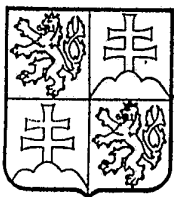


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 373

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 P 17/18

(21) PV 4580-88.C

(22) Přihlášeno 28 06 88

(40) Zveřejněno 12 07 90

(45) Vydáno 27 01 92

(75) Autor vynálezu

SAJDL PŘEMYSL RNDr. CSc.,
KŘEN VLADIMÍR ing.,
PAŽOUTOVÁ SYLVA RNDr. CSc.,
REZANKA TOMAŠ RNDr. CSc., PRAHA,
MALINKA ZDENĚK RNDr., OPAVA,
HARAZIM PAVEL ing., KOBERICE

(54)

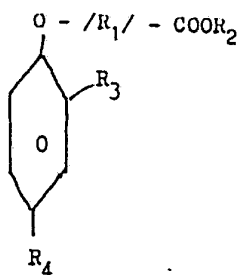
Způsob fermentační výroby námelových
alkaloidů s modifikací buněčných lipidů

(57) Řeší se fermentační výroba námelových alkaloidů při využití modifikace buněčných lipidů, vedoucí ke zvýšení biosyntézy námelových alkaloidů a změně jejich spektra. Hlavním účelem je podstatné zvýšení produkce námelových alkaloidů cca o 10 až 30 % s pozitivním vlivem na efektivitu fermentační výroby a následně i na extrakční, isolační a případné semisyntetické postupy, užívané k výrobě finálních léčebných substancí. Uvedeného účinku se dosáhne přidáváním mono- a dichlorfenoxysulfonových kyselin a/nebo jejich derivátů, způsobujících modifikaci buněčných lipidů, v množství 5 až 300 mg/l v produkční fázi fermentačního postupu. Účinné látky mohou být přidány na počátku nebo v průběhu kultivace a může být použita jedna specifická látka nebo kombinace více látek. Řešení může být využito ve fermentačním a farmaceutickém průmyslu.

Vynález se týká způsobu fermentační výroby námelových alkaloidů s modifikací buněčných lipidů u produkčních kmenů hub rodu *Claviceps*, užívaných k výrobě klavidových alkaloidů, kyseliny lysergové a paspalové, jednoduchých derivátů kyseliny lysergové a peptidických alkaloidů, kdy modifikace buněčných lipidů vede ke zvýšení jejich produkční schopnosti.

Dosud je popsána celá řada postupů fermentační přípravy námelových alkaloidů /H. Kobel a J.J. Sanglier, Ing: Biotechnology, Vol. 4, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1986, p. 569, čs. autorské osvědčení č. 199986, 202 613 a 224 532. Tyto postupy využívají vlastností produkčních kmenů, daných možnostmi vyjádření genetické informace pro biosyntézu námelových alkaloidů za konkrétních kultivačních podmínek, popřípadě tyto kultivační podmínky pro biosyntézu zvýhodňují, například prekurzoraci nebo indukci enzymů. Z toho vyplývá, že zvyšování produkce výše uvedenou optimalizací kultivačních podmínek je omezené. Další zvyšování produkce je potom závislé na šlechtění nových produkčních kmenů, které je u producentů námelových alkaloidů dosud stále založeno na nespecifické mutagenézi, rezultující v neřízené mutaci. Vzhledem k náhodnosti pozitivního mutačního zásahu a jeho nízké frekvenci je tento způsob dalšího zvyšování produkce velmi náročný z časového i materiálového hlediska.

Uvedené nevýhody způsobů zvyšování produkce odstraňuje způsob fermentační výroby námelových alkaloidů s modifikací buněčných lipidů, jehož podstatou je, že v produkční a/nebo inokulační fázi fermentačního procesu se na produkční kmen houby *Claviceps* působí mono- a/nebo dichlorfenoxyaalkonovými kyselinami a/nebo jejich deriváty obecného vzorce I.



kde R_1 je $-\text{CH}_2-$ nebo $-\text{CH}-$ nebo $-\text{C}-$ nebo $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

nebo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$

R_2 je $-\text{H}$ nebo $-\text{C}_2\text{H}_5$ nebo $-\text{NH}_2$

R_3 je $-\text{Cl}$ nebo $-\text{H}$ za předpokladu že R_4 je Cl a

R_4 je $-\text{Cl}$ nebo $-\text{H}$ za předpokladu, že R_3 je Cl , buď samostatnými, nebo ve směsi a to v koncentraci 5 až 300 mg/L živného média.

Účinná látka je do živného média přidána na počátku a/nebo v průběhu produkční a/nebo inokulační fáze fermentačního postupu.

V produkční fázi fermentačního procesu se na produkční organismus působí látkami, způsobujícími vzrůst podílu mono a dinenasycených mastných kyselin a/nebo snižujícími celkový obsah fosfolipidů a/nebo snižujícími podíl fosfatidylethanolaminu a/nebo snižujícími obsah membránové funkčních quasiplanárních demethylsterolů /D. Berg et. al., Mykosen 29, 221, 1986/ a/nebo snižujícími viskozitu cytoplasmatické membrány. Modifikace buněčných lipidů je dosahována přidávkou účinné látky v koncentraci 5 až 300 mg/l živného média v produkční fázi fermentačního postupu a účinná látka je přidána na za-

částku a/nebo v průběhu kultivace produkční fáze. Modifikace buněčných lipidů je dosahováno přidavkem jedné nebo více druhů účinných látek v libovolných poměrech při celkové koncentraci všech účinných látek 5 až 300 mg/l.

Cytochemické studie /Voříšek et al., In: Námelové alkaloidy a jejich deriváty, Academia, Praha, 1983, p.75/ lokalizovaly tvorbu námelových alkaloidů houbami rodu *Claviceps* do membrán endoplasmatického retikula, membrán homologních vakuol a lipoproteinové náplně vakuol. Například peptidické alkaloidy /ergopeptidy/ jsou deponovány v kapénkách lipidů /Neumann et. al., Biochem. Physiol. Pflanzen 174, 504, 1979/. Většina enzymů syntézy námelových alkaloidů u hub *Claviceps*, kromě tryptofan-dimethylallyltransferasy /Heinstein et. al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1244, 1971/ a DMAT-N-methyltransferasy /Otsuka et. al., Planta medica 40, 109, 1980/ je lokalizována na membránách převážně v endoplasmatickém retikulu. Jejich aktivita je většinou spojena s mikrosomální frakcí buněk. Aktivita těchto enzymů je ovlivněna konformačními interakcemi a kvalitou membrán, respektive jejich lipidickou skladbou. Podle teoretických předpokladů je tedy možno manipulaci metabolismu lipidů, respektive ovlivněním složení buněčných membrán žádoucím směrem, regulovat biosyntézu námelových alkaloidů ve smyslu zvýšení jejich produkce, popřípadě změny složení směsi produkovaných alkaloidů.

Dochází ke zvýšení produkce námelových alkaloidů, ke změně složení produkovaných alkaloidů, ke stabilizaci jejich produkce a modifikaci ve složení buněčných lipidů. K tomu je možno podle vynálezu použít například 4-chlorfenoxi kyseliny, 2,4-dichlorfenoxi kyseliny a jejich deriváty, například kyselinu DL-2-/4-chlorfenoxi/propionovou nebo 2,4-dichlorfenoxioctovou. Tyto látky jsou známy svými auxinovými účinky na rostliny. Například kyselina 2,4-dichlorfenoxioctová se používá jako herbicid a dále některé z těchto látek mají hypolipemické účinky na vyšší živočichy, například ethyl ester kyseliny 2-/4-chlorfenoxi/2-methyl propionové (Klofibrat). O působení těchto látek na mikroorganismy je známo relativně málo - p-chlorfenoxipropionát /0,1 - 2 mg/L/ zvyšuje výtěžky kyseliny glutamové o 30 % v kulturách *Lactobacillus arabinosus* a *Leuconostoc mesenteroides* a může substituovat biotin vyžadovaný kulturami k růstu /Kinoshita K. a spol.: Nippon Nogei Kagaku Kaishi 36, 760-763, 1962/. p-Chlorfenoxiacetát /0,2 mM/ zvyšuje produkci chlortetracyklinu u nízkoprodukčního kmene *Streptomyces aureofaciens* z 38 na 150 mg/L /Vaněk Z.: Folia Biol. 4, 100-106 (1958)/. Kyseliny se přidávají ve formě roztoků solí s výhodou sodných, které se sterilizují filtrací. Při tepelné sterilizaci se účinek látek poněkud snižuje, pravděpodobně hydrolýzou atomů chloru na aromatickém systému. Tuto nevýhodu lze odstranit zvýšením koncentrace látky nebo použitím dichlorderivátů, s výhodou např. 2-(2,4-dichlorfenoxi)propionátu. Sterilizaci je možno provést také rozpuštěním chlorfenoxi kyselin v 2 N NaOH, který je autosterilní. Potom se roztok z za sterilních podmínek neutralizuje konc. HCl na cca pH 8 a popřípadě zředí sterilní vodou. Tak je možno se vyhnout negativně působící sterilizaci teplem a náročné sterilizaci filtrací. Při kultivaci v a/nebo na médiích s obsahem látek modifikujících složení buněčných lipidů dochází ke vzrůstu podílů mono- a dinenasycených kyselin, především kyseliny olejové a linolové, klesá obsah kyseliny palmitové. Následně stoupne index nenасыcenosti mastných kyselin. Celkový obsah fosfolipidů (stanoveno metodou TLC-FID) se snižuje asi na 50 % kontroly, což souvisí s celkovým poklesem obsahu lipidů v myceliu. Silně klesá zastoupení fosfatidylethanolaminu a podstatně se zvyšuje index fosfatidylcholin fosfatidylethanolamin.

* Změna lipidického složení buněčných membrán při fermentaci námelových alkaloidů se následně projeví i na produkci námelových alkaloidů, a to jak na celkovém obsahu sumy alkaloidů jejím zvýšením, tak i na zastoupení jednotlivých alkaloidů (spektru) v celkové sumě. Optimální koncentrace lipidy modifikujících látek, které maximálně zvyšují produkci sumy alkaloidů jsou kmenově specifické a je třeba tuto koncentraci stanovit pro daný použitý produkční kmen a konkrétní kultivační podmínky.

Hlavní výhodou způsobu podle vynálezu je efektivní možnost podstatně zvýšit (až o 100 %) produkci námellových alkaloidů u používaných fermentačních technologií, kde jsou vyčerpány možnosti dalšího zvyšování produkce dosud známými způsoby. Další výhodou je možnost použití stávajících vyšlechtěných produkčních kmenů při eliminaci nutnosti velmi náročného dalšího šlechtění bez jistoty dosažení podobně zvýšené produkce. Další výhodou je možnost dosáhnout podstatného zvýšení produkce námellových alkaloidů bez jakýchkoli úprav technického výrobního zařízení. Další výhodou způsobu podle vynálezu je možnost podstatného zkrácení kultivačního procesu na dobu optimální z hlediska ekonomiky výroby námellových alkaloidů. Další výhodou, vyplývající ze zvýšeného množství námellových alkaloidů v konečném produktu fermentace, je intenzifikace extrakčních a isolačních procesů, která se projeví dalším snížením nákladů na výrobu konečného produktu. Další výhodou je možnost využití změn spektra alkaloidů k získání potřebného množství těch alkaloidů, které jsou stávajícími produkčními kmeny produkovány pouze v minoritním množství, popřípadě využití těchto změn k optimalizaci spektra alkaloidů z hlediska finálního produktu (produktů). Další výhodou je stabilizující vliv přídavku látek modifikujících buněčné lipidy na výtěžnost fermentace s nestandardním průběhem (například nízká životaschopnost nebo suboptimální množství inokula a podobně).

Způsob fermentační výroby námellových alkaloidů s modifikací buněčných lipidů je doložen následujícími příklady provedení, aniž by jimi byl předmět vynálezu jakkoli omezen.

Příklad 1

Produkční kmen *Claviceps purpurea* 59 (čs. autorské osvědčení č. 252 603) se naočkuje do inokulačního média obsahujícího v 1 litru 100 g sacharosy, 10 g asparaginu, 0,1 g L-cysteinu, 0,1 g kvasničného extraktu, 0,25 g KH_2PO_4 , 0,03 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, rozpuštěných ve vodě, o pH 5,5, rozplněného po 60 ml ve 300 ml Erlenmayerových bankách. Každá banka se naočkuje množstvím 5×10^7 konidií uvedeného kmene. Banky se inkubují 10 dnů při 26 °C na rotační třepačce (4 ot./s., excetr 55 mm). Roztok 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionátu sodného se připraví rozpuštěním volné kyseliny v ekvivalentním množství 2N NaOH a úpravou pH roztoku pomocí HCl na hodnotu 8,0. Tento roztok se vysterilizuje filtrací přes sterilní sintrový filtr S5 a přidá se v množství 20 mg účinné látky na 1 liter k produkčnímu médiu, obsahujícímu v 1 litru 100 g sacharosy, 16,8 g kyseliny citronové, 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 g KH_2PO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g KCl, 1,2 g CaCl_2 o pH 5,5. Takto připravené médium, rozplněné po 60 ml ve 300 ml Erlenmayerových bankách se zaočkuje 8 % obj. submersních inokula a kultivuje se za shodných podmínek jako inokulum po dobu 21 dnů. V produkčním médiu bez přídavku 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionátu sodného probíhá paralelní kultivace jako kontrola. Během kultivace se mění složení buněčných lipidů (stanovení podle V. Křen et al., FEMS Microbiol. Lett. 30, 359, 1985) a dochází k podstatnému zvýšení produkce klavinových alkaloidů a změně jejich spektra oproti kontrole. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Příklad 2

Produkční kmen *Claviceps purpurea* 59 se kultivuje postupem podle příkladu 1 s tím rozdílem, že do média se přidá DL 2-(4-chlorfenoxy)propionát sodný v koncentraci 100 mg/l. Výsledné změny ve složení buněčných lipidů a v produkci alkaloidů jsou uvedeny v tab. 2.

Příklad 3

Produkční kmen *Claviceps purpurea* EK 10 byl kultivován za podmínek shodných s příkladem 1 s tou výjimkou, že k produkčnímu médiu je 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionát sodný přidán do finální koncentrace 25 mg/l. Oproti kontrole došlo po 16 denní kultivaci ke zvýšení obsahu sumy alkaloidů ze 2 240 na 3 218 mg/l, po 20 denní kultivaci ke zvýšení

ze 3 218 na 3900 mg/l a ke změně poměru agroklavinu ku elymoklavinu z 19:81 na 30 : 68.

Příklad 4

Produkční kmen *Claviceps purpurea* EK 10 byl kultivován za podmínek shodných s příkladem 1 s tou výjimkou, že k produkčnímu médiu byl 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionát sodný přidán do finální koncentrace 100 mg/l. Oproti kontrole došlo po 16 denní kultivaci ke zvýšení obsahu sumy alkaloidů z 2 240 na 2 902 mg/l, po 20 denní kultivaci ke zvýšení ze 3 218 na 3 401 mg/l bez změny % zastoupení elymoklavinu.

Příklad 5

Inokulum produkčního kmene *Claviceps fusiformis* W 1 se připraví postupem podle příkladu 1. V produkční fázi se jako kontrola použije produkční médium, připravené podle příkladu 1, bez přídavku účinné látky, zainokulované 8 % obj. inokula. Další varianty představuje produkční médium podle příkladu 1 s přídavkem 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionátu sodného v množství 0,20, 50, 100, 150, 200 a 300 mg/l, zainokulované 3,2 % obj. inokula, jako simulace nestandardního průběhu kultivace s oslabeným inokulem. Výsledná produkce alkaloidů po 19 denní kultivaci je uvedena v tabulce 3.

Příklad 6

Produkční kmen *C. purpurea* 59 se kultivuje za podmínek shodných s příkladem 1. V produkční fázi se jako kontrola použije produkční médium bez přídavku účinných látek, modifikujících buněčné lipidy. Další varianty představuje produkční médium s přídavkem sodné soli 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny v koncentraci 10, 25 a 50 mg/l a s přídavkem sodné soli 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionové kyseliny v koncentraci 10, 25 a 50 mg/l. Výsledná produkce alkaloidů po 5, 11 a 20 denní kultivaci je uvedena v tabulce 4.

Příklad 7

Produkční kmen *Claviceps paspali* FA čs. autorské osvědčení č. 224 532 se kultivuje na povrchu ztuženého živného média, obsahujícího v 1 litru 10 g peptonu, 40 g glukosy, 26 g sladového extraktu, 20 g agaru, rozpuštěných ve vodě, po dobu 28 dnů při 24 °C. Narostlé mycelium se setře do 90 ml sterilního média shodného složení s výjimkou agaru, ve varné baňce 500 ml, a kultivuje se 4 dny při 24 °C na rotační třepačce /3,7 ot/s, excentr 70 mm/. Mycelium z baňky se za sterilních podmínek zbaví fermentační tekutiny odsátím na porcelánovém filtru s filtrační vložkou Schleicher Schuell č. 5393 a promyje se 100 ml destilované vody. Mycelium se suspenduje v 80 ml destilované vody a homogenizuje se přístrojem Ultra-Turrax po dobu 5 s. 6 % obj. této suspenze se naočkuje produkční médium, obsahující v 1 litru 30 g manitolu, 30 g kyseliny jantarové, 30 g propylen-glykolu, 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0,01 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, a 0,1 g $NaNO_3$, o hodnotě pH 5,2. Postupem dle příkladu 1 se připraví roztok sodné soli 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a přidá se k produkčnímu médiu do konečné koncentrace 45 mg/l. Produkční médium je rozplněno po 80 ml v 500 ml varných baňkách. Kultivace produkční fáze probíhá při 23 °C na rotační třepačce /4 ot./s, excentr 55 mm/ po dobu 16 dnů. V produkčním médiu bez přídavku 2,4-dichlorfenoxyoctanu sodného proběhla paralelní kultivace jako kontrola. Oproti kontrole došlo ke zvýšení obsahu isomerů hydroxyethylamidu kyseliny lysergové z 1 008 na 1 300 $mg \cdot l^{-1}$.

Příklad 8

Produkční kmen *Claviceps purpurea* ČCM F-725 /čs. autorské osvědčení č. 202 613, čs. autorské osvědčení č. 22 2391/ se kultivuje na povrchu ztuženého živného média o složení podle příkladu 1. Narostlé konidie se v množství $2 \cdot 10^8$ přenesou do 80 ml inokulačního média ve 300 ml Erlenmayerově baňce. Inokulační médium obsahuje v 1 litru 50 g sacharózy, 20 g kukuřičného extraktu a 1 g KH_2PO_4 , rozpuštěných ve vodě, hodnota pH 6,2. Naočkované baňky se inkubují 48 hodin při 24 °C na rotační třepačce /4 ot./s, excentr 55 mm/. Množstvím 0,5 % obj. tohoto submersního inokula se naočkuje produkční

Živné médium, obsahující v 1 l 300 g sacharozy, 4 g kvasničného extraktu, 10 g terc. citronanu amonného, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,44 g $\text{Ca}/\text{NO}_3/2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g KH_2PO_4 , 0,2 g L-iso-leucinu, 0,045 g 2-/2,4-dichlorfenoxu/propionátu sodného a 0,06 g 2,4-dichlorfenoxu-octanu sodného, rozpuštěných ve vodě, hodnota pH 6,2. Produkční médium bylo rozplněno po 40 ml do 200 ml Blackeových baněk. Kultivace probíhala stacionárně po dobu 21 dnů při 24 °C. V produkčním médiu bez přídavku lipidy modifikujících látek probíhala paralelní kultivace jako kontrola. Narostlé mycelium u kontroly obsahuje po ukončení kultivace sumu peptidických alkaloidů 0,86 % hmot., poměr ergokryptinů ku ergokorninu 2:1, poměr α - : β -ergokryptinu = 1:1. Při přídavku uvedených množství 2-/2,4-dichlorfenoxu/propionátu sodného a 2,4-dichlorfenoxu-octanu sodného obsahuje mycelium sumu peptidických alkaloidů 1,08 o hmot., poměr ergokryptinů/ergokornin = 2,7:1, poměr α : β -ergokryptinu = 1:3,5.

Tabulka 1 a 2

Vliv DL 2-(4-chlorfenoxu)propionátu na složení buněčných mastných kyselin a produkci námelových alkaloidů kmenem *Claviceps purpurea* 59

Varianta 1	Mastné kyseliny ^a				Index nenasycenosti mast. kys.	Anisotropie ^b membrán	Biomasa (g/l)
	(% celk.mast.kys.)						
	16:0	18:2	18:1	18:0			
Kontrola	26.3	35.8	28.0	9.7	1.006	0.200	22.7
Přídavek							
20 mg/l							
úč. látky	22.9	44.8	20.0	7.1	1.105	0.182	15.3

Varianta 2	alkaloidy ^c			
	celkové	A	E	C CA
	(mg/l)	-	-	(%)
Kontrola	3 728	18	24	24 33
Přídavek				
20 mg/l				
úč. látky	6 500	10	16	55 21

^a stanoveny jako methylestery z celkového zmydelnitelného podílu buněčných lipidů

^b měřeno pomocí fluorescenční sondy trimethylamonium 1,3,6-difenylohexatrien

^c A - agroklaavin, E - elymoklaavin, C - chanoklaavin-I, CA - chanoklaavin-I-aldehyd

Tabulka 3

Vliv 2-(4-chlorfenoxu)propionátu sodného na produkci alkaloidů v nestandardní (oslabené) kultivaci *C. fusiformis* W1 po 19 dnech

Varianta	Produkce alkaloidů (mg/l)
Kontrola	
s 8 % inokula	2 358
Kontrola s	
3.2 % inokula (oslabená)	1.685

Přídavek účinné látky
(mg/l) k oslabené kultuře

20	2 170
50	2 175
100	2 673
150	2 411
200	2 347
300	2 037

Tabulka 4

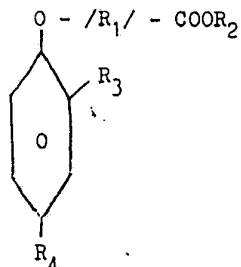
Vliv 2,4-dichlorfenoxyacetátu sodného (DCA) a 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionátu sodného (DCP) na produkci námelových alkaloidů kmenem C, purpurea 59.

Varianta produkce námelových alkaloidů (mg/l)

	5. den	11. den	20. den
Kontrola	728	2 654	7 030
Přídavek DCA			
10 mg/l	841	4 246	10 246
25 mg/l	813	4 506	9 797
50 mg/l	852	4 499	11 176
Přídavek DCP			
10 mg/l	865	4 010	9 601
25 mg/l	nestanoveno	3 946	9 715
50 mg/l	924	3 901	9 397

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob fermentační výroby námelových alkaloidů s modifikací buněčných lipidů, vyznačující se tím, že v produkční a/nebo inokulační fázi fermentačního procesu se na produkční kmen hub *Claviceps* působí mono- a/nebo dichlorfenoxyalkanovými kyselinami a/nebo jejich deriváty obecného vzorce I.



/I/

kde R_1 je $-\text{CH}_2-$ nebo $-\text{CH}-$ nebo $-\text{C}-$ nebo $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
 CH_3 CH_3

nebo $-\text{CH}_2/\text{CH}_2/\text{CH}_2-$

R_2 je $-\text{H}$ nebo $-\text{C}_2\text{H}_5$ nebo $-\text{NH}_2$

R_3 je -Cl nebo -H za předpokladu, že R_4 je Cl a

R_4 je -Cl nebo -H za předpokladu, že R_3 je Cl, buď samostatnými, nebo ve směsi a to v koncentraci 5 až 300 mg/l živného média.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že účinná látka a/nebo účinné látky jsou do živného média přidány na počátku a/nebo v průběhu produkční a/nebo inokulační fáze fermentačního postupu.