



(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

213 751 B

(51) Int. Cl.⁶

C 12 P 21/04

(21) A bejelentés ügyszám: P 95 00715

(22) A bejelentés napja: 1993. 07. 20.

(30) Elsőbbségi adatok:

92 115451 1992. 09. 10. EP

(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 93/01907

(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/05798

(40) A közzététel napja: 1996. 01. 29.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1997. 09. 29.

(72) Feltalálók:

Gastaldo, Luciano, Pogliano Milanese (IT)

Rizzo, Angelo Michele, Mesagne (IT)

(73) Szabadalmaz:

Gruppo Lepetit S.p.A., Lainate/Milánó (IT)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Eljárás GE 2270 antibiotikum-komplex hozamának és az A faktor kitermelésének szelektív növelésére

(57) KIVONAT

Eljárás a GE 2270 összantibiotikum hozamának és az A faktor antibiotikum termelésének szelektív növelésére, amely abban áll, hogy B₁₂-vitamint vagy annak B₁₂-vitamin hatású

analógjait adják a *Planobispora rosea* ATCC 53773 törzs vagy bármelyik GE 2270 antibiotikumot termelő mutánsának vagy variánsának fermentációs közegéhez.

HU 213 751 B

A GE 2270 antibiotikum egy tiazolil-peptid anyag, amelyet a *Planobispora rosea* ATCC 53773 törzs tenyésztéséből különítették el.

Ezt az anyagot, amely főként Gram-pozitív baktériumokkal, valamint néhány Gram-negatív anaerobbal szemben hatásos, a 359062 számon közzétett európai szabadalmi bejelentésben írták le az előállítására alkalmas eljárással és a megfelelő gyógyászati készítményekkel együtt.

A GE 2270 antibiotikumot a mikroorganizmus az egymással szoros kapcsolatban levő A, B1, B2, C1, C2, C2a, D1, D2, E és T jelű – elkülönített és jellemzett – komponensek komplexeként termeli.

Az A faktort, amelyet túlnyomó mennyiségben kapnak és a biológiai hatásért leginkább felelős, a fentebb említett, 359062 számon közzétett európai szabadalmi leírásban ismertetik az elkülönítésére alkalmas eljárással és felhasználásával együtt (ld. még: E. Selva és munkatársai, „Antibiotic GE 2270 A: A Novel Inhibitor of Bacterial Protein Synthesis. I. Isolation and Characterization”. The Journal of Antibiotics, 44 (7), 693–701, 1991; J. Kettenring és munkatársai, „Antibiotic GE 2270 A: A novel Inhibitor of Bacterial Protein Synthesis. II. Structure Elucidation”. The Journal of Antibiotics, 44 (7), 702–715, 1991).

Az A faktort kiindulási anyagként alkalmazzák a GE 2270 A1, A2, A3 (hidrolízissal) és H (redukálószerrel, például nátrium-bór-hidriddel való redukív kezeléssel) faktorok előállítására.

A B1, B2, C1, C2, D1, D2, E és T faktorok, valamint az elkülönítésükre alkalmas eljárást és alkalmazásukat a 451486 számon közzétett európai szabadalmi bejelentésben írják le. A C2a faktort és annak elkülönítési eljárását az 529410 számon közzétett európai szabadalmi bejelentésben (amely a 07/931084 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésnek felel meg) ismertették.

A GE 2270 antibiotikum A1, A2, A3 és H faktorainak a GE 2270 A faktorból való előállítását a 406745 számon közzétett európai szabadalmi bejelentésben írják le. Lásd még E. Selva és munkatársai, „Natural Antibiotics Related to GE 2270 A: Isolation, Structure Elucidation and Biological Characterization”, 31st ICAAC, Sept 29-Oct. 2, 1991, Chicago. A fenti közleményben a C2 faktort C2b-ként azonosítják.

A GE 2270 komplex komponenseinek szerkezete, amely az (I) általános képletnek felel meg, az I. táblázatban látható.

I. táblázat

GE 2270 faktor	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄ -R ₅
A	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OCH ₃	CH ₂ -CH
B1	CH ₃	H	CH ₂ OCH ₃	CH ₂ -CH
B2	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -CH
C1	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ -CH
C2	H	CH ₃	CH ₂ OCH ₃	CH ₂ -CH
C2a	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₂ OCH ₃	CH ₂ -CH
D1	CH ₃	H	H	CH ₂ -CH

GE 2270 faktor	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄ -R ₅
D2	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₂ -CH
E	CH ₃	H	CH ₂ OH	CH ₂ -CH
T	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OCH ₃	CH=C

A jelenlegi antibiotikus kezelésekkel szembeni tolerancia, sőt rezisztencia növekvő mértékű kifejlődése miatt továbbra is nagy az igény új antibiotikus anyagokra. Különösen kívánatosak olyan antibiotikumok, amelyek önállóan elkülönített formában, jól meghatározott és standardizált összetétellel rendelkeznek, ami állandó fizikai-kémiai (például stabilitási) és biológiai (például farmakokinetikai) tulajdonságot feltételez.

Az EP-A 359062 szabadalmi iratban ismertetett jelenlegi fermentációs módszer egy komplex keveréket eredményez, amelyben az A faktor általában kisebb mint 70% (HPLC-módszerrel meghatározva), és az összes antibiotikus termék mennyisége általában 300 ppm-nél kisebb. A találmány szerint azt találtuk, hogy ha a GE 2270 antibiotikum-komplex termelésére alkalmazott fermentációs közeghez B₁₂-vitamint (cianokobalamint) vagy annak B₁₂-vitaminszerű hatással bíró olyan analógiát adjuk, amelyben a cianocsoportot egy másik ligandum helyettesíti, az antibiotikum-komplex és ezen belül szelektíven az A faktor termelése nő.

A B₁₂-vitamin B₁₂-vitaminszerű hatású analógiái például a hidroxikobalamin, 5'-deoxiadenozil-kobalamin, metilkobalamint, valamint a „THE VITAMINS” (Chemistry, Physiology, Pathology, Methods” edited by W. H. Sebrell és R. S. Harris, Vol. II, 181. oldal, Academic Press, New York-London, 1968) kézikönyvben említettek.

A B₁₂-vitamin hatása következtében megjavult antibiotikum-termelésről az irodalomban már a monenzinek, fortimicin, gentamicin, chuanguxinmicin, ST-2312, heptémsavvázat tartalmazó antibiotikumok (tienamicin, PS-5 stb.), elzamicin és leinamicin esetében beszámoltak.

Azonban olyan nem fordult elő, hogy egyidejűleg kettős hatást, az összantibiotikum termelésének növekedését és a komplex egyik komponensének nagyon szelektív termelését figyelték volna meg.

Orosz szerzők részletesen tanulmányozták a gentamicint termelő *Micromonospora purpurea* törzset (T. P. Krasnova és munkatársai: „Comparative Studies on Active Strain of *Micromonospora purpurea* and its Low Active Mutant in connection with Biosynthesis of Gentamycin”. Antibiotics 24 (5), 323–328, 1979; Ringdog Abstract 31044U). Eredményeiket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

(a) A fermentációs közeghez adott kobalt stimulálja a B₁₂-vitamin bioszintézisét és befolyásolja az antibiotikum-komplex összetételét.

(b) A hozzáadott kobalt hatásának feltételezett mechanizmusa szerint a kobaltion stimulálja az endogén B₁₂-vitamin szintézisét, ami a metionin szintéziséhez szükséges, a metionin viszont a metilcsoportok forrása.

A feltalálók a GE 2270 antibiotikummal végzett kísérletek során a CoCl₂ hozzáadásának csak mérsékelt

hatását észlelték, ugyanakkor az A faktor szelektivitása csak kis mértékben változott, és az összes GE 2270 szintézis alig növekedett kb. ez 300 ppm nagyságrendű értékig.

A B₁₂-vitamin és analógjainak a fermentációs közeghez adandó mennyisége a találmány szerinti kívánt hatás elérésére általában a termelő törzstől és az alkalmazott táptalaj összetételétől függően változik. Egyszerű laboratóriumi kísérletekkel a szakember meg tudja határozni a B₁₂-vitamin vagy analógjainak azt a mennyiségét, amelyet a fermentációs közeghez kell adni.

A szokásos fermentációs körülmények között a hatásvias mennyiség általában 0,0005 és 5 ppm között változik. 5 ppm-nél nagyobb mennyiségek is alkalmazhatók, azonban az elérhető hatás lényegesen nem fokozható a fenti intervallum felső határának megfelelő mennyiséggel kapotthoz képest. A hozzáadott B₁₂-vitamin mennyisége előnyösen 0,005 és 1 ppm közötti.

A B₁₂-vitamint szabad vegyületként (például kristályos B₁₂-vitamin formájában) vagy koncentrátumként vagy egy komplex anyagkomponenseként adhatjuk a fermentációs közeghez. A fenti anyagnak elfogadhatónak kell lennie a GE 2270 antibiotikum termeléséhez szükséges fermentációs körülmények szempontjából, azaz nem lehet mérgező az említett törzsre nézve és nem hathat negatívan a törzs növekedésére és termelőképességére.

Előnyösen ezt az anyagot a mikroorganizmus felhasználhatja a növekedéséhez szükséges lényeges elemek, azaz szén, nitrogén és/vagy ásványi sók hatékony forrásaként is. Például B₁₂-vitamin hatása van mind a standard mind a zsírtalanított hallisztnek. Így a fermentációs közeghez adott megfelelő mennyiségű halliszt asszimilálható nitrogénforrásként működik és egyidejűleg biztosítja a találmány szerinti hatás eléréséhez szükséges B₁₂-vitamin mennyiséget.

A találmány szerinti eljárásban használt fermentációs közegek és tenyésztési eljárási körülmények lényegében azonosak a fentebb említett EP-A 359062 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtakkal. GE 2270 antibiotikum-termelő mikroorganizmusként *Planobispora rosea* ATCC 50773 törzset vagy annak bármilyen más GE 2270 antibiotikumot termelő mutánsát vagy variánsát használjuk. Az említett variánsokat vagy mutánsokat például különféle ismert mutagénekkel való kezeléssel kaphatjuk, amint arra a fentebb említett EP-A 359062 szabadalmi iratban utalnak.

Összefoglalva tehát a jelen találmány GE 2270 antibiotikum-komplex nagy hozammal és az uralkodó A faktorban szelektíven gazdagabb termelésére alkalmas, a *Planobispora rosea* ATCC 50773 törzs vagy annak bármely GE 2270 antibiotikumot termelő mutánsának vagy variánsának sülyesztett tenyészetben aerob körülmények között, asszimilálható szén-, nitrogén- és szerves sóforrás jelenlétében megvalósított fermentációs eljárás, amelyre jellemző, hogy a fermentációs közeghez B₁₂-vitamint vagy annak B₁₂-vitamin hatású olyan analógját adjuk, amelyben a cianocsoportot egy másik ligandum helyettesíti.

Amint azt az előzőekben említettük, a találmány szerinti fermentációs eljárások lényegében azonosak azok-

kal, amelyeket a technika állásában GE 2270 antibiotikum-komplex termelésére leírtak. *Planobispora rosea* fagyasztott tenyészetéből származó mintákat használunk a lombikban vagy fermentorban levő vegetatív táptalaj beoltására. A tenyészeteket azután rázással 26 °C és 37 °C közötti hőmérsékleten a kívánt növekedés eléréséhez szükséges ideig inkubáljuk. 28 °C és 30 °C közötti hőmérsékleten 65–70 óra általában elegendő a kielégítő növekedéshez. Ezután a kapott tenyészetek alikvot részeit fermentációs táptalajt tartalmazó lombikokba vagy fermentorokba visszük át, amely táptalajhoz megfelelő mennyiségű B₁₂-vitamint vagy B₁₂-vitamin analógot adnak. Ha a B₁₂-vitamint egy komplex anyag vagy előnyösen a fermentációs táptalaj tápanyagának komponenseként adjuk az elegyhez, akkor azt az anyagot a B₁₂-vitamin tartalmával arányos mennyiségben kell adagolni. A találmány szerinti hatás eléréséhez szükséges mennyiséget oly módon határozhatjuk meg, hogy egy sorozat tenyésztési kísérletet végzünk, amelyben a kiválasztott anyag különféle koncentrációit alkalmazzuk, vagy a fenti anyagnak oldószeres (azaz benzil-alkohollal, fenollal vagy butanollal végzett) extrakcióval és az extraktum kromatográfiás elválasztásával/analízisével előre meghatározzuk a B₁₂-vitamin tartalmát.

Bizonyos esetekben azonban korlátozott a fermentációs táptalajhoz adható anyag mennyisége, mivel bizonyos koncentrációérték felett néhány anyag általános visszazsírító hatást gyakorol a GE 2270 komplexet termelő mikroorganizmusra.

Megfigyeltük például, hogy bizonyos típusú halliszt (Agras type 99.9 hering halliszt, amelyet a FISKERINDUSTRY AMBA, Kiskeri Havnsgade 35, 6701 Esbjerg, Denmark állít elő), 1 és 15 g/liter mennyiségben elősegíti az össz GE 2270 komplex termelést és szelektíven növeli az A faktor termelését, 20 g/l koncentrációban pedig gyakorlatilag gátolja a mikroorganizmus növekedését és az antibiotikum termelését. Ilyen hatást nem figyeltünk meg a zsírtalanított Agras type 99.9 halliszt alkalmazásakor.

A standard fermentációs közeget és a megfelelő mennyiségű B₁₂-vitamint tartalmazó lombikot vagy fermentort a fentebb említett tenyészetrel való beoltás után 24 °C és 37 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen 28 °C és 30 °C közötti hőmérsékleten rázzuk vagy keverjük elég hosszú ideig ahhoz, hogy a GE 2270 antibiotikum-komplex maximális hozamát elérjük. Ezt az időszakot lényegében a fermentáció előrehaladásának analitikai eljárásokkal, így biológiai meghatározásokkal, például érzékeny (így *Bacillus subtilis* vagy *S. aureus*) mikroorganizmusokon végzett papírkorong vagy agardiffúziós vizsgálatokkal, vékonyréteg-kromatográfiás vagy HPLC-eljárásokkal határozzuk meg, ezen eljárásokat a szakterületen általánosan használják (ld. EP-A 359062).

A jelen találmány szerint alkalmazott körülmények között a GE 2270 antibiotikum maximális hozamának eléréséhez elegendő fermentációs idő általában 3 és 7 nap között változik.

A találmány szerinti eljárás megvalósításához használt standard előfermentációs készítmény és a fermentációs táptalaj a szakterületen általánosan alkalmazott táp-

anyagokat tartalmazza. Bizonyos tápanyagok azonban előnyösek.

Előnyös szénforrás a glükóz, mannóz, galaktóz, keményítő, kukoricaliszt és hasonló. Előnyös nitrogénforrás az ammónia, nitrátok, szójaliszt, pepton, hidrolizált kazein, húskivonat, élesztőkivonat, tripton, aminosavak és hasonló. A szervesetlen sók között, amelyek a táptalajba foglalhatók a nátrium-, kálium-, vas-, cink-, kobalt-, magnézium-, kalcium-, ammónium-, klorid-, karbonát-, szulfát-, foszfát-, nitrát- és hasonló ionok leadására képes oldható sókat említjük.

Például egy standard fermentációs táptalaj (a hozzáadott B₁₂-vitamintól vagy analógjaitól eltekintve) oldható keményítőt, hidrolizált kazeint, élesztőkivonatot, húskivonatot, szójalisztet, glükózt és kalcium-karbonátot tartalmazhat. A fentebb leírt tápanyag-komponensekhez más anyagok is adhatók, amennyiben a B₁₂-vitamint egy komplex anyag komponenseként alkalmazzuk. A B₁₂-vitamint tartalmazó komplex anyagra példaként a haliszt, állati szervkivonatok, mikrobiális úton termelt B₁₂-ből készült nyers kivonat említhető.

Az A faktor termelésének szelektivitására és a fermentlé összpotenciájára gyakorolt különös hatást figyeltünk meg akkor, amikor a fermentációs közeghez ammónium-szulfátot adtunk. Az ammónium-szulfát előnyös koncentrációja 0,5 és 1,5 g/l között változik.

Amikor a fermentációt leállítjuk, a találmány szerinti általános körülmények között kapott GE 2270 antibiotikum-komplex HPLC-eljárással meghatározva több mint 80% A faktort tartalmaz. A legelőnyösebb körülmények között végezve a fermentációs eljárást, az összes GE 2270 antibiotikum komplex végkoncentrációja a fermentlében 350–500 ppm nagyságú lehet, amelyben az A faktor aránya kb. 95% (HPLC).

Az antibiotikumterméket a fermentléből a korábban ismertetett eljárásokkal nyerhetjük ki és tisztíthatjuk (ld. EP-A 359062). Abban az esetben, amikor a nyers GE 2270 komplexben az A faktor 90% feletti mennyiségű, az A faktort szerves oldószerből vagy szerves oldószerek elegyéből való kristályosítással közvetlenül is tisztíthatjuk, amikor is 5%-nál kisebb mennyiségű más faktorokat tartalmazó terméket kapunk.

A következő példák a találmány szerinti eljárás néhány jellemző megvalósítási módját írják le.

1. példa Fermentációs eljárás

1.1. Mikroorganizmus

Az alkalmazott mikroorganizmus *Planobispora rosea* ATCC 53773 vagy egy GE 2270-t termelő mutánsa vagy variánsa, amelyet fagyasztott tenyészlében tárolunk –80 °C-on és törzstenyészetként alkalmazunk.

A tároláshoz használt közeg összetétele a következő:

Oldható keményítő	20 g/liter
Polipepton	5 g /liter
Élesztőkivonat	3 g/liter
Húskivonat	2 g/liter
Szójaliszt	2 g/liter
Kalcium-karbonát	1 g/liter

1.2. A fermentáció körülményei

Az előtenyészetet úgy készítjük, hogy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban 5 ml fenti fagyasztott tenyészet-tel a fenti táptalajt beoltjuk.

A beoltott lombikokat 72 órán át 28 °C-on 200 percenkénti fordulatszám mellett rázzuk, majd a tenyészlé 4–4 ml-es részleteit az alábbi összetételű és a kiválasztott mennyiségű B₁₂-t vagy analógját tartalmazó lombikba visszük át.

Oldható keményítő	35 g/liter
Hidrolizált kazein	5 g/liter
Élesztőkivonat	8 g/liter
Húskivonat	3,5 g/liter
Szójaliszt	3,5 g/liter
Glükóz	10 g/liter
Kalcium-karbonát	2 g/liter

Ezt a táptalajt desztillált vízben készítjük, és a pH-t sterilizálás előtt (122 °C, 30 perc) 7,2-re igazítjuk. Minden táptalaj 0,03% Hodag AFM-5 habzágátló anyagot tartalmaz.

A fermentálást 7 napon át 28 °C–30 °C-on rázással (200 rpm) végezzük, amely idő alatt a fermentált tenyészetben az antibiotikum-termelést követjük.

1.3. B₁₂-vitamin adagolás

1.3.1. A B₁₂-vitamint vagy analógjait desztillált vízben oldjuk kezdetben 25 mg/ml koncentrációban, majd az oldatot vízzel hígítjuk. Az oldatokat szűrővel sterilizáljuk, és a fentebb leírt fermentációs táptalajhoz adjuk a kiválasztott koncentrációban.

1.3.2. Halliszteket (Agris type 99.9-t és zsírtalanított Agris type 99.9-t) adunk a kiválasztott mennyiségekben a fenti táptalajt tartalmazó tenyészlombikokba.

1.4. Az antibiotikum-termelés HPLC-eljárással végzett vizsgálata

A fermentlé egy térfogatnyi mennyiségét két térfogat acetonitrillel keverjük szobahőmérsékleten kb. 20 percig, és azután a szuszpenziót 5 percen át 3000 rpm mellett centrifugáljuk.

A kapott oldatot kb. 1 : 3 arányú hígítás után használjuk a HPLC-vizsgálatokhoz.

A HPLC-eljárás körülményei:

Készülék:	HP 1082 UV 254-es detektorral
Oszlop:	Brownlee RP–18 5μ 22 cm
Előoszlop:	Brownlee RP–18 5μ 1,5 cm
Eluálószer A fázis:	NaH ₂ PO ₄ 20 mM: CH ₃ CN = 90 : 10
Eluálószer B fázis:	Na ₂ PO ₄ 20 mM: CH ₃ CN = 30 : 70
Gradiens típus:	lineáris
Gradiens idő:	20 perc 45% B-től 75% B-ig
Átfolyási sebesség:	1,5 ml/perc
Injektálás:	30 μl

A fenti körülmények között minden 6,20 és 13,67 perc közötti retencioidőnek (R_t) megfelelő HPLC kromatográfiás csúcs a GE 2270 komplex faktoraihoz tartozik. Az A faktor R_t értéke 11,65 perc.

2. példa

A B₁₂-vitamin vagy analógjai hozzáadásának hatása

2.1. A következő 1. táblázat azokat a hatásokat mutatja, amelyeket a különböző koncentrációban a fermentációs közeghez adott B₁₂-vitamin váltott ki. A meghatározásokat HPLC-eljárással végeztük.

1. táblázat

1. kísérlet

Vitamin B ₁₂ ppm	Összes GE 2270 komplex ppm	A faktor ppm	A faktor %
Kontroll (nincs hozzáadva)	312	192	61,6
0,01	369	347	94,1
0,05	340	321	94,3
0,10	410	387	94,3
0,50	319	299	93,8
1,00	378	356	94,5
2,00	408	385	94,4
5,00	422	398	94,2
10,00	366	347	94,8
20,00	340	321	94,4
2. kísérlet			
1,00	336	311	92,5
0,10	416	384	92,3
0,01	426	393	92,5
0,005	401	368	91,5
0,001	318	265	83,3
0,0005	345	284	82,4
0,00001	336	263	78,2
Kontroll (nincs hozzáadva)	320	249	77,8

2.2 A következő 2. táblázat adatai a fermentációs közeghez különféle koncentrációban hozzáadott metil-kobalamín hatását mutatják.

2. táblázat

Metil-kobalamín	A faktor ppm	A faktor %
Kontroll (nincs hozzáadva)	87	47,0
0,001	235	83,1
0,01	280	91,6
0,10	297	93,2
1,00	290	92,2

2.3. A következő, 3. táblázat a fermentációs közeghez különféle mennyiségben hozzáadott halliszt hatásait mutatja.

3. táblázat

Halliszt	A faktor ppm	A faktor %
Kontroll (nincs hozzáadva)	99	46,5
Agras type 99.9 (g/l)		
1	206	68,8
2,5	282	82,2
5	310	88,8
7,5	340	88,4
10	373	89,6
15	300	91,6
20	4	–
30	1	–
Agras type 99.9 (g/l) zsírtalanított		
5	355	93,9
10	466	93,9
20	445	92,8

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Fermentációs eljárás GE 2270 antibiotikum-komplex összhozamának és az uralkodó A faktor termelésének szelektív növelésére *Planobispora rosea* ATCC 53773 törzs vagy annak bármely GE 2270 antibiotikumot termelő mutánsa vagy variánsa sülyesztett tenyészetben, aerob körülmények között, asszimilálható szén-, nitrogén- és szervesen sóforrás jelenlétében történő tenyésztésével, *azzal jellemezve*, hogy a fermentációs közeghez B₁₂-vitamint vagy B₁₂-vitamin hatású olyan analógjait adjuk, amelyekben a cianocsoportot egy másik ligandum helyettesíti.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fermentációs közeghez a B₁₂-vitamint vagy analógjait 0,0005 és 5 ppm, előnyösen 0,005 és 1 ppm közötti mennyiségben adagoljuk.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vitamin vagy analógjaiként B₁₂-vitamint, hidroxó-kobalamint, 5'-deoxiadenozil-kobalamint vagy metil-kobalamint adagolunk.
4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a B₁₂-vitamint egy, a GE 2270 antibiotikum termeléséhez szükséges fermentációs körülmények szempontjából elfogadható komplex anyag komponenseként adagoljuk.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy komplex anyagként hallisztet vagy zsírtalanított hallisztet adagolunk.
6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fermentációs közeghez a hallisztet vagy zsírtalanított hallisztet 1 és 15 g/l közötti mennyiségben adagoljuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hallisztként hering hallisztet vagy zsírtalanított hering hallisztet adagolunk.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fermentációs közeghez 0,5 és 1,5 g/l közötti mennyiségben ammónium-szulfátot adunk.

