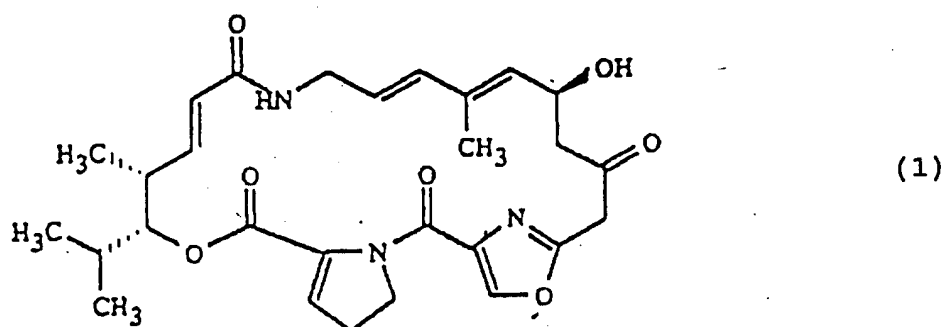


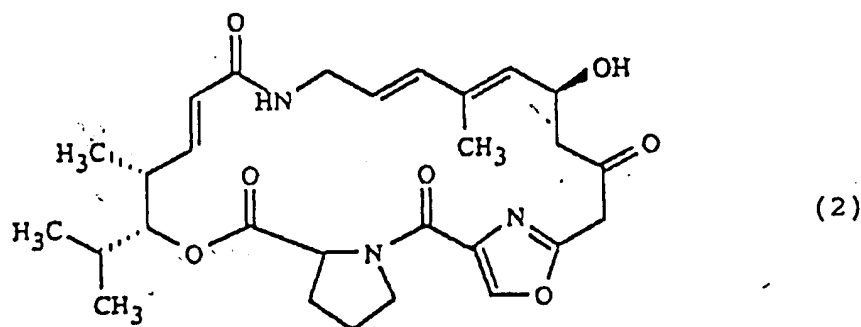
五、發明說明()

本發明係關於巨內酯之生物轉化，及更特定言之，係關於巨內酯之酵素製備方法。

本發明提供一種製備式(1)化合物之方法



其包括以一種鏈黴菌微生物或衍生自該微生物之一種非細胞製劑處理式(2)之巨內酯



該微生物或製劑能氧化 A 族鏈黴殺陽菌素之多不飽和巨內酯之 D - 脯胺酸基之 2 - 3 鍵成為去氫脯胺酸基。

式(1)及(2)之巨內酯視其來源有不同的名稱(見表)。

五、發明說明()

年 月 日	修正
84.7.11	補充

式 (1)

式 (2)

普利斯汀黴素

普利斯汀黴素

(Pristinamycin) PIIA

(pristinamycin) IIB

米加黴素(mikamycin) A

牡蠣菌素(ostreogrycin) A

牡蠣菌素 G

鏈黴殺陽菌素(streptogramin) A

協同素(synergistine) A1

春黴素(vernamycin) A

佛吉尼亞黴素(virginiamycin) M1佛吉尼亞黴素 M2

這些分子具有多不飽和巨內酯之一般結構，其出現在鏈黴殺陽菌素族之抗生素中。這些抗生素由一種多不飽和巨內酯（A族之成分）及一種縮酸肽（B族之成分）之相乘組合所組成。這些抗生素之作用方式及抗微生物之活性已經由多位作者研究（Tanaka 等人，Antibiotics vol. III p. 487, Springer Berlin, 1975；Vasquez 等人，Antibiotics vol. III p. 521, Springer Berlin, 1975）。

這些不同的研究已經示知只有以式(1)之巨內酯作為A族之成分時，才能獲得較佳的相乘作用。

此A族鏈黴殺陽菌素之多不飽和巨內酯之一項特點是只

五、發明說明()

稍溶於水性媒質中。此為這些化合物藥理學開發方面之主要阻力，由於其投藥方式因而受限制。為克服此缺點，已經發展出新穎水可溶的半合成衍生物(EP 135410；EP 191662；US 4775753)。用於製備這些衍生物之半合成途徑主要包括加硫醇至此巨內酯去氫脯胺酸之2-3不飽和鍵。因此，僅式(1)之巨內酯可以用於此半合成途徑中。

然而，在現行的生產系統中，式(1)及(2)之巨內酯係同時製得，且與其他鏈黴殺陽菌素成份混合。

因此，要能夠在生產培養基中增加式(1)化合物對式(2)化合物之比例有其重要性。

要能夠轉化與式(1)之化合物同時製得之式(2)化合物成為式(1)之化合物，及同時自醱酵培養液中分離，也有其重要性。

最近，Purvis 等人教示在式(1)巨內酯之生物合成中，式(2)之巨內酯是中間物(J. Amer. Chem. Soc., 1989, 111, 5931)。然而，在此文獻中，未描述或提出利用此反應機制之方法。

申請人茲發現可藉一種鏈黴菌微生物或由其衍生之一種非細胞製劑，能以高產率轉化式(2)之巨內酯成為式(1)之巨內酯。

根據本發明，在一種鏈黴菌微生物或衍生自此微生物之一種非細胞製劑之存在下，處理式(2)之化合物以製備式(1)之化合物，該微生物或製劑能氧化A族鏈黴殺陽菌素之多不飽和巨內酯之D-脯胺酸基之2-3鍵成為去氫脯胺酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

年 月 日 修正
84.7.11 補充

基。

在醱酵製程期間及醱酵製程之後均可使用本發明以製備此巨內酯。

於醱酵後，本發明使得以自醱酵培養液中分離出且不能直接精製之巨內酯 (2) 產製巨內酯 (1)。本發明使能夠以高產率轉化此巨內酯 (2) 成為一種半合成反應之基質。

於醱酵期間，本發明使能夠直接耗用衍生自醱酵製程中之混合物中之巨內酯 (2) 以增加巨內酯 (1) 之量。確實能夠將一種鏈黴菌微生物或自此微生物衍生且具所需氧化活性之一種非細胞製劑直接加入此巨內酯產製培養基中。

在本發明之一個特定具體實施例中，是直接加入鏈黴菌微生物或自其衍生之非細胞製劑至此巨內酯 (2) 之產製培養基中。

在本發明之一個較佳具體實施例中，此化合物 (2) 是以一種衍生自鏈黴菌微生物之非細胞製劑處理。

因此，本發明使能夠以一種簡單方式產製巨內酯 (1)，化合物 (2) 之轉化程度當使用完整的微生物時，高達 50%，及當使用衍生自這些微生物之非細胞製備時，超過 90%。

可以用於本發明之鏈黴菌微生物可以以數種方式選擇。特定言之，本發明提供一種試驗，其可鑑定具所需酵素活性之微生物及估計所獲之活性。此試驗包括進行下列步驟：

- 在標記之化合物 (2) 之存在下，培養受試之鏈黴菌微生物或自其衍生之非細胞製劑之培養液，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

- 於一段期間內取出此培養基樣品，
- 分離化合物(1)及(2)，
- 測定化合物(1)中併入之標記，及
- 計算此標記對導入之標記之比例。

由如此獲得之比例得以測定轉化為化合物(1)之量，及因此得以測定被培養之微生物之酵素活性程度。需知微生物之選擇可以藉任何其他能偵測是否有酵素活性之方法進行，且較佳的計量方式是視情況選用的。

使用此選擇方法，已經鑑定出許多種具有高酵素活性之鏈黴菌微生物。特別是，產生鏈黴殺陽菌素及巨內酯(1)之鏈黴菌通常可適用本發明之方法。

特定言之，產生鏈黴殺陽菌素之微生物通常適合用於本發明之方法中，產生巨內酯(1)之微生物亦然。

在這些微生物中，可以特別提及下列菌株：

始旋鏈黴菌 (*Streptomyces pristinaespiralis*)

亞伯鏈黴菌 (*Streptomyces alborectus*)

澱粉酶鏈黴菌 (*Streptomyces diastaticus*)

禾生鏈黴菌 (*Streptomyces graminofaciens*)

三鷹鏈黴菌 (*Streptomyces mitakaensis*)

勞意德鏈黴菌 (*Streptomyces loidensis*)

橄欖色鏈黴菌 (*Streptomyces olivaceus*)

奧斯特鏈黴菌 (*Streptomyces ostreogriseus*)，及

弗吉尼亞鏈黴菌 (*Streptormycsa virginial*)。

五、發明說明()

這些微生物可以在標準需氧醱酵條件下培養。特定言之，此營養培養基通常一種碳來源、一種氮來源及無機鹽類所組成。作為碳來源，特別可以使用糖類、油類、有機酸類、糊精類、澱粉類、甘油等。作為氮來源，可以是胺基酸類、植物粗粉及萃取物（麥芽、大豆、棉籽、蕃茄、玉米等）、內臟、各種水解物（酪蛋白、酵母等）及工業副產物，諸如“酒廠之可溶物”。作為礦物質來源，可以使用鈉、鉀、銨或鈣之氯化物、硝酸鹽、碳酸鹽、硫酸鹽及磷酸鹽或微量元素，諸如鎂、鐵、銅、鋅、錳或鈷。此外，使用上述之選擇試驗，申請人已示知所需之酵素活性是由受試之多種微生物短暫地表現。已進行此酵素活性表現之動力學，其使得以界定受試微生物酵素活性之表現是顛峯峰之生長期。於是，使本發明方法之產率有相當程度的改良。

在本發明之一個較佳具體實施例中，使用一種鏈黴菌微生物或衍生自一種微生物之非細胞製劑，其係處於酵素活性之顛峰最佳產生階段。

根據本發明，還可以在第一選擇階段之後，使用具所需酵素活性之鏈黴菌微生物以製備衍生之菌株，其表現更佳的催化潛力及 / 或可使工業利用更有效率。此類菌株可以藉使用多種突變方法而獲得，諸如：

- 物理作用物：X射線、紫外線，
- 化學作用物：烷基化（甲烷磺酸乙酯、亞硝基胍、NQO等）、雙官能烷基化或嵌入劑，

五、發明說明 ()

修正
年 月 日
84.7.11 補充

- 用於突變性插入至 DNA 中之系統：基因轉移子、整合質體、噬菌體或前噬菌體等，

或熟諳此技藝者所知之任何其他技藝。

根據本發明，還可以在眾多具有所需酵素活性之鏈黴菌細胞族群中，選擇在本發明方法中具有最佳酵素活性及 / 或得到最佳產率者。

在本發明之一個特定具體實施例中，使用一種產生鏈黴殺陽菌素之微生物或一種衍生自產生鏈黴殺陽菌素微生物之微生物。

較佳使用選自下列之微生物：

始旋鏈黴菌	ATCC 25486
奧斯特鏈黴菌	ATCC 27455
三鷹鏈黴菌	ATCC 15297
橄欖色鏈黴菌	ATCC 12019
勞意德鏈黴菌	ATCC 11415

或自其衍生之微生物。

此酵素轉化反應可以在醱酵培養基或在經過緩衝之水性培養基中進行，視使用完整的微生物抑或非細胞製劑，及此程序是直接在大內酯生產培養基中進行抑制或使用自醱酵培養基中分離出之化合物 (2) 而定。

當使用非細胞製劑時，加入一或多種酵素輔因子至此反應培養基中可能是有利的。特定言之，下列因子可能可改良

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

反應產率：NAD、NADP、NADH、NADPH、FAD及FMN。

熟諳此技藝者可以根據所使用之條件調節其他反應參數。

本發明之另一個主題係關於此衍生自鏈黴菌微生物之非細胞製劑，其具一種酵素活性，能氧化A族鏈黴殺陽菌素之多不飽和巨內酯之D-脯胺酸之2-3鍵成為去氫脯胺酸。

可以藉許多種方法獲得這些非細胞製劑。特別是藉(a)斷裂上述之微生物及(b)選擇性移除細胞碎屑而獲得。

可以使用多種方法斷裂此微生物，及特別是物理、化學或酵素方法。可以提及之物理方法如超音波、使用玻璃珠或法國壓機研磨，及酵素方法，如溶菌酶。

可以直接在細胞醱酵培養基中進行斷裂。然而，此程序以在經緩衝之水性培養基中進行為佳。就此而言，可以使用無機緩衝液(磷酸鉀等)或有機緩衝液(Bis-Tris, Bis-Tris 丙烷)。此外，此反應在還原劑之存在下進行為佳。特別是可以使用二硫蘇糖醇。視起始的微生物及斷裂條件，可以調節此非細胞製劑之pH至介於pH 5.0及pH 8.0，及以介於6及7為佳。

當需要時，可以以多種方式移除此細胞碎屑，最簡單的方式包括將此於斷裂後獲得之懸浮液離心及溶解上澄液。

為檢定此非細胞製劑確具所需之酵素活性或為選擇活性最佳的非細胞製劑，可以使用上述之試驗選擇微生物。

得具顛峰活性之非細胞製劑，可以在斷裂階段之前，測定整體微生物對應於酵素活性之最高表現之階段。特別是可以使用由上述試驗所得之動力學曲線。

在產製本發明之非細胞製劑之方法中，較佳是在酵素活性顛峰生產階段斷裂微生物。

圖式描述

圖式顯示，於實例 2 所描述之情況，橄欖色鏈黴菌培養菌之壽命與 (1) 在培養基中鏈黴殺陽菌素 A 效價及 (2) 以如實例 2 所述製得之非細胞製劑將化合物 (2) 轉化成化合物 (1) 之百分比間之關係。

以下列實例說明本發明。

實例 1

此實例描述碳 14-放射性標記之巨內酯 (2) 之製備方法。

將 [U-¹⁴C]-L-脯胺酸 (750 微居里) 加至始旋鏈黴菌培養物中，其已在錐形燒瓶中之生產培養基上培養 17 小時 (參看實例 3)。當此培養物達 24 小時，將其收集及藉以下列程序萃取巨內酯 (1) 及 (2)。

加入 0.1M 磷酸鹽緩衝液 (pH 2.9, 55 毫升) 及乙腈 (25 毫升) 至此培養物 (30 毫升) 中，及攪拌此混合物，再離心處理。於上澄液部分蒸發之後，以二氯甲烷 (3 x 1 體積) 萃取及將 3 個二氯甲烷相合併及乾燥。以含甲醇 (2%) 之氯仿溶解殘留物，及然後注入至一支矽凝膠管柱中，及以含甲醇 (5%) 之氯仿溶離化合物 (2)。藉薄層層析法在矽凝膠上純化化合物 (2)，係使用含甲醇 (8%) 之氯仿作溶離劑。

五、發明說明()

於使用前藉 HPLC 在 Nucleosil C8 管柱 (實例 3 中描述之系統) 中再純化。

若為非細胞製劑 (參看圖 1)，加入標記之脯胺酸之時間選擇對獲得高比活性值很重要。

實例 2

此實例描述一種試驗，供選擇可以用於本發明之微生物，其也說明酵素活性視開始生產鏈黴殺陽菌素後移出培養液之時間而定。

受試驗之微生物是橄欖色鏈黴菌 ATCC 12019，其培養於實例 6 之條件下。於不同的時間，以下列方式自此培養液試樣製備一種非細胞製劑：一粒離心小丸 (5 克)，以 pH 7.2 且含 10% 體積 / 體積之甘油 0.1M 磷酸鹽緩衝液洗滌，混入 100 mM Bis-tris 丙烷緩衝液中，其 pH 6.8 (10 毫升) 含二硫蘇糖醇 (5 mM) 及溶菌酶 (0.2 毫克 / 升)。於 27℃ 培養此懸浮液 30 分鐘及然後以 30,000 g 離心 30 分鐘。

將含此蛋白 (50 微克) (衍生自以上所得之製劑) 之非細胞萃取物以總體積 500 微升在 50 mM Bis-tris 丙烷緩衝液中，其 pH 6.8 且含 NADH (0.25 微莫耳)、FMN (1 毫微莫耳) 及以碳 14 依照實例 1 方法標記 (即 55 毫微居里) 之化合物 (2) (3.65 微克)，於 27℃ 下培養 1 小時。此反應藉加入乙腈 (500 微升) 及 0.1N 鹽酸 (500 微升) 停止。

於均質化及離心處理後，將上澄液注入一支 15 公分 5 μ Nucleosil C8 分析管柱中，以 CH₃CN (34%) 及 0.1M 磷酸鹽

五、發明說明()

緩衝液之混合物，pH 2.9 (66%)以0.8毫升 / 分鐘溶離。
此化合物(1)及(2)藉分光光度計於206毫微米偵測，及藉放射化學偵測加以測定。

所得之結果列於圖1中。它們示知 *S. olivaceus* 具所需之酵素活性。它們也示知此活性是短暫地表現，顛峰生產階段是在培養21小時左右。最後，它們也示知活性開始於鏈黴殺陽菌素生產階段開始，但活性非細胞萃取物可以在鏈黴殺陽菌素生產開始之前製備。

實例 3

此實例說明當使用一種完整微生物之本發明方法。

於無菌條件下加入始旋鏈黴菌 ATCC 25486 孢子之懸浮液 (0.5 毫升) 至一種接種培養基 (40 毫升) 中，其係在一個 300 毫升之錐形燒瓶中。此接種培養基由玉米漿 (10 克 / 升)；蔗糖 (15 克 / 升)； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 克 / 升)； K_2HPO_4 (1 克 / 升)； NaCl (3 克 / 升)； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 克 / 升)； CaCO_3 (1.25 克 / 升) 組成。在導入碳酸鈣之前，以氫氧化鈉調節 pH 至 6.9。在一台迴轉搖動機上，以速率 325 轉 / 分鐘在 27°C 下搖動此錐形燒瓶 46 小時 30 分鐘。

將以上已培養 46 小時 30 分鐘之培養物在無菌條件下加入至生產培養基 (30 毫升) 中，其係在一個 300 毫升之錐形燒瓶中。此生產培養基由大豆餅 (25 克 / 升)；澱粉 (7.5 克 / 升)；葡萄糖 (22.5 克 / 升)；圓釀母 (3.5 克 / 升)；硫酸鋅 (0.5 克 / 升)；及碳酸鈣 (6 克 / 升) 組成。在加入碳酸鈣之前，以鹽酸調節 pH 至 6。此錐形燒瓶於 27°C 下，在一

五、發明說明()

台迴轉搖動機上以325轉/分鐘搖動24小時。於時間0及17小時30分鐘時，加入依照實例1方法製備之碳14-標記之化合物(2)(10毫/升)(即每錐形燒瓶5.2微居里之 ^{14}C)至這些錐形燒瓶中。於時間24小時，藉加入 CH_3CN (34%)及0.1 M 磷酸鹽緩衝液 pH 2.9(66%)之混合物(2容積)停止反應。於均質化及離心處理後，將上澄液(200微升)注入至5 μ Nucleosil C8 管柱中：以 CH_3CN (34%)及0.1 M 磷酸鹽緩衝液 pH 2.9(66%)之混合物溶離，以測定自放射性化合物(2)生成之化合物(1)。計算化合物(2)轉化為化合物(1)之程度是從化合物(1)中發現之放射性對導入至錐形燒瓶中之放射性(錐形燒瓶加蓋有空氣循環：空氣流量1升/分鐘)。

結果如下：

化合物(2)添加時間	轉化程度 (%)	殘留化合物(2) (%)
0	36	11
17小時30分鐘	45	29

實例 4

重覆實例3中所述之程序，使用奧斯特鏈黴菌 ATCC

五、發明說明()

24455孢子之懸浮液。獲得之結果如下：

化合物(2)添加時間	轉化程度(%)	殘留化合物(2)(%)
17小時30分鐘	44	19

實例 5

重覆實例 3 中所述之程序，使用三鷹鏈黴菌 ATCC 15297 孢子之懸浮液。所得之結果如下：

化合物(2)添加時間	轉化程度(%)	殘留化合物(2)(%)
0	34	10
17小時30分鐘	43	18

實例 6

重覆實例 3 中所述之程序，使用橄欖色鏈黴菌 ATCC 12019 孢子之懸浮液。所得之結果如下：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

化合物(2)添加時間	轉化程度(%)	殘留化合物(2)(%)
0	39	14
17小時30分鐘	50	16

實例 7

重覆實例 3 中所述之程序，使用勞意德鏈黴菌 ATCC 11415 孢子懸浮液。獲得之結果如下：

化合物(2)添加時間	轉化程度(%)	殘留化合物(2)(%)
0	46	11
17小時30分鐘	53	16

實例 8

將在實例 6 中之條件下獲得之培養 22 小時 30 分鐘之橄欖色鏈黴菌 ATCC 12019 培養物之一粒離心小丸(5 克)，以含

五、發明說明()

甘油(10%體積 / 體積)之0.1 M磷酸鹽緩衝液 pH 7.2 洗滌後，置於50mM Bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8 (10毫升)中。

與依照實例 1 方法以碳 14 (55毫微居里)標記之化合物 (2) (3.65微克)培養此製備物(500微升)，於27℃為時2小時。於培養終了時，加入0.1M磷酸鹽緩衝液 pH 2.9(66%)及乙腈(34%)之混合物(1毫升)。於均質化及離心處理後，藉 HPLC(實例 3)分析此上澄液(200 微升)以測定放射性化合物 (1)。

化合物 (2) 轉化為化合物 (1) 之程度是 30%。

實例 9

在實例 7 中之條件下獲得之培養 17 小時 30 分鐘之勞意德鏈黴菌 ATCC 11415 培養物之一粒離心小丸(5克)，以含甘油(10%體積 / 體積)之0.1M磷酸鹽緩衝液 pH 7.2洗滌後，置於50mM Bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8 (10毫升)中。

與依照實例 1 方法以碳 14 (55 毫微居里)標記之化合物 (2) (3.65微克)培養此製備物(500微升)，於27℃為時2小時。於培養終了時加入0.1 M 磷酸鹽緩衝液 pH 2.9(66%)及乙腈(34%)之混合物(1毫升)。於均質化及離心處理後，藉 HPLC (實例 3)分析此上澄液(200微升)以測定放射性化合物 (1)。

化合物 (2) 轉化為化合物 (1) 之程度是 53%。

實例 10

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

在實例 3 中之條件下獲得之培育 19 小時之始旋鏈黴菌培養物之一粒離心小丸 (5 克)，以含甘油 (10% 體積 / 體積) 之 0.1 M 磷酸鹽緩衝液 pH 7.2 洗滌後，置於含二硫蘇糖醇 (5mM) 及溶菌酶 (0.2 毫克 / 升) 之 100mM Bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8 (10 毫升) 中。於 27℃ 培養此懸浮液 30 分鐘及然後於 30,000 g 離心 30 分鐘。此上澄液構成非細胞製劑。

在第一實驗中，此製劑 (207 微升) (1 毫克蛋白) 是以總體積 500 微升在 50mM Bis-tris 丙烷緩衝液中於 27℃ 培養 1 小時，其 pH 6.8 含 NADH (0.25 微莫耳)；FMN (1 毫微莫耳) 及依照例 1 以碳 14 (55 毫微居里) 標記之化合物 (2) (3.65 微克)。

在第二實驗中，使用此非細胞製劑 (414 微升) (2 毫克蛋白質)。

藉加入 CH_3CN (500 微升) 及 0.1N 鹽酸 (500 微升) 停止此反應。於均質化及離心處理後，將上澄液 (200 微升) 注入一支 5 μ Nucleosil C8 管柱中，以 CH_3CN (34%) 及 0.1M 磷酸緩衝液 pH 2.9 (66%) 之混合物溶離以測定此放射性化合物 (2) 生成之化合物 (1)。如實例 3 之方法計算化合物 (2) 轉化為化合物 (1) 之程度。

所得之結果如下：

五、發明說明()

懸浮液體積	轉化程度(%)	殘留化合物②(%)
207微升	63	29
414微升	76	17

實例 11

在實例 6 中之條件下獲得之培養 21 小時之橄欖色鏈黴菌 ATCC 12019 培養物之一粒離心小丸(5 克)，以含甘油(10% 體積 / 體積)之 0.1M 磷酸鹽緩衝液 pH 7.2 洗滌後，置於含二硫蘇糖醇(5mM)及溶菌酶(0.2 毫克 / 升)之 100mM Bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8 (10 毫升)中。於 27℃ 培養此懸浮液 30 分鐘及然後於 30,000 g 離心 30 分鐘。此上澄液構成非細胞製劑。

含蛋白質(0.1 毫克)之非細胞萃取物(22 微升之以上製劑)以總體積 500 微升在 50mM Bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8 中於 27℃ 培養 1 小時，其含 NADH(0.25 微莫耳)；FMN(1 毫微莫耳)及依照實例 1 方法以碳 14(55 毫微居里)標記之化合物②(3.65 微克)。

藉加入 CH_3CN (500 微升)及 0.1N 鹽酸(500 微升)停止此反應。於均質化及離心處理後，藉 HPLC 分析此上澄液(200 微

五、發明說明()

升)以測定此放射性化合物(1)。

化合物(2)轉化為化合物(1)之程度是93%。

實例12

在實例7中之條件下獲得之培養17小時30分鐘之勞意德鏈黴菌 ATCC 11415 培養物之一粒離心小丸(5克)，以含甘油(10%體積/體積)之0.1M 磷酸鹽緩衝液 pH 7.2 洗滌後，置於含二硫蘇糖醇(5mM)及溶菌酶(0.2毫克/升)之100mM Tris 丙烷緩衝液 pH 6.8(10毫升)中，於27℃培養此懸浮液30分鐘及然後於30,000g 離心30分鐘。此上澄液構成非細胞製劑。

此非細胞製劑(79微升)，即0.2毫克之蛋白質，是以總體積500微升在50mM Bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8中於27℃培養1小時，其含NADH (0.25微莫耳)；FMN (1毫微莫耳)及依照實例1方法以碳14(55毫微居里)標記之化合物(2)。

加入CH₃CN(500微升)及0.1N鹽酸(500微升)停止此反應。於均質化及離心後，藉HPLC分析此上澄液以測定此放射性化合物(1)。

化合物(2)轉化為化合物(1)之程度是92%。

四、中文發明摘要(發明之名稱：

巨內酯之酵素製備方法)

自含一個 D - 脯胺酸基之對應巨內酯製備 A 族鏈黴殺陽菌素之多不飽和巨內酯，其係藉以一種微生物，或衍生自一種微生物之非細胞製劑處理而達成，該微生物或製劑能氧化此巨內酯 D - 脯胺酸基之 2 - 3 鍵成為去氫脯胺酸基。

英文發明摘要(發明之名稱：

"PROCESS FOR THE ENZYMATIC PREPARATION OF MACROLACTONE")

Polyunsaturated macrolactones of group A streptogramins are prepared from corresponding macrolactones containing a D-proline residue by treatment with a microorganism, or an acellular preparation derived from a microorganism, capable of oxidising the 2-3 bond of the D-proline residue of macrolactone to a dehydroproline residue.

附註：本案已向

國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

法

1991.3.28

9103779

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

298603

83年2月4日 修正
補充

公告本

298603

A4
C4

修正頁 83.2.

申請日期	81.03.26
案 號	81102311
類 別	Int. Cl. 6 C12P 21/04

(以上各欄由本局填註)

發明
專利說明書

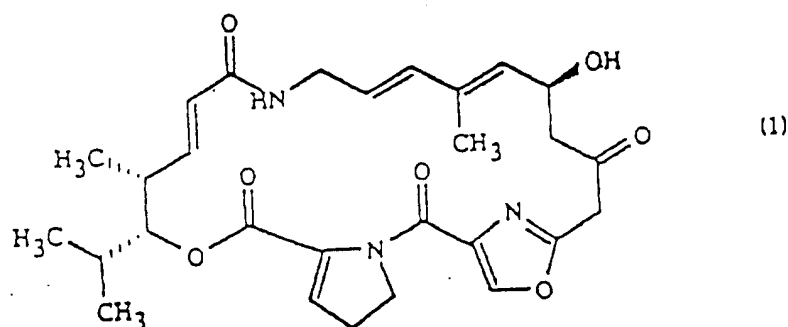
一、發明 名稱	中 文	巨內酯之酵素製備方法
	英 文	PROCESS FOR THE ENZYMIC PREPARATION OF MACROLACTONE
二、發明人 創作	姓 名	1. 法蘭西斯·布蘭奇 2. 丹尼斯·特布特
	籍 貫 (國籍)	均法國
	住、居所	1. 法國巴黎市索里塔瑞斯路41號 2. 法國巴黎市健寇利路28號
三、申請人	姓 名 (名稱)	法商隆寶蘭洛爾公司
	籍 貫 (國籍)	法國
	住、居所 (事務所)	法國安東尼市雷蒙阿諾大道20號
	代 表 人 姓 名	賈奎斯·皮拉德

六、申請專利範圍

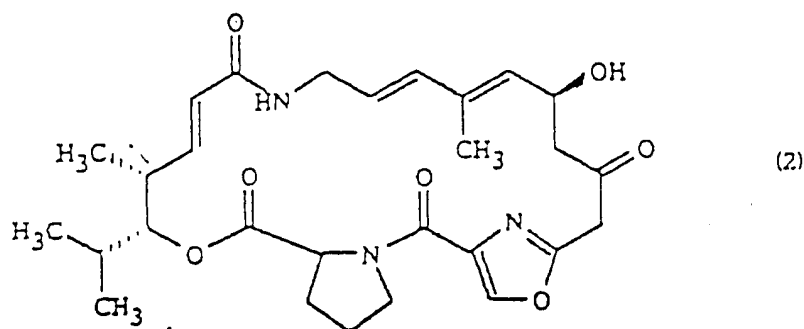
修正
年 月 日
84.7.11 補充

公 告 本

1. 一種製備式(1)化合物之方法，



其包括以一種鏈黴菌屬微生物或衍生自該微生物之一種非細胞製劑處理式(2)化合物，該微生物或製劑能氧化A族鏈黴殺陽菌素(streptogramin)之多不飽和巨內酯之D-脯胺酸基之2-3鍵成為去氫脯胺酸基，



而得到式(1)化合物。

2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該微生物或非細胞製劑是直接加至化合物(2)之產製培養基中。
3. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該反應是在一種經緩衝之水性培養基中進行。

六、申請專利範圍

4. 根據申請專利範圍第1、2或3項之方法，其中式(2)之化合物是以一種非細胞製劑處理而得。
5. 根據申請專利範圍第1、2或3項之方法，其中使用處於酵素活性顛峰產製階段的該微生物或衍生自該微生物的一種非細胞製劑。
6. 根據申請專利範圍第1、2或3項之方法，其中該鏈黴菌微生物是一種產生鏈黴殺陽菌素微生物或衍生自一種產生鏈黴殺陽菌素微生物之微生物。
7. 根據申請專利範圍第6項之方法，其中此微生物是選自下列菌株：始旋鏈黴菌 (Streptomyces pristinaespiralis)，亞伯鏈黴菌 (Streptomyces alborectus)，澱粉酶鏈黴菌 (Streptomyces diastaticus)，禾生鏈黴菌 (Streptomyces graminofaciens)，三鷹鏈黴菌 (Streptomyces mitakaensis)，勞意德鏈黴菌 (Streptomyces loidensis)，橄欖色鏈黴菌 (Streptomyces olivaceus)，奧斯特鏈黴菌 (Streptomyces ostreoriseus)及弗吉尼亞鏈黴菌 (Streptomyces virginiae)，及這些菌株之衍生物。
8. 根據申請專利範圍第4項之方法，其係在一或多種酵素輔因子之存在下進行反應。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

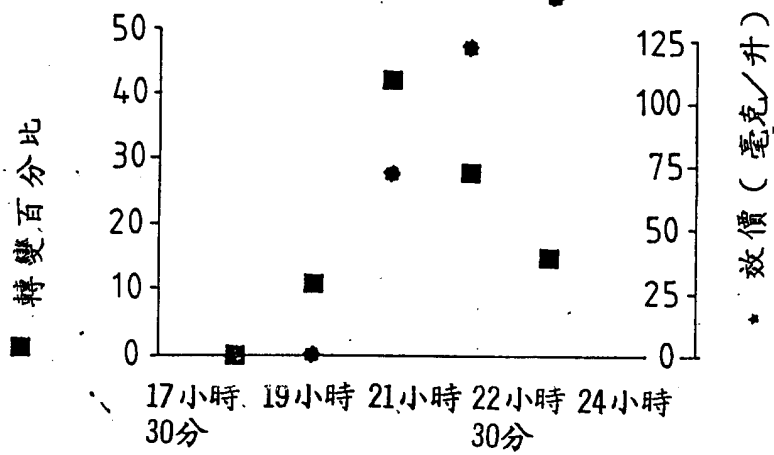
裝

訂

線

修正
補充 本82年5月19日

298603



培養菌之壽命

圖 1