



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1253/87
(22) Indleveringsdag: 11 mar 1987
(41) Alm. tilgængelig: 13 sep 1987
(44) Fremlagt: 12 okt 1992
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 12 mar 1986 GB 8606120

(51) Int.Cl.5 C 12 P 17/18
C 07 D 493/22
//(C 07 D 493/22,
C 07 D 307:00,
C 07 D 311:00,
C 07 D 311:00,
C 07 D 313:00)

(71) Ansøger: *American Cyanamid Company; One Cyanamid Plaza; Wayne; New Jersey 07470, US
(72) Opfinder: Martin *Todd; GB, Mark A. *Haxell; GB, Gordon C. *Lawrence; GB

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

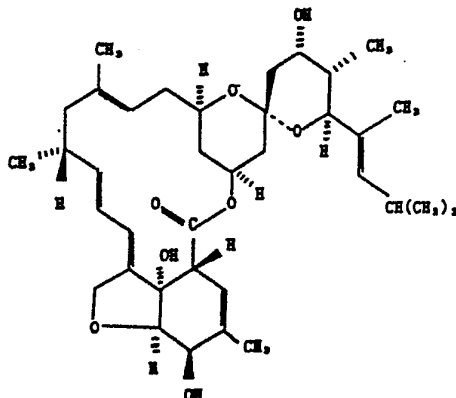
(54) Fremgangsmåde til fremstilling af en 5-hydroxy-S541-macrolidforbindelse

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1253-87

En forbindelse med formlen (I):



(I)

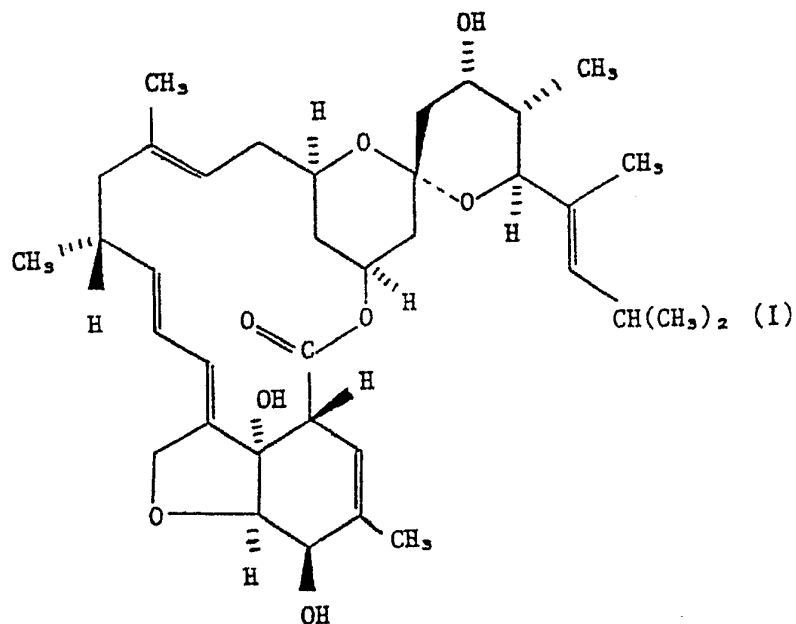
fremstilles ved, at en mikroorganisme af slægten *Streptomyces*, som er i stand til at producere forbindelsen med formlen (I), dyrkes i nærværelse af en eller flere fedtsyrer og/eller salte, estere eller amider af disse syrer, hvorved forbindelsen med formlen (I) dannes, og forbindelsen om ønsket isoleres. Fedtsyren foreger udbyttet af forbindelsen med formlen (I) og er fortrinsvis isosmørsyre eller valeriansyre.

Den foreliggende opfindelse angår en særlig og hidtil ukendt fremgangsmåde til fremstilling af en antibiotisk 5-hydroxy-S541-macrolid-forbindelse ved dyrkning af *Streptomyces*-mikroorganismer. Britisk patentskrift nr. 2166436 og europæisk patentskrift nr. 170006 beskriver fremstilling af en klasse af forbindelser, som ansøgerne har betegnet antibiotika S541. Antibiotika S541-substanser har antibiotisk og især anti-endoparasitisk, anti-ectoparasitisk, anti-fungal, insekticid, nematocid og acaricid virkning og er af særlig interesse til anvendelse i landbrug, havebrug og dyre- og menneskesundhedsvæsen.

10 Antibiotika S541-substanser er også nyttige som mellemprodukter ved fremstilling af andre forbindelser, som har den antibiotiske virkning, hvortil der henvises ovenfor.

En antibiotika S541-forbindelse af særlig interesse er forbindelsen med formelen (I)

15



Britisk patentskrift nr. 2166436 og europæisk patentskrift nr. 170006 beskriver fremstilling af forbindelsen med formelen (I) og andre antibiotika S541-forbindelser ved dyrkning af mikroorganismer tilhørende slægten *Streptomyces*. Under de normale dyrkningsbetingelser beskrevet i disse patentskrifter danner *Streptomyces*-mikroorganismene en blanding af forskellige antibiotika S541-forbindelser. Dette giver anledning til to problemer, når der ønskes en specifik antibiotika S541-

20

forbindelse. For det første opnås generelt en relativt lav koncentration af den ønskede antibiotika S541-forbindelse, og for det andet er isolering og adskillelse af den ønskede forbindelse vanskelig fra en blanding af beslægtede forbindelser.

- 5 Ansøgerne har nu fundet, at det er muligt at dyrke en antibiotika S541-dannende *Streptomyces*-stamme på en sådan måde, at mikroorganismen producerer forbindelsen med formlen (I) ovenfor i en højere andel i forhold til andre antibiotika S541-forbindelser end i det tilfælde, hvor mikroorganismen fermenteres under normale fermentationsbetingelser. Forbedringen opnås ved at dyrke *Streptomyces*-mikroorganismen i nærværelse af én eller flere fedtsyrer og/eller salte deraf. På denne måde forøges koncentrationen af forbindelsen med formlen (I), og isoleringen og adskillelsen af forbindelsen med formlen (I) gøres lettere, og der fås fordelagtigt højere udbytter af
- 10
- 15 den således vundne forbindelse.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af en forbindelse med formlen (I) er en sådan, ved hvilken en mikroorganisme af slægten *Streptomyces*, som er i stand til at danne forbindelsen med formlen (I), dyrkes, hvorved forbindelsen med formlen (I) dannes, hvorefter

20 forbindelsen om ønsket isoleres, og fremgangsmåden er ejendommelig ved, at dyrkningen sker i nærværelse af én eller flere C₃₋₈-fedtsyrer og/eller salte af disse syrer.

Mikroorganismer, som er i stand til at producere forbindelsen med formlen (I), kan let identificeres under anvendelse af en test i bekvemt lille skala, i hvilken test nematoden *caenorhabditis elegans* anvendes, fx ved at sætte en testprøve (opnået ud fra fermentation af mikroorganismen) til en suspension af nematoden og undersøge den deraf følgende virkning på nematode-levedygtighed, samt ved analytisk højtrykssvæske-chromatografi af testprøven.

25

- 30 Mikroorganismen vil fortrinsvis være af arten *Streptomyces thermoarchaensis* eller *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus*, især *Streptomyces thermoarchaensis* NCIB 12015 (deponeret 10. september 1984), *Streptomyces thermoarchaensis* NCIB 12111, 12112, 12113 eller 12114 (alle deponeret 26. juni 1985) eller *Streptomyces cyaneogriseus*

noncyanogenus NRRL 15773 (deponeret 3. maj 1984) eller mutanter deraf med i det væsentlige samme egenskaber.

Mutanterne af de ovennævnte stammer kan opstå spontant eller kan dannes ved en række metoder inklusive dem, der er skitseret i *Techniques for the Development of Micro-organisms* af H.I. Adler i "Radiation and Radioisotopes for industrial Microorganisms", Proceedings of the Symposium, Wien 1973, s. 241, International Atomic Energy Authority. Sådanne metoder omfatter ioniserende stråling, kemiske metoder, fx behandling med N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG); varme; genetiske teknikker såsom rekombination, transduktion, transformation, lysogenisation og lysogen konvertering, og selektive teknikker til spontane mutanter og mutanter af alle disse stammer.

Særligt egnede fedtsyrer, som kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er isosmørsyre og valerianesyre.

Den foreliggende opfindelse angår således i et foretrukket aspekt en fremgangsmåde til fremstilling af forbindelsen med formlen (I), ved hvilken fremgangsmåde en mikroorganisme af slægten *Streptomyces*, som er i stand til at producere forbindelsen med formlen (I), dyrkes, hvorved forbindelsen med formlen (I) dannes, hvorefter forbindelsen om ønsket isoleres, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at dyrkningen sker i nærværelse af én eller flere forbindelser valgt blandt isosmørsyre, valerianesyre og saltene af disse syrer.

Eksempler på egnede salte af fedtsyrerne omfatter alkalimetalsalte såsom kalium- eller natriumsalte.

Opfinderne har fundet det fordelagtigt at udføre fremgangsmåden ifølge opfindelsen i nærværelse af to fedtsyrer eller salte deraf. Anvendelse af begge syrer eller deres salte i samme fermentation giver forbindelsen med formlen (I) i et ønsket højt forhold sammenlignet med andre antibiotika S541-forbindelser. Et særlig foretrukket aspekt af opfindelsen angår således en fremgangsmåde til fremstilling af en forbindelse med formlen (I), ved hvilken fremgangsmåde en mikroorganisme af slægten *Streptomyces*, som er i stand til at producere

forbindelsen med formlen (I), dyrkes i nærværelse af to fedtsyrer eller salte deraf, hvorved forbindelsen med formlen (I) dannes.

Opfinderne har fundet, at det er specielt fordelagtigt at anvende isosmørsyre og valerianesyre eller salte deraf. Anvendelse af begge
5 syrer eller deres salte i samme fermentation giver forbindelsen med formlen (I) i et ønsket højt forhold sammenlignet med andre antibiotika S541-forbindelser. Et specielt aspekt af opfindelsen angår således en fremgangsmåde til fremstilling af en forbindelse med
10 formlen (I), ved hvilken fremgangsmåde en mikroorganisme af slægten *Streptomyces*, som er i stand til at producere forbindelsen med formlen (I), dyrkes i nærværelse af isosmørsyre eller et salt deraf og valerianesyre eller et salt deraf, hvorved forbindelsen med formlen (I) dannes.

Hvis der sættes mere end én fedtsyresubstans til fermentationen, kan
15 fedtsyresubstanserne tilsættes sammen i et fast forhold eller, fortrinnsvis, uafhængigt af hinanden. Forholdet kan ændres under dyrkningen efter ønske, enten ved at holde mængden af en substans konstant og ændre mængden af den anden eller ved at ændre mængderne af begge substanser. De præcise mængder må bestemmes empirisk for at
20 tilfredsstille kravene til dyrkningen. Det dyrkningsmedium, der anvendes til dyrkning af mikroorganismen, som producerer forbindelsen med formlen (I), er det medium, som normalt ville være blevet anvendt til fremstilling af den nævnte forbindelse, men med fedtsyren/-syrerne eller saltene deraf tilsat.

25 I almindelighed kan fedtsyresubstansen/-substanserne tilsættes på et hvilket som helst tidspunkt under dyrkningen af mikroorganismen. Opfinderne har imidlertid fundet det fordelagtigt at begynde tilsætning af substansen/substanserne, når dyrkningsmediets pH-værdi begynder at ændres væk fra den naturlige pH-værdi på omkring 5,5-7,5, og/eller
30 når mikroorganismen begynder at danne forbindelsen med formlen (I). Dette kan i almindelighed ske omkring 18 timer inde i dyrkningen. På dette tidspunkt tilsættes fedtsyresubstansen/substanserne for at regulere pH til det ønskede niveau (d.v.s. omkring pH 5,5-7,5, fx pH 7,3-7,4). Den samme eller en anden fedtsyresubstans/ substanser kan
35 derefter tilsættes under hele resten af fermentationen for at holde

pH på det ønskede niveau. Alternativt kan fedtsyresubstansen/-substan-
senerne tilsættes med en fast hastighed under resten af fermenta-
tionen sammen med en vandig syre (fx svovlsyre) eller en base (fx
natriumhydroxid) tilsat efter behov for at holde pH på det ønskede
5 niveau. Den nødvendige mængde fedtsyresubstans/-substanter vil vari-
ere over et bredt område afhængigt af arten af dyrkningsmediet og den
anvendte *Streptomyces*-stamme og må i almindelighed bestemmes empirisk
for at møde hver dyrknings krav. Det er også vigtigt empirisk at be-
stemme, hvorvidt det er nødvendigt at have en akkumulering af fedt-
10 syresubstansen/-substanter i mediet. Opfinderne har imidlertid
fundet, at det kan være at foretrække at undgå tilsætning af fedt-
syresubstansen/-substanter i en mængde, som tillader akkumulering
at finde sted, når fermentationen udføres under anvendelse af mikro-
organismer af arterne *Streptomyces thermoarchaensis* eller *Streptomy-*
15 *ces cyaneogriseus noncyanogenus*.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen vil dyrkningsmediet i alminde-
lighed indeholde andre assimilerbare kilder for carbon, nitrogen og
mineralsalte ud over den/de ovenfor diskuterede fedtsyresubstans/-
-substanter. Egnede kilder til carbon, nitrogen og mineralsalte er
20 diskuteret i britisk patentskrift nr. 2166436 og europæisk patent-
skrift nr. 170006.

Dyrkning af *Streptomyces*-organismen vil i almindelighed blive udført
i overensstemmelse med metoderne beskrevet i britisk patentskrift nr.
2166436 og, hvis det ønskes, kan forbindelsen med formlen (I) skilles
25 fra hele fermentationen ved konventionelle isolerings- og separati-
onsteknikker som beskrevet i ovennævnte britiske og europæiske pa-
tentskrifter. Britisk patentskrift nr. 2166436 og europæisk patent-
skrift nr. 170006 beskriver også egnede metoder til oprensning af
forbindelsen med formlen (I).

30 Opfindelsen illustreres ved følgende eksempler. I nedenstående ek-
sempler betegner L liter.

EKSEMPEL 1

Sporer af *Streptomyces thermoarchaensis* NCIB 12015 blev inokuleret på skråagar fremstillet ud fra følgende bestanddele:

	$g L^{-1}$
5 Gærekstrakt (Oxoid® L21)	0,5
Maltekstrakt (Oxoid® L39)	30,0
Mykologisk pepton (Oxoid® L40)	5,0
Agar nr. 3 (Oxoid® L13)	15,0

Destilleret vand op til 1 L, pH ca. 5,4,

- 10 og inkuberet ved 28°C i 10 dage. Den modnede skråagar blev derefter dækket med 6 ml af en 20% glycerol-opløsning og skrabet med et sterilt værktøj for at løsne sporerne og myceliet. 0,4 ml af den resulterende spore-suspension blev anvendt til at inokulere en 250 ml Erlenmeyer kolbe indeholdende *medium A*:

15	<i>Medium A</i>	$g L^{-1}$
	Glukose	2,5
	Malt Dextrin MD 30E	25,0
	Arkasoy™ 50	12,5
	Melasse	1,5
20	K ₂ HPO ₄	0,125
	CaCO ₃	1,25
	3-(N-morpholino)propansulfonsyre (MOPS)	21,0

Destilleret vand op til 1 L, pH justeret til pH 6,5 inden autoklavering.

- 25 Kulturen blev inkuberet ved 28°C i 2 dage på en rotationsryster, der kørte ved 250 omdr./min. med en orbital bevægelse med en diameter på 50 mm. 2% (volumen/volumen) portioner af det i 2 dage udviklede inokulum blev anvendt til at inokulere yderligere 250 ml Erlenmeyerkolber indeholdende 50 ml *medium A* og inkuberet som beskrevet tidligere.
- 30

80 ml af det samlede rysteflaskeudviklede inokulum blev anvendt til at inokulere en 7-liters fermenter indeholdende *medium B* (4 L):

<i>Medium B</i>	$g L^{-1}$
Glukose	3,75
5 Malt Dextrin MD 30E	37,5
Arkasoy™ 50	18,8
Melasse	2,25
K ₂ HPO ₄	0,188
CaCO ₃	1,88

- 10 pH justeret til pH 6,5 inden autoklivering.

Fermentationerne blev reguleret til en temperatur på 35°C. Kulturen blev omrørt ved 500 omdr./min. og blev luftet med 3 L/min. For at forhindre pH i at stige over pH 7,2-7,4 blev pH reguleret enten ved tilsætning af:

- 15 (i) 10% H₂SO₄ (ifølge metoden beskrevet i eksempel 5 i britisk patentskrift nr. 2166436). 80 ml 10% H₂SO₄ anvendt til pH-regulering og høstet efter 114 timer.

(ii) 50/50 valerianesyre/isosmørsyre

- 110 ml 50/50 valerianesyre/isosmørsyre blev anvendt til pH-regulering fra 18-138 timer,
 20 d.v.s. et gennemsnit på 2,75 g valerianesyre blev anvendt pr. liter pr. dag. På lignende måde blev der anvendt et gennemsnit på 2,75 g isosmørsyre pr. liter pr. dag.

(iii) 40/60 valerianesyre/isosmørsyre

- 115 ml 40/60 valerianesyre/isosmørsyre anvendt til pH-regulering fra 18-138 timer,
 25 d.v.s. der blev anvendt et gennemsnit på 2,3 g valerianesyre pr. liter pr. dag og et gennemsnit på 3,45 g isosmørsyre pr. liter pr. dag.

(iv) 30/70 valerianesyre/isosmørsyre

125 ml 30/70 valerianesyre/isosmørsyre blev anvendt til pH-regulering fra 18-138 timer,

d.v.s. der blev anvendt et gennemsnit på 1,875 g valerianesyre pr.

5 liter pr. dag og et gennemsnit på 4,375 g isosmørsyre pr. liter pr. dag.

(v) 60/40 valerianesyre/isosmørsyre

115 ml 60/40 valerianesyre/isosmørsyre blev anvendt til pH-regulering fra 18-138 timer,

10 d.v.s. der blev anvendt et gennemsnit på 3,45 g valerianesyre pr.

liter pr. dag og et gennemsnit på 2,3 g isosmørsyre pr. liter pr.

dag.

Fermentationerne blev høstet efter 138 timer, medmindre andet er angivet, og koncentrationerne af forbindelsen med formlen (I) blev

15 bestemt som følger:

		Forbindelse med formlen (I)	% af forbindel- sen med formlen (I) i forhold til totale antibio- tika S541-for- delser
5	Syre til pH-regulering	mg/L	
	(i) H ₂ SO ₄ = normal pH- regulering	284	46
10	(ii) 50/50 valerianesyre/ isosmørsyre	474	55
	(iii) 40/60 valerianesyre/ isosmørsyre	504	64
	(iv) 30/70 valerianesyre/ isosmørsyre	236	78
15	(v) 60/40 valerianesyre/ isosmørsyre	348	49

EKSEMPEL 2

Fermentationen ifølge eksempel 1 blev gentaget men under anvendelse af 4 L medium C istedet for medium B.

20	Medium C	gL ⁻¹
	Meritose	45,0
	Arkasoy™ 50	18,8
	Melasse	2,2
	K ₂ HPO ₄	0,18
25	CaCO ₃	1,8
	Silicone™ 1520	0,625

Destilleret vand op til 1 L, pH justeret til 6,5 ved hjælp af vandig H_2SO_4 inden autoklavering.

Fermentationerne blev reguleret til en temperatur på 35°C. Kulturen blev omrørt ved 500 omdr./min. og beluftet med 3 L/min. Fermentationerne blev også underkastet følgende betingelser:

(i) 10% H_2SO_4 tilsat for at forhindre pH i at overstige 7,2-7,4. Der blev anvendt 100 ml 10% H_2SO_4 til pH-regulering. Fermentationen blev høstet efter 138 timer.

(ii) Isosmørsyre tilsat med en gennemsnitlig hastighed på 2,63 g/L/-dag fra 24-162 timer med valerianesyre eller 10% NaOH tilsat efter behov for at regulere pH til pH 7,2-7,4. Der blev anvendt et gennemsnit på 2,17 g valerianesyre pr. liter pr. dag og ialt 2,1 g NaOH.

(iii) Isosmørsyre tilsat med en gennemsnitlig hastighed på 3,71 g/L/-dag fra 24-162 timer med valerianesyre eller 10% NaOH tilsat efter behov til regulering af pH til pH 7,2-7,4. Der blev anvendt et gennemsnit på 4,46 g valerianesyre pr. liter pr. dag og ialt 2,6 g NaOH.

(iv) Isosmørsyre tilsat med en gennemsnitlig hastighed på 4,38 g/L/-dag fra 24-162 timer med valerianesyre eller NaOH tilsat efter behov til regulering af pH til pH 7,2-7,4. Der blev anvendt et gennemsnit på 3,13 g valerianesyre pr. liter pr. dag og ialt 3,0 g NaOH.

Fermentationerne blev høstet efter 162 timer, medmindre andet er angivet, og koncentrationerne af forbindelsen med formlen (I) blev bestemt som følger:

		Forbindelse med formlen (I)	% af forbindel- sen med formlen (I) i forhold til totale antibio- tika S541-for- delser
5	Syre til pH-regulering	mg/L	
	(i) H ₂ SO ₄ = normal pH- regulering	460	46
10	(ii) Et gennemsnit på 2,63 g/L/dag isosmørsyre	804	69
	(iii) Et gennemsnit på 3,71 g/L/dag isosmørsyre	714	58
15	(ii) Et gennemsnit på 4,38 g/L/dag isosmørsyre	921	78

EKSEMPEL 3

20 *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus* NRRL 15773, der var blevet
opbevaret i flydende nitrogen, blev anvendt til at inokulere en
250 ml rystekolbe indeholdende 50 ml *medium A* og inkuberet ved 28°C i
2 dage på en rotationsryster kørt ved 250 omdr./min. med en orbital
bevægelse med en diameter på 50 mm. 1 ml-portioner af dette i 2 dage
udviklede inokulum blev anvendt til at inokulere yderligere 250 ml
25 rystekolber indeholdende 50 ml *medium A* og inkuberet som beskrevet
tidligere.

80 ml af det samlede rystekolbe-udviklede inokulum blev anvendt til
at inokulere en 7-liters fermenter indeholdende 4 L *medium C*.

Fermentationen blev reguleret til en temperatur på 30°C. Kulturen blev omrørt ved 500 omdr./min. og beluftet med 3 L/min. pH blev reguleret ned til pH 7,4 ved tilsætning af 50/50 valerianesyre/isosmørsyre fra 18-162 timer inde i fermentationen.

- 5 Fermentationen blev høstet efter 162 timer, hvilket gav 250 mg/L af forbindelsen med formlen (I) svarende til 84% af de totale dannede antibiotika S541-forbindelser.

EKSEMPEL 4

- 10 Inokuleringstrinnene ifølge eksempel 1 under anvendelse af *medium A* blev fulgt. 80 ml af det samlede rystekolbe-udviklede inokulum blev anvendt til at inokulere en 7-liters fermenter indeholdende 4 L *medium D*.

<i>Medium D</i>	$g L^{-1}$
Glucose	2,5
15 Malt Dextrin MD 30E	25,0
Arkasoy™ 50	12,5
Melasse	1,5
K ₂ HPO ₄	0,125
CaCO ₃	1,25

- 20 Destilleret vand til 4 L, pH justeret til 6,5 før autoklivering.

Fermentationen blev foretaget i 24 timer ved en temperature på 28°C, idet kulturen blev omrørt (500 omdr./min.) og beluftet (3 L/min.).

- 25 800 ml af dette 24-timers udviklede inokulum blev anvendt til at inokulere en 70-liters fermenter indeholdende 40 L *medium D*. Fermentationen blev foretaget i 24 timer ved en temperatur på 28°C, idet kulturen blev omrørt (550 omdr./min.) og beluftet (30 L/min.).

800 ml af dette efter 24 timer udviklede inokulum blev anvendt til at inokulere 40 L *medium B* i en 70-liters fermenter.

Fermentationen blev reguleret til en temperatur på 34°C. Kulturen blev omrørt (550 omdr./min.) og beluftet (40 L/min.), og 50/50 valerianesyre/isosmørsyre blev tilsat med en gennemsnitlig hastighed på 10 ml/time fra 21 til 117 timer, idet 10% H₂SO₄ og 10% NaOH blev
5 tilsat efter behov for at regulere pH til omkring pH 7,4.

Fermentationen blev høstet efter 117 timer, hvilket gav 944 mg/L af forbindelsen med formlen (I) svarende til 79% af de totale dannede antibiotika S541-forbindelser.

EKSEMPEL 5

10 Inokuleringstrinnene fra eksempel 1 under anvendelse af *medium A* blev fulgt. 80 ml af det rystekolbe-udviklede inokulum blev anvendt til at inokulere en 7-liters fementer indeholdende 4 L *medium D*. Fermentationen blev foretaget i 24 timer ved 28°C, idet kulturen blev omrørt (500 omdr./min.) og beluftet (4 L/min.).

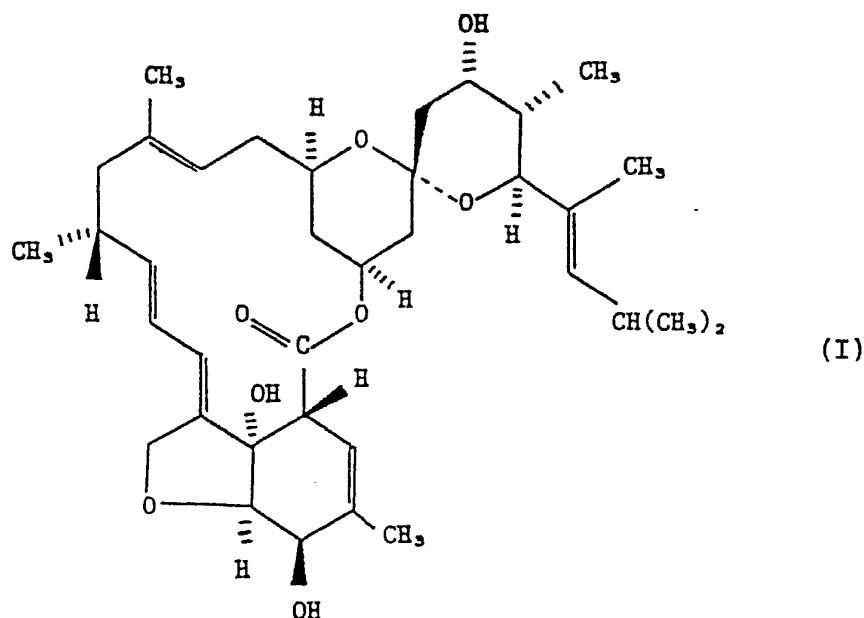
15 800 ml af dette 24-timers-udviklede inokulum blev anvendt til at inokulere en 70-liters fermenter indeholdende 40 L *medium C*.

Fermentationstemperaturen blev reguleret til 34°C. Fermenteren blev omrørt (550 omdr./min.) og blev beluftet (40 L/min.), og pH blev reguleret til omkring pH 7,3 ved tilsætning af enten (1) 80/20 valerianesyre/isosmørsyre med en gennemsnitlig hastighed på 6,67 g/L/dag fra
20 18 timer til 162 timer eller (2) 75/25 valerianesyre/isosmørsyre tilsat med en gennemsnitlig hastighed på 6,34 g/L/dag fra 18 til 186 timer.

Fermentationerne blev høstet efter henholdsvis 162 og 186 timer og
25 gav enten (1) 510 mg/L af forbindelsen med formlen (I) svarende til 61% af de totale dannede antibiotika S541-forbindelser eller (2) 516 mg/L af forbindelsen med formlen (I) svarende til 72% af de totale antibiotika S541-forbindelser.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en 5-hydroxy-S541-macrolidforbindelse med formlen (I):



5

ved hvilken en mikroorganisme af slægten *streptomyces*, som er i stand til at producere forbindelsen med formlen (I), dyrkes, hvorved forbindelsen med formlen (I) dannes, hvorefter forbindelsen om ønsket isoleres,

10 k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningen sker i nærværelse af én eller flere C₃₋₈fedtsyrer og/eller salte af disse syrer.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at fedtsyren er isosmørsyre eller valerianesyre.

15 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen dyrkes i nærværelse af isosmørsyre (eller et salt deraf) og valerianesyre (eller et salt deraf).

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at fedtsyren/-syrerne tilsættes til at
justere dyrkningsmediets pH til 5,5-7,5, og pH-værdien derefter
holdes i dette område ved, at fedtsyren/-syrerne eller en anden/andre
5 fedtsyre(r) tilsættes under resten af fermentationen eller ved, at
fedtsyren/-syrerne tilsættes ved en fast hastighed under resten af
fermentationen sammen med en vandig syre eller base.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen er af arten *Strepto-*
10 *myces thermoarchaensis* eller *Streptomyces cyaneogriseus noncyano-*
genus.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen er *Streptomyces ther-*
moarchaensis NCIB 12015, 12111, 12112, 12113 eller 12114 eller *Strep-*
15 *tomyces cyaneogriseus noncyanogenus* NRRL 15773, eller er en mutant af
en hvilken som helst af disse stammer og har i det væsentlige samme
egenskaber.