



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 654 851 A5

⑤① Int. Cl.4: C 12 P 13/06

// (C 12 P 13/06, C 12 R 1:13)

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 2748/83

㉒ Anmeldungsdatum: 19.05.1983

③① Priorität(en): 16.06.1982 US 388760

㉔ Patent erteilt: 14.03.1986

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 14.03.1986

⑦③ Inhaber:
W. R. Grace & Co., New York/NY (US)

⑦② Erfinder:
Updike, Mark Hampton, Baltimore/MD (US)
Calton, Gary Jim, Elkridge/MD (US)

⑦④ Vertreter:
Dr. A. R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑤④ **Fermentative Herstellung von L-Leucin.**

⑤⑦ L-Leucin wird mittels Kultivierung einer gegen L-Leucin-Analoga resistenten Mutante von *Brevibacterium thiogenitalis* in einem wässrigen Nähr-Medium unter aeroben Bedingungen erhalten. Die Kultivierung geschieht bei etwa 30°C und bei einem pH-Wert von 5 bis 8. Das L-Leucin wird aus dem Fermentationsmedium gewonnen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von L-Leucin, umfassend die Kultivierung, unter aeroben Bedingungen, eines Mutantenstammes von *Brevibacterium thiogenitalis*, welcher Stamm resistent ist gegenüber einem L-Leucin-Analogen, um ein Fermentationsmedium zu erhalten, und weiter umfassend die Gewinnung des angereicherten L-Leucins aus dem genannten Medium.

2. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, in dem die Mutante *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 39104 ist.

3. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, in dem die Fermentation bei einer Temperatur von 20 bis 45 °C ausgeführt wird, und zwar während 16 bis 176 Stunden.

4. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, in dem der pH-Wert der Fermentationsmedien während der Kultivierung 5 bis 8 beträgt.

5. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, in dem die Mutante *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 39104 ist, und in dem die Fermentation bei einer Temperatur von 25 bis 40 °C ausgeführt wird, und zwar während 16 bis 176 Stunden bei einem pH-Wert von 5 bis 9.

Diese Erfindung betrifft ein fermentatives Verfahren zur Herstellung von L-Leucin.

Die Herstellung von L-Leucin, L-Valin und anderen Aminosäuren mittels Fermentation ist im grossen Umfang erforscht worden. Eine grosse Zahl von Gattungen von Mikroorganismen sind zusammen mit verschiedenen Aminosäuren-Analogen verwendet worden. Die US-Patentschrift 3 865 690 lehrt die Herstellung von L-Leucin mittels Kultivierung eines Stammes von *Brevibacterium* oder von *Corynebacterium*, welche Stämme resistent gemacht worden sind gegenüber L-Leucin-Antagonisten. Gemäss der US-Patentschrift 3 970 519 werden Stämme der gleichen Gattungen in Anwesenheit von verschiedenen Aminosäuren kultiviert, um so L-Leucin herzustellen. Aus der US-Patentschrift 3 893 888 ist bekannt, dass L-Valin aus Mutantenstämmen von *Brevibacterium* erhalten werden kann, welche Mutanten resistent sind gegenüber der α -Amino- β -hydroxyvaleriansäure (AHV). Die US-Patentschrift 3 688 073 lehrt die Gewinnung von L-Leucin unter Verwendung eines Mikroorganismus des Genus *Corynebacterium* in Anwesenheit eines «Promoters» für Isoleucin, Methionin, Phenylalanin oder Valin, beispielsweise Azaleucin oder AHV. Azaleucin ist auch verwendet worden als ein Analoges für die Herstellung von L-Leucin; siehe dazu Wang et al., «Fermentation and Enzyme Technology», John Wiley and Sons, Inc. 1979, Seiten 18 bis 20. Die US-Patentschrift 3 759 789 schliesslich verwendet Kulturen von *Arthrobacter alkanicus*, welche resistent sind gegenüber L-Threonin. Präkursoren von L-Leucin und von L-Isoleucin können zugegeben werden, um die Ausbeute zu erhöhen.

In diesem Zusammenhang ist die folgende Literatur relevant:

1. Araki, Kazumi, H. Ueda and S. Saigusa. Fermentative Production of L-Leucine with Auxotrophic Mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* 38 (3), 565–572 (1974).

2. Calvo, R.A., and J.M. Calvo. Lack of End-Product Inhibition and Repression on Leucine Synthesis in a Strain of *Salmonella typhimurium*. *Science*, 156, 1107–1109 (1967).

3. Kisumi, M., S. Komatsubara and I. Chibata. Leucine Accumulations by Isoleucine Revertants of *Serratia marcescens* Resistant to α -Aminobutyric Acid: Lack of Both Feedback Inhibition and Repression. *J. Biochem.*, 73, 107–115 (1973).

4. Tsuchida, T., F. Yoshinaga, K. Kubota, H. Momose and S. Okumura. Cultural Conditions for L-Leucine Production by Strain No. 218, a Mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256. *Agr. Biol. Chem.* 39 (5), 1149–1153 (1975).

5. Tsuchida, T., and H. Momose. Genetic Changes of Regulatory Mechanisms Occurred in Leucine and Valine Producing Mutants Derived from *Brevibacterium lactofermentum* 2256. *Agr. Biol. Chem.* 39 (11), 2193–2198 (1975).

6. Tsuchida, T., F. Yoshinaga, K. Kubota, H. Momose and S. Okumura. Production of L-Leucine by a Mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256. *Agr. Biol. Chem.* 38 (10), 1909–1911 (1974).

7. Freundlich, M. and J.M. Trela. (1969). Control of isoleucine, valine, and leucine biosynthesis. *J. of Bacteriology*, 15 101–106.

8. Izumi, Y., Y. Asano, Y. Tani and K., Ogata. (1977). Formation of valine and leucine by analog-resistant mutants of an obligate methylotroph, *Methylomonas aminofaciens*. *J. Ferment. Technol.*, 55, 452–458.

9. Kisumi, M., S. Komatsubara and I. Chibata. (1977). Pathway for isoleucine formation from pyruvate by leucine biosynthetic enzymes in leucine-accumulating isoleucine revertants of *Serratia marcescens*. *J. Biochem.*, 82, 95–103.

10. Kisumi, M., J. Kato, S. Komatsubara, I. Chibata. (1973). Production of isoleucine, valine and leucine by regulatory mutants of *Serratia marcescens*. «Genetics of Industrial Microorganisms-Bacteria».

11. Rogerson, A., and M. Freundlich. (1969). Control of isoleucine, valine and leucine biosynthesis. VIII. Mechanism of growth inhibition by leucine in relaxed and stringent strains of *Escherichia coli* K-12. *Biochimica et Biophysica Acta*, BRA 26302.

Verschiedene allgemeine Artikel betreffend biosynthetischer Verfahren für die Gewinnung von L-Leucin wie auch für die Gewinnung von anderen Aminosäuren sollen hier ebenfalls aufgeführt werden:

12. Szentirmai, A. and I Horvath. (1976). Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 23, 137–149.

13. Umbarger, H.E. (1974). The elements involved in the multivalent regulation of the isoleucine and valine biosynthetic enzymes of the Enterobacteriaceae. Proceedings of the 1st. Intersectional Congress of IAMS, 1, Tokyo.

14. Umbarger, H.E. (1973). Genetic and physiological regulation of the isoleucine, valine and leucine biosynthetic enzymes of the Enterobacteriaceae. From «Genetics of Industrial Microorganisms».

15. Umbarger, H.E. (1978). Amino Acid Biosynthesis and Its Regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 533–606, 563.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Leucin, umfassend die Kultivierung eines Mutantenstammes von *Brevibacterium thiogenitalis* unter aeroben Bedingungen, welcher Stamm resistent ist gegenüber einem Analogen von L-Leucin.

Nicht kultivierte Stämme von *Brevibacterium thiogenitalis* (beispielsweise ATCC 19240), welche für Mutation ausgewählt werden, sind charakterisiert durch eine Überproduktion an Glutaminsäure. Der biosynthetische Weg, auf dem die Mikroorganismen L-Leucin herstellen, ist im allgemeinen bekannt. Siehe dazu beispielsweise Umbarger, «Amino Acid Biosynthesis and Its Regulation», *Ann. Rev. Biochem.* 1978, 47: Seiten 563 bis 565. Gemäss der angegebenen Referenz wird angenommen, dass die Synthese anhand der folgenden Stufen verläuft: Pyruvat – α -Acetolactat – α,β -Dihydroxyisovaleriat – α -Ketoisovaleriat – α -Isopropylmalat – β -Isopropylmalat – α -Ketoisocaproat – L-Leucin.

Gewisse Analoge von natürlich vorkommenden Aminosäuren sind geeignet für die Isolierung von Mutantenstämmen

men gemäss dieser Erfindung. Diese Analoge sind toxisch für Stämme, welche keine Überproduktion von L-Leucin zeigen. Solche Analoge umfassen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Methallylglycin und α -Hydroxy-leucin.

Die Mutante, welche gegenüber Leucin-Analogen resistent ist, kann durch UV-Bestrahlung eines nicht kultivierten Stammes von *Brevibacterium thiogenitalis* oder durch Behandlung des genannten Stammes mit einem Mutagen, beispielsweise mit Äthylmethansulfonat, N-Methyl-N₁-nitro-N-nitrosoguanidin, usw. erhalten werden. Anschliessend kann der Stamm in Anwesenheit des Analogens kultiviert werden, um so Kolonien zu isolieren, welche eine Überproduktion an L-Leucin zeigen. Beispielsweise kann der Stamm kultiviert werden bei 30 °C während 2 bis 7 Tagen, und zwar auf Agarplatten der folgenden Zusammensetzung: Gelatinhydrolysat-pepton: 5,0 g/l; Rindfleischextrakte: 3,0 g/l; Agar 15 g/l; Natriumsalz der α -Hydroxy- β -Valeriansäure: 25 g/l.

Eine wachstumsfähige Kultur eines L-Leucin produzierenden Mutantenstammes von *Brevibacterium thiogenitalis*, welcher gegenüber α -Amino- β -hydroxyvaleriansäure resistent ist (Produkt des weiter unten beschriebenen Beispiels 2) ist bei der American Type Culture Collection, 12301 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland, 20 852 USA, unter der Nr. ATCC 39104 am 15. April 1982 hinterlegt worden.

Die Fermentation der isolierten Mutantenstämme von *Brevibacterium thiogenitalis* kann durch Kultivierung unter Schütteln oder durch Fermentation unter dem Wasserspiegel, beides unter aeroben Bedingungen, ausgeführt werden. Die Fermentation wird im allgemeinen ausgeführt bei einer Temperatur von 25 bis 40 °C und bei einem pH-Wert von 5 bis 8, bevorzugterweise für 6,5 bis 7,5. Calciumcarbonat und Ammoniak können für das Einstellen des pH-Wertes des Fermentationsmediums verwendet werden. Das Fermentationsmedium enthält ein Kohlenstoff lieferndes Substrat, ein Stickstoff lieferndes Substrat und andere Elemente. Geeignete Substrate für die Abgabe von Kohlenstoff in der Fermentation umfassen fermentierbare Zucker, Proteinhydrolysate und Proteine. Beispiele für geeignete Substrate für die Abgabe von Stickstoff sind Harnstoff, Ammoniumsalze von organischen Säuren (beispielsweise Ammoniumacetat und Ammoniumoxoalat) und Ammoniumsalze von anorganischen Säuren (beispielsweise Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat oder Ammoniumchlorid). Die Menge der Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen im Medium liegen in der Regel im Bereich zwischen 0,001 und 20% (Gewicht pro Volumen). Im Fermentationsmedium können weiter organische Nährstoffe (beispielsweise Corn steep liquor, Pepton, Hefenextrakte, Sojabohnenextrakte) und/oder anorganische Elemente (beispielsweise Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat), Vitamine wie Biotin und Thiamin und Aminosäuren, beispielsweise Valin, zugesetzt werden. Die Fermentation wird üblicherweise während 16 bis 176 Stunden gefahren und das L-Leucin reichert sich dabei im Fermentationsmedium an.

Nach Abschluss der Fermentation, d.h. bei Vorlage von 0,1 bis 6 Prozent (Gewicht pro Volumen) an L-Leucin im Fermentationsmedium, werden Zellen und andere feste Kulturkomponenten vom Medium mittels konventioneller Verfahren wie Filtrierung oder Zentrifugierung, entfernt. Auch für die Gewinnung und/oder Reindarstellung von L-Leucin aus dem Filtrat oder aus der überstehenden klaren Lösung können bekannte Verfahren verwendet werden. Beispielsweise kann das filtrierte Fermentationsmedium mit einem starken Kationenaustauscher versetzt werden. Das beladene Harz wird anschliessend mit einer verdünnten alkalischen Lösung eluiert; ein Beispiel einer solchen Lösung ist wässriger Ammoniak. Die L-Leucin enthaltenden Eluate werden zusammengegeben und konzentriert. Dann wird die konzentrierte Lösung mit einem Alkanol, beispielsweise mit Methanol oder Ätha-

nol, versetzt. Die ausgefallenen Kristalle können aus einer wässrigen Alkanollösung, wie einer Mischung Wasser/Methanol oder Wasser/Äthanol, rekristallisiert werden, um so reines kristallines L-Leucin zu erhalten.

Die folgenden Beispiele illustrieren die Erfindung. «Difco» bezeichnet darin «Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, 9. Ausgabe, Difco Laboratories Incorporated, Detroit, Michigan, 1953».

Beispiel 1

Eine Kultur von ATCC 19240, *Brevibacterium thiogenitalis*, auf Nähr-Agar (Difco), welche 2 Tage lang bei 30 °C gehalten worden war, wurde mit einem 0,1 M-Natriumphosphatpuffer mit pH 7,0, ausgewaschen. Die erhaltene Zellsuspension wurde in sterile Gläser dekantiert und mit einem Mutagen, nämlich Äthylmethansulfonat (EMS) versetzt, und zwar in einer solchen Menge, die in der Lösung zu einer Konzentration von 0,08 M des Mutagens führte. Die EMS-behandelten Zellen wurden dann 18 Stunden lang bei 30 °C inkubiert, um die mutagene Wirkung zu erhalten.

Nach Inkubation wurde die Zellsuspension zentrifugiert, die überstehende Lösung wurde dekantiert und die Zellen neu in einer frischen Pufferlösung suspendiert.

Nach zweimaligem Waschen, um Reste der mutagenen Verbindung zu entfernen, wurden die Zellen auf einer Gradientplatte von Nähragar mit 25 g/l α -Amino- β -hydroxyvaleriansäure (AHV) am höheren Ende des Gradienten aufgegeben.

Resistente Mutanten, welche am höheren Ende der Platte ansiedelten, wurden auf frische Nähragar-Platten gegeben. Nach Inkubation während 24 Stunden bei 30 °C wurden die isolierten Proben zu 1-ml-Röhrchen von Isoleucin-Medium 1 inokuliert.

Isoleucin-Medium 1

	pro Liter entionisiertem Wasser
Glukose	100 g
KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	50 g
Biotin	100 µg
Thiamin HCl	1 mg
Bacto-Soyton* (Difco)	0,63 g
CaCO ₃	50 g

* Ein enzymatisches Hydrolysat von Sojabohnenmehl Difco, Seite 264.

Der pH-Wert des Mediums wurde mittels Zugabe von NaOH vor der Behandlung im Autoklaven auf 7,2 eingestellt. Die genannte Behandlung wurde bei 112 °C ausgeführt und dauerte 15 Minuten.

Die Glasröhrchen wurden anschliessend 4 Tage lang bei 30 °C und 300 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Ein Bioassay unter Verwendung von *Pediococcus cerevisiae* (ATCC 8042) wurde wie weiter unten beschrieben, ausgeführt, um die Menge des vorliegenden L-Leucins zu bestimmen. Ein resistentes Isolat, das mit 19240-31 bezeichnet wurde, wurde bei 2,6 g/l L-Leucin nachgewiesen.

Die genannte Bestimmung wird wie folgt ausgeführt:

Das Prinzip der Bestimmung beruht darauf, das *Pediococcus cerevisiae* für das Wachstum alle Aminosäuren in ihrer

L-Form braucht. Es ist daher möglich, die Menge einer speziellen Aminosäure, welche im Fermentationsmedium vorliegt, zu bestimmen, indem Fäden von *Pediococcus* auf ein Agarmedium gegeben wird, welches alle nötigen Nährstoffe mit Ausnahme der nachzuweisenden Aminosäure enthält. Wenn nun eine sterile Filterplatte, welche mit einem durch Millipore-filtrierten Fermentationsmedium getränkt ist, auf die Oberfläche des oben beschriebenen Mediums gelegt wird, kann die Zone des *Pediococcus*-Wuchses um die Scheibe gemessen und mit Standardflächen verglichen werden. Die letzteren werden hergestellt, indem *Pediococcus* in Anwesenheit einer Filterplatte kultiviert werden, welche bekannte Mengen der zu untersuchenden Aminosäuren enthalten.

Der Vorgang des Nachweises von Leucin verläuft wie folgt:

Pediococcus cerevisiae ATCC 8042 wird ca. 44 Stunden bei 37 °C in 4 × 10 ml Micro Inoculum Broth von Difco gezüchtet. Die Zellen werden anschliessend dreimal mit sterilisiertem Wasser gewaschen und dann zusammengegeben. Das Kombinat wird in 12 ml sterilem, entionisiertem Wasser wiederum suspendiert. Platten, enthaltend Leucin Assay Medium (Difco), hergestellt durch die Zugabe von 2,6 g Leucin Assay Medium (Difco) und 1,5 g Agar Noble (Difco) in 100 ml entionisiertem Wasser werden mit Fäden der oben erhaltenen Zellsuspension (0,3 ml) belegt. «Micro Inoculum Broth» ist ein kommerziell erhältliches Kulturmedium, das Pepton, Hefeextrakt, Dextrose, KH₂PO₄ und Sorbitan-Monoleat-Komplex enthält. Es wird in «Difco», auf Seite 213, beschrieben. Auch das Leucin Assay Medium ist kommerziell erhältlich und in der gleichen Publikation auf Seiten 230 bis 231 beschrieben.

Nachdem die Überschussfeuchtigkeit von den Platten abgedampft worden ist, werden sterile ¼ Zoll Absorptionsscheiben (kommerziell erhältlich) mit einer bekannten Menge an L-Leucin getränkt, um so die Standardkurve zu erhalten. Die gleichen Scheiben werden mit den Fermentationsmedien getränkt, in denen das L-Leucin zu bestimmen ist.

Die Platten werden dann 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert, wonach der Durchmesser der Wuchszone in Millimetern gemessen und notiert wird. Nach Anfertigung der Stan-

dardkurve werden die unbekanntenen Werte darin eingetragen und erlauben so die Bestimmung der L-Leucin-Produktion.

Das genannte Messverfahren ergibt, wegen seines mikrobiologischen Indikators, ein eher qualitatives Resultat der Aminosäureproduktion als ein genaues, quantitatives.

Beispiel 2

Es wurde festgestellt, dass das Isolat 19240-31 eine gemischte Population von grossen und kleinen Kolonien aus dem Nähr-Agar darstellt. Wenn die genannten Kolonien im Isoleucin-Medium Nr. 1 3 Tage lang bei 30 °C und 300 Umdrehungen pro Minute gezüchtet wurden, konnte festgestellt werden, dass die grossen Kolonien mehr Valin als Leucin und Isoleucin und die kleinen Kolonien umgekehrterweise produziert. Eine biologische Untersuchung wurde ausgeführt unter Verwendung von *Pediococcus cerevisiae*. Ein Isolat mit der Bezeichnung 19240-31-I zeigte eine Produktion von 0,5 g/l Leucin. Ein Isolat mit der Bezeichnung 19240-31-K zeigte eine Produktion von 1,5 g/l Leucin. Das zuletzt genannte Isolat wurde daher bei der ATCC hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer ATCC 39104.

Beispiel 3

Zur Bestimmung des Einflusses des Initial-pH-Wertes auf das Züchtungsmedium wie auch der Effekte der Behältergrösse und der Inkubationszeit, wurde Isoleucin-Medium 1 zubereitet und verschiedene Aliquote davon mittels Zugabe von NaOH auf verschiedene pH-Werte, beispielsweise 5,8 bis 8,2) vor der Autoklaven-Behandlung eingestellt.

Das Isolat 19240-31-K wurde verschieden lang gezüchtet (beispielsweise 3 bis 5 Tage), und zwar in 500 ml nicht eingezogenen Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Medium und in 250 ml eingezogenen und nicht eingezogenen Erlenmeyer-Kolben mit je 50 ml Medium.

Bei einer Wuchsperiode von 4 Tage bei 30 °C und 300 Umdrehungen pro Minute in einem eingezogenen 250 ml Erlenmeyer-Kolben, welcher das Medium bei einem Start-pH von 7,9 enthielt, zeigte das Isolat 19240-31-K einen Titer von 3,2 g/l L-Leucin, bestimmt nach der oben angegebenen Methode mit *Pediococcus* Bioassay.