



(12) PATENT

(19) NO

(11) 336051

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12P 19/56 (2006.01)

C12R 1/11 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20065157	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.05.12 PCT/EP2004/05074
(22)	Inng.dag	2006.11.09	(85)	Videreføringsdag	2006.11.09
(24)	Løpedag	2004.05.12	(30)	Prioritet	2004.05.12, EP, PCT/EP04/05074
(41)	Alm.tilgj	2006.11.09			
(45)	Meddelt	2015.04.27			
(73)	Innehaver	Indena SpA, Viale Ortles, 12, IT-20132 MILANO, Italia			
(72)	Oppfinner	Cesare Ponzone, c/o Indena Spa, Viale Ortles, 12, IT-20132 MILANO, Italia			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Biotransformasjon av colchicinoidforbindelser
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9815642 A1
(57)	Sammendrag	

Foreliggende oppfinnelse vedrører en biotransformasjonsprosess, utført ved hjelp av utvalgte mikrobestammer, for fremstillingen av 3-O-glykosylderivater av colchicinoidforbindelser.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører en biotransformasjonsprosess, utført ved hjelp av utvalgte mikrobestammer, for fremstillingen av 3-O-glykosylderivater av colchicinoidforbindelser.

5 Fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer spesielt colchicinoidforbindelser glykosylert utelukkende ved C-3 på den aromatiske ringen A, som starter fra colchicin, tiocolchicin eller derivatene derav. Fremgangsmåten som resulterer i høy produktivitet og renhet av det oppnådde produktet, er basert på en tidlig aktivering av glykosyleringsenzymet, bestemt ved et demetylert colchicinintermediat. Foretrukket består fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen av en multippel
10 mate-batch-fermenteringsprosess, omfattende den fraksjonerte matingen av en nitrogenkilde, en karbonkilde og substratet som skal transformeres.

Colchicinoidforbindelsene glykosydert ved C-3 på benzenringen er av bemerkelsesverdige farmakologiske viktighet med hensyn til deres høye effektivitet og som intermediater for fremstillingen av nye medikamenter.

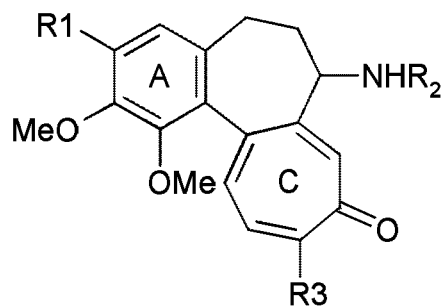
15 Spesielt er tiocolchicosid (3-O-glukosyltiocolchicin) en attraktiv og interessant aktiv ingrediens på det farmasøytiske området, hovedsakelig i terapien av sykdommer i muskel-skjelettsystemet, og som utgangsmaterialer for fremstillingen av nye antitumor, immunedbrytende, antipsoriasis og antiinflammatoriske medikamenter.

WO 98/15642 beskriver en fremgangsmåte for fremstilling av colchicinoidglykosylderivater i høye konverteringsutbytter (opp til 90%), startende fra colchicinoidforbindelser slik som colchicin, tiocolchicin og derivater derav, med en opprinnelig konsentrasjon opp til 1 g/l. Fremgangsmåten er basert på et preliminært, regioselektivt demetyleringsstrinn av C-3-metoksygruppen bundet til den aromatiske ringen av colchicinoidet, og en etterfølgende glykosylering av demetylderivatet på
25 det samme molekylsetet.

Fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelsen tillater, samtidig som man opprettholder det samme konverteringsutbyttet som tidligere, transformasjonen av vesentlig større mengde av totalt substrat, som således forbedrer både den totale produktiviteten, uttrykt som den totale mengden av produkt oppnådd per liter per batch, og den spesifikke produktiviteten, uttrykt som mengden produkt oppnådd
30 per liter per tidsenhet (dvs.: time) under biotransformasjonsprosessen.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er karakterisert ved aktiveringsmekanismen av glykosyleringstrinnet, basert på induksjonen av det spesifikke enzymet. Det har faktisk overraskende blitt funnet at enzymet involvert i glykosyleringstrinnet effektivt induseres av demetylerte colchicinoider slik som 3-O-demetylcolchicin (DMC) eller 3-O-demetyltiocolchicin (DMTC). En tilsetning av små mengder (200-600 mg/l) av 3-demetylderivatet i de tidlige trinnene av biotransformasjonsprosessen, eller foretrukket i den preliminaire utsåingskulturen, er nyttig for en tidlig aktivering av glykosyleringssystemet. Ved slik betingelse kan det demetylerte intermediet, gradvis frigitt av demetyleringsenzymet, effektivt konverteres til det endelige glykosyl-derivatet, og biotransformasjonen kan fortsette svært raskt, i løpet av de første 15-18 timene av fermentering. Videre er det ingen signifikant akkumulering av intermediet, dvs. ingen inhibering av demetyleringsaktiviteten og høy konverteringshastighet. Biotransformasjonen er fullstendig etter 18-21 timer og er derfor vesentlig raskere enn den ifølge den kjente fremgangsmåten (26-28 timer). Konverteringsutbyttet forblir svært høyt, fra 80% til 100%, vanligvis omkring 90-95%, men med en vesentlig økning av totalt transformert substrat og følgelig av sluttprodukt.

Oppfinnelsen tilveiebringer derfor en fremgangsmåte for fremstilling av 3-O-glykosylcolchicinoidforbindelser med formel (I),



hvor R_1 er et O-glykosydresidu, R_2 er hydrogen eller C_1 - C_7 acyl, R_3 er C_1 - C_6 alkoksy eller C_1 - C_6 tioalkyl, omfattende biotransformasjonen av forbindelser hvor R_1 er metoksy ved hjelp av *Bacillus megaterium*, som er kjennetegnet ved at den omfatter multipl, fraksjonert mating av en forbindelse med formel (I) hvor R_1 er metoksy i kombinasjon med en nitrogen- og karbonkilde, til en preliminær utsåingskultur inneholdende et demetylert colchicinoid anvendt for å indusere det glykosylerende enzymsystemet.

R_1 er foretrukket et O-glukosidresidu.

Pepton og glukose er egnet nitrogen- og karbonkilde. Denne betingelsen tillater, ved å sikre en stabil veksthastighet av mikrobedyrkingen, en relevant økning av det totale substratet tilsatt til fermenteringsbatchen (2-4 g/l, i stedet for 1 g/l) og følgelig av produktiviteten av fremgangsmåten (opp til 2,5-5,2 g/l av glykosylert produkt per enkelt batch, i stedet for 1-1,2 g/l), uten noe tap av konverteringseffektivitet og risiko for toksiske effekter på bakteriedyrking, grunnet en vesentlig akkumulering av det uttransformerte substratet.

Den foreliggende oppfinnelsen er også fordelaktig når det gjelder den reduserte prosesstiden, som resulterer i en høy levedyktighet av dyrkingen og en begrenset cellelysis, med redusert celleavfallsdannelse og vesentlige fordeler for nedstrømsprosesseringen og gjenvinningen av produktet. Denne fordelene kan ytterligere forbedres ved anvendelsen av absorpsjonsresiner, som XAD 1180 (Rohm & Haas) eller HP 21 (Mitsubishi), nyttige for en selektiv absorpsjon av colchicinoidforbindelsene og en effektiv produktgjenvinning fra fermenteringsbuljongen.

En ytterligere fordel vedrører muligheten for en halvkontinuerlig fremgangsmåte, ved å gjenvinne hovedfraksjonen (75-90%) av den endelige fermenteringsbuljongen, inneholdende produktet, å tilsette nytt fermenteringsmedium til den gjenværende delen av buljongen i bioreaktoren, og å starte med en ny batch. Denne tilnærmingen kan utvides til gjentatte fermenteringstrinn, med en proporsjonal økning av den totale produktiviteten.

Videre sikrer den konstante regioselektiviteten av katalysen, i tillegg til de bemerkelsesverdige produksjonsutbyttene, en høy kvalitet på det resulterende produktet, som tillater en renhet $\geq 99\%$ med en enkel nedstrømsprosessering og en redusert forekomst av trinnet for rensing og gjenvinning av produktet. Dette aspektet impliserer ytterligere fordeler når det gjelder løsemiddelbegrensning og høy miljømessig forenlighet av fremgangsmåten.

Bacillus megaterium-mikroorganismene anvendelige i den foreliggende oppfinnelsen, er de samme som beskrevet i WO 98/15642.

De kan velges fra forskjellige agar-media inneholdende en organisk nitrogenkilde (peptoner, gjærekstrakter, kjøttekstrakter, asparagin, etc.), en karbonkilde (glyserin, stivelse, maltose, glukose, etc.), med pH 5 til 8, foretrukket 6-7. Inkubasjonstemperaturen strekker seg fra 20° til 45°C, fortrinnsvis 28-40°C.

Dyrkingsmedia anvendt for konserveringen av dyrkingen er typisk mikrobiologiske substrater, innholdende organiske nitrogenkilder (pepton, gjærekstrakter, trypton, kjøttekstrakter, etc.), en karbonkilde (glukose, maltose, glyserin, etc.), ved pH 5 til 8, fortrinnsvis 6-7. Inkubasjonstemperaturen strekker seg fra 20 til 45°C, fortrinnsvis 28-40°C.

De valgte mikroorganismene kan testes for evnen til å vokse i undervannsdyrking, i nærvær av colchicinoidforbindelser, tilsatt som beskrevet i foreliggende oppfinnelse, og til å transformere sistnevnte til de tilsvarende 3-glykosylderivatene.

- 10 Assayene ble utført i 100 ml kolber inneholdende 20 ml flytende medium, med forskjellige mediumformuleringer, omfattende én eller flere organiske nitrogenkilder (gjærekstrakter, peptoner, trypton, kaseinhydrolysater, kjøttekstrakt, maisuttrekk, etc.), én eller flere karbonkilder (glukose, glyserol, stivelse, sakkarose, etc.), uorganiske fosfor- og nitrogenkilder og uorganiske salter av forskjellige ioner (K+,
15 Na+, Mg++, Ca++, Fe++, Mn++, etc.).

Dyrkingsprøvene kan eventuelt underkastes mutagenbehandlinger, ved hjelp av de konvensjonelle mutagenteleknikkene (bestråling med UV-stråler, etc.) for å indusere mutanter med en spesifikk biokonverteringsaktivitet som kan evalueres med den samme fremgangsmåten som over.

- 20 Det utvalgte bakterienes evne til å transformeres til de respektive 3-glykosylderivat colchicinoidsubstratene, tilsatt til dyrkingsbuljongen i gjentatte fraksjoner, sammen med karbon- og en nitrogenkilde, har blitt bekreftet ved hjelp av biokonverteringsassayer i kolber, i en 300 ml skala, inneholdende forskjellige mediumformuleringer, omfattende én eller flere organiske nitrogenkilder (gjærekstrakter, peptoner, trypton, kaseinhydrolysater, kjøttekstrakt, maisuttrekk, etc.), én eller flere
25 karbonkilder (glukose, glyserol, stivelse, sakkarose, etc.), uorganiske fosfor- og nitrogenkilder og uorganiske salter av forskjellige ioner (K+, Na+, Mg++, Ca++, Fe++, Mn++, NH₄+, etc.).

- Bakterievekst og biotransformasjon er støttet av én eller flere organiske nitrogen-
30 kilder, fortrinnsvis kjøttekstrakt, pepton, trypton, kaseinhydrolysater, maisuttrekk, etc. Karbonkilder nyttige for vekst og biotransformasjon er glukose, fruktose, sakkarose, glyserol, maltekstrakt, etc., fortrinnsvis glukose, fruktose og glyserol.

Dyrkingsmediet inneholder videre uorganiske fosforkilder og salter av K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , NH_4^+ , etc..

Karbonkilden nyttig i prosessmating er fortrinnsvis glukose og fruktose. Nitrogenkilden for prosessmating er fortrinnsvis en organisk kilde, som pepton, kasein-
5 hydrolysat, trypton eller en uorganisk slik som ammoniumsulfat eller en kombinasjon av begge.

Preliminære eksperimenter har vist at innføringen, før biotransformasjonstinet, av en neddykket utsåingskultur, inneholdende en mediumformulering lik den av produksjonsmediet, resulterer i en svært homogen og svært aktiv mikrobepopulasjon i
10 begynnelsen av biotransformasjonen.

Ytterligere eksperimenter har blitt utført ved anvendelse av forskjellige fermenteringsparametre, som mengde, tidspunkt og modalitet for substrattilsetning, matingsforhold, inkubasjonstid, inokulasjonsforhold, etc..

En tidlig tilsetning av et demetylcolchicinoid som induser, i begynnelsen av biotransformasjonstrinnet eller bedre under den preliminære utsåingskulturen, kan
15 vesentlig øke konverteringseffektiviteten og den totale produktiviteten av prosessen.

Ytterligere økning kan oppnås ved å mate substratet som skal konverteres i flere fraksjoner i løpet av prosessen, i kombinasjon med en karbonkilde og en nitrogen-
20 kilde.

En typisk fremgangsmåte, som kombinerer parametrene beskrevet over, kan derfor være basert på følgende plan:

- en preliminær tilsetning av et 3-O-demetylcolchicinoid (200-600 mg/l, fortrinnsvis 300-500 mg/l) i utsåingskulturen;
- 25 - tilsetning av alikvoter (300-800 mg/l, fortrinnsvis 500-600 mg/l) av colchicino-idsubstratet som skal konverteres, i begynnelsen av hver 1-3 timer, fortrinnsvis 1,5-2,5 timer, i løpet av de første 14-18 timer, fortrinnsvis 15-16 timer biotransformasjon;

- tilsetning, ved hver substratmating, av en løsning inneholdende følgende råmaterialer:

- a) pepton, eller trypton, eller kaseinhydrolysat, i en sluttkonsentrasjon på mellom 2 og 4 g/l, fortrinnsvis 2,5-3,5 g/l (også i kombinasjon med ammoniumsulfat 1-3 g/l, fortrinnsvis 1,5-2,5 g/l);
- b) glukose eller fruktose, i en sluttkonsentrasjon på mellom 5 og 15 g/l, fortrinnsvis 8-12 g/l.

Tatt i betraktning en total fermenteringstid på 20 timer, vil en opprinnelig substratkonsentrasjon på 500 g/l, et i-prosess matingsintervall på 2 timer og et totalt antall av 7 matingstrinn (siste substrattilsetning ved 14. fermenteringstime), en total substratmengde på 4 g/l (i stedet for 1 g/l, som beskrevet i WO 98/15642) tilsettes til kulturen.

Biotransformasjonen kan utføres ved 25-35°C, fortrinnsvis ved 28-32°C, ved pH mellom 4 og 8, fortrinnsvis 5-7, i omrørte kolber på en roterende rister.

Biotransformasjonen ifølge oppfinnelsen kan oppskaleres til fermenteringstanknivå, som holder dyrkingsbetingelsene uendret, spesielt når det gjelder dyrkingsmedium, temperatur og prosesseringstider. For å oppnå god vekst er passende nivåer av røre-ventilasjon viktig, spesielt er ventilasjonsnivåer på 1-2 liter luft per liter kultur per minutt (vvm), fortrinnsvis på 1,4-1,8 vvm, nødvendig. I slikt tilfelle er prosessen svært rask, og etter 20-21 timer er biotransformasjon fullstendig.

Produktet er ekstracellulært og kan ekstraheres fra dyrkingsbuljongen etter separasjon av biomassen fra væskefraksjonen ved sentrifugering og gjenvinning av supernatanten, eller mikrofiltrering og gjenvinning av permeatet. Kulturen kan behandles med alkoholer når det gjelder optimal gjenvinning av produktet.

Rensingen kan utføres ved kromatografiske teknikker, væske-væske-ekstraksjon med alkoholer og lipofile organiske løsemidler og krystallisering, som beskrevet i WO 98/154621.

Følgende eksempler beskriver oppfinnelsen mer detaljert.

Eksempel 1

En alikvot av frossen kultur av Bacillus megaterium anvendes for inokulasjon av utsåingskulturer (dvs.: predyrking) i 1000 ml Erlenmeyer-kolbe, inneholdende 250 ml medium SF2 (tabell), tilsatt 3-O-demetyltiocolchicin til en 0,4 g/l sluttkonsentrasjon. Kulturene inkuberes natten over ved 30°C, på en roterende rister ved 250 rpm. Etter inkubasjon overføres 500 ml prekulturer sterilt til en 14 l fermenter, inneholdende 9,5 l friskt medium SF2 (se tabell 1), tilsatt med tiocolchicin til en 0,5 g/l sluttkonsentrasjon. Fermenteringen utføres ved 30°C, som holder passende nivåer av røring-ventilasjon (omrøring opp til 900 rpm; ventilasjon 1 til 1,8 vvm, avhengig av dyrkingsveksten). Hver 2. time settes tiocolchicin (0,5 g/l sluttkonsentrasjon), pepton (2 g/l), ammoniumsulfat (2 g/l) og glukose (10 g/l) til kulturen, i løpet av de første 14 timene fermentering. Før hver tilsetning (dvs.: hver 2. time) tas det prøver fra dyrkingsbuljongene og de underkastes følgende analyse:

- vekstnivå, som optisk densitet (OD) ved 600 nm;
- sterilitets- og renhetsanalyse av stammen på LB Agar;
- mikroskopmorfologi (Gram-farging);
- analyse av tiocolchicosidinnholdet, med TLC og HPLC.

TLC-analyse utføres på silikagel, med et aceton:etylacetat:vann 5:4:1 eluentssystem. For HPLC-analysen, settes 1 ml fraksjoner av dyrkingsbuljongene til 9 ml metanol og sentrifugeres ved 13 000 rpm i 2 minutter. Innholdet i tiocolchicosid av supernatanten analyseres ved revers fase HPLC, med isokratisk eluering, ved hjelp av vann:acetonitril 80:20 eluentssystemet. HPLC-analyse viser at konverteringen av tiocolchicin til tiocolchicosid starter svært tidlig og er nesten fullstendig etter 20 timer. En total mengde på 4 g/l tiocolchicin transformeres til 5,2 g/l tiocolchicosid, med et 96% konverteringsutbytte og en spesifikk produktivitet på 0,26 g/l.h av glukosylert colchicinoid.

Eksempel 2

Den endelige dyrkingsbuljongen fra fermenteringen (totalt volum: ca. 10 l), inneholdende ca. 52 g tiocolchicosid som bestemt ved HPLC-analyse, underkastes en kryss-strøm-mikrofiltrering på en 0,22 µm keramisk patron, for å separeres cellene

fra buljongen. Permeatet absorberes på en kolonne fylt med en XAD 1180 (Rohm & Haas) absorpsjonsresin. Etter vasking med vann eluderes produktet med metanol. Metanoleluatet konsentreres til tørrhet under vakuum, deretter gjenoppløses det i metanol. Etter ekstraksjon med metylenklorid konsentreres alkoholfraksjonen til
5 tørrhet og gjenoppløses i en etanol-metylenklorid, 1:1-blanding. Etter klaring med silikagel konsentreres løsningen under vakuum; metylenklorid erstattes deretter med etanol. Den resulterende suspensjonen konsentreres og levnes til å krystalliseres. En andre krystallisering med etanol utføres etter ytterligere gjenoppløsnings-trinn av faststoffet i etanol-kloroformblandinger og klaring på silikagel. En total
10 mengde på 49,9 g produkt oppnås etter rensing, med et rensutbytte på 96% og en renhet på 99,5%.

Det resulterende produktet, analysert med HPLC, C-NMR, H-NMR og massespektrum, ser ut til å være det samme som tiocolchicosidstandarden.

Sammenligningseksempel 3

15 Fremgangsmåten beskrevet i eksempel 1 gjentas, men tiocolchicin tilsettes fullstendig i en enkel fraksjon, i en sluttkonsentrasjon på 4 g/l, i begynnelsen av fermenteringen. Den resulterende veksten er svært dårlig og blokkeres praktisk talt etter noen få timers inkubasjon. Tydelig cellelysis påvises ved mikroskopanalyse. Ingen signifikant biotransformasjon vises ved TLC- og HPLC-analyse.

20 Sammenligningseksempel 4

Fremgangsmåten beskrevet i eksempel 1 gjentas, men uten noen tilsetning av 3-O-demetyltiocolchicin i den preliminære utsåingskulturen (ingen enzyminduksjon). Biotransformasjon resulterer langsommere enn den i eksempel 1, og stoppes etter 28 timer, med et endelig konverteringsutbytte på 61%, en total produktivitet på
25 3,3 g/l og en spesifikk produktivitet på 0,118 g/l.h av tiocolchicosid.

Sammenligningseksempel 5 (tilsvarende WO 98/15462)

Fremgangsmåten beskrevet i eksempel 4 repeteres, men tiocolchicin tilsettes fullstendig i en enkel fraksjon, i en sluttkonsentrasjon på 1 g/l, i begynnelsen av fermenteringen, ved anvendelse av fermenteringsmedium ST som beskrevet i
30 WO98/15462. Biotransformasjon resulterer langsommere enn i eksempel 1, og

stoppes etter 28 timer, med et endelig konverteringsutbytte på 90%, en total produktivitet på 1,22 g/l og en spesifikk produktivitet på 0,044 g/l.h tiocolchicosid.

Følgende tabell viser en sammenligning uttrykt som total produktivitet, spesifikk produktivitet og konverteringsutbytte av tiocolchicin til tiocolchicosid, mellom fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse **(A)** og den i WO098/15642 **(B)**.

	Produktivitet (total) g/l	Produktivitet (spesifikk) g/l	Konverteringsutbytte %
A *	5,22	0,261	96
B *	1,22	0,044	90

* substrat (tiocolchicin) tilsatt; 4 g/l (A); 1 g/l (B)

Tabell 1

Formulering av dyrkingsmediet

1) LB-Agar (Sterilization: 121°C x 20') - pH 7

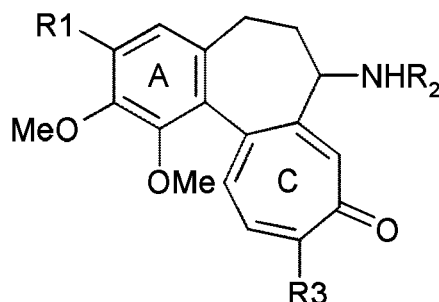
10	Trypton	10 g/l
	Gjærekstrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Agar Agar	15 g/l

2) Buljong SF2 (Sterilisering: 121°C x 20') - pH 7

15	Glukose	40 g/l
	Pepton	20 g/l
	Gjærekstrakt	5 g/l
	NaCl	3 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/l
20	K ₂ HPO ₄	8 g/l
	KH ₂ PO ₄	3 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av 3-O-glykosylcolchicinoid-forbindelser med formel (I),



5 hvori R_1 er et O-glykosydr residu, R_2 er hydrogen eller C_1 - C_7 acyl, R_3 er C_1 - C_6 alkoksy eller C_1 - C_6 tioalkyl, omfattende biotransformasjonen av en forbindelse med formel (I) hvori R_1 er OH eller metoksy ved hjelp av *Bacillus megaterium*,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter multi-
10 tippel, fraksjonert ma-
ting av en forbindelse med formel (I) hvori R_1 er metoksy i kombinasjon med en nitrogen- og karbonkilde, til en preliminær utsåingskultur inneholdende et demetylert colchicinoid anvendt for å indusere det glykosylerende enzymsystemet.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori det demetylerte colchicinoidet velges fra 3-O-demetylcolchicin (DMC) eller 3-O-demetylticolchicin (DMTC).

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori det demetylerte colchicinoidet tilsettes i en mengde på 200-600 mg/l.

15 4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1-3, hvori nitrogen- og karbonkilden er pepton og glukose.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst krav 1-4, hvori det totale substratet tilsatt til fermenteringsbatchen er på 2-4 g/l.

20 6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1-5, hvori gjenvinningen av produktet utføres ved hjelp av absorpsjonsresiner.

7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1-6, utført i en halvkontinuerlig prosess, ved å gjenvinne hovedfraksjonen (75-90%) av den endelige fermente-

ringsbuljongen, inneholdende produktet, å tilsette nytt fermenteringsmedium til den gjenværende delen av buljongen i bioreaktoren, og å starte med en ny batch.

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1-7, omfattende:

- en preliminær tilsetning av et 3-O-demetylcolchicinoid i utsåingskulturen;
- 5 - tilsetning av alikvoter av 300-800 mg/l av colchicinoidsubstratet som skal konverteres, i begynnelsen og hver 1-3 time, i løpet av de første 14-18 timene biotransformasjon;
- tilsetning, ved hver substratmating, av en løsning inneholdende følgende råmaterialer:
- 10 a) pepton, eller trypton, eller kaseinhydrolysat, i en sluttkonsentrasjon på 2-4 g/l, i kombinasjon med 1-3 g/l ammoniumsulfat;
- b) glukose eller fruktose, i en sluttkonsentrasjon på 5-15 g/l.

9. Fremgangsmåte ifølge ethvert av krav 1-8, hvori biotransformasjonen utføres ved

15 25-35°C, ved pH mellom 4-8.

10. Fremgangsmåte ifølge ethvert av krav 1-9, hvori ventileringsnivåene på 1-2 liter luft per liter dyrking per minutt (vvm) anvendes.