(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[6]
C12P 41/00
C12P 13/04

(45) 공고일자 2003년07월07일
(11) 등록번호 10-0383494
(24) 등록일자 2003년04월28일

(21) 출원번호 10-1995-0017509
(22) 출원일자 1995년06월26일

(65) 공개번호 특1996-0001133
(43) 공개일자 1996년01월25일

(30) 우선권주장 P4422045.6 1994년06월26일 독일(DE)

(73) 특허권자 훽스트 쉐링 아그레보 게엠베하
독일연방공화국 베를린(우:데-13509) 미라우스트라쎄54

(72) 발명자 로타빌름스
독일연방공화국데-65719호프하임쾨니히스타이너스트라세59

클라우스바르취
독일연방공화국데-61462쾨니히스타인임클라인펠트54

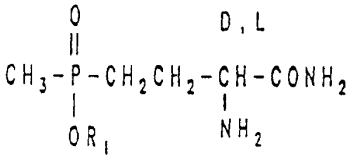
(74) 대리인 김창세
장성구

심사관 : 원종혁

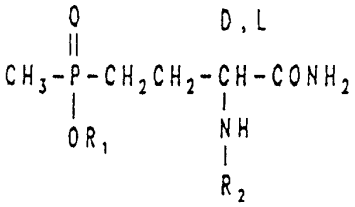
(54) 2-아미노-4-메틸-포스피노부탄아미드유도체의효소적절단방법

요약

본 발명은 수성 또는 수성-유기 배지중에서 가수분해적으로 활성인 효소로 하기 일반식(I) 및 (II)의 D- 및 L-PTC 유도체의 혼합물을 처리함을 포함하는, PTC 유도체의 효소적 분리 방법을 제공한다:



(I)



(II)

상기식에서, R_1 및 R_2 는 상기 정의한 바와 같다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

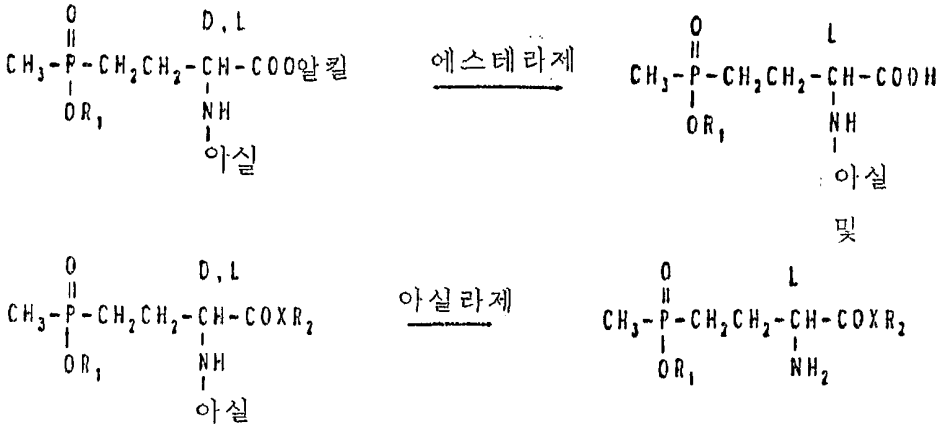
제 1 도는 유일한 질소원으로서 10mM PPT-AM을 갖는 최소 배지에서 생육한 엔테로박터 아에로제네스(Enterobacter aerogenes)(DSM 기탁 번호: DSM 9164) 배양 상등액의 아미노산 프로파일을 도시한다.
제 2 도는 유일한 질소원으로서 10mM PPT-Ac를 갖는 최소 배지에서 생육한 엔테로박터 아에로제네스(DSM 기탁 번호: DSM 9164) 배양 상등액의 HPLC 프로파일을 도시한다.

발명의 상세한 설명

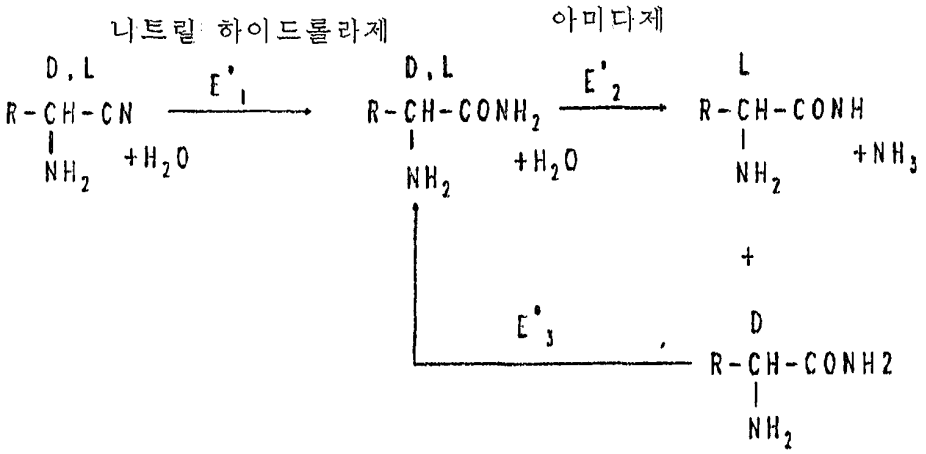
발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

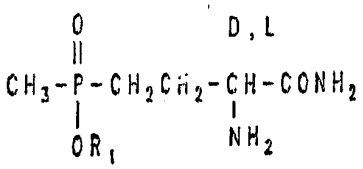
본 발명은 선택적으로 작용하는 L-아미노산 아미드-절단 효소 또는 미생물을 사용하는, 수성 또는 수성-유기 배지중의 가수분해 활성 효소로 D- 및 L-2-아미노-4-메틸포스피닐부타노산(본원에서는 L-포스피노트리신 또는 L-PTC라 칭한다) 유도체의 혼합물을 처리하여 PTC 유도체를 효소적으로 분리하는 방법에 관한 것이다.
L-PTC, 또는 그의 염기 또는 산과의 염은, DE-A-2939269에 개시되어 있는 바 와 같이, 화학적으로 쉽게 수득할 수 있는 라세미체의 활성 성분, 즉 2-아미노-4-메틸-포스피닐부타노산이다. DE-A 2717440에 개시된 시험은 L-포스피노트리신이 광범위한 잡초에 대해 현저한 제초 활성을 갖는 반면, D-형은 불활성임을 보였다. 이는 L-형을 경제적인 방법에 의해 수득할 수 있도록 하는 유용한 방법의 개발 필요성을 발생시킨다.
L-PTC 를 L-PTC-알라닐-알라닌(상기는 문헌에 미생물 기원의 항생물질로서 공지되어 있음)의 산 가수분해(JA-OS 73-85538) 또는 효소적 분해(JA-OS 74-31890)에 의해 수득할 수 있음은 이미 개시되어 있다.
더우기, 화학적으로 합성된 라세미 PTC 전구체들의 효소적 분해를 기본으로 하는 공지된 방법들이 공지되어 있다. DE-A 2939269에는 N-아실-PTC, 특히 N-아세틸-PTC를, 슈도모나스(Pseudomonas), 스트렙토마이세스(Streptomyces) 또는 아스퍼질러스(aspergillus) 속의 특이적으로 생육시킨 미생물 균주로부터 수득할 수 있는 아실라제로 절단하는 방법이 개시되어 있다.
EP 0 382 113에는 에스테라제를 사용하여 라세미 2-아실아미노-4-(알콕시-메틸포스피닐)부탄카복실산 에스테르를 효소적으로 절단시키고 아실라제를 사용하여 2-아실아미노-4-(알콕시-메틸포스피닐)부타노산 에스테르 및 -부탄아미드를 효소적으로 절단시키는 다양한 방법들이 개시되어 있다.
식 1:



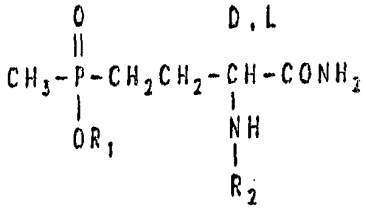
WO 8910969 A에는 특히 아릴-치환된 라세미 아미노니트릴을 먼저 아시네토박터 칼코아티엔스(Acinetobacter calcoatiens)(DSM 3875) 배양물과 함께 배양시킴으로서 상응하는 D,L-아미노산 아미드로 전환시키고, 다음 단계로 이들 생성물을 L-아미노산 아미다제, 예를 들어 아쓰로박터(Arthrobacter) ATCC 31652에 의해 절단시켜 L-아미노산을 수득하고 나머지 D-아미노산 아미드를 아미드 라세마제에 의해 동시에 라셈화시키는 방법이 개시되어 있다(식 2)
.
식 2:



상기식에서,
R 은 예를 들어 -CH $_2$ C $_6$ H $_5$ 이고;
E $_1$ * 는 아미노티트릴 하이드롤라제이고;
E $_2$ * 는 L-아미노산 아미드 아미다제이고;
E $_3$ * 는 D-아미노산 아미드 라세마제이다.
상기 모든 합성 단계들을 연속적으로 또는 동시에 수행할 수 있다 하더라도, 상기 방법은 부수적인 공정들의 복잡성으로 인해 3개의 상이한 효소들을 사용하여 L-아미노산을 산업적인 규모로 생산하기에는 다소 전망이 없어 보인다.
인 함유 라디칼을 갖는 아미노산의 절단 가능성은 제시되어 있지 않다. 이는 P(V)-함유 화합물, 특히 일반식 R'R'P(O)OR''의 유도체가 이들의 입체 배열에 기 인하여 효소적으로 가수분해된 카복실레이트의 전이 상태를 의태하며, 따라서 탈활성화 효과를 가질 수도 있다는 사실에 기인하는 것으로 보인다(M. Dixon, E. Webb, 'Enzymes' e. Edition, Longmans, Green amp; Co. LTD, London 1964, pp. 346-352 참조).
문헌[J. Org. Chem. 53, 1826(1988)]에는 또한 마이코박테리움 네사우륨(Mycobacterium nesaurum)(ATCC 25725)을 사용하여 라세미 α-알킬화된 아미노산 아미드를 효소적 분리시켜 α-알킬화된 L-아미노산 및 상응하는 D-아미노산 아미드를 수득하는 방법이 개시되어 있으나, 수득된 에난티오머 과잉은 단지 적당한 정도이다.
EP-A 193 113에는, 예를 들어 슈도모나스와 같은 미생물에 의해, 예를 들어 D,L-페닐알라닌 아미드와 같은 라세미 α-아미노산 아미드를 가수분해시켜 L-아미노산을 수득함이 개시되어 있다. 남은 D-아미노산 아미드는 강 염기, 예를 들어 NaOH에 의해 라셈화시키고, 상기 공정내로 재순환시킨다. 다시 상기 특허의 내용도 인 함유 아미노산 유도체의 사용에 관해서는 어떠한 제시도 없다.
최종적으로, 문헌[Bull. Chem. Soc. Japan 61, 3599(1988)]에는 글루타미나제 효소에 의해 L-2-아세트아미도-4-(메틸포스피닐)부탄아미드 또는 L-2-아세트아미도-4-(에톡시메틸포스피닐)부탄아미드를 가수분해하여 L-2-아세트아미도-4-(메틸포스피닐)부타노산 및 L-2-아세트아미도-4-(에톡시메틸포스피닐)부타노산을 수득함이 개시되어 있다. 그러나, 이들 아미다제 반응들은 단지 당해의 L-배위 포스피노트리신 아미드 유도체만을 사용하여 수행하는 것으로 표현되어 있으며, 따라서 저 렴한 라세미 전구체들로부터의 L-포스피노트리신의 경제적인 합성 경로는 제공되어 있지 않다.
상술한 종래 기술로부터, 쉽게 입수할 수 있는 포스핀산 잔기가 변형된 포스피노트리신 아미드를 효소적으로 사용하여 L-포스피노트리신을 효율적으로 합성할 수 있음을 예견할 수 없다.
본 발명은 선택적으로 작용하는 L-아미노산 아미드-절단 효소 또는 미생물을 사용하는 수성 또는 수성-유기 배지중의 가수분해적 활성 효소로 하기 일반식(I) 및 (II)의 D- 및 L-PTC 유도체의 혼합물을 처리함을 포함하는 PTC 유도체의 효소적 분리 방법을 제공한다:



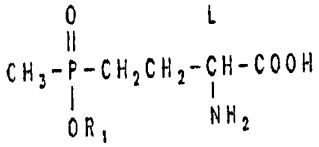
(I)



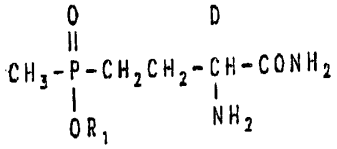
(II)

상기식에서,
R $_1$ 은 하나 이상의 할로겐 라디칼(예를 들어 불소, 염소, 브롬 또는 요오드)에 의해 치환되거나 비치환된 또는 (C $_1$ -C $_8$)알콕시에 의해 일치환 또는 다치환된, 선형 또는 분지된 (C $_1$ -C $_{20}$)알킬; (C $_1$ -C $_4$)-알킬, (C $_1$ -C $_4$)-알콕시 및 할로겐으로 이루어진 그룹중에서 선택된 하나 이상의 그룹에 의해 치환되거나 비치환된 (C $_3$ -C $_8$)-사이클로 알킬; (C $_3$ -C $_{10}$)알케닐; (C $_3$ -C $_{10}$)-알키닐; 또는 벤질이고,
R $_2$ 는 포밀; 하이드록실, 할로겐, (C $_1$ -C $_4$)-알콕시, (C $_1$ -C $_4$)-알킬티오, 및 페닐(페닐은 (C $_1$ -C $_{12}$)-알킬, (C $_1$ -C $_{12}$)-알콕시, 할로겐, 니트로 및 CF $_3$ 로 이루어진 그룹중에서 선택된 3개 이하의 라디칼에 의해 치환될 수 있다)로 이루어진 그룹중에서 선택된 하나 이상의 라디칼에 의해 알킬잔기가 치환되거나 비치환된, 선형 또는 분지된

(C_1-C_{20})-알킬카보닐; 또는 (C_1-C_{12})-알킬 (C_1-C_{12})-알콕시, 할로겐 니트로 및 CF_3로 이루어진 그룹중에서 선택된 1개 내지 3개의 라디칼에 의해 치환되거나 비치환된 벤조일이다.
일반식(I) 및 (II)의 라세미 아미노산 아미드 유도체 또는 L-형이 풍부한 아미노산 아미드 유도체를 사용할 수 있다. 남은 D-포스피노트리신 아미드 유도체는 예를 들어 염기의 작용에 의해 라셈화시키고 상기 공정내로 재순환시킬 수 있다.
상기 반응을 또한 D-아미노산 아미드 라세마제의 존재하에서 수행하여 순수한 L-포스피노트리신 유도체를 최종적으로 수득할 수 있다.
특히 중요한 것은
R_1이 할로겐(예를 들어 불소,염소), 또는 (C_1-C_4)알콕시에 의해 치환되거나 비치환된 선형 또는 분지된 (C_1-C_{10})알킬, 또는 (C_5-C_6)-사이클로알킬이고,
R_2가 수소, 포밀; 하이드록실, 할로겐, (C_1-C_4)-알콕시, (C_1-C_4)-알킬티오, 및 (C_1-C_4)-알킬, (C_1-C_4)-알콕시 및 할로겐으로 이루어진 그룹중에서 선택된 1개 내지 3개의 라디칼에 의해 치환되거나 비치환된 페닐로 이루어진 그룹중에서 선택된 1개 또는 2개의 라디칼에 의해 알킬 잔기가 치환되거나 비치환된, 선형 또는 분지된 (C_1-C_{10})-알킬카보닐; 또는 (C_1-C_4)-알킬, (C_1-C_4)-알콕시 및 할로겐으로 이루어진 그룹중에서 선택된 1개 내지 3개의 라디칼에 의해 치환되거나 비치환된 벤조일인
상기 일반식(I) 및 (II)의 D- 및 L-PTC 유도체의 혼합물을 사용함을 포함하는 본 발명에 따른 방법이다.
R_1이 선형 또는 분지된 (C_1-C_{10})알킬이고,
R_2가 수소; (C_1-C_4)-알킬, (C_1-C_4)-알콕시 및 할로겐으로 이루어진 그룹중에서 선택된 1개 내지 3개의 치환체에 의해 일치환 내지 삼치환되거나 비치환된 페닐에 의해 치환된 (C_1-C_{10})-알킬카보닐(바람직하게는 펜아세틸) 또는 벤조일인
상기 일반식(I) 및 (II)의 D- 및 L-PTC 유도체의 혼합물을 사용함을 포함하는 본 발명에 따른 방법이 바람직하다.
(C_1-C_6)-알킬은 특히 메틸, 에틸, 1-프로필 또는 2-프로필, n-부틸, i-부틸, 3급-부틸 또는 2-부틸, 3-메틸-부트-2-일, n-펜틸, i-펜틸, 3급-펜틸, 2-펜틸 또는 ,3-펜틸, n-헥실 또는 헥실 입체이성체이다. C_1-C_6-알콕시는 특히 (C_1-C_6-알킬)-옥시이며, 이때 알킬 라디칼은 상술한 의미를 갖는다.
보다 상세히 정의하지 않는한, 할로겐은 불소, 염소, 브롬 및 요오드, 바람 직하게 불소 및 염소, 특히 염소 라디칼이다.
본 발명에 따른 절단은 R_1 및 R_2가 상기 정의한 바와 같은 일반식 (I) 및 (II)의 D,L-PTC 유도체의 N-아실 절단에 의해 실현될 수 있다.
일반식(I)의 아미노산 아미드 유도체의 상기 아미다제 절단에 의해 하기 일반식(III)의 상응하는 포스핀 에스테르-보호된 L-포스피노트리신을 제공하는데, 이는 공지된 경로인 공지된 방식(예를 들어 산성범위의 pH에서 절단된 미반응된 D-PTC 유도체를 산으로부터 추출 제거함)으로 하기 일반식(IV)의 미반응된 아미드로부터 단리될 수 있으며, 상기 공정에서는 L-PTC 유도체는 암모늄 염의 형태로 수용액중에 존재하며 상기 수용액을 증발 건조시킴으로써 단리될 수 있다:

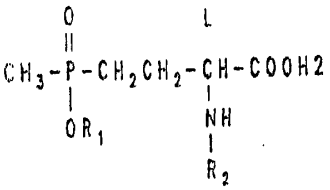


(III)

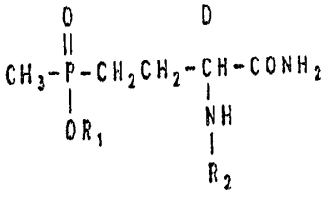


(IV)

다른 실행가능한 방법들은 특히 결정화, 증류 또는 크로마토그래피에 의한 분리이다.
상기 일반식(II)의 N-아실-아미노산 유도체의 아미다제 절단은, 상응하는 하기 일반식(V)의 포스핀 에스테르-보호된 L-N-아실포스피노트리신을 하기 일반식(VI)의 미반응된 D-N-아실아미노산 아미드와의 혼합물 형태로 제공한다:



(V)



(VI)

효소적으로 가수분해된 L-PTC 유도체(V)는 통상적인 방식 또는 원칙적으로 공지된 방식, 예를 들어 결정화, 증류, 컬럼 또는 이온교환 크로마토그래피에 의해 성공적으로 단리시킬 수 있으며, 특히 경우에 따라 0 내지 10℃의 저온에서 적합한 유기 용매를 사용하여 수성상(pH는 바람직하게 9 내지 11, 특히 9.5 내지 10.5이다)으로부터 미반응된 D-PTC 유도체를 고속 추출함으로써 성공적으로 단리시킬 수 있는데, 이때 상기 아미드 절단에 의한 L-PTC 유도체는 카복실레이트 염의 형태로 상기 수성상중에 존재한다.
D-유도체를 분리시킨 후에, L-PTC 유도체를 통상적인 방법과 유사하게, 예를 들어 20℃ 내지 용액의 비점의 온도에서 수성 묽은 무기산을 사용하여 1 내지 24시간 동안 화학적으로 가수분해시킨다. 적합한 무기산의 예로는 할로겐화

수소산 또는 황산, 특히 묽은 내지 진한 염산이다.
그러나, 유기산도 또한 개별적인 경우에 매우 적합하다. 화학적인 전체 가수분해는 L-PTC 뿐만 아니라, 아실 라디칼 R^2에 상응하는 카복실산을 제공하며, 상기 카복실산은 증류 또는 적합한 유기 용매로 추출함으로써 상기 산성 수용액으로부터 제거할 수 있다.
남은 D-PTC 유도체를 추출공정, 증류, 결정화 또는 크로마토그래피에 의해 부산물로부터 정제되고, 다시 D,L-혼합물의 형태로 효소적 가수분해되는데 경우에 따라, 예를 들어 알콜 용액중의 알콜레이트와 같은 염기의 작용에 의하거나 열적으로 라셈화시킨 후에 가수분해된다. 대체로, 상기와 같이 염기를 사용하는 라셈화는 특히 온화한 공정이다.
상술한 효소를 유리 형태로 사용하거나 또는 통상적인 공정 또는 숙련가들에게 공지된 공정에 의해 고정화시킨 후에 사용할 수 있다. 문제의 기질을 수성 매질중의 현탁액 또는 용액의 형태로 사용한다. 0.1% 내지 포화 용액(이때 상기 공정은 현탁액중에서 수행한다)의 농도가 가능하다. 또한, 수불용성인 유기 용매를 가하는 2상 혼합물을 포함한 공정인 경우와 같은 개별적인 경우에는 수용성 용매(예를 들어 메탄올)를 첨가할 수 있다.
대체로, 효소적 절단의 반응 온도는 10 내지 60℃, 바람직하게 20 내지 40℃이다. 예를 들어, 상기 공정을 배치식 또는 연속식 컬럼공정으로서 수행할 수 있다.
상기 효소적 가수분해를 바람직하게 5 내지 12의 pH, 특히 6 내지 10의 pH에서 수행하며, 또한 카복실레이트 또는 카복스아미드의 비특이적인 가수분해를 억제하기 위해서 개별적인 경우에 5 내지 7의 pH에서 수행할 수도 있다.
반응 과정은, 예를 들어 HPLC에 의해 기질의 손실을 측정함으로써 모니터할 수 있다. 개별적인 경우, 특히 카복실산 에스테르를 절단하는 경우의 반응 과정은, 다른 단순한 방법들에 의해 예를 들어 pH가 일정해질 때까지 계량첨가해야 하는 염기의 양을 측정함으로써 또한 모니터할 수 있다.
효소적 절단 생성물중의 L-화합물의 함량은, 상기 화합물을 알칼리성 또는 산성 가수분해시켜 L-PTC를 수득한 다음 유도체화시킨 후에 원칙적으로 공지된 방식(D. Asward, Analytical Biochemistry 137, 405-409(1984))으로 HPLC를 사용하여 측정할 수 있다.
일반식(II)의 출발 물질은 공지되어 있거나 또는 그 자체로서 공지된(참조. EP 0 382 114) 공정에 의해 제조할 수 있다.
일반식(I)의 출발 물질은 아직 공지되어 있지 않으며, 따라서 본원 발명의 대상이다. 상기 화합물의 합성은 실시예에 의해 실험 부분에 개시되어 있다.
임의로 유도체화된 PTC 유도체에서 D 또는 L의 용어는, 카복실기에 대해 α-위치에 있고 임의로 보호된 아미노기에 결합된 탄소원자상의 배위만을 가리킨다. 대체로 이들 D- 또는 L-PTC 유도체는, R^1-보호된 PTC 유도체중의 인 원자상의 추가의 키랄 중심으로 인하여 순수한 에난티오머가 아니라 디아스테레오머 혼합물이다.
놀랍게도, 효소적 절단에 중요한 상술한 α-탄소 원자상의 배위만이 필수적인 것으로 밝혀 졌다. 라디칼 R^1을 가수분해시킨 후에, 인 원자상의 키랄 중심은 OH와 O간의 고속 양성자 교환으로 인하여 실질적으로 상실된다.
D,L-PTC 유도체의 분리 및 L-PTC의 제조를 위한 본 발명에 따른 방법은 기질/생성물 혼합물의 효율적인 분리시 생성되는 소량의 염을 특징으로 한다. 효소 적 분리후에 수득된 L-PTC 유도체가 바람직하지 않은 경우, 경우에 따라 선행의 단리 공정을 거치지 않고 온화한 조건하에서 쉽게 라셈화시키고 따라서 효소적 분리에 다시 사용할 수 있다.
본 발명에 따른 방법은 바람직하게 아미다제를 합성하는 미생물을 사용하여 수행할 수 있다. 이러한 미생물의 예로는 엔테로박터 아에로제네스(DSM 9164), 클렙시엘라 옥시토카(Klebsiella oxytoca, DSM 9162), 클렙시엘라 트레비사니(Klebsiella trevisanii, DSM 9163), 코리네박테리움 아쿠아티컴(Corynebacterium aquaticum, DSM 9171), 로도코커스 루브로페르팅크투스(Rhodococcus rubropertincuus, ATCC 21930), 로도코커스 로도크로우스(Rhodococcus rhodochrous, ATCC 33278), 아쓰로박터 스페시즈(Arthrobacter sp., ATCC 31652) 및 코리네박테리움 스페시즈(Corynebacterium sp., ATCC 31662)가 있다.
본 발명에 따라 에스테르-보호된 P-O 산 기능을 제공하는 PTC 유도체를 사용하는 경우, 특별하고 뜻밖의 잇점은 상기 PTC 유도체의 에난티오머선택성 절단에 상업적으로 입수할 수 있는 아미다제를 사용할 수 있다는 것이다. 대체로, 포스핀산 에스테르에 의한 가수분해 활성의 억제 또는 심지어 포스핀산 에스테르의 가수분해 부반응 조차도 상기 공정에서 관찰되지 않으며, 이는 놀라운 것이다. 상기 효소적 아미드 절단에서, 에스테르 형태의 포스핀산의 보호는 전환율에 대해 공정적인 효과를 갖거나, 또는 개별적인 경우에 상기 효소가 처음 장소에서 상기 기질을 수용하게 만든다.
A) 출발 물질
실시예 A1
D,L-2-아미노-4-(1-부톡시-(메틸)포스피닐)부탄아미드(일반식(I);
R_1=n-C_4H_9)
a) D,L-2-아미노-4-(1-부톡시-(메틸)포스피노일)부타노니트릴(미합중국 특허 제 5,051,525 호 또는 EP 0 382 114와 유사하게 제조함)
D,L-2-아세톡시-4-(1-부톡시-(메틸)포스피노일)부티로니트릴 52.25g(0.200mol)을 30℃에서 2시간에 걸쳐 암모니아 용액(25%) 60㎖에 가한다. 반응 혼합물을 디클로로메탄을 사용하여 연속적으로 추출하고, 상기 추출물을 황산나트륨상에서 건조시키고 회전 증발기상에서 증발시킨다. 상기에 의해 황색을 띤 오일 32.1g(이론치의 73.5%)을 수득하며, 이를 정제 없이 다음 합성 단계에 사용한다.
b) D,L-2-아미노-4-(1-부톡시-(메틸)포스피노일)부탄아미드
D,L-2-아미노-4-(1-부톡시-(메틸)포스피노일)부타노니트릴 16.14g(0.075mol)을 실온에서 포름산 100㎖중에서 HCl 기체 60g으로 포화시킨다. 2시간 후에, 상기 반응 혼합물을 농축시키고, 잔사를 물에 용해시키고, 혼합물을 중탄산 나트륨 포화 용액으로 pH 8로 조절한다. 그후, 상기 용액을 디클로로메탄을 사용하여 2회 세척하고 수성 상을 회

전 증발기상에서 증발시키고 메탄올로 반복적으로 비등시킨다. 상기 메탄올 추출물을 농축시킨 후에, 남은 오일을 실리카겔상에서 메탄올/디클로 로메탄(3:7)으로 크로마토그래피시킨다. 상기에 의해 무색 오일 형태의 D,L-2-아미노-4-(1-부톡시-(메틸)포스피노일)부탄아미드 14.7g(이론치의 83.1%)을 수득한다.

^{1}H NMR($CDCl_3$): 0.94(t, J=Hz, 3H); 1.48(d, J=14Hz, 3H), 1.32-1.48(m, 2H), 1.64(m, 2H), 1.8-2.1(n, 4H)에 의해 겹침, 2.5(s, NH_2), 3.52(t, J=..Hz), 3.96(m, 2H); 6.38(s, 1H); 7.42(g, 1H) ^{31}p NMR($D_{2..}$) 62.4(s)ppm.

생물학적 실시예

물질

D,L-2-아미노-4-(메틸)(n-부톡시)포스피노일부탄아미드=PPT-AM

D,L-N-아세틸-4-(메틸)(n-부톡시)포스피노일-2-아미노-부탄아미드=PPT-Ac

실시예 1: 토양중의 PPT-AM 및 PPT-Ac의 분해

다양한 기원의 토양(모래, 제방 자갈, 삼림 부식토, 목초지, 정원 부식토, 옥토) 샘플 10g을 건조시키고, 스크리닝하고, 각각 2개의 시험 물질의 100mM 용액(pH=7.6) 1.2㎖로 처리하였다. 배치물을 실온에서 14일간 어두운 곳에서 배양시켰다.

분해 양상을 분석하기 위해서, 0.5g 샘플을 1, 2, 4, 6, 8, 12 및 14일 후에 취하고 60°C에서 30분간 0.5㎖의 물을 사용한 추출을 2회 반복하였다. 합한 상등액들을 닌하이드린 포스트-컬럼 유도체화로 아미노산 분석기(Biotronic LC5001, PPT-AM의 경우)에서 검사하거나, 또는 HPLC(컬럼: Aminex HPX-87H/용출제: 0.01 H_2SO_4, 10% 아세토니트릴, 또는 0.1% 트리플루오로아세테이트, 10% 아세토니트릴/용출: 평 등 검출: 각각 195nm 및 210nm, PPT-Ac의 경우)를 사용하여 검사하였다.

멸균 토양에 대한 대조 실험을 수행하였다(200°C에서 4시간 동안 배양). 상기 두 시험 물질이 대략 1 내지 2일의 반감기로 미생물 활성 토양에서 분해되는 것으로 나타났다. 각각의 경우에, 출발 물질에 대해 대략 동일한 몰비로 하나의 대사산물이 축적된다. 그러나, 2주의 실험 기간내에 시험 화합물들의 추가의 분해는 발견되지 않았다. 상기 두 아미드의 반응은 멸균 토양에서는 측정되지 않았다.

실시예 2: 유일한 질소원으로서 PPT-AM 또는 PPT-Ac를 갖는 토양

미생물의 농축 배양물

실시예 1에 개시된 토양 배치물 1g을 실온에서 10mM NaCl, 10mM 인산 나트륨 완충액(pH=7.0)으로 추출하고, 상등액들을 하기 배지의 접종을 위해 사용하였다:

글루코스	0.2%
숙시네이트	5mM
글리세롤	10mM
NH_4Cl	1g/ℓ
K_2HPO_4(pH=7.2)	2.5g/ℓ
$MgSO_4$	0.06g/ℓ
NaCl	0.01g/ℓ
미량 원소 용액	1㎖/ℓ
PPT-AM 또는 PPT-Ac	10mM

미량 원소 용액:

$FeSO_4 \times 7H_2O$	1g/ℓ
$MnSO_4 \times H_2O$	0.22g/ℓ
H_3BO_3	0.1g/ℓ
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0.1g/ℓ
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0.18g/ℓ
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0.16g/ℓ
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0.1g/ℓ
1N HCl	1㎖/ℓ

이들 배양물의 배치를 2㎖을 28°C 및 200rpm에서 2 내지 3일간 배양시키고, 생육시킨 후에, 질소원 NH_4Cl을 단계적으로 감소시키면서(1g/ℓ --> 0.5 --> 0.1 --> 0g/ℓ) 계대 배양시켰다. 상기에 의해 유일한 질소원으로서 PPT-AM 및 PPT-Ac 각각을 사용하여 생육시킬 수 있는 여러 농축 배양물을 수득하였다.

순수한 배양물을 수득하기 위해서, 단일 콜로니를 적합한 한천 배지상에 도말한 후에 상기 농축 배양물로부터 단리시키고, 이들 단일 콜로니를 액체 배지에서 증식시키고 다시 한천 플레이트상에 스트리킹시켜 순도를 평가하였다. 상기 수득된 순수한 배양물을 하기와 같이 동정하였다;

- 유일한 질소원으로서 PPT-AM 및 PPT-Ac의 이용:

엔테로박터 아에로제네스(DSM 기탁번호: DSM 9164)
- 유일한 질소원으로서 PPT-Ac의 이용:
클렙시엘라 옥시토카(DSM 기탁번호: DSM 9162)
클렙시엘라 트레비사니(DSM 기탁번호: DSM 9163)
코리네박테리움 아쿠아티컴(DSM 기탁번호: DSM 9171)
실시예 3: 유일한 질소원으로서 PPT-AM 또는 PPT-Ac를 이용하는 다른 미생물의 스크리닝
실시예 2에 개시된 공정을 사용하여, 균주 수집물로부터 유일한 질소원으로서 상기 2개 아미드를 이용하는 일련의 미생물을 스크리닝하였다. 기질로서 단독적으로 PPT-AM을 사용할 수 있는 하기와 같은 균주들을 발견하였다:
로도코커스 루브로페르팅크투스, ATCC 21930
로도코커스 로도크로우스, ATCC 33278
아쓰로박터 스페시즈, ATCC 31652
코리네박테리움 스페시즈, ATCC 31662
실시예 4: 분해 반응의 특성화:
실시예 2 및 3에 개시된 균주의 배양물 10㎖을 유일한 질소원으로서 관련된 아미드 기질과 함께 28℃ 및 200rpm에서 2 내지 3일간 실시예 2의 최소 배지에서 생육시켰다. 세포들이 대수 증식기의 후기상(late phase)에 도달했을때, 이들을 원심분리시키고 배양물 상등액을 실시예 1에 개략된 바와 같이 아미노산 분석기(PPT-AM 배양물의 경우)에 의해 또는 HPLC(PPT-Ac 배양물의 경우)에 의해 분석하였다.
상기 두 아미드 기질 모두를 사용하여, 대사산물이 미반응된 출발 화합물과 대략적으로 동일한 몰비로 형성됨이 관찰되었다(제 1 도 및 2 도를 참조하시오).
상기 배지에서 탄소원의 과잉에도 불구하고, 라세믹 아미드 PPT-AM 및 PPT-Ac의 추가 반응은 관찰되지 않았고, 이는 분해 반응이 입체 선택적임을 암시한다. 더우기, 배양물 상등액에서 풍부한 암모니아가 검출되었으며(제 1도 참조), 이때 암모니아는 아미다제 반응의 생성물로서 형성된 것이다.
실시예 5: PPT-Ac 대사산물의 확인, 및 에난티오머 비율의 측정:
실시예 4의 배양물 상등액(PPT-Ac)을 동결건조에 의해 10의 인자까지 농축시켰다. 각각 약 10mg의 대사산물과 미반응된 출발 화합물을 각각 하기와 같이 상기 용액으로부터 단리시켰다:
- PPT-Ac 및 대사산물 M: 예비 HPLC, 실시예 1을 참조하여 처리, 용출: 0.1% 트리플루오로아세테이트, 10% 아세토니트릴, 검출: 210nm.
단리된 물질을 동결건조에 의해 농축시키고, 계속해서 질량분광분석법에 의해 분석하였다. 상기에 의해 대사산물의 분자 구조를 측정하였다. 상기 물질은 하기 화합물로서 동정되었다:
- M = N-아세틸-4-(메틸)(n-부톡시)포스피노일-2-아미노부타노산.
에난티오머성 순도를 검사하기 위해서, 상기 대사산물 및 미반응된 아미드를 HCl로 가수분해시켜 유리 포스피노트리신(PPT)을 수득하였다. 생성된 PPT 샘플의 에난티오머 비율은 키랄 HPLC를 사용하여 유도체화시킨 후에 측정하였다(D. Aswad, Analytical Biochemistry 137, 405-409, 1984).
엔테로박토 아에로제네스(DSM 기탁 번호: DSM 9164)에 대한 결과를 하기에 나타내었다:
- 대사산물: L-PPT 95.7% -미반응된 PPT-AM: L-PPT 3.3%

D-PPT 4.3% D-PPT 96.7%

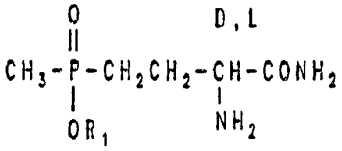
본원에 개시된 다른 균주들에 대한 대조 결과들도 또한 수득하였다.
시험들은 발견된 반응 유형이, L-특이적 아미다제에 의해 촉진된 상응하는 L-카복실산을 제공하기 위해 사용된 라세미 아미드의 입체선택적 가수분해임을 밝혔다.
실시예 6: 생전환에 의한 PPT-Ac의 에난티오머선택성 아미드 절단
클렙시엘라 옥시토카(DSM 기탁 번호: DSM 9162)를 유일한 질소원으로서 10mM PPT-Ac와 함께 28℃ 및 200rpm에서 2일간 삼각 플라스크에서 실시예 2의 배지 100㎖중에서 배양하였다. 세포들을 연속적으로 500rpm에서 10분간 원심분리시키고, 10mM NaCl, 10mM 인산 나트륨 완충액(pH=7.0) 50㎖로 1회 세척하고, 50mg/㎖의 농도로 D,L-PPT-Ac 30mg/㎖을 사용하여 동일한 완충액애 재현탁시켰다.
생전환 배치물(총 부피 12㎖)을 28℃ 및 200rpm에서 15시간동안 삼각 플라스크에서 배양시킨 후, 반응 상등액을 HPLC에 의해 분석하였다(실시예 1 참조).
N -아세틸-4-(메틸)(n-부톡시)포스피노일-2-아미노부타노산 함량은 14.5mg/㎖이었다. 형성된 생성물의 에난티오머 순도는 실시예 5에 제공된 도면에 상응하였다.
제 1 도는 유일한 질소원으로서 10mM PPT-AM을 갖는 최소 배지에서 생육한 엔테로박터 아에로제네스(DSM 기탁번호: DSM 9164) 배양 상등액의 아미노산 프로파일을 도시한다(실시예 2 참조). 상기 샘플을 아미노산 분석기(Biotronic LC5001 모델)에서 닌하이드린 포스트-컬럼 유도체화를 사용하여 분석하였다. 본 도면은 관련 피이크에 대한 보유 시간(분)을 나타낸다.
51.287 분 = 2-아미노-4-(메틸)(n-부톡시)-포스피노일부타노산
91.254 분 = 암모니아
107.691 분 = PPT-AM
다른 피이크들은 측정 장치의 내부 피이크이다.
제 2 도는 유일한 질소원으로서 10mM PPT-Ac를 갖는 최소 배지에서 생육한 엔테로박터 아에로제네스(DSM 기탁번호: DSM 9164) 배양 상등액의 HPLC 프로파일을 도시한다(실시예 2 참조) 상기 샘플을 Aminex HPX-87H 컬럼을 사용하여 0.1% 트리플루오로아세테이트 10% 아세토니트릴로 평등 용출시켜 분석하였다. 검출: 210nm, M2=N-

아세틸-4-(메틸)(n-부톡시)포스피노일-2-아미노부타노산.

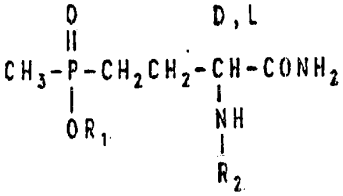
(57) 청구의 범위

청구항 1.

선택적으로 작용하는 L-아미노산 아미드-절단 효소 또는 미생물을 사용하는, 수성 또는 수성-유기 배지중에서 가수분해 활성 효소로 하기 일반식(I) 및 (II)의 D- 및 L-PTC 유도체의 혼합물을 처리함을 포함하는, PTC 유도체의 효소적 분리 방법:



(I)



(II)

상기식에서,

R_1 은 하나 이상의 할로겐 라디칼(예를 들어 불소, 염소, 브롬 또는 요오드)에 의해 치환되거나 비치환된, 또는 (C_1-C_8)-알콕시에 의해 일치환 또는 다치환된, 선형 또는 분지된 (C_1-C_{20})-알킬, (C_1-C_4)-알킬, (C_1-C_4)-알콕시 및 할로겐으로 이루어 진 그룹중에서 선택된 하나 이상의 그룹에 의해 치환되거나 비치환된 (C_3-C_8)-사이클로알킬; (C_3-C_{10})-알케닐; (C_3-C_{10})-알키닐; 또는 벤질이고,

R_2 는 포밀; 하이드록실, 할로겐, (C_1-C_4)-알콕시, (C_1-C_4)-알킬티오, 및 (C_1-C_{12})-알킬, (C_1-C_{12})-알콕시, 할로겐, 니트로 및 CF_3 로 이루어진 그룹중에서 선택된 3개 이하의 라디칼에 의해 치환되거나 비치환된 페닐로 이루어진 그룹중에서 선택된 하나 이상의 라디칼에 의해 알킬 잔기가 치휜되거나 비치환된, 선형 또는 분지된 (C_1-C_{20})-알킬카보닐; 또는 (C_1-C_{12})-알킬, (C_1-C_{12})-알콕시, 할로겐, 니트로 및 CF_3 로 이루어진 그룹중에서 선택된 1개 내지 3개의 라디칼에 의해 치환되거나 비치환된 벤조이이다.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

선택적으로 작용하는 L-아미노산 아미드-절단 효소 또는 상기 효소를 합성하는 미생물을 사용하는 효소적 분리 방법.

청구항 3.

제 1 항에 있어서,

엔테로박터 아에로제네스(Enterobacter aerogenes, DSM 9164), 클렙시엘라 옥시토카(Klebsiella oxytoca DSM 9162), 클렙시엘라 트레비사니(Klebsiella trevisanii, DSM 9163), 코리네박테리움 아쿠아티컴(Corynebacterium aquaticum, DAM 9171), 로도코커스 루브로페르팅크투스(Rhodococcus rubropertinctus, ATCC 21930), 로도코커스 로도크로우스(Rhodococcus rhodochrous, ATCC 33278), 아쓰로박터 스페시즈(Atthrobacter sp., ATCC 31652) 및 코리네박테리움 스페시즈(Corynebacterium sp., ATCC 31662)로 이루어진 그룹중에서 선택된 하나 이상의 미생물을 사용하는
효소적 분리 방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서,

상기 일반식(I) 또는 (II)의 라세믹 아미노산 아미드 유도체 또는 L-형이 풍부한 아미노산 아미드 유도체를 사용하는 효소적 분리 방법.

청구항 5.

제 1 항에 있어서,

상기 반응을 D-아미노산 아미드 라세마제의 존재하에서 수행하는
효소적 분리 방법.

청구항 6.

제 1 항에 있어서,

R_1 이 할로겐(예를 들어 불소, 염소) 또는 (C_1-C_4)-알콕시에 의해 치환되거나 비치환된 선형 또는 분지된 (C_1-C_{10})-알킬, 또는 (C_5-C_6)-사이클로알킬이고,

R_2 가 수소; 포밀; 하이드록실, 할로겐, (C_1-C_4)-알콕시, (C_1-C_4)-알킬티오, 및 (C_1-C_4)-알킬, (C_1-C_4)-알콕시 및 할로겐으로 이루어진 그룹중에서 선택된 1개 내지 3개의 라디칼에 의해 치환되거나 비치환된 페닐로 이루어진 그룹중에서 선택된 1개 또는 2개의 라디칼에 의해 알킬 잔기가 치환되거나 비치환된 선형 또는 분지된 (C_1-C_{10})-알킬카보닐; 또는 (C_1-C_4)-알킬, (C_1-C_4)-알콕시 및 할로겐으로 이루어진 그 룹중에서 선택된 1개 내지 3개의 라디칼에 의해 치환되거나 비치환된 벤조일인
효소적 분리 방법.

청구항 7.

제 1 항에 있어서,
R_1 이 선형 또는 분지된 (C_1-C_{10})-알킬이고,
R_2 가 수소; (C_1-C_4)-알킬, (C_1-C_4)-알콕시 및 할로겐으로 이루어진 그룹중에서 선택된 1개 내지 3개의 치환체에 의해 일치환 내지 삼치환되거나 비치환된 페닐에 의해 치환된 (C_1-C_{10})-알킬카보닐, 바람직하게는 펜아세틸, 또는 벤조일인
효소적 분리 방법.

청구항 8.

제 1 항에 있어서,
(C_1-C_6)-알킬이 메틸, 에틸, 1-프로필 또는 2-프로필, n-부틸, i-부틸, 3급 부틸 또는 2-부틸, 3-메틸-부트-2-일, n-펜틸, i-펜틸, 3급-펜틸, 2-펜틸 또는 3-펜틸, n-헥실 또는 입체이성체성 헥실 라디칼인
효소적 분리 방법.

청구항 9.

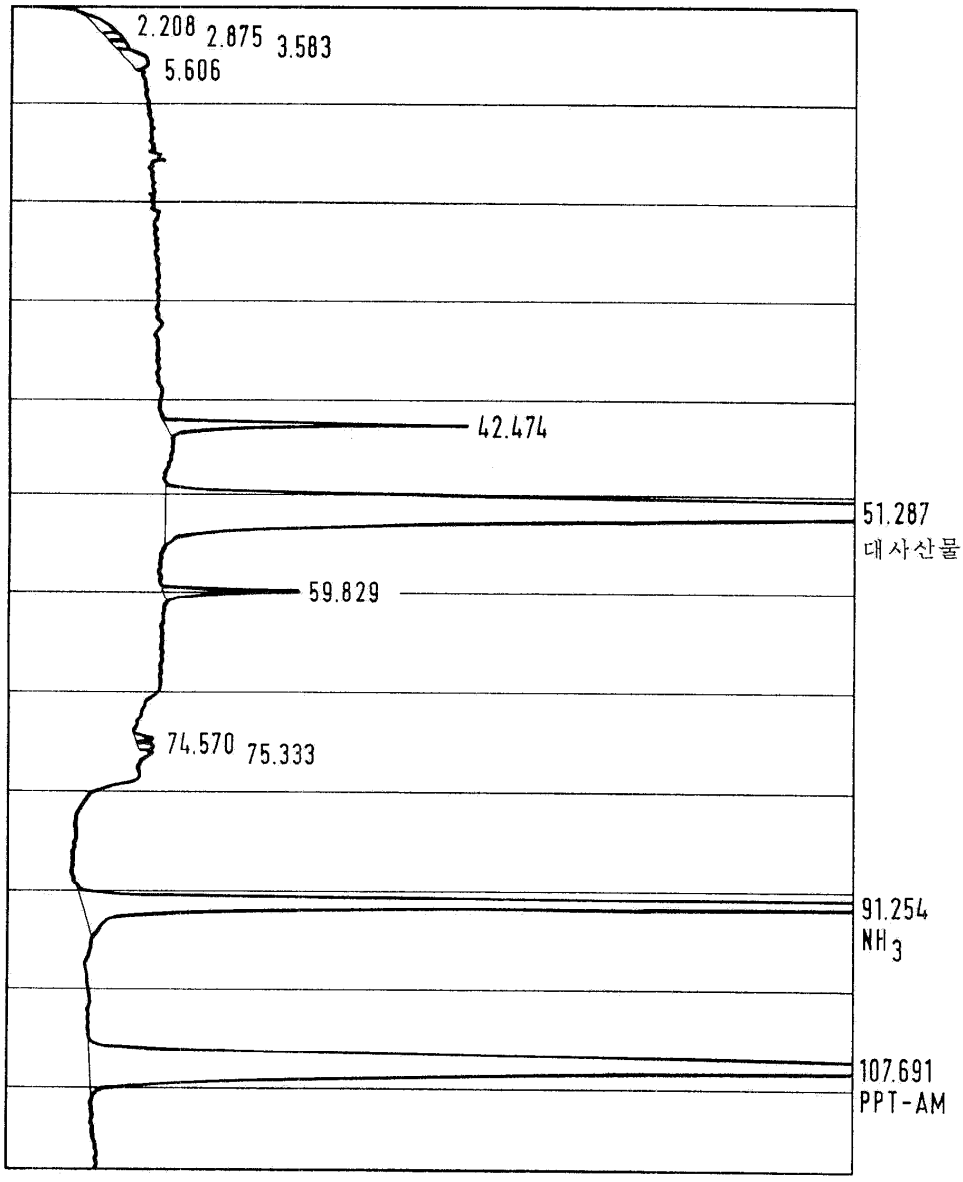
제 1 항에 있어서,
할로겐이 불소, 염소, 브롬 또는 요오드, 바람직하게 불소 또는 염소, 특히 염소 라디칼인
효소적 분리 방법.

청구항 10.

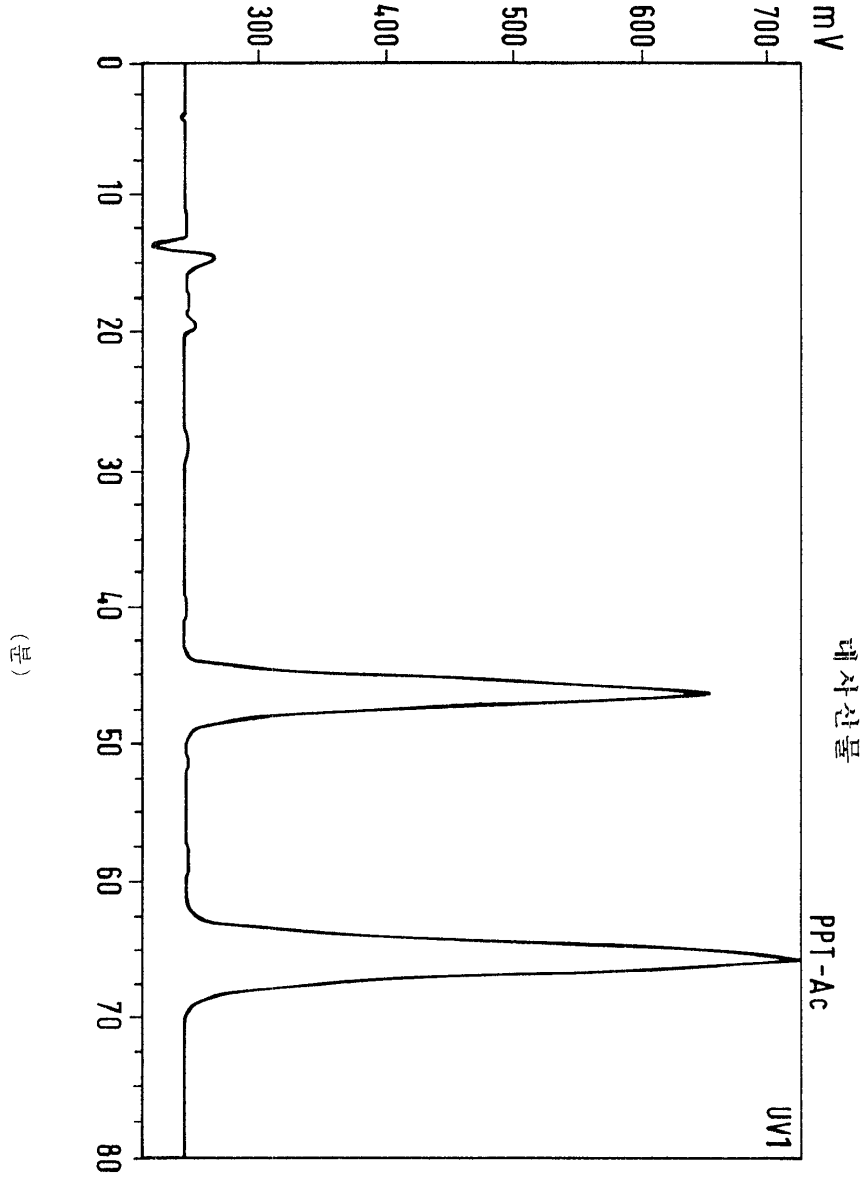
제 1 항에 정의된 일반식(I)의 화합물.

도면

도면1



도면2



(끝)