

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶ (45) 공고일자 2005년06월20일
C12P 7/40 (11) 등록번호 10-0471703
(24) 등록일자 2005년02월03일

(21) 출원번호 10-1996-0020328 (65) 공개번호 10-1997-0001546
(22) 출원일자 1996년06월07일 (43) 공개일자 1997년01월24일

(30) 우선권주장 95-1664 1995년06월07일 스위스(CH)
95-1733 1995년06월13일 스위스(CH)

(73) 특허권자 론자 아게
스위스 체하-3945 감펠/발리스

(72) 발명자 안드레아스 키이너
스위스연방 칸톤 발리스 체하-3930 비스프 마이젠베크 5

장-폴 로뒤
스위스연방 칸톤 발리스 체하-3979 그뢰네 루우스

라이너 클뤼클러
스위스연방 칸톤 발리스 체하-3932 비스퍼 테르미넨오브리 비피 가

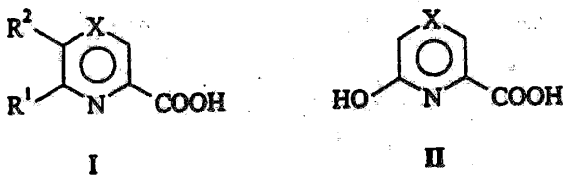
(74) 대리인 윤여범
특허법인코리아나

심사관 : 원종혁

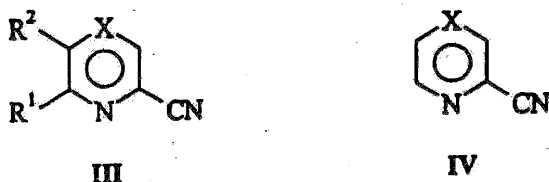
(54) 알칼리게네스속미생물을사용하여헤테로방향족카르복실산을제조하는미생물학적방법

요약

본 발명은 일반식



(여기서 R₁, R₂ 는 동일한 것이거나 혹은 다르며 수소 또는 할로겐원자를 표시하고 X 는 질소 원자 또는 -CH- 를 표시 함)의 헤테로방향족 카르복실산 또는 그것의 생리적으로 허용되는 염을 미생물학적으로 제조하는 방법에 관한 것으로서, 이카르복실산, 삼카르복실산 혹은 탄수화물의 존재하의 생물체에 의한 화학 변화 전에, 배양된 알칼리게네스 속의 2-시아노피리딘을 이용하는 미생물을 사용하여 일반식



(여기서 R₁, R₂ 및 X는 상기한 바의 의미를 가짐)의 헤테로방향족니트릴을 기질로서 그에 상응하는 카르복실산으로 전환시키고, 적합한 경우에는 후자의 물질을 생리적으로 허용되는 염으로 전환시키는 것을특징으로 하고 있다.

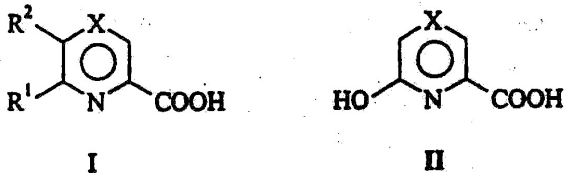
명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 일반식



(여기서 R₁, R₂는 동일한 것이거나 혹은 다르며 수소 또는 할로젠원자를 표시하고 X는 질소 원자 또는 -CH-를 표시함)의 헤테로방향족 카르복실산 또는 그것의 생리적으로 허용되는 염을 미생물학적으로 제조하는 방법에 관한 것이다.

헤테로방향족 카르복실산들, 예를 들면, 6-히드록시피콜린산 등은 약제의 제조, 예를 들면, 2-옥시피리미딘의 제조 [독일화학회 회보 (Berichteder Deutschen Chemischen Gesellschaft) 1912, 45, 제 2456-2467 페이지] 혹은 제초제 (除草劑)의 제조 (유럽특허 공개 공보 제 0 447 004 호) 등의 중요한 중간 산물들이다.

니트릴 히드라테이즈 (hydratase) 와 아미데이즈 (amidase) 들 또는 니트릴레이즈 (nitrilase) 들을 함유하는 미생물들이 니트릴을 그에 상응하는 산으로 전환시킨다는 사실은 일반적으로 알려져 있다. 예를들면, 유럽특허 공개 공보 제 0 187 680 호는 코리네박테리움(Corynebacterium), 노카르디아(Nocardia), 바실루스(Bacillus), 박테리디움(Bacteridium), 미크로코쿠스(Micrococcus) 및 브레비박테리움(Brevibacterium) 속의 미생물을 사용하여 예를들면, 니코틴산 등의 유기산들을 미생물학적으로 제조하는 방법을 기술한 것이다. 이 반응은빛 에너지의 존재하에서 수행하는 것이 요구된다. 유럽특허 공개 공보 제 0 444 640 호는 로도코쿠스(Rhodococcus) 속의 미생물을 사용하여 예를들면, 니코틴산 등의 유기산들을 미생물학적으로 제조하는 방법을 명시한 것이다. 이 반응은 락탐의 존재하에서 수행하는 것이 요구된다.

더욱이 로도코쿠스 로도크로우스(Rhodococcus rhodochrous) II 종의 미생물이 예를 들면, 2-시아노피라진을 피라진카르복실산으로 전환시킨다는 사실도 알려져 있다 [고바야시 (kobayashi) 등, 항생물질학 저널 (J. ofAntibiotics), 43 권, 제 10 호, 1990년, 제 1316 - 1320 페이지]. 그러나, 이들 미생물들은 2-시아노피리딘을 피콜린산으로 전환시킬 수 있는 능력이 없다 [매슈 (Mathew) 등, 응용 환경미생물학 (Appl. Environmental Microbiology), 제 54 권, 제 4 호, 1988년, 제 1030-1032 페이지].

또한 알칼리게네스(Alcaligenes) 속의 2-시아노피리딘을 이용하는 미생물들이 2-시아노피리딘을 6-히드록시피콜린산으로 전환시킨다는 사실도 알려져 있다 (유럽특허 공개 공보 제 0 504 818 호). 이 방법의 단점은 6-히드록시피콜린산이 일정한 한도의 낮은 수율로 형성된다는 것이다.

본 발명의 목적은 바로 알칼리게네스 속의 미생물을 사용하여 피 라진카르복실산, 피콜린산 또는 피콜린산 크로뎀 등의 헤테로방향족 카르복실산 또는 그것의 생리적으로 허용되는 염이 좋은 수율로 형성되는, 보다 경제적인 미생물학적 제조 방법을 제공하는 것이었다.

이 목적은 특허청구범위 제 1 항에 따른 방법으로 달성되었다.

본 발명은, 생물체에 의한 화학 변화 (biotransformation) 전에 이카르복실산, 삼카르복실산 혹은 탄수화물의 존재하에서 배양된 알칼리게네스속의 2-시아노피리딘을 이용하는 미생물을 사용하여, 일반 식



(여기서 X, R¹ 및 R²는 상기한 바의 의미를 가짐)의 헤테로방향족니트릴을 기질로서 식 I 또는 식 II에 따른 헤테로방향족 카르복실산으로 전환시키는 방법으로 본 발명에 따라 수행된다. 헤테로방향족 카르복실산은 그 후 적합한 경우에는 생리적으로 허용되는 염으로 전환된다. 이들 카르복실산들의 생리적으로 허용되는 염은 이후 예를 들면, 크로뎀염, 칼슘염 또는 암모늄염 등을 의미한다.

생물체에 의한 실제의 화학 변화 전에, 2-시아노피리딘을 사용하여, 본 발명에 사용되는 알칼리계네스 속의 미생물들을 정상적으로 배양시키며, 그것들의 유효 효소들을 편의상 유도시킨다. 2-시아노피리딘은 0.01 중량% 내지 20 중량%의 농도, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 1 중량%의 농도로 배양 및 유도에 사용될 수가 있다.

이카르복실산은 이후 푸마르산, 숙신산, 말레산, 글루타르산, 말론산 또는 그것의 염들 및 유도체들 이를 테면 에스테르 등을 의미한다.

삼카르복실산은 이후 시트르산, 이소시트르산 또는 그것들의 염들 및 에스테르 등의 유도체들을 의미한다. 사용될 수가 있는 상기 이카르복실산 및 삼카르복실산의 염과 유도체들은 푸마르산염, 말레산염, 말론산염, 옥살아세트산염, 시트르산염, 아코니트산염, 이소시트르산염, 2-옥소글루타르산염, 숙신산염 또는 숙시닐-CoA 등이 있다. 푸마르산염, 말론산염 또는 숙신산염을 사용하는 것이 좋다.

탄수화물들은 이후 글루코오스 등의 모노사카리드들, 수크로오스, 트레할로오스 또는 말토오스 등의 디사카리드들, 라피노오스 등의 트리사카리드들, 글리세롤 등의 당 알코올 등을 의미한다. 탄수화물로서는 글리세롤을 사용하는 것이 좋다.

이카르복실산, 삼카르복실산 또는 탄수화물은 편의상 0.1 중량% 내지 20중량%의 농도, 바람직하게는 0.5 중량% 내지 5 중량%의 농도로 사용된다.

배양 배지로서는 본 발명분야에 익숙한 사람들 사이에서는 통상적인 배지, 예를 들면, 쿨라 (kulla) 등의 미네랄염 배지 [미생물학 보고서 (Arch.Microbiol.) 제 135 권, 제 1-7 페이지, 1983년], 낮은 몰랄농도 (molarity) 인 산염 완충액 또는 표 1에 나타난 바의 배지 등을 사용하는 것이 가능하다. 표 1에 기술된 것을 사용하는 것이 좋다.

배양 단계 후 그리고 기질의 실제 첨가 전에, 미생물들을 종래의 분리 방법으로 거두어 들이거나, 또는 기질을 바로 미생물에 첨가한다.

생물체에 의한 화학 변화에 사용되는 기질들, 즉 식 III 및 식 IV의 헤테로방향족 니트릴들, 예를 들면, 2-시아노피리딘 등은 구입가능한 화합물들이다.

일반식 1 내지 IV에서의 X는 질소 원자 또는 -CH-, 바람직하게는 -CH-를 표시한다. 라디칼들 R¹과 R²는 동일한 것이거나 혹은 다르며 수소 또는 할로젠 이를 테면 불소, 염소, 브롬 또는 요오드 등을 표시한다. 가능한 기질들은, 따라서 2-시아노피리딘, 6-클로로-2-시아노피리딘, 5, 6-디클로로-2-시아노피리딘, 2-시아노피라진, 6-클로로-2-시아노피라진, 5-브로모-6-클로로-2-시아노피라진 등이 있다.

2-시아노피리딘, 2-시아노피라진 또는 6-클로로-2-시아노피리딘이 편의상 기질로서 사용된다.

생물체에 의한 화학 변화에 기질은 한 번에 모두 첨가하거나 혹은 연속적으로 첨가될 수가 있다. 기질은 편의상 배지 중의 기질 농도가 20중량%를 넘지 않도록, 바람직하게는 기질 농도가 10 중량%를 넘지 않도록 첨가한다.

생물체에 의한 화학 변화는, 정상적으로 정지기 (靜置期)의 세포들을 사용하여 수행되는 것으로, 유럽특허 공개 공보 제 0 504 818 호에 명시된 그리고 DSM 6335로 지정된 알칼리계네스 웨칼리스(Alcaligenes faecalis) 종의 2-시아노피리딘을 이용하는 미생물들 그리고 그것들과 기능상 동등한 변형체 및 돌연변이체들을 사용하여 수행되는 것이 편리하다. 이들 미생물들은 부다페스트 조약에 따라 1991년 1월 3일에 the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig에 기탁되었다.

"기능상 동등한 변형체 및 돌연변이체들"은 원래의 미생물과 본질상 똑같은 성질 및 기능을 가진 미생물들을 의미한다. 이러한 종류의 변형체 및 돌연변이체들은 우발적으로, 예를 들면 UV조사(照射)에 의해 형성될 수가 있다.

미생물의 배양에 사용된 배지와 똑같은 배지를 생물체에 의한 화학 변화에 사용할 수가 있다. 생물체에 의한 화학 변화는 또한 상기 한 이카르복실산, 삼카르복실산 또는 탄수화물의 존재 유무에 관계없이 일어날 수가 있다.

pH는 4 내지 10의 범위, 바람직하게는 5 내지 9의 범위에 있는 것이 편리하다. 생물체에 의한 화학 변화는 10°C 내지 50°C의 온도, 바람직하게는 20°C 내지 40°C의 온도에서 수행될 수가 있다.

6 시간 내지 100 시간의 통상의 전환 시간 후, 식 I 또는 식 II에 따른 적당한 카르복실산들을 보통의 다음 단계의 방법들 예를 들면, 산 성화 등에 의한 방법으로 얻을 수가 있다. 카르복실산들은 또한 염 예를 들면, 암모늄염 또는 크로뎀염 등의 형태로 분리될 수가 있다.

제조된 헤테로방향족 카르복실산이 6번 위치에서 히드록실화된 헤테로방향족 카르복실산 (일반식 II)인 경우, 생물체에 의한 화학 변화는 호기적 조건하에서 수행되는 것이 편리하다. 그러나, 비(非)히드록실화 헤테로방향족 카르복실산 예를 들면, 피콜린산 등이 제조되는 경우에는, 생물체에 의한 화학 변화는 혐기적 조건하에서 수행되는 것이 편리하다.

[실시예]

실시예 1

6-히드록시피콜린산의 제조

알칼리계네스 웨칼리스 중 DSM 6335를 사용하여 6-히드록시피콜린산을 제조하기 위해 선택된 조건들은 다음과 같았다. 유효 체적이 5ℓ인 7.5ℓ 짜리 발효조가 사용되었다. 30℃, 600 rpm 그리고 pH 7.0에서 탄소 및 에너지의 유일한 원천으로 푸마르산 나트륨과 유도물질로서 2-시아노피리딘이 함유된 미네랄염 배지 (표 1)에서 알칼리계네스 웨칼리스 DSM 6335를 배양하였다. 이 배양 동안 통기 (通氣) 속도는 1분당 3ℓ 정도였다. 푸마르산 나트륨의 첨가는 pO₂가 30 % 를 초과 하였을 때 pO₂ 통제하에 행해졌다. 0.5 % 2-시아노피리딘이 첨가된 20 % 농도의 푸마르산 나트륨 원액을 사용하였다. 23 시간에 걸쳐서 650 nm 에서 측정 한, 광학밀도(OD₆₅₀)가 16 이 될 때까지 세포들을 배양한 후에는 생물체에 의한 화학 변화가 시작되었다. 성장 단계 동안, 푸마르산 나트륨 160 g 정도가 20 % 농도액 (약 800 ml) 의 형태로 사용되었다. 2-시아노피리딘의 6-히드록시피콜린산으로의 호기적 생물체에 의한 화학 변화 동안에는 탄소 및 에너지를 전혀 첨가하지 않았다. 생물체에 의한 화학 변화는 정지기 세포들로 행해졌다.

2-시아노피리딘의 첨가는 제한된 조건의 펌프를 사용하여 행해졌다. 펌프속도는 HPLC 에 의해서 "온라인" 으로 모니터 되었다. 중간물질인 피콜린산 [그것의 형성 속도는 피콜린산의 6-히드록시피콜린산으로의 전환속도 (10 g/ℓ·h 내지 4 g/ℓ·h) 보다 2.5 배 정도 더 큼] 의 농도는 1ℓ 당 2g 미만의 값으로 제한하였는데, 이는 그렇지 않을 경우 피콜린산의 6-히드록시피콜린산으로의 전환이 억제되기 때문이었다.

2-시아노피리딘은 실온에서는 고체이므로, 2-시아노피리딘을 함유하는 저장 용기를 50℃ 까지 가열하는 일이 필요하였으며, 이로써 액체형태의 2-시아노피리딘을 첨가하는 것이 가능하였다. 이러한 방법으로 31시간 이내에 1ℓ 당 75g 의 6-히드록시피콜린산을 제조할 수가 있었다. 중간물질인 피콜린산은 생물체에 의한 화학 변화가 끝났을 때 더이상 탐지되지 않았다.

6-히드록시피콜린산을 분리하기 위하여, 세포들을 여과에 의한 방법으로 제거시켰다. 그리고 나서 그 무세포액 (cell-free solution) 을 60℃까지 가열하고, 농축 황산으로 pH 2-2.5 까지 산성화시켰다. 이 pH에서, 6-히드록시피콜린산이 용액으로부터 침전되었다.

그 다음에는, 휘저어 주면서, 4℃ 까지 서서히 냉각시키고 여과하였으며, 잔류물을 탈염수로 씻어 내고 말려 주었다 (100 mbar, 55℃). 1ℓ당 2g 정도의 6-히드록시피콜린산이 이 모액에 남아 있었다. 수율은 사용된 2-시아노피리딘을 기초로 하여 87% 였다.

표 1:

조성물:	농도(g/ℓ):
푸마르산 이나트륨	10
효모 추출액	1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.8
Na ₂ SO ₄	0.25
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
NH ₄ Cl	2.33
NaCl	0.2

CaCl ₂ *2H ₂ O	0.16
MnSO ₄	1.8*10 ⁻²
H ₃ BO ₃	3*10 ⁻²
NiCl ₂	2*10 ⁻³
NaMoO ₄	3*10 ⁻³
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.3
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	0.75
2-시아노피리딘	1
KH ₂ PO ₄	0.4
Na ₂ HPO ₄	0.96

실시예 2

피콜린산의 제조

실시예 1 에 기술된 바의 생물량 (biomass)을 배양하였다. 피콜린산의 형성은 엄격하게 혐기적인 조건하에서 행해졌다. OD₆₅₀ = 20 의 생물량 400 ml 를 채운, 고무 격막(漏續)이 달린 500 ml 짜리 유리병이 생물체에 의한 화학 변화에 사용되었다. 보온 반응은 30℃에서 행해졌다. 생물체에 의한 화학 변화가 시작되기 전에, 순수 질소를 사용하여 혼합물을 혐기성으로 만들어 주었다. 이 목적을 위해, 질소 (50 mbar게이지 압력) 를 약 30 분 동안 교반하의 혼합물에 바늘을 통해 넣어서 산소를 양적으로 방출시켰다. 생물체에 의한 화학 변화 중에 또는 2-시아노피리딘의 첨가시에 산소가 들어오지 못하게 하기 위해, 생물체에 의한 화학 변화 동안 가스 도입을 지속시켰다 (약 10 mbar 게이지 압력). 2-시아노피리딘은 12 단계들에서 매 단계 1ℓ 당 10 g 씩, 각각 1 시간이 지날 때마다 첨가되었다. 그러나, 첨가는 연속적으로도 행해질 수가 있다. 2-시아노피리딘이 다음의 2-시아노피리딘 첨가 전에 피콜린산으로 완전히 전환되었는지를 확인하기 위한 목적에서 HPLC 가 사용되었다. 생물체에 의한 화학 변화 동안 피콜린아미드의 형성은 전혀 탐지되지 않았다. 이러한 방법으로 26 시간 이내에 1ℓ 당 150 g 정도의 피콜린산을 제조하는 것이 가능하였다. 이 과정 중에 6-히드록시피콜린산은 형성되지 않았다.

분리를 위해, 피콜린산의 무세포액을 CaCl₂/H₂SO₄ 로 침전시켰다. 이 목적을 위해, 실시예 2 의 피콜린산 무세포액을 3 배 희석시켰으며, 휘저어 주면서, 그 무세포 발효액을 90℃ 까지 가열시킨 후 피콜린산 1 당량당 CaCl₂ 0.5 당량을 첨가하였다. 그 결과로 생기는 칼슘/피콜린산 복합물이 즉시 침전되었다. 그 결과의 복합물을 4℃ 까지 냉각시키면서 휘저어 주었고, 유리 프릿 (다공률 3) 상에서 걸러 내었으며 탈염수로 씻어 주었다. 그 필터 덩어리 (filter cake)를 탈염수에 현탁시켰고, 농축황산으로 pH 2.5까지 산성화시켰다. 이 과정 중에 피콜린산이 복합물로부터 용해되었으며, 동시에, 불용성의 황산 칼슘이 형성되었다. 자유 피콜린산은 물에 매우 잘 녹으므로 황산 칼슘을 여과에 의한 방법으로 제거하는 것이 가능하였다. 그 피콜린산 용액을 증발 건조시켜 분석하였다. 대략적인 수율은 적정 (滴定) 에 의해 86 % 의 순도를 갖는 70 % 정도였다. 수분 함량은 카를-휘셔법 (Karl-Fischer method)으로 측정하여 0.7 % 이었다.

실시예 3

피콜린산 크로뮴 (III) 의 제조

500 ml 짜리 플라스크 내의 pH 7.1, 73 ℃ 의 피콜린산 암모늄 용액(271.4 g; 0.325 mol; 16.8 %) 에 삼염화 크로뮴 육수화물 수용액 (63 ml 의 물에 23.95 g, 0.09 mol의 Cr)을 3.5 시간에 걸쳐서 한 방울씩 첨가하였다.

그 결과로 생기는 보라색 용액을 1시간 더 휘저어 준 다음 3℃ 까지 서서히 냉각시켰다. 형성되었던 적색 고형물이 가라앉은 후에, 청색의 상층상을 살살 따라 내었다. 고형물은 100 ml 의 물에 30 분 동안 현탁시켰고, 살살 따라내기를 반복하였다. 50 ml의 물에서의 두번째 현탁 (30 분) 후, 고형물을 흡입 여과시켰으며 50 ℃에서 진공 건조시켰다. 33.64 g 의 암적색의 결정들이 얻어졌다(90 % 수율).

실시예 4

각종 탄소원에 의한 알칼리게네스 웨칼리스 DSM 6335 의 배양

알칼리게네스 웨칼리스 (DSM 6335) 의 배양을 위해 100 ml 의 A + N 배지 (푸마르산 이나트륨이 빠진 표 1) 를 함유하는 3 ml 짜리 원뿔형 플라스크가 사용되었으며 그 위에, 1ℓ 당 2 g 의 2-시아노피리딘과 1ℓ 당 10 g 의 다음의 탄소원들이 배지에 첨가되었다 :

푸마르산 이나트륨

글리세롤

말론산 이나트륨

숙신산 이나트륨

보온 반응은 진탕기에서 30°C에서 행해졌다. 16 시간의 성장 후, 세포들을 1ℓ 당 10 g 의 2-시아노피리딘을 함유하는 신선한 A + N 배지 (탄소원 없이) 에 스펀 다운시켜 재현탁시켰다. 650 nm 에서 측정된, 세포 현탁액의 광학 밀도 (OD₆₅₀) 는 10 이었다. 그 다음에 그 세포 현탁액 (총 부피 10 - 20 ml) 을 다시 30 °C에서 보온반응시켰다. 6-히드록시피콜린산이 형성된 다음에는 308 nm 에서의 무세포액의 흡광도를 측정하는 분광 광도측정을 하였다. 6-히드록시피콜린산의 형성에 대해 다음의 평균 생산성이 측정되었다:

탄소 생산성(gℓ⁻¹h⁻¹)

푸마르산 이나트륨 2.4

글리세롤 2.0

말론산 이나트륨 4.2

숙신산 이나트륨 0.14

실시예 5

6-히드록시피라진카르복실산의 제조

푸마르산을 탄소원으로 하여 알칼리게네스 웨칼리스 (DSM 6335) 를 실시예 4 에서와 마찬가지로 배양하였다. 씻어준 세포들을 1ℓ 당 10g 의 2-시아노피라진을 함유하는 A+N 배지에 재현탁시켰으며 (OD₆₅₀ = 10) 30 °C 에서 보온반응시켰다. 6-히드록시피라진카르복실산이 형성된 다음에는 320 nm 에서 무세포액의 흡광도를 측정하는, 분광 광도측정을 하였다. 270 nm 에서의 흡광도를 측정함으로써 2-시아노피라진 (기질) 의 농도의 감소를 측정하는 것이 가능하였다. 사용된 양의 2-시아노피라진은 7시간 후에 6-히드록시피라진카르복실산으로 전환되었다.

실시예 6

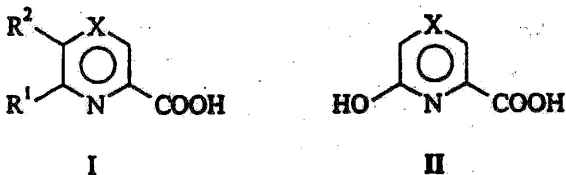
6-클로로피콜린산과 피라진카르복실산의 제조

푸마르산을 탄소원으로 하여 알칼리게네스 웨칼리스 (DSM 6335) 를 실시예 4 에서와 마찬가지로 배양하였다. 씻어준 세포들을 유리 용기(고무 마개로 폐쇄시킬 수 있음) 중의 A+N 배지에 재현탁시켰고 (OD₆₅₀ =10), 용해된 산소를 제거하기 위하여 바늘을 통해 질소를 도입하였다. 그리고 나서 2-시아노피라진 또는 6-클로로-2-시아노피리딘을 기질로서 세포 현탁액에, 최종 농도가 1ℓ 당 10 g 이 될 때까지 첨가하였으며, 30°C 에서 보온반응시켰다. 3시간 후, 출발 물질들은 양적으로 그에 상당하는 산으로 전환되었다 [박층 크로마토그래피에 의한 탐지; 형광 표지물질이 있는 실리카 젤 60, 이동상: 클로로포름 30/에탄올 55/NH₄OH (25%)10/H₂O 5].

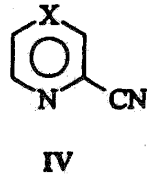
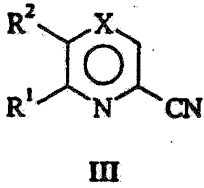
(57) 청구의 범위

청구항 1.

일반 식



(여기서 R₁, R₂ 는 동일한 것이거나 혹은 다르며 수소 또는 할로젠원자를 표시하고 X 는 질소 원자 또는 -CH- 를 표시함) 의 헤테로방향족 카르복실산 또는 그것의 생리적으로 허용되는 염을 미생물학적으로 제조하는 방법으로서, 생물체에 의한 화학 변화 전에 이카르복실산, 삼카르복실산 혹은 탄수화물의 존재하에서 배양된 알칼리게네스(Alcaligenes) 속의 2-시아노피리딘을 이용하는 미생물을 사용하여, 일반 식



(여기서 R₁, R₂ 및 X 는 상기한 바의 의미를 가짐)의 헤테로방향족니트릴을 기질로서 그에 상응하는 카르복실산으로 전환시키고, 적합한 경우에는 후자의 물질을 생리적으로 허용되는 염으로 전환시키는 것을 특징으로 하며, 유일한 이카르복실산으로서 폴산(folic acid)의 존재하에서 배양시킨 알칼리게네스 속의 2-시아노피리딘을 이용하는 미생물을 사용하여 2-시아노피리딘을 화학 변화시킴으로써 6-히드록시피콜린산을 제조하는 방법이 제외된 방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 생물체에 의한 화학 변화는 기탁명 DSM 6335 의 알칼리게네스 웨칼리스(*Alcaligenes faecalis*) 종의 미생물, 그와 기능상 동등한 변형체 그리고 돌연변이체에 의해서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 생물체에 의한 화학 변화는 pH 4 내지 10, 온도 10 °C 내지 50 °C 에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 생물체에 의한 화학 변화 전에 혐기적 조건하 및 이카르복실산의 존재하에서 배양된 알칼리게네스 속의 2-시아노피리딘을 이용하는 미생물을 사용하여, 기질인 2-시아노피리딘을 피콜린산으로 전환시키고, 적합한 경우에는 후자의 물질을 생리적으로 허용되는 염으로 전환시키는 것을 특징으로 하는 방법.