(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 30 959 T2** 2004.05.13

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 694 614 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 30 959.5**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 110 186.4**
(96) Europäischer Anmeldetag: **29.06.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.01.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **04.06.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.05.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12P 13/04**
C12P 13/06, C12P 13/08, C12N 1/20

(30) Unionspriorität:
14968094 30.06.1994 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
Nakano, Tetsuo, Machida-shi, Tokyo 194, JP; Nakayama, Motokazu, Inashiki-gun, Ibaraki 300-03, JP; Shitashige, Mariko, Tokuyama-shi, Yamaguchi 745, JP; Ikeda, Masato, Hofu-shi, Yamaguchi 747, JP; Furukawa, Satoru, Chesterfield, MO 63017, US

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe von L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin, durch Fermentation. Eine aliphatische Aminosäure wie L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin ist ein essentieller Nährstoff für Menschen und Tiere und wird in Arzneimitteln, Nahrungsmitteln und Tierfutter eingesetzt.

[0002] Verschiedene Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure durch direkte Fermentation sind bekannt. Als Verfahren zur Herstellung von L-Valin sind Verfahren unter der Verwendung von Mikroorganismen, die zu den Gattungen Serratia, Corynebacterium und Arthrobacter gehören, bekannt. Als Verfahren zur Herstellung von L-Valin unter der Verwendung eines zur Gattung Escherichia gehörenden Mikroorganismus ist ein Verfahren unter der Verwendung eines Mikroorganismus mit einer Resistenz gegen β-Hydroxyisoleucin, β-2-Thienylalanin oder 1,2,4,-Triazolalanin bekannt (Japanische, veröffentlichte, ungeprüfte Patentanmeldung Nr. 51989/81).

[0003] Als Verfahren zur Herstellung von L-Leucin sind Verfahren unter der Verwendung von Mikroorganismen, die zu den Gattungen Serratia, Corynebacterium und Arthrabacter gehören, bekannt. Als Verfahren zur Herstellung von L-Leucin unter der Verwendung eines zur Gattung Escherichia gehörenden Mikroorganismus ist ein Verfahren unter der Verwendung eines Mikroorganismus mit einer Resistenz gegen β-2-Thienylalanin bekannt (Japanische, veröffentlichte, ungeprüfte Patentanmeldung Nr. 72695/81). Als Verfahren zur Herstellung von L-Isoleucin sind Verfahren unter der Verwendung von Mikroorganismen, die zu den Gattungen Serratia, Corynebacterium und Arthrobacter gehören, bekannt. Als Verfahren zur Herstellung von L-Isoleucin unter der Verwendung eines zur Gattung Escherichia gehörenden Mikroorganismus ist ein Verfahren unter der Verwendung eines Mikroorganismus mit einer Resistenz gegen Isoleucin-Analoga bekannt (EP-A-0542487).

[0004] Jedoch war bisher kein Verfahren zur Herstellung von aliphatischen Aminosäuren unter Verwendung von Mikroorganismen mit einer Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure bekannt.

[0005] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein industriell effizientes Verfahren zur Herstellung einer in Arzneimitteln, Nahrungsmitteln und Tierfutter nutzbringenden L-Aminosäure bereitzustellen.

[0006] Entsprechend der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin, bereitgestellt, wobei das Verfahren das Züchten in einem Medium eines Mikroorganismus, der zur Gattung Escherichia gehört, der gegen 5 g/l Dinatrium-2-ketobutyrat resistent ist und die L-Aminosäure produzieren kann, bis die L-Aminosäure in dem Medium angereichert ist, und das Gewinnen der L-Aminosäure daraus umfasst, wobei der Mikroorganismus innerhalb von 72 Stunden bei 33°C auf einer Minimalagarplatte, die 5 g/l Dinatrium-2-ketobutyrat enthält, wachsen kann.

[0007] In der vorliegenden Erfindung kann jeder Mikroorganismus verwendet werden, so lange er zur Gattung Escherichia gehört, die vorstehend erwähnte Resistenz gegen Dinatrium-2-ketobutyrat aufweist und die Fähigkeit besitzt, eine der verstehend erwähnten L-Aminosäuren zu produzieren.

[0008] Ein der vorliegenden Endung entsprechender, L-Aminosäure produzierender Mikroorganismus kann erhalten werden, indem ein Mikroorganismus, der zu der Gattung Escherichia gehört und die Fähigkeit zur Produktion einer L-Aminosäure besitzt, einer herkömmlichen Mutationsbehandlung wie einer Behandlung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin und einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlen unterzogen wird, die resultierenden Mikroorganismen auf einem Minimalmedium, das 5 g/l Dinatrium-2-ketobutyrat enthält, verteilt werden und die Kolonien, die auf einem Minimalmedium bei 33°C innerhalb von 72 Stunden wachsen, abgeimpft werden. Ein in der vorliegenden Erfindung verwendeter Mikroorganismus kann ebenfalls erhalten werden, indem ein Mikroorganismus, der zur Gattung Escherichia gehört, die vorstehend erwähnte Resistenz gegen Dinatrium-2-ketobutyrat aufweist und von einem Wild-Stamm abstammt, mit einer Nährstoff-Auxotrophie, einer Resistenz gegen Antagonisten des L-Aminosäurestoffwechsels usw. ausgestattet wird, um die Produktivität der L-Aminosäure zu verbessern. Bevorzugte Beispiele eines geeigneten Mikroorganismus sind Escherichia coli H-9069, H-9071 und H-9073.

[0009] Innerhalb der Produktion einer L-Aminosäure unter der Verwendung eines Mikroorganismus der vorliegenden Erfindung ist jedes herkömmliche Verfahren zur Züchtung der Bakterien anwendbar. Als Medium für die Kultur kann jedes synthetische und natürliche Medium verwendet werden, so lange es in geeigneter Weise eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Substanzen und andere, für die verwendeten Mikroorganismen notwendigen Nährstoffe enthält.

[0010] Als Kohlenstoffquelle können Kohlehydrate wie Glucose, Fructose, Lactose, Molasse, Cellulose-Hydrolysate, Rohzucker-Hydrolysate und Stärke-Hydrolysate, organische Säuren wie Brenztraubensäure, Essigsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure und Milchsäure und Alkohole wie Glyzerin, Ethanol usw. verwendet werden.

[0011] Als Stickstoffquelle können Ammoniak und Ammoniumsalze anorganischer oder organischer Säuren wie Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Ammoniumacetat und Ammoniumphosphat, Amine, Pepton, Fleischextrakt, Maisquellwasser, Casein-Hydrolysat, Sojabohnenkuchen-Hydrolysat, verschiedene gezüchtete Zellen und ihre gespaltenen Produkte verwendet werden.

[0012] Als anorganische Substanzen können Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Magnesiumphosphat, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Eisensulfat, Mangansulfat, Kupfersulfat, Calciumchlorid und Calciumcarbonat verwendet werden.

[0013] Die Züchtung wird unter aeroben Bedingungen, zum Beispiel durch das Schütteln der Kultur oder durch das Bewegen der Submerskultur usw. bei einer Temperatur von 20 bis 40°C, vorzugsweise von 28 bis 37°C durchgeführt. Der pH-Wert des Mediums wird innerhalb eines Bereiches von 5 bis 9, vorzugsweise um den neutralen pH-Wert herum, gehalten. Der pH-Wert des Mediums wird mit Calciumcarbonat, anorganischen oder organischen Säuren, alkalischen Lösungen, Ammoniak, pH-puffernden Mitteln und ähnlichen eingestellt. Üblicherweise wird die L-Aminosäure nach einer Züchtung von 1 bis 7 Tagen in der Kultur angereichert.

[0014] Nach dem Beenden der Züchtung werden Präzipitate wie Zellen durch Zentrifugation usw. aus der Kultur entfernt. Durch die Anwendung einer Kombination von Ionenaustausch-Behandlung, Aufkonzentration, Aussalzen usw. kann eine L-Aminosäure aus der Kultur gewonnen werden. Beispiele der vorliegenden Erfindung werden nachstehend beschrieben.

Beispiel 1: Herstellung einer L-Valin produzierenden Mutante mit einer Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure

[0015] Escherichia coli H-9068 (ein für Methionin und Diaminopimelinsäure nicht auxotropher Stamm, der durch reverse Spontanmutationen des für Methionin und Diaminopimelinsäure auxotrophen Stammes Escherichia coli ATCC 21530 erhalten wurde) wurde einer herkömmlichen Mutationsbehandlung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (0,5 mg/ml, 33°C, 30 Minuten) unterzogen und anschließend auf eine Minimalagarplatte (0,5% Glucose, 0,2% Ammoniumchlorid, 0,3% Kaliumdihydrogenphosphat, 0,6% Dikaliumhydrogenphosphat. 0,01% Magnesiumsulfat, 20 mg/l Calciumchlorid, 2% Agar, pH 7,2), die 10 g/l Dinatrium-2-ketobutyrat enthält, verteilt. Nach der Züchtung für 2 bis 5 Tage bei 33°C wurden größer gewachsene Kolonien als die Stämme mit einer Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure abgeimpft und dem L-Valin-Produktionstest unterzogen. Stämme mit einer größeren L-Valin-Produktivität als die des Ausgangsstammes wurden mit einer Häufigkeit von etwa 20% erhalten. Unter diesen Mutanten wurde der Stamm mit der höchsten L-Valin-Produktivität als Escherichia coli H-9069 bezeichnet. Der Stamm H-9069 wurde am 21. Juni 1994 dem Budapester Vertrag entsprechend mit der Zugangsnummer FERM BP-4705 im nationalen Institut für Biowissenschaften und Humantechnologie, Amt für industrielle Wissenschaft und Technologie, Japan hinterlegt.

Beispiel 2: Herstellung einer L-Leucin produzierenden Mutante mit einer Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure

[0016] Auf die gleiche Art und Weise wie in Beispiel 1, außer dass Escherichia coli H-9070 (ein von Stamm H-9068 abstammender, mutierter Stamm mit einer Resistenz gegen 4-Azaleucin) anstelle von Escherichia coli H-9068 verwendet wurde, wurde der Stamm der Mutationsbehandlung unterzogen und anschließend auf einer 10 g/l Dinatrium-2-ketobutyrat enthaltenden Minimalagarplatte gezüchtet. Nach der Züchtung wurden größer gewachsene Kolonien als die Stämme mit einer Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure abgeimpft und dem L-Leucin-Produktionstest unterzogen. Stämme mit einer größeren L-Leucin-Produktivität als die des Ausgangsstammes wurden mit einer Häufigkeit von etwa 20% erhalten. Unter diesen Mutanten wurde der Stamm mit der höchsten L-Leucin-Produktivität als Escherichia coli H-9071 bezeichnet. Der als Ausgangsstamm verwendete Stamm H-9070 und der davon abstammende Stamm H-9071 mit einer Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure wurden am 21. Juni 1994 dem Budapester Vertrag entsprechend mit den jeweiligen Zugangsnummern FERM BP-4704 und FERM BP-4703 im nationalen Institut für Biowissenschaften und Humantechnologie, Amt für industrielle Wissenschaft und Technologie, Japan hinterlegt.

Beispiel 3: Herstellung einer L-Isoleucin produzierenden Mutante mit einer Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure

[0017] Auf die gleiche Art und Weise wie in Beispiel 1, außer dass Escherichia coli H-8683 (FERM BP-4052: ein Methionin-auxotropher Stamm mit einer Resistenz gegen Rifampicin, α-Amino-β-hydroxyvaleriansäure, Thioisoleucin, Argininhydroxamat, DL-Methionin, S-(2-Aminoethyl)-L-Cystein und D-Serin) anstelle von Escherichia coli H-9068 verwendet wurde, die Konzentration von Dinatrium-2-ketobutyrat 5 g/l anstelle von 10 g/l war und dass 0,1 g/l DL-Methionin zu den Minimalagarplatten gegeben wurde, wurde der Stamm der Mutationsbehandlung unterzogen und dann gezüchtet. Nach der Züchtung wurden größer gewachsene Kolonien als die Stämme mit einer Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure abgeimpft und dem L-Isoleucin-Produktionstest unterzogen. Stämme mit einer größeren L-Isoleucin-Produktivität als die des Ausgangsstammes wurden mit einer Häufigkeit von etwa 5% erhalten. Unter diesen Mutanten wurde der Stamm mit der höchsten L-Isoleucin-Produktivität als Escherichia coli H-9073 bezeichnet. Der Stamm H-9073 wurde am 21. Juni 1994 dem Budapester Vertrag entsprechend mit der Zugangsnummer FERM BP-4707 im nationalen Institut für Biowissenschaften und Humantechnologie, Amt für industrielle Wissenschaft und Technologie, Japan hinterlegt.

Beispiel 4: Vergleich des Grades an Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure

[0018] Der Grad an Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure der in den Beispielen 1 bis 3 erhaltenen Mutanten, nämlich der mutierten Stämme H-9069, H-9071 und H-9073, wurde mit dem ihrer Ausgangsstämme, nämlich H-9068, H-9070 bzw. H-8683, verglichen. Jeder der vorstehend erwähnten Stämme wurde in ein natürliches Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,2) angeimpft und unter Schütteln für 24 Stunden gezüchtet. Die resultierende Kultur wurde mit sterilisiertem Wasser verdünnt und auf eine Minimalagarplatte, die Dinatrium-2-ketobutyrat in der in Tabelle 1 gezeigten Konzentration und 0,1 g/l DL-Methionin enthält, mit einer Dichte von 1×10^3 Zellen/cm^2 verteilt. Das Züchten wurde für 72 Stunden bei 33°C durchgeführt. Nach dem Beenden der Züchtung wurde der Grad an Resistenz gegen 2-Ketobuttersäure des Stammes auf der Basis seines Wachstums bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Der Grad an Resistenz der mutierten Stämme H-9069, H-9071 und H-9073 war höher als der der jeweiligen Ausgangsstämme.

Tabelle 1

Konzentration von Dinatrium-2-ketobutyrat (g/l)				
Stamm	0	3	5	10
H-9068	+	+	-	-
H-9069	+	+	+	+
H-9070	+	+	-	-
H-9071	+	+	+	+
H-8683	+	+	-	-
H-9073	+	+	+	-

+: ausreichendes Wachstum, -: kein Wachstum

Beispiel 5: Produktionstests von L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin

[0019] Die Produktionstests von L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin wurden durch das Züchten der in den Beispielen 1 bis 3 erhaltenen, mutierten Stämme durchgeführt. Jeder der Escherichia coli H-9068, H-9069, H-9070, H-9071, H-8683 und H-9073 wurde in 20 ml Vormedium (2% Glucose, 1% Pepton, 1% Hefeextrakt, 0,25% NaCl, pH 7,0) in einem konischen 300 ml-Kolben angeimpft und unter Schütteln für 16 Stunden bei 30°C gezüchtet. 2 ml der resultierenden Vorkultur wurde in einen konischen 2 l-Kolben mit 250 ml Produktionsmedium (6% Glucose, 0,2% Maisquellwasser, 1,6% Ammoniumsulfat, 0,1% Kaliumphosphat, 100 mg/l DL-Methionin, 4% Magnesiumphosphat, 1% Calciumcarbonat, pH 7,0) angeimpft und das Züchten wurde für 72 Stunden bei 30°C unter Schütteln durchgeführt. Nach dem Beenden der Züchtung wurde die Menge des jeweils angereicherten L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin durch flüssige Hochdruckchromatographie quantitativ bestimmt.

[0020] Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Angereicherte Aminosäure (g/l)			
Stamm	L-Valin	L-Leucin	L-Isoleucin
H-9068	8.0		
H-9069	9.5		
H-9070		3.4	
H-9071		5.0	
H-8683			14.1
H-9073			15.0

[0021] Ein Liter der jede der L-Aminosäuren enthaltenden Kulturen, die durch das Züchten eines mutierten Stammes ausgewählt aus H-9069, H-9071 und H-9073 erhalten wurden, wurde zentrifugiert (3000 U/min, 10 Minuten), um die Zellen und andere Verunreinigungen davon zu entfernen. Der erhaltene Überstand wurde durch eine Säule, die mit dem stark sauren Kationenaustauscherharz DIAION (Typ H^+; Produkt der Mitsubishi Chemical Corporation, Japan) gepackt wurde, passagiert, um die L-Aminosäuren darauf zu adsorbieren. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und einer Elution mit 0,5 N wässrigem Ammoniak unterzogen, um die L-Aminosäurefraktionen zu sammeln. Die gesammelten Fraktionen wurden konzentriert und Ethanol wurde dem Konzentrat zugegeben. Durch die Lagerung des Gemisches in der Kühle wurde aus einem Liter der L-Valin enthaltenden Kultur, die durch das Züchten des Stammes H-9069 erhalten wurde, 6,8 g kristallines L-Valin mit einer Reinheit von 98% oder mehr erhalten, wurde aus einem Liter der L-Leucin enthaltenden Kultur, die durch das Züchten des Stammes H-9071 erhalten wurde, 3,8 g kristallines L-Leucin mit einer Reinheit von 98% oder mehr erhalten und wurde aus einem Liter der L-Isoleucin enthaltenden Kultur, die durch das Züchten des Stammes H-9073 erhalten wurde, 12,6 g kristallines L-Valin mit einer Reinheit von 98% oder mehr erhalten.
[0022] Der vorliegenden Erfindung entsprechend kann eine L-Aminosäure im industriellen Maßstab mit einer hohen Effizienz produziert werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer L-Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin, wobei das Verfahren das Züchten eines Mikroorganismus, der zur Gattung Escherichia gehört, der gegen 5 g/l Dinatrium-2-ketobutyrat resistent ist und die L-Aminosäure in einem Medium produzieren kann, bis die L-Aminosäure in dem Medium angereichert ist, und das Gewinnen der L-Aminosäure daraus umfasst, wobei der Mikroorganismus innerhalb von 72 Stunden bei 33°C auf einer Minimalagarplatte, die 5 g/l Dinatrium-2-ketobutyrat enthält, wachsen kann.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Mikroorganismus der Art Escherichia coli angehört.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Mikroorganismus Escherichia coli H-9069 (FERM BP-4705), H-9071 (FERM BP-4703) oder H-9073 (FERM BP-4707) ist.

4. Mikroorganismus, der zur Gattung Escherichia gehört, gegen 5 g/l Dinatrium-2-ketobutyrat resistent ist und eine L-Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin produzieren kann, wobei der Mikroorganismus innerhalb von 72 Stunden bei 33°C auf einer Minimalagarplatte, die 5 g/l Dinatrium-2-ketobutyrat enthält, wachsen kann.

5. Mikroorganismus nach Anspruch 4, der Escherichia coli H-9069 (FERM BP-4705) ist.

6. Mikroorganismus nach Anspruch 4, der Escherichia coli H-9071 (FERM BP-4703 ist.

7. Mikroorganismus nach Anspruch 4, der Escherichia coli H-9073 (FERM BP-4707) ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen