



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 319 029**

(21) Número de solicitud: 200700519

(51) Int. Cl.:

C12P 17/06 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **09.02.2007**

(71) Solicitante/s: **Universidad de Almería**
Ctra. de Sacramento, s/n
04120 La Cañada de San Urbano, Almería, ES

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

(72) Inventor/es: **Sánchez Pérez, José Antonio;**
Casas López, José Luis;
Rodríguez Porcel, Elisa María y
Fernández Sevilla, José María

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2009

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Proceso para la producción en continuo de lovastatina.**

(57) Resumen:

Proceso para la producción en continuo de lovastatina. La presente invención consiste en la producción de lovastatina, a partir de cultivos de *Aspergillus terreus* en forma de pellets, mediante un proceso de fermentación en continuo en un biorreactor de tipo columna de burbujeo operando de forma análoga a un biorreactor de lecho fluidizado (BLF) con un cultivo en tres fases, gas, líquido y sólido. La producción de lovastatina está regulada mediante un mecanismo de inhibición por producto, dando lugar al cese de la síntesis cuando la concentración alcanza un determinado valor.

El proceso permite la obtención en continuo de un caldo de fermentación libre de biomasa conteniendo éste la lovastatina, lo cual facilita las posteriores etapas de extracción y purificación. La operación en continuo da lugar a que parte de la lovastatina generada abandone el biorreactor de lecho fluidizado, disminuyendo de esta forma los efectos de la inhibición por producto.

ES 2 319 029 A1

DESCRIPCIÓN

Proceso para la producción en continuo de lovastatina.

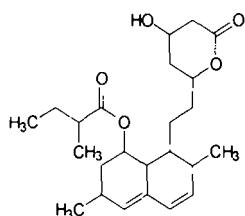
5 **Sector de la técnica**

La presente invención se encuadra en el sector farmacéutico y químico, más concretamente en el relativo a la producción de lovastatina mediante fermentaciones del microhongo filamento *Aspergillus terreus*.

10 **Estado de la técnica**

En el año 1978 en los laboratorios de investigación de Merck, Alberts y sus colaboradores descubrieron un potente inhibidor de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa obtenido a partir de fermentaciones del microhongo filamento *Aspergillus terreus* (Alberts y cols., 1980). Lo llamaron mevinolina, posteriormente, la USAN (United States Adopted Names) estableció el nombre oficial como lovastatina. La lovastatina es generada a través de la ruta de síntesis de los policétidos, su fórmula molecular es $C_{24}H_{36}O_5$ y su estructura se presenta en la figura 1. Fue la primera estatina desarrollada para uso clínico y fue aprobada por la US FDA (United States Food and Drug Administration) para el tratamiento de la hipercolesterolemia el 31 de Agosto de 1987 (Tobert, 2003).

20



25

Figura 1: Molécula de lovastatina.

La lovastatina es un fármaco perteneciente a la familia de las estatinas que inhibe la HMG-CoA reductasa, enzima implicada en la síntesis del colesterol, es por ello que la lovastatina está prescrita en el tratamiento de la hipercolesterolemia para la disminución de los niveles de colesterol en sangre (Alberts y otros., Am. J. Cardiol., 62: 10J-15J, 1988).

La lovastatina es un metabolito secundario cuya producción industrial se lleva a cabo mediante fermentaciones de microhongos filamentos tales como *Aspergillus terreus* (US 4231938) o *Monascus ruber* (US 4323648) realizadas en reactores de tanque agitado operando en modo discontinuo.

Endo y otros, (J. Antibiot. 29: 1346-1348, 1976 y FEBS 72: 323-326, 1976) describen un proceso de producción y purificación de mevastatina a partir de *Penicillium citrinum* (NRRL 8082). Después de esto, la lovastatina fue obtenida a partir de cultivos de *Monascus ruber* (Negishi y otros, Hakko Kogaku Kaishi, 64: 509-512, 1986) y, en 1989, un proceso industrial para su producción fue establecido usando *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) que produjo aproximadamente 180 mg de lovastatina/l, siendo el glicerol la fuente de carbono en un cultivo alimentado en lotes (Buckland y otros, en: "Novel microbial product for Medicine and Agriculture" por A. L. Demain y otros., 161-169, Elsevier, 1989).

La patente GB 2046737 presenta un proceso de producción en discontinuo a partir de fermentaciones de cepas del género *Monascus*, mas concretamente *Monascus ruber* 1005, cultivado entre 7 y 40°C, en un medio de cultivo consistente en una disolución acuosa de glucosa, peptona, licor de maíz y cloruro amónico. La fermentación fue llevada a cabo durante 10 días en condiciones aeróbicas, obteniéndose finalmente 87 mg. de lovastatina de cinco litros de caldo cultivo.

La patente alemana 4402591 describe la síntesis de lovastatina por microorganismos del género *Pleurotuss*, como por ejemplo, *P. ostreatus*, *P. sapidus* y *P. saca*, en fermentaciones llevadas a cabo a una temperatura comprendida entre 25 y 35°C durante 7 y 14 días.

La patente US 4294926 describe la síntesis de lovastatina preferiblemente a partir de fermentaciones del microhongo filamento *Aspergillus terreus* ATCC 20541 y ATCC 20542 a una temperatura entre 20 y 37°C en un medio de cultivo líquido que contiene fuentes de carbono tales como carbohidratos (glucosa, fructosa, maltosa), fuentes de nitrógeno tales como hidrolizados de levadura, hidrolizados de caseina o licor de maíz y sales minerales como por ejemplo, carbonato cálcico, sulfato de magnesio, cobalto, hierro y sales de manganeso. Procedimientos similares han sido descritos en US 4420491, 4342767, 4319039 y 4294846 en las que las fermentaciones fueron llevadas a cabo durante 3 y 5 días en medios de cultivo que contenían entre 1 y 6% de carbohidratos y entre 0,2 y 6% de fuentes de nitrógeno.

La patente canadiense de número 2129416 presenta la preparación de lovastatina y mevastatina con un microorganismo del género *Coniothyrium*, más concretamente *Coniothyrium fuckelii* ATCC 74227 cultivado en un medio que contiene entre el 3 y el 15% de glucosa, entre el 0,5 y el 4% de peptona, entre el 0,5 y el 5% de amilasa, entre el 0,2 y el 1% de sulfato amónico, entre el 0,01 y el 0,1% de sulfato magnésico, entre el 0,05 y el 0,2% de antiespumante, entre el 0,2 y el 1,5% de L-isoleucina y entre el 0,2 y el 1,5% de L-ácido aspartico, en un rango de pH entre 5 y 6. De acuerdo con los ejemplos, la concentración del principio activo en el caldo de cultivo estuvo entre 19 y 430 mg/L.

La patente húngara de número HU 208997 presenta una aplicación de la cepa *Aspergillus obscurus* depositada bajo el número NCAIM(P)F 001189. La fermentación se lleva a cabo preferiblemente en un medio de cultivo que contiene extracto de levadura y/o peptona y/o caseína como fuente de nitrógeno y glucosa y/o maltosa o sacarosa como fuente de carbono. Al final del cultivo a escala de laboratorio, el caldo de cultivo contuvo entre 400-850 mg/L.

Las patentes americanas de números 6197560 y 6500651 proponen un sistema de producción consistente en el cultivo en modo fed-batch de un acepa del hongo filamento *Aspergillus obscurus* en un reactor de tipo tanque agitado que se alimenta de forma discontinua con diferentes soluciones de nutrientes con el fin de alcanzar un estado estacionario de crecimiento, llevando a cabo el cosechado del cultivo también de forma discontinua.

La patente de número WO9837220-A1 propone un sistema de producción consistente en el cultivo de microorganismos para la producción de lovastatina en un reactor que se alimenta de forma continua o intermitente con un medio de cultivo que contiene únicamente una fuente de nitrógeno asimilable para controlar el crecimiento del microorganismo.

Tal y como se puede comprobar en las referencias citadas, la mayor parte del trabajo desarrollado acerca de la síntesis de lovastatina ha estado enfocado a la obtención de nuevos microorganismos sobre-productores de lovastatina y a la mejora de los procesos de extracción y purificación, en detrimento del desarrollo de métodos de cultivo que aumenten la productividad y reduzcan los costes de operación. Los métodos de cultivos empleados en las referencias citadas se centran en el uso de reactores de tipo tanque agitado operando en modo discontinuo, en modo fed-batch y en modo continuo pero alimentando el reactor con medio que contiene únicamente fuente de nitrógeno asimilable.

La síntesis de lovastatina mediante cultivos de *Aspergillus terreus* está regulada mediante un mecanismo enzimático de inhibición por producto, que produce el cese de la síntesis de lovastatina en los cultivos que se realizan de forma discontinua cuando la concentración de lovastatina alcanza un determinado valor (Casas López y cols. 2004. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31(1):48 -50)

La presente invención consiste en la producción de lovastatina, a partir de cultivos de *Aspergillus terreus* creciendo este en forma de pellets, mediante un proceso de fermentación en continuo en un biorreactor de tipo columna de burbujeo operando de forma análoga a un biorreactor de lecho fluidizado (BLF) con un cultivo en tres fases, gas, líquido y sólido, según la clasificación E-III-a de L. S. Fan (1989) (L. S. Fan, 1989. Gas-Liquid-Solid Fluidization Engineering. Butterworths Series in Chemical Engineering).

Trabajos previos al estudio objeto de patente han sido publicados demostrando la viabilidad del uso del reactor de tipo lecho fluidizado para la producción de lovastatina a partir de cultivos de *Aspergillus terreus*. Una aplicación para producción en semi-continuo de lovastatina ha sido publicada (Rodríguez Porcel y colaboradores, Journal of Chemical Technology and Biotechnology 82: 58-64 (2007)) aunque con importantes diferencias con el proceso objeto de patente. En dicha publicación los autores abogan por un proceso en tres fases, una primera fase en discontinuo, una segunda fase en modo fed-batch y una tercera fase en semicontinuo. En la presente patente se opta por una fase de crecimiento en discontinuo y una segunda fase de producción en continuo facilitando la operación del proceso completo. Como medio de dilución optan por utilizar un medio de cultivo con fuente de carbono y sin fuente de nitrógeno. La presente patente utiliza simplemente una disolución de sales minerales como medio de dilución, abaratando de esta forma los costes de producción.

El proceso presentado objeto de patente permite la obtención en continuo de un caldo de fermentación libre de biomasa conteniendo éste la lovastatina, lo cual facilita las posteriores etapas de extracción y purificación. La operación en continuo da lugar a que parte de la lovastatina generada en el cultivo abandone el biorreactor de lecho fluidizado, disminuyendo de esta forma los efectos de los mecanismo de inhibición por producto.

Descripción de la invención

La presente invención consiste en la producción de lovastatina, a partir de cultivos de *Aspergillus terreus* creciendo este en forma de pellets, mediante un proceso de fermentación en continuo en un biorreactor de tipo columna de burbujeo operando de forma análoga a un biorreactor de lecho fluidizado (BLF) con un cultivo en tres fases, gas, líquido y sólido.

El proceso permite la obtención en continuo de un caldo de fermentación libre de biomasa conteniendo éste la lovastatina, lo cual facilitará las posteriores etapas de extracción y purificación.

En este sistema, la fermentación para la producción de lovastatina tiene lugar en un reactor de lecho fluidizado en el que se mantiene la concentración de oxígeno disuelto entre 300% y 450% con respecto a la saturación con aire; para

lo que se utiliza un ciclo cerrado en el que el gas es impulsado por una bomba que toma aire de la cabeza del reactor y lo impulsa de nuevo al interior de este. Entre la cabeza y la bomba se sitúa un sistema de trampas para la retirada continua del CO₂ generado. Entre la bomba y la entrada al reactor se encuentra, en primer lugar e inmediatamente después de la bomba un caudalímetro, a continuación una trampa de humedad y, finalmente, justo antes de la entrada al reactor, un filtro de 0,22 micras de tamaño de poro que evita la entrada de microorganismos.

La inyección de oxígeno a la corriente de gas se realiza antes de la bomba cuando la concentración de oxígeno disuelto en el interior del reactor es inferior al valor del punto de consigna.

La cepa empleada de *Aspergillus terreus* fue adquirida en forma liofilizada de la American Type Culture Collection con el código ATCC 20542. Fue recuperada mediante rehidratación con agua destilada estéril y posterior inoculación en placa en medio de cultivo PDA.

La inoculación del reactor se lleva a cabo mediante precultivos de 48 horas de edad realizados en matraces Erlenmeyer de 1 L de capacidad con 250 mL del medio de cultivo. La inoculación de los precultivos se realiza con disolución de esporas obtenida del lavado de cultivos en placa.

Una vez inoculado el reactor se opera en modo discontinuo para permitir el crecimiento del microorganismo y, transcurridos entre 2 y 5 días, preferiblemente 4 días, comienza la operación en continuo. En este modo de operación, la biomasa permanece en el reactor y el medio fresco se alimenta con una velocidad de dilución comprendida entre 0,13 y 0,52 d⁻¹, preferiblemente 0,42 d⁻¹, utilizando una bomba de diafragma. La retirada de medio se realiza a través de un rebosadero de forma cilíndrica en el que las paredes están formadas por una malla, con un tamaño de orificio de 1 mm, permitiendo la retirada del medio por gravedad y quedando retenida la biomasa en forma de pellets dentro del reactor.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron mediante autoclave a 126°C y 2 atm durante 15 minutos.

La síntesis de lovastatina por *Aspergillus terreus* presenta inhibición por producto, por lo que su retirada del medio de cultivo favorece un aumento en la productividad. La utilización de biorreactores de lecho fluidizado en discontinuo en lugar de los tradicionales biorreactores de tanque agitado supone una mejora en la productividad, experimentando ésta un mayor incremento si la operación se realiza en modo continuo. Así, por ejemplo, utilizando la cepa de colección *Aspergillus terreus* ATCC 20542, después de 240 h de fermentación en continuo en un reactor de 17 L de volumen útil la productividad aumenta en un 315% con respecto a la operación en discontinuo en un biorreactor de tanque agitado.

35 Breve descripción de los dibujos

A continuación se pasa a describir de manera breve un modo de realización de la invención, como ejemplo ilustrativo y no limitativo de ésta. Para una mejor comprensión del modo de realización, se incluye la figura 1:

Esquema del proceso de producción en continuo de lovastatina en un reactor de lecho fluidizado. El equipo empleado consiste en un reactor tipo columna de burbujeo donde se lleva a cabo el cultivo. Por la base de dicho reactor se introduce una corriente de gas que proporciona la agitación al cultivo así como el oxígeno necesario.

El cultivo se realiza con control de oxígeno disuelto en el medio para lo cual se utiliza un ciclo cerrado de la fase gaseosa, de forma que el gas que sale del reactor por la parte superior se vuelve a introducir por la parte inferior impulsado por una bomba (Pall, Gelman Laboratory). Con el fin de retirar el dióxido de carbono generado en la respiración del microorganismo se colocan tres trampas consecutivas, la primera con hidróxido sódico para retener el dióxido de carbono, la segunda con ácido clorhídrico para neutralizar la humedad básica arrastrada por la corriente de gas y por último una trampa de humedad justo antes de entrar de nuevo en el compresor.

La medida de la concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo se realiza utilizando un electrodo polarográfico Mettler toledo InPro® 6000 Series O2 conectado a un transmisor de oxígeno disuelto Crison Mettler toledo O2 4100e. Este transmisor incorpora una sonda de temperatura que permite la corrección de la lectura en función de la temperatura. La medida se facilita en porcentajes de saturación respecto al equilibrio agua-aire a la temperatura de trabajo. Al transmisor se encuentra incorporado un controlador todo/nada que actúa sobre un relé al que se conecta una electroválvula que permite la entrada de oxígeno a la corriente gaseosa cuando el nivel de oxígeno disuelto es inferior al deseado. La sonda para medir la concentración de oxígeno disuelto se introduce en el reactor por medio de un puerto situado en el cuerpo central del reactor. La inyección de oxígeno a la corriente de gas se realiza antes de la entrada del mismo a la bomba cuando la concentración de oxígeno disuelto en el interior del reactor es inferior al punto de consigna.

El reactor está equipado con dos camisas de termostatación, una colocada en la parte superior a 4°C que evita el crecimiento del hongo en la pared y otra en la parte inferior a 28°C que controla la temperatura del cultivo.

Para poder llevar a cabo la operación en modo continuo el reactor tiene un puerto en la parte superior para la adición de medio con la ayuda de una bomba de diafragma y un puerto lateral para el cosechado situado en la parte superior del reactor provisto de una malla de 1 milímetro de luz que evita la salida de biomasa.

ES 2 319 029 A1

El reactor está provisto de sondas y transmisores de pH, DO2 y temperatura conectadas a una tarjeta de adquisición que permite registrar los datos durante todo el cultivo.

Descripción de una realización preferida

5 La invención ahora será descrita, por la manera del ejemplo, como medios de la ilustración y no han de ser interpretados como limitativos.

Ejemplo 1

10 La cepa *Aspergillus terreus* fue adquirida en forma liofilizada de la American Type Culture Collection con el código ATCC 20542. Fue recuperada mediante rehidratación con agua destilada estéril y posterior inoculación en placa en medio de cultivo PDA.

15 La inoculación del reactor se ha llevado a cabo mediante precultivos de 48 horas de edad realizados en matraces Erlenmeyer de 1 L de capacidad con 250 mL del medio de cultivo descrito en la tabla 1.

20

TABLA 1

Composición del medio de cultivo

25	Lactosa	114,26 g
	Harina de soja	5,41 g
	KH ₂ PO ₄	0,8
	NaCl	0,40 g
30	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,52 g
	ZnSO ₄ · H ₂ O	1 mg
	Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	2 mg
	Biotina	0,04 mg
	Disolución de metales traza	1 mL
35	pH	6,2 ajustado con NaOH
	Agua destilada	1L

40

TABLA 2

Composición de la disolución de metales traza

45	Disolución de metales traza:	
	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	100 mg
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	50 mg
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	50 mg
50	CuSO ₄ · 5H ₂ O	250 mg
	Agua destilada	1,0 L

55 La inoculación de los precultivos se realizó con disolución de esporas obtenida del lavado de cultivos en placa de 16 días de edad que fueron inoculados con 100 μ L de un vial del stock de esporas.

60 Una vez inoculado el reactor de 17 L de volumen útil con precultivos de 48 horas de edad se opera el reactor en modo discontinuo para permitir el crecimiento del microorganismo y, transcurridos 4 días, comienza la operación en continuo. En este modo de operación, la biomasa permanece en el reactor y el medio fresco se alimenta con una velocidad de dilución de 0,42 d⁻¹. La retirada de medio se realiza a través de un rebosadero de forma cilíndrica en el que las paredes están formadas por una malla, con un tamaño de orificio de 1 mm, permitiendo la retirada del medio por gravedad y quedando retenida la biomasa en forma de pellets dentro del reactor.

65 El medio de cultivo utilizado durante la operación en discontinuo es el descrito en la tabla 1. El medio de dilución utilizado durante la etapa en continuo es el descrito en la tabla 3.

ES 2 319 029 A1

TABLA 3
Composición del medio de dilución

5	KH ₂ PO ₄	0,80 g
	NaCl	0,40 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,52 g
	ZnSO ₄ · H ₂ O	1 mg
10	Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	2 mg
	Biotina	0,04 mg
	Disolución de metales traza	1 mL
	pH	6,2 ajustado con NaOH
15	Agua destilada	1L

Todos los medios de cultivo se esterilizaron mediante autoclave a 126°C y 2 atm durante 15 minutos. La biotina se añadió al medio después de la esterilización puesto que es termolábil, realizándose su esterilización por filtración estéril con filtros de 0,22 micras de tamaño de poro.

20 El cultivo se realizó manteniendo una concentración de oxígeno disuelto igual al 400% de la saturación con aire. Dicho control de la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo durante los primeros 7 días de cultivo en el reactor, después de los cuales dicho control fue retirado y se burbujeó únicamente con aire.

25 Operando de la forma descrita se obtuvieron 5,4 g totales de lovastatina en una fermentación que duró 300 h en un reactor de 17 L de volumen útil, representando un incremento del 96% respecto de las fermentaciones llevadas a cabo en las mismas condiciones pero en modo discontinuo y de un 303% con respecto a las fermentaciones llevadas a cabo en un biorreactor de tanque agitado operando en modo discontinuo.

30 Ejemplo 2

La inoculación del reactor se llevó a cabo mediante precultivos de *Aspergillus terreus* ATCC 20542 de 48 horas de edad realizados en matraces de 1 L de capacidad con 250 mL del medio de cultivo descrito en la tabla 1.

TABLA 1

Composición del medio de cultivo

40	Lactosa	114,26 g
	Harina de soja	5,41 g
	KH ₂ PO ₄	0,8
	NaCl	0,40 g
45	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,52 g
	ZnSO ₄ · H ₂ O	1 mg
	Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	2 mg
	Biotina	0,04 mg
	Disolución de metales traza	1 mL
50	pH	6,2 ajustado con NaOH
	Agua destilada	1L

TABLA 2

Composición de la disolución de metales traza

60	Disolución de metales traza:	
	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	100 mg
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	50 mg
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	50 mg
65	CuSO ₄ · 5H ₂ O	250 mg
	Agua destilada	1,0 L

ES 2 319 029 A1

La inoculación de los precultivos se realizó con disolución de esporas obtenida del lavado de cultivos en placa de 16 días de edad.

El reactor de 17 L de volumen útil inoculado con precultivos de 48 horas de edad se opera en modo discontinuo 5 durante para permitir el crecimiento del microorganismo y, transcurridos 4 días, comienza la operación en continuo alimentando medio fresco a una velocidad de dilución de $0,42 \text{ d}^{-1}$.

El medio de cultivo utilizado durante la operación en discontinuo es el descrito en la tabla 1. El medio de dilución 10 utilizado durante la etapa en continuo es el descrito en la tabla 3.

10

TABLA 3

Composición del medio de dilución

15

	KH ₂ PO ₄	0,80 g
	NaCl	0,40 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,52 g
20	ZnSO ₄ · H ₂ O	1 mg
	Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	2 mg
	Biotina	0,04 mg
	Disolución de metales traza	1 mL
25	pH	6,2 ajustado con NaOH
	Agua destilada	1L

20

25

30

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso de producción en continuo de lovastatina a partir del cultivo del microorganismo *Aspergillus terreus* en un biorreactor de lecho fluidizado mediante un proceso en al menos dos etapas, una primera etapa en modo discontinuo, fase de crecimiento y una segunda etapa en modo continuo, fase de producción.
- 10 2. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en la reivindicación 1 en el que se controle la concentración de oxígeno disuelto mediante aplicación de un ciclo cerrado para el gas e inyección directa de oxígeno cuando el nivel del mismo se encuentre por debajo del fijado, que estará entre el 300% y el 450% respecto de la saturación con aire.
- 15 3. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en las reivindicaciones 1 y 2 en el que el control de oxígeno disuelto se realice durante los 7 primeros días de cultivo y en adelante, preferiblemente se utilizará control de oxígeno disuelto durante todo el cultivo.
- 20 4. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en las reivindicaciones 1, 2 y 3 que se realiza a una temperatura comprendida entre 26 y 30°C.
- 25 5. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en las reivindicaciones 1-4 en el que la primera etapa tenga una duración comprendida entre 2 y 5 días.
- 30 6. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en las reivindicaciones 1-5 en el que el medio de cultivo para la primera etapa contenga: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales minerales y biotina.
- 35 7. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en las reivindicaciones 1-6 en el que la segunda etapa se realice en modo continuo respecto de la fase líquida, caldo de cultivo; en modo discontinuo respecto de la fase sólida, biomasa; a una velocidad de dilución comprendida entre 0,13 y 0,52 d⁻¹.
- 40 8. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en las reivindicaciones 1-7 en el que la retirada del caldo de cultivo se realiza por gravedad a través de un rebosadero situado en la parte superior del reactor y provisto de una malla que permita la salida del caldo de cultivo que contiene la lovastatina y evite la salida de biomasa.
- 45 9. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en las reivindicaciones 1-8 en el que el medio de dilución empleado contenga sales minerales, tales como: KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄, ZnSO₄ y Fe(NO₃)₃.
- 50 10. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en las reivindicaciones 1-9 en el que el medio de dilución empleado contenga elementos traza, tales como: Na₂B₄O₇, MnCl₂, Na₂MoO₄, y CuSO₄.
- 55 11. Proceso de producción en continuo de lovastatina definido en las reivindicaciones 1-10 en el que el medio de dilución empleado contenga biotina.

45

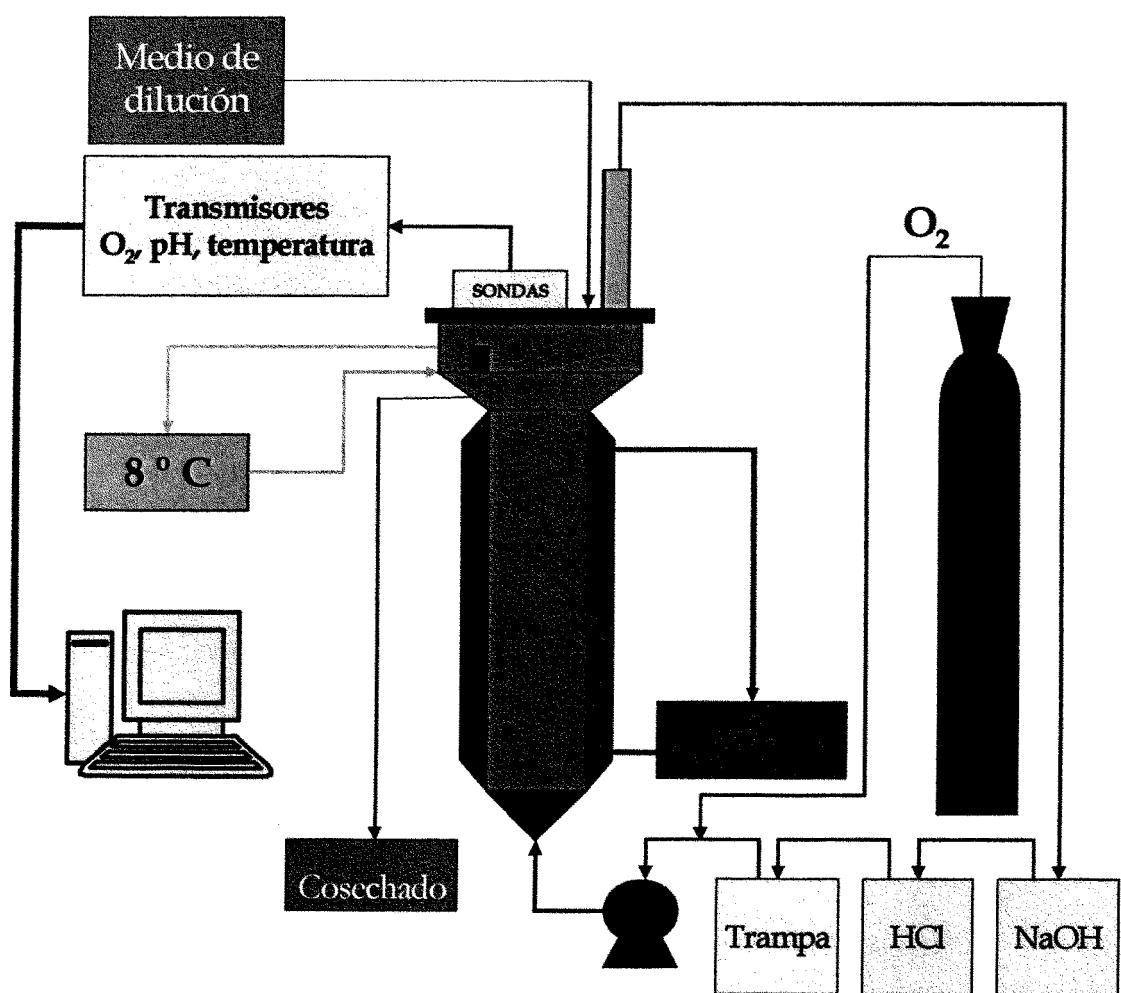
50

55

60

65

Figura 1





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RODRÍGUEZ PORCEL, E.M. et al.: "Enhanced Production of Lovastatin in a Bubble Column by Aspergillus terreus using a Two-Stage Feeding Strategy", J. Chem. Technol. Biotechnol. (enero 2007), vol. 82, pp.: 58-64, todo el documento.	1-11
A	CASAS LÓPEZ, J.L. et al.: "Lovastatin Inhibits its Own Synthesis in Aspergillus terreus", J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (2004), vol. 31, pp.: 48-50, todo el documento.	1-11
A	RODRÍGUEZ PORCEL, E.M. et al.: "Effects of Pellet Morphology on Broth Rheology in Fermentations of Aspergillus terreus", Biochem. Engineering J. (2005), pp.: 139-144, todo el documento.	1-11
A	WO 9837220 A1 (GIST-BROCADES, B.V.) 27.08.1998, todo el documento.	1-11
A	US 4231938 A (MONAGHAN, R.L. et al.) 04.11.1980, todo el documento.	1-11
A	DE 4402591 A1 (KRKA TOVARNA ZDRAVIL) 20.10.1994, todo el documento.	1-11
A	US 4294926 A (MONAGHAN, R.L. et al.) 13.10.1981, todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

A: refleja el estado de la técnica

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 27.03.2009	Examinador A. Maquedano Herrero	Página 1/2
--	------------------------------------	---------------

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 200700519

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P 17/06 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)