



## SUOMI-FINLAND

(FI)

### Patentti- ja rekisterihallitus Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU  
UTLAGGNINGSSKRIFT

87234

C (13) Patenti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen 10 1000

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

C 12P 21/04, 1/06, C 12N 1/38

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	861834
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	30.04.86
(24) Alkupäivä - Löpdag	30.04.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	22.11.86
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.08.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	

21.05.85 GB 8512795 P

(71) Hakija - Sökande

1. Gruppo Lepetit S.p.A., Via Roberto Lepetit, 8, 20124 Milano, Italia, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Assi, Francesco, 34, Via Corridoni, 20063 Cernusco Sul Naviglio (MI), Italia, (IT)  
2. Lancini, Giancarlo, 4, Via Vittadini, 27100 Pavia, Italia, (IT)  
3. Gianantonio, Anacleto, 1, Via Barzilai, 20146 Milano, Italia, (IT)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä, joka selektiivisesti lisää teikoplaniini A<sub>2</sub>:n kompleksin yksittäisten  
pääkomponenttien suhteellista osuutta  
Metod, vilken selektivt ökar den proportionella andelen av enstaka huvudkomponenter av  
teikoplanin A<sub>2</sub> komplex**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 137506 (C 07G 11/00), GB A 2121401 (C 07G 11/00), US A 4239751 (A 61K 35/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä, joka selektiivisesti lisää yksittäisten T-A<sub>2</sub>-pääkomponenttien suhteellista osuutta T-A<sub>2</sub>-kompleksissa. Erityisesti tämän keksinnön kohteena on menetelmä, jolla saadaan teikoplaniini A<sub>2</sub> selektiivisesti rikastettua minkä tahansa pääkomponenttinsa T-A<sub>2</sub>-1, T-A<sub>2</sub>-2, T-A<sub>2</sub>-3, T-A<sub>2</sub>-4 ja T-A<sub>2</sub>-5 suhteen ja jossa menetelmässä lisätään kannan Actinoplanes teichomyceticus nov.sp. ATCC 31121 tai sen mutantin, joka tuottaa T-A<sub>2</sub>-kompleksia saman metaboli- sen kaavion mukaisesti, viljelyalustaan selektiivisesti tehokas määrä sopivaa prekursoria.

Denna uppfinning avser en metod, vilken selektivt ökar proportionen av enstaka T-A<sub>2</sub>-huvudkomponenter i teikoplanin T-A<sub>2</sub>-komplex. Särskilt avser denna uppfinning en process för erhållande av teikoplanin A<sub>2</sub> selektivt anrikad i vilken som helst av dess huvudkomponenter T-A<sub>2</sub>-1, T-A<sub>2</sub>-2, T-A<sub>2</sub>-3, T-A<sub>2</sub>-4 och T-A<sub>2</sub>-5 och i vilken process i odlingsmediet av Actinoplanes teichomyceticus nov.sp. ATCC 31121 eller en mutant därav, vilken producerar T-A<sub>2</sub>-komplex genom samma metabolska schema, tillsättes en selektivt effektiv mängd av en lämplig prekursor.

MENETELMÄ, JOKA SELEKTIIVISESTI LISÄÄ TEIKOPLANIINI  $A_2$ :n  
KOMPLEKSIN YKSITTÄISTEN PÄÄKOMPONENTTIEN SUHTEELLISTA  
OSUUTTA

5 Teikoplaniini (aikaisemmin nimetty teikomysiini) on glyko-  
peptidinen antibiootti, jota tuotetaan viljelemällä kantaa  
Actinoplanes teichomyceticus nov.sp. ATCC 31121. Tämä anti-  
biootti on aktiivinen pääasiassa gram-positiivisten baktee-  
reiden aiheuttamia infektioita vastaan.

10 Menetelmän mukaan, joka on kuvattu US-patentissa 4,239,751,  
teikoplaniini eristetään tuottavan kannan käymisliemistä  
kompleksina, joka sisältää kolme tekijää, nimeltään  $A_1$ ,  $A_2$   
ja  $A_3$ . Tekijää  $A_2$  on vallitsevassa määrin edellä mainitun  
kannan käymisliemistä saadussa antibioottikompleksissa ja  
se on kaikkein tärkein biologisilta vaikutuksiltaan. Teki-  
15 jää  $A_1$  ja tekijää  $A_3$  on ainoastaan vähäisissä määrin.

US-patentin 4,239,751 mukaan teikoplaniini  $A_2$  (T-A2) eris-  
tetään teikoplaniini-kompleksin muista tekijöistä pylväs-  
kromatografisesti, käyttäen Sephadex<sup>(R)</sup> LH-20:tä, joka on  
ristiinkytketyn polydekstraanigeelin hydroksipropyyljoh-  
20 dannainen, jonka eksklusioraja on molekyyllipaino noin  
4000.

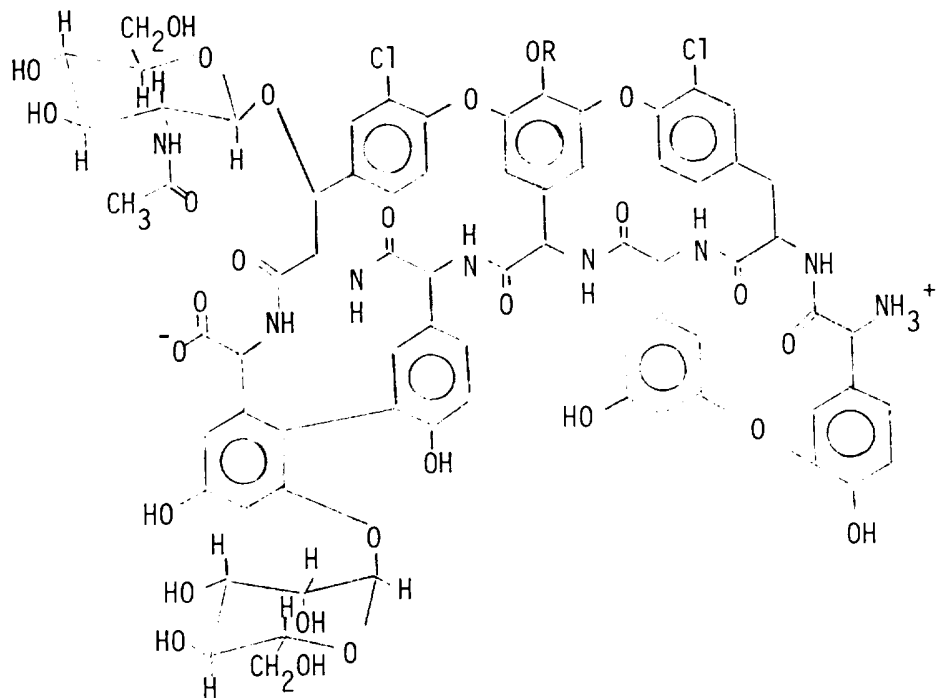
Laajemmassa mittakaavassa suoritetuista valmistus- ja puh-  
distusmenetelmistä (esimerkiksi näitä menetelmiä on esitet-  
ty EPO-patenttijulkaisussa No 0122969) saadaan tavallisesti  
25 teikomysiinituote pääasiallisesti muodostuneena teikopla-  
niini  $A_2$ :sta, johon on liittynenä pieni määrä teikoplani-  
ni  $A_3$ :a. Tämä tuote on sopiva käytettäväksi terapeuttisis-  
sa sovellutuksissa. Katso: Drugs of the Future; Vol. 9,  
No 6, 1984, sivut 429-430, toimittaja J.R. Prous Publishers,  
30 Barcelona, Espanja.

Artikkelissa, jonka ovat julkaisseet A. Borghi, C. Coronelli  
et al. julkaisussa Journal of Antibiotics, Vol. 37., No 6,

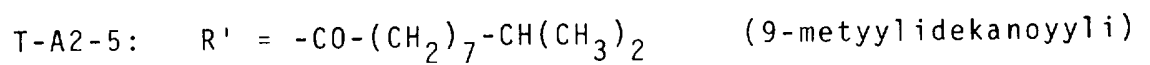
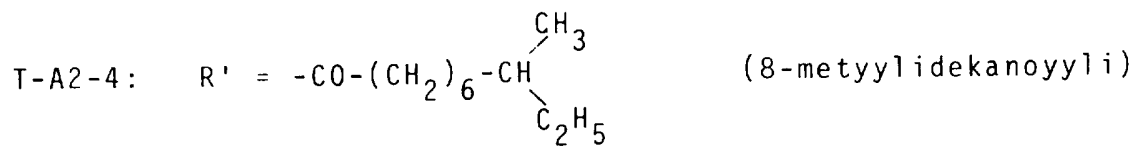
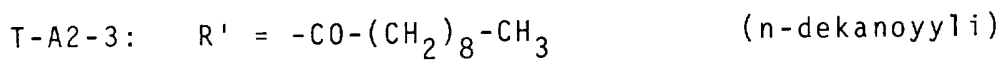
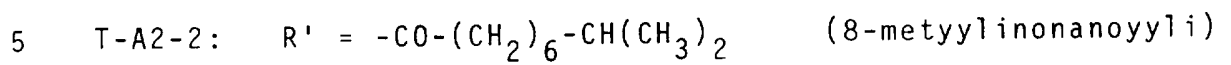
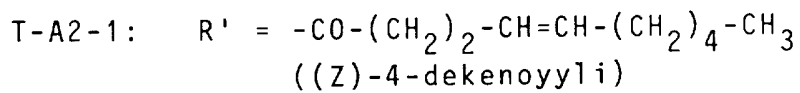
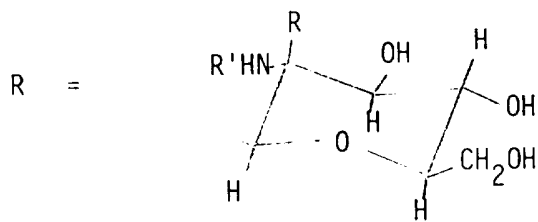
sivut 615-620, 10.06.1984, osoitetaan, että teikoplaniinin tekijä A<sub>2</sub> (T-A2) on puolestaan viiden läheistä sukua olevan pääkomponentin, joilla on hyvin samanlainen polaarisuus, seos.

5 Nämä komponentit, joita merkitään T-A2-1, T-A2-2, T-A2-3, T-A2-4 ja T-A2-5, eristetään käyttäen ensimmäisessä vaiheessa käänteisfaasi-jakaantumiskromatografiaa normaali paineessa silanoidussa piihappogeelipylväässä. Komponenttien T-A2-3, T-A2-4 ja T-A2-5 puhdistaminen vaatii seuraavaan vaiheeseen, jossa käytetään puolipreparatiivista HPLC:tä  
10 Whatman Partisil<sup>®</sup> ODS M-9-pylväässä, joka eluoidaan 0,2-prosenttisellä vesipitoisella ammoniumformiaatti-asetonitriili-seoksella (76:24). Kaikki mainitut komponentit ovat kemiallisesti ja biologisesti karakterisoituja. Katso  
15 myös GB-patenttihakemusjulkaisu No 2,121,401.

Rakenteelliset tutkimukset, joita ovat esittäneet J.C. Barna, D.M. Williams et al. julkaisussa J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 4895-4902, osoittavat, että teikoplaniini A<sub>2</sub>:n  
20 pääkomponentit voidaan esittää seuraavalla rakennekavalla:



jossa:



In vitro- ja in vivo-testit, jotka on esitetty edellä mainitussa GB-patenttihakemusjulkaisussa No 2,121,401, osoittavat, että jokainen komponenteista T-A2-2, T-A2-3, T-A2-4 ja T-A2-5 on aktiivisempi kuin teikoplaniini A<sub>2</sub>-kompleksi kokonaisena.

Sen tähden on ilmeistä, että menetelmä, joka selektiivisesti lisää teikoplaniini A<sub>2</sub>:n jokaisen pääkomponentin tuotantoa, on ensisijaisena kohteena teikoplaniinin teollisessa tuottamisessa. Se voisi tarjota merkittävän teknisen edun koskien sekä yksittäisten T-A2-pääkomponenttien eristämistä puhtaaksi muodoksi että mahdollisuutta saada T-A2-kompleksissa rikastumaan aktiivisimmat komponentit. Lisäksi mahdollisuus muuttaa yksittäisten T-A2-pääkomponenttien suhdetta T-A2-kompleksissa suuressa teollisessa mittakaavassa tapahtuvassa käymisessä, tarjoaa käyttökelpoisen keinon säilyttää vakiona käymistuotteen koostumus, jonka tulee pysyä standardiohjeissa. Toisin sanoen, kun mistä tahansa syystä (esim. johtuen teollisesta viljelyalustan modifikaatiosta, jossa käytetään vähemmän kalliita aineita) yksittäisten komponenttien prosentuaalinen koostumus pyrkii eroamaan standardikoostumuksesta, mahdollisuus selektiivisesti lisätä jokaista T-A2-pääkomponenttia, merkitsee käyttökelpoista keinoa tällaisen puutteen korjaamiseksi.

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä, joka selektiivisesti lisää yksittäisten T-A2-pääkomponenttien suhdetta T-A2-kompleksissa. Vielä tarkemmin, tämän keksinnön kohteena on menetelmä, jolla saadaan teikoplaniini A<sub>2</sub> selektiivisesti rikastumaan missä tahansa pääkomponenttissaan T-A2-1, T-A2-2, T-A2-3, T-A2-4 ja T-A2-5, jossa menetelmässä Actinoplanes teichomyceticus nov.sp. ATCC 31121-kannan tai sen mutantin, joka tuottaa T-A2-kompleksia saman metabolisen kaavion mukaisesti, viljelyalustaan lisätään selektiivisesti tehokas määrä T-A2:n glukoosiamiiniosaan liittyneen, karakterisen asyyliiryhmän sopivaa prekursoria (katso edellä merkityksiä, jotka on annettu lähteelle R'), jäljempänä: "T-A2:n glukoo-

siamiiniosan kunkin asyyliryhmän sopiva prekursori".

Tämän keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että:

- 5 a) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-1:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa, on linolihappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat ja sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa;
- 10 b) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-2:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa, on valiini, sen hapon ja emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, alfa-keto-isovaleriaanahappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa, isovoihappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat,
- 15 lat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa, isobutanoli ja sen happojen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat;
- 20 c) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-3:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa, on öljyhappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa;
- 25 d) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-4:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa, on isoleusiini, sen happojen ja emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, alfa-keto-beta-metyylivaleriaanahappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa, 2-
- 30 -metyylivoihappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa, 2-metyylibutanoli ja sen happojen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät esterit;

e) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-5:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa, on leusiini, sen happojen ja emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, isovaleriaanahappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa, alfa-keto-isokapronihappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa, isoamyylialkoholi ja sen happojen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät esterit.

Suolat emästen kanssa, jotka ovat myrkyttömiä mikro-organismille, ovat suoloja, joissa annetun kationin tyyppi ja konsentraatio on sellainen, että se ei heikennä mikro-organismiviljelmän kasvua tai toivotun antibiootin tuotantoa huomattavassa määrin. Esimerkkejä mainituista kationeista ovat natrium, kalium, ammonium ja vastaavat.

Esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa ovat estereitä ( $C_1-C_6$ )alkanolien kanssa, joissa on 1, 2, 3, 4, 5 tai 6 hydroksifunktiota per molekyyli.

Käytettäessä ( $C_4-C_6$ )alkanoleja, niiden täytyy olla erilaisia kuin ne, jotka toimivat muiden T-A2-pääkomponenttien prekursoreina (esim. isobutanoli, isoamyylialkoholi ja 2-metyylibutanoli) jollei toivota yhden tai useamman mainitun komponentin samanaikaisesti lisääntyvän.

Edullisia esimerkkejä polyhydroksi-alkanoleista ovat glyseroli ja propyleeniglykoli.

Kun alempialkanolia on läsnä erilaisissa enantiomeerisissa ja epimeerisissä muodoissa, tässä esitetyssä selityksessä ja vaatimuksissa, tarkoitetaan sekä yksittäistä muotoa erikseen että yksittäisten muotojen seosta missä tahansa suhteessa.

Esterit, jotka ovat myrkyttömiä mikro-organismille, ovat

(C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>)alkanoyyliesterit, joissa alkanoyyliosan tyyppi ja konsentraatio käymisalustassa on sellainen, että se ei heikennä mikro-organismiviljelmän kasvua tai toivotun antibiootin tuotantoa huomattavassa määrin. Yleensä suoraketjuiset (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)alkanolit ovat edullisia.

Tämän keksinnön mukainen menetelmä käsittää edellä mainitun kannan viljelyn vesipitoisessa ravintoalustassa, joka sisältää assimiloituvan hiililähteen, assimiloituvan typpi-  
lähteen ja epäorgaanisia suoloja, tavanomaisissa olosuh-  
teissa, jotka on esitetty tunnetussa tekniikassa teiko-  
planiinin tuottamiseksi, sillä parannuksella, että selek-  
tiivisesti tehokas määrä sopivaa prekursoria lisätään käy-  
misalustaan ennen kannan ympäämistä tai käymisprosessin  
kuluessa, jolloin selektiivisesti lisääntyy yhden tai useam-  
man teikoplaniini A<sub>2</sub>-komponettien T-A2-1, T-A2-2, T-A2-3,  
T-A2-4 ja T-A2-5 tuotanto.

Maininta "sen mutantti, joka tuottaa T-A2-kompleksia saman metabolisen kaavion mukaisesti" tarkoittaa niitä luonnollisia tai keinoteikoisia Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121 (peruskanta) -kannan mutanteja, jotka tuottavat T-A2-kompleksia käyttämällä olennaisesti samoja entsymaattisia systeemejä kuin peruskanta, tuoden T-A2-kompleksiin R' rasva-asyyliosan.

Tässä selityksessä ja vaatimuksissa sanonnalla "selektiivisesti tehokas määrä" tarkoitetaan selektiivisen prekursorin määrää, joka lisättäessä viljelyalustaan muodostaa selektiivisen prekursorin konsentraation, joka on riittävä aikaansaamaan T-A2-kompleksin spesifisen komponentin selektiivisen lisääntymisen, aiheuttamatta myrkyllisiä vaikutuksia mikro-organismiin.

Ravintoviljelyalusta, joka on sopiva T-A2:ta tuottavan kannan käymiseen ja jota voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisessa suoritusmuodossa, sisältää tavallisesti: sopivan hiililähteen, joka voi olla esimerkiksi sokeri (esim. glukoo-

si, sakkaroosi, maltoosi), polysakkaridi (esim. tärkkelys, dekstraani), polyalkoholi (esim. glyseroli, propyleeniglykoli); sopivan tyypilähteen, joka voi olla esimerkiksi ammoniumsuo-la, asparagiini, maapähkinäjauho, soijapapujauho, 5 lihauute, tryptoni, peptoni, hiiva-hydrolysaatti, hiiva-uute ja maissineste (corn step liquor); happamia mineraalisuoloja, kuten natriumkloridia, kalsiumkarbonaattia, magnesiumsulfaattia.

Käymisen suorittamiseksi käytetään vaihtelevia aikoja 50 - 10 200 tuntia, aerobisia olosuhteita, lämpötila on 25°C - 35°C, mieluummin 27°C - 33°C. Sopivien prekursorien selektiivisesti tehokkaan määrän lisääminen voidaan tehdä käymisalustaan ennen kuin ympätään tuottavalla kannalla, kuitenkin se mieluummin tehdään 24 - 48 tuntia sen jälkeen, 15 kun käyminen on aloitettu. Lisäys voidaan tehdä yhdellä kertaa tai useissa annoksissa tai jatkuvasti.

Tämän keksinnön mukaisen tyypillisen suoritusmuodon mukaan kaurajauhoagarivinopinnoilla oleva Actinoplanes teichomyceticus-kanta ympätään pulloon, joka sisältää 100 ml 20 kasvualustaa. 36 tunnin kuluttua käytetään viljelmän näytteitä (5 ml) ympättäessä joukko käymispulloja, jotka sisältävät 100 ml käymisalustaa. 24 tunnin ja 48 tunnin käymisen jälkeen selektiivisesti tehokas määrä prekursoria lisätään niinkuin on esitetty. Jos halutaan samanaikaisesti 25 kahden tai useamman T-A2-kompleksin pääkomponentin lisääntyvän, samaan käymispulloon voidaan lisätä kaksi tai useampi prekursori. Käymistä jatketaan vielä 60 - 150 tuntia, kasvualusta sentrifugoidaan ja liemestä otetut näytteet analysoidaan T-A2-pääkomponenttien konsentraation osalta kor- 30 keapaine-nestekromatografisesti (HPLC).

Prekursorin lisääminen suoritetaan tavallisesti siten, että se ei muuta etukäteen säädettyä käymisalustan pH-arvoa. Näin ollen esimerkiksi, kun vapaat happo-prekursorit lisätään suoraan kasvatusalustaan, pH-arvoa kontrolloidaan

puskuroimalla kasvatusalusta tai neutraloimalla välittömästi emäksillä, jotka ovat myrkyttömiä mikro-organismille.

Kun lisättävä prekursori on aminohappo, se voidaan lisätä käymisalustaan sen suolan vesipitoisena liuoksena, joka  
5 suola saadaan happojen tai emästen kanssa, jotka eivät ole myrkyllisiä tuottavalle mikro-organismille, esim. hydrokloridit ja natriumsuolat. Sekä raseemisia seoksia että optisesti aktiivisia isomeereja voidaan käyttää prekursoreina.

Kuitenkin ainakin jossain tapauksissa L-muodon lisääminen  
10 antaa suurempia saantoja kuin vastaava D-muoto.

Tämän keksinnön mukaiselle edulliselle suoritusmuodolle on siksi kuvaavaa, että käytetään L-aminohappo-prekursoria teikoplaniini  $A_2$ -kompleksin T-A2-2:n (valiini, sen suola tai esteri), T-A2-4:n (L-isoleusiini, sen suola tai esteri)  
15 ja/tai T-A2-5:n (L-leusiini, sen suola tai esteri) konsentraation lisäämiseksi. Tämän edullisen suoritusmuodon mukaan on myös mahdollista lisätä T-A2-2:n, T-A2-4:n tai T-A2-5:n prosenttia käymistuotteessa aina 90 - 95 prosenttiin kompleksissa.

20 Alempialkaanihappo-prekursoreilla (esim. isovoihappo, 2-metyylivoihappo, isovaleriaanahappo, alfa-keto-isovaleriaanahappo, alfa-keto-beta-metyylivaleriaanahappo ja alfa-keto-isokapronihappo) lisäys voidaan tehdä käyttäen niiden suolojen vesipitoista liuosta, jotka suolat saadaan myrkyttömien emästen kanssa; edullisia ovat tavallisesti ammonium- ja natriumsuolat.

Käytettäessä tyydyttämättömien rasvahappojen, kuten lino-  
lihapon ja öljyhapon suoloja, sopivana prekursorina ovat edullisia yleensä natriumsuolat. Kuitenkin mitä tahansa  
30 emäksen kanssa saatua suolaa, joka ei ole myrkyllinen tuottavalle kannalle, voidaan käyttää.

Kun käytetään edellä mainittujen alempialkanaanihappojen ja tyydyttymättömien rasvahappojen estereitä, jotka saadaan monohydroksialempialkanolien kanssa, prekursoreina, mainitut esterit johdetaan tavallisesti metanolista, etanolista ja propanolista, vaikka voidaan käyttää myös estereitä, jotka valmistetaan C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>-alkanolien kanssa. Tässä tapauksessa C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>-alkanolin täytyy olla erilainen kuin ne, jotka toimivat muiden T-A2-pääkomponenttien prekursoreina (esim. isobutanoli, isoamyylialkoholi ja 2-metyylibutanoli) ellei haluta nostaa yhden tai useamman mainitun komponentin suhteellista osuutta samanaikaisesti.

Edellä mainittujen alempialkanaanihappojen ja tyydyttymättömien rasvahappojen edullisia estereitä polyhydroksi-alempialkanolien kanssa ovat esterit etyleeniglykolin ja glyserolin kanssa, esim. tri-isobutyriini, tri-oleiini ja tri-linoleiini.

Tyydyttymättömien rasvahappojen lisääminen voidaan suorittaa myös käyttämällä luonnollisia raaka-aineita, jotka sisältävät mainittuja happoja sellaisinaan tai niiden glyseridejä. Esimerkiksi kaupallinen soijapapuöljy tavallisesti sisältää noin 20 - noin 35 % öljyhappoa ja noin 50 % - noin 60 % linolihappoja triglyserideinä; laardi sisältää noin 40 - noin 55 % öljyhappoa; puuvillansiemenöljy sisältää noin 20 - noin 45 % öljyhappoa ja noin 30 - noin 55 % linolihappoa; auringonkukkasiemenöljy sisältää noin 15 - noin 25 % öljyhappoa ja noin 65 - noin 75 % linolihappoa.

Alkanoli-prekursorit, kuten isobutanoli, isoamyylialkoholi ja 2-metyylibutanoli, lisätään tavallisesti sellaisenaan käymisalustaan. Kuitenkin ne voidaan lisätä myös happojen estereinä, jotka eivät ole myrkyllisiä mikro-organismeille. Näiden happojen tulee olla erilaisia, kuin ne, jotka voivat toimia muiden T-A2-pääkomponenttien prekursoreina (esim. isovoihappo, isovaleriaanahappo, 2-metyylivoihappo, linolihappo jne. ellei toivota samanaikaisesti yhden tai

useamman mainitun komponentin lisääntymistä. Tavallisesti esterit lineaaristen alempialkaanihappojen, kuten etikka-, propioni- ja voihapon kanssa ovat edullisia.

5 "Selektiivisesti tehokas määrä", joka lisätään käymisalus-  
taan tämän keksinnön mukaisesti riippuu prekursorin tyy-  
pistä. Tavallisesti alempialkaanihappojen (isovoihappo,  
2-metyylivoihappo, isovaleriaanahappo) estereiden ja tyy-  
dyttymättömien rasvahappojen (linolihappo, öljyhappo) es-  
tereiden määrät, joita käytetään halutun konsentraation  
10 saamiseksi käymisalustaan, vaihtelevat välillä 0,5 g/l -  
- 15 g/l, edullisen alueen ollessa välillä 1 g/l - 5 g/l.  
Alempialkanoleilla (isobutanoli, 2-metyylibutanoli, iso-  
amyylialkoholi) tai niiden happojen kanssa saaduilla mik-  
ro-organismille myrkyttömällä estereillä, määrät, joilla  
15 saadaan konsentraatio, vaihtelevat välillä 0,5 g/l - 5 g/l,  
edullisen käyttöalueen ollessa välillä 1 g/l - 2 g/l.

Aminohapoilla (esim. valiini, leusiini, isoleusiini) ja  
keto-hapoilla (alfa-keto-isovaleriaanahappo, alfa-keto-  
-beta-metyylivaleriaanahappo, alfa-keto-isokapronihappo)  
20 tai niiden happojen ja emästen kanssa saaduilla suoloilla  
"selektiivisesti tehokas määrä", joka lisätään käymisalus-  
taan, vaihtelee tavallisesti välillä 0,5 g/l - 5 g/l,  
alueen 1 g/l - 3 g/l ollessa edullinen.

25 Kun alempialkaanihappoja (esim. isovoihappoa, 2-metyyli-  
voihappoa, isovaleriaanahappoa), tyydyttymättömiä rasva-  
happoja (esim. linolihappoa, öljyhappoa) tai näiden suolo-  
ja lisätään suoraan käymisalustaan, "selektiivisesti teho-  
kas määrä" vaihtelee tavallisesti välillä 0,1 g/l - 2,5 g/l,  
alueen 0,3 g/l - 1,5 g/l ollessa edullinen.

30 Suuremmat konsentraatiot ovat vielä tehokkaita edistään T-A2-  
pääkomponenttien selektiivistä lisääntymistä, mutta T-A2-  
kompleksin kokonaissaanto pienenee, koska ilmenee toksisia  
vaikutuksia mikro-organismeilla.

Seuraavat esimerkit kuvaavat yksityiskohtaisesti tämän keksinnön eräitä spesifisiä suoritustapoja.

#### ESIMERKKI 1

#### YLEINEN MENETELMÄ

- 5 Kannan Actinoplanes teichomyceticus nov.sp. ATCC 31121 yksi kaura-agarvinopinta ympättiin 500 ml:n pulloon, joka sisälsi 100 ml seuraavaa kasvualustaa:

	glukoosia	10 g/l
	peptonia Difco	4 g/l
10	hiivauutetta	4 g/l
	MgSO <sub>4</sub>	0,5 g/l
	CaCO <sub>3</sub>	5 g/l
	standardi oligoalkuainetta	1 ml jokaista liuoksista A, B ja C
15	vettä	1000 ml

(pH säädettiin arvoon 6,7 steriloinnin jälkeen)

Liuos A: 10 % natriumkloridi (paino/til.)

Liuos B: 10 % kalsiumkloridi (paino/til.)

- 20 Liuos C: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 50 mg; CuSO<sub>4</sub>: 4 mg; KI: 10 mg; FeCl<sub>3</sub>: 20 mg;  
MgSO<sub>4</sub>: 40 mg; FeSO<sub>4</sub>: 40 mg; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>: 20 mg;  
100 ml:ssa tislattua vettä.

- 25 Kasvatettiin 36 tuntia pyörivässä ravistelijassa, jonka jälkeen käytettiin 5 ml viljelmää ympättäessä testipullot ja standardipullot, jotka sisälsivät jokainen 100 ml käymis-  
alustaa, jonka koostumus oli seuraava:

	hiivaa (yeast lisate)	5 g/l
	asparagiinia	1,5 g/l
	glukoosia	20 g/l
	MgSO <sub>4</sub>	0,5 g/l
30	CaCO <sub>3</sub>	5 g/l
	standardi oligoalkuainetta	1 ml jokaista liuoksista A, B ja C

vettä 1000 ml  
(pH säädettiin arvoon 6,9 steriloinnin jälkeen)

Liuokset A, B ja C samat kuin edellä.

Käyminen suoritettiin 28-30°C:ssa pyörivässä ravistelijassa.  
5 24 tunnin kuluttua lisättiin sopiva prekursori. Viljelmä  
sentrifugoitiin 72 tunnin kuluttua ja näytteet, jotka oli-  
vat 50 µl lientä, analysoitiin T-A2-pääkomponenttien kon-  
sentraation suhteen.

Analyysi suoritettiin käyttäen seuraavaa HPLC-menetelmää:

10 a. EROTTAMINEN GRADIENTTI-KÄÄNTEISFAASIJAKAANTUMISELLA

Laite: pumppu Varian 5000 A;  
detektori Varian 254 mikrometrillä;  
injektori Rheodyne model 7125;  
integraattori Spectra Physics model 4000;

15 Kolonni: Zorbax<sup>®</sup> ODS 5 mikrometriä, 4,6 x 150 mm;  
(Du Pont)

Liikkuva faasi: A) CH<sub>3</sub>CN: 0,025 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1:9, pH 6,0  
B) CH<sub>3</sub>CN: 0,025 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7:3, pH 6,0

Gradientti  
20 profiili: lineaarinen alkaen 0 prosentista B:tä -  
50 prosenttiin B:tä 30 minuutissa, virtaus-  
nopeus 2 ml/min.

Injektio: 50 µl käymislientä  
retentioajat (minuutteja)  
25 T-A2-1 = 16,9  
T-A2-2 = 18,0  
T-A2-3 = 18,6  
T-A2-4 = 20,5  
T-A2-5 = 20,9

Sisäinen standardi: 3,5-dihydroksitolueeni (retentioaika  
6,3 minuuttia).

b. PROSENTUAALINEN JAKAUTUMINEN

5 Komponentit erotettiin edellä esitetyllä menetelmällä ja  
niiden suhteellinen jakautuminen saatiin prosenttina vii-  
den piikin kokonaisalasta, käyttäen alaprocenttimenetelmää.

Lisäykset g/l	Kokonaissaanto mikrogramma/l	T-A2-1 %	T-A2-2 %	T-A2-3 %	T-A2-4 %	T-A2-5 %
ei	340	2,0	30,4	18,1	26,1	23,3
ei	305	2,1	32,0	20,6	20,1	25,0
ei	379	1,8	32,9	20,4	24,1	20,7
L-valiinia (natriumsuola)						
0,5	295	1,5	52,1	20,5	14,0	11,9
1	648	0,8	70,4	12,4	9,8	6,7
2	795	0,9	83,0	9,2	3,0	3,3
L-isoleusiinia (natriumsuola)						
0,5	116	2,0	29,3	20,4	32,1	16,2
1	134	1,8	24,1	13,5	40,2	20,4
2	159	1,7	13,5	4,4	66,5	13,9
L-leusiinia (natriumsuola)						
0,5	373	2,1	37,9	15,2	15,1	29,7
1	459	2,0	35,0	17,7	9,5	35,8
2	281	1,7	35,4	9,5	8,0	45,4
2,5	144	0,8	12,6	12,0	1,5	73,5

Lisäykset g/l	Kokonaissaanto mikrogramma/l	T-A2-1 %	T-A2-2 %	T-A2-3 %	T-A2-4 %	T-A2-5 %
------------------	---------------------------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

L-valiinia (HCl)

2,5	750	0,2	86,2	8,7	2,8	2,1
-----	-----	-----	------	-----	-----	-----

Tri-oleiinia (sisältää 10 % painosta tri-linoleinia)

2	320	12,0	17,2	41,0	18,9	10,9
4	258	12,3	16,1	48,8	16,9	10,9

Tri-linoleinia

2	341	29,0	20,3	14,0	20,1	17,1
5	355	31,2	22,9	17,4	16,9	11,5

87234

16

Edellä esitetyllä menetelmällä ja seuraavilla koejärjestelyillä saatiin tulokset:

Lisäykset g/l	Kokonaissaanto mikrogramma/l	T-A2-1 %	T-A2-2 %	T-A2-3 %	T-A2-4 %	T-A2-5 %
ei	460	2,2	44,1	20,8	15,2	17,7
Isobutanoli						
1	480	2,6	52,3	16,8	15,9	12,4
2	258	1,4	60,7	15,2	13,1	9,6
2-metyyliibutanoli						
1	423	2,3	42,1	15,2	26,3	14,1
2	265	1,7	46,3	10,5	30,1	11,4

## ESIMERKKI 2

## YLEINEN MENETELMÄ

Actinoplanes teichomyceticus nov.sp. ATCC 31121-kanta  
 esiviljeltiin 500 ml:n ravistelupullossa, joka sisälsi  
 5 100 ml seuraavaa kasvualustaa:

	lihauutetta	3 g/l
	tryptonia	5 g/l
	hiivauutetta	5 g/l
	glukoosia	1 g/l
10	liukenevaa tärkkelystä	24 g/l
	kalsiumkarbonaattia	5 g/l
	vettä	1000 ml

(pH säädettiin steriloinnin jälkeen arvoon 6,7)

15 Pulloja ravisteltiin 24 tuntia 28-30<sup>o</sup>C:ssa, jonka jälkeen  
 esiviljelmaa käytettiin ympättäessä käymisastiat, joista  
 jokainen sisälsi 10 litraa seuraavaa ravintoalustaa:

	lihauutetta	4 g/l
	peptonia	4 g/l
	hiivauutetta	1 g/l
20	natriumkloridia	2,5 g/l
	soijapapujauhoa	10 g/l
	glukoosia	50 g/l
	kalsiumkarbonaattia	5 g/l
	vesijohtovettä	q.s. 1000 ml

25 (pH säädettiin steriloinnin jälkeen arvoon 6,9).

Käymisastioita inkuboitiin aerobisesti, samalla hämmentäen  
 24 tuntia, jonka jälkeen sopiva prekursori lisättiin. Käy-  
 mistä jatkettiin edelleen 90 tuntia, jonka jälkeen käymis-  
 astioista korjattiin tuote. Liemestä otetut näytteet (100  
 30 ml) suodatettiin pH-arvossa 11 (pH säädettiin lisäämällä  
 20-prosenttista (paino/til.) natriumhydroksidia) ja analy-  
 soitiin menetelmällä, joka esitettiin esimerkissä 1 injek-

toimalla 40  $\mu$ l jokaista suodatettua näyteliuosta, jonka pH oli säädetty arvoon 7,38 0,1 M fosfaattipuskurilla.

Lisäykset g/l	Kokonaissaanto mikrogramma/l	T-A2-1 %	T-A2-2 %	T-A2-3 %	T-A2-4 %	T-A2-5 %
ei	678	4,5	50,9	16,0	15,8	12,8
ei	684	3,5	50,0	15,1	17,0	14,4
Tri-linoleinia						
5	764	15,5	45,1	14,0	12,8	12,7
10	596	52,8	21,1	10,4	5,5	10,2
Tri-oleiinia						
5	802	4,0	44,0	26,9	13,8	11,3
10	792	5,0	29,3	49,2	9,8	6,7
2-metyylivoihapon metyyliesteri						
1	720	2,8	40,3	15,2	31,0	10,7
3	846	4,2	40,9	11,9	35,7	7,3
5	530	5,7	41,3	9,6	37,2	6,2

Lisäykset g/l	Kokonaissaanto mikrogramma/l	T-A2-1 %	T-A2-2 %	T-A2-3 %	T-A2-4 %	T-A2-5 %
<b>2-metyylivoihappoa (natriumsuola)</b>						
0,5	531	3,8	39,6	14,6	32,3	9,7
1,5	357	5,0	35,9	10,6	41,4	7,1
<b>Metyyli-isobutyraatti</b>						
1	683	3,9	67,9	15,9	6,7	5,6
3	402	2,6	80,8	12,5	1,8	2,3
5	220	3,1	80,8	12,2	1,6	2,3
<b>Isovoihappo (natriumsuola)</b>						
0,5	532	3,8	69,1	18,4	4,4	4,3
1,5	214	3,3	79,7	13,5	1,8	1,7
<b>L-valiinia (puskuroitu liuos)</b>						
1	458	2,3	79,3	10,2	4,3	3,9
2	377	3,2	83,9	9,4	1,6	1,9
3	250	1,9	85,3	9,6	1,2	2,0

Lisäykset g/l	Kokonaissaanto mikrogramma/l	T-A2-1 %	T-A2-2 %	T-A2-3 %	T-A2-4 %	T-A2-5 %
Puuvillansiemenöljy 10	571	37,3	26,4	22,9	6,0	7,4
Laardi 10	708	8,1	36,1	36,3	11,3	8,2
Soijapapuöljy 10	637	39,9	23,8	21,6	7,4	7,3
Auringonkukkaöljy 10	712	31,7	31,8	18,6	8,8	9,1
α-ketoisovaleriaana- happo 3	380	2,8	81,0	13,0	1,2	1,8
α-ketoisokaproni- happo 1,5	360	4,5	34,9	11,4	41,9	7,3
α-ketoisokaproni- happo 3	350	6,2	21,4	10,5	9,3	52,6
Isoamyylialkoholi 1	410	2,3	35,1	15,8	6,6	40,2
Isovaleriaanahappo 1,5	280	2,8	34,6	15,3	7,6	39,7

87234

22

Vertailua varten myristiinihappoa, tripalmitiinia ja tristeariinia lisättiin neljään käymisastiaan konsentraatiossa ollessa vastaavasti 1 g/l, 5 g/l ja 10 g/l edellä esitetyissä olosuhteissa. Minkään T-A2-pääkomponentin suhteen ei havaittu lisääntymistä.

### ESIMERKKI 3

Kantaa Actinoplanes teichomyceticus nov.sp. ATCC 31121 esiviljeltiin kuten esimerkissä 2 on kuvattu. Esiviljelmän pulloja käytettiin ympättäessä käymisastia, joka sisälsi 10 litraa ravintoalustaa, joka on esitetty esimerkissä 2.

Käymisastia inkuboitiin aerobisesti, samalla hämmentäen 25<sup>0</sup>C:ssa 24 tuntia, jonka jälkeen lisättiin 2 g/l L-valiinia. L-valiini oli etukäteen liuotettu veteen (2 g/15 ml) lisäämällä rikkihappoa pH-arvoon 3 asti ja saatua liuosta oli hämmennetty 120<sup>0</sup>C:ssa 10 minuutin ajan.

Käymistä jatkettiin 25<sup>0</sup>C:ssa edelleen 50 tuntia, jonka jälkeen käymisastiasta otettiin tuote talteen.

Liemi suodatettiin pH-arvossa 11 ja analysoitiin menetelmän mukaan, joka on esitetty esimerkissä 1, se sisälsi 220 µg/l T-A2-kompleksia, jolla oli seuraava koostumus: T-A2-1: 2%; T-A2-2: 95%; T-A2-3: 3%.

## Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä teikoplaniini A<sub>2</sub>:n (T-A2) valmistamiseksi selektiivisesti rikastettuna minkä tahansa pääkomponenttinsa T-A2-1, T-A2-2, T-A2-3, T-A2-4 tai T-A2-5 suhteen, t u n - n e t t u siitä, että kannan Actinoplanes teichomyceticus nov.sp. ATCC 31121, viljelyalustaan lisätään T-A2:n glukosiamiiniosan kunkin asyyliryhmän sopivaa prekursoria, jolloin

a) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-1:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa on linolihappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat 0,1-2,5 g/l:n määränä ja sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa 0,5-15 g/l:n määränä,

b) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-2:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa on valiini, sen happojen ja emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat 0,5-5 g/l:n määränä, alfa-keto-isovaleriaanahappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa 0,5-5 g/l:n määränä, isovoihappo ja sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat 0,1-2,5 g/l:n määränä, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa 0,5-15 g/l:n määränä tai isobutanolin ja sen happojen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät esterit 0,5-5 g/l:n määränä,

c) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-3:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa on öljyhappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat 0,1-2,5 g/l:n määränä, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa 0,5-15 g/l:n määränä,

d) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-4:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa on isoleusiini, sen happojen ja

emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat 0,5-5 g/l:n määränä, alfa-keto-beta-metyylivaleriaanahappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa 0,5-5 g/l:n määränä, 2-metyylivoihappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat 0,1-2,5 g/l:n määränä, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa 0,5-15 g/l:n määränä tai 2-metyylibutanoli ja sen happojen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät esterit 0,5-5 g/l:n määränä,

e) sopiva prekursori, joka lisää T-A2-5:n suhteellista osuutta T-A2-kompleksissa on leusiini, sen happojen ja emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat 0,5-5 g/l:n määränä, isovaleriaanahappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat 0,1-2,5 g/l:n määränä, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa 0,5-15 g/l:n määränä, alfa-keto-iso-kapronihappo, sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, sen esterit mono- ja polyhydroksi-alempialkanolien kanssa 0,5-5 g/l:n määränä tai isoamyyli-alkoholi ja sen happojen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät esterit 0,5-5 g/l:n määränä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sopiva prekursori, joka lisätään on lino-lihappo tai sen emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, ja vastaava selektiivisesti tehokas määrä vaihtelee välillä 0,3-1,5 g/l.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sopiva prekursori, joka lisätään, on lino-lihapon esteri mono- tai polyhydroksi-alempialkanolin kanssa, ja vastaava selektiivisesti tehokas määrä vaihtelee välillä 1-5 g/l.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että sopiva prekursori, joka lisätään, on va-  
liini tai sen happojen ja emästen kanssa saadut mikro-or-  
ganismille myrkyttömät suolat, ja vastaava selektiivisesti  
tehokas määrä vaihtelee välillä 1-3 g/l.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että sopiva prekursori, joka lisätään, on iso-  
voihappo tai sen emästen kanssa saadut mikro-organismille  
myrkyttömät suolat, ja vastaava selektiivisesti tehokas  
määrä vaihtelee välillä 0,3-1,5 g/l.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että sopiva prekursori, joka lisätään, on iso-  
voihapon esteri mono- tai polyhydroksi-alempialkanolin  
kanssa, ja vastaava selektiivisesti tehokas määrä vaihte-  
lee välillä 1-5 g/l.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että sopiva prekursori, joka lisätään, on iso-  
butanoli tai sen happojen kanssa saadut mikro-organismille  
myrkyttömät esterit, ja vastaava selektiivisesti tehokas  
määrä vaihtelee välillä 1-2 g/l.
8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että sopiva prekursori, joka lisätään, on öljy-  
happo tai sen emästen kanssa saadut mikro-organismille  
myrkyttömät suolat, ja vastaava selektiivisesti tehokas  
määrä vaihtelee välillä 0,3-1,5 g/l.
9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että sopiva prekursori, joka lisätään, on öljy-  
hapon esteri mono- tai polyhydroksi-alempialkanolin kans-  
sa, ja vastaava selektiivisesti tehokas määrä vaihtelee  
välillä 1-5 g/l.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sopiva prekursori, joka lisätään, on isoleusiini tai sen happojen ja emästen kanssa saadut mikro-organismille myrkyttömät suolat, ja vastaava selektiivisesti tehokas määrä vaihtelee välillä 1-3 g/l.

11. Minkä tahansa edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käyminen suoritetaan lämpötilassa, joka on välillä 25°C ja 35°C, ja mieluummin välillä 27°C ja 35°C.

12. Minkä tahansa edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sopiva prekursorin lisääminen suoritetaan 24-48 tuntia sen jälkeen, kun käyminen on alkanut.

## Patentkrav

1. Förfarande för framställning av teikoplanin A<sub>2</sub> (T-A2) selektivt anrikad med avseende på vilken som helst av dess huvudkomponenter T-A2-1, T-A2-2, T-A2-3, T-A2-4 eller T-A2-5, k ä n n e t e c k n a t därav, att odlingsmediet av stammen Actinoplanes teichomyceticus nov. sp. ATCC 31121 tillsätts med en lämplig prekursor av var och en acylgrupp av glukosamindelen av T-A2, varvid

a) en lämplig prekursor, som ökar den proportionella andelen av T-A2-1 i T-A2-komplexet, är linolsyra, dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,1-2,5 g/l och dess estrar med mono- och polyhydroxi-lågalkanoler i en mängd av 0,5-15 g/l,

b) en lämplig prekursor, som ökar den proportionella andelen av T-A2-2 i T-A2-komplexet, är valin, dess salter med syror och baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,5-5 g/l, alfa-keto-isovaleriansyra, dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, dess estrar med mono- och polyhydroxi-lågalkanoler, i en mängd av 0,5-5 g/l, isosmörnsyra och dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,1-2,5 g/l, dess estrar med mono- och polyhydroxi-lågalkanoler i en mängd av 0,5-15 g/l eller isobutanol och dess estrar med syror, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,5-5 g/l,

c) en lämplig prekursor, som ökar den proportionella andelen av T-A2-3 i T-A2-komplexet, är oleinsyra, dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,1-2,5 g/l, dess estrar med mono- och polyhydroxi-lågalkanoler i en mängd av 0,5-15 g/l,

d) en lämplig prekursor, som ökar den proportionella andelen av T-A2-4 i T-A2-komplexet, är isoleucin, dess sal-

ter med syror och baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,5-5 g/l, alfa-keto-beta-metylvalleriansyra, dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, dess estrar med mono- och polyhydroxilågalkanoler, i en mängd av 0,5-5 g/l, 2-metylsmörtsyra, dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,1-2,5 g/l, dess estrar med mono- och polyhydroxilågalkanoler i en mängd av 0,5-15 g/l eller 2-metylbutanol och dess estrar med syror, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,5-5 g/l,

e) en lämplig prekursor, som ökar den proportionella andelen av T-A2-5 i T-A2-komplexet, är leucin, dess salter med syror och baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,5-5 g/l, isovaleriansyra, dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,1-2,5 g/l, dess estrar med mono- och polyhydroxilågalkanoler, i en mängd av 0,5-15 g/l, alfa-keto-isokaprionsyra, dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, dess estrar med mono- och polyhydroxilågalkanoler i en mängd av 0,5-5 g/l eller isoamylalkohol och dess estrar med syror, vilka är giftfria för mikroorganismen, i en mängd av 0,5-5 g/l.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en lämplig prekursor, som tillsätts, är linolsyra eller dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, och den motsvarande selektivt effektiva mängden varierar mellan 0,3-1,5 g/l.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en lämplig prekursor, som tillsätts, är en ester av linolsyra med en mono- eller polyhydroxilågalkanol, och den motsvarande selektivt effektiva mängden varierar mellan 1-5 g/l.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en lämplig prekursor, som tillsätts, är valin eller dess salter med syror och baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, och den motsvarande selektivt effektiva mängden varierar mellan 1-3 g/l.

5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en lämplig prekursor, som tillsätts, är isosmörtsyra eller dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, och den motsvarande selektivt effektiva mängden varierar mellan 0,3-1,5 g/l.

6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en lämplig prekursor, som tillsätts, är en ester av isosmörtsyra med en mono- eller polyhydroxilålganol, och den motsvarande selektivt effektiva mängden varierar mellan 1-5 g/l.

7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en lämplig prekursor, som tillsätts, är isobutanol eller dess estrar med syror, vilka är giftfria för mikroorganismen, och den motsvarande selektivt effektiva mängden varierar mellan 1-2 g/l.

8. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en lämplig prekursor, som tillsätts, är oleinsyra eller dess salter med baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, och den motsvarande selektivt effektiva mängden varierar mellan 0,3-1,5 g/l.

9. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en lämplig prekursor, som tillsätts, är en ester av oleinsyra med en mono- eller polyhydroxilålganol, och den motsvarande selektivt effektiva mängden varierar mellan 1-5 g/l.

10. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att en lämplig prekursor, som tillsätts, är isoleucin eller dess salter med syror och baser, vilka är giftfria för mikroorganismen, och den motsvarande selektivt effektiva mängden varierar mellan 1-3 g/l.

11. Förfarande enligt något av de ovan angivna patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att fermenteringen utförs i en temperatur mellan 25 °C och 35 °C, och företrädesvis mellan 27 °C och 35 °C.

12. Förfarande enligt något av de ovan angivna patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att tillsättningen av den lämpliga prekursor utförs 24-48 timmar efter det att fermenteringen påbörjats.