(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 322 418**

(21) Número de solicitud: 200602619

(51) Int. Cl.:

C12N 15/72 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C12N 9/86 (2006.01)
C12N 9/80 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **02.10.2006**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **19.06.2009**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **19.06.2009**

(71) Solicitante/s: **Universidad de Almería**
Ctra. de Sacramento, s/n
04120 La Cañada de San Urbano, Almería, ES

(72) Inventor/es: **Martínez Gómez, Ana Isabel;**
Martínez Rodríguez, Sergio;
Clemente Jiménez, Josefa María;
Pozo Dengra, Joaquín;
Madrid Romero, Pedro;
Las Heras Vázquez, Francisco Javier y
Rodríguez Vico, Felipe

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Sistema de coexpresión enzimática para la producción de D-aminoácidos.**

(57) Resumen:
Sistema de coexpresión enzimática para la producción de D-aminoácidos. La presente invención se refiere a un vector de coexpresión para la preparación de D-aminoácidos o derivados de D-aminoácidos, a partir de la mezcla racémica de la D,L-5-hidantoína correspondiente y a un sistema enzimático que da lugar a una ruta metabólica nueva de utilidad en dicho procedimiento, que cataliza la conversión estereoselectiva de D,L-5-hidantoína hasta D-aminoácido y la racemización entre los enantiómeros de la misma.

ES 2 322 418 A1

DESCRIPCIÓN

Sistema de coexpresión enzimática para la producción de D-aminoácidos.

Sector de la técnica

Esta invención tiene su aplicación en los campos de la industria farmacéutica, la industria química, la industria de los alimentos y la agronomía.

Los D-aminoácidos son el producto directo del procedimiento aquí descrito. Estos compuestos son extremadamente valiosos en la preparación de sustancias farmacológicamente activas. Por ejemplo, la D-fenilglicina y la D-parahidroxifenilglicina son precursores en la síntesis de antibióticos como amoxicilina, ampicilina, aspoxicilina, cefbuperzone, cefpiramide, cefalexin, cefadroxil y otras penicilinas y cefalosporinas; la D-valina está siendo utilizada para la síntesis de pesticidas como el fluvanilato, y la D-alanina es precursora para la síntesis de edulcorantes en la industria alimentaria (Sharna y col. (1999) Current Science, 77,1,127-136).

Estado de la técnica

La síntesis química de aminoácidos naturales o no naturales da lugar a mezclas racémicas de D,L-aminoácidos, que deben ser resueltas hasta sus componentes ópticamente puros antes de ser utilizadas. Existen métodos químicos y biológicos para este proceso y obtener D-aminoácidos razonablemente puros. Estos métodos incluyen la cristalización de sales estereoméricas, cristalización en disolventes ópticamente activos, cromatografía y métodos enzimáticos (Greenstein, J. P. y col. En Chemistry of the amino acids, Krieger Publisher, USA, (1984) 1. 715-759). Todos estos procedimientos tienen muy limitada aplicación industrial debido a su bajo rendimiento, baja rentabilidad y fuerte efecto contaminante del medio ambiente.

Los métodos que han recibido mayor atención en los últimos años son los que parten de hidantoínas monosustituidas en su carbono 5. Estos compuestos pueden ser fácilmente sintetizados por varios métodos; los más importantes son: el de Bucherer-Berg (Finkbeiner, H. J. Org.Chem., (1965) 30, 3414-3419), que utiliza el correspondiente aldehido, cianuro potásico y carbonato amónico. La limitación de este método es su elevada toxicidad. Otro proceso de síntesis importante pero aplicable solo para la p-hidroxifenilglicina, parte de ácido glioxálico, urea y fenol (Ohashi, T., y col. (1981), Agric. Biol. Chem., 45, 831-838). Todos estos procedimientos tienen como resultado una mezcla racémica de hidantoínas D,L-5-monosustituidas, y su transformación química genera una mezcla de la que es difícil y costoso purificar los D-aminoácidos puros. Un ejemplo de ello está en el documento de patente FR 2.310.986. La patente FR 2.317.357 describe un proceso en el que introduce una importante novedad al utilizar una preparación enzimática para hidrolizar una mezcla racémica estereoespecíficamente de D,L-hidantoínas-5-sustituidas, los N-carbamil-D-α-aminoácidos formados son seguidamente oxidados por un método químico. No obstante este procedimiento no es económicamente atractivo desde el punto de vista industrial.

La racemización química espontanea de las hidantoínas 5-sustituidas se realiza en condiciones fuertemente alcalinas por tautomerismo ceto-enólico. La velocidad de racemización depende de la electronegatividad inductiva del susbtituyente del carbono 5. La reacción de racemización de las hidantoínas sustituidas es de primer orden, observándose que el tiempo medio de racemización varía desde 55.9 horas, en el caso de la isopropilhidantoína hasta 16 minutos, en el caso de la fenilhidantoína. Solo esta última y la para-hidroxifenilhidantoína racemizan a una velocidad razonable para ser sometidas a las reacciones de transformación en sus correspondientes D,L-aminoácidos (Bommarius, A.S., y col. (1992) nato asi Ser., Ser. C, 381, 161-174). Por tanto, la inmensa mayoría de hidantoínas D,L-5-sustituidas no racemizan espontáneamente a una velocidad adecuada, alargando y encareciendo la obtención de aminoácidos a partir de ellas.

La producción mediante catalizadores enzimáticos de D-aminoácidos ópticamente puros desde sus mezclas racémicas de hidantoínas D,L-5-sustituidas es un procedimiento más barato y técnicamente simple que los métodos de síntesis química y quimioenzimática descritos, además es menos contaminante (Kim G. J. y col. (1995) Enzyme Microb. Technol.,17, 63-67. Park J. H. y col. (2000) Biotechnol. Prog., 16, 564-570). En esta transformación enzimática, en primer lugar, el anillo de las hidantoínas D,L-5-sustituidas sintetizadas químicamente es hidrolizado por la enzima D-hidatoínasa. Posteriormente, la hidrólisis del D-N-carbamil aminoácido producido es llegada a cabo per la enzima estereoespecífica estricta N-carbamil-D-aminoácido amidohidrolasa (D-carbamilasa). En esta reacción se produce NH3, CO2 y el D-aminoácido correspondiente. Puesto que el sustrato de partida (hidantoína D,L-5-monosustituida) es una mezcla racémica y la transformación es enantioselectiva, el rendimiento de esta reacción para la mayoría de los sustratos es del 50% como máximo. La única aplicación industrial rentable económicamente es la que utiliza D-fenilhidantoína y D-5-para-hidroxi-fenilhidantoína ya que son hidantoínas con una velocidad de racemización espontanea razonablemente rápida (Bommarius, A.S., y col. (1992) nato asi Ser., Ser. C, 381, 161-174. Pietzsch, M. and Syldatk, C. (2002) Enzyme catalysis in organic synthesis. Drauz, K., Waldmann, H., Eds.; Wiley-VCH, Weinheim, 761-799).

Las restricciones a la racemización espontanea de la mayoría de hidantoínas D,L-5-monosustituidas limitan su uso industrial, a pesar del valor económico de sus derivados. Pero estos compuestos pueden ser racemizados rápida y eficientemente por la acción catalítica de la enzima hidantoín racemasa. De tal forma que, la utilización conjunta de esta enzima, la D-hidatoinasa y la D-carbamilasa, permite la transformación total del sustrato, hidantoína D,L-5-monosustituida, en producto, D-aminoácido. Solo dos hidantoín racemasas se han estudiado a nivel bioquímico

evaluándose su aplicación a la síntesis de L-aminoácidos. (Watabe, K. y col. (1992) J. Bacteriol. 74, 798q-7995. Wiese, A. y col. (2000) J. Biotechnol., 80, 217-230. Wilms, B. y col. (2001) J. Biotechnol., 86, 19-39).

Los documentos de patente: EP-199.943, EP-309.310, U.S. Pat. No. 4,312,948, ES 2 150 452, describen procedimientos para la obtención de L ó D-aminoácidos por hidrólisis enzimática de hidantoínas D,L-5-monosustituidas, en las cuales las enzimas forman parte del equipo natural de biocatalizadores de microorganismos aislados de medios silvestres. Estos procedimientos presentan dos inconvenientes principales: a) solo son aplicables a hidantoínas D,L-5-monosustituidas que racemicen espontáneamente, por la falta de actividad hidantoín racemasa, y b) baja producción de las enzimas necesarias, dado que están sometidas a sistemas de control de la expresión genética que son desconocidos y por tanto impredecibles.

Para superar este problema los genes de las enzimas implicadas han sido aislados, clonados y expresados. La patente WO9620275, presenta la hidrólisis de D-hidantoínas por una enzima D-hidatoinasa de microorganismos pertenecientes a los genéros Bacillus, Agrobacterium o Pseudomonas, que está producida en *E. coli*. El documento EP-643.133, se refiere al uso de una D-hidatoinasa recombinante que posee una fuerte termorresistencia. En EP-739.978, se describe la síntesis de N-carbamil-D-aminoácidos por una D-hidatoinasa estable a pH alcalino. Ninguno de estos procedimientos tiene aplicación industrial por si solo, ya que carecen de la enzima con actividad D-carbamilasa que permite la producción de D-aminoácidos. El mismo problema se plantea en el documento ES 2 159 527, en el que solo se incluye en el organismo recombinante productor a la D-carbamilasa, siendo necesario empezar la síntesis de D-aminoácidos desde D-carbamil-aminoácidos, lo que es económicamente inviable.

Otros procedimientos posteriores han incluido la actividad de las enzimas codificadas por los genes de la D-hidatoinasa y la D-carbamilasa. Concretamente la patente WO 94/00577 describe la producción de D-aminoácidos desde hidantoínas D,L-5-monosustituidas por producción de D-hidatoínasa y D-carbamilasa en *E. coli* y en células del propio género Agrobacterium. Esta estrategia permite incrementar la cantidad soluble de estas proteínas y controlar su producción mediante la inducción de los promotores de los vectores recombinantes utilizados. En la patente WO9600296 se da un paso adelante en la técnica al inmovilizar las dos proteínas en una columna de tipo cromatográfico. Esta novedad es de gran aplicación industrial, al facilitar la purificación del enantiomero D, pero no resuelve la imposibilidad de superar un 50% de rendimiento cuando se utilicen mezclas racémicas de hidantoínas que no racemicen espontáneamente.

Los sistemas recombinantes descritos arriba tienen una serie de desventajas entre las que se pueden destacar el incremento en los costes de producción, una cierta variabilidad en los rendimientos de producción de las enzimas y que los adecuados niveles de expresión en la mayoría de los microorganismos son alcanzados en unas condiciones de inducción del promotor que no son viables económicamente desde el punto de vista industrial (Syldatk y col. (1987), Biotechnol. Lett., 9, 25-30). Una de las posibles estrategias para la solución de algunos de estos problemas se documenta en la patente U.S. No. 5,834,258. En ella se describe la construcción y uso de un sistema recombinante en el que los genes D-hidatoinasa y D-carbamilasa de Agrobacterium están clonados en tandem en el mismo vector y controlados por un promotor constitutivo. De esta forma se evita la necesidad de añadir inductores durante la fermentación y las dos enzimas se producen en proporción estable en un mismo compartimento celular. Como en los casos anteriores este sistema no incluye el gen de la hidantoín racemasa, por lo que no puede ser aplicado a sustratos no racemizables espontáneamente.

Las hidantoinas D,L-5-sustituidas no racemizables espontáneamente tienen un fuerte potencial de aplicación industrial, puesto que permitirán obtener nuevos productos derivados de estas hidantoinas. La limitación para la producción de esta nueva línea de productos con aplicación farmacológica es la carencia de sistemas de síntesis que comprendan las tres enzimas necesarias: hidantoína racemasa, D-hidatoínasa y D-carbamilasa.

La patente WO 01/23582 describe la construcción y uso de células de *E. coli* capaces de degradar hidantoinas D,L-5-monosustituidas hasta sus correspondientes aminoácidos de forma completa. Pero no hace referencia al enantiómero producido. Las células construidas son portadoras de los genes de la hidantoína racemasa, L-hidatoínasa y L-carbamilasa de *Arthrobacter aurescens* DSM 3747. Las dos últimas enzimas están descritas en la propia patente WO 01/23582 y en los documentos Wilms B. y col. (2001), J. Biotechnol. 86, 19-30 y Wiese A. y col. (2001), Arch. Microbiol., 176, 187-196, como L- específicas y L-estereoselectivas. Esto significa, que la D,L-isopropil-5-hidatoína utilizada en los ejemplos de aplicación de esa patente es transformada selectivamente en L-triptófano con un rendimiento del 100%, pero este sistema no puede producir en ningún caso D-aminoácidos, porque no contiene enzimas que reconozcan como sustratos específicos a las hidantoínas D-5-monosustituidas. Esta es la gran diferencia con la invención que aquí se presenta, ya que este nuevo sistema es el primero diseñado para producir selectiva y únicamente D-aminoácidos a partir de mezclas racémicas de D,L-hidantoínas. Recientemente se ha comunicado la construcción de un sistema de producción de D-aminoácidos, compuesto por dos plásmidos portadores de una D-hidantoinasa y D-carbamilasa de Flavobacterium en uno, y una hidantoín racemasa de Microbacterium en otro (Nozaki y col. (2005), J. Molecular Catalysis, 32, 231-218). En este sistema los dos plásmidos van en la misma célula, con la consiguiente necesidad de utilizar dos antibióticos para mantener las células transformadas, además las enzimas utilizadas son de un origen diferente a las utilizadas en esta patente. Este aspecto es importante porque la actividad de este sistema es muy baja, en el documento antes mencionado, no se demuestra su utilidad en la transformación de D,L-hidantoínas que no posean una racemización rápida y los genes de las enzimas están en dos plásmidos diferentes. Por lo que su aplicabilidad industrial es muy limitada.

En el documento Martínez-Rodríguez y col. (2002) Biotechnol. Prog. 18, 1201-1206, se describe la utilización de un procedimiento de síntesis de D-aminoácidos a partir de mezclas racémicas de D,L-hidantoínas con alto nivel de rendimiento y velocidad de reacción. Este sistema está compuesto por tres tipos de células que independientemente expresan una de las tres enzimas implicadas en el proceso y que puede también actuar sobre hidantoínas con muy baja velocidad de racemización. La limitación de este sistema esta en la necesidad de cultivar tres tipos celulares distintos para disponer de las tres enzimas necesarias, además el transporte de los intermediarios metabólicos del proceso biosintético condiciona su rendimiento final.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un sistema enzimático de utilidad en la preparación selectiva y exclusiva de D-aminoácidos o derivados de los mismos a partir de mezclas racémicas de D,L-hidantoínas 5-monosustituidas, caracterizado por estar constituido por las enzimas hidantoína racemasa, D-hidatoinasa y D-carbamilasa. Los genes de dichas enzimas están insertados en la misma molécula Plasmídica y clonados en células de *E. coli.*

Además, según la invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de dicho sistema enzimático por sobre-expresión genética en microorganismos transformados con los genes de hidantoína racemasa, D-hidatoinasasa y D-carbamilasa, que comprende la construcción de una factoría celular de *E. coli* portadora de D-hidatoinasa, D-carbamilasa de *Agrobacterium tumefaciens* BQL9 e hidantoína racemasa de *Agrobacterium tumefaciens* C58; clonación de los genes de los mismos en el mismo plásmido,denominado pSER42, constituyendo un policistrón controlado por las mismas señales de transcripción; expresión de estos genes de forma simultanea dentro de la misma factoría celular; y optimización de los parámetros cinéticos apropiados de un sistema enzimático capaz de transformar todas las moléculas de una mezcla racémica de hidantoinas D,L-5-monosustituidas en su correspondiente D-aminoácido.

En resumen, el procedimiento de este último aspecto de la invención para la producción de D-aminoácidos, se caracteriza porque el sustrato de la reacción es una mezcla racémica de hidantoína D,L-5-monosustituida, el catalizador es un sistema enzimático en el que las enzimas son producidas en factorías celulares de microorganismos portadores de plásmidos recombinantes que incluyen los genes de las mismas, dichos genes (hidantoína racemasa, D-hidatoinasa y D-carbamilasa) están clonados en la misma célula y deben ser inducidos con IPTG en condiciones específicas, la transformación de la mezcla racémica sustrato es completa obteniéndose una preparación del D-aminoácido puro.

A continuación se detallan los diferentes aspectos de la invención.

Las hidantoinas D,L-5-sustituidas sobre las que tiene aplicación preferente esta invención son las que presentan una baja o nula racemización química espontánea. Como se ha comentado antes son precisamente la mayoría de ellas y preferentemente las que no tienen grupos aromáticos en la posición 5. Aplicando esta invención con todas ellas se obtienen velocidades de transformación total menores de dos horas.

Un aspecto importante de esta invención es que los genes de las D-estereoselectivas D-hidatoinasa y D-carbamilasa fueron clonados como productos de la reacción en cadena de la polimerasa. El DNA fuente fue extraído de la cepa BQL9 de *Agrobacterium tumefaciens*, para el caso de la D-hidantoinasa y la D-carbamilasa (Clemente y col. (2003) Biotechnol. Lett. 25, 1067-1073). La hidantoín racemasa fue clonada de la cepa C58 de *A. tumefaciens* (Las Heras-Vázquez y col. (2003) Biochem. Biophhys. Res. Commun. 303, 541-547.

Un aspecto de la mayor importancia de la presente invención es la construcción de una célula de *E. coli* portadora de una secuencia de DNA codificante de una proteína con actividad hidantoín racemasa. La posible presencia de un gen codificante de hidantoín racemasa en el genoma de *Agrobacterium tumefaciens* C58 ha sido comunicada en los documentos Goodner, B. y col. (2001) Science, 294,2323-2328, y Wood, D.W., y col., (2001) Sience, 294, 2317-2323. La hipotética secuencia codificante de la hidantoín racemasa está depositada en el GenBank con el número de acceso NC003063 y NC003305. En el desarrollo de esta patente se obtuvieron, por vez primera, datos experimentales de que esta secuencia efectivamente codifica una proteína con actividad hidantoín racemasa. Y esta patente es el primer documento en el que se demuestra la función hidantoín racemasa de estas secuencias nucleotídicas.

Otro aspecto de esta invención es que las tres enzimas que constituyen la nueva ruta biosintética están clonados en el mismo tipo de vector plasmídico. Por tanto, en los tres casos la inducción de la expresión genética se produce con IPTG, ya que el promotor utilizado es derivado del operón lac. Igualmente los tres están introducidos en células BL21 de *E. coli*, lo que permite la manipulación y crecimiento de los microorganismos por las mismas técnicas.

Todos los procedimientos de construcción y manipulación de las moléculas recombinantes fueron extraídos y optimizados de Sambrook, J. Y col. (1989) Molecular clonig: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

El sistema enzimático de la presente invención puede ser obtenido por cultivo de células de *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pSER42. El cultivo de las células debe realizarse en condiciones aeróbicas, con al menos una fuente asimilable de carbono y nitrógeno así como varios tipos de aniones y cationes. Opcionalmente pueden usarse vitaminas tales como biotina y tiamina o aminoácidos. En general puede usarse preferentemente el medio de cultivo LB (Luria-Bertani) o una modificación de éste. El medio de cultivo debe estar suplementado con una cantidad

adecuada de ampicilina, preferentemente 50-100 mL. En orden a la utilización de esta invención, debe realizarse un precultivo para sembrar con mayor rendimiento un fermentador del volumen apropiado.

La fermentación es llevada a cabo en estrictas condiciones aeróbicas a una temperatura de 26-30ºC y un pH de 7.0 y 7.8. Una vez que el cultivo ha alcanzado una densidad de población correspondiente a una turbidez de 0.4 y 0.6 unidades de densidad óptica se puede iniciar la fase de inducción de la expresión. Se añade al fermentador IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactósido) hasta una concentración comprendida entre 0.1 y 0.2 mM y se 3 prolonga la fermentación entre 3 y 4 horas.

Para el desarrollo óptimo de esta invención las factorías celulares deben ser concentradas y lavadas por un procedimiento clásico de concentración celular, preferentemente la centrifugación a un máximo de 7000 g a 4ºC durante 10 minutos. La biomasa, así obtenida, puede ser congelada y guardada hasta su utilización. Esta biomasa enriquecida en enzimas se resuspende en fosfato potásico 100 mM pH 8 hasta una D.O. de 10. El tiempo de reacción es otro parámetro que debe ser optimizado para cada hidantoína D,L-5-sustituida. De manera general todas las hidantoinas D,L-5-monosustituidas con grupos no aromáticos, y que por tanto, no racemizan espontáneamente son los sustratos ideales de este sistema. Todas las hidantoinas de aminoácidos naturales son convertidas, en estas condiciones, en sus correspondientes D-aminoácidos en menos de 2 horas. Con un rendimiento del 100%.

Los D-aminoácidos preparados por el procedimiento de la presente invención pueden ser purificados desde el medio de reacción mediante medios convencionales del tipo de la cromatografía de intercambio iónico o precipitación en su punto isoeléctrico.

Breve descripción de los dibujos

A continuación se pasa a describir de manera breve un modo de realización de la invención, como ejemplo ilustrativo y no limitativo de ésta. Para una mejor comprensión del modo de realización, se incluyen las siguientes figuras:

Figura 1: Plásmido de transformación y expresión en *E. coli*, portador de los genes de la hidantoín racemasa, D-carbamilasa e hidantoinasa, bajo el promotor del operón de la lactosa.

Figura 2: Tiempo de conversión y rendimiento de la misma (50%) de D,L-metiltioetilhidantoína en D-metionina. En presencia de un sistema de expresión compuesto solo por D-hidantoinasa y D-carbamilasa.

Figura 3: Tiempo de conversión y rendimiento de la misma (100%) de D,L-metiltioetilhidantoína en D-metionina. En presencia del sistema basado en el plásmido pSER42, que incluye los genes de la hidantoín racemasa, D-carbamilasa y D-hidantoinasa.

Figura 4: Determinación del intervalo óptimo de pH para la reacción en la factoría celular de conversión de D,L-metiltioetilhidantoína en D-metionina, usando el sistema pSER42 de esta invención.

Figura 5: Determinación del intervalo óptimo de temperatura para la reacción en la factoría celular, construida en esta invención de D-L-metiltioetilhidantoína en D-metionina. Obviamente utilizando la expresión de los genes contenidos en pSER42.

Figura 6: Ejemplo de Actividad Específica en la síntesis de varios D-aminoácidos a partir de sus correspondientes D,L-hidantoinas momosustituidas. El proceso se desarrolló como se describe en la utilización preferente de la invención, utilizando factorías celulares constituidas en esta invención con el vector de expresión pSER42.

Descripción de una realización preferida

La producción de masa enzimática que actúa como catalizador en esta invención, es obtenida por factorías celulares portadoras del plásmido policistrónico pSER42. Estas células deben ser cultivadas en un medio constituido por una fuente de carbono y nitrógeno que puede ser preferentemente un hidrolizado de aminoácidos en una cantidad de 10 gr/L, extracto de levadura 5 gr/L y NaCl 5 gr/L. Se preparan precultivos de volúmenes crecientes que son utilizados para sembrar cultivos de volumen cada vez mayor, dependiendo del escalado industrial correspondiente al nivel de producción deseado. Todos los cultivos se desarrollan en condiciones aeróbicas, 28ºC y a pH 7.0. El inicio de la inducción debe producirse una vez que la fermentación llega a un nivel de población equivalente a 0.4 unidades de densidad óptica. En estas condiciones las células pueden ser recolectadas y lavadas por centrifugación, preferentemente a 7000 g, 4ºC durante 10 minutos. Los sedimentos obtenidos deben ser congelados a -20ºC para su posterior utilización.

El desarrollo de la conversión de hidantoínas D,L-5-sustituidas se inicia con la resuspensión de las células transformadas en un medio con fosfato potásico 100 mM pH8, hasta una D.O. de 10 y la adición del sustrato (mezcla racémica de hidantoínas D,L-5-monosustituidas) correspondiente, según la necesidad industrial. Dos parámetros que deben ser tenidos en cuenta para una eficiente conversión de mezclas racémicas de hidantoínas D,L-5-monosustituidas en D-aminoácidos son la afinidad del sistema enzimático por cada sustrato específico y la solubilidad de éste en el medio acuoso utilizado como medio de reacción. Por tanto, ambos parámetros han de ser puestos a punto para cada D-aminoácido que quiera obtenerse. Esta optimización se consigue ajustando las cantidades relativas en peso de mezcla enzimática y sustrato. Para las hidantoínas D,L-5-monosustituidas cuyo substituyente es una cadena de un aminoácido natural, esta

relación varia entre 1:10 y 1:50. Las hidantoínas D,L-5-monosustituidas deben estar disueltas, hasta saturación, en un medio acuoso compuesto por sales de fosfato, carbonato, etc., y ajustadas a un pH de 8. Una vez mezcladas en un recipiente con el diseño adecuado a la planta industrial específica, la mezcla enzimática y la disolución de hidantoína D,L-5-monosustituida, se deja reaccionar a 50ºC, durante 2 horas para los sustratos más solubles y 4 horas para los sustratos más insolubles. Las factorías celulares con los genes correspondientes inducidos y la ruta biosintética de interés activada puede estar compuesta por células completas, también es posible utilizar células permeabilizadas con un detergente o alcohol o células rotas por homogeneización.

Este procedimiento de conversión es especialmente útil para hidantoínas D,L-5-monosustituidas que no racemizan espontáneamente o que lo hacen a una velocidad baja. Por tanto, no es necesario considerar, en la aplicación industrial de esta invención, la velocidad de racemización del sustrato, ya que no es un factor limitante de la reacción. Esta es una ventaja importante respecto a los otros sistemas de síntesis de D-aminoácidos descritos. Ya que permite una simplificación técnica y una disminución de costes que convierten al sistema descrito en esta patente en el más versátil, eficiente y económico.

Por este sistema, la mezcla racémica de cualquier hidantoína D,L-5-monosustituida es convertida con un rendimiento del 100% en su correspondiente D-aminoácido. Esto reduce los costes de purificación de estos productos al evitar la necesidad de separar las enantiómeros producidos por otros sistemas. Así los D-aminoácidos pueden ser purificados por un procedimiento simple de cromatografía de intercambio iónico, por precipitación en su punto isoeléctrico o cualquier otro procedimiento industrialmente viable.

Las grandes ventajas de la presente invención respecto a los otros sistemas existentes son:

a) Es aplicable a hidantoínas D,L-5-monosustituidas que no racemizan espontáneamente o que lo hacen a velocidad mayor a 30 minutos. A este grupo pertenecen todas menos las que poseen un grupo aromático en posición 5.

b) Permite la modificación del rendimiento de cada una de las tres reacciones que componen la ruta biosintética de D-aminoácidos desde hidantoínas D,L-5-monosustituidas. Ya que se puede alterar la cantidad de hidantoín racemasa, D-hidatoinasa y D-carbamilasa que forman parte de la mezcla enzimática por alteración del orden de clonación en el vector. Puesto que la cantidad de enzima fabricada será mayor cuanto menor sea la distancia al promotor.

c) La mezcla racémica de hidantoína D,L-5-monosustituida es convertida completamente en su correspondiente D-5 aminoácido con un rendimiento del 100%.

d) El producto final está completamente puro, no siendo necesario un proceso ulterior de separación de enantiómeros.

e) El proceso puede ser escalado fácilmente a nivel industrial o desarrollado en una columna de células inmovilizadas.

f) Los productos intermediarios de la ruta biosintética no deben ser transportadas a diferentes células. Es decir, todo el proceso se realiza en la misma célula.

Los siguientes ejemplos experimentales proporcionan una buena ilustración de la presente invención pero no limitan su aplicación de ninguna manera.

Ejemplo 1

Construcción del vector de expresión pSER42, portador de los genes de la D-hidantoinasa, D-carbamilasa e hidantoín racemasa

El gen de la hidantoín racemasa fue clonado como producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como molde el DNA de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Los oligonucleótidos cebadores de la reacción fueron diseñados a partir de la secuencia depositada en el Genebank con número de accesión AY436503. El cebador de 5' fue 5'-AACTGCAGGCAGGAAAGCTATTATGCGTGCGATGCAT-3'. Este cebador dispone de un sitio de corte para la enzima de restricción PstI, un sitio de unión a ribosomas, propio de *E. coli* y un codón de inicio de la traducción. Por otra parte el cebador de 3' fue 5' -GCCCTCGAGTTAGGCGCAGGCGA-3', diseñado con un sitio de corte para la enzima XhoI y un codón de parada para la traducción. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400 programado como sigue: desnaturalización inicial a 94ºC durante 5 min., después cada ciclo estuvo compuesto por 30 sec. A 94ºC para la desnaturalización, 30 sec. A 57ºC para el acoplamiento de los cebadores y 1 min. A 72ºC para la síntesis. Después de 35 ciclos se realizó un paso de síntesis final de 5 min. a 72ºC. El producto de PCR fue purificado desde un gel de agarosa usando un preparado QIAquick de Qiagen y siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de PCR, una vez purificado, fue cortado en sus extremos por las enzimas PstI y XhoI, dando lugar a extremos cohesivos que permitieron su inserción en el plásmido pBluescrip II SK(+), el cual había sido abierto con las mismas enzimas, dando lugar la plásmido pSER14. Después del ligamiento, el vector con el inserto (gen de la

hidantoín racemasa) fue clonado en células de *E. Coli* DH5α. La secuencia del inserto fue verificada por secuenciación automática con dideoxinucleótidos en un Applied Biosystems ABI 377.

El gen de la D-carbamilasa fue insertado y clonado en pSER14 por un procedimiento básicamente igual al descrito para el gen de la hidantoín racemasa. Se amplificó mediante PCR utilizando como DNA molde el genoma de *Agrbacterium tumefaciens* BQL9. Los oligonucleótidos cebadores fueron diseñados a partir de la secuencia depositada en el GenBank con el número de accesión X91070. El cebador de 5' fue 5' -GCTCTAGAGTGACAGGAAAGCTTTATGAC ACGTCAGATGATACTTGC-3' y contiene un sitio de corte para la enzima XbaI, el correspondiente sitio de unión a ribosomas de *E. coli* y un codón de parada para la traducción. El cebador de 3' fue 5'-TTCTGCAGTTAGAATTCCGC-GATCAGACCG-3' y contiene un sitio de corte para la enzima PstI y un codón de terminación de la traducción. El producto de PCR y el Plásmido pSER14 fueron cortados con las enzimas XhoI y PstI permitiendo, así, la inserción del gen de la D-carbamilasa en posición 5' del gen de la hidantoín racemasa. El plásmido resultante, portador de ambos genes, se denominó pSER15 y permitió el clonado de los mismos en células de *E. Coli* DH5α.

El gen de la D-hidantoinasa fue insertado y clonada en pSER15 por una metodología básicamente idéntica a la utilizada para los genes anteriores. El DNA molde para la reacción fue el correspondiente a el Plásmido pSBH1, construido previamente en Clemente-Jiménez y col. (2003) Biotechnol. Lett. 25, 1067-1073. Este plásmido contiene el gen de la D-hidantoinasa de *A. tumefaciens* BQL9 y también fue utilizado para el diseño de Los cebadores de la amplificación. El cebador de 5' fue 5' -AACTCGAGGCAGGAAAGCTTTATGGATATCATCATC-3', portador de un sitio de corte para la enzima XhoI, un sitio de unión a ribosomas reconocible por *E. Coli* y un codón de inicio de la traducción. El cebador de 3' fue 5' -AAGGTACCTTATTGCTTGTATTTGCGGCG-3', portador de un sitio de corte para la enzima KpnI y un codón de parada para la traduccción. El producto de PCR, después de purificado por electroforesis en agarosa y el vector pSER15 fueron cortados por las enzimas XhoI y KpnI, lo cual permitió insertar el gen de la D-hidantoinasa en posición 3' del gen de la hidantoín racemasa, dando lugar al plásmido pSER42 (Figura 1). Este plásmido fue utilizado para su clonación en *E. coli* DH5α.

Ejemplo 2

Conversión de D,L-5-(2-metiltioetil)-hidantoína en D-metionina por actividad D-hidatoinasa y D-carbamilasa

Se transformaron células de *E. Coli* BL21 con el plásmido pSER11, construido en nuestro laboratorio de forma que expresa el gen de la D-hidantoinasa de *A. tumefaciens* BQL9. Igualmente se transformaron células de *E. Coli* BL21 con el plásmido pJMC38 que porta y expresa el gen de la D-carbamilasa de *A. Tumefaciens* BQL9. Las construcciones BL21 pSER11 y BL21 pJMC38 contienen actividad D-hidantoinasa y D-carbamilasa respectivamente y fueron crecidas, independientemente, en medio LB sólido suplementado con 100 μg/mL de ampicilina a 37ºC durante 12 horas. Una colonia individual, de cada tipo celular, fue utilizada para sembrar 10 mL de LB líquido con la misma concentración de ampicilina. Este cultivo fue incubado a 37ºC durante 12 horas con fuerte agitación. 1 mL de este cultivo se utilizó para sembrar 100 mL de LB fresco con ampicilina. Después de 2 horas de incubación en agitación a 37ºC se llegó a una DO600 del cultivo de 0.3 á 0.5. En este momento se inició la inducción de la expresión de los genes clonados: D-hidatoinasa en el caso de BL21 pSER11 y D-carbamilasa en el caso de BL21 pJMC38. Se añadió IPTG hasta una concentración de 0.2 mM y el cultivo fue continuado a 28ºC durante 4 horas. Para la producción correcta de D-hidatoinasa se añadió MnCl2 a una concentración de 2 mM. Las células fueron recogidas por centrifugación a 7000 g a 4ºC durante 10 minutos. Los sedimentos fueron congelados a -20ºC hasta el momento de su uso.

Para la realización de la reacción de conversión de D,L-5-(2-metiltioetil)-hidatoína, un sedimento de cada tipo de enzima fue descongelado y resuspendido en fosfato potásico 100 mM pH 8, hasta una DO600 de 10. 100 μL de cada tipo celular fueron mezclados con 200 μL de una disolución 15 mM de D,L-5-(2-metiltioetil)-hidatoína en el mismo amortiguador. La mezcla se dejó reaccionar a 50ºC durante 300 minutos. A cada periodo regular de tiempo se tomó una alícuota en la que la reacción fue detenida con un volumen equivalente de HCl 1 M. Estas muestras fueron centrifugadas y la cantidad de D,L-5-(2-metiltioetil)-hidantoína, carbamil D-metionina y D-metionina fue analizada por HPLC (Breeze HPLC System, Waters, equipado con una columna Symmetry C18 4.6 x 150 nm Waters). La fase móvil utilizada, 20 mM de ácido fosfórico pH 3 (85%) y metanol (15%), fue bombeada a un flujo de 0.75 mL/min. El detector UV a 210 nm permitió cuantificar la evolución de cada compuesto a lo largo del tiempo de reacción. Los resultados se representan en la figura 2. Como puede verse, el sistema D-hidatoínasa, D-carbamilasa convierte solo el 50% de la D,L-5-(2-metiltioetil)-hidantoína en D-metionina en 200 minutos, pero a partir de ese tiempo no se produce nueva formación de D-aminoácido. Esto significa que la mitad del sustrato, el enantiómero L-5-(2-metiltioetil)-hidatoína, queda sin transformar. Esto ocurre porque la D,L-5-(2-metiltioetil)-hidatoína no tiene racemización química espontánea. El rendimiento máximo de esta reacción es del 50% y es el mismo que pueden alcanzar los procedimientos antes descritos para la síntesis de D-aminoácidos a partir de hidantoínas D,L-5-monosustituidas que no racemizan espontáneamente y que no utilizan hidantoín racemasa.

Ejemplo 3

Conversión de D,L-5-(2-metiltioetil)-hidantoína en D-metionina por el empleo del vector pSER42 y por tanto con actividad hidantoín racemasa, D-hidatoinasa y D-carbamilasa

La ruta enzimática para la reacción se obtuvo a partir de células portadoras del vector pSER42, estas fueron resuspendidas en un amortiguador de pH constituido por borato-ClH 100 mM (pH 8), hasta una densidad celular de 1 g/mL. El proceso de conversión de D,L-5-(2-metiltioetil)-hidantoína en D-metionina y el análisis de los productos de la misma se efectuó como se explica en el ejemplo 2. El seguimiento de la conversión a lo largo del tiempo esta sumarizado en la figura 3. Estos resultados demuestran que, en la presencia de la hidantoín racemasa, toda la mezcla racémica de D,L-5-(2-metiltioetil)-hidantoína es convertida en D-metionina en un tiempo de 150 minutos, con lo que la reacción puede darse por finalizada. El rendimiento, por tanto, de está conversión es del 100%, mejorando en un 50% el de los otros procedimientos y realizando la misma a una velocidad compatible con las necesidades de los procesos industriales.

Ejemplo 4

Optimización de las condiciones de reacción para la producción de D-aminoácidos

Se obtuvieron los valores de pH y temperatura de reacción para la síntesis de D-metionina a partir de su correspondiente D,L-5-monosustituida hidantoina. Para determinar el pH óptimo de reacción se prepararon células portadoras de pSER42 y se determinó su actividad como se explica en el ejemplo 3, pero se realizaron diferentes determinaciones a diferentes pHs. Los medios de reacción cambiaron de pH en un rango de 6 á 10.5; para ello se prepararon tres amortiguadores, el primero fue fosfato potásico 200 mM para el intervalo de 6 á 8, el segundo fue borato-HCl 100 mM para el intervalo de 8 á 9 y el tercero fue borato-NaOH para el intervalo de 9 á 10.5. La síntesis de D-metionina varió a lo largo de este rango de pHs como se indica en la figura 4, presentando un máximo de actividad en el intervalo preferente de pH de 8.8 á 9.7. Por otro lado, se determinó la temperatura óptima de trabajo. La Producción de D-metionina fue medida como en el ejemplo 2, pero a diferentes temperaturas; como se demuestra en la figura 5 la temperatura optima para la síntesis es de 55ºC, ya que el 100% de la D,L-5-monosubstituida hidantoína se transforma en menos de 100 minutos.

Ejemplo 5

Producción de D-Triptófano a partir de una mezcla racémica de D,L-5-indolil-metil-hidantoína

De acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el ejemplo 2, se incubaron, durante 10 minutos, células inducidas y portadoras de pSER42 con la D,L-5-monosustituida hidantoína de triptófano 15 mM. Terminada la reacción se calculó la Actividad Específica del sistema de producción y los datos se incluyen en la figura 6. El rendimiento de producción demuestra la capacidad de las enzimas codificadas en pSER42 y de las células que las producen para sintetizar D-triptófano puro. Igualmente el sistema puede ser escalado hasta adaptarlo a las necesidades industriales específicas.

Ejemplo 6

Producción de D-Tiroxina a partir de una mezcla racémica de D,L-5-p-hidroxi-benzil-hidantoína

De acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el ejemplo 2, se incubaron, durante 10 minutos, células inducidas y portadoras de pSER42 con la D,L-5-monosustituida hidantoína de tiroxina 15 mM. Terminada la reacción se calculó la Actividad Específica del sistema de producción y los datos se incluyen en la figura 6. El rendimiento de producción demuestra la capacidad de las enzimas codificadas en pSER42 y de las células que las producen para sintetizar D-tiroxina pura. Igualmente el sistema puede ser escalado hasta adaptarlo a las necesidades industriales específicas.

Ejemplo 7

Producción de D-Valina a partir de una mezcla racémica de D,L-5-isopropil-hidantoína

De acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el ejemplo 2, se incubaron, durante 10 minutos, células inducidas y portadoras de pSER42 con la D,L-5-monosustituida hidantoína de Valina 15 mM. Terminada la reacción se calculó la Actividad Específica del sistema de producción y los datos se incluyen en la figura 6. El rendimiento de producción demuestra la capacidad de las enzimas codificadas en pSER42 y de las células que las producen para sintetizar D-Valina pura. Igualmente el sistema puede ser escalado hasta adaptarlo a las necesidades industriales específicas.

Ejemplo 8

Producción de D-Ácido amino butírico a partir de una mezcla racémica de su correspondiente D,L-5-etil-hidantoína

De acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el ejemplo 2, se incubaron, durante 10 minutos, células inducidas y portadoras de pSER42 con la D,L-5-monosustituida hidantoína de ABA 15 mM. Terminada la reacción se calculó la Actividad Específica del sistema de producción y los datos se incluyen en la figura 6. El rendimiento de producción demuestra la capacidad de las enzimas codificadas en pSER42 y de las células que las producen para sintetizar D-ABA pura. Igualmente el sistema puede ser escalado hasta adaptarlo a las necesidades industriales específicas.

Ejemplo 9

Producción de D-Fenil alanina partir de una mezcla racémica de D,L-5-benzil-hidantoína

De acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el ejemplo 2, se incubaron, durante 10 minutos, células inducidas y portadoras de pSER42 con la D,L-5-monosustituida hidantoína de PA 15 mM. Terminada la reacción se calculó la Actividad Específica del sistema de producción y los datos se incluyen en la figura 6. El rendimiento de producción demuestra la capacidad de las enzimas codificadas en pSER42 y de las células que las producen para sintetizar D-PA puro. Igualmente el sistema puede ser escalado hasta adaptarlo a las necesidades industriales específicas.

Ejemplo 10

Producción de D-Norvalina a partir de una mezcla racémica de D,L-5-propil-hidantoína

De acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el ejemplo 2, se incubaron, durante 10 minutos, células inducidas y portadoras de pSER42 con la D,L-5- monosustituida hidantoína de Norvalina 15 mM. Terminada la reacción se calculó la Actividad Específica del sistema de producción y los datos se incluyen en la figura 6. El rendimiento de producción demuestra la capacidad de las enzimas codificadas en pSER42 y de las células que las producen para sintetizar D-Norvalina pura. Igualmente el sistema puede ser escalado hasta adaptarlo a las necesidades industriales específicas.

Ejemplo 11

Producción de D-Norleucina a partir de una mezcla racémica de D,L-5-butil-hidantoína

De acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el ejemplo 2, se incubaron, durante 10 minutos, células inducidas y portadoras de pSER42 con la D,L-5- monosustituida hidantoína de Norleucina 15 mM. Terminada la reacción se calculó la Actividad Específica del sistema de producción y los datos se incluyen en la figura 6. El rendimiento de producción demuestra la capacidad de las enzimas codificadas en pSER42 y de las células que las producen para sintetizar D-Norleucina pura. Igualmente el sistema puede ser escalado hasta adaptarlo a las necesidades industriales específicas.

Ejemplo 12

Producción de D-Metionina a partir de una mezcla racémica de D,L-5-(2-metiltioetil)-hidantoína

De acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el ejemplo 2, se incubaron, durante 10 minutos, células inducidas y portadoras de pSER42 con la D,L-5-monosustituida hidantoína de Metionina 15 mM. Terminada la reacción se calculó la Actividad Específica del sistema de producción y los datos se incluyen en la figura 6. El rendimiento de producción demuestra la capacidad de las enzimas codificadas en pSER42 y de las células que las producen para sintetizar D-Metionina pura. Igualmente el sistema puede ser escalado hasta adaptarlo a las necesidades industriales específicas.

Ejemplo 13

Producción de D-Leucina a partir de una mezcla racémica de D,L-5-isobutil-hidantoína

De acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el ejemplo 2, se incubaron, durante 10 minutos, células inducidas y portadoras de pSER42 con la D,L-5-monosustituida hidantoína de Leucina 15 mM. Terminada la reacción se calculó la Actividad Específica del sistema de producción y los datos se incluyen en la figura 6. El rendimiento de producción demuestra la capacidad de las enzimas codificadas en pSER42 y de las células que las producen para sintetizar D-Leucina pura. Igualmente el sistema puede ser escalado hasta adaptarlo a las necesidades industriales específicas.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de coexpresión enzimática **caracterizado** por una molécula plasmídica portadora que comprende al menos tres secuencias nucleotídicas, controladas por el promotor Lac y la transcripción y la traducción por células de *E. Coli*.

2. Sistema de coexpresión enzimática según reivindicación 1 donde las secuencias nucleotídicas están codificadas por la enzima D-hidantoinasa de *Agrobacterium tumefaciens* BQL9, D-carbamilasa de *Agobacterium tumefaciens* BQL9 y la enzima hidantoín racemasa de *Agrobacterium tumefaciens* C58.

3. Sistema de coexpresión enzimática según reivindicación 1 y 2 denominado pSER42, **caracterizado** por estar compuesto por un plásmido de transformación y expresión en *E. coli*, que contiene entre la zona promotora del operon Lac y la zona terminadora, en primer lugar el gen D-carbamilasa, seguido por el gen hidantoín racemasa y por ultimo por el gen hidantoinasa. Cada gen comienza con un inicio de la traducción (ATG) y finaliza con un triplete de parada de la traducción (TAA). Corriente arriba de cada gen existe un sitio de unión a ribosomas, que dista 10 nucleótidos del ATG de inicio de la traducción. Los tres genes se transcriben como un ARN mensajero policistrónico.

4. Procedimiento para la preparación del sistema de coexpresión enzimática según reivindicación 1-3 por sobre-expresión genética en microorganismos transformados con los genes de hidantoína racemasa, D-hidantoinasa y D-carbamilasa, **caracterizado** porque comprende las etapas de construcción de una factoría celular de *E. coli* portadora de D-hidantoinasa y D-carbamilasa de *Agrobacterium tumefaciens* BQL9 e hidantoín racemasa de *Agrobacterium tumefaciens* C58; clonación de los mismos en el plásmido pSER42; expresión de estos genes conjuntamente para constituir un sistema enzimático capaz de transformar todas las moléculas de una mezcla racémica de hidantoinas D,L-5-monosustituidas en su correspondiente D-aminoácido.

5. Un procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque comprende las etapas de sobre-expresión en células de microorganismos que son obtenidos por transformación con plásmidos portadores de los genes de dichas enzimas y cultivo de las mismas en un medio derivado del medio LB (Luria-Bertani), con suplemento de MnCl2 para mejorar la actividad de la D-hidantoinasa.

6. Un procedimiento según las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizado** porque los microorganismos hospedadores utilizados son *Escherichia coli* transformados con el plásmido pSER42.

7. Un procedimiento para la preparación de D-aminoácidos por conversión estereoselectiva y completa de una mezcla racémica de hidantoína D,L-5-monosustituida, en donde la reacción es catalizada por medio del sistema enzimático según las reivindicaciones 5 y 6, **caracterizado** porque comprende incubar proporciones definidas de dicho sistema enzimático y de una mezcla racémica acuosa de una hidantoína D,L-5-monosustituida; y recuperar el D-aminoácido correspondiente por métodos estándar y viables industrialmente. La hidantoín racemasa componente de dicho sistema enzimático es capaz de catalizar la conversión entre los enantiómeros ópticamente activos de las hidantoinas D,L-5-monosustituidas, donde el grupo sustituyente tiene entre uno y nueve átomos de carbono y puede contener grupos sulfidrilo, amínicos, carboxilicos, imidazol, aromáticos sustituidos o no y amídicos. Dichas hidantoinas D,L-5-monosubstituidas están **caracterizadas** porque no tienen que presentar racemización espontánea. Aunque el hecho de que la presenten no restringe su aplicación en esta invención.

8. Un procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la reacción de conversión se lleva a cabo usando una relación en peso de biomasa húmeda de mezcla enzimática/hidantoinas D,L-5-monosustituidas comprendida entre 1:10 y 1:50, a un intervalo preferente de temperatura de 50 á 60ºC y a un intervalo preferente de pH de 8.8 á 9.7.

9. Uso del sistema de coexpresión enzimática según reivindicación de 1-8 para la preparación selectiva y exclusiva de D-aminoácidos o derivados de los mismos.

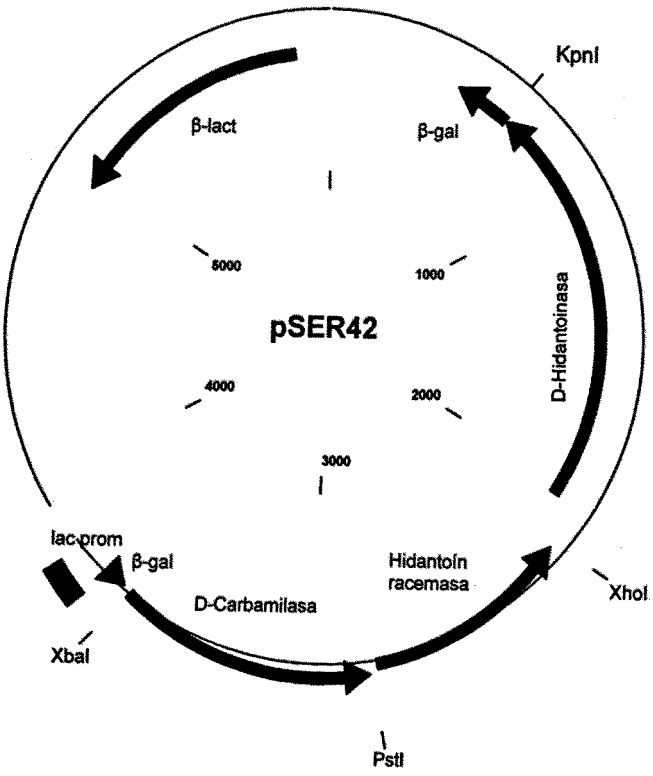

KpnI
β-lact
β-gal
5000
1000
pSER42
D-Hidantoinasa
4000
2000
3000
lac-prom
β-gal
Hidantoín
racemasa
XhoI
D-Carbamilasa
XbaI
PstI

Figura 1

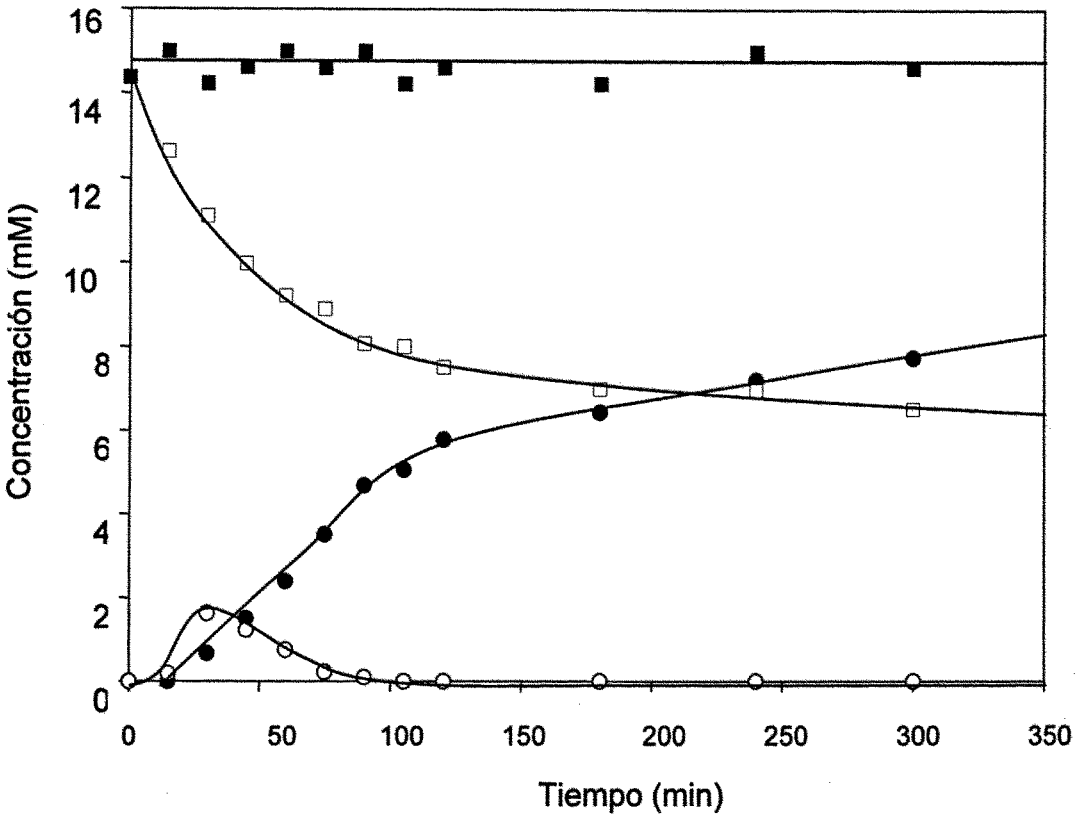

16
14
12
10
8
6
4
2
0
Concentración (mM)
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)

Figura 2

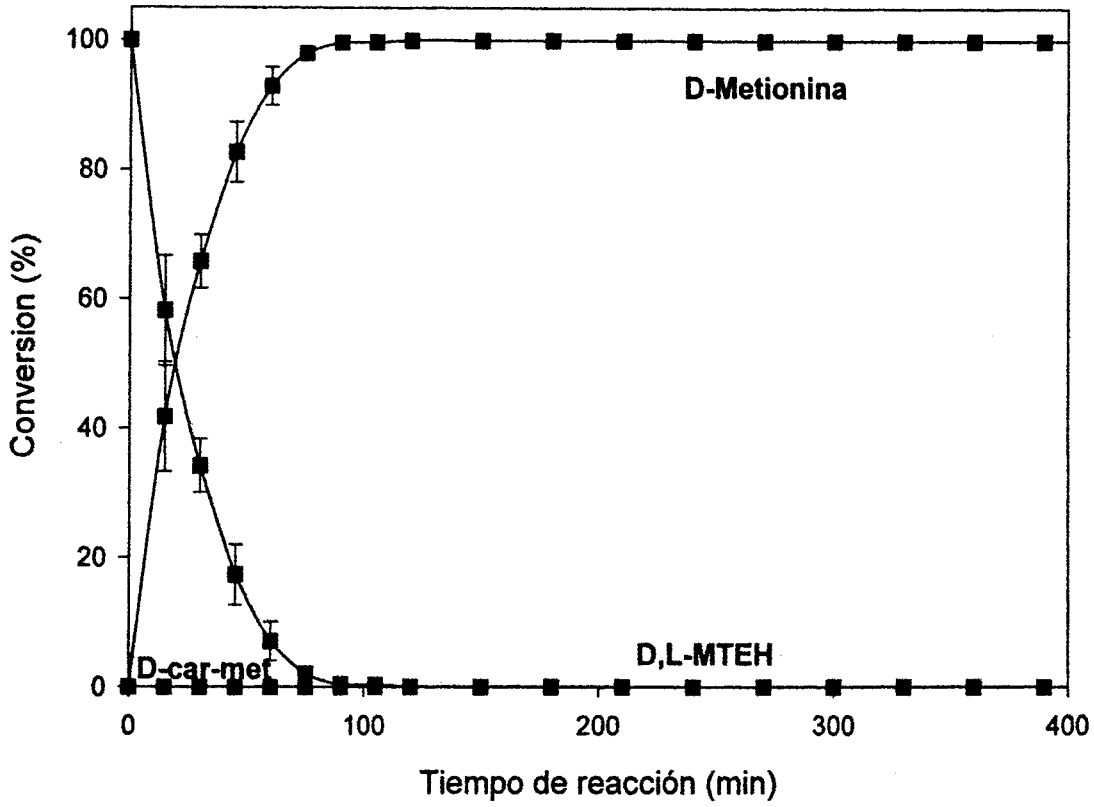

100
80
60
40
20
0
Conversion (%)
D-Metionina
D-car-met
D,L-MTEH
0
100
200
300
400
Tiempo de reacción (min)

Figura 3

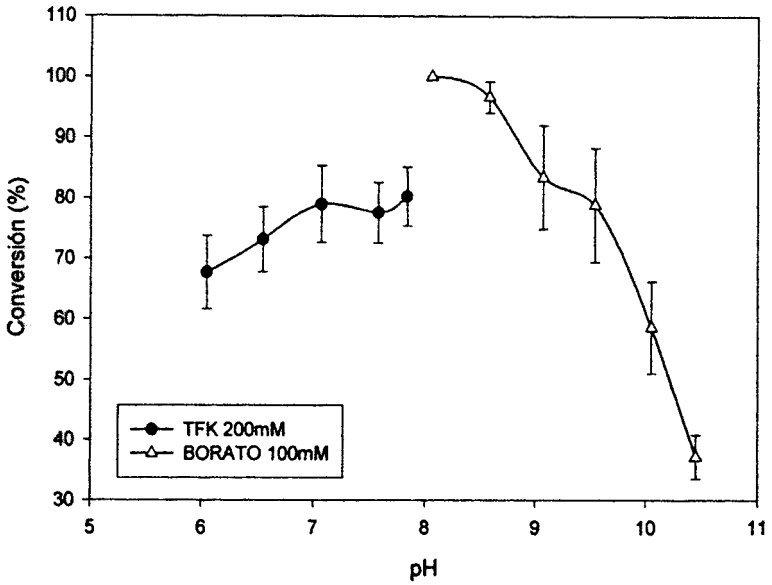

110
100
90
80
70
60
50
40
30
Conversión (%)
5
6
7
8
9
10
11
pH
TFK 200mM
BORATO 100mM

Figura 4

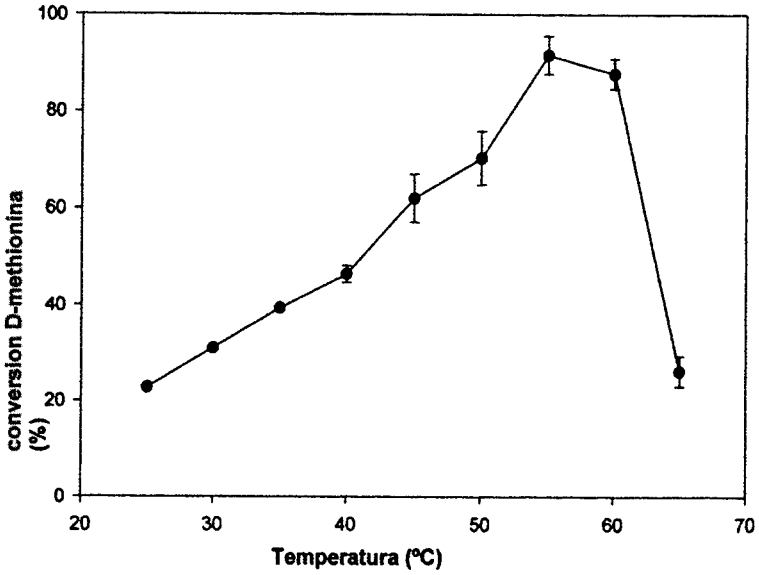
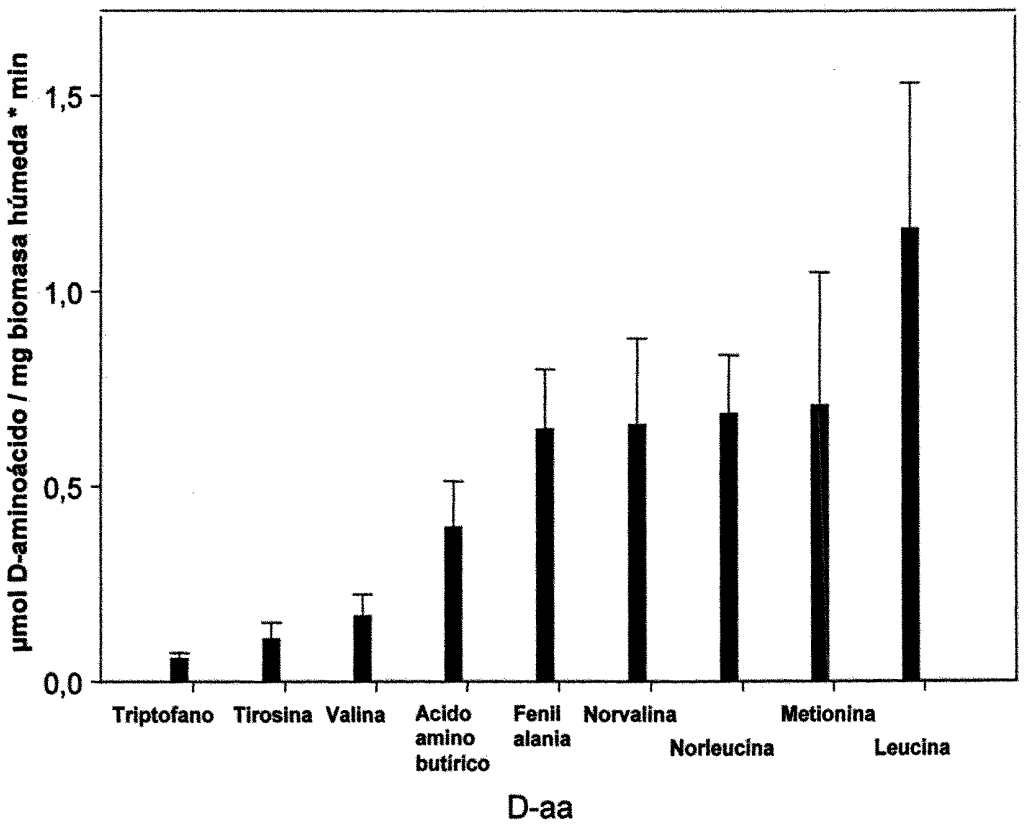

100
80
60
40
20
0
conversion D-methionina (%)
20
30
40
50
60
70
Temperatura (ºC)

Figura 5


µmol D-aminoácido / mg biomasa húmeda * min
1,5
1,0
0,5
0,0
Triptofano
Tirosina
Valina
Acido amino butírico
Fenil alania
Norvalina
Norleucina
Metionina
Leucina
D-aa

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 322 418

(21) Nº de solicitud: 200602619

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **02.10.2006**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 0123582 A1 (DEGUSSA; UNIV STUTTGART; ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 05.04.2001, página 8, líneas 12-14; página 11, líneas 9-14.	1
A	Todo el documento.	2-8
A	MARTINEZ-RODRIGUEZ, FJ. et al. Complete conversion of D,L-5-monosubstituted hydantoins with a low velocity of chemical racemization into D-amino acids using whole cells of recombinant Escherichia coli. Biotechnol. Prog. Octubre 2002, Vol. 128, Núm. 6, páginas 1201-106, ISSN 8756-7938. Todo el documento.	2-8
A	US 20050219912 A1 (AJINOMOTO, KK., NOZAKI, H., WATANABE, K.,) 29.03.2005, todo el documento.	2-8
A	GRIFANTINI, R. et al. Efficient conversion of 5-substituted hidantoins to D-alpha-aminoacids using recombinant Escherichia coli strains. 01.04.1998. Microbiology, Vol 144. Núm. 4, páginas 947-954. Todo el documento.	2-8
A	HILS, M. et al. Cloning and characterization of genes from Agrobacterium sp. IP I-671 involved in hydantoin degradation. Applied Microbiology and Biotechnology. Diciembre 2001. Vol. 57, Núm. 5-6, páginas 680-688. Todo el documento.	2-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
29.05.2009	N. Urquía Fernández	1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/72 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12P 41/00 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C12N 9/86 (2006.01)
C12N 9/80 (2006.01)