente de rendimiento de lipstatina, tetrahidrolipstatina o LOC obtenido puede ser al menos aproximadamente del 20% o al menos aproximadamente del 20%-70%.

[0017] En una forma de realización de la presente invención, el ácido graso omega-9 empleado en dicho proceso se selecciona de un grupo que comprende ácido oleico, ácido eicosenoico, ácido de Mead, ácido erúxico y ácido nervónico.

[0018] En todavía otra forma de realización de la presente invención, el ácido graso omega-9 usado es ácido oleico.

40 [0019] En todavía otra forma de realización de la presente invención, una combinación de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 se alimenta de modo que la concentración residual de ácido linoleico y el ácido graso omega-9 se mantenga en el rango de 0,01-5 g/l y 0,01-10,0 g/l, respectivamente.

[0020] En todavía otra forma de realización de la presente invención, la concentración residual de ácido linoleico se mantiene en el rango de 0,01-5 g/l.

45 [0021] En todavía otra forma de realización de la presente invención, la concentración residual de ácido linoleico se mantiene en el rango de 0,02-0,1 g/l

[0022] En todavía otra forma de realización de la presente invención, la concentración residual de ácido linoleico se mantiene en el rango de 0,10-0,30 g/l.

[0023] En todavía otra forma de realización de la presente invención, la concentración residual de ácido graso omega-9 se mantiene en el rango de 0,1-10,0 g/l.

5 [0024] En todavía otra forma de realización de la presente invención, la concentración residual de ácido oleico se mantiene en el rango de 0,5-1,0 g/l.

[0025] En todavía otra forma de realización de la presente invención, la concentración residual de ácido oleico se mantiene en el rango de 1,0-2,0 g/l.

10 [0026] Se describe también un proceso de fermentación para producir lipstatina o sus derivados que comprende las etapas de:

a. realizar la fermentación de un medio que comprende un microorganismo, una fuente de carbono, una fuente de nutriente limitante y proporcionar las condiciones suficientes para permitir el crecimiento y el mantenimiento de dicho microorganismo;

15 b. alimentar posteriormente una combinación de ácido linoleico o sus ésteres o sales derivadas y al menos un ácido graso omega-9 de manera que la concentración residual de ácido linoleico y el ácido graso omega-9 se mantenga en el rango de 0,01-5 g/l y 0,01-10,0 g/l respectivamente; y

c. mantener dicha concentración residual de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 en toda la operación de fermentación.

[0027] Según la presente invención, el microorganismo pertenece a *Streptomyces* sp.

20 [0028] En todavía otra forma de realización de la presente invención, el microorganismo se selecciona de un grupo que comprende *Streptomyces toxytricini*; *Streptomyces tuius*; *Streptomyces vinaceus*; *Streptomyces virginiae*; *Streptomyces lateritus*; *Streptomyces flavovariabilis*; *Streptomyces janthinus*; *Streptomyces purpurascens*; *Streptomyces roseospinus*; *Streptomyces roseoviolaceus*; *Streptomyces violaceus*; *Streptomyces violaceus* subsp. *confinus*; *Streptomyces violaceus* subsp. *vicinus*; *Streptomyces violarus*; *Streptomyces violatus*; *Streptomyces yokosukanensis*; *Streptomyces albosporeus*; *Streptomyces aurantiacus*; *Streptomyces aureoverticillatus*; *Streptomyces aurini*; *Streptomyces cremeus*; *Streptomyces daghestanicus*; *Streptomyces fradiae*; *Streptomyces fragilis*; *Streptomyces fumanus*; *Streptomyces glomeroaurantiacus*; *Streptomyces griseoviridis*; *Streptomyces niveoruber*; *Streptomyces peuceitius*; *Streptomyces phaeoviridis*; *Streptomyces roseiscieroticus*; *Streptomyces roseoflavus*

25 [0029] En todavía otra forma de realización de la presente invención, el microorganismo es *Streptomyces toxytricini*.

[0030] En todavía otra forma de realización de la presente invención, el proceso de fermentación tiene una fase de cultivo de semillas y una fase de fermentación principal, donde dicho método comprende

a. el cultivo de una biomasa de microorganismos en dicha fase de cultivo de semillas para producir un inóculo;

35 b. transferir dicho inóculo a un medio de fermentación en dicha fase de fermentación principal; y

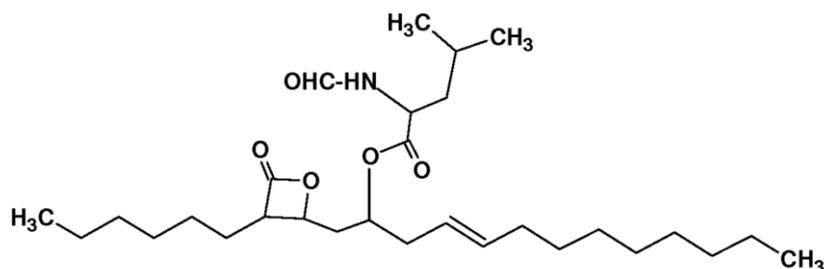
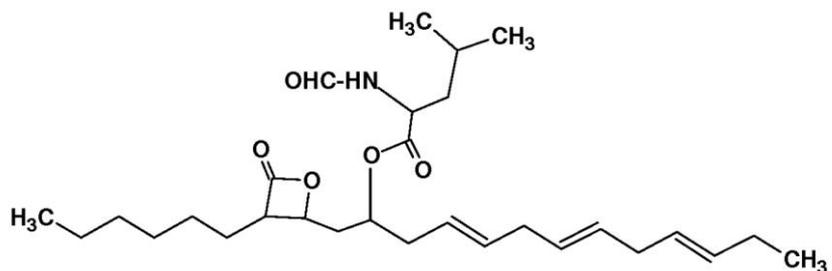
c. mantener condiciones de fase estacionaria en dicha fase de fermentación principal, produciendo así un caldo de fermentación que contiene lipstatina.

[0031] En todavía otra forma de realización de la presente invención, las condiciones de estado estacionario se mantienen mediante la alimentación de una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, el control del pH, el control de la espuma y el control del oxígeno disuelto.

40 [0032] Opcionalmente, la concentración de oxígeno disuelto no afecta al coeficiente de rendimiento de lipstatina, tetrahidrolipstatina o LOC obtenido.

[0033] La concentración de oxígeno disuelto puede variar entre 0-100%.

45 [0034] En todavía otra forma de realización de la presente invención, el medio de fermentación empleado comprende al menos una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y condiciones del proceso suficientes para permitir el crecimiento y el mantenimiento del microorganismo fermentador.

Fórmula II:**Fórmula III:**

[0050] Los "ácidos grasos omega-9" como se usan en la presente son una clase de ácidos grasos insaturados que tienen un enlace doble C=C en la posición omega-9. La presente invención abarca y contempla el uso de ácidos grasos omega-9 tales como ácido oleico 18:1 (n=9) ácido 9-octadecenoico, ácido eicosenoico 20:1 (n-9) ácido 11-eicosenoico, ácido de Mead 20:3 (n-9) ácido 5,8,11-eicosatrienoico, ácido erúxico 22:1 (n-9), ácido 13-docosenoico, ácido nervónico 24:1 (n-9), ácido 15-tetracosenoico.

[0051] "Ácido linoleico" como se utiliza en la presente se refiere a un ácido graso omega-6. Es un ácido graso poliinsaturado con una cadena de 18 carbonos y dos enlaces dobles *cis*, el primer enlace doble se localiza en el 6º carbono del extremo omega. La invención contempla el uso del ácido linoleico o sus ésteres o derivados de los mismos para conseguir el presente objetivo de una mayor productividad de lipstatina.

[0052] Como se utiliza en la presente, el término "fuente de nutriente limitante" se refiere a una fuente de un nutriente (incluido el propio nutriente) esencial para el crecimiento de un microorganismo en cuanto a que, cuando el nutriente limitante se agota en el medio de crecimiento, su ausencia limita sustancialmente que el microorganismo siga creciendo o replicándose. Sin embargo, ya que los otros nutrientes siguen todavía en abundancia, el organismo puede continuar sintetizando y acumulando productos intracelulares y/o extracelulares. Mediante la elección de un nutriente limitante específico, se puede controlar el tipo de productos que se acumulan.

[0053] Por lo tanto, la provisión de una fuente de nutriente limitante con una cierta velocidad permite controlar tanto la velocidad de crecimiento del microorganismo como la producción o acumulación de productos deseados.

[0054] El microorganismo fermentador deseado se selecciona para ser capaz de convertir los sustratos de fermentación bajo condiciones fermentables adecuadas para producir el producto final deseado. Según la invención, los microorganismos incluyen *Streptomyces* sp, pero no limitados a *Streptomyces toxytricini*; *Streptomyces tuius*; *Streptomyces vinaceus*; *Streptomyces virginiae*; *Streptomyces lateritus*; *Streptomyces flavovariabilis*; *Streptomyces janthinus*; *Streptomyces purpurascens*; *Streptomyces roseospinus*; *Streptomyces roseoviolaceus*; *Streptomyces violaceus*; *Streptomyces violaceus* subsp. *confinus*; *Streptomyces violaceus* subsp. *vicinus*; *Streptomyces violarus*; *Streptomyces violatus*; *Streptomyces yokosukanensis*; *Streptomyces albosporeus*; *Streptomyces aurantiacus*; *Streptomyces aureovorticillatus*; *Streptomyces aurini*; *Streptomyces cremeus*; *Streptomyces daghestanicus*; *Streptomyces fradiae*; *Streptomyces fragilis*; *Streptomyces fumanus*; *Streptomyces glomeroaurantiacus*; *Streptomyces griseoviridis*; *Streptomyces niveoruber*; *Streptomyces peucetius*; *Streptomyces phaeoviridis*; *Streptomyces roseisceroticus*; *Streptomyces roseoflavus*. Microorganismos particularmente útiles de la presente invención son los microorganismos capaces de convertir los sustratos de fermentación proporcionados a lipstatina. El organismo productor de lipstatina más preferido se ha descrito en la US 4,598,089, que es

Streptomyces toxytricini Preobrazhenskaya & Sveshnikova (véase Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª edición, página 811).

5 [0055] La presente invención proporciona un proceso mejorado para la producción fermentativa de lipstatina, que ocurre en el caldo de fermentación mediante la alimentación de una combinación de ácido linoleico y un ácido graso omega-9, preferiblemente el ácido oleico, manteniendo además una concentración residual apropiada de dichos componentes que permiten un aumento en la productividad de lipstatina. Según la primera etapa de este proceso, las células del microorganismo productor de lipstatina se cultivan en un medio basal/medio de semillas. En la segunda etapa de este proceso, se añaden a esta combinación de medio basal de determinados componentes, que o sirven directamente como precursores bioquímicos o experimentan una conversión bioquímica y sirven 10 posteriormente como precursores de la vía biosintética. Atribuido a una toxicidad inferior conferida por el ácido oleico con respecto al ácido linoleico, su equilibrio apropiado de concentración residual asegura que se cumplan los requisitos de energía para el crecimiento y el mantenimiento de los microorganismos. Así, se posibilita que el microorganismo sintetice el producto final deseado, la lipstatina, en una concentración mucho más alta.

15 [0056] El coeficiente de rendimiento de biomasa producida sobre el sustrato utilizado se entiende aquí como la cantidad de biomasa producida en gramos de peso seco sobre la cantidad de sustrato utilizado en gramos. El coeficiente de rendimiento de producto de fermentación producido sobre el sustrato se puede expresar como unidades o gramos de producto producido por kg de sustrato usado. Particularmente, en el contexto de la presente invención, el coeficiente de rendimiento se refiere a la cantidad de lipstatina producida por cantidad de ácido linoleico consumido.

20 [0057] El medio de fermentación basal contiene los siguientes componentes necesarios para el crecimiento y el mantenimiento del microorganismo fermentador. Fuentes adecuadas de carbono metabolizable y energía incluyen, pero de forma no limitativa, glucosa, fructosa, maltosa, glicerol, almidón, hidrolizados de almidón, metanol, alcoholes de cadena corta y las mezclas de los mismos, así como una o más fuentes de nitrógeno, tales como 25 harina de soja, harina de semilla de algodón, melaza, polvo de maíz remojado o licor de maíz remojado, subproductos animales de extracto de levadura y sales amónicas inorgánicas. Además, se pueden añadir macro- y microelementos al medio. En un aspecto, un inhibidor de espuma se añade a los medios de fermentación para evitar la acumulación y el desarrollo de espuma causados por el burbujeo de oxígeno del caldo de fermentación contenido en el mismo.

30 [0058] La fuente de carbono y cada uno de los otros nutrientes celulares esenciales se añaden, progresiva o continuamente, a los medios de fermentación, y cada nutriente requerido se mantiene esencialmente en el nivel mínimo necesario para una asimilación eficiente por las células en crecimiento, conforme a una curva de crecimiento celular predeterminada en base a la función metabólica o respiratoria de las células que convierten la fuente de carbono en una biomasa. El proceso constituye una mejora marcada en la aceleración y el aumento de la producción celular en un sistema de fermentación dado.

35 [0059] Según un aspecto de la invención, el medio de cultivo empleado en la presente está sustancialmente libre de grasas y aceites. Opcionalmente, el medio de cultivo empleado en la presente comprende aceite y una fuente de carbono asimilable como se ha descrito anteriormente, donde la proporción p/p de aceite y una fuente de carbono asimilable se ajusta para regular la biosíntesis lipídica del microorganismo. Preferiblemente, el aceite se selecciona del grupo que comprende aceite natural, aceite sintético o una mezcla de los mismos. El aceite natural se selecciona 40 del grupo que consiste en aceite de girasol, aceite de soja, aceite de palma, aceite de lino, aceite de colza y aceite de germen de maíz. Los medios de fermentación satisfacen los requisitos de nutrientes básicos para el crecimiento del microorganismo.

45 [0060] Como puede apreciar una persona experta en la técnica, los aspectos significativos de la invención implementados no resultan afectados por el contenido residual de grasas en el medio de fermentación. El contenido residual de grasas en el medio de fermentación puede variar entre 0-40 g/l.

[0061] Varios tipos de componentes auxiliares también se pueden emplear en el medio de fermentación para mejorar además el proceso de fermentación. Ejemplos de los mismos incluyen, pero de forma no limitativa, varios tipos de metales traza, agentes quelantes, agentes antiespumantes y similares.

50 [0062] El medio de semillas puede contener harina de soja - 10,0 gramos, glicerol - 5,0 gramos y extracto de levadura - 5,0 gramos en agua (1 litro). pH del medio ajustado a 7,0±0,1.

[0063] El medio de producción puede contener harina de soja - 360,0 gramos, glicerol - 180,0 gramos, antiespumante SAG - 6 gramos en 6 litros de agua y agua (10 litros). pH del medio ajustado a 7,0±0,1.

5 [0064] Para obtener una condición de estado estacionario durante la fase de fermentación principal, los inventores han hallado que estos parámetros, etapas y/o variables del proceso incluyen el control de la glucosa y/o el contenido de azúcar reductor total, el mantenimiento de las fuentes de carbono en un nivel mínimo adecuado, la alimentación de fuentes de nitrógeno orgánicas y/o inorgánicas, el control del pH, el control del nivel de espuma, el control de la masa del caldo mediante retiradas y alimentaciones y el control del nivel de oxígeno disuelto mediante cambios de la velocidad de agitación y/o la velocidad de aireación.

10 [0065] El proceso se puede realizar sobre cualquier rango de pH o temperatura donde el microorganismo fermentador puede crecer y catalizar la reacción de conversión deseada. Un rango de pH preferido y especialmente ventajoso está en el régimen ácido, es decir, un pH de aproximadamente 7 o menos y el rango de temperatura preferido es aproximadamente $27 \pm 1^\circ\text{C}$. El proceso de esta invención se puede realizar a una temperatura de aproximadamente 27°C a aproximadamente 37°C , preferiblemente aproximadamente 27°C . Los cambios del pH se evitan mediante la adición de bases tales como el NaOH o ácidos tales como el H_2SO_4 o el HCl. El agente regulador es típicamente un hidróxido o un ácido orgánico o inorgánico. Ejemplos de agentes reguladores del pH adecuados son el hidróxido potásico, el hidróxido sódico y el ácido clorhídrico. Un aspecto importante de la presente
15 invención es el control de una serie de parámetros del proceso para favorecer los productos de reacción deseados. Así, el proceso o los segmentos del proceso se pueden realizar como operaciones continuas o varias operaciones unitarias diferentes. El periodo de tiempo durante el que se permite que continúe el proceso de fermentación depende de la composición del medio de fermentación, la temperatura, la cantidad de inóculo, la cantidad de producto deseado, etc. Típicamente, el proceso de fermentación se realiza durante aproximadamente 8-10 días.

20 [0066] El proceso de esta invención se realiza bajo condiciones suficientemente estériles para asegurar la viabilidad celular y el metabolismo.

25 [0067] Resulta ventajoso mantener un nivel de oxígeno disuelto en el medio de producción de aproximadamente 20%-80% de saturación de aire durante la mayor parte de la fermentación. La capacidad para conseguir un nivel de oxígeno disuelto adecuado se puede aumentar ajustando adecuadamente la velocidad de aireación y/o agitación.

[0068] Se describe también un proceso para producir lipstatina que comprende:

- 30 a) realizar la fermentación de un medio que comprende un microorganismo, una fuente de carbono, una fuente de nutriente limitante y proporcionar las condiciones suficientes para permitir el crecimiento y el mantenimiento de dicho microorganismo.
b) alimentar posteriormente una combinación de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 de manera que la concentración residual de ácido linoleico y el ácido graso omega-9 se mantenga en el rango de 0,01-5 g/l y 0,1-10,0 g/l, respectivamente.
c) mantener dicha concentración residual de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 en toda la operación de fermentación.

35 [0069] Según otro aspecto de la invención, el proceso de fermentación tiene una fase de cultivo de semillas y una fase de fermentación principal, donde dicho método comprende

- 40 a. el cultivo de una biomasa de microorganismos en dicha fase de cultivo de semillas para producir un inóculo.
b. transferir dicho inóculo en un medio de fermentación en dicha fase de fermentación principal.
c. mantener condiciones de fase estacionaria en dicha fase de fermentación principal, produciendo así un caldo de fermentación que contiene lipstatina.

[0070] El punto decisivo de la invención reside en el hecho de que la alimentación combinatoria de ácido linoleico, así como un ácido graso omega-9, preferiblemente el ácido oleico, aumenta significativamente la producción de lipstatina.

[0071] La adición de ácido linoleico y ácido oleico puede ser o concomitante o intermitente.

45 [0072] Preferiblemente, la concentración residual de ácido linoleico se mantiene entre 0,10-0,30 g/l, más preferiblemente entre 0,01-0,05 g/l y más preferiblemente entre 0,02-0,05 g/l. El ácido linoleico se puede alimentar en el medio en el rango de 0,01-5 g/l.

[0073] Preferiblemente, la concentración residual de ácido oleico se mantiene entre 0,25-0,30 g/l, más preferiblemente entre 0,50-1,0 g/l, más preferiblemente entre 1,0-1,5 g/l y más preferiblemente entre 1,0-2,0 g/l. El ácido oleico se puede alimentar en el medio en el rango de 0,01-10,0 g/l.

5 [0074] Por lo tanto, uno de los objetos de la invención es mejorar la eficiencia del procedimiento de fermentación productor de lipstatina forzando la capacidad de producción del microorganismo mediante el cambio de las condiciones y la realización del proceso de fermentación. Otro objeto de la presente invención es proporcionar, en una o en las dos fases de semillas y de fermentación principal, las condiciones químicas y fisiológicas más convenientes para el metabolismo por el microorganismo. Otro objeto de la presente invención es proporcionar, en una o en las dos fases de semillas y de fermentación principal, las condiciones químicas y fisiológicas más convenientes para el metabolismo por el microorganismo manteniendo, en una condición de estado estacionario, la velocidad de crecimiento y luego, durante un tiempo prolongado, una velocidad máxima de formación de producto.

10 [0075] Según el aspecto más significativo, la invención proporciona una mejora de aproximadamente el 100% en el coeficiente de rendimiento de producción de lipstatina. La lipstatina obtenible por el proceso según la invención puede estar en una cantidad de al menos 2,0±1 g/l, preferiblemente al menos 6,0±1 g/l, más preferiblemente al menos 8,0±1 g/l, más preferiblemente al menos 13±1 g/l, aún más preferiblemente al menos 16±1g/l, más preferiblemente al menos 20±1 g/l.

15 [0076] La lipstatina obtenible por el proceso según la invención puede estar en una cantidad de al menos 1,0±1 g/l, preferiblemente al menos 6,0±1 g/l, más preferiblemente al menos 8,0±1 g/l, más preferiblemente al menos 13±1 g/l, aún más preferiblemente al menos 16±1 g/l, más preferiblemente al menos 20±1 g/l. La conversión de ácido oleico a lipstatina, que incorpora aspectos de la presente invención, consiguió un rendimiento de conversión de al menos el 10%, al menos el 20%, preferiblemente al menos el 25%, preferiblemente al menos el 30%, preferiblemente al menos el 35%, más preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 45%, más preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 55%, más preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 65% y más preferiblemente al menos el 70%. El rendimiento de conversión obtenible puede ser de aproximadamente el 100%. La conversión de ácido linoleico a lipstatina, que incorpora aspectos de la presente invención, consiguió un rendimiento de conversión de al menos el 20%, preferiblemente al menos el 25%, preferiblemente al menos el 30%, preferiblemente al menos el 35%, más preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 45%, más preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 55%, más preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 65% y más preferiblemente al menos el 70%. El rendimiento de conversión obtenible puede ser de aproximadamente el 100%.

20 [0077] Según una ventaja de la presente invención, la fase de fermentación cuando se añade leucina al medio de fermentación y la concentración de leucina añadida no afecta o altera los niveles de producción del producto final deseado. Así, la leucina se puede añadir en el propio medio de semillas inicial y no alimentarla durante la fase por lote alimentado o la leucina se puede añadir durante la fase de fermentación por lote alimentado como se practica rutinariamente. La concentración de leucina añadida al medio de fermentación está en el rango de 0,1 g/l-40 g/l. Opcionalmente, la concentración preferida de leucina añadida al medio de fermentación es de al menos 5 g/l, preferiblemente al menos 10 g/l, preferiblemente al menos 15 g/l, más preferiblemente al menos 20 g/l. Opcionalmente, la concentración de leucina puede ser superior a 16 g/l.

25 [0078] Según otro aspecto ventajoso de la presente invención, se pueden incorporar ácido linoleico, ácido oleico y leucina en el medio de semillas o el propio medio inicial destinado a la fase de carga de la producción o se puede incorporar durante la fase por lote alimentado de la fermentación.

30 [0079] Los inventores han descubierto que la biosíntesis óptima de lipstatina se puede realizar ajustando uno o más de determinados parámetros, etapas y/o variables del proceso en una o en las dos fases de cultivo de semillas y de fermentación principal del proceso de biosíntesis.

35 [0080] Preferiblemente, la alimentación intermitente o continua de suspensión concentrada de harina de soja, extiende la fase productiva de lipstatina, así como la lipstatina, en casi el 50%. Las adiciones intermitentes o continuas de suspensión de harina de soja pueden extender el ciclo de carga eliminando así la necesidad de añadir una alta concentración de harina de soja en el medio inicial, evitando así una alta demanda de oxígeno en la fase de carga del proceso.

40 [0081] La invención se describirá y se entenderá de manera más completa con referencia a los ejemplos siguientes, que se dan a modo de ilustración y no se destinan a limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

EJEMPLO 1:

a) Preparación de un cultivo de semillas

5 [0082] Se preparó un medio de semillas que contenía 10,0 gramos de harina de soja, 10,0 gramos de glicerol, 5,0 gramos de extracto de levadura en agua (1 litro). El pH del medio de semillas se ajustó a $7,0 \pm 0,1$ con una solución de NaOH. Se rellenó un matraz Erlenmeyer de 2000 ml con un medio de inóculo (500 ml) y se cerró con un tapón de algodón y se esterilizó. La esterilización se realizó a 121 ± 2 °C, 100 ± 10 kPa durante 45 minutos. El medio de inóculo esterilizado se inoculó con una suspensión en un vial de esporas de *Streptomyces toxytricini* y se incubó a 27 ± 1 °C durante 24-36 horas bajo condiciones aeróbicas.

b) Proceso de fermentación principal

10 [0083] Aproximadamente 1-2 % vol. del cultivo de semillas anterior se usó para inocular a escala de laboratorio. El fermentador agitado con un tamaño de recipiente de 10 litros contenía 6,0 litros del medio de producción. El medio de producción contenía 360,0 gramos de harina de soja, 180,0 gramos de glicerol y 6,0 gramos de antiespumante SAG en 6,0 litros de agua. El pH del medio de fermentación se ajustó antes de esterilizar a $7,0 \pm 0,1$ con NaOH. La esterilización fue a 121 ± 2 °C, 100 ± 10 kPa durante 120 minutos. La fermentación se realizó a 27 ± 1 °C durante 8-10 días bajo condiciones aeróbicas. (800 r.p.m., 1 vvm)

15

[0084] La fermentación continuó durante 10 días. La conversión máxima de ácido linoleico a lipstatina conseguida fue del 19,48%. En otro lote (experimento n.º 2) se usó la misma composición de los medios y adicionalmente se alimentó el ácido oleico junto con el ácido linoleico y la leucina. La fermentación continuó durante 10 días. El ácido oleico residual se mantuvo entre 0,25-0,30 g/l en todo el lote y los niveles residuales de ácido linoleico se mantuvieron entre 0,10-0,30 g/l. La conversión máxima conseguida fue del 20,12% y no hubo ninguna diferencia significativa observada en la eficiencia de conversión. Después de fermentar durante 240 h, la concentración de lipstatina fue de $8,0 \pm 1$ g/l.

20

EJEMPLO 2:

25 [0085] En este experimento, el medio de cultivo de semillas y el medio de producción fueron los mismos que los usados en el ejemplo 1. Los niveles residuales de ácido oleico se mantuvieron entre 0,50-1,0 g/l y los niveles residuales de ácido linoleico se mantuvieron entre 0,10-0,30 g/l en todo el lote.

[0086] La conversión máxima conseguida en la formación de lipstatina a partir de ácido linoleico fue del 39,56%. Después de fermentar durante 240 h, la concentración de lipstatina fue de $8,0 \pm 1$ g/l.

EJEMPLO 3:

30 [0087] En este experimento, el medio de cultivo de semillas y el medio de producción fueron los mismos que los usados en el ejemplo 1. Los niveles residuales de ácido oleico se mantuvieron entre 1,0-2,0 g/l y los niveles residuales de ácido linoleico se mantuvieron entre 0,10-0,30 g/l en todo el lote.

[0088] La conversión máxima conseguida en la formación de lipstatina a partir de ácido linoleico fue del 45,46%. Después de fermentar durante 240 h, la concentración de lipstatina fue de $8,0 \pm 1$ g/l.

35 **EJEMPLO 4:**

[0089] En este experimento, el medio de cultivo de semillas y el medio de producción fueron los mismos que los usados en el ejemplo 1. Los niveles residuales de ácido oleico se mantuvieron entre 1,0-2,0 g/l y los niveles residuales de ácido linoleico se mantuvieron entre 0,02-0,05 g/l en todo el lote.

40 [0090] La conversión de ácido linoleico a lipstatina mejoró significativamente al 49,31%. Además, se produjo una mayor producción de lipstatina. Al final de la fermentación, el título de lipstatina fue de 6,05 g/l.

EJEMPLO 5:

[0091] En este experimento, el medio de cultivo de semillas fue el mismo que el usado en el ejemplo 1. El medio de producción contenía 360,0 gramos de harina de soja, 180,0 gramos de glicerol, 120 gramos de L-leucina y 6,0 gramos de antiespumante SAG en 6,0 litros de agua. El pH del medio de fermentación se ajustó antes de esterilizar

a $7,0 \pm 0,1$ con NaOH. La esterilización fue a 121 ± 2 °C, 100 ± 10 kPa durante 120 minutos. La fermentación se realizó a 27 ± 1 °C durante 8-10 días bajo condiciones aeróbicas. (800 r.p.m., 1 vvm)

5 [0092] Después de que se completara la fase de carga, el ácido linoleico se alimentó en todo el lote. Los niveles residuales de ácido linoleico se mantuvieron entre 0,10-0,30 g/l en todo el lote. Al final de la fermentación (163 h), el título de lipstatina fue de 2,67 g/l.

[0093] En otro lote (experimento n.º 2) se usó la misma composición de los medios y se alimentó ácido oleico en todo el lote. Los niveles residuales de ácido oleico se mantuvieron entre 1,0-1,5 g/l en todo el lote. Al final de la fermentación (170 h), el título de lipstatina fue de 1,38 g/l.

EJEMPLO 6:

10 [0094] En este experimento, el medio de cultivo de semillas y el medio de producción son los mismos que los usados en el ejemplo 1. Se alimentó ácido linoleico en todo el lote. Los niveles residuales de ácido linoleico se mantuvieron entre 0,10-0,30 g/l en todo el lote. Para extender el lote, se alimentó una suspensión concentrada (15%) de harina de soja desgrasada tostada durante la fermentación como un suplemento de nitrógeno. Al final de la fermentación, el título de lipstatina fue de 13,5 g/l.

15 [0095] En otro lote (experimento n.º 2) se usa la misma composición de los medios y solo se alimentó ácido oleico en todo el lote. Los niveles residuales de ácido oleico se mantuvieron entre 1,0-1,5 g/l en todo el lote. Para extender el lote, se alimentó una suspensión concentrada (15%) de harina de soja desgrasada tostada durante la fermentación como un suplemento de nitrógeno. Al final de la fermentación, el título de lipstatina fue de 5,86 g/l.

20 [0096] Los medios proporcionados en la presente superan los problemas que se resumen arriba y avanzan la técnica proporcionando un sistema que tiene menos costes relacionados con la producción y es fácil de operar con respecto a otros métodos conocidos. Este sistema reduce los costes usando las metodologías descritas para conseguir una eficiencia de conversión mejorada dada con respecto a cualquier proceso conocido, superando así las principales desventajas conocidas en este campo de la técnica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso de fermentación por lote alimentado para la producción de lipstatina, tetrahidrolipstatina o N-formil-L-leucina (S)-1-[[[(2S,3S)-3-etil-4-oxo-2-oxetanyl]metil]octadecil éster (LOC), **caracterizado por el hecho de que** dicho proceso implica una alimentación combinatoria de ácido linoleico o sus ésteres o sales derivadas y al menos un ácido graso omega-9 al microorganismo fermentador, donde el microorganismo pertenece a *Streptomyces sp.*
2. Proceso de fermentación según la reivindicación 1, donde el ácido graso omega-9 empleado en dicho proceso se selecciona de un grupo que comprende ácido oleico, ácido eicosenoico, ácido de Mead, ácido erúxico y ácido nervónico.
3. Proceso de fermentación según la reivindicación 2, donde el ácido graso omega-9 es ácido oleico.
- 10 4. Proceso de fermentación según la reivindicación 1, donde la concentración residual de ácido linoleico se mantiene en el rango de 0,01-5 g/l.
5. Proceso de fermentación según la reivindicación 4, donde la concentración residual de ácido linoleico se mantiene en el rango de 0,02-0,1 g/l o en el rango de 0,10-0,30 g/l.
- 15 6. Proceso de fermentación según la reivindicación 1, donde la concentración residual de ácido graso omega-9 se mantiene en el rango de 0,1-10,0 g/l.
7. Proceso de fermentación según la reivindicación 6, donde la concentración residual de ácido graso omega-9 se mantiene en el rango de 0,5-1,0 g/l o en el rango de 1,0-2,0 g/l.
- 20 8. Proceso de fermentación según la reivindicación 1, donde una combinación de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 se alimenta de modo que la concentración residual de ácido linoleico y el ácido graso omega-9 se mantenga en el rango de 0,01-5 g/l y 0,01-10,0 g/l, respectivamente.
9. Proceso de fermentación por lote alimentado para producir lipstatina, tetrahidrolipstatina o N-formil-L-leucina (S)-1-[[[(2S,3S)-3-etil-4-oxo-2-oxetanyl]metil]octadecil éster (LOC), que comprende las etapas de:
- 25 a. realizar la fermentación de un medio que comprende un microorganismo, una fuente de carbono, una fuente de nutriente limitante y proporcionar las condiciones suficientes para permitir el crecimiento y el mantenimiento de dicho microorganismo, donde el microorganismo pertenece a *Streptomyces sp.*;
- b. alimentar posteriormente una combinación de ácido linoleico o sus ésteres o sales derivadas y al menos un ácido graso omega-9 de manera que la concentración residual de ácido linoleico y el ácido graso omega-9 se mantenga en el rango de 0,01-5 g/l y 0,01-10,0 g/l, respectivamente; y
- 30 c. mantener dicha concentración residual de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 en toda la operación de fermentación.
10. Proceso de fermentación según la reivindicación 9, donde el microorganismo se selecciona de un grupo que comprende *Streptomyces toxytricini*, *Streptomyces tuirus*, *Streptomyces vinaceus*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces lateritus*, *Streptomyces flavovariabilis*, *Streptomyces janthinus*, *Streptomyces purpurascens*, *Streptomyces roseospinus*, *Streptomyces roseoviolaceus*, *Streptomyces violaceus*, *Streptomyces violaceus* subsp. *confinus*, *Streptomyces violaceus* subsp. *vicinus*, *Streptomyces violarus*, *Streptomyces violatus*, *Streptomyces yokosukanensis*, *Streptomyces albosporeus*, *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces aureovercillatus*, *Streptomyces aurini*, *Streptomyces cremeus*, *Streptomyces daghestanicus*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces fragilis*, *Streptomyces fumanus*, *Streptomyces glomeroaurantiacus*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces niveoruber*, *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces phaeoviridis*, *Streptomyces roseiscieroticus* y *Streptomyces roseoflavus*.
- 35 40
11. Proceso de fermentación según las reivindicaciones 9 o 10, donde el microorganismo es *Streptomyces toxytricini*.
12. Proceso de fermentación según la reivindicación 9, donde el proceso de fermentación tiene una fase de cultivo de semillas y una fase de fermentación principal, donde dicho método comprende
- 45 a. el cultivo de una biomasa de microorganismos en dicha fase de cultivo de semillas para producir un inóculo;
- b. transferir dicho inóculo a un medio de fermentación en dicha fase de fermentación principal; y

c. mantener condiciones de fase estacionaria en dicha fase de fermentación principal, produciendo así un caldo de fermentación que contiene lipstatina.

- 5 13. Proceso de fermentación según la reivindicación 12, donde las condiciones de estado estacionario se mantienen mediante la alimentación de una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, el control del pH, el control de la espuma y el control del oxígeno disuelto.
14. Proceso de fermentación según la reivindicación 12, donde el medio de fermentación empleado comprende al menos una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y condiciones del proceso suficientes para permitir el crecimiento y el mantenimiento del microorganismo fermentador.
- 10 15. Proceso de fermentación según la reivindicación 12, donde el medio de fermentación comprende harina de soja, glicerol y extracto de levadura opcionalmente junto con una fuente de aceite o grasa.
16. Proceso de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medio de fermentación está libre de una fuente de aceite o grasa.
17. Proceso de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por el hecho de que** la leucina se añade inicialmente en la fase de fermentación principal.
- 15 18. Proceso de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por el hecho de que** la adición de ácido linoleico y al menos un ácido graso omega-9 se puede incorporar o en el medio de fermentación de semillas o en el medio de producción.