

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 165375 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4618/87

(22) Indleveringsdag: 04 sep 1987

(41) Alm. tilgængelig: 12 mar 1988

(44) Fremlagt: 16 nov 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 11 sep 1986 GB 8621912

(51) Int.Cl.5 C 12 P 21/00
//C 12 P 21/00,
C 12 R 1:03)

(71) Ansøger: *Gruppo Lepetit S.p.A.; 23, Via Murat; 20159 Milano, IT

(72) Opfinder: Enrico *Selva; IT, Luciano *Gastaldo; IT, Maurizio *Denaro; IT, Giovanni *Cassani; IT, Francesco *Parenti; IT

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til selektivt at forøge andelen af faktor A og/eller B₀ eller PA og/eller PB i et antibiotikum A 40926-kompleks

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammen drag:

4618-87

Fremgangsmåde til selektivt at forøge andelen af enkelte hovedkomponenter af antibiotikum A 40926-kompleks

En fremgangsmåde til selektivt at forøge produktionen af faktor A og/eller faktor B₀ af antibiotikum A 40926, enten for at isolere disse enkeltkomponenter i forbedrede udbytter eller for at berige komplekset med hensyn til den ene eller begge de nævnte komponenter, består i at man sætter en passende prækursor for den ønskede antibiotikum-faktor til en A 40926-producerende kultur under gæringen.

DK 165375 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af antibiotikum A 40926-kompleks, beriget med hensyn til dets faktorer A og/eller B_0 , eller PA og/eller PB, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 1's 5 kendetegnende del angivne.

Antibiotikum A 40926 er et glykopeptidisk antibiotikum som er blevet isoleret fra en kultur af *Actinomadura* betegnet *Actinomadura* sp. ATCC 39727. Det er et kompleks hvis faktorer er blevet benævnt faktor A, faktor B, faktor B_0 , faktor PA og faktor PB. Det er beskrevet i beskrivelsen til EP-skrift A 177882. 10

Dette antibiotiske kompleks såvel som de enkelte faktorer deraf binder sig til D-alanyl-D-alanin-terminerende oligopeptider og er hovedsagligt virksom mod gram-positive bakterier og arter af *Neisseria*. 15

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det faktisk muligt fx at påvirke mængdeforholdet af de enkelte hovedkomponenter af antibiotikum A 40926-kompleks ved industriel gæring i stor målestok. Denne fremgangsmåde repræsenterer derfor et nyttigt værktøj til regulering af sammensætningen af slutproduktet så den svarer til standardspecifikationer. 20

Desuden er det ved at gå frem i henhold til fremgangsmåden ifølge opfindelsen også muligt direkte ud fra gæringsmassen af den producerende stamme at opnå et råprodukt som er meget rigt med hensyn til antibiotikum A 40926 faktor A eller B_0 , der derefter kan isoleres i ren form med højere udbytter og ved mindre tidsrøvende trin end ellers. 25

Det er specielt den foreliggende opfindelses formål at tilvejebringe en fremgangsmåde til at forøge produktionen af faktorerne PA og/eller PB i A 40926. Det er kendt fra EP-skrift nr. A-177882 at disse to faktorer er naturlige "forløbere" eller "prækursorer" for antibiotikum A 40926, 30 henholdsvis faktorerne A og B_0 . Ved at gennemføre udvinningen af de antibiotiske stoffer mens man i begrænset

grad udsætter dem for basiske betingelser, vil der derfor blive vundet et kompleks som er beriget med hensyn til faktor PA og/eller PB i stedet for faktor A og/eller faktor B_0 . Nærmere betegnet er den særlige prækursor som forøger produktionen af antibiotikum A 40926 faktor PA den samme som den der forøger andelen af antibiotikum 40926 faktor A, og den prækursor som svarer til faktor PB er den samme som den der svarer til antibiotikum A 40926 faktor B_0 .

Den prækursor som giver en forøgelse af andelen af faktor B_0 i antibiotikum A 40926 er udvalgt blandt valin, salte deraf med syrer og baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, α -keto-isovalerianesyre, salte deraf med baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf med lavere mono- og polyhydroxyalkanoler, isosmørsyre, salte deraf med baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf med lavere mono- og polyhydroxyalkanoler, isobutanol og estere deraf med syrer som er ugiftige for den producerende mikroorganisme.

Den prækursor som giver en forøgelse af andelen af faktor A i antibiotikum A 40926 kompleks er udvalgt blandt n-propanol og estere deraf som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, propionsyre, salte deraf med baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf med lavere mono- og polyhydroxyalkanoler, isoleucin, salte deraf med syrer og baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, α -keto- β -metylvalerianesyre, salte deraf med baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf med lavere mono- og polyhydroxyalkanoler, 2-metylsmørsyre, salte deraf med baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf med lavere mono- og polyhydroxyalkanoler, 2-metylbutanol og estere deraf med syrer som er ugiftige for den producerende mikroorganisme.

Salte med baser som er ugiftige for mikroorganismen er salte hvor typen og koncentrationen af den givne kation er en sådan at den ikke forringer væksten af

mikroorganismekulturen eller produktionen af det ønskede antibiotiske stof i betragtelig grad ved den koncentration der bruges i gæringsmassen. Eksempler på disse kationer er dem der stammer fra alkalimetaller og jordalkalimetaller såsom natrium, kalium, kalcium og magnesium såvel som dem der stammer fra aminer såsom ammonium, primære, sekundære eller tertiære C_{1-4} -alkylammonium- og hydroxy- C_{1-4} -alkylammoniumioner. Foretrukne salte er de salte som indeholder natrium-, kalium- eller ammoniumioner.

Eksempler på syrer som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, dvs. salte med syrer som ikke i væsentlig grad forringer enten væksten af mikroorganismekulturen eller produktionen af det ønskede antibiotiske stof, ved den koncentration ved hvilken de er til stede i gæringsmassen, er fortrinsvis uorganiske syrer såsom saltsyre, selv om der også i nogle tilfælde kan være organiske syrer til stede.

Estere af en egnet prækursor som defineret ovenfor med lavere mono- og polyhydroxyalkanoler er estere med C_{1-6} alkanoler med 1, 2, 3, 4, 5 eller 6 hydroxyfunktioner pr. molekyle. Når der bruges C_{1-4} alkanoler må de være forskellige fra dem der virker som prækursorer for den anden antibiotiske faktor (dvs. butanol eller 2-metylbutanol), med mindre der ønskes samtidig forøgelse af begge faktorer.

Foretrukne eksempler på polyhydroxyalkanoler er glycerol og propylenglykol.

Når den lavere alkohol kan foreligge i forskellige enantiomere og epimere former sigtes der i nærværende beskrivelse med tilhørende krav til hver enkelt form for sig såvel som blandinger af hvilke som helst af de enkelte former i hvilket som helst mængdeforhold.

Estere af en valgt hydroxyholdig prækursor som defineret ovenfor, der er ugiftig for mikroorganismen, er C_{2-22} alkanoylestere hvor typen og koncentrationen af alkanoyldelen i gæringsmediet er en sådan at de ikke forringer væksten af mikroorganismekulturen eller pro-

duktionen af det ønskede antibiotiske stof i væsentligt omfang. I almindelighed foretrækkes ligekædede C_{2-4} alkanoler.

Den anvendte antibiotikum A 40926-producerende kultur er en kultur af *Actinomadura* sp. ATCC 39727 eller en mutant deraf med væsentligt samme egenskaber.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen indbefatter dyrkning af en antibiotikum A 40926-producerende kultur i et vandigt næringskulturmedium indeholdende en assimilerbar kilde til kulstof, en assimilerbar kilde til nitrogen og uorganiske salte under de sædvanlige betingelser som kendes til dyrkning af streptomyceter i almindelighed og for den A 40926-producerende stamme i særdeleshed (se også ovennævnte EP-A-177882), i det der til sættes en effektiv mængde af den valgte prækursor for selektivt at forøge produktionen af antibiotikum A 40926 faktor A og/eller faktor B_0 .

Den valgte prækursor kan sættes til gæringsmediet på kontinuerlig eller diskontinuerlig måde under gæringen, eller i en for-kultur, eller den kan sættes til dyrkningsmediet før gæringen. Den kan tilsættes direkte hvis den er passende flydende ved gæringstemperaturen, eller den kan tilsættes som en opløsning, suspension eller emulsion og fortrinsvis i form af en vandig opløsning eller suspension.

En "effektiv mængde" af den valgte prækursor er en mængde af en prækursor som defineret foran, der ved tilsætning til gæringen giver en koncentration af en selektiv prækursor som er tilstrækkelig høj til at frembringe den selektive forøgelse af den specifikke faktor af antibiotikum A 40926 uden at bevirke toksiske virkninger på den i vækst værende kultur af den producerende mikroorganisme.

Graden af tilsætning af prækursoren må være tilstrækkelig høj til at forøge udbyttet af den ønskede faktor i væsentlig eller optimal grad uden dog at fremkalde en toksisk virkning på gæringen.

I almindelighed kan det være nyttigt at tilføre en effektiv mængde af den valgte prækursor på kontinuerlig eller portionsvis måde fra begyndelsen, eller under gæringens produktionsstadium.

- 5 I nogle tilfælde kan det være hensigtsmæssigt at tilføre en blanding af nogle af prækursorerne for en given faktor eller dem alle for at opnå et maksimalt resultat med minimale "toxiske" virkninger på kulturen.

Efter gæringen kan man om ønsket udvinde antibiotikum A 40926-kompleks eller de enkelte faktorer A eller B₀, PA eller PB, ved kendte fremgangsmåder eller indlysende modifikationer deraf.

Nærings-gæringsmedier som egner sig til gæring af den A 40926-producerende stamme, som kan bruges ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, indeholder sædvanligvis: en passende kulstofkilde der fx kan være udvalgt blandt sukkerarter (fx glukose, sakkarose, maltose), polysakkarider (fx stivelse, dextran), polyalkoholer (fx glycerol, propylenglykol); passende nitrogenkilder der fx kan være udvalgt blandt ammoniumsalte, asparagin, jordnøddemel, soyamel, kødekstrakt, trypton, pepton, gærhydrolysat, gærekstrakt og majsstøbevand; og uorganiske salte. Blandt de uorganiske salte som kan inkorporeres i dyrkningsmedier kan nævnes de sædvanlige opløselige salte med evne til at frembringe natrium-, kalium-, jern-, zink-, kobolt-, magnesium-, kalcium-, ammonium-, klorid-, karbonat-, sulfat-, fosfat-, nitrat- og lignende ioner.

I almindelighed for-dyrkes den antibiotikumproducerende stamme i en rystekolbe hvorpå kulturen bruges til podning af krukkefermentorer til produktion af væsentlige mængder af de antibiotiske stoffer. Det medium der bruges til forkulturen kan være det samme som det der bruges til større gæringer, men der kan også bruges andre medier.

Gæringen udføres gennem et tidsrum som varierer mellem 50 og 150 timer under submerse, aerobe betingel-

ser og ved en temperatur mellem 25-35°C, fortrinsvis mellem 27-33°C. Tilsætning af den selektivt effektive mængde af vedkommende prækursorer kan ske til gæringsmedierne før podningen med den producerende stamme, eller
5 24-48 timer efter at gæringen er sat igang. Tilsætningen kan ske i en eller flere portioner eller på kontinuerlig måde.

Ved et typisk forsøg med fremgangsmåden ifølge opfindelsen podes en kultur af den A 40926-producerende
10 stamme der holdes i havremels-agar-skråkultur, i en kolbe indeholdende 100 ml af et vegetativt medium. Efter ca. 72 timer bruges prøver af kulturen (5 ml) til podning af et antal gæringskolber indeholdende hver 100 ml gæringsmedium, hvortil der sættes en selektivt effektiv mængde
15 de prækursor efter behov. Hvis der ønskes samtidig forøgelse af de to faktorer af A 40926-kompleks, sættes vedkommende prækursorer til samme gæringskolbe. Gæringen fortsættes i yderligere 60-150 timer og overvåges ved mellemrum ved HPLC, hvorefter gæringskagen fjernes og
20 prøver af gæringssuppen analyseres ved HPLC.

Udvinding af de antibiotiske stoffer kan udføres på i og for sig kendt måde og som beskrevet udførligt i EP-A-177882.

Til veterinær anvendelse kan man bruge hele gæringskagen eller en koncentreret gæringssuppe.
25

Tilsætning af prækursoren til gæringen er en sådan at den ikke i væsentlig grad påvirker dens forudbestemte pH-område. Når der således sættes prækursorer i form af fri syre direkte til mediet, holdes pH under
30 kontrol ved pufning af mediet eller ved øjeblikkelig neutralisering med baser som er ugiftige for mikroorganismen.

Når den prækursor som skal tilsættes er en aminosyre kan den føres til gæringen som en vandig opløsning
35 af salte deraf med syrer eller baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, fx hydroklorider og natriumsalte, selv om man i mange tilfælde hensigtsmæssigt

kan tilsætte aminosyre i form af en opløsning af det "indre salt". Der kan bruges racemiske blandinger og optisk aktive isomerer som prækursorer.

I almindelighed opnås der imidlertid højere udbytte ved tilsætning af L-formen end med den tilsvarende D-form.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen består derfor i man bruger L-formen af aminosyre-prækursoren til at forøge koncentrationen af faktor B₀ eller PB (L-valin eller et salt eller en ester deraf), og/eller faktor A eller PA (L-isoleucin eller et salt eller en ester deraf) af antibiotikum A 40926-kompleks. I henhold til denne foretrukne udførelsesform er det også muligt at forøge procentandelen af faktor A eller B₀ i gæringsproduktet til over 80% af komplekset.

Når man bruger lavere alkansyre-prækursorer (2-metylsmørsyre, isosmørsyre, α -keto-isovalerianesyre eller α -keto- β -metylvalerianesyre) kan tilsætningen ske ved hjælp af en vandig opløsning af salte deraf med ugiftige baser; i almindelighed foretrækkes ammoniumsalte og natriumsalte.

Når der bruges estere af ovennævnte lavere alkan-syrer og umættede fedtsyrer med lavere monohydroxyalkanoler som prækursorer, er disse estere i almindelighed afledet af metanol, ætanol eller propanol om end der også kan bruges estere med C₄₋₆alkanoler. I dette tilfælde må vedkommende C₄₋₆alkanol være en anden end den

der kan virke som prækursor for den anden faktor (isobutanol, 2-metylbutanol eller propanol), med mindre der ønskes samtidig forøgelse af den anden faktor.

Alkanol-prækursorer såsom isobutanol, 2-metylbutanol og n-propanol føres sædvanligvis som sådanne til gæringen. De kan imidlertid også tilføres som estere med syrer som er ugiftige for mikroorganismen. Disse syrer må være forskellige fra dem der kan virke som prækursorer for den anden A 40926-faktor med mindre der ønskes samtidig forøgelse også af den anden faktor. Som regel foretrækkes estere med ligekædede C_{2-4} alkansyrer såsom eddikesyre, propionsyre og smørsyre.

Den "selektivt effektive mængde" som skal sættes til mediet ifølge den foreliggende opfindelse afhænger af prækursor typen. Med esterne af de lavere alkansyrer (isosmørsyre, 2-metylsmørsyre) bruges der som regel mængder der giver en koncentration af syren i gæringsmediet mellem 0,1 g/l og 5 g/l, idet området mellem 0,1 g/l og 1 g/l foretrækkes. Med de lavtkogende alkanoler (isobutanol, 2-metylbutanol, n-propanol) eller deres estere med syrer som er ugiftige for mikroorganismen bruges som regel mængder der giver en koncentration af alkoholen mellem 0,5 g/l og 5 g/l, hvorved området mellem 1 g/l og 2 g/l foretrækkes.

Med aminosyrerne (valin, isoleucin) og ketosyrerne (α -keto-isovaleriansyre, α -keto- β -metylvaleriansyre) eller deres salte med baser ligger den selektivt effektive mængde, der sættes til gæringsmediet, som regel mellem 0,2 g/l og 5 g/l, fortrinsvis mellem 0,5 g/l og 4 g/l; det mest foretrukne område er mellem 2 og 4 g/l.

I tilfælde hvor de lavere alkansyrer (fx isosmørsyre eller 2-metylsmørsyre) eller salte deraf sættes direkte til gæringsmediet, ligger den selektivt effektive mængde i almindelighed mellem 0,1 g/l og 2,5 g/l, hvorved området mellem 0,3 g/l og 1,5 g/l foretrækkes.

Koncentrationer som er højere end de ovenfor angivne kan stadig være effektive til at forøge den relative procentandel af en af faktorerne af A 40926, men i almindelighed går totaludbyttet ned på grund af toksiske virkninger på kulturen.

Eksempel 1

En kultur af *Actinomadura* sp. ATCC 39727 på en agar-skråplade bruges til podning af en 500 ml stor Erlenmeyer-kolbe indeholdende 100 ml af følgende medium:

	Kødekstrakt	5	g
	Autolyseret gær	5	g
15	Pepton	5	g
	Hydrolyseret kasein	3	g
	Glukose	20	g
	NaCl	1,5	g
	CaCO ₃	4	
20	Destilleret vand indtil	1000	ml

Kolben inkuberes ved 28°C på en roterende ryster ved 200 opm i ca. 72 timer hvorpå myceliet opsamles ved centrifugering, vaskes to gange med sterilt deioniseret vand og suspenderes i 100 ml sterilt deioniseret vand. 2 ml af denne suspension bruges til podning af en 500 ml stor Erlenmeyer-kolbe indeholdende 100 ml af ovennævnte medium, hvorpå den valgte prækursor tilsættes. Antibiotikumproduktionen overvåges ved papirskive-agar-diffusionsmetoden under anvendelse af *Bacillus subtilis* på et minimalt medium som testorganisme.

Efter 72 timers dyrkning på en roterende ryster ved 200 opm fjernes gæringskagen ved filtrering og filtratet føres gennem en "Sephacrose"[®]-Epsilon-aminokaproyl-D-alanyl-D-alaninkolonne (0,5 ml harpiks/0,3 ml suppe) og elueres med 1% v/r (vægt/rumfang, dvs. forholdet mellem enheder af fast stof og væske som mellem gram og

ml) ammoniakvand. De fraktioner som indeholder antibiotikum A 40926 forenes og henstår én dag ved stuetemperatur, hvorpå de analyseres ved HPLC i henhold til følgende fremgangsmåde:

- 5 kolonne: silaniseret silicagel "Ultrasphere" ODS
(5 μ m) "Altex"[®] ("Beckman"[®])
4,6 mm (indvendig diameter) x 250 mm
- for-kolonne: silaniseret silicagel "Brownlee Labs"
10 RP 18 (5 μ m)
- elueringsmiddel A: CH₃CN 10% } reguleret
(2,5 g/l) NaH₂PO₄·H₂O 90% } til pH 6,0
- elueringsmiddel B: CH₃CN 70% } reguleret
(2,5 g/l) NaH₂PO₄·H₂O 30% } til pH 6,0
- 15 eluering: lineær gradient fra 5% til 60% eluerings-
middel B i elueringsmiddel A, i 40 minutter
- strømningshastighed: 1,8 ml/min.
- U.V.-detektor: 254 nm
- intern standard: Teicoplanin A₂ komponent 2,
20 R_t = 20,3 min. (Gruppo Lepetit S.p.A.)
- relative retentionstider: A 40926 faktor A 1,12
A 40926 faktor B₀ 1,22
A 40926 faktor B₁ 1,27
A 40926 faktor PA 1,15
25 A 40926 faktor PB 1,27

Procentvis fordeling

- 30 Komponenterne adskilles ved den ovenfor beskrevne fremgangsmåde og den relative fordeling findes som en procentdel af det samlede areal af de to toppe ved arealprocentmetoden. Resultaterne for repræsentative forsøg fremgår af nedenstående tabel.

	Tilsat præ- kursor, nM	Samlet koncen- tration, µg/ml	Faktor A	Faktor B ₀
			% Faktor A+Faktor B ₀	% Faktor A+Faktor B ₀
5	Ingen (-)	24-60	22-36	78-64
10	L-valin 8	24	5	95
	L-isoleucin 8	13	59	41
	Isobutanol 5	30-57	3-18	97-81
15	n-Propanol 5	34	51	48
	2-Metyl-1-butanol 5	34	47	53

20 Ved i det væsentlige at følge den ovenfor be-
skrevne fremgangsmåde, men ved hurtigt at neutralisere
de ammoniakalske eluater i stedet for at lade dem stå
i 24 timer, vindes antibiotikum A 40926 faktor PA og/
eller PB i stedet for henholdsvis faktor A og faktor
25 B₀.

De procentvise mængder og resultaterne er i det
væsentlige som angivet ovenfor med hensyn til faktorer-
ne A og B₀.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et antibiotikum A 40926-kompleks beriget med hensyn til dets faktorer A og/eller B₀, eller PA og/eller PB, k e n d e t e g n e t ved at man under dyrkning af en kultur af Actinomadura 5 sp. ATCC 39727 eller en mutant deraf med væsentligt samme egenskaber, fortrinsvis Actinomadura sp. ACTT 39727, i et gæringsmedie, sætter en selektivt effektiv mængde af en fornøden prækursor hvor den fornødne prækursor til forøgelse af en forholdsmæssig andel af 10 faktor A eller PA i antibiotikum A 40926-kompleks er udvalgt blandt n-propanol og estere deraf som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, propionsyre, salte deraf med baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf med lavere mono- el- 15 ler polyhydroxyalkanoler, isoleucin, fortrinsvis i L-formen, salte deraf med syrer og baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, α-keto-β-metylvarianesyre, salte deraf med baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf med lave- 20 re mono- og polyhydroxyalkanoler, 2-metylsmørsyre, salte deraf med baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf lavere mono- og polyhydroxyalkanoler, 2-metylbutanol og estere deraf med syrer som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, mens 25 den fornødne prækursor til forøgelse af andelen af faktor B₀ eller PB i antibiotikum A 40926-kompleks er udvalgt blandt valin, fortrinsvis i L-form, salte deraf med syrer og baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, α-keto-isovalerianesyre, salte deraf med 30 baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf med lavere mono- og polyhydroxyalkanoler, isosmørsyre, salte deraf med baser som er ugiftige for den producerende mikroorganisme, estere deraf med lavere mono- og polyhydroxyalkanoler og isobutanol

og estere deraf med syrer som er ugiftige for den producerende mikroorganisme.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved at den tilsatte prækursor er valin, fortrins-
5 vis i L-formen, eller et eller flere salte deraf med sy-
rer og/eller baser som er ugiftige for den producerende
mikroorganisme, hvorved den selektivt effektive mængde
er mellem 0,2 g/l og 5 g/l, fortrinsvis mellem 0,5 g/l
og 4 g/l.
- 10 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved at der som prækursor tilsættes isosmørsyre
eller et eller flere salte deraf med baser som er ugif-
tige for mikroorganismen, hvorved den selektivt effek-
tive mængde er mellem 0,1 g/l og 2,5 g/l, fortrinsvis
15 mellem 0,3 g/l og 1,5 g/l.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved at der som prækursor tilsættes en ester af
isosmørsyre med en lavere mono- eller polyhydroxyalka-
nol, hvorved den selektivt effektive mængde er mellem
20 0,1 g/l og 5 g/l, fortrinsvis mellem 0,1 g/l og 1 g/l.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved at der som prækursor tilsættes isobutanol
eller et eller flere estere deraf med syrer som er ugif-
tige for mikroorganismen, hvorved den selektivt effek-
25 tive mængde er mellem 0,5 g/l og 5 g/l, fortrinsvis mel-
lem 1 g/l og 2 g/l.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved at der som prækursor tilsættes isoleucin,
fortrinsvis i L-form, eller et eller flere salte deraf
30 med syrer, fortrinsvis hydroklorid eller sulfat og/eller baser som
er ugiftige for mikroorganismen, hvorved en selektivt effektiv mæng-
de er mellem 0,2 g/l og 5 g/l, fortrinsvis mellem 0,5 g/l og 4 g/l.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved at der som prækursor tilsættes 2-metylsmør-
35 syre eller et eller flere salte deraf med baser som er
ugiftige for mikroorganismen, hvorved den selektivt ef-
fektive mængde er mellem 0,1 g/l og 2,5 g/l, fortrins-

vis mellem 0,3 g/l og 1,5 g/l.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved at der som prækursor tilsættes en ester af
2-metylsmørsyre med en lavere mono- eller polyhydroxy-
5 alkanol, hvorved den selektivt effektive mængde er mel-
lem 0,1 g/l og 5 g/l, fortrinsvis mellem 0,1 g/l og 1
g/l.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved at der som prækursor tilsættes 2-metylbuta-
10 nol, n-propanol eller en eller flere estere deraf med
syrer som er ugiftige for mikroorganismen, hvorved den
selektivt effektive mængde er mellem 0,5 g/l og 5 g/l,
fortrinsvis mellem 1 g/l og 2 g/l.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
15 n e t ved at der som prækursor tilsættes α -keto- β -me-
tylvalerianesyre eller et eller flere salte deraf med ba-
ser som er ugiftige for mikroorganismen og/eller en el-
ler flere estere deraf med lavere mono- eller polyhydro-
xyalkanoler, hvorved den selektivt effektive mængde er
20 mellem 0,2 g/l og 5 g/l, fortrinsvis mellem 2 g/l og 4
g/l.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 1, 2, 3, 6, 7 eller 10,
k e n d e t e g n e t ved at salte med baser som er u-
giftige for mikroorganismen er natriumsalte eller am-
25 moniumsalte.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 1, 4, 8 eller 10, k e n-
d e t e g n e t ved at esteren er en ester med en af
følgende alkanoler: metanol, ætanol, propanol, ætylen-
glykol og glycerol.

30 13. Fremgangsmåde ifølge krav 1, 2 eller 6, k e n-
d e t e g n e t ved at saltet med en syre som er ugif-
tig for mikroorganismen er et hydroklorid eller et sul-
fat.

14. Fremgangsmåde ifølge krav 1, 5 eller 9, k e n-
35 d e t e g n e t ved at esteren med en syre som er u-
giftig for mikroorganismen er en ester med en af følgen-
de syrer: eddikesyre, propionsyre og smørsyre.

15. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved at gæringen udføres ved en temperatur mellem 25°C og 35°C , fortrinsvis mellem 27°C og 33°C .
- 5 16. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved at tilsætning af den eller de valgte prækursorer udføres i forkulturen, ved begyndelsen af gæringen eller 24-48 timer efter at gæringen er gået i gang.