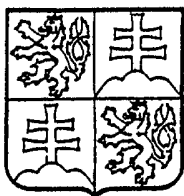


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00298-92

(13) A3

5(51) C 12 P 17/10

(22) 03.02.92

(32) 04.02.91

(31) 91/330

(33) CH

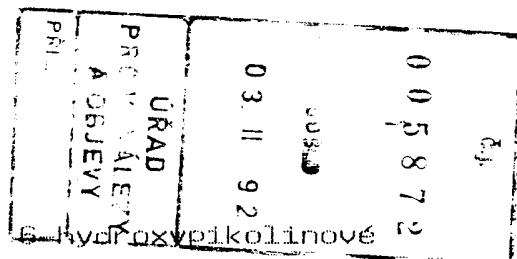
(40) 16.09.92

(71) LONZA A.G., Basel, CH

(72) Kiener Andreas dr., Visp, CH
Glöckler Rainer dipl. biol., Visperterminen, CH
Heinzmann Klaus, Visperterminen, CH

(54) Mikrobiologický způsob výroby kyseliny
6-hydroxypikolinové

(57) Mikrobiologický způsob výroby kyseliny
6-hydroxypikolinové z kyseliny pikolinové a/nebo
jejich solí. Volí se taková koncentrace kyseliny
pikolinové a/nebo jejich solí, aby se kyselina
6-hydroxypikolinová dále nemetabolizovala.
Způsob se provádí buď pomocí mikroorganismu
rodu Pseudomonas, Bacillus, Alcaligenes nebo
Rhodotorula nebo pomocí biomasy, která
zpracovává kyselinu pikolinovou a která roste s
kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem
uhlíku, dusíku a energie.



Mikrobiologický způsob výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové

Oblast techniky

Vynález se týká nového mikrobiologického způsobu výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové. Výchozí látkou je kyselina pikolinová a/nebo její soli.

Kyselina 6-hydroxypikolinová se například používá k výrobě 2-oxypyrimidinu (Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1912, 45, str. 2456-2467), který je zase důležitým meziproduktem pro výrobu léčiv.

Dosavadní stav techniky

Je známo několik způsobů výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové pomocí organických syntéz. Z kyseliny pikolinové lze například získat kyselinu 6-hydroxypikolinovou reakcí s hydroxidem draselným (Tetrahedron Letters, sv. 29, str. 4389-4392, 1988). Nevýhoda tohoto způsobu však spočívá v tom, že se kyselina 6-hydroxypikolinová získá v měřitelném výtěžku, který činí jen 51 %.

Je rovněž známo, že mikroorganismy rodu Bacillus hydroxylují kyselinu pikolinovou za vzniku kyseliny 6-hydroxypikolinové (O. Shukla a S.M.Kaul, Indian J. of Biochemistry and Biophysics, sv. 10, str. 176-178, 1973, O.Shukla a spol., Indian J. of Biochemistry and Biophysics, sv. 14, str. 292-295, 1977). Velká nevýhoda tohoto způsobu však spočívá v tom, že další metabolický proces kyseliny 6-hydroxypikolinové lze zamezit pouze pomocí inhibitoru arsenitanu sodného, čímž se rovněž brzdí růst mikroorganismů. Dalším nedostatkem je, že se netvoří pouze kyselina 6-hydroxypikolinová, ale směs kyseliny 3,6-dihydroxypikolinové a kyseliny 6-hydroxypikolinové.

R.L.Tate a J.C.Ensign, Can. J. Microbiol. sv. 20, str. 695-702, 1974 popsali hydroxylaci kyseliny pikolinové pomocí mikroorganismů rodu Arthrobacter. Nevýhoda tohoto způsobu spočívá v

tom, že mikroorganismy nemohou využívat kyselinu pikolinovou výlučně jako zdroj uhlíku, dusíku a energie. Při hydroxylaci musí být totiž přítomen extrakt kvasnic, což může vést k nežádoucímu znečištění produktu. Dalším nedostatkem je, že se kyselina 6-hydroxypikolinová tvoří jen při nízkém obsahu kyslíku, takže mikroorganismy nejsou v růstové fázi a tím se tvoří malé množství produktu.

Podstata vynálezu

Pojem kyselina pikolinová zahrnuje rovněž její soli, jako například její ve vodě rozpustné alkalické soli, amonné soli nebo také například směs kyseliny pikolinové a jejích ve vodě rozpustných alkalických solí.

Úloha předloženého vynálezu spočívá v odstranění jmenovaných nedostatků a v uskutečnění hospodárného mikrobiologického způsobu výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové, přičemž se získá produkt ve vysoké čistotě a ve vysokém výtěžku.

Úloha je řešena způsobem podle patentového nároku 1 a způsobem podle patentového nároku 7.

Podle vynálezu se provádí jedna varianta způsobu výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové tak, že se hydroxyluje kyselina pikolinová pomocí mikroorganismu rodu *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Aerococcus* nebo *Rhodotorula*, který roste s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie. Volí se taková koncentrace kyseliny pikolinové, aby kyselina 6-hydroxypikolinová nebyla dále metabolizována.

Jako mikroorganismy lze použít všechny shora uvedené rody, které rostou s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie. Tyto mikroorganismy lze izolovat metodami běžnými v oboru, například z čistících zařízení nebo z půdy.

Účelně se pro výrobu kyseliny 6-hydroxypikolinové používá mikroorganismus *Alcaligenes faecalis*, který byl 7.12.1990 uložen u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur GmbH, Mascherodeweg 1b, D-3300 Braunschweig, pod číslem 6269. Tento mikroorganismus nebyl dosud známý.

Vlastnosti kmene *Alcaligenes faecalis* DSM č. 6269:

buněčná forma	tyčinky	VP	-
šířka μm	0,5-0,8		
délka μm	1,2-2,0	ODC	-
pohyblivost	+	NO_2 z NO_3	-
mrskání	peritrich	denitrifikace	-
gram-reakce	-	fenylalanin-desamináza	-
lyze 3 % KOH	+		
aminopeptidáza (Cerný)	+	levan ze sacharózy	-
spóry	-	lecitináza	-
oxidáza	+	ureáza	-
kataláza	+	hydrolyza	
		škrobu	-
růst		želatiny	-
anaerobní	-	kaseinu	-
37/40 °C	+/-	DNA	-
pH 5,6	+	tweenu 80	-
Mac-Conkey-agar	+	esculinu	-
pigmenty	-	odbourání tyrosinu	-
nedifundující	-		
difundující	-	potřeba růstové látky	-
fluoreskující	-		
pyocyanin	-	využití substrátu	
		acetát	+
kyselina z (OF-test)		adipát	-
glukózy aerobně	-	kaprát	+
glukózy anaerobně	-	citrát	+
xylózy aerobně	-	glykolát	+
		L-laktát	+
plyn z glukózy	-	levulinát	-
		malát	+

kyselina z (ASS)		malonát	+
glukózy	-	fenylacetát	+
fruktózy	-	propionát	+
xylózy	-	suberát	-
		L-arabinóza	-
ONPG	-	fruktóza	-
		glukóza	-
ADH	-	mannóza	-
		maltóza	-
LDC	-	xylóza	-
		ribóza	-
VP	-	mannit	-
		glukonát	-
indol	-	2-ketoglukonát	-
		N-acetylglukosamin	-
		L-histidin	-
		L-methionin	+
		hydroxybutyrát	+

Pro provedení hydroxylace kyseliny pikolinové je žádoucí, aby kyselina 6-hydroxypikolinová nebyla dále metabolizována.

Z důvodu hospodárnosti musí být splněny následující parametry při hydroxylaci kyseliny pikolinové:

- a) Buňky by měly produkovat kyselinu 6-hydroxypikolinovou již během růstové fáze.
- b) Hydroxyláza kyseliny pikolinové má zůstat aktivní po skončení růstu.
- c) Odbourání kyseliny pikolinové by mělo být zbrzděno na stupni kyseliny 6-hydroxypikolinové.
- d) Produkt (kyselina 6-hydroxypikolinová) má být obohacen v růstovém mediu.

S překvapením se zjistilo, že jsou tyto parametry současně splněny tehdy, když se během růstu mikroorganismů nebo také po růstové fázi mikroorganismů přidá takové množství kyseliny pikolinové, aby se kyselina 6-hydroxypikolinová dále nemetabolizovala.

Jak již bylo uvedeno, roste kmen s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie. Napěstování toho-

to kmene lze uskutečnit kyselinou pikolinovou o koncentraci 0,05 až 0,2 % hmotnostní, přičemž je kyselina pikolinová zcela metabolizována.

Jestliže se zvýší koncentrace kyseliny pikolinové, pak se brzdí růst buněk. Při koncentraci kyseliny pikolinové nad 0,5 % hmotnostními nelze již pozorovat žádný růst. Avšak aktivita hydroxylázy kyseliny pikolinové zůstává v buňkách nezměněna.

Účelně se po napěstování mikroorganismů přidává kyselina pikolinová jako hmotnostně 10 %ní až nasycený roztok takovou rychlostí, že nepřesáhne koncentrace kyseliny pikolinové ve fermentoru 10 % hmotnostních. S výhodou nepřesáhne koncentrace kyseliny pikolinové ve fermentoru 1 % hmotnostní.

Účelně slouží roztok kyseliny pikolinové spolu s roztokem alkalického hydroxidu k regulaci hodnoty pH kultivačního media. Jako alkalický hydroxid lze například použít hydroxid sodný nebo hydroxid draselný. Jako kultivační medium se mohou použít v oboru běžně používaná media, výhodně se používá medium s minerálními solemi, jehož složení je uvedeno v tabulce 2.

Účelně je obsah kyslíku v kultivačním mediu během hydroxylace až do 90 % maximálního sycení, výhodně je obsah kyslíku v rozmezí od 0,1 do 50 % maximálního sycení.

Hydroxylace kyseliny pikolinové se uskutečňuje během růstové fáze nebo po ní.

Hodnota pH je účelně během růstové fáze nebo po ní mezi pH 4 a 10, výhodně mezi 5 a 9.

Hydroxylace se uskutečňuje účelně při teplotě od 10 do 60 °C, výhodně od 15 do 40 °C.

K dodatečnému zvýšení koncentrace produktu se podle výhodného provedení vynálezu přivádí alkalická sůl kyseliny pikolinové, přičemž je přívod alkalické soli kyseliny pikolinové řízen regulací parciálního tlaku kyslíku ve fermentoru.

Alkalická sůl kyseliny pikolinové se účelně přidává takovou rychlostí, aby koncentrace soli kyseliny pikolinové ve fermentoru nepřesáhla 10 % hmotnostních, výhodně aby nepřesáhla 1 % hmotnostní.

Druhá varianta způsobu výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové podle vynálezu se uskutečňuje tak, že se

a) aerobní biomasa zpracující kyselinu pikolinovou napěstuje s

kyselinou pikolinovou a minerální kyselinou v molárním poměru kyseliny pikolinové k minerální kyselině od 1 do 8, přičemž se tento poměr udržuje po celou růstovou fázi a pak se

b) provede hydroxylace kyseliny pikolinové touto biomasou.

Pod pojmem "napěstovat aerobní biomasu zpracující kyselinu pikolinovou" se rozumí následující: Jestliže se pěstuje biomasa například z kalů čistících zařízení jako inokulum s popsáním molárním poměrem kyseliny pikolinové a minerální kyseliny za anaerobních podmínek, získá se aerobní biomasa zpracující kyselinu pikolinovou, to znamená nesterilní biomasa, která roste s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie v přítomnosti kyslíku.

Molární poměr kyseliny pikolinové k minerální kyselině, to znamená přívod směsi sestávající z kyseliny pikolinové a minerální kyseliny k buněčné suspenzi se účelně reguluje buď měřením hodnoty pH a/nebo měřením poměru kyslíku ku kysličníku uhličitému v odpadním vzduchu.

Jako minerální kyselina se používá například kyselina sírová, kyselina chlorovodíková, kyselina dusičná nebo kyselina fosforečná, výhodně se používá kyselina sírová.

Účelně se uskuteční regulace, popřípadě přívod směsi během napěstování biomasy (stupeň a) tak, že se udržuje molární poměr kyseliny pikolinové ke kyselině sírové od 3 do 5. Znamená to, že se pro napěstování použije účelně na 1 mol kyseliny sírové 3 až 5 molů kyseliny pikolinové. Výhodně se pro napěstování použijí 4 až 5 molů kyseliny pikolinové na 1 mol kyseliny sírové.

Obvykle se napěstuje aerobní biomasa zpracující kyselinu pikolinovou v mediu, které obsahuje minerální soli, s výhodou v mediu obsahujícím minerální soli, jehož složení je uvedeno v tabulce 2.

Napěstování biomasy se účelně provádí při hodnotě pH od 5 do 9, výhodně od 6 do 8. Teplota je účelně během napěstování biomasy mezi 15 a 50 °C, výhodně mezi 25 a 40 °C. Obvykle se napěstování biomasy uskuteční v době od 0,5 až 3 dnů. Po napěstování se biomasa připravená pro vlastní biotransformaci (hydroxylaci) buď oddělí metodami obvyklými v oboru nebo se kyselina pikolinová, která má být hydroxylována, přidá přímo do napěstované biomasy. Vlastní hydroxylace kyseliny pikolinové (substrát) se

pak uskuteční za stejných podmínek, které již byly popsány v první variantě. Účelně je během hydroxylace optická hustota biomasy při 650 nm (OD_{650}) mezi 0,5 a 100, výhodně mezi 1 a 50. Vhodná teplota je při této variantě mezi 15 a 50 °C, výhodně mezi 25 a 40 °C. Vhodná hodnota pH je mezi 5 a 9, výhodně mezi 6 a 8.

Po oddělení buněk z kultivačního media, například centrifugací nebo mikrofiltrací, se čirý roztok okyselí, přičemž se vysráží kyselina 6-hydroxypikolinová. Aby se dosáhlo optimální krystalizace, roztok se výhodně okyseluje při 60 °C. Čirý roztok lze však použít pro další reakce i bez zpracování.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace *Alcaligena faecalis* (DSM 6269)

Mikroorganismy aerobně metabolizující kyselinu pikolinovou se obohacují v A+N mediu (tabulka 1) s přídatkem 0,1 % (hmotnost/objem) kyseliny pikolinové jako jediným zdrojem uhlíku a energie. Obecné metody pro izolaci mikroorganismů jsou popsány například v "G.Drews, Mikrobiologisches Praktikum, 4. vydání, nakladatelství Springer, 1983, str. 1-84". Jako inokulum se používají vzorky půdy nebo vzorky z čisticích zařízení. Obohacené vzorky se kultivují v třepacích baňkách při 30 °C. Po trojnásobném přeočkování do čerstvého media se obohacené vzorky rozetřou na stejné medium s přídatkem 16 g agaru na litr a inkubují se při 30 °C. Po několikanásobném rozetření na agarové medium se mohou izolovat čisté kultury.

Příklad 2

Hydroxylace v růstové fázi

Alcaligenes faecalis (DSM 6269) se kultivuje aerobně v mediu obsahujícím minerální soli (tabulka 2) s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie při pH 7 a při teplotě 30 °C. K napěstování slouží 20ti litrový fermentor s pracovním objemem ca 15 l. Pro regulaci pH se přidává 4,06

mol/l (50 % hmotnost/objem, ca. 2 l) roztoku kyseliny pikolinové a 3 mol/l (12 % hmotnost/objem, méně než 20 ml) roztoku hydroxidu sodného v průběhu 27 hodin. Potom se prokázalo ve fermentačním roztoku 0,14 mol/l (2 % hmotnost/objem) kyseliny 6-hydroxypikolinové a 16 mmol/l (0,18 % hmotnost/objem) kyseliny pikolinové. K tomuto časovému bodu tvoří obsah kyslíku 1 % syčení při prosycení vzduchem 30 l/min a při rychlosti míchání 750 otáček/min.

Hydroxylace po růstové fázi

Po růstové fázi se přidávákuje do fermentoru 2,7 mol/l (47 % hmotnost/objem, ca 2,5 l) roztoku pikolinátu sodného (pH 7) v průběhu 15 hodin. Rychlost dávkování roztoku pikolinátu sodného je řízena regulací parciálního tlaku kyslíku fermentoru tak, aby obsah kyslíku nepřekročil 20 % nasycení, přičemž koncentrace pikolinátu je ca. 20 mmol/l (0,22 % hmotnost/objem). Při koncentraci 0,7 mol/l (9,8 % hmotnost/objem) kyseliny 6-hydroxypikolinové a celkové době fermentace 42 hodin se přidávání přerušuje. Pro celou náplň se dohromady použije 17,8 mol (2190 g) kyseliny pikolinové ve formě volné kyseliny a sodné soli. Z kyseliny pikolinové, popřípadě její sodné soli se po okyselení bezbuněčného roztoku izoluje 13,3 mol (1850 g) kyseliny 6-hydroxypikolinové v krystalické formě. To odpovídá výtěžku 74 %, vztaženo na vnesenou kyselinu pikolinovou. Z výsledků HPLC-analýzy vyplývá 95 % ní čistota kyseliny 6-hydroxypikolinové. V čirém filtrátu je možné prokázat 0,13 mol (18,5 g) kyseliny 6-hydroxypikolinové, což odpovídá 0,75 % vnesené kyseliny pikolinové a 0,3 mol (37 g) kyseliny pikolinové, což odpovídá 1,7 % vnesené kyseliny pikolinové.

Příklad 3

Výroba kyseliny 6-hydroxypikolinové (nesterilní biomasou)

a) Napěstování

Fermentace se provádí v nesterilním mediu obsahujícím minerální soli (tabulka 2), ve fermentoru s pracovním objemem 5 l při pH 7,0, při teplotě 30 °C a při provzdušnění 0,5 - 5,0 l/min. Pro regulaci pH se k mediu přidá směs 307 g kyseliny pikolinové

(2,5 mol) a 49 g (0,5 mol) kyseliny sírové a 1 l vody. Fermentor se naočkuje 200 ml kalu z čistícího zařízení odpadních vod, Zermatt, Švýcarsko. Po 48 hodinách se fermentor vyprázdní až na půl litru a naplní se čerstvým nesterilním médiem. Po 24 hodinách se tento postup zopakuje.

b) Hydroxylace v růstové fázi

Když poslední náplň v postupu a) dosáhne hodnotu OD_{650nm} 1, zahájí se hydroxylace. Regulace pH se od této chvíle uskuteční odpovídajícím přidáním 50 % (hmotnost/objem) roztoku kyseliny pikolinové. Dodatečně se do fermentoru přidá 59 % (hmotnost/objem) roztok pikolinátu sodného s průměrnou rychlostí dávkování 7,3 ml/h po dobu 68 hodin. Na konci hydroxylační fáze se kyselina pikolinová nedá spektrofotometricky prokázat. Konečná koncentrace kyseliny 6-hydroxypikolinové je 51 g/l (analyticky stanovená).

Tabulka 1: A+N medium

<u>Složení:</u>	<u>Koncentrace(mg/l)</u>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2000
Na_2HPO_4	2000
KH_2PO_2	1000
NaCl	3000
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14.5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.8
pyridoxalhydrochlorid	$10 \cdot 10^{-3}$
riboflavin	$5 \cdot 10^{-3}$
amid kyseliny nikotinové	$5 \cdot 10^{-3}$
thiaminhydrochlorid	$2 \cdot 10^{-3}$
biotin	$2 \cdot 10^{-3}$
kyselina pantotenová	$5 \cdot 10^{-3}$
p-aminobenzoát	$5 \cdot 10^{-3}$
kyselina listová	$2 \cdot 10^{-3}$
vitamín B12	$5 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$100 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$90 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$300 \cdot 10^{-3}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$200 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$10 \cdot 10^{-3}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$20 \cdot 10^{-3}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$30 \cdot 10^{-3}$
$\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$5 \cdot 10^{-3}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2 \cdot 10^{-3}$

(pH roztoku se po přidání kyseliny pikolinové upraví na hodnotu 7,0)

Tabulka 2

Složení media obsahující minerální soli:

- kyselina pikolinová	2	g/l
- $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,8	g/l
- $CaCl_2$	0,16	g/l
- Na_2SO_4	0,25	g/l
- KH_2SO_4	0,4	g/l
- Na_2HPO_4	0,9	g/l
- stopové prvky	1	ml/l

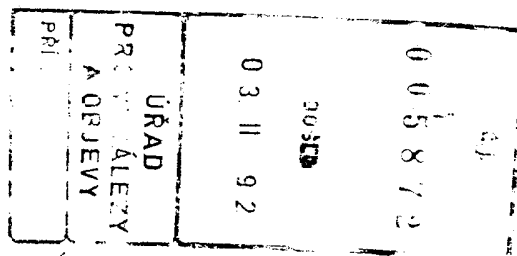
Složení roztoku stopových prvků:

- kyselina pikolinová	200	g/l
- NaOH	65	g/l
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	9	g/l
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	4	g/l
- H_3BO_3	2,7	g/l
- $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,8	g/l
- $CuCl_2 \cdot 2H_2O$	1,5	g/l
- $NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0,18	g/l
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,2	g/l
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	30	g/l

(pH roztoku se upraví na hodnotu 7,0)

Průmyslová využitelnost

Kyselina 6-hydroxypikolinová se například používá k výrobě 2-oxypyrimidinu. 2-oxypyrimidin je zase důležitým meziproduktem pro výrobu léčiv.



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Mikrobiologický způsob výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se hydroxyluje kyselina pikolinová a/nebo její soli pomocí mikroorganismu rodu Pseudomonas, Bacillus, Alcaligenes, Aerococcus nebo Rhodotorula, který roste s kyselinou pikolinovou jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku nebo energie, přičemž se koncentrace kyseliny pikolinové a/nebo jejích solí zvolí tak, aby se kyselina 6-hydroxypikolinová dále nemetabolizovala.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se hydroxylace provádí s mikroorganismem Alcaligenes faecalis, který je uložen u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur pod číslem 6269, nebo s jeho descendenty a mutanty.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se volí koncentrace kyseliny pikolinové a/nebo jejích solí tak, aby nepřesáhla 10 % hmotnostních.
4. Způsob podle nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se hydroxylace provádí při teplotě od 10 do 60°C a při hodnotě pH od 4 do 10.
5. Mikroorganismus Alcaligenes faecalis uložený u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur s číslem 6269 a jeho descendenty a mutanty.
6. Mikrobiologický způsob výroby kyseliny 6-hydroxypikolinové, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se a) biomasa zpracovávající kyselinu pikolinovou a/nebo její rozpustné soli napěstuje s kyselinou pikolinovou a/nebo s jejími rozpustnými solemi a minerální kyselinou v molárním

poměru kyseliny pikolinové a/nebo jejích rozpustných solí k minerální kyselině od 1 do 8, přičemž se po celou fázi napěstování udržuje tento poměr, a pak se

b) provede hydroxylace kyseliny pikolinové a/nebo jejích rozpustných solí touto biomasou.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se ve stupni a) upravuje molární poměr kyseliny pikolinové a/nebo jejích rozpustných solí k minerální kyselině přes měření poměru kyslíku k oxidu uhličitému v odpadním plynu a/nebo přes měření hodnoty pH.
8. Způsob podle jednoho z nároků 6 a 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se ve stupni a) použije jako minerální kyselina kyselina sírová v molárním poměru kyseliny pikolinové a/nebo jejích rozpustných solí ke kyselině sírové od 3 do 5.
9. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 6 až 8, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že se napěstování ve stupni a) a hydroxylace ve stupni b) provádí při teplotě od 15 °C do 50 °C a při hodnotě pH od 5 do 9.

