(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[2]
C12D

(45) 공고일자 1980년01월24일
(11) 공고번호 특1980-0000003

(21) 출원번호	특1974-0000137	(65) 공개번호
(22) 출원일자	1974년01월04일	(43) 공개일자

(71) 출원인 메이지 세이가 가부시끼가이샤 나까가와 다께시
일본국 도오꾜도 쥬오우구 고바시 2쪼메 8

(72) 발명자 에사끼 노리오
일본국 가나가와껭 다가즈구 아리마 2338
아마노 하라이찌
일본국 가나가와껭 가와사끼시 사이와 리구후루가와쪼 156
쇼무라 다까시
일본국 가나가와껭 스루미구 고마오까쪼 203
나가오까 고라죠우
일본국 가나가와겡 요꼬하마시 이소꼬구 쓰기다쪼 675
이노우에 시게하루
일본국 가나가와겡 요꼬하마시 미도리구 스스지가오가 16-2
나이다 다로우
일본국 가나가와겡 요꼬하마시 아시히구 기보우 가오가 127

(74) 대리인 백문구

심사관 : 윤승모 (책자공보 제458호)

(54) α-아미노-γ-메틸포스페닐 낙산의 제조방법

요약

내용 없음.

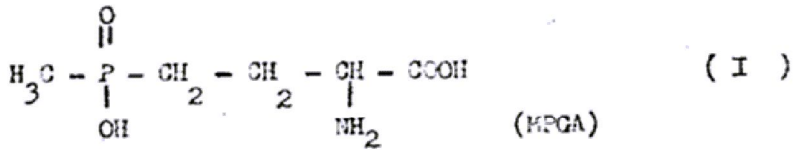
명세서

[발명의 명칭]

α-아미노-γ-메틸포스페닐 낙산의 제조방법

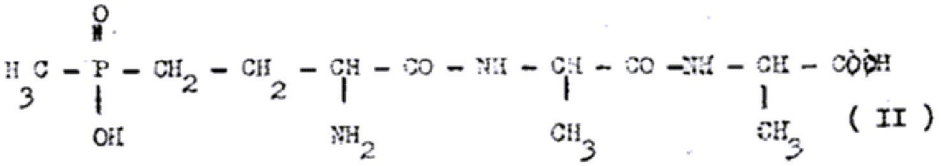
[발명의 상세한 설명]

본 발명은 다음의 구조식(II)의 화합물을 미생물 또는 그 처리물과 접촉시켜 구조식(I)의 α-아미노-γ-메틸포스페닐 낙산을 제조하는 방법에 관한 것이다.



(I)

(MPGA)



(II)

구조식(II)의 화합물은 일본국 특허 제827,768호에 항생물질 SF-1293물질로서 알려진 물질인바, 벼문고병균, 도열병균, 백선균, 기타의 병원균에 대하여 강력한 항미활성을 갖는 유용한 항생물질이지만 α-아미노-γ-메틸포스페닐낙산(이하 MPGA라고 약칭한다)도 위에서 말한 사상균에 대하여 구조식(II)의 화합물과 마찬가지로 강한 항미활성을 갖는 유용한 물질이다. MPGA의 제조법으로서 이미 합성법(일본 특허출원 소 47-23097) 및 화합물(II)로부터 화학적으로 분해하여 제조하는 방법(일본특허출원 소 47-17686) 등이 개발되었지만, 본 발명자등은 화합물(II)로부터 미생물의 작용에 의하여 MPGA를 제조할 수 있음을

발견하였다. 본 발명의 제조방법은 전기한 두가지 방법에 비하여 좋은 조건하에서 안전하게 실시되고, 반응후의 후처리가 간단하면서 수율이 높은점에서 우수하다.

본 발명에 의하여 제조된 MPGA의 각종 곰팡이에 대한 시험관내의 최소 저지농도는 보트리티스. 시네례 1.9r/cc, 페리크라리아. 사사끼 0.45r/cc, 렙토스 호에리아사르비니 0.45r/cc, 피리크라리아. 오리제 3.9r/cc이나 벼문고병, 도열병에 대하여는 시험관내 시험에서 각각 5r/cc, 12.5r/cc로서 극히 유효하였다. 이와 같이 MPGA 그 자체가 유용할뿐만 아니라 MPGA를 기본으로한 여러가지 유도체의 원료로서도 중요한 가치를 갖는다.

본 발명은 에세리치아속, 에르비니아속, 후라보 박테리움속, 브레비박테리움속, 아크로모박터속, 글루코노박터속 및 키산토모나스속 등의 세균, 또는 스트렙토마이세스속의 방선균의 배양물 또는 이들의 생균체 또는 유기용제로 처리한 균체 수성 현탄액 등을 사용하여 다음식으로 표시되는 아미도결합수해반응을 시키고 반응액으로부터 MPGA를 수집한다.

화합물(Ⅱ)→MPGA+ L-알라닌(2분자)

본 발명자 등은 여러가지 미생물에 대하여 화합물(Ⅱ)을 분해하여 MPGA를 생성하는 능력에 대하여 조사하고, 그 결과를 표 1에 요약하여 표시하였다.

시험방법은 액체 배지(건조 부이온 2.0%, pH 7.0) 10㎖에 시험균주를 접종하고 28℃, 24-48시간 진탕 배양한 다음 화합물(Ⅱ) 10mg을 첨가하여 다시 48시간 진탕배양한후 화합물(Ⅱ) 10mg을 첨가하고 다시 48시간 진탕하여 배양을 끝낸다. 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거한 상등액중에 잔존하는 화합물(Ⅱ)을 미생물 검정에 의하여 측정하고 분해율을 산출하였다. 분해물이 강한 균주에 대해서는 위에서 말한 상등액을 직접 셀루로오스 박층판에 스포트하여 n-부타놀:초산:물(2:1:1)을 용매로하여 전개하고 MPGA의 표준품과 Rf치를 비교하므로서 MPGA의 생성을 확인하였다.

[표 1]

공시(供試)미생물 명	화합물(Ⅱ)의 분해율
아크로모박터. 싸이크ㅣ크라스데스 IAM 1013	98%
에아로박터. 에아로게네스 ATCC 8308	50
알카리게네스. 비스코락틱스 ATCC 9036	0
바셀루스. 메카테리움 IAM 1166	0
브레비박테리움·암모니아게네스 ATCC 6871	99
에세리치아. 콜리 IAM 1239	84
〃 IAM 1253	79
〃 IAM 1268	100
후라보박테리움. 세파넨스 IAM 1014	100
후라보박테리움. 아르보렛세스스 IAM 110	96
글루코노박터. 서브옥시단스 IAM 1829	99
키산토모나스. 오리재 IAM 1299	80
키산토모나스. 오리제 IAM 1298	82
슈우도모나스. 솔라나세름 IAM 1306	0
프로테우스. 불가티스 IAM 1025	0
에로비니아. 아로이데 IAM 1068	95
스트렙토마이세스. 리보시데이쿡스 FERM--P No.99	98
스트렙토마이세스. 프라툴덴시스 FERM—P No.151	100
스트렙토마이세스. 하이그로스코픽스 IFO 3192	89

표1의 결과로부터 명백한 바와 같이 본 발명에서 사용되는 화합물(Ⅱ) 분해능을 갖는 미생물은 자연계에 넓게 분포되고 있다. 대표적 균종으로서는 예를들면 세균으로서 아크로모박터속, 브레비박테리움속, 아세리치아속, 후라보박테리움속, 글루코노박터속, 키산토모나스속, 에르비니아속에 속하는 균종 또는 방선균으로서 스트렙토마이세스속에 속하는 균종, 기타 많은 균종을 들 수 있다. 본 발명에서 사용되는 화합물(Ⅱ)로부터 MPGA를 생성하는 미생물은 그것이 생성하는 효소계에 화합물(Ⅱ)의 아미도 결합분해능력의 근원을 갖는 것이라고 추정되나, 이와 같은 효소계의 정확한 조성은 아직 알려지지 않았다. 그러나 본 발명에서는 MPGA 생성능을 갖는 미생물의 배양물을 처리제로서 사용되는 경우뿐만 아니라 배양물로부터 분리된 생균체를 세척한 다음 물에 재분산하여 얻은 수성현탁액을 사용하는 경우 또는 세척한 균체를 초산부틸등의 유기용제에서 효소의 분해가 일어나지 않은 조건하에서 처리하여 얻어지는 균체를 사용하는 경우에도 MPGA 생성능이 인정되므로서, 본 발명에 사용되는 미생물의 세포내 또는 배양물내에서 화합물(Ⅱ)로부터 MPGA를 생성하는 반응에 관계하는 효소계의 존재가 추정된다.

본 발명의 방법을 실시함에 있어서는 전술한 표1의 미생물중에서 선택된 하나의 균종을 배양한다.

이 경우 배지는 액상의 것이 적당하며, 정치, 진탕, 통기교반중 어느 배양법에 의해서도 좋다. 또 배지는 사용미생물이 생육할 수 있는 탄소원, 질소원을 함유하는 것을 사용한다.

배양온도는 사용미생물의 종류등에 의하여 다르나 통상 25-37℃에서 배양하면 좋다. 원료로서 사용하는 화합물(II)은 유리산 또는 금속염을 미세분말 또는 수용액의 형으로 배양액에 그대로 첨가할 수 있다.

첨가시기는 미생물의 배양전, 배양중 어느때도 좋다. 또는 배양물로부터 집균, 분리된 생균체를 함유하는 수성현탁액이나 유기용제 처리한 균체 현탁액에 가하여도좋다. 처리반응액의 pH는 6-9의 범위에서 행할수 있으나 MPGA의 생성율을 높이려면 pH 6.8-8.0이 좋고 반응온도는 25-40℃에서 처리할 수 있다.

반응 종료후 반응액중에 함유되는 MPGA는 산성아미노산을 분리하는 보통방법에 의하여 추출, 분리, 정제하여 목적물을 얻는다. 예를 들면 반응액을 여과하여 균체를 제거한 다음 여액을 이온 교환수지 다우엑스 1×2(초산형)을 통과시키면 MPGA는 수지에 흡착되지만 생성된 알라닌은 흡착되지 않는다. 수지를 충분히 수세한 다음 미반응의 화합물(II)이 잔존할 경우에는 0.1N 초산수로 세척하여 용출시킨다. MPGA는 1N 초산으로 선택적으로 용리할 수 있는바 용리액은 활성탄으로 탈색한후 농축 건조하여 MPGA의 순품을 얻는다.

본 발명에서 제조된 MPGA의 융점, 선광도, 원소분석치, 박층 크로마트의 Rf치는 하기한 바와 같으며 표준품의 MPGA와 완전히 일치하였다.

융 점	214°C (발포 분해)
$[\alpha]_D^{20}$	17°C (물)

원소분석치:$C_5H_{12}HO_4P$로서

탄소 33.15%, 수소 6.68%, 질소 7.73%

실측치:

탄소 32.8%, 수소 6.4%, 질소 7.5%

셀루로우스 박층크로마토(n-부타놀:초산:물 2:1:1)의 Rf치 0.20

[실시예 1]

사면 하천에 배양한 에세리치아·콜리 IAM-1268주를 분말 부이온 2%, pH를 조정하지않은 액체 배지 1ℓ에 접종하고 28℃에서 진탕 배양한다. 24시간 배양한후 화합물(II) 500㎎을 첨가하고 더욱 배양을 계속하여 43시간후에 배양을 중지한다. 얻어진 배양액을 여별하여 900㎖의 여액을 얻고 여액을 활성탄으로 탈색한 다음 이온 교환수지 다우엑스 50W×2(H^+형)의 탑을 통과시켜 목적물을 수지에 흡착시킨다. 수지를 수세한다음 1N 암모니아수 300㎖로 용리하고 용리액을 30㎖까지 농축한다. 얻은 농축액을 이온 교환수지 다우엑스 1×2(초산형)의 탑을 통과 시키면 목적물은 수지에 흡착된다. 수지를 수세한다음 0.2N 초산수로 세척하고 1규정 초산수로 용리한다음 용리액을 감압, 농축, 건조하여 MPGA 100㎎을 얻었다.

융점 214℃(분해)

[실시예 2]

사면 배양한 에세리치아·콜리 IAM-1268주를 분말부이온 2%, pH를 조정하지 아니한 액체배지 100㎖에 접종하고 28℃에서 24시간 진탕 배양한후 배양을 중지하고 배양액을 3,000회전으로 15분간 원심 분리하여 균주 5㎖을 얻었다. 균체를 수세한후 pH 7.5의 M/15 인산완충액 100㎖에 분산한다음 화합물(II) 100㎎을 첨가하고 37℃에서 48시간 진탕 반응시켰다.

반응액을 물 500㎖로 희석하고, 이온 교환수지 다우엑스 1×2(초산형)의 탑을 통과시키면 목적물은 수지에 흡착된다. 수지를 수세한후 0.2N-초산수로 세척하고, 1N-초산수로 용리한다음 용리액을 농축 건조하여 32㎎의 MPGA를 얻었다.

[실시예 3]

사면한천에 배양한 에세리치아·콜리 IAM-1268주를 분말효모엑기스 2.5%, pH를 무조정의 액체 배지 100㎖에 접종하고 25.5℃에서 24시간 진탕 배양한 다음 배양액을 같은 조성의 액체배지 10ℓ에 옮기고 25.5℃에서 24시간 배양하였다. 배양액에 100㎖의 초산부틸을 첨가하여 5℃에서 20분 교반하고 살균한후 10,000회전으로 10분간 원심 분리해서 균체를 침전시켰다. 균체에 물 500㎖을 가하여 균체현탁액을 얻고 이 균체현탁액 220㎖와 화합물(II) 74g을 pH 7.2의 M/30인산 완충액 8ℓ에 주입하고 37℃에서 48시간 반응시킨다. 반응후 침전을 여과 제거하고 수세한후 전체여액 8.5ℓ에 물 16ℓ를 가하여 희석한다음 이온 교환수지 다우엑스 1×2(초산형) 2.5ℓ의 탑을 통과시키면 MPGA는 수지에 흡착된다.

흡착한 MPGA는 수지를 수세하고 0.2N 초산으로 세척한후 1N 초산으로 용리시킨다. 용리액을 감압 농축하여 MPGA 37.5G을 얻었다.

[실시예 4]

사면 배양한 스트렙토마이세스·프라텐시스(FERM-P No.151)를 전분2.0%, 대두분 2.5%, 소맥배아 1.0%, 식염 0.25%, pH 7의 액체배지 1ℓ에 접종하고 28℃에서 진탕 배양한다. 72시간후 화합물(II)200mg을 첨가하고 배양을 계속하여 48시간후 배양을 중지한다.

얻은 배양물을 pH 3에서 여별하여 800㎖의 여액을 얻어서 활성탄으로 탈색한 다음 이온 교환수지 다우엑스 50W×2(H^+형)의 탑을 통과시켜 목적물을 수지에 흡착시키고 수지를 수세한다음 1N-암모니아수 200㎖로 용리시킨다. 용리액을 감압하에 20㎖가지 농축하고 이온교환수지다우엑스 1×2(초산형)의 탑을 통과시키면 목적물이 수지에 흡착된다. 수지를 수세하고 0.1N-초산수로 세척한다음 1N-초산수로 용리하고 용리액을 활성탄으로 탈색한 다음 농축건조하여 MPGA 63mg 얻었다.

[실시예 5]

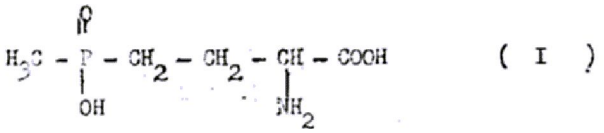
펩톤 1.0%, 우육엑기스 0.5%, 식염 0.5%, pH 7의 액체배지 500㎖에 사면 배양한 하기의 각종 세균을 접종하고 28℃에서 24시간 진탕 배양한다. 24시간후 기질로서 화합물(II)을 각각 500㎎씩 첨가하고 다시 48시간 배양한 다음 실시예 4의 추출 정제법에 의하여 다음표와 같이 MPGA를 얻었다.

아크로모박터. 싸이크로라스테스 IAM 1013	200
브레비박테리움. 암모니아게네스 ATCC 6871	200
에세리치아. 콜리 IAM 1239	140
후아보박테리움. 세파엔스 IAM 1014	220
후아보박테리움. 아르보렛센스 IAM 1100	190
글루코노박터. 서브옥시단스 IAM 1829	180
키산토모나스. 브래니이 IAM 1299	100
키산토모나스. 오리제 IAM 1298	100
에르비니아. 아로이데 IAM 1068	170

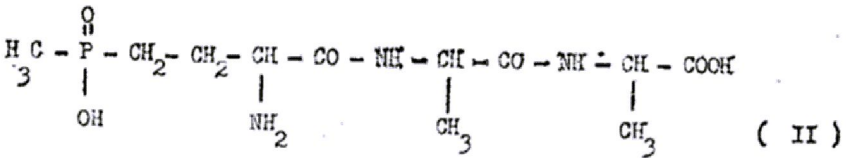
(57) 청구의 범위

청구항 1

아크로모박터, 브레비박테리움, 에세리차아, 후라보박테리움, 글루코노박터, 키 산토모나스, 에르비니아 및 스트렙토마이세스의 각속에 속하며 다음의 구조식(II)에 물질을 구조식(I)의 α-아미노-γ-메틸포스페닐낙산으로 변환할 수 있는 통상의 균의 배양물 또는 생균체 또는 이들의 처리물과 구조식(II)의 물질을 접촉시킴을 특징으로 하는 구조식(I)의 α-아미노-γ-메틸포스페닐 낙산의 제조방법.



(I)



(II)