(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12P 21/00
C12P 1/06

(45) 공고일자 1996년10월09일
(11) 공고번호 특1996-0013575

(21) 출원번호	특1987-0010011	(65) 공개번호	특1988-0004095
(22) 출원일자	1987년09월10일	(43) 공개일자	1988년06월01일

(30) 우선권주장 8621912 1986년09월11일 영국(GB)

그루포 레페티트 에스. 피. 에이 레나토 스가르비
이탈리아공화국, 20159 밀라노, 비아 무라트 23

(72) 발명자 엔리코 셀바
이탈리아공화국, 27027 그로펠로 카이롤리(피브이), 비아 디 비토리오 15
루시아노 가스탈도
이탈리아공화국, 20010 포글리아노 밀라네세(밀라노), 비아 산 마르티노 7
마우리지오 데나 로
이탈리아공화국, 20136 밀라노, 비알레 블리그니 41
지오반니 카싸니
이탈리아공화국, 27100 파비아, 비아 비타디니 3
프란체스코 파렌티
이탈리아공화국, 20020 라이나테(엠아이), 비아 벤베누토 셀리니 24

(74) 대리인 장수길

심사관 : 이세진 (책자공보 제4670호)

(54) 항생물질 A 40926 복합체 중 단일 주성분의 비율을 선택적으로 증가시키는 방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

항생물질 A 40926 복합체 중 단일 주성분의 비율을 선택적으로 증가시키는 방법

[발명의 상세한 설명]

항생물질 A 40926은 악티노마두라종(Actinomadura sp.) ATCC 39727(이 균주는 특허 출원 제85-7474호와 관련하여 1985년 12월 5일자로 한국과학기술원에 기탁 번호 KCTC 817P로 기탁되었음)이라 명명된 악티노마두라의 배양물로부터 단리된 글리코펩티드 항생물질로서, 이것은 인자 A, 인자 B, 인자 B_0, 인자 PA, 인자 PB로 명명된 인자들의 복합체이다(유럽 특허 제177882로 참조).

이 항생물질 복합체 및 그의 단일 인자들은 D-알라딘-D-알라딘 말단 올리고펩티드에 결합하고, 주로 그람-양성 박테리아 및 나이세리아속(Neisseriae)에 대해 활성이다.

본 발명은 목적하는 항생물질 인자의 적당한 전구체를 발효중에 A 40926 생산 배양물에 첨가하는 것으로 이루어지는 항생물질 A 40926의 인자 A 및(또는) 인자 B_0의 생산을 선택적으로 증진시켜서 이들 단일 성분들을 보다 양호한 수율로 단리시키거나 또는 상기한 성분중 어느 하나 또는 두 성분이 모두 풍부한 복합체를 제공하도록 하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 방법에 의하면, 예를 들면 대규모의 산업적 발효에서 항생물질 A 40926 복합체 중 단일 주성분의 비율을 조정하는 것이 사실상 가능하다. 그러므로 본 발명에 의한 방법은 표준 명세내역을 고수하는 최종 생성물의 조성을 조절하는데 유용한 도구가 된다.

또한, 본 발명에 의한 방법을 행함으로써 생산균주의 발효덩어리로부터 보다 높은 수율로 보다 적은 시간을 소모하여 순수한 형태로 단리시킬 수 있는, 항생물질 A 40926 인자 A 또는 B_0가 매우 풍부한 조 생성물을 직접 얻을 수가 있다.

본 발명의 추가 목적은 항생물질 A 40926 인자 PA 및(또는) PB의 생산을 증진시키는 방법에 있다. 이들 두 인자들은 각각 항생물질 A 40926 인자 A 및 B_0의 천연 전구체임이 유럽 특허 제177882호에 공지되어 있다. 그러므로 염기성 조건에 제한 노출시키면서 항생물질을 회수함으로써 인자 A 및(또

는) B_0 대신에 인자 PA 및(또는) PB가 풍부한 복합체를 얻을 수 있다. 특히, 항생물질 A 40926 인자 PA의 생산을 증진시키기에 적당한 전구체는 항생물질 A 40926 인자 A의 경우와 동일하고, 인자 PB에 적당한 전구체는 항생물질 A 40926 인자 B_0의 경우와 동일하다.

항생물질 A 40926 복합체 중 인자 B_0의 비율을 증가시키기에 적당한 전구체는 발린 및 그의 생산미생물에 대해 무독성인 산 및 염기와의 염, 알파-케토-이소발레르산, 그의 생산미생물에 대해 무독성인 염기와의 염 및 그의 모노-및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르, 이소부티르산, 그의 생산 미생물에 대해 부독성인 염기와의 염 및 그의 모노- 및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르, 이소부탄올 및 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 산과의 에스테르 중에서 선택된다.

항생물질 A 40926 복합체 중 인자 A의 비율을 증가시키기에 적당한 전구체는 n-프로판올 및 그의 생산미생물에 대해 무독성인 에스테르, 프로피온산, 그의 생산미생물에 대해 무독성인 염기와의 염 및 그의 모노-및 폴리-히드록시 저급알칸올과의 에스테르, 이소로이신 및 그의 생산미생물에 대해 무독성인 산 및 염기와의 염, 알파-케토-베타-메틸발레르산, 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 염기와의 염 및 그의 모노-및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르, 2-메틸부티르산, 그의 생산미생물에 대해 무독성인 염기와의 염 및 그의 모노-및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르, 2-메틸부탄올 및 그의 생산미생물에 대해 무독성인 산과의 에스테르 및 발효 조건하에서 프로피오닐-조효소 A로 전환될 수 있는 기타물질들 중에서 선택된다.

미생물에 대해 무독성인 염기와의 염이란 주어진 양이온의 종류 및 농도가 발효덩어리 중에서 사용된 농도에서 미생물 배양물의 생장 또는 목적하는 항생물질의 생산을 그다지 손상시키지 않는 염이다. 이와 같은 양이온의 예로서는 나트륨 이온, 칼륨이온, 칼슘이온 또는 마그네슘 이온과 같은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속 이온 및 암모늄 이온, 일급, 이급, 또는 삼급(C_1-C_4)알킬 암모늄 이온 및 히드록시(C_1-C_5)알킬 암모늄 이온과 같은 아민 이온을 들 수 있다. 적합한 염은 나트륨, 칼륨 또는 암모늄 이온과의 염이다.

생산 미생물에 대해 무독성인 산과의 염, 즉 이들이 발효덩어리 중에서 존재하는 농도에서 미생물 배양물의 생장 또는 목적하는 항생물질의 생산을 그다지 손상시키지 않는 산과의 염에 대한 예로서는, 경우에 따라서 유기산을 존재시킬 수 있으나, 염산염과 같은 무기산과의 염의 적합하다.

상기한 적당한 전구체의 모노-및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르로서는 분자 당 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 히드록시 기능기를 갖는 (C_1-C_6)알칸올과의 에스테르를 들 수 있다. (C_C--C_4)알칸올을 사용하는 경우에는. 두 인자를 동시에 증가시키고자 하는 경우가 아니면 다른 항생물질 인자 전구체로서는 작용하는 것(예, 이소부탄올 또는 2-메틸부탄올)과는 상이하여야 한다.

폴리-히드록시 알칼올의 예로서 적합한 것은 글리세롤 및 프로필렌 글리콜이다.

저급 알칼올이 상이한 에난티오머 및 에피머 형태로 존재하는 경우, 본 명세서 및 특허청구의 범위에서는 각 분리된 단일 형태 및 이들 단일 형태의 임의 비율 혼합물을 모두 의미한다.

미생물에 대해 무독성인 상기한 적당한 히드록시-함유 전구체의 에스테르로서는 발효 배지중에서 알칸오일 일부분의 종류 및 농도가 미생물 배양물의 생장 또는 목적하는 항생물질의 생산을 그다지 손상시키지 않는 (C_2-C_{22}) 알칸오일 에스테르를 들 수 있다. 일반적으로 직쇄(C_2-C_4)알칸올이 적합하다.

항생물질 A 40926 생산 배양물은 균주 악티노마두라종 ATCC 39727 또는 배양후 항생물질 A 40926을 회수가능한 양으로 생산할 수 있는 그의 생산 돌연변이체 또는 변종의 배양물이다.

본 발명에 의한 방법은 항생물질 A 40926 생산 배양물을 일반적으로 스트랩토 마이세스과, 특히 A 40926 생산균주의 배양에 대해 공지되어 있는 통상의 조건(역시, 유럽 특허 제177882호에 기재되어 있음)하에 동화될 수 있는 탄소원, 동화될 수 있는 질소원 및 무기염원을 함유하는 수성 영양 배지 중에서 배양시키되, 항생물질 A 40926 인자 A 및(또는) 인자 B_0의 생산을 선택적으로 증진시키기 위해 적당한 전구체 유효량을 첨가하는 것을 포함한다.

적당한 전구체는 발효중에 또는 전배양 중에, 연속적으로 또는 불연속적으로 발효 배지에 첨가하거나 또는 발효전에 배지에 첨가할 수 있다. 이 전구체가 발효온도에서 적당히 유동적인 경우에는 직접 첨가하거나 또는 용액, 현탁액 또는 에멀젼액으로서, 적합하기로는 현탁 수용액으로서 첨가할 수 있다.

적당한 전구체의 유효량이란 발효 배지에 첨가했을때 생산 미생물 배양물의 생장에 대해 유독 효과를 일으킴이 없이 항생물질 A 40926중 특정 인자의 선택적인 증가를 일으키기에 충분한 선택적인 전구체의 농도를 제공하는 상기 전구체의 양을 의미한다.

전구체의 첨가속도는 발효 배지에 대해 유독 효과를 일으킴이 없이 목적하는 인자의 수율을 상당한 정도 또는 최적의 정도까지 증가시키기에 충분한 정도로 높아야 한다.

일반적으로는 유효량의 적당한 전구체를 초기에 또는 발효액의 생산 단계 중에, 연속적으로 또는 단계적으로 공급하는 것이 유용할 수 있다.

경우에 따라서는 배양물에 대해 최소의 유독효과를 갖고, 최대의 결과를 제공하기 위해서 특정 인자의 전구체 중 몇몇 또는 모두의 혼합물을 공급하는 것이 편리할 수도 있다.

발효 후 목적에 따라서 항생물질 A 40926 복합체 또는 단일 인자 또는 B_0, PA 또는 PB를 공지된 방법 또는 그의 자명한 수정된 방법에 따라 회수할 수 있다.

본 발명의 방법에 사용될 수 있는 항생물질 A 40926 생산균주의 발효에 적합한 영양 발효 배지에는 통상적으로 다음과 같은 성분들을 함유시킨다. ; 즉, 예를 들면 당(예, 글루코오스, 슈크로오스, 말

토오스), 다당류(예, 전분, 텍스트란), 다가 알코올(예 ; 글리세롤, 프로필렌글리콜)로부터 선택될 수 있는 적합한 탄소원, 예를 들면 암모늄염, 아스파라긴, 땅콩가루, 콩가루, 고기 추출물, 트립톤, 펩톤, 이스트 가수분해물, 이스트 추출물 및 옥수수 줄기 모액으로부터 선택될 수 있는 적합한 질소원, 및 무기 염류, 배지중에 혼입시킬 수 있는 무기염류로는 나트륨 이온, 칼륨이온, 철이온, 아연 이온, 코발트이온, 마그네슘이온, 칼슘이온, 암모늄이온, 염화이온, 탄산이온, 황산이온, 인산이온, 질산이온 등을 생성할 수 있는 통상의 가용성 염류가 있다.

통상적으로는 항생물질 생산 균주를 진탕 플라스크 중에서 전배양하고, 이어서 항생물질 상당량을 생성시키기 위해 배양물을 항아리형 발효기에 접종한다. 전배양에 사용되는 배지는 보다 큰 발효공정에 사용되는 것과 동일할 수 있으나, 기타 배지를 사용할 수도 있다.

발효는 심부 호기성 조건하에 25℃ 내지 35℃, 적합하기로는 27℃ 내지 33℃의 온도에서 50내지 150시간동안 행한다. 선택적으로 유효량의 적다한 전구체의 첨가는 생산 균주로 접종하기 전에 도는 발효 개시 후 24 내지 48시간에 발효 배지에 행할 수 있다. 이 첨가 공정은 1회로 또는 수회로, 또는 연속적인 방법으로 행할 수 있다.

본 발명의 전형적인 실시형태에 의하면, 오트밀 한천 사면판 상의 항생물질 A 40926 생산균주 배양물을 식물성 배지 100ml를 함유하는 플라스크에 접종시킨다. 약 72시간 후, 배양물 5ml의 샘플을 사용해서 발효배지 100ml를 넣은 일련의 발효 플라스크를 접종시키고, 여기에 선택적 유효량의 전구체를 적절히 첨가한다. 항생물질 A 40926 복합체 중 2가지 인자를 동시에 증가시키고자 하는 경우에는 적당한 전구체를 적절히 첨가한다. 발효를 60 내지 150시간 동안 더 지속시키고, 이를 일정간격으로 HPLC에 의해 모니터한 후, 이어서 발효 케이크를 떼어내어 발효액의 샘플을 HPLC에 의해 분석한다.

항생물질의 회수는 당 업계에 공지된 방법으로 행할 수 있는데, 이는 유럽 특허 제177882호에 상세히 기재되어 있다.

수의 용으로서는 전체 발효 케이크 또는 농축 발효액을 사용할 수 있다.

전구체를 발효 배지에 첨가할 때는 설정된 pH범위에 그다지 영향을 미치지 않도록 첨가한다. 그리하여, 예를 들면, 유리산 전구체를 배지에 직접 첨가하는 경우에는, 배지를 완충시키거나 또는 미생물에 대해 무독성인 염기를 즉시 중화시켜서 pH를 유지시킨다.

첨가되는 전구체가 아미노산인 경우, 이것은 그의 생산 미생물에 대래 무독성인 산 또는 염기와의 염(예, 염산염 및 나트륨염)의 수용액으로서 발효 배지에 공급할 수 있으나, 대부분의 경우에는 아미노산을 내부염의 용액으로서 첨가하는 것이 편리하다. 라세미 혼합물 및 광학적으로 활성인 이성질체를 모두 전구체로서 사용할 수도 있다.

그러나, 일반적으로는 L-형을 첨가하는 것이 대응하는 D-형을 첨가하는 경우 보다 높은 수율을 제공한다.

그리하여, 본 발명에 의한 방법의 적합한 실시형태는 항생물질 A 40926 복합체의 인자 B_0 또는 PB(L-발린, 그의 염 또는 에스테르) 및(또는) 인자 A 또는 PA(L-이소로이신, 그의 염 또는 에스테르)의 농도를 증진시키기 위해 L-형 아미노산 전구체를 상요하는 것이다. 또한 본 발명의 적합한 실시형태에 의하면, 발효 생산물 중 인자 A 또는 B_0의 백분율을 복합체의 80% 이상으로 증가시킬 수 있다.

저급 알칸산 전구체 (예, 2-메틸부티르산, 아소부티르산, 알파-케토-이소발레르산 및 알파-케토 -베타-메틸발레르산)를 사용하는 경우에는, 무독성 염기와의 염 (통상적으로 암모늄염 및 나트륨이 적합함)의 수용액으로서 첨가할 수 있다.

상기 저급 알칸산 및 불포화 지방산의 모노-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르를 전구체로서 사용하는 경우에는, 이로서 C_4-C_6 알칸올과의 에스테르를 사용할 수도 있으나, 통상적으로는 메탄올, 에탄올 및 프로판올로부터 유도한다. 이 경우에, C_4-C_6 알칸올은 다른 인자를 동시에 증가시키고자 하는 경우가 아니면 다른 인자의 전구체로서 작용할 수 있는 것(예, 이소부탄올, 2-메틸부탄올 및 프로판올)과는 상이하여야 한다.

통상적으로, 이소부탄올, 2-메틸부탄올 및 n-프로판올과 같은 알칸올 전구체는 그 자체로 발효 배지에 첨가한다. 그러나, 이 전구체를 미생물에 대해 무독성인 산의 에스테르로서 공급할 수도 있다. 이들 산들은 다른 인자를 동시에 증가시키고자 하는 경우가 아니면 다른 A 40926 인자의 전구체로서 작용할 수 있는 것과는 상이하여야 한다. 통상적으로는, 아세트산, 프로피온산 및 부티르산과 같은 직쇄(C_2-C_4)알칸산과의 에스테르가 적합하다.

본 발명에 의한, 발효 배지에 첨가되는 선택적인 유효량은 전구체의 종류에 좌우된다. 저급 알칸산 (이소부티르산, 2-메틸부티르산)이 에스테르를 사용하는 경우에는, 통상적으로 발효 배지중에서 0.1g/리터 내지 5g/리터, 바람직하게는, 0.1g/리터 내지 1g/리터 범위의 산 농도를 제공하는 양을 사용한다. 저급 알칸을(이소부탄올, 2-메틸부탄올, n-프로판올) 또는 그의 미생물에 대해 무독성인 산과의 에스테르를 사용하는 경우에는, 통상적으로 0.5g/리터 내지 5g/리터, 적합하기로는, 1g/리터 내지 2g/리터 범위의 알코올 농도를 제공하는 양을 사용한다.

아미노산(예, 발린, 이소로이신) 및 케토-산(알파-케토-이소발레르산, 알파-케토-베타-메틸발레르산) 또는 그의 산 및 염기와의 염을 사용하는 경우, 발효 배지에 첨가되는 선택적 유효량은 통상적으로 0.2g/리터 내지 5g/리터, 적합하기로는, 0.5g/리터 내지 4g/리터, 특히 적합하기로는 2g/리터 내지 4g/리터의 범위이다.

저급 알칸산(예, 이소부티르산, 2-메틸부티르산) 또는 그이 염을 발효 배지에 직접 첨가하는 경우에, 선택적인 유효량은 통상적으로 0.1g/리터 내지 2.5g/리터, 적합하기로는, 0.3g/리터 내지

1.5g/리터의 범위이다.

상기한 것보다 높은 농도는 A 40926 인자중 어느 한 인자의 상재적인 백분율을 증진시키는데 효과적이기는 하지만, 일반적으로 배양물에 대한 유독 효과로 인해 전체 수율은 저하된다.

이하, 본 발명은 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다.

실시예 1

한천 사면판 상의 악티노마두라종 ATCC 39727의 배양물로 다음과 같은 배지 100ml를 내포하는 500ml을 엘렌마이어 플라스크를 접종시켰다.

공기 추출물	5g
자기분해된 이스트	5g
펩톤	5g
가수분해된 카제인	3g
글루코오스	20g
NaCl	1.5g
$CaCO_3$	4g
증류수(적량)	1000ml

플라스크를 200rpm의 회전 진탕기 상에서 약 72시간동안 28℃에서 인큐베이션을 시키고, 이어서 균사체를 원심분리에 의해 모은 후, 멸균 탈이온수로 2회 세척하고, 멸균 탈이온수 100ml중에 현탁시켰다. 이 현탁액 중 2ml를 사용해서 상기 배지 100ml를 내포하는 500ml용 엘렌마이어 플라스크를 접종시킨 후, 여기에 적당한 전구체를 첨가한다. 항생물질 제조 과정을 시험 유기체로서 최소 배지 상의 고초균(B. subtilis)을 사용하여 페이퍼-디스크 한천 확산법에 의해 모니터하였다.

200rpm의 회전 진탕기 상에서 72시간동안 배양시킨 후, 여과에 의해 발효 케이크를 제거하고, 여액을 세파로오스-입실론-아미노카프로일-D-알라딘-D-알리닌 컬럼(수지 0.5ml/발효액 0.3ml)에 통과시키고, 1%(w/v)암모니아 수화물로 용출시켰다. 항생물질 A 40926을 함유하는 분화물을 모아서, 실온에서 1일동안 방치한 후, 이어서 HPLC에 의해 다음과 같은 방법으로 분석하였다.

컬럼 : 실란화 실리카겔 Ultrasphere ODS(5 마이크로미터)

Altex[벡크만(Beckman) 제품]

4.6mm(내경)×250mm

전-컬럼 : 실란화 실리카겔 Brownlee Labs RP 18(5마이크로미터)

용출제 A : CH_3CN 10%

pH 6.0으로 조절

(2.5g/리터) $NaH_2PO_4 . H_2O$ 90%

용출체 B : CH_3CN 70%

pH 6.0으로 조절

용출 : 40분 이내에, 용출체 A 중에서 5내지 60%의 용출체 B 선형 구배.

유속 : 1.8ml/분

U. V. 검출기 : 245nm

내부 표준물 : 테이코플라닌 A_2 , 성분 2, Rt= 20.3분[그루포 레퍼티트 에스. 피. 에이. (Gruppo Lepetit S. p. A.)제품]

상대 체류 시간 : A 40926 A	1.12
A 40926 B0	1.22
A 40926 B1	1.27
A 40926 PA	1.15
A 40926 PB	1.27

백분율 분포

각 성분들을 상기 방법으로 분리시킨 후, 그의 상대 분포를 면적 백분율법에 의해 2개 피크의 전체 백분율로서 얻었다.

대표적인 실험의 결과를 하기하였다.

[표 1]

첨가한 전구체 (nM)	전체농도 (마이크로그램/ml)	% 인자 A / 인자 A + 인자 B_0	% 인자 B_0 / 인자 A + 인자 B_0
무 (-)	24-60	22-36	78-64
L-발린 8	24	5	95
L-이소로이신 8	13	59	41
이소부탄올 5	30-57	3-18	97-81
n-프로판올 5	34	51	48
2-메틸-1-부탄올 5	34	47	53

본질적으로는 상기한 방법을 따르되, 24시간 동안 방치하는 대신에 암모니아 용출액을 재빨리 중화시켜서, 항생물질 A 40926 인자 및 B 대신에 인자 PA 및(또는) PB를 각각 얻었다.

그의 백분율 및 결과는 상기 인자 A 및 B에서 서술한 것과 실질적으로 동의하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

악티노마두라종 ATCC 39727 또는 그의 항생물질 A 40926 생산 돌연변이체의 배양물에, n-프로판올 및 그의 생산물에 대해 무독성인 에스테르, 프로피온산, 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 염기와의 염 및 그의 모노-또는 폴리 히드록시 저급 알칸올과의 에스테르, 이소로이신 및 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 산 및 염기와의 염, 알파-케토-베타-메틸발레르산, 그의 생산미생물에 대해 무독성인 염기와의 염 및 그의 모노-및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르, 2-메틸부티르산, 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 염기와의 염 및 그의 모노-및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르, 2-메틸 부탄올 및 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 산과의 에스테르 중에서 선택되는 항생물질 A40926 복합체 중인자 A 또는 PA의 비율을 증가시키는 전구체, 또는 발린 및 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 산 및 염기와의 염, 알파-케토-이소발레르산, 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 염기와의 염 및 그의 모노-및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르, 이소부티르산, 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 염기와의 염 및 그의 모노-및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르, 이소부탄올 및 그의 생산 미생물에 대해 무독성인 산과의 에스테르 중에서 선택되는 항생물질 A 40926 복합체 중 인자 B_0 또는 PB의 비율을 증가시키는 전구체를 첨가하는 것으로 이루어지는, 인자 A 및(또는) B_0, 또는 PA 및(또는) PB가 풍부한 항생물질 A 40926 복합체의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 첨가한 전구체가 발린 또는 그의 미생물에 대해 무독성인 산 및 염기와의 염이고, 그의 양이 0.2g/리터 내지 5g/리터인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 첨가한 전구체가 이소부티르산의 또는 그의 미생물에 대해 무독성인 염기와의 염이고, 그의 양이 0.1g/리터 내지 2.5g/리터인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 첨가한 전구체가 이소부티르산의 모노-또는 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르이고, 그의 양이 0.1g/리터 내지 5g/리터인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 첨가한 전구체가 이소부탄올 또는 그의 미생물에 대해 무독성인 산과의 에스테르이고, 그의 양이 0.5g/리터 내지 5g/리터인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 첨가한 전구체가 이소로이신 또는 그의 미생물에 대해 무독성인 산 및 염기와의 염

이고, 그의 양이 0.2g/리터 내지 5g/리터인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 첨가한 전구체가 2-메틸 부티르산 또는 그의 미생물에 대해 무독성인 염기와의 염이고, 각각의 선택적 유효량이 0.1g/리터 내지 2.5g/리터인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 첨가한 전구체가 2-메틸 부티르산의 모노-또는 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르이고, 그의 양이 0.1g/리터 내지 5g/리터인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 첨가한 전구체가 2-메틸부탄올, n-프로판올 또는 그의 미생물에 대해 무독성인 산과의 에스테르이고, 그의 양이 0.5g/리터 내지 5g/리터인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 첨가한 전구체가 알파-케토-베타-메틸발레르산, 그의 미생물에 대해 무독성인 염기와의 염, 또는 그의 모노-및 폴리-히드록시 저급 알칸올과의 에스테르이고, 그의 양이 0.2g/리터 내지 5g/리터인 방법.

청구항 11

제1, 2, 3, 6, 7 또는 10항에 있어서, 미생물에 대해 무독성인 염기와의 염이 나트륨 또는 암모늄인 방법.

청구항 12

제1, 4, 8 또는 10항에 있어서, 에스테르가 메탄올, 에탄올, 프로판올, 에틸렌그리콜 및 글리세롤중 어느 하나와의 에스테르인 방법.

청구항 13

제1, 2 또는 6항에 있어서, 아미노산이 L-형인 방법.

청구항 14

제1, 2 또는 6항에 있어서, 미생물에 대해 무독성인 산과의 염이 염산염 또는 황산염인 방법.

청구항 15

제1, 5 또는 9항에 있어서, 미생물에 대해 무독성인 산과의 에스테르가 아세트산, 프로피온산 및 부티르산중 어느 하나와의 에스테르인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 균주가 악티노마두라종 ATCC 39727인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 발효를 25℃ 내지 35℃의 온도에서 행하는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 전구체의 첨가를 전배양 중, 발효 개시 또는 발효 개시 후 24 내지 48시간에 행하는 방법.

청구항 19

제2항에 있어서, 상기 전구체의 양이 0.5g/리터 내지 4g/리터인 방법.

청구항 20

제3항에 있어서, 상기 전구체의 양이 0.3g/리터 내지 1.5g/리터인 방법.

청구항 21

제4항에 있어서, 상기 전구체의 양이 0.1g/리터 내지 1g/리터인 방법.

청구항 22

제5항에 있어서, 상기 전구체의 양이 1g/리터 내지 2g/리터인 방법.

청구항 23

제6항에 있어서, 상기 전구체의 양이 0.5g/리터 내지 4g/리터인 방법.

청구항 24

제7항에 있어서, 상기 전구체의 양이 0.3g/리터 내지 1.5g/리터인 방법.

청구항 25

제8항에 있어서, 상기 전구체의 양이 0.1g/리터 내지 1g/리터인 방법.

청구항 26

제9항에 있어서, 상기 전구체의 양이 1g/리터 내지 2g/리터인 방법.

청구항 27

제10항에 있어서, 상기 전구체의 양이 2g/리터 내지 4g/리터인 방법.

청구항 28

제17항에 있어서, 상기 발효를 27℃ 내지 33℃의 온도에서 행하는 방법.