

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12P 35/06

(45) 공고일자 1984년12월15일
(11) 공고번호 84-002294

(21) 출원번호	특1981-0002646	(65) 공개번호	특1983-0006307
(22) 출원일자	1981년07월21일	(43) 공개일자	1983년09월20일
(30) 우선권 주장	8023834 1980년07월21일 영국(GB)		
(71) 출원인	후지사와 야구형 고오교 가부시기가이샤 후지사와 도모 키찌로오 일본국 오오사까시 히가시구 도소오마찌 4쵸오메		

(72) 발명자 이마나카 히로시
일본국 오오사까후 미시마군 시마모토쵸오 사쿠라이 4-19-25
미요시 도시오
일본국 후지시 히로미니시호노쵸오 1-3-101
코모노미 토시오
일본국 쓰시마시 후지나미쵸오 코오단쥬우타쿠 4-405
쿠보치 요시아끼
일본국 아이찌켄 아마군 사오리쵸오 마찌가다신덴 아자미나미 데이가타
142-20
하토오리 세이지로오
일본국 아이찌켄 니와군 후소우쵸 오오아자 다까오 아자후소우다이
1-127
카와기다 다께
일본국 쓰시 오사토 가와기다쵸오 83
이필모

(74) 대리인

심사관 : 백남훈 (책자공보 제1021호)

(54) 디아세틸세팔로스포린 C의 제조방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

디아세틸세팔로스포린 C의 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 pH와 상대적 효소활성도와와의 관계를 나타낸 그래프.

제2도는 pH와 잔여 효소활성도와와의 관계를 나타낸 그래프.

제3도는 온도와 상대적효소활성도와와의 관계를 나타낸 그래프.

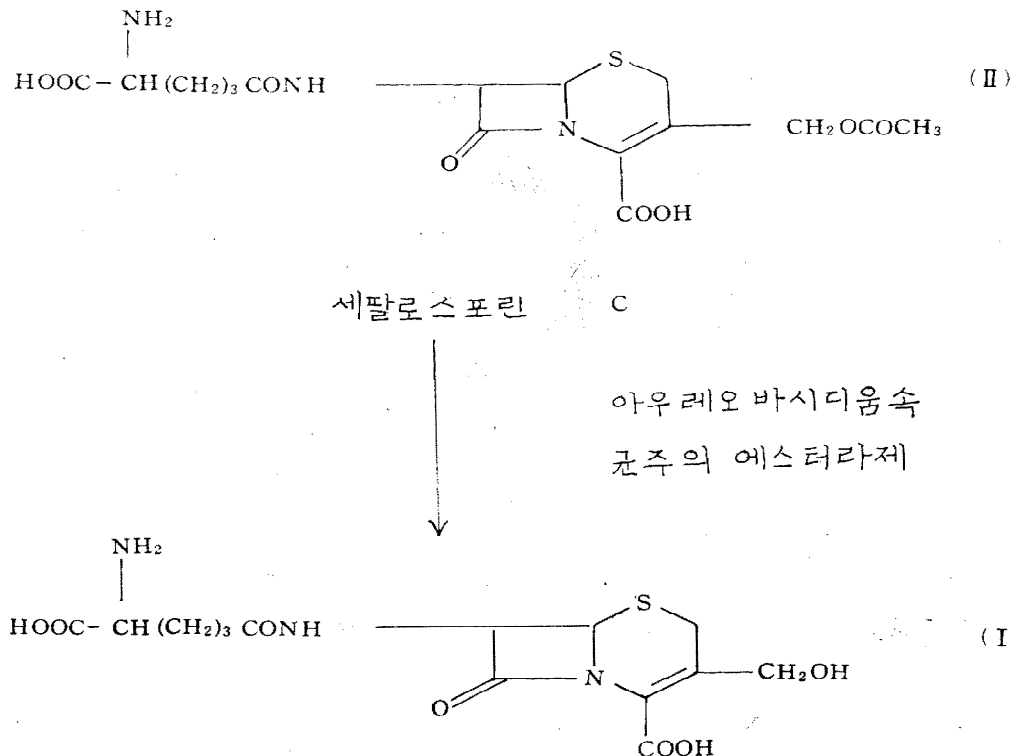
제4도는 온도와 잔여효소활성도와와의 관계를 나타낸 그래프.

제5도는 온도와 상대적 효소활성도와와의 관계를 나타낸 그래프이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 세팔로스포린 C의 효소적 탈아실화에 의한 디아세틸 세팔로스포린 C의 새로운 제조방법에 관한 것이다. 부가하면, 아우레오 바시디움속 균주의 새로운 에스테라제와 세팔로스포린 C 또는 그 염과의 접촉에 의해 디아세틸세팔로스포린 또는 그 염을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 방법은 하기 반응과정으로 나타낸다 :



디아세틸 세팔로스포린 C

본 발명의 목적화합물(I), 즉 디아세틸세팔로스포린 C는 치료학적으로 유용한 세팔로스포린화합물의 합성을 위한 중요한 중간체라고 잘 알려져 있다.

디아세틸세팔로스포린 C는 세팔로스포린 C를 여러 미생물의 에스테라제로 탈아세틸화함으로써 제조할 수 있음은 잘 알려져 있지만, 이러한 방법들은 산업적 규모의 제조방법으로는 적당하지 않다.

따라서 본 발명은 아우레오 바시디움속의 균주에 의해 생성된 에스테라제가 양호한 수율로 탈아세틸화에 의해 세팔로스포린 C를 디아세틸세팔로스포린 C로 변화시키기 위한 활성을 갖는다는 새로운 사실을 발견한 본 발명자들의 폭넓은 연구에 의해 완성되었다.

본 발명에 따르면, 디아세틸 세팔로스포린 C는 수용성매체에서 아우레오바시디움속의 균주의 에스테라제로 세팔로스포린 C 또는 그 염을 모든 세팔로스포린 C가 탈아세틸화가 될 때까지 접촉시킨 후 수용성 매체에서 고체형태로 형성된 디아세틸 세팔로스포린 C를 유리시킴으로써 제조된다.

디아세틸세팔로스포린 C와 세팔로스포린 C의 적합한 염은 알칼리금속염(예 : 나트륨염, 칼륨염) 또는 알칼리 토금속염(예 : 마그네슘염)이다.

본 발명에 사용되는 아우레오바시디움속의 균주는 디아세틸세팔로스포린 C를 제조하기 위해 세팔로스포린 C의 제3위치에서 에스테르 결합을 가수분해할 수 있는 에스테라제를 생성할 수 있는 아우레오바시디움속의 균주에 속하는 모든 미생물을 포함하는데, 이러한 균주는 자연계에 분리분포되어 있거나 배양기관에 보관되어 있다. 따라서, 상기의 이러한 균주는 토양샘플과 같은 천연원으로부터 유리되거나 공공배양 기관으로부터 배양된 배양체로부터 용이하게 선택될 수 있다.

상기 미생물의 대표적 보기로서 아우레오 바시디움 풀룰란스 IFO 4466를 들 수 있는데, 이 미생물은 Institute for Fermentation(일본 오오사카)와 같은 배양기관으로부터 쉽게 얻을 수 있다.

또한 본 발명의 범주에서 X선, 자외선조사, 변이유발제(즉, 질산, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘)로의처리와 같은 종래의 변이방식에 의해 상기 미생물로부터 생성된 돌연변이체의 사용도 포함된다.

본 발명의 공정에 있어서, 세팔로스포린 C의 미생물의 에스테라제와의 접촉은 후술되는 바와 같이 본 발명의 여러 방식에 의해 이루어질 수 있다.

본 발명공정의 한 방식에 있어서, 세팔로스포린 C와 미생물의 에스테라제와의 접촉은 아우레오 바시디움속에 속하는 균주를 배양시켜 얻어진 배양액 또는 이의 가공물질과 세팔로스포린 C를 수용성 매체에서 접촉시킴으로써 이루어진다.

본 발명에 사용되는 미생물의 배양은 일반적으로 종래방식에 의해 이루어지며, 교반하에서 실시하는 것이 바람직하다.

사용되는 배양매체로서, 동화할 수 있는 탄소와 질소의 공급원과 무기염을 함유한 영양매체를 들 수 있다.

탄소공급원으로 바람직한 것은 글루코스, 슈크로스, 락토오스, 글리세롤과 전분이다. 질소공급원으로 바람직한 것으로 고기액즙, 펩톤, 글루텐, 옥수수가루, 면실유, 강낭콩, 효무추출물, 카사민산

및 아미노산과 같은 유기질소공급원과 암모늄염(예 : 질산암모늄, 인산암모늄)과 같은 무기질소 공급원을 들 수 있다. 필요에 따라 탄산칼륨, 인산나트륨, 인산칼륨, 마그네슘염 및 구리염과 같은 무기염과 여러 비타민을 사용할 수 있다.

배양매체의 pH값, 배양온도 및 배양시간은 사용되는 미생물의 종류에 따라 다르다. 바람직한 pH값은 일반적으로 5-8이다. 배양온도는 20°-30℃, 바람직하게는 약 25℃이며, 배양시간은 15-72시간, 바람직하게는 24-50시간이다.

배양액과 이의 가공물질은 디아세틸세팔로스포린 C의 제조에 사용된다. 배양액의 가공물질이란 효소의 활성을 증가시키기 위해 종래 방식에 따라 배양액으로부터 제조된 제품을 의미하는 것으로, 세팔로스포린 C를 디아세틸세팔로 스포린 C로 탈아세틸화할 수 있다.

일반적으로, 에스터라제 활성은 미셀리아에 존재한다. 그러므로 배양액의 가공물질로서 하기 제품들을 들 수 있다.

(1) 비가공미셀리아 : 여과와 원심분리와 같은 종래방법에 의해 배양액으로부터 분리시킴으로써 얻어진다.

(2) 건조미셀리아 : 동결건조 및 진공건조와 같은 방법에 의해 상기 비가공미셀리아를 건조시킴으로써 얻어진다.

(3) 세포-유리추출물 : 상기 비가공 또는 건조세포를 종래방법(예 : 유기용매를 사용하여 미셀리아를 자기 분해시키거나, 알루미늄으로 미셀리아를 연마하거나 또는 초음속파로 미셀리아를 처리하는 방법)에 의해 파쇄시킴으로써 얻어진다.

(4) 효소용액 : 종래방법(예 : 칼럼크로마토그래피)에 의해 상기 세포-유리추출물을 정제 또는 부분 정제함으로써 얻어진다.

(5) 고정화미셀리아 또는 효소 : 상기 미셀리아 또는 효소를 종래방법(예 : 아크릴아미드, 유리비이드, 이온교환수지)에 의해 고정화함으로써 얻어진다.

세팔로스포린 C와 효소와의 접촉에 의해 이루어진 반응은 물 또는 완충용액과 같은 수용성 매체에서 이루어진다. 즉, 세팔로스포린 C를 함유한 완충용액 또는 물과 같은 수용성 매체에 배양액 또는 이의 가공물질을 현탁시키거나 용해함으로써 이루어진다.

반응혼합물의 pH값, 세팔로스포린 C의 농도, 반응시간 및 반응온도는 사용되는 배양액 또는 이의 가공물질의 성질에 따라 다르다. 일반적으로, 반응은 3-7 pH(의 바람직하게는 3.5-5의 pH)와 20°-40℃(바람직하게는 25-37℃)의 온도에서 2-50시간 동안 이루어진다.

반응혼합물에 있어서, 기질로서의 세팔로스포린 C의 농도는 0.1-100mg/ml이 바람직하다.

세팔로스포린 C와 에스터라제와의 접촉에 대한 또 다른 방법으로서, 산업적인 규모의 생성에 편리한 또 다른 방법이 있다. 즉, 배양액으로부터 세팔로스포린 C를 유리시키지 않고 세팔로스포린 C를 생성할 수 있는 미생물의 배양액에 있는 세팔로스포린 C를 아우레오바시디움 속에 속하는 에스터라제를 생성하는 균주의 배양액에 있는 미셀리아와 직접 접촉시켜 디아세틸세팔로스포린 C를 제조하는 방법이 있다.

상기 목적을 위해 아우레오바시디움속에 속하는 에스터라제를 생성하는 균주와 세팔로스포린 C를 생성하는 미생물과의 혼합배양을 사용하는 것이 바람직하다. 세팔로스포린 C를 생성하는 미생물에는 세팔로스포리움 아크레모니움(이 포함되는데, 이는 공공의 배양기관(예 : 세팔로스포리움아크레모니움 ATCC 11550)에 공지되어 있다.

혼합배양은 수용성매체에서 세팔로스포린 C를 생성하는 미생물(예 : 세팔로스포리움 아크레모니움)을 배양한 후 아우레오바시디움속에 속하는 에스터라제를 생성하는 균주를 세팔로스포린 C를 생성하는 미생물의 배양액에 접종시키고 배양액에 축적된 세팔로스포린 C가 디아세틸세팔로스포린 C로 변환될 때까지 계속배양시킴으로써 얻어진다.

환언하면, 아우레오바시디움속에 속하는 에스터라제를 생성하는 균주를 세팔로스포린 C를 생성하는 미생물이 배양되는 동안 세팔로스포린 C생성미생물의 배양액에 접종액에 접종시킴으로써 혼합배양을 시작하는 것이 바람직하다.

상술한 바와 같이 혼합배양 단계에 있어서, 아우레오바시디움속에 속하는 에스터라제 생성균주의 접종은 상기 배양액을 세팔로스포린 C-생성미생물의 배양액에 첨가함으로써 실시되는 것이 바람직하다. 또한, 에스터라제를 생성하는 균주를 접종시키기 위한 적합한 시간은 미생물의 배양액 종류와 배양조건에 따라 실질적으로 바람직한 조건을 인지할 수 있는 예비실험에 따라 설정되며, 세팔로스포린 C를 생성하는 미생물의 미셀리아가 매체에서 성장하여 증가하기 시작하고 세팔로스포린 C자체가 생성되며 배양액이 증가되는 때를 선택하는 것이 바람직하다.

또한 에스터라제를 생성하는 균주의 접종시간은 세팔로스포린 C를 생성하는 미생물의 배양이 시작된 후 2-6일(바람직하게는 -5일)동안이다.

혼합배양에 대한 매체는 상술한 아우레오바시디움속에 속하는 균주에 대한 배양매체와 같은 성분으로 구성된다.

매체에 대한 적합한 pH값은 5-7(바람직하게는 5-6)이다. 혼합배양의 온도는 20-30℃(바람직하게는 약 25℃)이다.

반응혼합물 또는 혼합배양액에서 생성된 목적화합물은 세팔로스포린화학에서 사용되었던 종래방법에 따라 유리되고 정제될 수 있다. 이러한 방법에 있어서, 적절한 용매로의 정제, 감압하에서의 농축, 동결건조, 결정화, 재결정화 및 음이온 교환수지, 양이온 교환수지 또는 다공성의 비이온성 흡착수

지로의 처리와 같은 방법의 예로 들 수 있다.

상술한 바와 같이, 본 발명의 발명가들은 세팔로스포린 C 또는 이의염과 아우레오 비시디움 속에 속하는 균주, 특히 아우레오바시디움 풀롤란스 IF0 4466의 에스터라제와의 접촉으로 구성되는 디아세틸세팔로스포린 C를 제조하는 효과적인 공정을 발견하게 되었다. 상기 연구에 이어 본 발명의 발명가들은 연구를 계속하여 본 발명에 사용되는 아우레오바시디움 속의 에스터라제의 성질을 알게 된 후 종래의 공지된 에스터라제에 비해 신규성이 있는 에스터라제를 확인하기에 이르러, 이러한 아우레오바시디움 속의 에스터라제는 세팔로스포린 C를 디아세틸세팔로스포린 C로 가수분해시킬 수 있는 신규의 효소라는 결론에 도달했다.

종래의 기술로서 1975년 10월 14일에 공보된 미합중국 특허 제3,912,589호를 들 수 있는데, 이 특허에서는 세팔로스포린 C를 디아세틸세팔로스포린 C로 가수분해 할 수 있는 에스터라제로서 로도톨라속의 에스터라제에 대해 언급하였다. 이 로도톨라속의 에스터라제는 본 발명에 사용되는 아우레오바시디움과 유사한 미생물이지만 이는 일종의 "이스트"에 속하는 미생물이다.

하기에 아우레오바시디움 속에 속하는 대표적 균주인 아우레오바시디움 풀롤란스 IF0 4466 속의 균주에 의해 제조되는 에스터라제의 특성이 예시되어 있다.

효소의 산출

에스터라제는 아우레오바시디움 풀롤란스 IF04466의 배양액으로부터 분리 및 정제에 의해 산출되는데 자세한 산출방법은 하기 실시예 3에 예시되어 있다.

실시예 3에 예시되어 있듯이, 에스터라제는 세팔로스포린 C를 디아세틸세팔로스포린 C로 가수분해할 수 있는 2성분의 효소를 포함하고 있으며, 상기 에스터라제는 아세트산에스테르를 가수분해할 수 있지만 아세트에스테르 이외의 에스테르는 가수분해할 수 없는 특성이 있다. 따라서, 아우레오바시디움 풀롤란스 IF04466으로부터 산출된 에스터라제는 소위 "아세틸에스터라제"라 불리우며, 따라서 본 발명의 발명가들은 하기 설명을 위해 본 발명의 두 성분 에스터라제들을 아세틸에스터라제 4466-I과 아세틸에스터라제 4466-II로 각각 칭했다.

에스터라제의 성질

아세틸에스터라제 4466-I 및 아세틸에스터라제 4466-II는 하기와 같은 효소적 성질을 갖는다 :

(1) 기질특이성(아세틸에스터라제 4466-I 및 4466-II) : 가수분해 : 아세트산에스테르

비가수분해 : 아세트산에스테르 이외의 에스테르.

기질특이성은 하기 방법에 의해 측정된다 :

하기 명시된 기질(5mg)을 시험관에 주입한 후 0.05M의 아세트산염 완충용액(pH 4.5)(1ml)에 용해시킨다. 이 용액에 실시예 3에 따라 산출된 효소용액 A(즉, 아세틸 에스터라제 4466-I)(0.1ml) 또는 효소용액 B(즉, 아세틸에스터라제 4466-II)(0.1ml)를 첨가한다.

반응혼합물을 25°C에서 1시간 동안 진탕기에서 항온시킨 후, 기질의 가수분해도를 하기 방법에 따라 측정한다.

(i) 분석 1(박층크로마토그래피)

시험용액(1 μ l)과 샘플을 각각 실리카겔 판상에 떨어뜨린다. 상기판을 70%의 n-프로판올 수용액으로 전개시킨 후 건조시킨다.

(ii) 분석 2(기체크로마토그래피)

시험용액을 하기 조건하에서 기체크로마토그래피에 의해 분석한다 :

칼럼 : SE. 30ml

캐리어가스 : N₂(15ml/분)

칼럼온도 : 80°C

주입온도 : 120°C

검출기온도 : 80°C

검출기 ; FID(공기 : 1.0kg/cm²G,

H₂ : 1.0kg/cm²G).

시험결과가 하기표에 명시되어 있다.

기 질	가 수 분 해		분석방법
	아세틸에스터라제 4466-I	아세틸에스터라제 4466-II	
세팔로스포린 C	卄	卄	분석 I
7-아미노 세팔로스포란산	卄	卄	〃
세파미딘	卄	卄	〃
아세트산메틸	卄	卄	분석 II
아세트산에틸	+	+	〃
프로피온산메틸	-	-	〃
메틸부티레이트	-	-	〃
포름산메틸	-	-	〃

(주) 卄 : 완전가수분해

+: 부분가수분해

-: 비가수분해

(주) # : 완전가수분해

+: 부분가수분해

-: 비가수분해

(2) pH의 효과

(A) : 기질 : 세팔로스포린 C

(a) 최적 pH(아세틸에스터라제 4466-I 및 4466-II) : pH 4이하.

첨부된 제1도에서 볼 수 있듯이, 아세틸에스터라제 4466-I(0-0)와 아세틸에스터라제 4466-II(△-△)의 최적 pH는 4이하이다.

여러 pH에서의 효소활성은 하기 방법에 의해 측정된다 :

(i) 완충용액

pH 3.5-6.0 : 0.05M의 아세트산염 완충용액

pH 5.0-8.0 : 0.1M의 인산염 완충용액

pH 7.0-9.5 : 0.1M의 트리스-염산염 완충용액

(ii) 반응

효소용액(0.5ml)에 상기 언급된 pH값에서 따뜻한 완충용액(30℃, 4ml)과 5%의 세팔로스포린 C 소디움 디하이드레이트수용액(0.5ml)를 첨가한다. 반응혼합물을 1시간동안 30℃의 진탕기에서 항온시킨다. 그 후 산출된 디아세틸세팔로스포린 C와 비반응된 세팔로스포린 C를 고압액체크로마토그래피에 의해 측정한다.

(b) 적합한 pH범위(아세틸에스터라제 4466-I 및 4466-II) : pH 4.0-6.0

첨부된 제(2)도에서 알 수 있듯이, 아세틸에스터라제 4466-I(0-0)과 아세틸에스터라제 4466-II(△-△)의 적합한 pH범위는 4.0-6.0이다.

안정성 시험이 하기방법에 의해 실시된다 :

효소용액(1ml)에 상술된 pH범위에 있는 완충용액(9ml)을 첨가한다. 효소용액(10ml)을 1시간동안 60℃에서 가열한다. 다음, 아세틸에스터라제의 잔류효소 활성도를 후술하는 측정방법 I에 따라 측정한다.

(B) 기질 : 아세트산에틸

최적 pH(아세틸에스터라제 4466-I 및 4466-II) : 약 5.25pH

첨부된 제5도에서 볼 수 있듯이, 기질로서 아세트산에틸을 사용하는 경우에 있어서 아세틸에스터라제 4466-I(0-0)와 아세틸에스터라제 4466-II(△-△)의 최적 pH는 약 5.25이다.

여러 pH에서의 효소활성은 하기방법에 의해 측정된다 :

아세트산에틸(5μl)에 상술된 여러 pH범위에서 따뜻한 완충용액(30℃, 1ml)과 효소용액(30μl)을 첨가한다. 반응혼합물을 1시간 동안 30℃의 진탕기에서 항온시킨다.

다음, 산출된 에탄올과 비반응된 아세트산에틸을 기체크로마토그래피에 의해 측정한다.

(3) 온도의 효과

(a) 최적온도(아세틸에스터라제 4466-I 및 4466-II) : 약 37℃

첨부된 제3도에서 볼 수 있듯이, 아세틸에스터라제 4466-(0-0)과 아세틸에스터라제 4466-11(Δ - Δ)의 최적온도는 약 37°C이다.

여러 온도에서의 효소활성은 하기방법에 의해 측정된다.

효소용액(0.5ml)에 상술된 온도에서 가온시켜 0.05M의 아세트산염완충용액(pH 4.0)(4ml)과 5%의 세팔로스포린 C 소듐 디하이드레이트 수용액(0.5ml)을 첨가한다.

반응 혼합물을 1시간동안 상술온도의 진탕기에서 항온시킨다. 다음, 산출된 디아세틸세팔로스포린 C의 비반응된 세팔로스포린 C를 고압의 액체크로마토그래피에 의해 측정한다.

(b) 적합한 온도범위(아세틸에스터라제 4466-I 및 4466-II) : 60°C이하.

첨부된 제4도에서 볼 수 있듯이, 아세틸에스터라제 4466-I (0-0)와 아세틸에스터라제 4466-II(Δ - Δ)의 적합한 온도범위는 60°C이하이다.

안정성시험은 하기방법에 따라 실시된다 :

효소용액(pH 4.0)를 상술된 온도(25-70°C)에서 1시간동안 방치시켰다. 그후, 잔유효소활성을 후술되는 측정방법 I에 따라 측정한다.

(4) Km의 측정

(기질은 세팔로스포린 C이다)

아세틸에스터라제 4466-I : Km=11.5mM

아세틸에스터라제 4466-II : Km=13.7mM

아세틸에스터라제 4466-I와 아세틸에스터라제 4466-II의 Km

값은 하기방법에 따라 측정된다 :

여러 농도(0.2-5%)의 세팔로스포린 C 소듐디하이드레이트(4.5ml)를 함유하고 있는 0.05M의 아세트산염 완충용액(pH 4.0)에 효소용액(5ml)을 첨가한다.

반응혼합물을 한 시간 동안 30°C의 진탕기에서 항온시킨다. 다음, 산출된 디아세틸세팔로스포린 C와 비반응된 세팔로스포린 C를 고압액체크로마토그래피에 의해 측정한다. 각 에스터라제의 Km값은 종래 방식에 의해 계산된다.

(5) 금속이온의 효과

아세틸에스터라제 4466-I 및 아세틸에스터라제 4466-II의 효소활성은 Cu^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Ba^{+2} , Fe^{+2} 과 같은 금속이온에 영향을 받지 않는다.

상기 아세틸에스터라제에 대한 금속이온의 효과는 하기방법에 의해 측정된다 :

효소용액(0.5ml)에 상술된 금속이온(5×10^{-4} mol)을 함유한 0.05M아세트산염 완충용액(pH 4.0)과 5%의 세팔로스포린 C소듐디하이드레이트 수용액(0.5ml)을 첨가한다. 반응혼합물을 1시간동안 30°C의 진탕기에서 항온시킨다. 다음, 산출된 디아세틸세팔로스포린 C와 비반응된 세팔로스포린 C를 고압액체크로마토그래피에 의해 측정한다.

대조로서, 상술된 진행과정에서 어떠한 금속이온도 함유하지 않은 0.05M 아세트산염 완충용액(pH 4.0)를 사용한다.

에스터라제의 효소활성은 하기방법에 의해 측정된다.

측정방법 I

(a) 반응

효소용액(0.5ml)에 따뜻한 0.05M의 아세트산 염완충용액(4ml)와 세팔로스포린 C 소듐 디하이드레이트(50mg/ml)이 함유된 0.05M 아세트산염 완충용액(0.5ml)을 첨가한다. 반응혼합물을 1시간동안 30°C의 진탕기에서 항온시킨다. 다음, 산출된 디아세틸세팔로스포린 C와 반응된 세팔로스포린 C를 각각 하기조건하의 고압액체크로마토그래피에 의해 측정한다.

고정상 : 폴리고실 60-10C₁₈(상표명, Sumitomo Chemical Co., Ltd 의해 제조)

이동상 : 메탄올, 물 및 아세트산(100 : 900 : 5)의 혼합물

칼럼높이 : 30cm

칼럼온도 : 주위온도

검출기 : 250nm에서 자외선흡광

이동속도 : 1.0ml/분

효소활성(mg/시간 ml or mg)은 상기 조건하에서 효소제제 1ml 또는 1mg당 산출되는 디아세틸세팔로스포린 C(mg)으로 표시된다.

(b) 특이활성의 계산방법

(i) 단백질 함량의 측정

효소제제의 단백질함량은 표준시료로서 소의 표준혈청 알부민을 사용하여 라우리방법[참조 : Journal of Biological Chemistry 193, 265(1951)]에 따라 측정한다.

(ii) 특이활성도의 계산

$$\text{특이활성도} = \frac{\text{효소활성(mg/시간·ml 또는 mg)}}{\text{단백질함량(mg/ml 또는 mg)}}$$

상술한 바와 같은 성질의 고찰로부터, 공지된 에스터라제에 비해 본 발명의 아세틸에스터라제는 매우 독특한 특성, 특히 세팔로스포린 C를 디아세틸세팔로스포린 C로 가수분해할 수 있는 성질, 매우 좁은 기질특이성(즉, 상기 아세틸에스터라제는 아세트산에스테르는 가수분해할 수 있지만 기타 에스테르는 가수분해할 수 없다) 및 특이 최적 pH값(즉, 상기 아세틸 에스터라제는 산의 pH값을 갖는다)을 갖는다.

또한, 세팔로스포린 C를 디아세틸세팔로스포린 C로 가수분해할 수 있는 공지된 에스터라제(즉, 로도토룰라 글루티니스 IFO 1125로 대표되는 로도토룰라 속에 의해 산출된 에스터라제)에 비해 본 발명의 아세틸에스터라제(이후 A.E.로 칭하여짐)은 로도토룰라속에 의해 산출된 에스터라제(이후 R.E.로 칭하여짐)와 하기와 같은 점에서 서로 다르다. 추 :

-A.E.의 최적 pH는 4이하 값인데 비해, R.E.의 최적 pH는 약 5-6이다.

-A.E.의 최적온도는 37℃인데 비해, R.E.의 최적온도는 50℃이다.

-A.E.의 적합한 pH범위는 약 4.0-6.0인데 비해, R.E.의 pH범위는 약 6.0이다.

상술한 바와 같은 결과의 분석과 연구에 의해 본 발명의 발명가들은 아세틸에스터라제 4466-I과 아세틸 에스터라제 4466-II는 신규의 효소라는 것을 알게 되었다.

하기 실시예에 의해 본 발명이 예시된다.

[실시예 1]

1%의 글루코스, 0.3%의 펩톤 및 0.3%의 육즙을 함유한 수용성매체(pH 7.0)(100ml)를 4개의 50ml삼각 플라스크에 주입한 후 20분 동안 120℃에서 멸균시킨다.

매체 각각에 아우레오바시디움 풀룰란스 IFO 4466의 사면배양에 첨가한다. 생체를 2일동안 25℃의 진탕기에서 성장시킨다.

또한, 상기와 같은 수용성 매체(20ℓ)를 30ℓ의 발효조에 주입한 후 20분동안 12℃에서 멸균시킨다. 수용성매체에 상기에서 얻어진 배양액 전부를 첨가한다. 생체는 2일 동안 25℃에서 성장시킨다.

산출된 배양액은 디아세틸세팔로스포린 C의 산출에 사용된다.

(1) 아우레오바시디움 풀룰란스의 미셀리아를 사용한 디아세틸 세팔로스포린 C의 제제

상기 배양액의 원심분리에 의해 산출된 습윤미셀리아(10g)를 세팔로스포린 C소디움디하이드레이트(25mg/ml)를 함유한 수용성용액(300ml)에 첨가한다. 반응혼합물을 반응물에서의 세팔로스포린 C가 사라질 때까지 10시간동안 30℃와, 4.5의 pH에서 교반한다. 반응혼합물을 여과시킨다. 여액을 pH7.0으로 조정후 감압하에서 농축하고 5℃에서 하룻 밤동안 방치시켜 결정체를 얻는다. 결정체에 75%의 수용성 에탄올을 첨가한 후 혼합물을 연화시킨다.

결정체를 여과에 의해 얻은 후 진공에서 건조시켜 디아세틸 세팔로스포린 C(3.8g)을 얻는다.

상기에서 얻어진 결정체에 대한 IR스펙트럼에 의해 디아세틸세팔로스포린 C를 확인할 수 있다.

(2) 아우레오바시디움 풀룰란스의 미셀리아로부터 추출된 효소추출액을 사용한 디아세틸세팔로스포린 C의 제제

습윤 미셀리아(10g)에 클로로포름을 첨가한다. 혼합물을 30분동안 주위에서 방치시킨다. 혼합물에 증류수(20ml)를 첨가한다. 주위 온도에서 하루 낮동안 방치시킨 후, 혼합물을 농축시켜 효소추출액(20ml)을 얻는다. 효소추출액을 세팔로스포린 C소디움디하이드레이트(25mg/ml)를 함유한 수용성용액(300ml)에 첨가한다. 반응 혼합물을 혼합물에 있는 세팔로스포린 C가 사라질 때까지 10시간동안 30℃와 pH 4.5에서 교반시킨다. 결과의 혼합물에 활성탄(3g)을 첨가한 후 혼합물을 여과시킨다. 여액을 pH 7.0으로 조정후 감압하에서 농축시켜 결정체를 얻고 이를 75%의 수용성 에탄올에 첨가한 후 혼합물을 연화시킨다. 결정체를 여과에 의해 분리한 후 진공에서 건조시켜 결정질의 디아세틸세팔로스포린 C(3.6g)을 얻는다.

상기에서 얻어진 결정체의 IR스펙트럼에 의해 디아세틸 세팔로스포린 C를 확인할 수 있다.

(3) 부동화 미셀리아를 사용한 디아세틸세팔로스포린 C의 제제

동결 및 해빙된 아우레오바시디움 풀룰란스 IFO 4466의 미셀리아(24g)를 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드(0.4g)과 아크릴아미드(7.5g)를 함유한 수용성용액(20ml)에 첨가한다. 혼합물에 5g의 N, N, N', N'-테트라메틸 에틸렌디아민(5ml) 사용액과 1%의 과황산 암모늄 수용액(5ml)를 4℃의 질소대기하에서 첨가한다. 반응혼합물을 1시간 동안 4℃의 유리관에서 중합시킨다. 산출된 폴리아크릴 아미드겔을 파쇄기에서 파쇄시킨다. 파쇄된 겔을 칼럼(부피용량 : 100ml)에 충전시킨 후 0.1M의 아세트산염 완충용액과 차가운 물(1ℓ)로 세척한다. 세팔로스포린 C소디움디하이드레이트(1.6mg/ml)를 함유한 수용액(1ℓ)를 SV=0.5의 속도로 준비된 칼럼에 통과시킨다. 어떠한 세팔로스포린 소디움디하이드레

이트도 통과하는 용액에 존재하지 않는다는 것을 확인한 후 통과된 용액을 pH 7.0으로 조정하고 감압하에서 농축시키고 5℃에서 하룻밤동안 방치시킨다. 잔사에 75%의 에탄올 수용액을 첨가한 후 결정체가 침전되도록 충분히 혼합하여 침전된 결정체를 분리하여 진공에서 건조시켜 결정질의 디아세틸 세팔로스포린 C(0.9g)을 얻는다.

결정체에 대한 IR스펙트럼으로 디아세틸 세팔로스포린 C의 진위를 확인한다.

[실시예 2]

3%의 콩, 2%의 슈크로스, 1%의 글루코스, 1%의 옥수수액제 및 0.5%의 탄산칼슘을 함유하고 있는 수용성매체(pH 7.0)(100ml)를 4개의 500ml의 삼각플라스크 각각에 주입한 후 120.0에서 20분동안 멸균시킨다. 매체 각각에 세팔로스포리움 아크레모니움 ATCC 11550의 사면배양을 접종시킨다. 생체를 5일동안 30℃의 진탕기에서 생장시킨다.

한편, 3%의 땅콩분말, 1%의 콩가루, 2%의 옥수수액제, 2%의 메틸올레이트, 0.5%의 황산암모늄, 0.6%의 DL-M메티오닌, 2%의 사탕무, 2%의 글루코스 및 0.8%의 탄산칼슘을 함유한 수용성매체(pH 7.0 : 20 ℓ)를 30 ℓ의 발효기에 주입한 후 120℃에서 20분 동안 살균시킨다. 매체상에 상기에서 얻어진 배양액의 전부피를 접종시킨다. 생체를 25℃에서 3일동안 생장시킨다.

그후, 1%의 글루코스, 0.3%의 펩톤 및 0.3%의 고기액즙을 함유한 수용성매체(pH 7.0 ; 100ml)를 4개의 500ml 삼각플라스크 각각에 주입한 후 120℃에서 20분동안 살균시킨다. 각각의 매체상에 아우레오 바시디움 풀룰란스 IF0 4466을 접종시킨다. 생체를 25℃에서 2일동안 배양시킨다. 배양액의 전부피를 3일 동안 상기에서 얻어진 세팔로스포리움 아크레모니움의 배양액상에 3일동안 접종시킨 후, 혼합배양액을 25℃에서 2일동안 항온시킨다. 그후, 혼합배양액을 바실루스 메가테리움을 사용하는 생물학적 자기묘사(bioautography) 및 바이오아세(bioassay)에 의해 분석한다. 분석결과에 의해, 배양액의 모든 세팔로스포린 C는 디아세틸세팔로스포린 C로 전환되었음을 알 수 있으며, 디아세틸세팔로스포린 C의 수율은 0.5mg/ml이다.

[실시예 3]

미셀리아(350ml)를 상기 실시예 1의 방법에 따라 제조된 아우레오 바시디움 풀룰란스 IF04466의 배양액(10 ℓ)로부터 원심분리시켜 모은다. 미셀리아에 1/5부피의 클로로포름을 첨가한다.

혼합물을 30분동안 교반시킨다. 그 부피의 물을 혼합물에 첨가한다. 수용성 혼합물을 24시간 동안 25℃에서 방치시킨다.

혼합물을 여과하여 효소추출액 I(1000ml)를 얻은 후, pH를 4.0으로 조정하고 여과하여 불용성물질을 제거한다. 여액을 막(분자량 : 0.1 million cut)을 사용하고 한 외여과에 의해 여과하여 80ml로 농축시킨 후 동결건조시켜 조분말을 얻는다. 조분말(4g)을 0.05M의 아세트산염 완충용액(pH 4.0 : 20ml)에 용해한 후 CM-Sephadex C-25의 칼럼(상표명 : Pharmacia AB에서 생산, 칼럼의 내부직경 : 40mm, 칼럼높이 : 675mm)을 통과시키고 칼럼을 상술된 것과 같은 아세트산염 완충용액(속도 : 64ml/시간)으로 전개시킨다. 목적화합물을 함유한 부분액(440ml)를 모아 DEAE-Sephadex A-25(상표명 : Pharmacia AB에 의해 생산, 칼럼의 내부직경 : 40mm, 칼럼 높이 : 785mm)를 통과시킨다. 칼럼을 0.05M의 아세트산염 완충용액(pH 4.0, 1000ml)으로 세척한 후 0.05M-0.25M의 아세트산염 완충용액(pH 4.0)으로 선형그라디언트 방법(속도 : 64ml/시간)에 의해 전개시켜 부분액 A(360ml)와 부분액 B(980ml)를 얻는다.

부분액 A는 부분액 B보다 1.7배이상 더 큰 특이활성을 갖는다. 부분액 A와 부분액 B를 한외여과에 의해 농축시키고, 각각 Sepharose 4B칼럼(상표명 : Pharmacia AB, 칼럼의 내부직경 29mm, 칼럼의 높이 : 535mm)에 통과시킨다. 각 칼럼을 0.05M의 아세트산염 완충용액(pH 4.0)으로 전개시켜 각각 부분액A로부터 효소용액 A(72ml)와 부분액 B로부터 효소용액 B(32ml)를 얻는다.

결과의 효소제제에 대한 각각의 특이활성은 하기표에서처럼 상대적 특이활성도로 표시된다. "상대적 특이활성도"는 효소추출액 I의 활성도를 "1"로 하였을 때 산출된 값을 의미한다.

효소제제	상대특이활성도	효소제제	상대특이활성도
효소추출액 I	1	효소용액 A	167
부분액 A	110	효소용액 B	105
부분액 B	64		

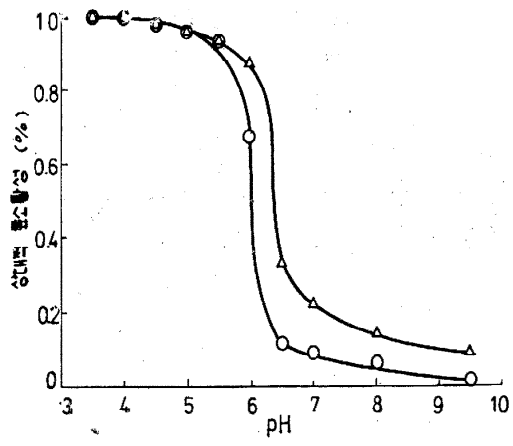
(57) 청구의 범위

청구항 1

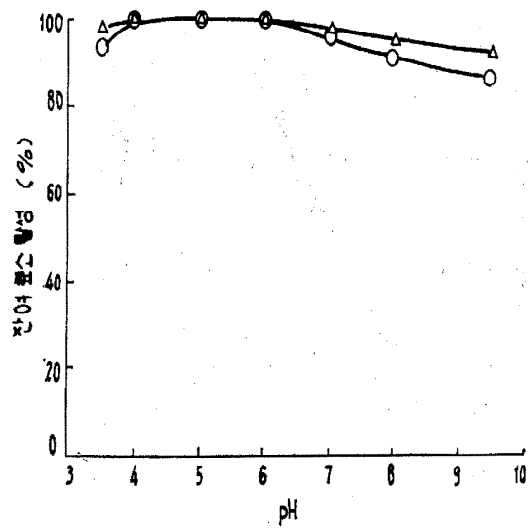
아우레오바시디움속에 속하는 균주에 의해 산출된 아세틸에스터라제와 세팔로스포린 C를 접촉시키는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는, 효소가수분해에 의해 세팔로스포린 C로부터 디아세틸세팔로스포린 C를 제조하는 방법.

도면

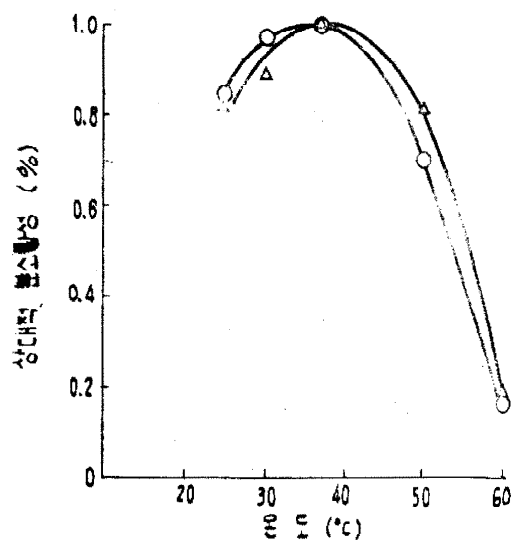
도면1



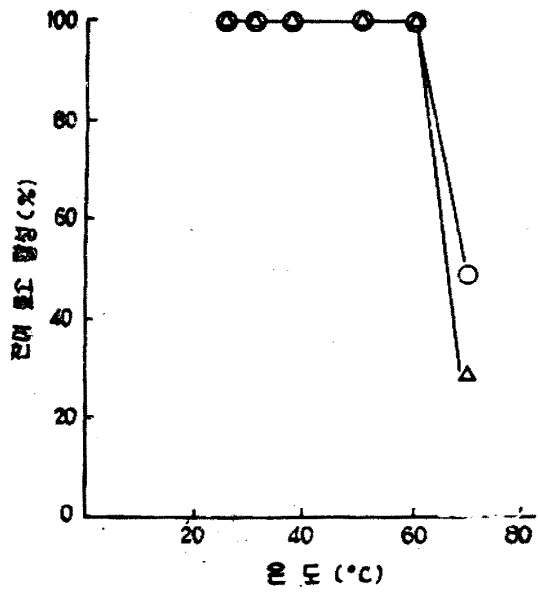
도면2



도면3



도면4



도면5

