

(19) DANMARK

(11)

DK 175472 B1



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.: C 12 P 13/06 C 07 F 9/50 C 12 N 1/20 C 12 N 15/52 C 12 N 15/54
C 12 P 13/04

(21) Patentansøgning nr: PA 2004 00936

(22) Indleveringsdag: 2004-06-16

(24) Løbedag: 1987-06-03

(41) Alm. tilgængelig: 2004-06-16

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-11-08

(30) Prioritet: 1986-06-04 DE P3618812.3

(73) Patenthaver: Hoechst Aktiengesellschaft, Brüningstrasse 45, 6230 Frankfurt/Main 80, Tyskland

(72) Opfinder: Johan Then, Sulzbacher Weg 2, D-6238 Hofheim am Taunus, Tyskland
Klaus Bartsch, Memelstrasse 2, D-6233 Kelkheim (Taunus), Tyskland
Hans-Matthias Deger, Am Rheingauer Weg 8, D-6238 Hofheim am Taunus, Tyskland
Susanne Grabley, Hoelderlinstrasse 7, D-6240 Koenigstein/Taunus, Tyskland
Ruediger Marquardt, Guentherburgalle 69, D-6000 Frankfurt am Main, Tyskland

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark

(54) Benævnelse: Fremgangsmåde til fremstilling af L-tert.-leucin

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

L-tert.-leucin fremstilles ved, at 3,3-dimethyl-2-oxo-butan-
syre eller et salt af denne forbindelse, hver gang i nær-
værelse af aminosyrer som aminogruppedonatorer, transamine-
res.

Optisk aktive, ikke-proteinogene aminosyrer har stor betydning på grund af deres kendte eller potentielle biologiske aktivitet. Nogle anvendes med held inden for det farmaceutiske område, såsom L-dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) eller α -methyldopa, eller finder anvendelse inden for plan-
5 tebeskyttelsen, såsom phosphinothricin. Andre er forstadier til farmaceutika, såsom D-phenylglycin eller β -p-hydroxyphe-nylglycin ved fremstillingen af halvsyntetiske penicilliner ampicillin og amoxycillin. De kan ligeledes være værdifulde
10 forstadier til syntesen af finkemikalier. Inden for den asymmetriske syntese af aminosyrederivater har især tert.-leucin ligeledes vundet indpas [U. Schöllkopf, Pure and Appl. Chem. 55, 1799-1806, (1983)].

De ikke-proteinogene optisk aktive aminosyrer fremstilles fortrinsvis kun på kemisk måde. I den sammenhæng
15 er det en ulempe, at man ikke kan arbejde stereoselektivt, og at man får racematet som slutprodukt. Enzymatiske fremgangsmåder har derimod særdeles ofte den fordel, at der ud fra forstadier, der er simple at fremstille, ved hjælp af
20 et enzymtrin selektivt kan syntetisere en chiral forbindelse. Dette er især fordelagtigt, når kun én af de to stereoisomere forbindelser er biologisk aktiv.

Syntesen af naturlige, såkaldte proteinogene aminosyrer ved hjælp af biotransformation med transaminaser
25 er i og for sig kendt. I EP-patentansøgning nr. 152.275 er beskrevet en fremgangsmåde til fremstilling af phenylalanin ved transaminering ved hjælp af en genetisk modificeret mikroorganisme, som udmærker sig ved overproduktion af aminotransferasen. Ifølge EP-patentansøgning nr.
30 135.846 sker fremstillingen af naturlige L-aminosyrer på den måde, at α -ketosyrer omsættes med L-asparaginsyre som aminogruppedonator i nærværelse af en transaminase, som er blevet isoleret fra E. coli. Der dannes de til
35 α -ketosyren svarende L-aminosyrer samt oxalacetat fra asparaginsyren.

Udvælgelsen og mutationen af mikroorganismer blandt

E. coli, Paracoccus denitrificans, Torula, Rhodotorula og Streptomyces til fremstilling af L-phenylalanin ud fra phenylpyrodruesyre med forbedret udbytte er beskrevet i DE patentansøgning nr. 3.423.036.

5 Ikke-naturligt forekommende, såkaldte ikke-proteinogene aminosyrer er hidtil ikke fremstillet ved enzymatisk biotransformation.

Det har nu vist sig, at man kan gennemføre syntesen af den ikke-proteinogene aminosyre L-tert.-leucin i særdeles
10 godt udbytte ved hjælp af transaminering. Dette er for så vidt overraskende, eftersom det er kendt, at man med transaminaser kan syntetisere forskellige naturlige proteinogene aminosyrer, men på baggrund af enzymernes specificitet dog ikke kunne forvente, at der ligeledes på denne måde kan
15 fremstilles ikke-proteinogene aminosyrer med ikke-naturligt forekommende α -ketosyrer som forstadier. På baggrund af dette er det overraskende, at de tilsvarende forstadier på trods af deres hydrofobe gruppe, som ikke forekommer i forstadierne til naturlige aminosyrer, tolereres og omsættes af det akti-
20 ve centrum i transaminasen.

Opfindelsen angår følgelig en fremgangsmåde til fremstilling af L-tert.-leucin, og denne fremgangsmåde er
ejendommelig ved, at 3,3-dimethyl-2-oxo-butansyre eller et salt af denne forbindelse, hver gang i nærværelse af amino-
25 syrer som aminogruppedonatorer, transamineres.

Foretrukne udførelsesformer for fremgangsmåden er angivet i krav 2-11.

I det følgende belyses opfindelsen i detaljer.

Enzymer fra talrige organismer, eksempelvis fra
30 mikroorganismer, planter og animalske organer, såsom svinehjerter, er i stand til at omdanne α -ketosyrer til naturlige L-aminosyrer ved transaminering. Disse organismer eller deres enzymer kan anvendes ifølge opfindelsen. Man arbejder dog fortrinsvis med mikroorganismer, som har en transaminase,
35 såsom mikroorganismene fra slægterne Paracoccus, Alkaligenes, Rhizobium, Pseudomonas, Serratia, Agrobacterium, Streptomyces

samt enterobakterier. Især fordelagtige er mikroorganismer, såsom *Alcaligenes faecalis* DSM 4115, *Alcaligenes denitrificans* DSM 4114, *Pseudomonas paucimobilis* DSM 4120, *Pseudomonas spec.* DSM 4119, *Serratia plymuthica* DSM 4116, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* ATCC 11303, *Enterobacter agglomerans* DSM 4122, *Enterobacter spec.* DSM 4121, *Paracoccus denitrificans* DSM 65, *Streptomyces hygrosopicus* og *Streptomyces viridochromogenes* samt 3 jordisolater DSM 4113, DSM 4117 og DSM 4118.

10 Disse mikroorganismer er, for så vidt de ikke er frit tilgængelige eller beskrevet, således at de kan fremstilles. deponeret hos Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM).

Man kan få højere enzymaktiviteter ved, at man vælger stammer, som er resistente mod fosphinothricin eller udnytter fosphinothricin som eneste nitrogenkilde, eksempelvis *Alcaligenes faecalis* DSM 4115, *Agrobacterium tumefaciens* samt jordisolatet DSM 4113. Dette er fordelagtigt, men ikke ubetinget nødvendigt. Ligeledes kan ved selektion og mutation, på i og for sig kendt måde, mod stigende mængder af 3,3-dimethyl-2-oxo-butansyre, phenylpyrodruesyre eller salte deraf i dyrkningssubstraterne til de videre arbejder udvælges mikroorganismer, som på grundlag af deres adaptation til α -ketosyren gennemfører transamineringen i bedre udbytter. 3,3-Dimethyl-2-oxo-

25 -butansyre eller salte deraf er let tilgængelige ved forsæbning af trimethyleddikesyre i nærværelse af thionylchlorid og KCN ifølge klassiske fremgangsmåder. Fremstillingen af (3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinsyre eller salte deraf sker ligeledes ved kendte fremgangsmåder

30 (Hans Beyer, Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag, Stuttgart).

Man får ligeledes gode udbytter ved at anvende genteknisk manipulerede mikroorganismer ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Især foretrækker man at arbejde med

35 *E. coli* ATCC 11303, som er transformeret med et plasmid,

der indeholder et tyrB-gen eller ilvE-gen, idet tyrB-genet hver gang koder for den aromatiske transaminase og ilvE for den aliphatiske transaminase i E. coli. Således manipulerede stammer kan eksempelvis fremstilles ifølge DE patentansøgning nr. P 3.631.829.9 eller P 3.636.722.2.

Transamineringen kan ske samtidig med dyrkningen, idet der i så tilfælde fortrinsvis arbejdes med mikroorganismer, som er resistente mod fosphinothricin, eksempelvis *Alcaligenes faecalis* DSM 4115 og *Agrobacterium tumefaciens*.

10 Mikroorganismene dyrkes dog fordelagtigt i et til deres vækst optimalt næringssubstrat under tilsvarende gunstige temperatur- og beluftningsbetingelser indtil en tørvægt på ca. 4-60 g/liter næringssubstrat. De for den hver gang foreliggende mikroorganisme gunstigste betingelser er enten

15 kendt for fagfolk eller kan konstateres ved simple forsøg. Cellerne anvendes i så tilfælde, i næringssubstratet eller skilt fra næringssubstratet, til aminering af α -ketosyrerne. Transamineringen kan gennemføres med hele eller også med oplukkede celler, idet man anvender de gængse

20 oplukningsmetoder. Det er ligeledes muligt at gennemføre transamineringen med celleekstrakter, isolerede hele proteiner samt rensede transaminaser. Ud fra praktiske overvejelser, eksempelvis på grund af udgifterne, arbejder man dog fortrinsvis med intakte celler. Dog kan isoleringen af

25 transaminaserne på grund af en længere levetid af enzymet samt en bedre styringsmulighed for reaktionen ligeledes være fordelagtig. Det er endvidere muligt at anvende mikroorganismerne eller enzymerne i fikseret form. Til fikseringen kommer de kendte fremgangsmåder i betragtning, fordelagtigt frem-

30 gangsmåderne ifølge DE offentliggørelsesskrift nr. 3.237.341 og 3.243.591

Mikroorganismene eller det isolerede enzymsystem suspenderes i den foretrukne udførelsesform i en fysiologisk puffer således, at deres transaminaseaktivitet

35 ikke påvirkes nævneværdigt negativt, under tilsætning af α -ketosyren og aminogruppedonatoren. Alt efter mængden af

mikroorganismene kan den til udgangsblendingen tilsatte enzymatiske aktivitet i form af mikroorganismer eller det isolerede enzymsystem variere inden for brede områder. Hensigtsmæssigt ligger den mellem 10 og
5 20.000 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{liter}$. Fortrinsvis indeholder udgangsblendingen cellemængder med en enzymaktivitet fra 1500 til 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{liter}$.

Som aminogruppedonator finder aminosyrer anvendelse. Hvilken aminosyre, som anvendes fordelagtigt, er i
10 vid udstrækning afhængig af mikroorganismen eller det isolerede enzymsystem, hvilket dog kan fastslås ved korte forforsøg. Egnede er eksempelvis valin, leucin, isoleucin, methionin, tyrosin og phenylalanin, især asparagin, asparaginsyre, glutamin, glutaminsyre og glycin. Disse aminosyrer
15 anvendes i L-formen, eftersom kun denne udnyttes ifølge opfindelsen, som fri syre eller egnede salte (svarende til det anvendte substrat). Til fremstilling af L-tert.-leucin anvendes 3,3-dimethyl-2-oxo-butansyre.

Man kan ligeledes anvende salte deraf, idet man
20 naturligvis vælger ioner, som ikke påvirker transaminaseaktiviteten nævneværdigt i negativ retning. Fortrinsvis er disse natrium-, kalium- og ammoniumsalte. Aminogruppedonatoren sættes i ækvimolære mængder eller i et overskud til α -ketosyren. Forhold på 1:1-5:1, fortrinsvis 1:1-2:1, har
25 vist sig at være egnede.

Tilsætningen af reaktionskomponenterne til reaktionsblendingen kan ske som opløsning i vand eller ved tilsætning af de faste stoffer samtidigt. Man foretrækker imidlertid en portionsvis eller kontinuert tilsætning
30 i mængder fra 0,1-4,5%, især fra 0,2-2%, hver gang beregnet på reaktionsblendingens vægt, i løbet af et tidsrum på 1-90 timer, fortrinsvis 2-40 timer.

Man arbejder fordelagtigt ved en pH-værdi, der ligger mellem 5 og 9, især mellem 7 og 8,5. Det er desuden
35

hensigtsmæssigt at gennemføre transamineringen i et temperaturområde, der ligger fra 10 til 65°C, især fra 20 til 50°C. Ved lavere temperaturer forløber enzym-reaktionen tiltagende langsommere, medens enzymet ved højere temperaturer fremadskridende deaktiveres.

Den mest gunstige fremgangsmåde afhænger af den hver gang foreliggende mikroorganisme og kan let fastslås ved enkle forforsøg.

Det har især vist sig at være hensigtsmæssigt at permeabilisere mikroorganismene forud for eller under transamineringsreaktionen. Dette kan ske ved at sætte egnede midler, såsom toluen, cetyltrimethylammoniumbromid eller dimethylsulfoxid, til inkubationsmediet.

De følgende eksempler tjener til yderligere at illustrere opfindelsen. Procentangivelser refererer, når intet andet er angivet, til vægten.

Eksempel 1

Dyrkning og oparbejdning af mikroorganismene.

De nævnte deponerede og frit tilgængelige bakterier dyrkes i 400 ml væskeskulturer i LB-substrat [Luria-Bertani-Medium: 10 g Bacto-Trypton/5 g Bacto-Yeast-Extrakt/10 g NaCl pr. liter, (pH 7,5)] eller M9-minimalmedium [6 g Na₂HPO₄/3 g KH₂PO₄/0,5 g NaCl/1 g NH₄Cl/2 ml 1 M MgSO₄ + 10 ml 20% glucose + 0,1 ml 1 M CaCl₂ + 1 ml 1% vitamin B1 (Thiamin) pr. liter (pH 7,4)] ved 30°C (alle bakterier undtagen E. coli) eller 37°C (E. coli, DH1) natten over.

Derpå centrifugeres bakterierne fra, og cellepellets vaskes flere gange i 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaCl (pH = 7,0) (vaskepuffer) og suspenderes til slut i 10 ml vaskepuffer pr. 3 g cellepellet. Cellerne oplukkes ved hjælp af ultralydpåvirkning i 5 x 1 minutter, og celleresten centrifugeres derpå fra. De således udvundne lysat-supernatanter kan opbevares i flere måneder ved -20°C.

Eksempel 2

Proteinisolering

Til proteinisolering fyldes hver gang 5 ml af lysat-supernatanterne med vaskepuffer ad 50 ml, og proteinerne udfældes ved tilsætning af ammoniumsulfat til 65%. Efter fracentrifugeringen i løbet af 15 minutter ved 10.000 g suspenderes proteinpellets atter i hver gang 5 ml 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0) 1 mM EDTA, 2% glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT). Denne suspension kan ligeledes opbevares ved -20°C. For at opnå en bedre rensningsvirkning fældes proteinerne til dels to gange med ammoniumsulfat.

Proteinbestemmelser foretages ifølge biuret-metoden. Proteinindholdet i de ifølge ovennævnte forskrift behandlede præparater ligger for det meste mellem 5 og 10 mg/ml. Til partiel rensning af transaminasen fra *Alcaligenes faecalis* DSM 4115 og fra DSM 4113 fældes proteinerne fraktioneret med fra 25% til 75% ammoniumsulfat, hver gang tilsat i 10%'s trin, og enkeltfraktionerne testes med hensyn til transaminase-aktivitet (se nedenfor). Proteinfraktionen med den største specifikke aktivitet overføres til en Sephadex G 100-gelfiltreringsøjle og elueres med 10 mM Na₂HPO₄ (pH-værdi = 7,0). Eluatfraktionerne med den højeste specifikke transaminase-aktivitet koncentrerer ved hjælp af fornyet ammoniumsulfatfældning og tages for hver 5 mg/ml op i 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0), 1 mM EDTA, 2% glycerol, 1 mM DTT. Molekylvægten af (®) Sephadex G 100) polydextransøjlefraktionerne bestemmes ved sammenligning med molekylvægt-standard-proteiner. Renheden af de isolerede transaminase-fraktioner kan efterprøves ved hjælp af elektroforese af proteinprøver i 10% SDS/polyacrylamid-geler.

Eksempel 3

Udvælgelse af *Escherichia coli* ATCC 11303.

Escherichia coli ATCC 11303 dyrkes ved gængse fremgangsmåder og mutageniseres med N-methyl-N-nitro-N-nitro-guanidin (MNG) ifølge E. Adelberg et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 788 (1965). De med MNG behandlede celler udstryges på en autoklaveret agar med følgende sammensætning:

	Fumarsyre	5	g/l
	Kødekstrakt	20	g/l
10	Asparaginsyre	20	g/l
	KH ₂ PO ₄	2	g/l
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,5	g/l
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,1	g/l
	Agar	20	g/l

15 pH-Værdien indstilles til 7,2 med vandig natriumhydroxid-opløsning.

En sterilfiltreret opløsning af phenylpyruvat hældes i den endnu varme agar, således at der opnås en slutkoncentration på 24 g phenylpyruvat pr. liter. Pladerne inkuberes ved 37°C i 4 dage. Kolonier med en diameter, der er større end 1 mm, isoleres. 20% af de voksende stammer har en forøget transaminaseaktivitet i sammenligning med udgangsstammen.

25 Transaminase-aktivitetsbestemmelsen gennemføres ved hjælp af Sigmatest-kit G 0390.

Eksempel 4

a. Isolering og nedbrydning af cosmidet pIMS 6026 fra *E. coli*.

Cosmidet pIMS 6026 er afledt af cosmidet pLAFRI (ATCC 37167) ved, at der i dets eneste EcoRI snitsted kloner det i handelen gængse EcoRI-fragment, hvorpå kanamycin-resistensgenet af transposonen Tn 903 ligger (Pharmacia, Uppsala, Sverige). Ved nedbrydning ved hjælp af BamHI og efterfølgende religering kan den største del af det i handelen gængse EcoRI-fragment ødelægges, således at der kun bliver 35 er kort stykke DNA tilbage som insertion, hvori et BamHI-

-spaltested frankeres af 2 EcoRI-snitsteder.

Til isolering af cosmidet pIMS 6026 fra E. coli HB101 går man enten frem efter Humphreys et al. [Biochem. Biophys. Acta 383, 457-63 (1975)] eller gennemfører en basisk lyse ifølge Birnboim og Doly [Nucleic Acids Res. 7, 1513 (1979)]. I hvert tilfælde renses plasmid-DNA'en mindst 5 én gang ved hjælp af CsCl/EtBr-massefyldegradientcentrifugering.

Cosmidet pIMS 6026 nedbrydes fuldstændigt med restriktionsenzymet BamHI, idet man går frem ifølge fremstillere-ns, New England Biolabs, anvisninger. Til efterprøvning af fuldstændigheden af denne nedbrydning sættes en portion af restriktionsudgangsblendingen til en 0,8% agarosegel og underkastes elektroforese. Tilsynekomsten af kun et bånd efter 15 farvning med ethidiumbromid og bestråling med kortbølget UV-lys (254 nm) tjener til at påpege en fuldstændig nedbrydning. Fra det nedbrudte cosmid-DNA fjernes restriktionsenzymet ved phenolisering, DNA fældes ved hjælp af ethanol, vaskes med 70%'s ethanol, og efter tørring under vakuum tages 20 den op i et egnet rumfang TE-puffer (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH-værdi = 8,0). Efter frit valg gennemføres endnu en behandling med basisk phosphatase ifølge fremstillere-ns, Boehringer Mannheim, anvisninger. Efter tilsætning af 1 µliter basisk phosphatase (CIP) inkuberer man i 30 minutter ved 37°C, 25 fjerner enzymet fra reaktionsudgangsblendingen ved hjælp af phenolisering og renser DNA som beskrevet ovenfor. Endelig suspenderes den atter i TE-puffer.

b. Partiel nedbrydning af DNA fra E. coli ATCC 11303.

Isoleringen af hele DNA'en fra E. coli ATCC 11303 30 gennemføres ved fremgangsmåden ifølge Marmur i J. Mol. Biol. 53, 155-162 (1961). Den isolerede hele DNA nedbrydes partielt med restriktionsenzymet Sau3A, således at der hovedsageligt dannes fragmenter i et størrelsesområdet fra 20-30 kb. Dertil konstateres det hertil optimale forhold mellem 35 DNA og enzym samt den optimale påvirkningstid af enzymet på DNA ved forforsøg. Den tilsvarende fremgangsmåde er beskrev-

et i det af firmaet BRL udgivne hæfte "focus", bind 7, nr. 2 (1985) på side 3. Efter forløbet af den som optimum bestemte reaktionstid ødelægges enzymet ved opvarmning til 65°C i et tidsrum på 10 minutter, og dannelsen af DNA-fragmenter i det ønskede størrelsesområde efterprøves ved
5 agarose-gelelektroforese med egnede DNA-markører, eksempelvis med EcoRI-nedbrudt DNA fra phagen λ .

C. Ligering af restriktions-udgangsblandingerne.

10 Helt DNA, partielt nedbrudt ved hjælp af Sau3A, fra E. coli ATCC 11303 blandes sammen med pIMS 6026 cosmid-DNA, som er fuldstændigt spaltet med BamHI og behandlet med basisk phosphatase, i et molært forhold på ca. 1:5. Til den fremkomne blanding sættes der en flere gange koncentreret
15 puffer ifølge anvisningerne fra New England Biolabs således, at der fremkommer en for enzymet T4-DNA-ligase optimal ionkoncentration, og der inkuberes med 1 μ liter af enzymet i mindst 14 timer ved 16°C. Det samlede rumfang af blandingen udgør derved 50 μ liter med en total DNA-koncentration
20 på 20 μ g/ml.

d. Indbygning i λ -phager.

Efter den skete ligase-reaktion indbygges DNA, der fås ifølge eksempel 3, in vitro i λ -phagernes hoveder.
25 De dertil nødvendige ekstrakter fra to forskellige bakteriestammer kan udvindes ifølge Hohn, B., i Wu, R., editor: Recombinant DNA, Methods in Enzymology, Vol. 68, Academic Press, New York, s. 299-309 (1979) eller fås fra Boehringer Mannheim eller Amersham Buchler, Braunschweig. 3 μ liter
30 af den ifølge eksempel 3 tilvejebragte blanding blandes grundigt med umiddelbart før optøede bakterie-ekstrakter fra firmaet Amersham under isafkøling. Blandingen inkuberes i 30-60 minutter ved 20°C, og derpå tilsættes der 200 μ liter SM-puffer (100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM
35 Tris-HCl (pH 7,5), 0,01% gelatine). Denne blanding anvendes enten direkte i en transduktions-reaktion eller opbevares efter tilsætning af 10 μ liter chloroform til senere anvendelse

ved 4°C.

e. Transduktion af E. coli DG 30.

5 5 ml L-Broth, bestående af 1% bacto-trypton,
0,5% gærekstrakt og 0,5% NaCl, tilsættes 0,4% maltose
og podes med 50 µliter af en væskekultur af E. coli DG 30
i den stationære vækstfase. Der inkuberes i 12 timer ved
37°C, indtil den tidlige stationære fase er opnået.
Bakterierne centrifugeres fra og suspenderes atter forsigt-
10 tigt i 2,5 ml af en vandig opløsning, som er 10 mmolær
med hensyn til MgCl₂. Til 10 µliter af blandingen ifølge
eksempel 4 sættes der 20 µliter af den koncentrerede bak-
teriesuspension, og der inkuberes i 50 minutter ved stue-
temperatur.

15 Derpå tilsættes der 200 µliter L-Broth, og man
inkuberer i 1 time ved 37°C, idet blandingen lejligheds-
vis rystes.

Hver gang 50 µliter af udgangsblandingen udplette-
res på L-Broth-Agar, som indeholder 20 µg tetracyclin pr.
20 ml. Pladerne inkuberes i mindst 12 timer ved 37°C. Ved
den beskrevne fremgangsmåde kan der fra en blanding i gennem-
snit fås 1000 kolonier.

f. Selektionering af E. coli DG 30 med et aspC- eller
25 ilvE- eller tyrB-gen.

Ca. 800 kolonier, som fås ved transduktion af
E. coli DG 30 ved den beskrevne fremgangsmåde på L-Broth-
-agar, som indeholder 20 µg tetracyclin pr. ml, "udstikkes"
på minimalagar. Minimalagaren består af M9-substrat med
30 glucose (Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold
Spring Harbor, 1972) som er suppleret med aminosyrerne
isoleucin, leucin, valin, asparaginsyre og phenylalanin.
Aminosyren tyrosin, som stammen DG 30 ligeledes ikke læn-
gere kan syntetisere, sættes dog ikke til substratet.
35 Af de 800 "udstukne" kolonier kan 7 vokse på minimalsubstra-
tet.

Til adskillelse af de tre mulige gener aspC, ilcE og tyrB i E. coli DG 30 "udstikkes" disse 7 kolonier atter på det ovennævnte minimalmedium, som er suppleret med de angivne aminosyrer, på nær hver gang en, for hvilken en af transaminaserne, som er kodet af en af generne, viser substratspecificitet.

Resultaterne er angivet i den følgende tabel:

Klon	Minimalsubstrat, suppleret på nær antagen aminosyre					Gen
	Asp	Leu	Ile	tyr		
10 1	+	+	-	+		tyrB
2	+	+	-	+		tyrB
3	-	+-	+	+-		ilvE
4	-	+-	+	+-		ilvE
15 5	+	+	-	+		tyrB
6	+	+	-	+		tyrB
7	-	+-	+	+-		ilvE

+ = god vækst

20 +- = dårlig vækst

- = ingen vækst

g. Lokalisering af tyrB-genet.

Ved minilyse ifølge Maniatis et al., Cold Spring Harbor, side 366-370 (1982), fås cosmid-DNA af klonerne 1-7, som fås ifølge eksempel 6: Derpå indsluses dette cosmid-DNA i E. coli DH1 (ATCC 33849), hvorfra den i gode udbytter atter kan isoleres.

Plasmid-DNA, som oprindeligt er udvundet ud fra klonen 3 fra E. coli DG 30 (jf. eksempel 6), isoleres fra den med denne DNA transformerende stamme E. coli DH 1 og nedbrydes fuldstændigt med restriktionsenzymene SallI og SmaI, ved at følge fremstillernes, New England Biolabs, anvisninger. Ligeledes fuldstændigt med ClaI nedbrudt bliver vektoren pAT 153, som derpå endnu underkastes en behandling med basisk phosphatase. De to DNA'er blandes

sammen, ligeres på den i eksempel 4 allerede beskrevne art og vis med hinanden, og kompetente celler fra stammen E. coli ATCC 11303 transformeres med en portion af ligase-udgangsblendingen, eksempelvis 10 μ liter.

5 Resistente kolonier selektioneres på L-Broth-plader, som indeholder 50 μ g ampicillin pr. ml, og afprøves ved hjælp af "replica plating" på L-Broth-plader med 20 μ g tetracyclin pr. ml med hensyn til markør-inaktivering og dermed indbygning. Fra kolonier, som har fænotypen AprTcs, 10 isoleres ved minilyse plasmid-DNA, og ved hjælp af fuldstændig nedbrydning med restriktionsenzymet ClaI efterprøves tilstedeværelsen af ClaI-fragmenter i vektoren pAT153.

h. Efterprøvning af transaminase-aktiviteten.

15 De ifølge eksempel 4 tilvejebragte kloner efterprøves ved hjælp af APPAT-Test (Aspartat-Phenylpyruvat-Aminotransferase Assay, Sigma Testkit G0390, idet α -glutarat er erstattet med phenylpyruvat) med hensyn til aktiviteten af den aromatiske transaminase, altså genproduktet af tyrB. 20 Som sammenligning tjener den ikke-transformerede udgangsstamme E. coli ATCC 11303. Derved kan der i et tilfælde måles en tydelig stigning i tyrB-aktivitet, nemlig en faktor 5-10, i forhold til udgangsstammen E. coli ATCC 11303.

Ved hjælp af agarose-gelelektroforese under anvendelse 25 af egnede markører kan man vise, at i den stamme, som udviser den øgede tyrB-genaktivitet, er indeholdt en pAT 153-vektor, som indbygget indeholder et ca. 2,7 MD stort ClaI-fragment. Transformerer man atter den plasmidløse stamme E. coli ATCC 11303 med den isolerede plasmid-DNA, kan man således i hvert enkelt 30 tilfælde iagttage en stigning i tyrB-genaktiviteten med en faktor 5-10.

Transformationen af E. coli ATCC 11303 med ilvE-genet sker på analog måde.

Eksempel 5

Fremstilling af L-tert.-leucin

a. En ifølge eksempel 3 udvalgt stamme af *Escherichia coli* ATCC 11303 dyrkes i følgende næringsopløsning.

5	Fumarsyre	10	g/l
	Kødekstrakt	20	g/l
	Asparaginsyre	8	g/l
	KH_2PO_4	2	g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5	g/l
10	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1	g/l
	3,3-Dimethyl-2-oxo-smørsyre	4	g/l

Der indstilles en pH-værdi på 7,4 med vandig natriumhydroxidopløsning.

15 Efter 48 timers vækst ved 37°C centrifugeres cellerne fra. I den ovenstående væske bestemmes der ved hjælp af HPLC på en RPC-8 søjle (mobil fase: gradient af 100 mM Na-acetat (pH 7,2) og methanol) 0,9 g/l L-2-amino-3,3-dimethyl-smørsyre (tert.-leucin).

20

b. Cellemateriale dyrkes som i eksempel 8 og inkuberes under omrystning i en opløsning af 10 g asparaginsyre pr. liter, 4 g 3,3-dimethyl-2-oxo-smørsyre pr. liter i 10 mmol/liter tris-HCl-puffer (pH-værdi = 7,4). Efter 24 timers forløb
 25 ved 37°C kan man ved hjælp af HPLC måle 1,9 g/liter L-2-amino-3,3-dimethyl-smørsyre.

30

35

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af L-tert.-leucin
k e n d e t e g n e t ved, at 3,3-dimethyl-2-oxo-butansyre
eller et salt af denne forbindelse, hver gang i nærværelse
5 af aminosyrer som aminogruppedonatorer, transamineres.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at der transamineres ved hjælp af mikroorganis-
mer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g -
10 n e t ved, at der transamineres ved hjælp af mikroorganis-
mer af slægterne Paracoccus, Alcaligenes, Pseudomonas,
Serratia, Agrobacterium og Streptomyces samt enterobakterier.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 og 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at der transamineres ved hjælp af Alcaligenes
15 faecalis DSM 4115, Alcaligenes denitrificans DSM 4114,
Pseudomonas paucimobilis DSM 4120, Pseudomonas spec. 4119,
Serratia plymuthica DSM 4116, Agrobacterium tumefaciens,
Escherichia coli DH1, Escherichia coli ATCC 11303, Entero-
bacter agglomerans DSM 4112, Enterobacter spec. DSM 4121,
20 Paracoccus denitrificans DSM 65, Streptomyces hygrosopicus
og Streptomyces viridochromogenes samt 3 jordisolater DSM
4113, DSM 4117 og DSM 4118.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at der transamineres ved hjælp af genteknisk
25 manipulerede mikroorganismer.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g -
n e t ved, at der transamineres ved hjælp af E. coli ATCC
11303, som er transformeret med et plasmid indeholdende et
tyrB-gen eller et ilvE-gen.

7. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene
30 1-6, k e n d e t e g n e t ved, at der transamineres med
celleekstrakter, isolerede hele proteiner eller med rensede
transaminaser.

8. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 1-7, k e n d e t e g n e t ved, at aminogruppedonator og α -ketosyre anvendes i et forhold fra 1:1 til 5:1.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g -
5 n e t ved, at aminogruppedonator og α -ketosyre anvendes i et forhold fra 1:1 til 2:1.

10. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 1-9, k e n d e t e g n e t ved, at transamineringen gennemføres i et pH-værdiområde fra 5 til 9.

10 11. Fremgangsmåde ifølge krav 10, k e n d e t e g -
n e t ved, at transamineringen gennemføres i et pH-værdiområde fra 7 til 8,5.