



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 765**

51 Int. Cl.:  
**C12P 13/04** (2006.01)  
**C12P 13/14** (2006.01)  
**C12P 17/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02783795 .4**  
96 Fecha de presentación : **09.12.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1445323**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2004**

54 Título: **Procedimiento para producir derivados de ácido glutámico.**

30 Prioridad: **27.12.2001 JP 2001-396471**  
**29.03.2002 JP 2002-95760**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.04.2011**

73 Titular/es: **AJINOMOTO Co., Inc.**  
**15-1 Kyobashi 1-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es: **Sugiyama, Masakazu;**  
**Watanabe, Kunihiko;**  
**Funakoshi, Nao;**  
**Amino, Yusuke;**  
**Kawahara, Shigeru y**  
**Takemoto, Tadashi**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 765 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

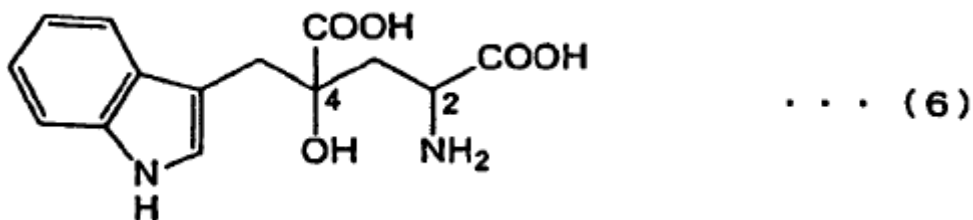
## DESCRIPCIÓN

## CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir derivados de glutamato por el uso de reacciones de enzima. Además, la invención se refiere a un procedimiento para producir monatina útil como un agente edulcorante, a partir de triptófano como uno de los aminoácidos utilizados como un material de inicio.

## ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

(3-(1-amino-1,3-dicarboxi-3-hidroxi-butan-4-il)-indol) del ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-glutámico (denominado en adelante "monatina") representado por la siguiente fórmula estructural (6) es uno de los aminoácidos contenidos en la raíz de un arbusto, Schlerochitom ilicifolius en Sudáfrica, y tiene un nivel de dulzura varios cientos de veces mayor que la sacarosa. Por lo tanto, la monatina es un compuesto particularmente prometedor como un edulcorante de bajas calorías (véase JP-A-64-25757).



## ácido (4-indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-glutámico

La monatina tiene carbonos asimétricos en las posiciones 2 y 4. La monatina natural está en la configuración estérica de (2S, 4S). Con respecto a la presencia de sus estereoisómeros de tipo no natural, además, se confirma la presencia de tres tipos de tales estereoisómeros sintéticamente preparados. No sólo la monatina de tipo natural sino que también todos los otros estereoisómeros tienen niveles de dulzura individual y altamente enriquecidos. Por lo tanto, se espera que uno cualquiera de estos o una mezcla de varios pueda utilizarse como un agente edulcorante o un componente para agentes edulcorantes (edulcorante).

Como el procedimiento de producción de monatina, se informaron cinco ejemplos en el pasado. Los detalles son los descritos en las siguientes referencias de la técnica relacionada.

- (1) Specification of USP No. 5994559
- (2) Tetrahedron Letters, 2001, Vol. 42, No. 39, pp. 6793-6796
- (3) Organic Letters, 2000, Vol. 2, No. 19, pp.2967-2970
- (4) Synthetic Communication, 1994, Vol. 24, No. 22, pp. 3197-3211
- (5) Synthetic Communication, 1993, Vol. 23, No. 18, pp. 2511-2526.

Sin embargo, todos estos procedimientos requieren múltiples etapas. Aún no se ha establecido procedimiento sintético de monatina alguno a una escala de producción industrial. Por lo tanto, se desea el desarrollo de un procedimiento industrial para producir derivados de glutamato que incluyen monatina y análogos de la misma en una forma simple con un alto rendimiento.

EP 0.692.539 describe un procedimiento para producir un ácido  $\gamma$ -hidroxi-L-glutámico ópticamente activo permitiendo la coexistencia de un biocatalizador, un donante de un grupo amino, ácido pirúvico y ácido glioxílico en un medio acuoso. En una realización alternativa, el ácido  $\gamma$ -hidroxi-L-glutámico ópticamente activo se forma permitiendo la coexistencia de un biocatalizador, un donante de un grupo amino, y un ácido 4-hidroxi-2-cetoglutámico ópticamente activo en un medio acuoso.

Hélaine et al., 1999 describen el ácido (2S,4R)-4-propil glutámico análogo del ácido glutámico, y la producción enzimática del mismo por el uso de una transaminasa glutámico oxalacética. Como sustratos de esta transaminasa, se mencionan ácidos 4-alkil- $\alpha$ -cetoglutámicos.

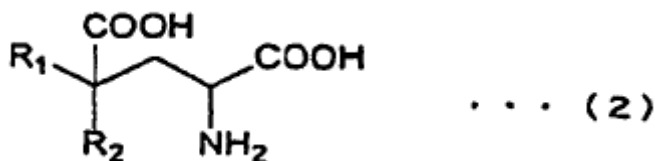
Hélaine et al., 2001 describen la síntesis de ácidos L-glutámicos 4,4-disustituidos por transaminación enzimática por el uso de transaminasa glutámico oxalacética.

Winter and Dekker, 1989 discuten la especificidad de la aspartato aminotransferasa a partir de plantas leguminosas para ácidos glutámicos 4-sustituidos. El documento concluye con que la transaminación de ácidos glutámicos 2-oxo-4-sustituidos no está involucrada en la biosíntesis de los ácidos glutámicos 4-sustituidos correspondientes en estas especies e informa la ineficiencia de la transaminación de ácidos glutámicos 4-sustituidos por aspartato aminotransferasa.

Por lo tanto, es un objetivo de la invención proporcionar un procedimiento eficiente para producir derivados de glutamato (que incluyen formas salinas del mismo) tales como monatina promisorio como un componente para edulcorantes y análogos de los mismos.

#### **DIVULGACIÓN DE LA INVENCION**

En tales circunstancias, los inventores de la presente han llevado a cabo investigaciones. Por consiguiente, han logrado exitosamente la producción de un derivado de glutamato (que incluye formas salinas de mismo) de la fórmula general (2)

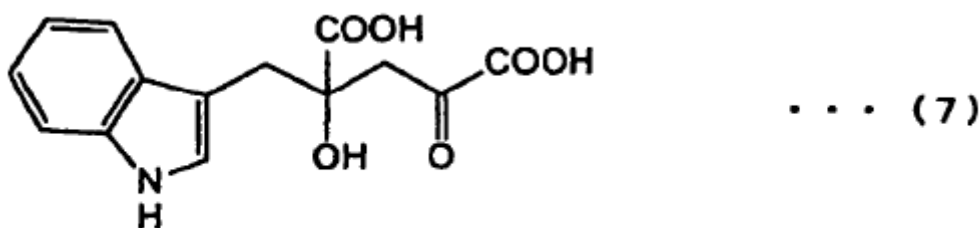


(R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> en la fórmula general (2) tienen el mismo significado que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> en la fórmula general (1)) en presencia de una transaminasa que cataliza la reacción para producir el derivado de glutamato de la fórmula general (2) a partir de un ácido α-ceto sustituido de la siguiente fórmula general (1)

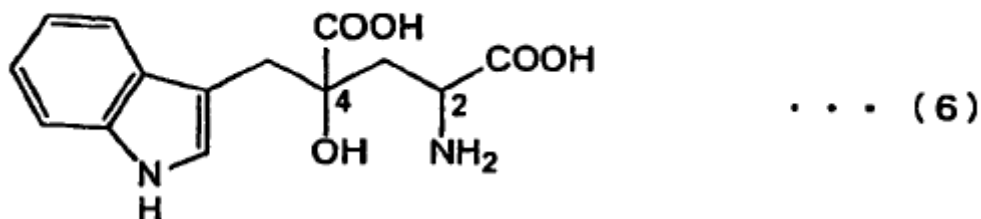


5 (en la fórmula general (1), R<sup>1</sup> representa un grupo fenilmetilo o un grupo 3-indolilmetilo, y R<sup>2</sup> representa un grupo hidroxilo = 3 que incluye una etapa de proseguir la reacción. Con base en este hallazgo, se ha logrado la invención.

10 El procedimiento para producir derivados de glutamato de acuerdo con la invención permite la producción eficiente de monatina representada por la siguiente fórmula (6) a partir de ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutárico (denominado en adelante "IHOG") representado por la siguiente fórmula (7), por el uso de la reacción de transaminasa.



IHOG



ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-glutámico

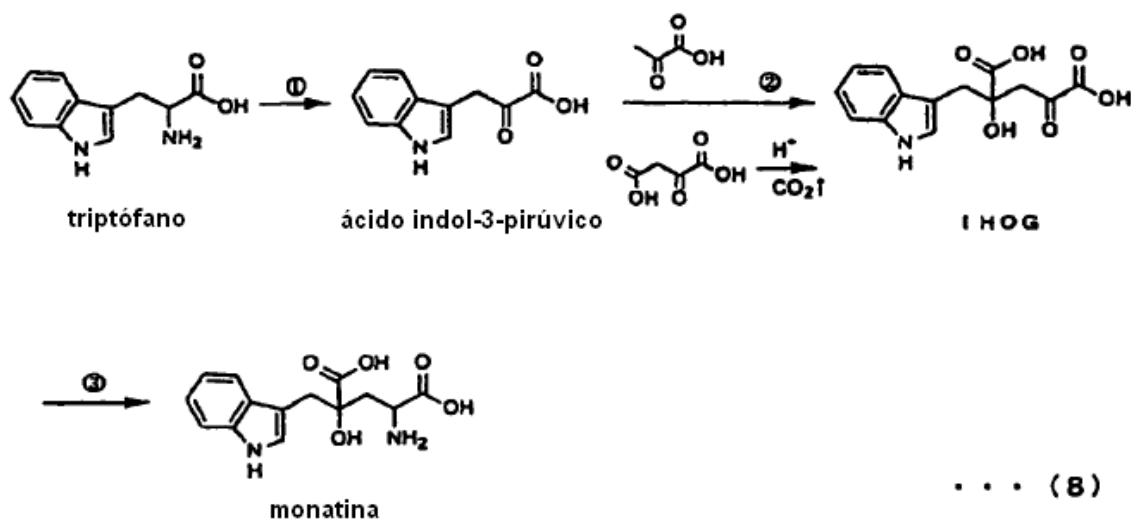
15 Además, los inventores han desarrollado un nuevo procedimiento de producción de monatina que incluye las siguientes reacciones 1 a 3 a partir de un material de inicio triptófano, uno de aminoácidos, por el uso del procedimiento para producir derivados de glutamato de acuerdo con la invención. El procedimiento para producir derivados de glutamato de la presente invención corresponde a la reacción 3 en el procedimiento de producción de monatina

que incluye las siguientes reacciones 1 a 3. La vía de producción de monatina que incluye las reacciones 1 a 3 se muestra en el esquema de reacción (8).

Reacción 1: preparar ácido indol-3-pirúvico a partir de triptófano en presencia de una enzima.

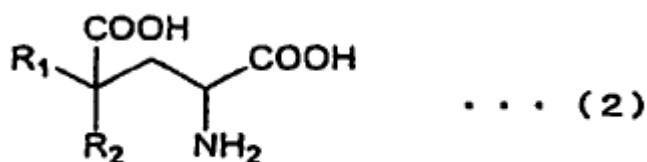
5 Reacción 2: preparar el ácido ceto precursor (IHOG) vía la condensación de aldol entre ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético).

Reacción 3: preparar sintéticamente monatina por aminación de IHOG en la posición 2 en presencia de una transaminasa.



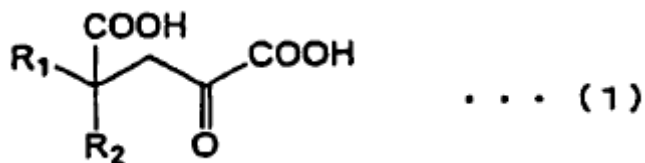
10 En otras palabras, la invención puede describirse de acuerdo con lo presentado a continuación.

[1] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato (que incluye formas salinas del mismo) de la fórmula general (2)



15 (R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> en la fórmula general (2) tienen el mismo significado que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> en la fórmula general (1)) en presencia de una transaminasa que cataliza una reacción para producir el derivado de glutamato de la fórmula general

(2) a partir de un ácido α-ceto sustituido de la siguiente fórmula general (1)



(en la fórmula general (1), R<sup>1</sup> representa un grupo fenilmetilo o un grupo 3-indolilmetilo, y R<sup>2</sup> representa un grupo hidroxilo

5 [2] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [1], en el que el sistema de reacción para la transaminasa contiene uno o varios tipos de aminoácidos como donantes de grupos de aminoácidos.

[3] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [2], en el que los aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, triptófano, fenilalanina, isoleucina, leucina, tirosina, valina, arginina, 10 asparagina, glutamina, metionina, ornitina, serina, cisteína, histidina y lisina.

[4] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [1] a [3], en el que la enzima es una L-aminoácido transaminasa.

[5] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [1] a [3], en el que la enzima es una D-aminoácido transaminasa.

15 [6] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [5], en el que el sistema de reacción para éste contiene una enzima con una actividad que cataliza la reacción para convertir L-aminoácido en D-aminoácido.

[7] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [4], en el que la L-aminoácido transaminasa es una enzima derivada de un microorganismo 20 seleccionado del grupo que consiste en los géneros Aeromonas, Agrobacterium, Alcaligenes, Beijerinckia, Escherichia, Proteus y Morganella.

[8] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [7], en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en Aeromonas hydrophila, Agrobacterium tumefaciens, Alcaligenes faecalis, Beijerinckia indica, Escherichia 25 coli, Proteus rettgeri y Morganella morganii.

[9] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [5] o [6], en el que la D-aminoácido transaminasa es una enzima derivada de un microorganismo del género Bacillus o Paenibacillus.

30 [10] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [9], en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en Bacillus sphaericus, Bacillus pulvifaciens, Bacillus macerans, Bacillus lentus, Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens y Paenibacillus macerans.

[11] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [1], en el que la enzima es una enzima generada por un microorganismo con el gen de la D-aminoácido transaminasa introducido en el mismo.

5 [12] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [11], en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.

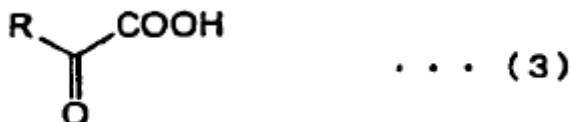
[13] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [11] o [12], en el que el gen de la D-aminoácido transaminasa deriva de *Bacillus sphaericus* o *Bacillus macerans*.

10 [14] El procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con cualquiera de [1] a [13], que además incluye al menos la siguiente etapa [I]:

[I] Una etapa para producir un ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (4)



15 (R en la fórmula general (4) tiene el mismo significado que R en la fórmula general (3)) en presencia de una enzima que cataliza la reacción para producir el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (4) a partir de un ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (3)



20 (en la fórmula general (3), R representa un grupo fenilmetilo o un grupo 3-indolilmetilo, y ácido oxaloacético o ácido pirúvico, que incluye una etapa de proseguir la reacción.

[15] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [14], en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [I] deriva de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium* y *Xanthomonas*.

25 [16] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [15], en el que el microorganismo es *Pseudomonas taetrolens*, *Pseudomonas coronafaciens*, *Pseudomonas desmolytica*, *Erwinia* sp., *Flavobacterium rhenanum* o *Xanthomonas citri*.

[17] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [16], en el que el microorganismo es *Pseudomonas taetrolens* ATCC4683 o *Pseudomonas coronafaciens* AJ2791.

5 [18] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en [14], en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [I] es cualquiera de las siguientes proteínas:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias;

10 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos preparada por la sustitución, eliminación, inserción, adición y/o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias que tienen la actividad de aldolasa;

(c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm.3;

15 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos preparada por la sustitución, eliminación, inserción, adición y/o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 3 en el listado de secuencias que tienen la actividad de aldolasa.

[19] Un procedimiento para producir un derivado de glutamato descrito en [14], en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [I] es una enzima obtenida a partir de un recombinante en el que el gen que codifica cualquiera de las siguientes proteínas está amplificado y expresado:

20 (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias;

25 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos preparada por la sustitución, eliminación, inserción, adición y/o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias que tienen actividad de aldolasa;

(c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 3;

30 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos preparada por la sustitución, eliminación, inserción, adición y/o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 3 en el listado de secuencias que tienen la actividad de aldolasa.

[20] Un procedimiento para producir monatina que incluye al menos las siguientes etapas [A] a [C]:



[A] una etapa para producir ácido indol-3-pirúvico en presencia de una enzima que cataliza la reacción para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico, permitiendo la reacción del triptófano;

5 [B] una etapa para producir ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico a partir de ácido indol-3-pirúvico, y ácido oxaloacético o ácido pirúvico;

[C] una etapa para producir monatina en presencia de una transaminasa que cataliza la reacción para producir monatina a partir de ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico, permitiendo la reacción de ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico.

10 [21] Una etapa para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [20], en el que la etapa [A] incluye permitir la reacción de triptófano en presencia de una enzima que cataliza la reacción para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico produciendo así ácido indol-3-pirúvico, y la solución resultante se trata con cualquiera de un tratamiento de desaireación, tratamiento de desoxigenación y tratamiento de ajuste del pH hasta pH 2 como máximo para recolectar ácido indol-3-pirúvico.

15 [22] Una etapa para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [21], en el que el tratamiento de desaireación o el tratamiento de desoxigenación es un procedimiento para sustituir la totalidad o una parte del gas contenido en la solución de reacción con un gas inactivo.

20 [23] Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [22], en el que el gas inactivo es cualquiera de nitrógeno, argón y helio.

[24] Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [21] a [23], en el que el ajuste del pH se lleva a cabo por la adición de un ácido a la solución de reacción, y el procedimiento además comprende una etapa de cristalización del ácido indol-3-pirúvico producido como una consecuencia del ajuste del pH y la recolección del ácido indol-3-pirúvico  
25 resultante.

[25] Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [24], en el que el ácido es cualquiera de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido fosfórico.

30 [26] Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [20] a [25], en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [A] deriva de un microorganismo que tiene actividad de aminoácido oxidasa y actividad de catalasa.

[27] Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [20] a [26], en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [A] deriva de cualquiera de los géneros *Achromobacter*, *Proteus* y *Morganella*.

[28] Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [27], en el que la enzima deriva de cualquiera de *Achromobacter* sp. AJ2425, *Proteus rettgeri* IFO13501 y *Morganella morganii* IFO3168.

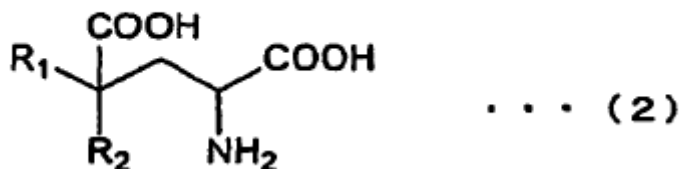
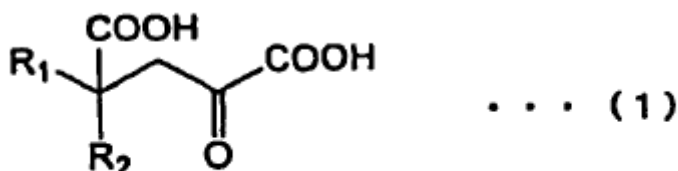
[29] Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [20], en el que la etapa [A] comprende la interacción de un cultivo de un microorganismo con triptófano, en el que dicho microorganismo posee una capacidad para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico y se selecciona de los géneros *Achromobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Pseudomonas* y *Neurospora*, y que además comprende la producción de ácido indol-3-pirúvico y después la recolección del ácido indol-3-pirúvico.

[30] Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [20] a [29], en el que la etapa [B] se lleva a cabo en presencia de una enzima que cataliza la reacción.

[31] Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en [20] a [29], en el que la etapa [B] se lleva a cabo de acuerdo con un procedimiento químico sintético.

#### MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

El procedimiento para producir derivados de glutamato desarrollado por los inventores es para producir derivados de glutamato de la siguiente fórmula general (2) a partir del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (1) y se refiere a un procedimiento para producir derivados de glutamato que incluye una etapa que permite que una enzima catalice la transaminación o que un microorganismo genere la enzima para interacción.

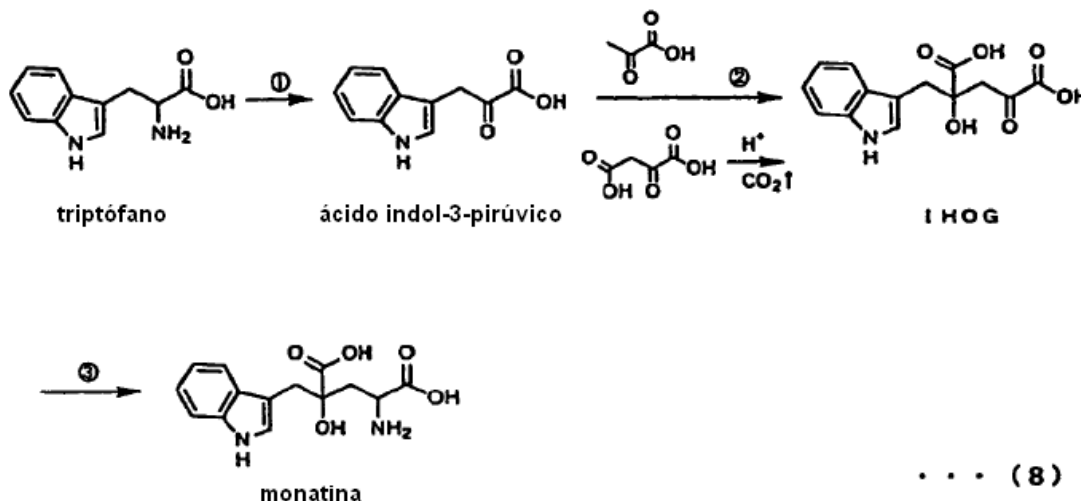


Además, el procedimiento para producir monatina a partir de un material de inicio triptófano desarrollado por los inventores incluye las siguientes reacciones 1 a 3. El procedimiento para producir monatina que incluye las siguientes reacciones 1 a 3 utiliza el procedimiento para producir derivados de glutamato de acuerdo con la invención como la reacción 3.

Reacción 1: síntesis de ácido indol-3-pirúvico a partir de triptófano en presencia de una enzima.

Reacción 2: síntesis del ácido ceto precursor (IHOG) por la condensación de aldol entre ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético).

5 Reacción 3: síntesis de monatina por aminación de IHOG en la posición 2 en presencia de una transaminasa.



Entre las reacciones 1 a 3, las reacciones 1 a 3 son reacciones enzimáticas. Sin embargo, la reacción 2 puede llevarse a cabo por el uso de cualquiera de una síntesis química y una síntesis enzimática, en forma satisfactoria, sin limitación específica.

El procedimiento para producir monatina de acuerdo con la invención no se limita al procedimiento para producir monatina por el uso de triptófano como el material de inicio sino que incluye en forma satisfactoria la reacción 3 como la etapa esencial entre las reacciones 1 a 3. En otras palabras, la invención también incluye un procedimiento para producir monatina a partir de un ácido indol-3-pirúvico comercialmente disponible como el material de inicio vía las reacciones 2 y 3, y un procedimiento para producir monatina a partir del ácido ceto precursor (IHOG) como el material de inicio vía la reacción 3. Por lo tanto, el procedimiento para producir monatina de acuerdo con la invención incluye todos los siguientes procedimientos (a) a (c).

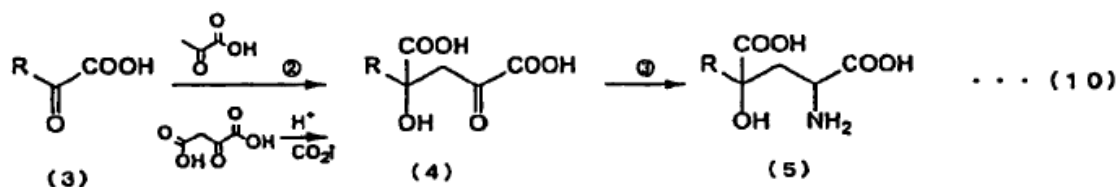
(a) Reacciones 1 + 2 + 3

20 (b) Reacciones 2 + 3

(c) Sólo Reacción 3

Además, la reacción 2 en el procedimiento para producir monatina puede utilizarse no sólo para la síntesis del ácido ceto precursor (IHOG) de monatina sino también para la producción del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido utilizado como el sustrato en el procedimiento para producir derivados de glutamato de acuerdo con la desvelación. De acuerdo con lo mostrado

en el siguiente esquema (10), el procedimiento para producir un derivado de glutamato de la fórmula general (5) vía la reacción 3, mediante el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (4) de acuerdo con lo obtenido vía la reacción 2 (Reacción 2 + Reacción 3) también se incluye en el procedimiento para producir derivados de glutamato de acuerdo con la invención.

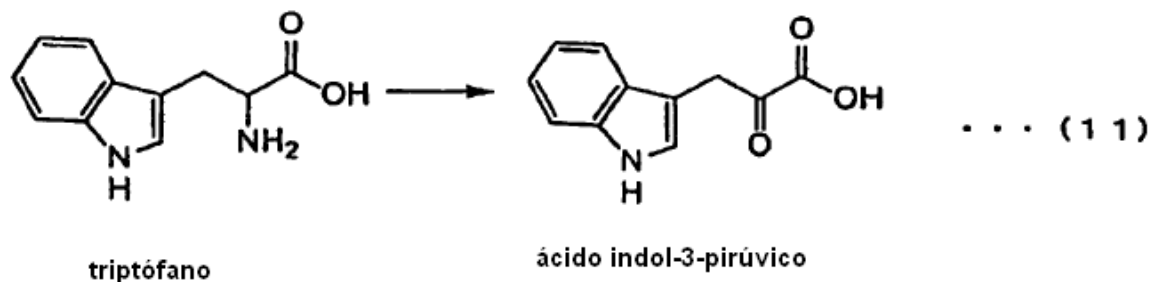


5 A continuación, la invención se describe en detalle con referencia a las figuras adjuntas, secuencialmente en el orden de [A] Reacción 1, [B] Reacción 2 y [C] Reacción 3.

#### [A] Reacción 1

10 La reacción 1 mostrada en el siguiente esquema de reacción (11) es una reacción referida con la producción de ácido indol-3-pirúvico. La reacción 1 de acuerdo con la desvelación característicamente incluye una etapa que permite la reacción de triptófano en presencia de una enzima que cataliza la reacción para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico produciendo así ácido indol-3-pirúvico, y la solución resultante se trata con cualquiera de un tratamiento de desaireación, tratamiento de desoxigenación y tratamiento de ajuste del

15 pH hasta pH 2 como máximo para recolectar ácido indol-3-pirúvico.

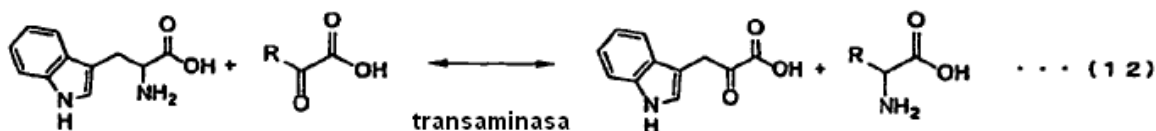


20 En la técnica relacionada, se ha propuesto un procedimiento químico para producir ácido indol-3-pirúvico por Giovanna De Luca, et al. y se ha conocido, que incluye una etapa en la que triptófano como un material de inicio se hace reaccionar con aldehído de piridina en presencia de una base para deshidratar aceptadores de protones para obtener ácido indol-3-pirúvico en un rendimiento de 50 a 62% (véase la publicación de Publicación de Patente (TOKUHYO) Núm. Sho 62-501912, el panfleto de Publicación Internacional WO 87/00169). De acuerdo con el procedimiento, la base y la aldehído piridina esenciales son muy costosas, pero

25 el rendimiento es bajo. Por lo tanto, por consiguiente, el costo de producción es muy elevado,

problemáticamente. Además, se ha conocido un procedimiento para obtener ácido indol-3-pirúvico con una recuperación del 64% propuesto por Politi Vincenzo, et al., que incluye una etapa de reacción de condensación por el uso de indol y oxima del éster de etil-3-bromopiruvato como los materiales en bruto e hidrólisis ácida subsiguiente (EP 421946). De acuerdo con el procedimiento, se requiere una etapa de purificación en la que se utiliza gel de sílice y el rendimiento es bajo. Además, los materiales en bruto son costosos. Por lo tanto, el procedimiento es desfavorable en términos de su elevado costo para aplicación a producción industrial.

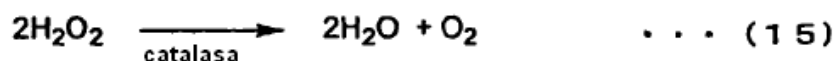
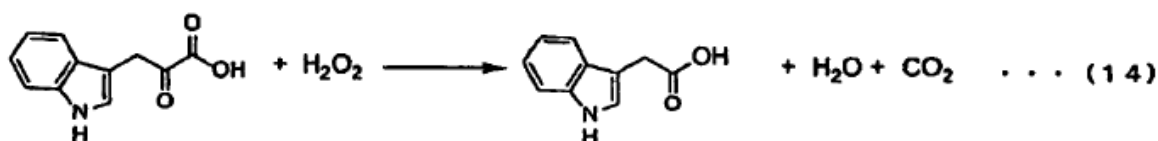
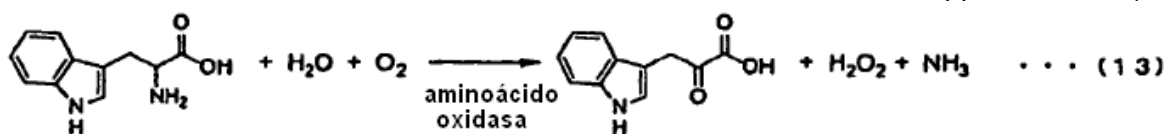
Mientras tanto, como el procedimiento enzimático, se ha conocido un procedimiento que utiliza transaminasa (véase el siguiente esquema (12) a continuación).



Se han publicado informes sobre un procedimiento para producir ácido indol-3-pirúvico que incluye una etapa que permite que L-triptófano (L-Trp) interactúe con L-triptófano transaminasa a partir de *Candida maltosa*, para por consiguiente generar ácido indol-3-pirúvico a partir de L-Trp 40 mM y ácido 2-cetoglutarico 80 mM y una etapa de purificación con una resina de intercambio iónico y obtención del ácido indol-3-pirúvico resultante en un rendimiento del 72% (véase la Patente de Alemania Oriental DD 297190 de Bobe Ruediger, et al.); y un procedimiento para producir ácido indol-3-pirúvico que incluye una etapa que permite que aspartato transaminasa interactúe con L-Trp y ácido 2-cetoglutarico para generar ácido indol-3-pirúvico, una etapa de extracción de la solución de reacción resultante en éter de petróleo, y una etapa de purificación de ácido indol-3-pirúvico por separación cromatográfica en columna para recolectar el ácido indol-3-pirúvico purificado (véase JP-A-59-95894 de Mario Matterazzi, et al.). Estos procedimientos en los que se utiliza transaminasa tienen bajo rendimiento y requieren la presencia de un ácido ceto tal como ácido 2-cetoglutarico funcionando como un aceptador de grupos amino como un material en bruto distinto a L-Trp, y, además, implican la producción secundaria de un aminoácido correspondiente al aceptador de grupos amino en una cantidad molar equivalente a la cantidad molar del ácido indol-3-pirúvico producido. Además, se requiere ácido ceto en una cantidad excesiva a L-Trp en el sistema de reacción para la mejora del rendimiento, de modo que aún permanece ácido ceto residual incluso tras la finalización de la reacción. Con base en estas razones, la recolección del ácido indol-3-pirúvico pretendido a partir de la solución de reacción requiere una etapa de purificación por el uso de

resina de intercambio iónico o similares, que implica procedimientos complicados y costos elevados.

Junto al procedimiento para producir ácido indol-3-pirúvico a partir de L-Trp, además, se ha conocido un procedimiento en el que se utiliza L-aminoácido oxidasa. Dado que ácido indol-3-pirúvico se descompone a ácido indolacético (véase el esquema de reacción (14)) con peróxido de hidrógeno secundariamente producido durante la oxidación de triptófano por L-aminoácido oxidasa (véase el siguiente esquema de reacción (13)), en la presente, se propone un procedimiento, que incluye añadir catalasa al sistema de reacción para descomponer el peróxido de hidrógeno (véase el siguiente esquema de reacción 15) (véase la memoria



Específicamente, el procedimiento incluye una etapa en la que se utiliza una columna de enzima inmovilizada preparada por la inmovilización de L-aminoácido oxidasa a partir de catalasa derivada de veneno de serpiente e hígado bovino sobre un vehículo para pasar una solución que contiene L-Trp a través de la columna para reacción, una etapa de adsorción del ácido indol-3-pirúvico producido sobre una columna de intercambio iónico, una etapa de elución con metanol y una etapa de secado del producto para recolectar el producto. Sin embargo, de acuerdo con el procedimiento, 0,5 g del L-Trp de inicio sólo dan 0,2 g de ácido indol-3-pirúvico, en un rendimiento tan bajo como 40%; el procedimiento de inmovilización por enzima y el procedimiento de purificación con la resina de intercambio iónico son laboriosos; y se requiere una etapa de recuperación y reciclamiento del L-Trp residual. Por lo tanto, el procedimiento es desfavorablemente muy costoso.

Con respecto a la L-aminoácido oxidasa derivada de microorganismos, alternativamente, John A. Duerre, et al. detectan la actividad de oxidación de L-Trp por medio de la medición de la actividad que incluye una etapa de aproximadamente purificación de la L-aminoácido oxidasa a partir de *Proteus rettgeri* y una etapa de detección del consumo de oxígeno (véase *Journal of Bacteriology*, 1975, Vol. 121, Núm. 2, pp. 656-663). Además, Furuyama, et al. confirman que la L-fenilalanina oxidasa derivada de *Pseudomonas sp. P-501* interactúa con L-Trp por medio de la medición de la actividad que incluye una etapa de detección del consumo de oxígeno (véase Noda Institute for Scientific Research, Kiyofumi Maruyama, *Journal of Biochemistry*, 1990, 108, pp. 327-333).

Sin embargo, en cualquiera de estos informes, la actividad de la oxidasa es detectada por medio de la medición del consumo de L-triptófano, del consumo de oxígeno y de la cantidad de peróxido de hidrógeno generado durante las reacciones de enzima pero el ácido indol-3-pirúvico nunca es directamente ensayado. Esto puede deberse al hecho de que el ácido indol-3-pirúvico es descompuesto a ácido indolacético con peróxido de hidrógeno producido vía la reacción con aminoácido oxidasa. Mientras tanto, no existe ejemplo alguno de la producción de ácido indol-3-pirúvico por el uso de una célula microbiana o un producto tratado a partir de células microbianas. Por lo tanto, se desconoce cómo el triptófano es descompuesto con microorganismos o qué clase de productos de descomposición son producidos.

Además, el procedimiento en que se utiliza transaminasa y el procedimiento en que se utiliza L-aminoácido oxidasa derivada de veneno de serpiente para el procedimiento para recolectar ácido indol-3-pirúvico producido en la técnica relacionada descritos con anterioridad tienen bajos rendimientos de reacción, y requieren etapas de separación cromatográfica para la recuperación del ácido indol-3-pirúvico, dada la presencia del subproducto ácido ceto y el L-triptófano residual en la solución de reacción. Por lo tanto, los procedimientos requieren procedimientos muy laboriosos e implican costos elevados.

En tales circunstancias, los inventores han llevado a cabo investigaciones con el fin de proporcionar un procedimiento para producir ácido indol-3-pirúvico en una forma simple y a un costo bajo. Los inventores han descubierto que la interacción con las actividades de aminoácido oxidasa y catalasa con triptófano puede producir ácido indol-3-pirúvico, que puede recolectarse, es decir, que la interacción de las mismas con triptófano puede producir ácido indol-3-pirúvico, preferentemente bajo supresión de la descomposición del producto pretendido por sustitución del gas inactivo o ajuste del pH para la solución de reacción resultante, que puede recolectarse. En investigaciones continuas adicionales, además de la descomposición del ácido indol-3-pirúvico a ácido indolacético con peróxido de hidrógeno, los inventores han descubierto un problema que radica en el hecho que el ácido indol-3-pirúvico es atacado con

oxígeno y similares en la solución para producir productos de descomposición con estructuras desconocidas, de modo que la solución que contiene ácido indol-3-pirúvico es finalmente coloreada, como así también un procedimiento para resolver el problema.

5 De acuerdo con la desvelación, específicamente, se deja reaccionar triptófano en presencia de una enzima que cataliza la reacción para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico, para por consiguiente producir ácido indol-3-pirúvico, y después, la solución resultante se trata con cualquiera de un tratamiento de desaireación, tratamiento de desoxigenación y tratamiento de ajuste del pH hasta pH 2 como máximo, para que pueda recolectarse ácido indol-3-pirúvico.

10 La descomposición o coloreado del ácido indol-3-pirúvico puede proseguir en su estado de solución. Sin embargo, por el procedimiento de adición de ácido, ácido indol-3-pirúvico es cristalizado en su etapa temprana de la etapa de recolección del ácido indol-3-pirúvico resultante. Por lo tanto, en comparación con otras etapas de purificación y tratamiento, el procedimiento de adición de ácido puede suprimir la descomposición y coloreado, ventajosamente.

15 El ácido indolacético como un producto de descomposición del ácido indol-3-pirúvico no siempre es fácilmente eliminado por cristalización directa bajo condiciones acídicas. Vía la sustitución del gas inactivo, la producción secundaria de ácido indolacético puede suprimirse efectivamente. Una combinación de la cristalización bajo condiciones acídicas con sustitución del gas inactivo puede ser más altamente efectiva sobre la recolección de ácido indol-3-pirúvico con pureza elevada.

25 Además, otro modo para llevar a cabo la reacción 1 de acuerdo con la desvelación característicamente incluye una etapa de interacción de un cultivo de un microorganismo con triptófano, en la que dicho microorganismo posee una capacidad de convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico, para producir y recolectar ácido indol-3-pirúvico.

30 Hasta ahora, no se conoce informe sobre la interacción de un cultivo de un microorganismo con triptófano, en la que dicho microorganismo posea una capacidad de convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico, para producir y recolectar ácido indol-3-pirúvico. Así, el procedimiento proporciona un procedimiento novedoso y útil para producir ácido indol-3-pirúvico por un procedimiento enzimático.

El modo para llevar a cabo la reacción 1 de acuerdo con la desvelación se describe a continuación en forma secuencial alrededor de los apartados (A-1) Enzima para uso en la reacción 1 y (A-2) Condiciones de reacción para la reacción 1, en este orden.

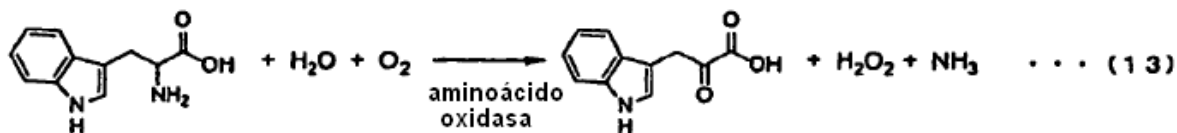
(A-1) Enzima para uso en la reacción 1



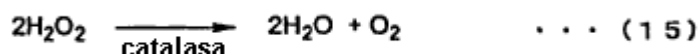
La enzima para uso en la reacción 1 incluye cualquier enzima con una capacidad para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico, sin limitación específica. Como la enzima para uso en la reacción 1, se prefieren enzimas con actividad de aminoácido oxidasa, y enzimas con actividad de catalasa.

5 La "actividad de aminoácido oxidasa" para la reacción 1 significa una actividad que cataliza la reacción mostrada en el siguiente esquema de reacción (13). En general, L-aminoácido oxidasa genera ácido ceto a partir del L-aminoácido correspondiente, mientras que la D-aminoácido oxidasa genera ácido ceto a partir del D-aminoácido correspondiente. Específicamente, de acuerdo con la desvelación, individualmente, un microorganismo con actividad de L-aminoácido oxidasa puede utilizarse cuando L-triptófano se utilice como el material en bruto, mientras que un microorganismo con actividad de D-aminoácido oxidasa puede utilizarse cuando D-triptófano se utilice como el material en bruto. Además, también es aplicable la preparación a partir DL-triptófano. Cuando la D- y L-aminoácido oxidasa se dejan interactuar con DL-triptófano, el ácido indol-3-pirúvico pretendido puede producirse en forma  
10  
15

Además, la "actividad de catalasa" significa una actividad que cataliza la reacción mostrada en el siguiente esquema de reacción (15).



20



La enzima con actividad de aminoácido oxidasa para la reacción 1 puede seleccionarse por el uso de cualquiera de varios procedimientos conocidos, tales como un ensayo de detección del consumo de oxígeno causado por la actividad de oxidación de aminoácido (véase por un ejemplo, Journal of Bacteriology, 1975, Vol. 121, Núm. 2, pp. 656-663) y un  
25 procedimiento para medir el peróxido de hidrógeno generado vía la reacción (véase por un ejemplo M. Gabler, et al., Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27, pp. 605-611) como así el procedimiento para medir directamente el ácido indol-3-pirúvico producido a partir de triptófano según lo descrito a continuación de acuerdo con la desvelación.

30 La enzima con actividad de catalasa para la reacción 1 puede seleccionarse por el uso de cualquiera de varios procedimientos conocidos, tales como un procedimiento para medir la reducción del peróxido de hidrógeno vía la reacción de catalasa, con base en el cambio de la

absorbancia de 230 nm a 250 nm, un procedimiento para medir el peróxido de hidrógeno residual en la solución de reacción con  $\text{KMnO}_4$ , y un procedimiento para medir el oxígeno producido durante la reacción con un manómetro. Como un ejemplo, se menciona un procedimiento espectroscópico para medir el peróxido de hidrógeno residual, que incluye una etapa de oxidación de donantes de electrones tales como o-dianisidina vía la reacción de peroxidasa, de acuerdo con lo descrito en M. Gabler, et al., *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27, pp.605-611. Por el uso de cualquiera de estos procedimientos, puede seleccionarse una enzima con actividad de catalasa.

Además, la enzima para uso en la reacción 1 puede seleccionarse por medio de detección de la actividad para producir ácido indol-3-pirúvico a partir de triptófano, de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación en el Ejemplo 1.

El microorganismo que genera la enzima para uso en la reacción 1 puede seleccionarse, por ejemplo, de los géneros *Achromobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Pseudomonas* y *Neurospora*. Preferentemente, el microorganismo es un microorganismo con actividad de aminoácido oxidasa y actividad de catalasa. Específicamente, el microorganismo, por ejemplo, se selecciona de los géneros *Achromobacter*, *Proteus*, y *Morganella*. En particular, *Achromobacter* sp. AJ2425, *Proteus rettgeri* IFO13501 y *Morganella morganii* IFO3168 se prefieren como tales microorganismos.

En la presente, *Achromobacter* sp. AJ2425 ha sido depositado de acuerdo con lo presentado a continuación.

Cepa AJ2425 de *Achromobacter* sp.

(a) Núm. de Acceso FERM BP-8244 (transferido a partir de FERM P-18786 a International Patent Organism Depositary, 22 de Noviembre de 2002).

(b) Fecha de deposición: 20 de Marzo de 2002

(c) Organización Depositaria: International Patent Organism Depositary, The Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Núm. 6, Chuo, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón (Código postal: 305-8566))

Además, los microorganismos depositados en Institute for Fermentation, Osaka (IFO) se encuentran disponibles y pueden obtenerse a partir de Institute for Fermentation, (2-17-85, Tomimoto-cho, Yodogawa-ku, Osaka, Japón (Código postal: 532-8686)).

Estos microorganismos pueden ser cepas microbianas recientemente separadas de las fuentes naturales, tales como el suelo o plantas o pueden ser cepas microbianas artificialmente cultivadas por tratamiento con químicos mutagénicos o tecnología del ADN recombinante.

El procedimiento para el cultivo del microorganismo que genera la enzima para uso en la reacción 1 puede llevarse a cabo por el uso de medios de cultivo generales para uso en el

campo, medios de cultivo que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, sales con vestigios metálicos, vitaminas y similares. Como las fuentes de carbono, por ejemplo, puede utilizarse cualquier fuente de carbono que pueda utilizar el microorganismo. Representativamente, tales fuentes de carbono incluyen azúcares tales como glucosa, sacarosa y dextrina, alcoholes tales como sorbitol, etanol y glicerol, ácidos orgánicos tales como ácido fumárico, ácido cítrico, ácido acético y ácido propionico y sales de los mismos, hidrocarburos tales como parafina o mezclas de los descritos con anterioridad.

Como las fuentes de nitrógeno, por ejemplo, puede utilizarse sulfato de amonio, cloruro de amonio, urea, extracto de levadura, extracto de carne, licor de maíz fermentado y productos hidrolizados con caseína o mezclas de los mismos. Como una composición específica de un medio de cultivo, por ejemplo, se mencionan un medio de cultivo que contiene glucosa 1,0%, sulfato de amonio 0,3%, extracto de levadura en polvo 1,0%, peptona 1,0%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%, y  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,001% (pH 7,0).

Además, a menudo pueden obtenerse células microbianas con una alta capacidad para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico por la adición al medio de cultivo de L-aminoácido o D-aminoácido como un agente inductor de enzimas.

Para mejorar la permeabilidad del sustrato en el interior de las células microbianas, además, pueden utilizarse detergentes tales como Triton X y Tween y disolventes orgánicos tales como tolueno y xileno.

En cuanto a la temperatura del cultivo, en general, la reacción se lleva a cabo dentro de un intervalo en el que puede crecer un microorganismo utilizado, un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 a 45°C, preferentemente 25 a 37°C, por ejemplo. Como el pH del medio de cultivo, el pH se ajusta a, con preferencia, aproximadamente 3 a 10, con más preferencia, aproximadamente 4 a 8. En cuanto a la condición de aireación, la condición debe ajustarse a una condición adecuada para el crecimiento de un microorganismo a utilizar. Con preferencia, la condición es condición aeróbica. En cuanto al tiempo del cultivo, en general, la reacción se lleva a cabo durante aproximadamente 12 a 120 horas, con preferencia aproximadamente 16 a 96 horas.

#### (A-2) Condiciones de reacción para la reacción 1

La reacción 1 característicamente incluye una etapa para producir ácido indol-3-pirúvico a partir de triptófano en presencia de tal enzima y una etapa para tratar la solución de reacción resultante con cualquiera de un tratamiento de desaireación, tratamiento de desoxigenación y tratamiento de ajuste del pH hasta pH 2 como máximo para recolectar ácido indol-3-pirúvico.

En la reacción 1, el término "en presencia de una enzima" significa permitir que la enzima exista en el sistema de reacción mientras que la enzima esté en el estado que permita

la conversión de triptófano en ácido indol-3-pirúvico. En otras palabras, la enzima puede satisfactoriamente existir en el sistema de reacción a condición de que la enzima esté en cualquier estado que convierta triptófano en ácido indol-3-pirúvico. Por ejemplo, la enzima puede añadirse sola al sistema de reacción, o puede añadirse al sistema de reacción un microorganismo con la actividad de enzima (microorganismo que genera la enzima, células transformadas con ADN recombinante), un cultivo del microorganismo (cultivo líquido, cultivo sólido, etc.), un medio de cultivo (preparado por la eliminación preliminar de células microbianas del cultivo) o un producto tratado del cultivo. En el caso de la utilización de un cultivo de un microorganismo, la reacción 1 puede proseguirse concurrentemente con el cultivo del microorganismo. De lo contrario, la reacción 1 puede llevarse a cabo por el uso de cultivo para obtener la enzima. En la presente, el "tratamiento" significa un tratamiento con el propósito de recuperar enzimas en células microbianas. El tratamiento incluye, por ejemplo, tratamientos con ultrasonificación, perlas de vidrio, prensa francesa, y liofilización y tratamientos con enzimas líticas, disolventes orgánicos, detergentes o similares. Además, los productos tratados según estos tratamientos se tratan por procedimientos de rutina (cromatografía líquida, fraccionamiento con sulfato de amonio, etc.) para preparar una fracción de enzima en bruto o una enzima purificada, que puede utilizarse satisfactoriamente, cuando la fracción o la enzima tengan una capacidad requerida.

Para utilizar el cultivo o el producto tratado del mismo, además, el cultivo o el producto tratado pueden incluirse en carragenano o poliacrilamida o pueden inmovilizarse sobre una película de sulfona de poliéter o celulosa regenerada, previo al uso.

La célula microbiana o un producto tratado de la célula microbiana pueden utilizarse en una cantidad (cantidad efectiva) suficiente para lograr el efecto pretendido en caso de una reacción dada. En cuanto a la cantidad efectiva, aquellos con experiencia en la técnica pueden determinar fácilmente la cantidad por un simple experimento preliminar. Para células microbianas húmedas enjuagadas, por ejemplo, la cantidad es 1 a 40 g por 100 ml de solución de reacción.

En cuanto al sustrato triptófano, puede utilizarse cualquiera de la forma L, la forma D y la forma DL. Con base en la facilidad de la disponibilidad y el precio, se adopta la forma L. El triptófano se añade íntegra, intermitente o continuamente dentro de un intervalo de concentración sin supresión de la reacción pretendida. En cuando al procedimiento de adición, el triptófano puede añadirse directamente a las células microbianas durante el cultivo. De lo contrario, las células microbianas después del cultivo se separan una vez, y posteriormente se mezclan con triptófano para su uso. El triptófano puede mezclarse con un producto tratado del mismo para uso. Para su adición, el sustrato se añade en un estado de solución o suspensión

acuosa. Por el propósito de aumentar la solubilidad o promover la dispersión, disolventes orgánicos o detergentes sin influencia sobre la reacción pueden mezclarse en triptófano para la adición.

La reacción para uso de acuerdo con la desvelación se lleva a cabo dentro de un intervalo de pH de, con preferencia, aproximadamente pH 3 a 10, con más preferencia, de aproximadamente pH 5 a 9 y dentro de un intervalo de temperatura de, con preferencia, 10 a 60°C, con más preferencia, de aproximadamente 20 a 40°C para un tiempo de reacción de, con preferencia, aproximadamente 0,5 a 120 horas, con más preferencia, de aproximadamente 0,5 a 24 horas, bajo agitación o mientras la mezcla de reacción se deja reposar sola. El sustrato puede utilizarse en cualquier concentración sin limitación específica, pero, con preferencia, se utiliza en una concentración de aproximadamente 0,1% a 10%.

En cuanto a la determinación cuantitativa del triptófano restante en el cultivo líquido o en la solución de reacción, el ácido indol-3-pirúvico allí producido o el subproducto ácido indolacético allí presente, estos pueden medirse en forma simple e inmediata por el uso de procedimientos bien conocidos de cromatografía líquida de alto rendimiento.

El cultivo líquido que acumula el ácido indol-3-pirúvico así producido (solución de reacción) en el mismo se trata por tratamiento de desaireación o desoxigenación para suprimir la descomposición del ácido indol-3-pirúvico. En cuanto al procedimiento para el tratamiento de desaireación o tratamiento de desoxigenación, se menciona un procedimiento para sustituir el gas (la totalidad o una parte) contenido en la solución de reacción con gases inactivos, por ejemplo nitrógeno y argón.

En la presente, el "tratamiento de desaireación" significa un procedimiento para eliminar componentes reactivos con ácido indol-3-pirúvico, tales como oxígeno y peróxido de hidrógeno existentes en la solución de reacción o para reducir las concentraciones de los mismos, en un procedimiento para sustituir la solución de reacción con gases inactivos o en un procedimiento para someter la solución de reacción a condiciones bajo presión reducida, por el uso de un aspirador y una bomba de vacío. Además, el "tratamiento de desoxigenación" significa un procedimiento para eliminar el oxígeno disuelto en la solución de reacción o reducir la concentración del mismo. Específicamente, el procedimiento para eliminar oxígeno en la solución incluye, por ejemplo, un procedimiento para eliminar oxígeno con gas inactivo o un procedimiento para añadir un agente de desoxigenación a la solución.

Por la sustitución de la solución de reacción con gas inactivo, puede eliminarse el oxígeno restante en la solución de reacción para terminar la reacción y además evitar la descomposición del ácido indol-3-pirúvico producido y el triptófano residual. En la presente, el "gas inactivo" significa un gas que nunca reacciona directa o indirectamente con ácido indol-3-

pirúvico pero que reduce efectivamente los componentes reactivos con ácido indol-3-pirúvico y triptófano, tal como oxígeno o una cantidad ínfima de peróxido de hidrógeno residual. Los ejemplos del gas inactivo utilizable de acuerdo con la invención incluyen nitrógeno, argón y helio. La sustitución con gas inactivo puede llevarse a cabo inmediatamente después de la finalización de la reacción. En caso de la reacción en que se utilizan células microbianas enjuagadas, la sustitución puede llevarse a cabo después de la separación de las células microbianas.

El procedimiento para cargar gas inactivo incluye, por ejemplo, un procedimiento para sustituir la fase gaseosa con gas inactivo para reducir la concentración de oxígeno en la fase gaseosa y un procedimiento para introducir gas inactivo en la solución para eliminar el oxígeno disuelto. El procedimiento de carga no está particularmente limitado. En cuanto a la concentración de oxígeno en la fase gaseosa, se adopta el 5% o menos, preferentemente 3% o menos, más preferentemente 1% o menos. Con preferencia, la concentración de oxígeno en la solución es de 1 ppm o menos, preferentemente 0,1 ppm o menos, más preferentemente 0,01 ppm o menos.

Además, la reacción puede terminarse y la descomposición de ácido indol-3-pirúvico puede suprimirse, por la adición adecuada de sustancias tales como sulfito de sodio conocidas por tener un efecto sobre la reducción de la concentración de oxígeno disuelto a la solución de reacción.

Como el agente de desoxigenación de acuerdo con la divulgación, puede utilizarse ión de sulfito. Como la fuente para el ión de sulfito, pueden utilizarse sales tales como sulfito de sodio, sulfito de potasio, sulfito de amonio y ácido sulfuroso o hidrosulfito. Éstas preferentemente se utilizan en una concentración de ión de sulfito o hidrosulfito de, con preferencia, 20 ppm o más a 1% o menos, con más preferencia 100 ppm o más a 0,5% o menos.

El tratamiento de sustitución del gas inactivo y el procedimiento para añadir agentes de desoxigenación a la solución pueden llevarse a cabo en combinación o puede llevarse a cabo cualquiera de los mismos.

El ácido indol-3-pirúvico producido por la reacción se recolecta a partir del cultivo líquido o la solución de reacción por procedimientos generales, previo al uso. Para su recolección a partir del cultivo líquido o la solución de reacción, pueden utilizarse en combinación adecuada, en caso de ser necesario, procedimientos bien conocidos para uso general en el campo en un caso tal, por ejemplo, filtración, centrifugación, concentración al vacío, intercambio iónico o cromatografía por adsorción o cristalización.

En una realización preferible de la desvelación, se reduce el pH de la solución de reacción, para así cristalizar o precipitar ácido indol-3-pirúvico, que puede separarse directamente y recolectarse de la mezcla tras la finalización de la reacción. Con respecto al ajuste del pH de la solución de reacción, el pH preferentemente se ajusta a 2 o menos, más preferentemente se ajusta a 1 o menos. De acuerdo con la desvelación, puede producirse ácido indol-3-pirúvico con un rendimiento de producción elevado mientras que las concentraciones del subproducto ácido ceto y L-triptófano residual se reducen en la solución. Por lo tanto, por la cristalización directa del ácido indol-3-pirúvico bajo condiciones acídicas, puede simplificarse la etapa de purificación. En una realización más preferible de la desvelación, ácido indol-3-pirúvico puede cristalizarse directamente por la adición adecuada de ácidos tales como ácido sulfúrico y ácido clorhídrico a la solución de reacción. De acuerdo con el procedimiento, ácido indol-3-pirúvico puede producirse con un rendimiento de producción elevado mientras que las concentraciones del subproducto ácido ceto y L-triptófano residual se reducen en la solución. Así, el procedimiento de purificación puede simplificarse por la cristalización directa de ácido indol-3-pirúvico bajo condiciones acídicas.

Para el ajuste a condiciones acídicas, el tipo de ácido a utilizar no está específicamente limitado a condición de que tampoco lo esté el procedimiento para ajustar la solución de reacción a acidez. Los ejemplos del ácido a utilizar incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico. Aquellos con experiencia en la técnica puede seleccionar en forma adecuada la temperatura de cristalización, la cantidad del ácido a utilizar, el período de tiempo de cristalización, y el procedimiento para añadir el ácido, dentro de un intervalo sin deterioramiento de la técnica de la divulgación.

Como la temperatura de cristalización, puede seleccionarse, con preferencia, una de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $100^{\circ}\text{C}$ , con más preferencia, de aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  a  $60^{\circ}\text{C}$ . Como la cantidad del ácido a utilizar, puede seleccionarse una cantidad del mismo para ajustar la solución de reacción de, con preferencia, pH 2 o menos, con más preferencia, pH 1 o menos. El ácido puede añadirse y utilizarse para que la concentración de ión de hidrógeno en la solución tras la adición del ácido sea, con preferencia, de aproximadamente 0,01 a 10 mol/L, con más preferencia, de aproximadamente 0,1 a 1 mol/L.

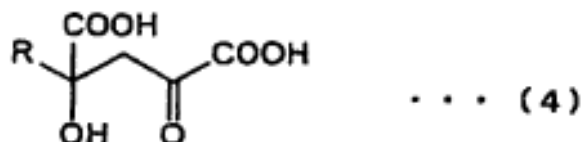
Como el período de tiempo de cristalización, puede seleccionarse uno de, con preferencia, aproximadamente 1 a 100 horas, con más preferencia, aproximadamente 1 a 24 horas.

#### [B] Reacción 2

La reacción 2 de acuerdo con la desvelación es una reacción para sintetizar el ácido ceto precursor (IHOG) de monatina a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido

oxaloacético). Sin embargo, la reacción 2 también puede utilizarse no sólo para la síntesis de IHOG sino que también para la síntesis del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido para uso como el sustrato en la reacción 3 descrita a continuación.

Específicamente, la reacción 2 también puede utilizarse ampliamente para la reacción  
5 para producir el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la siguiente fórmula general (4)



a partir del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (3)



10 y ácido oxaloacético o ácido pirúvico.

El ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (4) de acuerdo con lo obtenido vía la reacción 2 puede utilizarse como el sustrato para la reacción 3 descrita a continuación.

En las fórmulas generales (3) y (4), R representa un grupo fenilmetilo o un grupo 3-indolilmetilo, preferentemente un grupo 3-indolilmetilo. Específicamente, el ácido  $\alpha$ -ceto  
15 sustituido de la fórmula general (3) es ácido fenilpirúvico o ácido indol-3-pirúvico, preferentemente ácido indol-3-pirúvico. Como el ácido indol-3-pirúvico, es preferible el ácido indol-3-pirúvico preparado por el procedimiento descrito en el apartado [A] Reacción 1. Sin embargo, razonablemente, el procedimiento para preparar ácido indol-3-pirúvico no está limitado a este procedimiento.

20 En el caso en que se utilice ácido indol-3-pirúvico como el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (3), puede producirse IHOG (esquema de reacción (16)) como el intermedio importante para la producción de monatina.

En el caso en que se utilice ácido fenilpirúvico como el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (3), puede producirse PHOG (esquema de reacción (17)) (ácido 4-fenilmetil-4-  
25 hidroxil-2-oxoglutarico) como el ácido ceto intermedio para un ácido 4-fenilmetil-4-hidroxi-2-oxoglutarico (PHG) (esquema de reacción (17)) análogo de monatina.





sustituido y ácido oxaloacético en un disolvente adecuado en presencia de una base inorgánica o una base orgánica.

El tipo del disolvente a utilizar no está específicamente limitado, a condición de que el disolvente sea inactivo a la reacción.

5 Aquellos con experiencia en la técnica pueden seleccionar en forma adecuada la temperatura de reacción, la cantidad de base a utilizar, el período de tiempo de reacción, y el procedimiento para añadir materiales de inicio, dentro de un intervalo sin deterioramiento de la técnica de la invención.

10 Preferentemente, el disolvente incluye, por ejemplo, disolventes polares tales como agua, metanol, acetonitrilo y dimetilformamida.

Si se utiliza, la base preferentemente incluye, por ejemplo, hidróxidos o carbonatos de bases inorgánicas, por ejemplo, metales alcalinos o metales térreo-alcalinos, que incluyen hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, carbonato de potasio y carbonato de calcio, y bases orgánicas, por ejemplo, trietilamina.

15 Como la temperatura de reacción, puede seleccionarse una, con preferencia, de aproximadamente -20 a 100°C, con más preferencia, de aproximadamente 0 a 60°C.

Para la reacción para descarboxilar el condensado de la reacción con aldol, la reacción puede completarse por la descarboxilación espontánea pero la descarboxilación puede llevarse a cabo en forma efectiva por la adición de ácido o ión metálico o ambos a la solución de  
20 reacción. El ácido para uso en un caso tal incluye, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido p-toluensulfónico y ácidos sólidos tales como resinas de intercambio iónico, mientras que el ión metálico incluye, por ejemplo, iones de metales de transición, tales como ión de níquel, ión de cobre e ión de hierro. Como la temperatura de reacción, puede seleccionarse una de, con preferencia, aproximadamente  
25 -10 a 100°C, con más preferencia, aproximadamente, 0 a 60°C.

(B-2) Sistema de reacción enzimática

(I) Enzima para uso en la reacción 2;

30 Como la enzima para uso en la reacción 2, puede utilizarse cualquiera enzima que catalice la reacción para sintetizar el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (4) vía la condensación con aldol entre el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (3) y ácido oxaloacético o ácido pirúvico, sin limitación específica. En otras palabras, cualquier enzima derivada de microorganismos u obtenida por tecnología de recombinación genética puede ser satisfactoria a condición de que la enzima catalice la reacción.

Las investigaciones de los inventores han verificado que existen cepas microbianas que generan aldolasa con actividad descomponedora de ácido 4-fenilmetil-4-hidroxi-2-oxoglutarico (PHOG) en los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, y *Xanthomonas*.

La aldolasa generada por estos microorganismos cataliza la reacción para descomponer una molécula de PHOG para generar una molécula de ácido fenilpirúvico y una molécula de ácido pirúvico. Los inventores pensaron que la aldolasa podría posiblemente catalizar la reacción para sintetizar ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico (IHOG) a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético). Con base en este concepto, los inventores aislaron y purificaron aldolasa a partir de células microbianas de las cepas microbianas para identificar la presencia de una aldolasa novedosa. Además, los inventores descubrieron que gracias a la enzima, se sintetizó IHOG vía la condensación con aldol entre ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético).

Como enzimas microbianas que catalizan la condensación con aldol a partir de dos moléculas de ácido  $\alpha$ -ceto (y ácido  $\alpha$ -ceto sustituido) como el sustrato, se informaron dos ejemplos en la técnica relacionada, aldolasa de 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato a partir de una bacteria del género *Pseudomonas* y aldolasa de 4-hidroxi-2-oxoglutarato en *E. coli*, *B. subtilis* o similares. Un informe comunica que la primera aldolasa de 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato cataliza la reacción para generar 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato (4-HMG) a partir de dos moléculas de ácido pirúvico y la reacción para generar una molécula de ácido oxaloacético y una molécula de ácido pirúvico a partir de 4-oxalocitramalato (véase Kiyofumi Maruyama, *Journal of Biochemistry*, 1990, 108, pp. 327-333). Además, también es sabido que la última aldolasa de 4-hidroxi-2-oxoglutarato cataliza la reacción para generar 4-hidroxi-2-oxoglutarato (4HG) a partir de una molécula de ácido glioxílico y una molécula de ácido pirúvico.

Sin embargo, no existe absolutamente ningún informe o hallazgo sobre la actividad descomponedora del ácido 4-fenilmetil-4-hidroxi-2-oxoglutarico (denominado de aquí en adelante PHOG) o sobre la actividad sintética del ácido ceto precursor de la monatina (IHOG) a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético) en ninguna de estas cepas microbianas. Es totalmente desconocido el hecho de si la aldolasa generada por estas cepas microbianas puede o no utilizarse para la vía sintética descrita con anterioridad.

En otras palabras, antes de los hallazgos de los inventores de la presente, no se había publicado informe alguno concerniente a un ejemplo de la preparación sintética del ácido ceto precursor (IHOG) a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético), por el uso de un sistema enzimático microbiano.

Además, los inventores purificaron la aldolasa derivada de *Pseudomonas taetrolens* ATCC4683 y determinaron la secuencia de aminoácidos de la aldolasa. Además, los inventores

lograron con éxito la síntesis de una molécula de ADN de aproximadamente 30 bp de acuerdo con lo especulado a partir de la secuencia de aminoácidos de la aldolasa, el aislamiento y recuperación de una parte de un ADN que codifica la aldolasa por PCR, y el aislamiento del ADN de longitud completa que codifica la aldolasa derivada de *Pseudomonas taetrolens* en las bibliotecas de genes cromosomales de *Pseudomonas taetrolens*, por el uso del fragmento de ADN resultante como una sonda.

La SEQ ID Núm. 1 en el listado de secuencias muestra el ADN que codifica la aldolasa de la desvelación, de acuerdo con lo identificado por el procedimiento descrito con anterioridad. Además, la SEQ ID Núm. 2 y 3 muestra las secuencias de aminoácidos de la aldolasa codificadas por la secuencia de nucleótidos SEQ ID Núm. 1 en el listado de secuencias. La SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias muestra la secuencia de aminoácidos de la aldolasa, que está codificada por la secuencia de nucleótidos de la posición 456 a la posición 1118 en la secuencia de nucleótidos SEQ ID Núm. 1 en el listado de secuencias. Además, la SEQ ID Núm. 3 en el listado de secuencias muestra la secuencia de aminoácidos de la aldolasa, que está codificada por la secuencia de nucleótidos de la posición 444 a la posición 1118 en la secuencia de nucleótidos SEQ ID Núm. 1. Cualquier aldolasa descrita como SEQ ID Núm. 2 y 3 tiene la actividad de la aldolasa y cataliza la reacción para sintetizar el ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico (IHOG) a partir de una molécula de ácido indol-3-pirúvico y una molécula de ácido pirúvico (o ácido oxaloacético).

#### (1) Aldolasa codificadora de ADN

De acuerdo con lo descrito con anterioridad, el gen de la aldolasa de la secuencia de nucleótidos SEQ ID Núm. 1 en el listado de secuencias se aisló a partir del ADN cromosomal de la cepa ATCC4683 de *Pseudomonas taetrolens*. La secuencia de nucleótidos SEQ ID Núm. 1 en el listado de secuencias tiene una homología del 29% con la aldolasa de 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato conocida (nombre del gen: *proA*) derivada de la bacteria *Pseudomonas ochraceae* (véase Maruyama K., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, 65 (12), pp. 2701-2709) en términos de secuencia de aminoácidos. En la presente, la homología se calcula por el uso de un software de análisis de genes "genetyx ver. 6" mientras que varios parámetros se utilizan de acuerdo con su ajuste inicial.

A continuación, se describe el procedimiento para obtener la aldolasa codificadora de ADN a partir de una bacteria generadora de aldolasa.

En primer lugar, se determina la secuencia de aminoácidos de la aldolasa purificada. Por el uso del procedimiento Edman (Edman, P., *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4, p. 227), puede determinarse en la presente la secuencia de aminoácidos. Alternativamente, por el uso de un secuenciador fabricado por Applied Biosystems Inc., también puede determinarse la secuencia

de aminoácidos. La aldolasa derivada de la cepa ATCC4683 de *Pseudomonas taetrolens* de la desvelación se descompuso con proteasa en una forma limitada. Los fragmentos de péptidos resultantes se separaron y recuperaron por HPLC en fase reversa. Se determinaron las secuencias de aminoácidos internos de dos de estos fragmentos, para finalmente identificar las secuencias de las SEQ ID Núm. 4 y 5.

Con base en las secuencias de aminoácidos identificadas, puede deducirse la secuencia de nucleótidos del ADN que codifica las secuencias. Para deducir la secuencia de nucleótidos de ADN, se utilizan codones universales.

Con base en la secuencia de nucleótidos deducida, se preparan sintéticamente moléculas de ADN de aproximadamente 30 pares de base. El procedimiento para preparar sintéticamente la molécula de ADN se desvela en *Tetrahedron Letters*, 1981, 22, p.1859. Además, la molécula de ADN puede prepararse sintéticamente, por el uso de un sintetizador fabricado por Applied Biosystems Inc. La molécula de ADN puede utilizarse como la sonda para aislar el ADN de longitud completa que codifica la aldolasa a partir de las librerías de genes cromosomales del microorganismo que genera aldolasa. Por el contrario, la molécula de ADN puede utilizarse como el cebador para amplificar el ADN que codifica la aldolasa de la invención por PCR. Dado que el ADN amplificado por PCR nunca incluye el ADN de longitud completa que codifica la aldolasa, el ADN amplificado por PCR se utiliza para aislar el ADN de longitud completa que codifica la aldolasa a partir de las librerías de genes cromosomales del microorganismo que genera aldolasa.

El procedimiento de PCR se describe por White, T. J., et al., *Trends Genet.* 5, 1989, p. 185. El procedimiento para preparar ADN cromosomal y el procedimiento para aislar una molécula deseada de ADN a partir de una librería de genes por el uso de una molécula de ADN como una sonda se describe en *Molecular Cloning*, 2nd edition, Cold Spring Harbor press, 1989.

El procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos del ADN aislado que codifica la aldolasa se describe en *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, Inc., 1985. Además, la secuencia de nucleótidos también puede determinarse, por el uso de un secuenciador de ADN fabricado por Applied Biosystems Inc. La SEQ ID Núm. 1 en el listado de secuencias muestra el ADN que codifica la aldolasa derivada de la cepa ATCC4683 de *Pseudomonas taetrolens*.

El ADN de la SEQ ID Núm. 1 no es el único ADN que codifica una aldolasa que cataliza la reacción para la síntesis de IHOG a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético). En otras palabras, razonablemente, cada especie y cada cepa del género *Pseudomonas* que genera la aldolasa que cataliza la reacción para la síntesis de IHOG a partir

de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético) debe tener diferencias en sus secuencias de nucleótidos.

Razonablemente, incluso un ADN resultante de la mutación artificial del ADN que codifica aldolasa aislado del ADN cromosomal de una bacteria que genera aldolasa también puede utilizarse para la reacción 2, en caso que el ADN artificial codifique la aldolasa. El procedimiento de mutación de sitio específico descrito en Method. in Enzymol., 1987, p.154 frecuentemente se utiliza como un procedimiento para añadir tal mutación artificial.

Además, un ADN que hibridiza con un ADN de una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos SEQ ID Núm. 1 en el listado de secuencias bajo condiciones estrictas y que codifica una proteína con la actividad de aldolasa también puede utilizarse para la reacción 2. En la presente, el término "condiciones estrictas" significa condiciones para formar el denominado híbrido específico pero sin formar bajo ningún concepto híbridos no específicos. Si bien es difícil mostrar claramente las condiciones en figuras numéricas, un ejemplo de las mismas es lo presentado a continuación: bajo las condiciones, ADN con homología elevada de, por ejemplo, 50% o más, preferentemente 80% o más, más preferentemente 90% o más, y en particular, preferentemente 95% o más pueden hibridarse entre sí, pero ADN con menor homología no pueden hibridarse entre sí (el término homología preferentemente se expresa como un valor calculado mientras que las secuencias para comparación se alinean para que el número de las mismas bases pueda ser el más grande). Por el contrario, las condiciones son condiciones para permitir la hibridación en una concentración salina correspondiente a la condición de enjuague general para hibridación Southern, a saber 0,1 X SSC, 0,1% X SDS a 37°C, preferentemente 0,1 X SSC, 0,1% X SDS a 60°C, más preferentemente 0,1 X SSC, 0,1% X SDS a 65°C. Además, el término "actividad de la aldolasa" significa cualquier actividad para preparar sintéticamente IHOG a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético). En caso de una secuencia de nucleótidos que hibridiza con una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos SEQ ID Núm. 1 en el listado de secuencias bajo condiciones estrictas, la actividad es del 10% o más, preferentemente 30% o más, más preferentemente 50% o más, aún más preferentemente 70% o más de la actividad de la aldolasa de la proteína de la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 o 3 en el listado de secuencias bajo condiciones a 33°C y pH 9.

Además, el ADN que codifica esencialmente la misma proteína que la aldolasa codificada por el ADN descrita como SEQ ID Núm. 1 también puede utilizarse para la reacción 2. En otras palabras, los siguientes ADN también se incluyen en el ADN de la desvelación.

(a) ADN que codifica la proteína de la secuencia de aminoácido SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias.

(b) ADN que codifica la proteína de una secuencia de aminoácido preparada tras la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias y con la actividad de la aldolasa.

5 (c) ADN que codifica la proteína de la secuencia de aminoácido SEQ ID Núm. 3 en el listado de secuencias.

(d) ADN que codifica la proteína de una secuencia de aminoácido preparada tras la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 3 en el listado de secuencias y con la actividad  
10 de la aldolasa.

En la presente, el término "uno o varios" significa un intervalo de residuos de aminoácidos que no implican deterioración severa de la configuración estérica de la proteína resultante o la actividad de la aldolasa, específicamente incluye 1 a 50, preferentemente 1 a 30, más preferentemente 1 a 10. De acuerdo con lo descrito con anterioridad, además, el término  
15 "actividad de la aldolasa" significa la actividad para la síntesis de IHOG a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético). En el caso de una secuencia de aminoácidos preparada tras la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias, la actividad de la aldolasa resultante bajo condiciones a 33°C y PH 9 está al 10% o  
20 más, preferentemente 30% o más, más preferentemente 50% o más, aún más preferentemente 70% o más de la actividad de la aldolasa de la proteína de la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 o 3 en el listado de secuencias, bajo condiciones a 33°C y pH 9.

#### (2) Propiedades de la aldolasa

Se describen a continuación las propiedades de la aldolasa purificada a partir de la cepa  
25 ATCC4683 de *Pseudomonas taetrolens*.

La aldolasa derivada de la cepa ATCC4683 de *Pseudomonas taetrolens* tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 o 3 de acuerdo con lo mostrado claramente por el aislamiento y análisis del gen descritos con anterior. Sin embargo, razonablemente, una proteína de una secuencia de aminoácidos preparada tras la sustitución, eliminación, inserción,  
30 adición o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 o 3 en el listado de secuencias y con la actividad de la aldolasa también puede utilizarse para la reacción 2.

En otras palabras, las siguientes proteínas (a) a (d) también pueden utilizarse como la enzima que cataliza la reacción 2.

(a) Proteína de una secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias.

(b) Proteína de una secuencia de aminoácidos preparada tras la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias y con la actividad de la aldolasa.

(c) Proteína de la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 3 en el listado de secuencias.

(d) Proteína de una secuencia de aminoácidos preparada tras la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 3 en el listado de secuencias y con la actividad de la aldolasa.

En la presente, las definiciones de "varios" y "actividad de la aldolasa" son las descritas en la descripción en el apartado ADN que codifica la aldolasa (1).

Tal aldolasa puede catalizar la reacción para preparar sintéticamente ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico (IHOG) vía la condensación con aldol a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético).

La actividad de la aldolasa de la aldolasa puede ensayarse por la medición de la cantidad de IHOG generada a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético) por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Específicamente, la actividad de la aldolasa puede estimarse por la adición de aldolasa a una solución de reacción de tampón 100 mM, ácido indol-3-pirúvico 50 mM, ácido pirúvico 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, y tolueno 1% v/v, para reacción bajo agitación a 33°C durante 4 horas y la medición de la cantidad de IHOG generada por HPLC.

IHOG puede determinarse por HPLC por el uso de "Inertsil ODS-2" (5 µm, 4,6 X 250 mm) fabricado por by GL Sciences, Inc. Se muestra a continuación un ejemplo de las condiciones analíticas.

Fase móvil: acetonitrilo 40% v/v /solución de fosfato diácido de tetrabutilamonio 5 mM

Caudal: 1 ml/min

Temperatura de columna: 40°C

Detección: UV 210 nm.

Se describen a continuación las propiedades enzimáticas y químicas de la aldolasa de *Pseudomonas taetrolens* de acuerdo con lo medido por el procedimiento analítico mencionado con anterioridad.



La aldolasa derivada de *Pseudomonas taetrolens* puede catalizar la reacción para preparar sintéticamente IHOG vía la condensación con aldol de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético). Como enzimas microbianas que catalizan la condensación con aldol a partir de dos moléculas de ácido  $\alpha$ -ceto (o ácido  $\alpha$ -ceto sustituido) como el sustrato, hasta la fecha, se informaron dos de tales enzimas, que son aldolasa 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato a partir del género *Pseudomonas* y aldolasa 4-hidroxi-2-oxoglutarato existente en *E. coli* y *B. subtilis*. Sin embargo, no existe absolutamente ningún hallazgo o informe sobre la primera concerniente a la interacción de la misma con PHOG o IHOG. Por lo tanto, es totalmente desconocido el hecho de si PHOG (e IHOG) pueden prepararse sintéticamente o no, por el uso de la enzima. Además, no se observa actividad descomponedora de PHOG en la última, y, por lo tanto, la síntesis de PHOG (e IHOG) por el uso de la enzima fue imposible. En otras palabras, la aldolasa derivada de *Pseudomonas taetrolens* característicamente cataliza la reacción para la síntesis de IHOG vía la condensación con aldol de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético), a diferencia de la aldolasa informada hasta la fecha. El pH óptimo de la aldolasa derivada de *Pseudomonas taetrolens* es de aproximadamente 9 a 33°C.

El peso molecular de la aldolasa derivada de *Pseudomonas taetrolens* de acuerdo con lo medido por filtración con gel fue de aproximadamente 146 kDa, que fue de aproximadamente 25 kDa de acuerdo con lo medido por SDS-PAGE. Por lo tanto, la aldolasa de la desvelación posiblemente formará un homohexámero compuesto por una subunidad con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa.

### (3) Procedimiento para preparar aldolasa

Se describe a continuación el procedimiento para preparar aldolasa. El procedimiento para preparar aldolasa para uso en la reacción 2 de acuerdo con la desvelación incluye dos procedimientos, a saber (i) un procedimiento para generar y acumular la aldolasa por el cultivo microbiológico de una bacteria que genera aldolasa y (ii) un procedimiento para generar y acumular la aldolasa por la formación de un transformante que genera la aldolasa por tecnología de ADN recombinante y el cultivo del transformante.

#### (i) El procedimiento para generar y acumular la aldolasa por cultivo microbiológico

Para el procedimiento para generar y acumular la aldolasa por el cultivo microbiológico de una bacteria que genera aldolasa, el microorganismo como una fuente para recuperar la aldolasa incluye microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, y *Xanthomonas*.

Entre los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, y *Xanthomonas*, puede utilizarse cualquier microorganismo que genere aldolasa que catalice la reacción para la

síntesis del ácido ceto precursor (IHOG) a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético) de acuerdo con la desvelación. Preferentemente, el microorganismo incluye *Pseudomonas taetrolens* ATCC4683, *Pseudomonas coronafaciens* AJ2791, *Pseudomonas desmolytica* AJ1582, *Erwinia* sp. AJ2917, *Xanthomonas citri* AJ2797, y *Flavobacterium rhenanum* AJ2468. En particular, entre estos, son preferibles *Pseudomonas taetrolens* ATCC4683 y *Pseudomonas coronafaciens* AJ2791. Se muestran a continuación las organizaciones depositarias de estos microorganismos.

(1) Cepa AJ2791 de *Pseudomonas coronafaciens*

(a) Núm. de Acceso FERM BP-8246 (transferido a partir de FERM P-18881 a International Depository, 22 de Noviembre de 2002)

(b) Fecha de Deposición: 10 de Junio de 2002

(c) Depositario: International Patent Organism Depository, The Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Núm. 6, Chuo, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón)

(2) *Pseudomonas desmolytica* AJ1582

(a) Núm. de Acceso FERM BP-8247 (transferido a partir de FERM P-18882 a International Depository, 22 de Noviembre de 2002)

(b) Fecha de Deposición: 10 de Junio de 2002

(c) Depositario: International Patent Organism Depository, The Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Núm. 6, Chuo, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón)

(3) *Erwinia* sp. AJ29117

(a) Núm. de Acceso FERM BP-8245 (transferido a partir de FERM P-18880 a International Depository, 22 de Noviembre de 2002)

(b) Fecha de Deposición: 10 de Junio de 2002

(c) Depositario: International Patent Organism Depository, The Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Núm. 6, Chuo, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón)

(4) *Flavobacterium rhenanum* AJ2468

(a) Núm. de Acceso FERM BP-1862

(b) Fecha de Deposición: 30 de Septiembre de 1985

(c) Depositario: International Patent Organism Depository, The Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Núm. 6, Chuo, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón)

(5) *Xanthomonas citri* AJ2797

(a) Núm. de Acceso FERM BP-8250 (transferido a partir de FERM P-4347 a International Depository, 27 de Noviembre de 2002)

(b) Fecha de Deposición: 30 de Septiembre de 1985

(c) Depositario: International Patent Organism Depository, The Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Núm. 6, Chuo, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón)

El modo para cultivar el microorganismo como una fuente para recuperar la aldolasa puede ser cualquiera de un cultivo líquido y un cultivo sólido. Un modo industrialmente ventajoso es el cultivo de aireación sumergida. Como la fuente de nutriente en medios de cultivo nutritivos, pueden utilizarse aquellas generalmente utilizados para cultivo microbiano, tales como fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y otras fuentes de oligonutrientes. Puede utilizarse cualquier fuente de nutrientes que puedan utilizar cepas microbianas.

Para la condición de aireación, se adoptan condiciones aeróbicas. La temperatura del cultivo puede estar dentro de un intervalo para crecimiento microbiano para generar la aldolasa. Por lo tanto, no existen condiciones estrictas. En general, la temperatura es de 10 a 50°C, preferentemente 30 a 40°C. El período de tiempo del cultivo varía, dependiendo de otras condiciones del cultivo. Por ejemplo, el tiempo de cultivo es de hasta un período que implica la máxima generación de aldolasa, que es de por ejemplo 5 horas a 7 días, con preferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 3 días.

Tras el cultivo, las células microbianas se cosechan por centrifugación (por ejemplo, 10.000 X g, 10 minutos). Dado que la aldolasa mayormente existe en las células microbianas, las células microbianas se rompen o lisan, por solubilización con aldolasa. Para la ruptura microbiana, pueden utilizarse tratamientos tales como ruptura ultrasónica, ruptura por prensa francesa, y ruptura por perlas de vidrio. En el caso de lisis, además, puede utilizarse un tratamiento con lisozima de clara de huevo o peptidasa o una combinación adecuada de tales tratamientos.

Para purificar la aldolasa derivada a partir de una bacteria que genera aldolasa, se utiliza la solución solubilizada con enzima como un material de inicio para la purificación. Cuando puede permanecer un residuo no alterado o no lisado, la solución solubilizada se trata nuevamente por procedimientos de centrifugación para eliminar el residuo precipitante, que no es ventajoso para la purificación.

Para purificar la aldolasa, puede utilizarse cualquier procedimiento de rutina generalmente utilizado para la purificación de enzimas, que incluye, por ejemplo, procedimiento *salting-out* con sulfato de amonio, cromatografía por filtración con gel, cromatografía por intercambio iónico, cromatografía hidrófoba y cromatografía por hidroxiapatita. Por consiguiente, pueden obtenerse fracciones que contienen aldolasa con una actividad superior.

(ii) Procedimiento por tecnología de ADN recombinante

Se describe a continuación el procedimiento para preparar la aldolasa por tecnología de ADN recombinante. Se han conocido numerosos ejemplos para preparar proteínas útiles tales

como enzimas y sustancias fisiológicamente activas por el uso de tecnología de ADN recombinante. Por el uso de tecnología de ADN recombinante, pueden prepararse a gran escala proteínas útiles que existen en la naturaleza en cantidades ínfimas.

5 Cualquier ADN a ser conjugado por un ADN vector puede ser satisfactorio si el ADN puede expresar la aldolasa.

Como un ejemplo del gen de la aldolasa conjugado a un ADN vector, en la presente, puede utilizarse, (1) el ADN descrito en el apartado "ADN que codifica aldolasa".

10 En el caso de preparación de proteína a gran escala por el uso de tecnología de ADN recombinante, preferentemente, la proteína está asociada junta en un transformante para formar un cuerpo de inclusión de proteínas. Se presentan a continuación las ventajas del procedimiento de expresión y preparación. La proteína pretendida puede protegerse de la digestión con proteasa en células microbianas y la proteína pretendida puede purificarse en una forma simple por procedimientos de centrifugación después de la ruptura de las células microbianas.

15 El cuerpo de inclusión de proteínas obtenido en tal forma se solubiliza con un agente desnaturizante de proteínas y se trata por un procedimiento para regenerar la actividad mediante principalmente la eliminación del agente desnaturizante, y después se convierte en una proteína fisiológicamente activa correctamente plegada. Por ejemplo, existen numerosos ejemplos tales como regeneración de la actividad de la interleuquina-2 humana (JP-A-61-20 257931).

25 Con el fin de obtener la proteína de tipo activo a partir de un cuerpo de inclusión de proteínas tal, se requieren una serie de procedimientos tales como solubilización y regeneración de la actividad que son más complicados que aquellos para directamente generar la proteína de tipo activo. En el caso de preparación a gran escala de una proteína con influencias sobre el crecimiento de una célula microbiana en la célula microbiana, las influencias pueden suprimirse por la acumulación de la proteína en forma de un cuerpo de inclusión de proteínas inactivas en la célula microbiana.

30 El procedimiento de preparación a gran escala de una proteína pretendida en la forma de un cuerpo de inclusión incluye la expresión simple de la proteína pretendida bajo controles de un promotor resistente, y un procedimiento para expresar la proteína pretendida en la forma de una proteína de fusión con una proteína conocida por ser expresada a gran escala.

Después de su expresión como una proteína de fusión, con el fin de eliminar la proteína de fusión y obtener la proteína pretendida en forma efectiva, deben organizarse las secuencias de reconocimiento de proteasas de restricción en sitios adecuados.

En el caso de preparación de proteínas a gran escala por el uso de tecnología de ADN recombinante, pueden utilizarse como células huésped para transformación, células microbianas, células actinomicetales, células de levadura, células de hongos, células de plantas y células de animales. Las células microbianas para las que ahora se desarrollan sistemas de huésped-vector incluyen, por ejemplo, un microorganismo del género *Escherichia*, un microorganismo del género *Pseudomonas*, un microorganismo del género *Corynebacterium*, y un microorganismo *Bacillus*. Preferentemente, se utiliza *Escherichia coli* dado que existe mucho conocimiento respecto a la técnica concerniente a la forma de uso de *Escherichia coli* para la generación de proteínas a gran escala. Se describe a continuación un procedimiento para preparar aldolasa por el uso de *Escherichia coli* transformada.

Como el promotor para expresar el ADN que codifica la aldolasa, en general, pueden utilizarse promotores para *Escherichia coli* para la preparación de proteínas exógenas e incluyen, por ejemplo, promotores resistentes tales como promotor T7, promotor *trp*, promotor *lac*, promotor *tac* y promotor PL.

Para la generación de la aldolasa en un cuerpo de inclusión de la proteína de fusión, se conjuga un gen que codifica otra proteína, preferentemente un péptido hidrófilo, corriente arriba o corriente abajo del gen de la aldolasa, para preparar un gen de una proteína de fusión. El gen que codifica tal otra proteína puede satisfactoriamente ser cualquier gen capaz de aumentar la acumulación de la proteína de fusión y elevar la solubilidad de la proteína de fusión tras las etapas de desnaturalización y regeneración. Por ejemplo, el gen T7, el gen  $\beta$ -galactosidasa, el gen de la enzima reductora de deshidrofolato, el gen de interferón  $\gamma$ , el gen de interleuquina-2 y el gen de proquimosina son candidatos del mismo.

Para la conjugación de estos genes al gen que codifica la aldolasa, estos genes deben tener el mismo marco de lectura para sus codones. Estos genes se conjugan en sitios de restricción adecuados o se conjugan por el uso de ADN sintético de una secuencia adecuada.

Para aumentar la cantidad generada, además, un finalizador como una secuencia de terminación de la transcripción preferentemente se conjuga corriente abajo del gen de fusión de proteínas. El finalizador incluye, por ejemplo, finalizador T7, finalizador de fagos fd, finalizador T4, el finalizador para el gen resistente a tetraciclina, y el finalizador para el gen *Escherichia coli trpA*.

El vector para introducir el gen que codifica la aldolasa o un gen que codifica una proteína de fusión de la aldolasa con otra proteína es preferentemente del tipo denominado multicopia e incluye, por ejemplo, un plásmido con un origen de replicación como el derivado de Col E1, tal como plásmido de base pUC, plásmido de base pBR322 o derivados de los mismos. En la presente, el término "derivado" significa plásmidos desnaturalizados por

sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión de nucleótidos. En la presente, el término “desnaturalización” significa tratamiento genético con mutagenes e irradiación con rayos UV o mutación espontánea.

5 Para evaluar el transformante, además, el vector preferentemente tiene marcadores tales como un gen resistente a la ampicilina. Como tal plásmido, vectores de expresión con promotores resistentes se encuentran comercialmente disponibles (serie pUC (fabricado por TAKARA BIO INC.), serie pPROK (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.), pKK233-2 (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.), etc.).

10 Un fragmento de ADN, en el que un promotor, el gen que codifica la aldolasa o un gen que codifica una proteína de fusión de la aldolasa con otra proteína y un finalizador, se conjugan secuencialmente en conjunto en este orden, se conjuga a un ADN vector para formar un ADN recombinante.

15 Por el uso del ADN recombinante, se transforma *Escherichia coli*. La *Escherichia coli* resultante se cultiva para expresar y generar la aldolasa o la proteína de fusión de la aldolasa con otra proteína. Como el huésped a transformar, pueden utilizarse cepas generalmente utilizadas para la expresión del gen exógeno. En particular, son preferibles la *Escherichia coli* cepa JM109 (DE3) y JM109. El procedimiento para tal transformación y el procedimiento para evaluar el transformante resultante se describen en *Molecular Cloning*, 2da edición, Cold Spring Harbor press, 1989 y similares.

20 En caso de la expresión en la forma de proteína de fusión, la aldolasa puede satisfactoriamente recortarse por el uso de proteasas de restricción tales como Factor de coagulación sanguínea Xa y calicreína, aquellos que reconocen secuencias de reconocimiento nunca existentes en aldolasa como las secuencias de reconocimiento.

25 En la generación del medio de cultivo, pueden utilizarse medios de cultivo para uso general en el cultivo de *Escherichia coli*, tales como medio de cultivo M9-casaminoácido y medio de cultivo LB. Además, las condiciones de cultivo y las condiciones para inducir la generación se seleccionan en forma adecuada, dependiendo de los tipos del marcador, promotor, y bacteria huésped para el vector utilizado.

30 Para recuperar la aldolasa o la proteína de fusión de la aldolasa con otra proteína, se utilizan los siguientes procedimientos. Cuando la aldolasa o la proteína de fusión se solubilizan en células microbianas, las células microbianas se recuperan, que después se rompen o lisan para uso como solución de enzima en bruto. En caso de ser necesario, además, la aldolasa y la proteína de fusión de la misma pueden purificarse por procedimientos generales tales como precipitación, filtración y cromatografía en columna, previo al uso. En este caso, también

pueden utilizarse procedimientos de purificación en los que se utilizan anticuerpos contra la aldolasa o la proteína de fusión.

Un cuerpo de inclusión de proteínas cuando se forma se solubiliza con un agente desnaturizante. El cuerpo de inclusión de proteínas puede solubilizarse junto con la proteína de la célula microbiana. En términos del siguiente procedimiento de purificación, sin embargo, el cuerpo de inclusión se toma y después se solubiliza, preferentemente. El cuerpo de inclusión puede recuperarse a partir de las células microbianas por procedimientos conocidos en la técnica relacionada. Por ejemplo, las células microbianas se rompen para recuperar el cuerpo de inclusión por procedimientos de centrifugación y similares. El agente desnaturizante para solubilizar el cuerpo de inclusión de proteínas incluye, por ejemplo, clorhidrato de guanidina (por ejemplo, 6M, pH 5 a 8) y urea (por ejemplo, 8 M).

Por la eliminación de estos agentes desnaturizantes mediante diálisis y similares, la proteína resultante puede regenerarse como una proteína con la actividad. Como la solución para diálisis para uso en la diálisis, puede utilizarse tampón de Tris-HCl y tampón de fosfato. La concentración incluye, por ejemplo, 20 mM a 0,5 M a pH 5 a 8.

La concentración de proteína en la etapa de regeneración preferentemente se suprime a aproximadamente 500 µg/ml o menos. Con el fin de suprimir la auto-reticulación de la aldolasa regenerada, la temperatura para la diálisis es preferentemente de 5° o menos. El procedimiento para eliminar los agentes desnaturizantes incluye procedimiento de disolución y procedimiento de ultrafiltración diferente al procedimiento de diálisis. Por el uso de estos procedimientos, puede esperarse la regeneración de la actividad.

En el caso que el gen de la aldolasa se deriva de un microorganismo del género *Pseudomonas*, además, la aldolasa puede expresarse y generarse en un microorganismo huésped del género *Pseudomonas* como una realización preferible.

Por ejemplo, Shi-En Lu, et al. informan un procedimiento de transformación y expresión en *Pseudomonas syringae* como la célula huésped (FEMS Microbiology Letters, 2002, 210, pp.115-121). Además, Olsen, R. H., et al. informan sobre el procedimiento de transformación y expresión en *Pseudomonas aeruginosa* (Journal of Bacteriology, 1982, 150, pp.60-69). Además, Grapner, S., et al. informan sobre el procedimiento de transformación y expresión en *Pseudomonas stutzeri* (Biomol. Eng., 2000, 17, pp.11-16). Sin embargo, el microorganismo del género *Pseudomonas* como células huésped para la expresión de la aldolasa no se limita a estos.

Con respecto al vector para introducir el gen de la aldolasa en el microorganismo del género *Pseudomonas*., puede utilizarse un plásmido con un origen de replicación funcionando dentro de las células del microorganismo del género *Pseudomonas*. Por ejemplo, Eza

Kalyaeva, et al. informan el plásmido PKLH4.05 con el replicón TFK funcionando en *Pseudomonas aeruginosa*. Además, también pueden utilizarse vectores denominados para intervalos de huéspedes amplios, que se utilizan para transformación de microorganismos Gram-negativos. Es sabido que entre estos vectores, por ejemplo, RK404 (Ditta, G., et al., Plasmid, 1985, 13, pp. 149-153) y RSF1010 (Frey, J., et al., Gene, 1982, 24, pp.289-296) funcionan en microorganismos de *Pseudomonas*.

Cuando el ADN de la SEQ ID Núm. 1 en el listado de secuencias se utiliza como el ADN que codifica la aldolasa, se genera la aldolasa de la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 o 3.

#### 10 (II) Condiciones de reacción para la reacción 2

Se describen a continuación las condiciones de reacción para la reacción 2 en caso del uso de un sistema enzimático.

Como la enzima que cataliza la reacción 2, puede utilizarse cualquier enzima que catalice la reacción para sintetizar el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (4) vía la condensación con aldol del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (3) y ácido oxaloacético o ácido pirúvico, sin limitación específica. En otras palabras, cualquiera enzima derivada de microorganismos u obtenida por tecnología de manipulación genética puede ser satisfactoria, a condición de que la enzima catalice la reacción.

20 Como tal enzima, es preferible la aldolasa descrita en el apartado (I) Enzima para uso en la reacción 2. En este caso, puede utilizarse la aldolasa obtenida por el cultivo de células microbianas que generan la aldolasa que cataliza la reacción 2 a partir de los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium* y *Xanthomonas*. Alternativamente, puede utilizarse la aldolasa obtenida por la preparación de un transformante que genera la aldolasa que cataliza la reacción mediante tecnología de ADN recombinante y por el cultivo posterior del transformante. La expresión "en presencia de una enzima" en la reacción 2 significa que se permite la existencia de una enzima en el sistema de reacción, mientras que la enzima esté en un estado que permita catalizar la reacción para preparar sintéticamente el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (4) a partir del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (3) y ácido oxaloacético o ácido pirúvico. Por ejemplo, la enzima puede añadirse sola al sistema de reacción o puede añadirse al sistema de reacción un microorganismo con la actividad de la enzima (microorganismo generador de aldolasa, células transformadas por ADN recombinante), un cultivo del microorganismo (cultivo líquido, cultivo sólido, etc.), un medio de cultivo (el cultivo del que se eliminan las células microbianas), y productos tratados del cultivo. En el caso en que se utiliza el cultivo del microorganismo, se



prosigue la reacción 2 mientras que el microorganismo es simultáneamente cultivado. De lo contrario, la reacción 2 se lleva a cabo en forma satisfactoria por el uso del cultivo preparado por el cultivo preliminar para obtener la enzima. Además, el término "tratamiento" significa tratamiento con el propósito de recuperar la enzima fuera de las células microbianas e incluye, por ejemplo, tratamientos con ultrasonificación, perlas de vidrio, prensa francesa, y liofilización y tratamientos con enzimas lisadas, disolventes orgánicos, detergentes y similares. Además, cualquier enzima fraccionada o enzima purificada preparada por el procesamiento adicional del producto tratado después de estos tratamientos por procedimientos rutinarios (cromatografía líquida, fraccionamiento por sulfato de amonio, etc.) puede ser satisfactoria, a condición de que la enzima en bruto o purificada tenga la capacidad requerida.

En el caso de la producción del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (4) por el uso de la bacteria que genera aldolasa o una célula transformada por ADN recombinante, los sustratos pueden añadirse al cultivo líquido durante el cultivo. De lo contrario, puede utilizarse cualquiera de las células microbianas separadas del cultivo líquido y de las células microbianas enjuagadas. Además, el producto tratado con células microbianas preparado por la ruptura o lisado de las células microbianas puede utilizarse como esté o la aldolasa recuperada del producto tratado con células microbianas se utiliza como una solución de enzima en bruto, a partir de la que la enzima también se purifica y utiliza.

Para utilizar el cultivo o el producto tratado, además, estos pueden incluirse en carragenano y poliacrilamida o pueden inmovilizarse sobre una película de sulfona de poliéter y celulosa regenerada para su uso.

Para proseguir la reacción 2 en presencia de una enzima, se ajusta una solución de reacción que contiene al menos uno del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (3), ácido oxaloacético o ácido pirúvico y la enzima que cataliza la reacción 2 a una temperatura adecuada de 20 a 50°C, que después se deja reposar o se bate o agita mientras se mantiene el pH de 6 a 12 durante de 30 minutos a 5 días.

La velocidad de la reacción puede aumentarse por la adición de cationes divalentes tales como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , y  $Co^{2+}$  a la solución de reacción. Desde el punto de vista del costo, preferentemente, a menudo puede utilizarse  $Mg^{2+}$ .

Para añadir estos cationes divalentes a la solución, puede utilizarse satisfactoriamente cualquier sal de los mismos a condición de que la sal no inhiba la reacción. Preferentemente, a menudo pueden utilizarse  $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$  o similares. Aquellos con experiencia en la técnica pueden determinar la concentración de estos cationes divalentes a añadir, mediante simples experimentos preliminares. Los cationes divalentes pueden añadirse dentro de un

intervalo de 0,01 mM a 10 mM, preferentemente 0,1 mM a 5 mM, más preferentemente 0,5 mM a 2 mM.

Se describe a continuación un ejemplo de las condiciones de reacción preferibles para llevar a cabo la reacción 2. A la solución de reacción que consiste en tampón 100 mM, ácido indol-3-pirúvico 50 mM, ácido pirúvico 250 mM,  $MgCl_2$  1 mM, y tolueno 1% v/v, se añaden 5 células microbianas de *E. coli* enjuagadas que expresan la aldolasa como la fuente de enzimas a 10% p/v, para reacción bajo agitación a 33°C durante 4 horas, para obtener ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico (IHOG).

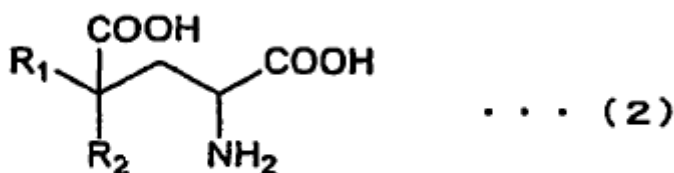
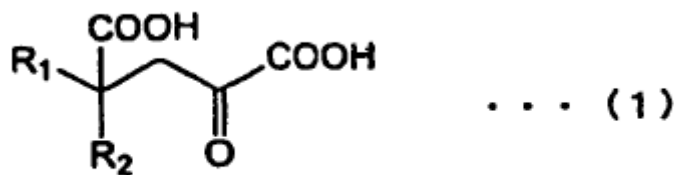
El ácido  $\alpha$ -ceto sustituido resultante de la fórmula general (4) puede separarse y 10 purificarse mediante procedimientos conocidos.

Por ejemplos, los procedimientos conocidos incluyen un procedimiento para poner el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido en contacto con una resina de intercambio iónico para adsorber aminoácidos básicos, y eluir y posteriormente cristalizar el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido resultante; y un procedimiento para eluir el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido, descolorar y filtrar el ácido  $\alpha$ -ceto 15 sustituido con carbón activo y después cristalizar el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido.

Vía la reacción 2, el ácido ceto precursor (IHOG) útil como un intermedio para la síntesis de monatina puede generarse a partir de ácido indol-3-pirúvico y ácido pirúvico (o ácido oxaloacético).

#### [C] Reacción 3

20 La reacción 3 de la invención es una reacción referida a la producción de monatina y preferentemente se utiliza para la síntesis de monatina a partir del ácido ceto precursor (IHOG). Sin embargo, la reacción 3 puede utilizarse no sólo para la síntesis de monatina sino que también se describe para la reacción de producción de derivados de glutamato de la fórmula general (2) a partir del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (1).



R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en un grupo fenilmetilo y un grupo 3-indolilmetilo.

En el caso en que R<sup>1</sup> sea un grupo 3-indolilmetilo y R<sup>2</sup> sea un grupo hidroxilo, es decir, que IHOG (ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico) se utilice como el ácido α-ceto sustituido de la fórmula general (1), puede obtenerse monatina como el derivado de glutamato de la fórmula general (2).

En el caso en que R<sup>1</sup> sea un grupo fenilmetilo y R<sup>2</sup> sea un grupo hidroxilo, es decir, que PHOG (ácido 4-fenilmetil-4-hidroxi-2-oxoglutarico) se utilice como el ácido α-ceto sustituido de la fórmula general (1), puede obtenerse un ácido 4-fenilmetil-4-hidroxi-glutámico (PHG) análogo de monatina como el derivado de glutamato de la fórmula general (2).

Como el ácido α-ceto sustituido representado por la fórmula general (1) como el sustrato, preferentemente se utiliza el ácido α-ceto sustituido de la fórmula general (4) de acuerdo con lo obtenido por el procedimiento descrito en el apartado [B] Reacción 2. Más preferentemente, se utiliza IHOG preparado por el procedimiento del apartado [B] Reacción 2, por el uso del ácido indol-3-pirúvico preparado por el procedimiento descrito en el apartado [A] Reacción 1. Sin embargo, razonablemente, el procedimiento para preparar el ácido α-ceto sustituido representado por la fórmula general (1) no se limita a estos procedimientos descritos con anterioridad. La reacción 3 utiliza la reacción de una transaminasa que cataliza la reacción para generar un aminoácido correspondiente al ácido α-ceto sustituido como el sustrato. La reacción 3 se refiere, por ejemplo, a un procedimiento para producir derivados de glutamato mediante la reacción de una transaminasa que cataliza la transaminación o un microorganismo que genera la proteína. En la presente, el término "transaminación" significa una reacción para

convertir un compuesto de cetona precursor en el compuesto amino correspondiente por la transferencia del grupo amino del sustrato donante al grupo cetona del compuesto aceptador.

El modo para llevar a cabo la reacción 3 de la invención se describe a continuación en detalle en el siguiente orden.

5 (C-1) Enzima para uso en la reacción 3

(C-2) Condiciones de reacción para la reacción 3.

(C-1) Enzima que cataliza la reacción para generar aminoácidos

Para la reacción 3, la enzima que cataliza la reacción para generar un aminoácido correspondiente al ácido  $\alpha$ -ceto sustituido cuando el sustrato individualmente es una transaminasa como una enzima que cataliza la transaminación.

La transaminasa para uso en la reacción 3 es satisfactoriamente una enzima que cataliza la reacción para generar un derivado de glutamato a partir de un ácido  $\alpha$ -ceto sustituido correspondiente y un donante de amino como los materiales de inicio. Vía la acción de una transaminasa tal el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (1) puede convertirse en el derivado de glutamato correspondiente (representado por la fórmula general (2)).

Como un donante de amino, se utiliza un compuesto que contiene un grupo amino. Por ejemplo, el compuesto incluye compuestos de amino tales como L-aminoácidos y D-aminoácidos naturales y no naturales. Específicamente, los aminoácidos incluyen, por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, triptófano, fenilalanina, isoleucina, leucina, tirosina, valina, arginina, asparagina, glutamina, metionina, ornitina, serina, cisteína, histidina y lisina. El donante de amino a ser añadido para la reacción puede ser uno de tipo simple o una mezcla de tipos plurales de tales donantes.

En general, la L-aminoácido transaminasa genera un L-aminoácido pretendido mediante la transferencia del grupo amino de un donante de L-aminoácidos al ácido ceto precursor, mientras que la D-aminoácido transaminasa genera un D-aminoácido pretendido mediante la transferencia del grupo amino de un donante de D-aminoácido al ácido ceto precursor. Vía la selección de tal enzima, también puede seleccionarse un isómero óptico de un derivado de glutamato a ser generado. Por ejemplo, la reacción con D-aminoácido transaminasa en presencia de D-aminoácidos tales como D-alanina, ácido D-glutámico y ácido D-aspártico puede generar selectivamente derivados de D-glutamato a partir del ácido ceto precursor.

De acuerdo con lo descrito con anterioridad, monatina como uno de los derivados de glutamato como el objetivo de la invención incluye tres isómeros ópticos además del tipo natural (2S, 4S). Se ha confirmado que cualquiera de estos isómeros tiene intensidades de dulzura varias cientos de veces a algunas miles de veces más en comparación con sacarosa.

En una de las realizaciones preferibles de acuerdo con la invención, la reacción de la D-aminoácido transaminasa con el ácido ceto precursor para monatina puede generar la forma 2R de monatina en forma estéreo-selectiva, mientras que la reacción de la L-aminoácido transaminasa con el precursor puede generar la forma 2S de monatina en forma estéreo-selectiva. En una de las realizaciones más preferibles, el uso de la D-aminoácido transaminasa puede generar en forma selectiva la forma 2R de la misma como un isómero que tiene un nivel de dulzura superior.

Cuando se pretende utilizar D-aminoácido como un donante de amino, en la presente, el L-aminoácido correspondiente se añade a la solución de reacción para permitir la existencia concurrente del aminoácido con una enzima que cataliza la reacción de racemización del aminoácido, para que el donante pueda suministrarse como un donante de D-aminoácido. Como tal enzima de racemización, los ejemplos preferibles de la misma incluyen alanina racemasa, ácido glutámico racemasa, ácido aspártico racemasa, y fenilalanina racemasa. En este caso, L-alanina, ácido L-glutámico, L-fenilalanina, ácido L-aspártico o mezclas racémicas de estos L-aminoácidos pueden añadirse a la solución de reacción, mientras que los derivados de D-glutamato están en procedimiento de generación.

La enzima que cataliza la transaminación también puede prepararse mediante el cultivo de un microorganismo que genera tal enzima. Tal microorganismo incluye, por ejemplo, microorganismo de los géneros *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Escherichia*, *Proteus*, *Morganella* y *Paenibacillus*.

Específicamente, estos microorganismos incluyen, por ejemplo, los descritos a continuación. En otras palabras, el microorganismo que genera L-aminoácido transaminasa con una actividad para generar derivados de glutamato descritos en la fórmula general (2) a partir del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido descrito en la fórmula general (1) incluyen los siguientes ejemplos.

- *Aeromonas hydrophila* IFO3820
- *Agrobacterium tumefaciens* IF03058
- *Alcaligenes faecalis* ATCC8750
- *Beijerinckia indica* ATCC9037
- *Escherichia coli* ATCC12814
- *Proteus rettgeri* IFO13501
- *Morganella morganii* IFO3848

Además, los microorganismos que generan D-aminoácido transaminasa incluyen los siguientes ejemplos.

- *Bacillus sphaericus* ATCC10208

- Bacillus pulvifaciens AJ1327
- Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens ATCC13537
- Bacillus macerans AJ1617
- Paenibacillus macerans ATCC8244
- 5 • Bacillus lentus AJ12699
- Bacillus lentus ATCC10840

En la presente, se ha depositado Bacillus macerans AJ1617 de acuerdo con lo presentado a continuación.

Cepa AJ1617 de Bacillus macerans

10 (a) Núm. de Acceso FERM BP-8243 (transferido a partir de FERM P-18653 a International Patent Organism Depository, 22 de Noviembre de 2002).

(b) Fecha de Deposición: 13 de Diciembre de 2001

(c) Organización Depositaria: International Patent Organism Depository, The Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Núm. 6, Chuo, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 15 Japón).

Los microorganismos pueden satisfactoriamente ser cepas microbianas recientemente separadas de las fuentes naturales, tales como suelo o plantas o pueden satisfactoriamente ser cepas microbianas artificialmente preparadas por el tratamiento con químicos mutagénicos y tecnología de ADN recombinante.

20 En una de las realizaciones preferibles de acuerdo con la invención, un gen pretendido que codifica una enzima que cataliza la transaminación pretendida a partir del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido a derivados de glutamato también puede integrarse en células microbianas. Se han conocido numerosos ejemplos para preparar proteínas útiles tales como enzima y sustancias fisiológicamente activas por el uso de tecnología de ADN recombinante. El uso de tecnología 25 de ADN recombinante permite la preparación a gran escala de proteínas útiles a partir de orígenes naturales en una cantidad ínfima. El gen a integrar incluye genes de L-aminoácido transaminasa y genes de D-aminoácido transaminasa. Un ejemplo posible es la introducción de genes de D-aminoácido transaminasa de Bacillus sphaericus o Bacillus macerans en microorganismos.

30 La Publicación de Patente Europea 0736604 y Taylor, et al., Journal of Bacteriol., 1998, Vol. 180, No. 16, p. 4319 informan sobre el gen de D-aminoácido transaminasa derivado de Bacillus sphaericus.

Como el gen de la D-aminoácido transaminasa derivado de Bacillus macerans, además, puede utilizarse el ADN del gen de la D-aminoácido transaminasa derivado de Bacillus 35 macerans, que se describe como SEQ ID Núm. 17 en el listado de secuencias. Cuando se

utiliza el ADN del gen de la D-aminoácido transaminasa derivado de *Bacillus macerans* descrito como SEQ ID Núm. 17 en el listado de secuencias, puede obtenerse la D-aminoácido transaminasa descrita como SEQ ID Núm. 18 en el listado de secuencias. En la presente, el gen que codifica la D-aminoácido transaminasa a partir de *Bacillus macerans* y la secuencia de aminoácido del mismo son dilucidados en primer lugar por los inventores.

El origen del gen de la D-aminoácido transaminasa no se limita a éste. Cualquier gen que codifique la D-aminoácido transaminasa que genera un derivado de D-glutamato pretendido puede ser satisfactorio.

En el caso de la producción a gran escala de una proteína por el uso de tecnología de ADN recombinante, pueden utilizarse como células huésped a transformar, células microbianas, células actinomicetales, células de levadura, células de hongos, células de plantas, células de animales o similares. Entre estos, los microorganismos para los que existe el conocimiento con tecnología con ADN recombinante incluyen, por ejemplo, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* and *Escherichia coli*. Gracias a numerosos hallazgos concernientes a la técnica para la producción a gran escala de proteína por el uso de bacterias de *Escherichia*, en general se utilizan bacterias de *Escherichia*. Preferentemente, se utiliza *Escherichia coli*.

Por el uso de vectores tales como plásmido o fago que portan el gen pretendido de una transaminasa, el gen puede satisfactoriamente introducirse en estos microorganismos. De lo contrario, el gen pretendido puede satisfactoriamente integrarse sobre el cromosoma de la célula por recombinación homóloga. Son preferibles los denominados vectores plásmidos multicopia que incluyen, por ejemplo, plásmidos con un origen de replicación como el derivado de Col E1 como el vector para *Escherichia coli*, que son, por ejemplo, plásmidos de base pUC, plásmidos de base pBR322 o derivados de los mismos. Para estos vectores, pueden utilizarse promotores para uso general en la producción de proteínas en *Escherichia coli* como el promotor para expresar el gen de transaminasa pretendido e incluyen promotores resistentes, por ejemplo, promotor T7 promotor trp, promotor lac, promotor tac y promotor PL. Para aumentar la productividad, un finalizador como una secuencia de finalización de la transcripción preferentemente se conjuga corriente abajo del gen de la proteína. Tal finalizador incluye, por ejemplo, finalizador T7, finalizador de fagos fd, finalizador T4, finalizadores para un gen resistente a tetraciclina, y finalizadores para el gen A trp de *Escherichia coli*. Además, para evaluar los transformantes, preferentemente, el vector tiene un marcador tal como un gen resistente a ampicilina. Como tales plásmidos, se encuentran comercialmente disponibles vectores de expresión con promotores resistentes, tales como la serie pUC (fabricada por

TAKARA BIO INC.), la serie pPROK (fabricada por Clontech Laboratories, Inc.), y pKK233-2 (fabricada por Clontech Laboratories, Inc.).

Para un procedimiento para cultivar un microorganismo que genera una enzima para uso en la reacción 3, pueden utilizarse medios de cultivo para uso general en el campo, a saber, medios de cultivo que contienen fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, sales con vestigios metálicos y vitaminas. Dependiendo del tipo de un microorganismo o de las condiciones de cultivo, se añaden aproximadamente 0,1 a 1,0 g/dl de compuestos de amino tales como aminoácido a tal medio de cultivo, para promover la actividad de transaminación.

En el caso del cultivo de células recombinantes genéticas, pueden adecuadamente añadirse químicos tales como ampicilina, canamicina, neomicina y cloramfenicol en una forma que depende del marcador seleccionado para el vector. Dependiendo del promotor portado sobre el vector, el nivel de expresión del gen recombinante puede elevarse mediante la adición de una cantidad adecuada de un agente de inducción. En el caso de la conjugación de un gen pretendido corriente abajo del promotor tac para construir un vector, en un ejemplo, posiblemente se añade 1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosida de isopropilo (IPTG) en una cantidad a un intervalo de concentración final de 0,1 mM a 5 mM. En cambio, puede añadirse adecuadamente galactosa a una concentración final de 0,1 a 5 g/dl, preferentemente 0,5 g/dl a 2 g/dl.

Como sustancias para uso como los componentes del medio de cultivo, por ejemplo, cualquier fuente de carbono que pueda ser utilizada por el microorganismo a utilizar puede ser satisfactoria sin limitación específica. Por ejemplo, puede utilizarse glucosa, sacarosa, fructosa, glicerol y ácido acético o mezclas de los mismos. Como la fuente de nitrógeno, puede utilizarse sulfato de amonio, cloruro de amonio, urea, extracto de levadura, extracto de carne, licor de maíz fermentado, y productos hidrolizados con caseína o mezclas de los mismos. Como una composición de un medio de cultivo, por ejemplo, se menciona un medio de cultivo que contiene ácido fumárico 0,5 g/dl, extracto de levadura 1 g/dl, peptona 1 g/dl, sulfato de amonio 0,3 g/dl,  $K_2HPO_4$  0,3 g/dl,  $K_2HPO_4$  0,1 g/dl,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1 mg/dl, y  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  1 mg/dl, pH 7,0.

La temperatura de cultivo en general está dentro de un intervalo en el que los microorganismos utilizados pueden crecer, a saber, un intervalo de 10 a 45°C. La temperatura está preferentemente dentro de un intervalo de 20 a 40°C, más preferentemente dentro de un intervalo de 25 a 37°C. El pH del medio de cultivo se ajusta a un intervalo de preferentemente 2 a 12, más preferentemente 3 a 10, aún más preferentemente 4 a 8. Las condiciones de aireación se ajustan a condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos



utilizados. Son preferibles las condiciones aeróbicas. El período de cultivo es en general de aproximadamente 12 a 120 horas, preferentemente de aproximadamente 24 a 96 horas.

(C-2) Condiciones de reacción para la reacción 3

La reacción 3 característicamente produce derivados de glutamato de la fórmula general (2) a partir del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (1).

La expresión "en presencia de una transaminasa" para la reacción 3 significa que la transaminasa debe existir en un estado que le permita la generación de derivados de glutamato de la fórmula general (2) a partir del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (1) en el sistema de reacción. En otras palabras, la transaminasa puede existir en cualquier estado en el sistema de reacción a condición de que la transaminasa pueda convertir el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (1) en el derivado de glutamato de la fórmula general (2). Por ejemplo, la transaminasa puede añadirse sola al sistema de reacción. De lo contrario, también puede añadirse al sistema de reacción un microorganismo con la actividad de transaminasa (microorganismo que genere la transaminasa, células transformadas con ADN recombinante), un cultivo del microorganismo (cultivo líquido, cultivo sólido, etc.), un medio de cultivo (cultivos a partir de los que se eliminan preliminarmente células microbianas), y productos tratados del cultivo. En el caso del uso de cultivos de microorganismos, la reacción 3 puede satisfactoriamente proseguirse en forma concurrente con el cultivo de los microorganismos, o la reacción 3 puede llevarse a cabo por el uso de cultivos preliminarmente preparados para obtener la enzima. En la presente, el término "tratamiento" significa tratamiento con el propósito de recuperar la transaminasa en células microbianas e incluye, por ejemplo, tratamientos con ultrasonificación, perlas de vidrio, prensa francesa, y liofilización y tratamientos con enzima lisada, disolventes orgánicos, detergentes y similares. Los productos tratados según estos tratamientos pueden tratarse por procedimientos de rutina (cromatografía líquida, fraccionamiento con sulfato de amonio y similares) para recuperar transaminasas fraccionadas en bruto o transaminasa purificadas. Cuando estas transaminasas tienen la capacidad requerida, también pueden utilizarse.

Además, cuando se utiliza el cultivo o producto tratado puede incluirse en gel de carragenano o poliacrilamida o puede inmovilizarse sobre películas de sulfona de poliéter, celulosa regenerada y similares.

En la reacción 3, el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido como el sustrato incluye, por ejemplo, el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (1).

El sistema de reacción puede satisfactoriamente contener coenzimas, detergentes, disolventes orgánicos y similares para acelerar la reacción. Con el fin de aumentar la permeabilidad del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido como el sustrato en células microbianas, por ejemplo,

también pueden utilizarse detergentes tales como Triton X y Tween y disolventes orgánicos tales como tolueno y xileno. Además, también pueden añadirse coenzimas tales como piridoxal-5-fosfato al medio de cultivo.

5 En el caso de la división del cultivo para la generación de la transaminasa y la reacción 3 y la puesta en práctica de estas etapas en forma secuencial, la última etapa de la reacción 3 no se lleva a cabo necesariamente en una atmósfera aeróbica. En cambio, en una atmósfera anaeróbica la reacción 3 puede llevarse a cabo en un sistema de reacción en el que se elimina el oxígeno disuelto en la solución de reacción con la sustitución con gas de nitrógeno, la sustitución con gas de argón y la adición de sulfito de sodio. En cuanto a la temperatura de  
10 reacción, en general, la reacción se conduce dentro de un intervalo de temperatura en el que la transaminasa utiliza puede ser activa, preferentemente dentro de un intervalo de 10 a 50°C, más preferentemente dentro de un intervalo de 20 a 40°C, y aún más preferentemente dentro de un intervalo de 25 a 37°C. El pH de la solución de reacción se ajusta a un intervalo de, en general, 2 a 12, preferentemente 6 a 11 y más preferentemente 7 a 9. El tiempo de reacción es,  
15 en general, de aproximadamente 1 a 120 horas, preferentemente de aproximadamente 1 a 72 horas y más preferentemente de aproximadamente 1 a 24 horas.

En el caso de la determinación de las cantidades del derivado de glutamato o del ácido  $\alpha$ -ceto sustituido en el cultivo líquido o la solución de reacción, además, el derivado de glutamato o el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido pueden ensayarse en forma inmediata por el uso de  
20 procedimientos bien conocidos. Para un procedimiento simple, puede utilizarse cromatografía sobre cada delgada por el uso de "Silica gel 60F254" fabricado Merck Ltd. Para mejorar la precisión analítica, puede utilizarse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en la que se utilizan columnas de resolución óptica tales como "Inertsil ODS-80A" fabricada por GL Sciences, Inc. y "CROWNPAK CR (+)" fabricada por Daicel Chemical Industries, Ltd. En tal  
25 forma, el derivado de glutamato acumulado en el cultivo líquido o la solución de reacción puede recolectarse del cultivo líquido o la solución de reacción por procedimientos de rutina, antes del uso. Para la recolección a partir del cultivo líquido o la solución de reacción, puede utilizarse una combinación adecuada de medidas bien conocidas para uso general en este campo, por ejemplo procedimientos tales como filtración, centrifugación, concentración al vacío,  
30 intercambio iónico, cromatografía por adsorción y cristalización.

El derivado de glutamato pretendido puede obtenerse en la forma libre. En caso de ser necesario, el derivado de glutamato también puede recuperarse en una forma salina del mismo. La forma salina incluye sales del mismo con bases. Por ejemplo, se mencionan bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de calcio y bases  
35 orgánicas tales como amoníaco y varias aminas.

## Ejemplos

La invención se describe en detalle en los siguientes ejemplos

## Ejemplo 1 (ejemplo comparativo)

El Ejemplo 1 se refiere a la reacción 1 de la desvelación. En el Ejemplo 1, se midieron L-triptófano, ácido indol-3-pirúvico y ácido indolacético por cromatografía líquida de alto rendimiento (columna: Inertsil ODS-2 (4,6 X 250 mm); Temperatura de columna: 40°C; eluato:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M- $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH = 2,80)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  =1/9 a 5/5; caudal de 1,0 ml/min; detección: UV 210 nm).

(1-1) Generación de ácido indol-3-pirúvico a partir de L-Trp vía la reacción de células microbianas con actividad de aminoácido oxidasa

50 ml de un medio de cultivo, pH 7,0 que contenía extracto de levadura 1 g/dl, polipeptona 1 g/dl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,3 g/dl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,3 g/dl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1 g/dl,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05 g/dl,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mg/dl, y  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1 mg/dl se colocaron en un matraz Sakaguchi de 500 ml para esterilización a 110°C durante 10 minutos.

Una ansada de *Achromobacter* sp. AJ2425, *Proteus rettgeri* IFO13501 o *Morganella morganii* IFO3168 preliminarmente cultivadas en un medio de cultivo de caldo de agar a 30°C durante 24 horas se inoculó al medio de cultivo y se cultivó bajo agitación a 30°C durante 24 horas. Después del cultivo, se cosecharon células microbianas del cultivo por centrifugación, individualmente enjuagadas en 50 ml de tampón de Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, y se prepararon como células microbianas enjuagas, nuevamente por centrifugación.

Estas células microbianas humectadas se añadieron a una solución de reacción de L-triptófano 1 g/dl y tampón de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 en un peso de células microbianas humectadas de 1% p/v. Se transfirió 1 ml de la solución de reacción a un tubo de ensayo de 5 ml, para agitación a 30°C durante 1 hora para reacción. Una vez completa la reacción, se midió la cantidad generada de ácido indol-3-pirúvico, la cantidad de L-triptófano residual (L-Trp) y la cantidad del subproducto ácido indolacético (IAA) (véase la Tabla 1).

Tabla 1 Cantidad de ácido indol pirúvico generada a partir de L-triptófano

Cepas	L-Trp (g/dl)	IPA (g/dl)	IAA (g/dl)
<i>Achromobacter</i> sp. AJ2425	0,02	0,97	0,03
<i>Proteus rettgeri</i> IFO13501	0	0,98	0,03
<i>Morganella morganii</i> IFO3168	0	0,99	0,02

Por consiguiente, se acumuló ácido indol-3-pirúvico de 0,97 a 0,99 g/dl en cualquiera de los lotes experimentales en los que se llevó a cabo la reacción con las células microbianas enjuagadas. Por lo tanto, se generó ácido indol-3-pirúvico en forma casi totalmente cuantitativa a partir de L-triptófano 1 g/dl.

5 (1-2) Recuperación de ácido indol-3-pirúvico por tratamiento de sustitución con gas de nitrógeno de la solución de reacción con las células microbianas enjuagadas de *Morganella morganii* IFO3168 y cristalización en ácido clorhídrico

(a) Preparación de la solución de reacción con las células microbianas enjuagadas de *Morganella morganii* IFO3168

10 Por el mismo procedimiento de (1-1), se prepararon las células microbianas enjuagadas de *Morganella morganii* IFO3168. Se prepararon seis matraces Sakaguchi que contenían 50 ml de la solución de reacción de L-triptófano 1 g/dl y tampón de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Las células microbianas humectadas preparadas se añadieron a los matraces individuales en un peso de células microbianas humectadas de 1% p/v, para reacción bajo agitación a 30°C durante 1 hora. Una vez completa la reacción, las células microbianas se eliminaron por  
15 centrifugación, para obtener la solución de reacción de aproximadamente 290 ml.

(b) Recuperación de ácido indol-3-pirúvico por la sustitución con gas de nitrógeno de la solución de reacción y cristalización de ácido

Se transfirieron 74 ml de la solución de reacción obtenida en (a) a un matraz de fondo  
20 redondo, para sustitución con gas de nitrógeno. Se añadió ácido clorhídrico para ajustar la solución de reacción a pH 2 o menos. Se añadieron 15 ml de ácido clorhídrico 6 N a 74 ml de la solución de reacción (a una concentración final de ácido clorhídrico de aproximadamente 1 N), y la mezcla se agitó a 20°C. Durante el procedimiento, se depositó el cristal. 24 horas después, se filtró la mezcla. El cristal resultante se enjuagó en 15 ml de agua. El cristal mojado así  
25 obtenido se secó a presión reducida a 40°C, y la cantidad de ácido indol-3-pirúvico obtenido fue de 684 mg (rendimiento del 79,5% a partir del material de inicio triptófano). El ácido indol-3-pirúvico resultante fue un cristal amarillento blanco, y el contenido fue de 97,2% en peso según cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

30 (c) Recuperación de ácido indol-3-pirúvico por cristalización de ácido de la solución de reacción

Se transfirieron 66 ml de la solución de reacción obtenida en (a) a un matraz de fondo redondo. Se añadieron 13 ml de ácido clorhídrico 6 N para ajustar la solución de reacción de pH 2 o menos y se agitaron a 20°C. Durante el procedimiento, se depositó el cristal. 24 horas después, se filtró la mezcla. El cristal resultante se enjuagó en 13 ml de agua. El cristal mojado  
35 así obtenido se secó a presión reducida a 40°C, para obtener 538 mg de ácido indol-3-pirúvico

(rendimiento del 58,2% a partir del material de inicio triptófano). El ácido indol-3-pirúvico resultante fue un cristal marrón oscuro, y el contenido fue de 80,5% en peso medido por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

(d) Comparación del ácido indol-3-pirúvico obtenido

5 El ácido indol-3-pirúvico (IPA) así obtenido en (b) se comparó con el obtenido en (c) en términos de la calidad del cristal (véase la Tabla 2).

De acuerdo con lo aparentemente mostrado a partir de estos resultados, el lote (b) que tenía en su haber una sustitución con gas de nitrógeno incluía un mayor contenido de IPA y un contenido reducido del subproducto ácido indolacético (IAA) como una impureza en el cristal. Además, se suspendió el coloreado del cristal resultante en el lote que tenía en su haber una sustitución con gas de nitrógeno. Los cristales en los lotes individuales se diluyeron a 10 mg/dl, sobre lo que después se midió la transmitancia a 450 nm y 400 nm. Se confirmó que se redujo la transmitancia en el lote con sustitución con gas de nitrógeno, es decir, que se suprimió el coloreado vía descomposición.

15 Tabla 2 Calidad del cristal de IPA

	Con sustitución con nitrógeno (b)	Sin sustitución con nitrógeno (c)
Contenido de IPA en el cristal	97,30%	80,50%
Contenido de IAA en el cristal	0,18%	1,54%
Color del cristal	blanco amarillento	marrón oscuro
Transmitancia (450 nm)	T 96,9%	T 82,9%
Transmitancia (400 nm)	T 94,1%	T 75,9%

De acuerdo con lo aparentemente mostrado en los resultados, ácido indol-3-pirúvico puede producirse eficientemente a partir de triptófano en una forma simple.

Ejemplo 2 (ejemplo comparativo)

20 En el Ejemplo 2, la reacción 2 se lleva a cabo por el uso de un sistema químico sintético.

(2-1) Síntesis del ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico (IHOG)

7,50 g de ácido indol-3-pirúvico (35,8 mmol; contenido del 97,0% en peso) y 14,18 g de ácido oxaloacético (107,4 mmol) se añadieron a y disolvieron en 64,45 ml de agua mediante la disolución preliminar de 18,91 g de hidróxido de potasio (286,5 mmol; contenido del 85 % en peso) en la misma. La solución de mezcla se agitó a 35°C durante 24 horas.

Además, se añadieron 40,0 ml de ácido clorhídrico 3N para neutralización (pH 7,0), para obtener una solución de reacción neutralizada de 153,5 g. La solución de reacción neutralizada contenía 5,55 g de IHOG, entonces el rendimiento fue del 53,3 % (vs. ácido indol-3-pirúvico).

Se añadió agua a la solución de reacción neutralizada a 168 ml y se pasó a través de una columna de resina (diámetro de 4,8 cm) empacada con 840 ml de un adsorbente sintético (DIAION-SP207 fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation). Además, se pasó agua pura a través de la columna en un caudal de 23,5 ml/minuto, para recolectar 1,73 a 2,55 (L/L-R) para obtener una solución acuosa que contenía 3,04 g de IHOG de alta pureza en un rendimiento del 54,7% (vs. la cantidad cargada a la resina).

(Medición por RMN)

RMN-<sup>1</sup>H (400MHz, D<sub>2</sub>O): 3,03 (d, 1H, J = 14,6 Hz), 3,11(d, 1H, J = 14,6 Hz), 3,21(d, 1H, J= 18,1 Hz), 3,40 (d, 1H, J = 18,1 Hz), 7,06-7,15 (m, 3H), 7,39 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,66 (d, 1H, J = 7,8 Hz).

RMN-<sup>13</sup>C (100MHz, D<sub>2</sub>O): 35,43, 47,91, 77,28, 109,49, 112,05, 119,44, 119,67, 121,91, 125,42,128,41, 136,21, 169,78, 181,43, 203,58.

(2-2) Síntesis del ácido 4-fenilmetil-4-hidroxi-2-oxoglutárico (PHOG)

Se añadieron 5,0 g (30,5 mmol) de ácido fenilpirúvico y 12,1 g (91,4 mmol) de ácido oxaloacético a 25 ml de agua mediante la disolución preliminar de 13,8 g de hidróxido de potasio (pureza del 85%) en la misma, para reacción a temperatura ambiente 72 horas. Por el uso del ácido clorhídrico concentrado, la solución de reacción se ajustó a pH 2,2, para extracción en acetato de etilo. La capa orgánica se enjuagó con cloruro de sodio saturado acuoso, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró, para obtener el residuo. El residuo se recristalizó en acetato de etilo y tolueno, para obtener 2,8 g de PHOG (11,3 mmol) en cristal.

(Medición por RMN)

RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ: 2,48 (d, J=14,4 Hz, 0,18 H), 2,60 (d, J= 14,4 Hz, 0,18 H), 2,85 - 3,30 (m, 3,64 H), 7,17 - 7,36 (m, 5 H)

(Medición del peso molecular)

Valor teórico por ESI-MS: C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> = 252,23

Valor experimental: 251,22 (MH-)

Ejemplo 3 (ejemplo comparativo)

En el Ejemplo 3, la reacción 2 se lleva a cabo por el uso de un sistema enzimático. En el Ejemplo 3, en la presente, IHOG y PHOG utilizados como sustratos se prepararon sintéticamente por el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

(3-1) Evaluación del microorganismo con la actividad de aldolasa para PHOG (denominada en adelante actividad de PHOG)

Se llevó a cabo la evaluación de las cepas microbianas que tenían la actividad de aldolasa, en las que se utilizó ácido 4-fenilmetil-4-hidroxi-2-oxoglutarico (PHOG) como un sustrato.

Se inocularon microorganismos de ensayo (bacterias y levadura) sobre un medio de cultivo de una placa de caldo (Eiken Chemical Co., Ltd.), para un cultivo a 30°C durante 24 horas. El cultivo resultante se inoculó sobre una placa que contenía glicerol 0,5 g/dl, ácido fumárico 0,5 g/dl, extracto de levadura 0,3 g/dl, peptona 0,2 g/dl, sulfato de amonio 0,3 g/dl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/dl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 g/dl, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 0,05 g/dl, ftalato de sodio 0,25 g/dl, y polvo de agar (pH 6,5) 2 g/dl, para un cultivo a 30°C durante 24 horas. Las células microbianas resultantes se inocularon en una solución de reacción de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, PHOG 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, solución de fosfato de amonio 5 mM (KPi) y tolueno 1% v/v en un peso de células microbianas humectadas de aproximadamente 1% p/v, para reacción a 30°C durante 24 horas. La concentración del ácido pirúvico libre en la solución de reacción se midió por un procedimiento enzimático por el uso de deshidrogenasa de lactato (LDH). Se añadieron 10 µl de muestra a 200 µl de una solución de reacción de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NADH 1,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, y LDH 25 U/ml, para incubación a 30°C durante 10 minutos. La absorbancia a 340 mM se midió tras la reacción, para determinar la cantidad de ácido pirúvico en la muestra, con base en la cantidad de NADH reducida.

Además, la cantidad del ácido fenilpirúvico generado se ensayó por un análisis de HPLC por el uso de "Inertsil ODS-2" (5 µm, 4,6 X 250 mm) fabricada por GL Sciences, Inc. Se presentan a continuación las condiciones analíticas.

Fase móvil: acetonitrilo 20% v/v/solución de ácido trifluoroacético acuoso 0,05% v/v

Caudal: 1 ml/min

Temperatura de columna: 40°C

Detección: UV 210 nm.

Bajo estas condiciones, se eluyó PHOG en un tiempo de retención de aproximadamente 9,8 minutos, mientras se eluía ácido fenilpirúvico en un tiempo de retención de aproximadamente 12 minutos. Estos se fraccionaron y ensayaron individualmente.

El valor de la cantidad de ácido pirúvico o ácido fenilpirúvico generado a partir de PHOG en el lote con adición de células microbianas de ensayo menos su cantidad en el lote de control (sin el lote con adición de células microbianas) se definió como la cantidad de los mismos generada con aldolasa. Por consiguiente, la actividad de aldolasa para el sustrato PHOG se halló en las cepas microbianas mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3 Resultados de la evaluación de cepas microbianas con actividad de aldolasa PHOG

Cepas	Ácido pirúvico (mM)	Ácido fenilpirúvico (mM)
<i>Pseudomonas taetrolens</i> ATCC4683	34,9	35,0
<i>Pseudomonas coronafaciens</i> AJ2791	33,6	33,9
<i>Pseudomonas desmolytica</i> AJ1582	1,1	2,9
<i>Erwinia</i> sp. AJ2917	0,8	3,0
<i>Flavobacterium rhenanum</i> AJ2468	3,0	6,1
<i>Xanthomonas citri</i> AJ2797	1,0	3,2

Se seleccionó *Pseudomonas taetrolens* ATCC4683, y se examinó la reacción sintética de PHOG a partir de ácido fenilpirúvico y ácido oxaloacético o ácido pirúvico. Las células microbianas de *P. taetrolens* ATCC4683 (AJ2212) se inocularon en una solución de reacción de Tris 100 mM-HCl, pH 8,0, ácido fenilpirúvico 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, KPi5 mM, ácido oxaloacético o ácido pirúvico 100 mM y tolueno 1% p/p en una concentración final de aproximadamente 1% p/v, para reacción a 30°C durante 16 horas. Una vez completa la reacción, la cantidad de PHOG generada se ensayó por HPLC. La cantidad de PHOG generado a partir de ácido fenilpirúvico y ácido oxaloacético o ácido pirúvico se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4 Cantidad de PHOG generada a partir de ácido fenilpirúvico y ácido oxaloacético o ácido pirúvico

	Lote de ácido oxaloacético	Lote de ácido pirúvico
Lote con células microbianas añadidas	14,3 mM	9,3 mM
Lote de control (Mg añadido)	8,6	1,7
Lote de control (sin Mg añadido)	Cantidad ínfima	N.D.

La Tabla 4 muestra que la cantidad de PHOG generada en el lote con adición de células microbianas aumentó y que la actividad de aldolasa puede generar PHOG a partir de cualquier combinación de ácido fenilpirúvico + ácido oxaloacético y de ácido fenilpirúvico + ácido pirúvico.



(3-2) Purificación de aldolasa derivada de *Pseudomonas taetrolens* ATCC4683 para IHOG

Se purificó aldolasa para IHOG (en adelante a menudo denominada aldolasa de IHOG) de acuerdo con lo presentado a continuación a partir de una fracción soluble de la *P. taetrolens* cepa ATCC4683. En cuanto al ensayo de la actividad de aldolasa, se midió la actividad de descomposición de aldol (retroaldol) por el uso de PHOG como el sustrato bajo las siguientes condiciones.

Condiciones de reacción: Tris 50 mM-HCl, pH 8,0, PHOG 2 mM, NADH 0,2 mM, KPi 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, deshidrogenasa de lactato 16 U/ml, y enzima 3 µl/solución de reacción 600 µl, para la medición de absorbancia a 30°C y 340 nm.

#### 1. Preparación de la fracción soluble:

Una ansada de las células microbianas de *P. taetrolens* ATCC4683, *Proteus rettgeri* IFO13501 o *Morganella morganii* IF03168 preliminarmente cultivadas en un medio de cultivo de placa de caldo a 30°C durante 24 horas se inoculó en un matraz de 500 ml que contenía 50 ml de un medio de cultivo generador de enzima (glicerol 0,5 g/dl, ácido fumárico 0,5 g/dl, sulfato de amonio 0,5 g/dl, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g/dl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 g/dl, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 0,05 g/dl, extracto de levadura 0,3 g/dl, peptona 0,2 g/dl, ftalato de sodio 0,25 g/dl, y Antifoam A 0,005% (fabricado por Sigma), tras el ajuste a pH 6,5 con KOH), para un cultivo bajo agitación a 30°C durante 24 horas. Se inocularon 0,5 ml del cultivo líquido en 40 matraces con un volumen de 500 ml, cada uno de los matraces contenía 50 ml del medio de cultivo generador de enzima, para un cultivo bajo agitación a 30°C durante 24 horas. Las células microbianas se cosecharon a partir del cultivo líquido resultante por centrifugación, y se suspendieron y lavaron en tampón A (Tris 20 mM-HCl, pH 7,6), seguido nuevamente por centrifugación para cosechar las células microbianas. Las células microbianas lavadas resultantes se suspendieron en 200 ml de tampón A, para ruptura ultrasónica a 4°C durante 30 minutos. Tras la ruptura, la solución se centrifugó (X 8.000 rpm, 10 minutos en dos oportunidades) para eliminar las células microbianas residuales, seguido por ultra-centrifugación adicional (X 50.000 rpm, 30 minutos) para recuperar el sobrenadante resultante, que se definió como fracción soluble.

#### 2. Cromatografía de intercambio aniónico: Q-Sefarosa FF

Se trataron 80 ml de la fracción soluble en una columna de cromatografía de intercambio aniónico Q- Sefarosa FF 26/10 (fabricada por Pharmacia, CV = 20 ml), para adsorción sobre el vehículo. Las proteínas nunca adsorbidas sobre el vehículo (proteínas no adsorbidas) se lavaron por el uso de Tampón A. Posteriormente, la proteína adsorbida se eluyó mientras que la concentración de KCl se modificó linealmente de 0 M a 0,7 M (en un total de 140 ml). Mediante la detección de la actividad de la aldolasa para PHOG (denominada a

menudo en adelante aldolasa de PHOG) en cada una de las fracciones eluidas, se detectó el valor máximo de la actividad de PHOG en la fracción correspondiente a aproximadamente 0,5 M. Los mismos procedimientos cromatográficos se llevaron a cabo repetidamente en dos oportunidades.

5           3. Cromatografía hidrófoba: Fenil Sefarosa HP HR 16/10

La solución con la actividad de aldolasa detectada se recolectó y dializó con Tampón B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, sulfato de amonio 1M, pH 7,6) a 4°C hasta el día siguiente y después se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. El filtrado resultante se trató con una columna de cromatografía hidrófoba de Fenil Sefarosa HP HR 16/10 (fabricada por Pharmacia) equilibrada  
10 con Tampón B. Durante los procedimientos, la aldolasa se adsorbió sobre el vehículo.

Las proteínas no adsorbidas que no se habían adsorbido sobre el vehículo se lavaron por el uso de Tampón B. Posteriormente, la aldolasa se eluyó mientras se modificaba linealmente la concentración de sulfato de amonio de 1M a 0M. Mediante la medición de la actividad de la aldolasa en cada una de las fracciones eluidas, se detectó el valor máximo de la  
15 actividad de la aldolasa en la fracción correspondiente a aproximadamente 0,2 M de la concentración de sulfato de amonio.

4. Cromatografía de filtración en gel: Sephadex 200 HP 16/60

Se combinaron en conjunto fracciones individuales que contenían aldolasa y se dializaron con Tampón A, y se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm. El filtrado resultante se  
20 concentró con una membrana de ultrafiltración Centriprep 10. El concentrado resultante se trató con una filtración en gel Sephadex 200 HP 16/60 (fabricada por Pharmacia) equilibrada con Tampón C (Tris 20 mM-HCl, pH 7,6, KCl 0,1 M) para elución en un caudal de 1 ml/min. Durante los procedimientos, la aldolasa se eluyó en fracciones de 66 a 71 ml. Con base en la posición del valor máximo de actividad eluido, se estimó que el peso molecular de la aldolasa sería de  
25 aproximadamente 146 kDa.

5. Cromatografía de intercambio aniónico: Mono Q HR5/5

Las fracciones resultantes se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm. El filtrado resultante se trató con una columna de cromatografía de aniones Mono-Q HR 5/5 (fabricada por Pharmacia) equilibrada con Tampón A. Durante los procedimientos, la aldolasa se adsorbió  
30 sobre el vehículo. Las proteínas no adsorbidas se lavaron por el uso de Tampón A. Posteriormente, la proteína se eluyó mientras que la concentración de KCl se modificó linealmente de 0 mM a 700 mM (en un total de 24 ml). Mediante la medición de la actividad de la aldolasa en cada una de las fracciones eluidas, se detectó el valor máximo de la actividad de la aldolasa en la fracción correspondiente a aproximadamente 0,4 M de la concentración de  
35 KCl.

## 6. Cromatografía de hidroxapatita: CHT-II

La fracción resultante se dializó con Tampón D (tampón de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0) a 4°C hasta el día siguiente, y se filtró a través de 0,45 µm. El filtrado resultante se trató con una columna de cromatografía de hidroxapatita CHT-II 5 ml (fabricada por Bio-Rad Laboratories Inc.) equilibrada con Tampón D. Durante los procedimientos, la aldolasa podría separarse de las proteínas adsorbidas dado que la aldolasa no se adsorbió sobre el vehículo.

La fracción purificada por los procedimientos cromatográficos en columna mencionados con anterioridad se trató con SDS-PAGE. Se detectó una banda casi única en una posición correspondiente a aproximadamente 25 kDa. Dado que se estimó mediante cromatografía de filtración en gel que el peso molecular fue de aproximadamente 146 kDa, se especuló que la aldolasa formaría un hexámero. La Tabla 5 muestra tablas de purificación.

Tabla 5 Tabla de purificación de la IHOG aldolasa derivada de la cepa *Pseudomonas taetrolens* ATCC4683

	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Veces de purificación	Actividad total (U)	Rendimiento (%)
Fración soluble	3750	-0,014	1	51	100
0-sefarosa HP 26/10	510	0,060	4,4	30,5	59,8
Fenil sefarosa HP 26/10	21,2	0,893	66	19,0	37,2
Sephadex 200 HP 16/60	1,9	4,643	341	8,65	17,0
MonoQ HR5/5	0,49	10,89	800	5,33	10,4
Hidroxapatita CHT-II	0,025	28,70	2110	0,71	1,4

15 (3-3) Determinación de la secuencia interna de aminoácidos de la IHOG aldolasa

Una porción de aproximadamente 2 µg de la aldolasa purificada se trató con SDS-PAGE. Posteriormente, la muestra en el gel SDSPAGE se trató con tripsina (pH 8,5, 35°C, 20 horas) y se trató por HPLC en fase reversa para separar péptidos fragmentados. Las secuencias de aminoácidos de dos de las fracciones separadas se determinaron de acuerdo con lo presentado a continuación, que estaban compuestas por 20 residuos y 12 residuos como SEQ ID Núm. 4 y 5, respectivamente.

20

Tabla 6 Secuencia interna de aminoácidos determinada

SQ ID Núm. 4	SLLDA	FONVV	TPHIS	DNLGR
SQ ID Núm. 5	AEIAT	GALDQ	SW	

(3-4) Clonación del gen de la IHOG aldolasa derivada de *P. taetrolens* cepa ATCC4683

#### 1. Preparación de ADN cromosomal

5 La cepa ATCC4683 de *P. taetrolens* se cultivó en 50 ml de un medio de cultivo de caldo a 30°C hasta el día siguiente (precultivo). Se utilizaron 5 ml del cultivo líquido como una bacteria para siembra, para un cultivo en 50 ml de un medio de cultivo de caldo. Tras el cultivo hasta la última etapa del crecimiento logarítmico, se trataron 50 ml del cultivo líquido por centrifugación (12.000 X g, 4°C, 15 minutos) para cosechar las células microbianas. Por el uso  
10 de las células microbianas, se preparó el ADN cromosomal mediante el procedimiento de rutina.

#### 2. Identificación de la secuencia interna por PCR

Con base en la secuencia interna de aminoácidos de la IHOG aldolasa determinada, se preparó la siguiente mezcla de cebadores (SEQ ID Núm. 6 y 7).

15 Tabla 7 Mezcla de cebadores diseñada y sintetizada sobre la base de la secuencia interna de aminoácidos

SQ ID Núm. 6	TTY	CAR	AAY	GTS	GTS	ACS	CCS	C		
SQ ID Núm. 7	TGR	TCR	ATN	GCN	CCS	GTN	GCR	ATY	TCN	GC

Por el uso de la mezcla de cebadores preparada, se llevó a cabo amplificación por PCR por el uso de ADN cromosomal de la cepa ATCC4683 de *P. taetrolens* como una plantilla. La PCR se llevó a cabo por el uso de PCR Thermal PERSONEL (fabricado por TAKARA BIO INC.)  
20 durante 30 ciclos bajo las siguientes condiciones:

94°C durante 30 segundos

55°C durante 30 segundos

72°C durante 1 minuto.

25 Los productos de PCR se trataron por electroforesis en gel de agarosa, de modo que se observó que se había amplificado un fragmento de aproximadamente 500 bp. El fragmento de ADN se clonó en pUC18, para la determinación de la secuencia de nucleótidos. La secuencia de aminoácidos especulada sobre la base del fragmento de ADN recuperado fue idéntica a la secuencia interna de aminoácidos de la IHOG aldolasa, de modo que se confirmó la recuperación del gen de la aldolasa pretendido.

### 3. Clonación del gen de longitud completa por hibridación de colonias

Se intentó recuperar el gen de longitud completa por el uso de un fragmento de ADN amplificado por PCR por análisis Southern e hibridación de colonias. La sonda de ADN se preparó por el uso de DIG High Prime (fabricado por Roche Diagnostics) de acuerdo con el manual de instrucciones, y después, la sonda se marcó por incubación hasta el día siguiente (O/N) a 37°C. Se llevó a cabo un análisis Southern mediante la digestión completa de 1 µg del ADN cromosomal con varias enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa 0,8%, transferencia sobre membrana de nylon y otros procedimientos siguiendo el manual. La hibridación se llevó a cabo por el uso de DIG Easy Hyb (fabricado por Roche Diagnostics), para prehibridación a 50°C durante 1 hora. Después, la sonda se añadió para hibridación O/N. Se detectaron las bandas, por el uso de un Kit de Detección de Nucleótidos DIG. Por consiguiente, se detectó un fragmento de PstI de aproximadamente 4 kbp en hibridación intensa con el fragmento de PCR como sonda. Después, el fragmento de PstI se recuperó por hibridación de colonias. Se trataron 20 µg del ADN cromosomal con PstI y se trataron con electroforesis en gel de agarosa, para recuperar un fragmento de aproximadamente 4 kbp. El fragmento se conjugó en pUC118, para preparar una librería en *E. coli* JM109. La colonia se transfirió sobre un filtro de membrana de nylon (Hybond-N, fabricado por Amersham), seguido por desnaturalización alcalina, neutralización e inmovilización. La hibridación se llevó a cabo por el uso de DIG Easy Hyb. El filtro se sumergió en un tampón, durante una prehibridación de 1 hora a 42°C. Después, se añadió la sonda marcada preparada, para hibridación a 42°C durante 16 horas. Tras el enjuague en SSC, se detectó una colonia en hibridación con la sonda, por el uso del Kit de Detección de Nucleótidos DIG (fabricado por Roche Diagnostics). Por consiguiente, se obtuvo un clon en hibridación intensa con la sonda.

Se determinó la secuencia de nucleótidos del ADN plásmido recuperado a partir del clon resultante. Se demostró que el ADN tenía la secuencia de nucleótidos descrita como SEQ ID Núm. 1. Se halló el 678-bp orf que contenía la secuencia de nucleótidos (las posiciones 507 a 566 y las posiciones 1046 a 1082 en la SEQ ID Núm. 1), que corresponde a la secuencia interna de aminoácidos interna, determinada, y se obtuvo la aldolasa de longitud completa pretendida.

### 4. Expresión de la IHOG aldolasa en *E. coli* (Núm. 1)

Por el uso de los cebadores (SEQ ID Núm. 8 y 9) mostrados en la Tabla 8, el fragmento amplificado a partir del ADN cromosomal de la cepa ATCC4683 de *P. taetrolens* se trató con BamHI/HindIII y después se insertó en el sitio BamHI/HindIII de pUC18, para construir un plásmido pUCALD. El plásmido de expresión construido se introdujo en *E. coli* JM109. El transformante resultante se agitó en un medio de cultivo LB que contenía ampicilina 50 µg/ml

ampicillin a 37°C día y noche (precultivo). Después, el precultivo líquido se sembró al 1% en 50 ml del medio de cultivo LB, para un cultivo a 37°C. Aproximadamente 2 horas después del comienzo del cultivo, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM, para un cultivo adicional de 3 horas. Una vez completo el cultivo, las células microbianas se cosecharon y enjuagaron, y se suspendieron en 1 ml de Tris 20 mM-HCl, pH 7,6. Después, las células microbianas se rompieron por el uso de Multi-Bead Shocker (fabricado por Yasui Kikai Corporation). Tras la ruptura, la solución se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos, de modo que el sobrenadante resultante se definió como una solución de enzima en bruto.

Tabla 8 Cebadores

SQ ID Núm. 8	ALD-5'	Bam (5'-GCC GGA TCC ACA AGG GTT CAGTCA TTC ATG G-3')
SQ ID Núm. 9	ALD-3'	Hind (5'-CCG AAG CTT TCA GTT CGC CAG GCC AGC C-3')

Por el uso de la solución de enzima en bruto, se midió la actividad de la aldolasa por el uso del sustrato PHOG. Si bien no se detectó actividad de la PHGO aldolasa en E. coli que portaba pUC18 (control), la actividad de la PHOG aldolasa de proteína 0,81 U/mg se observó en la cepa que portaba pUCADL. Esto indica que el gen codifica la aldolasa pretendida.

(3-5) Síntesis del ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico (IHOG) a partir de ácido indol-3-piruvico y ácido piruvico, por el uso de la cepa que expresa aldolasa.

Las células microbianas enjuagadas de E. coli que expresa aldolasa preparadas como en (3-4) se utilizaron como la fuente de enzima, para llevar a cabo la síntesis del ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico (IHOG) a partir de ácido indol-3-piruvico y ácido piruvico. IHOG se midió cuantitativamente por HPLC por el uso de "Inertsil ODS-2" (5 µm, 4,6 X 250 mm) fabricado por GL Sciences, Inc. Se presentan a continuación las condiciones analíticas.

Fase móvil: acetonitrilo 40% v/v/solución de fosfato diácido de tetrabutilaminio 5 mM

Caudal: 1 ml/min

Temperatura de columna: 40°C

Detección: UV 210 nm

Las células microbianas enjuagadas del E.coli que expresa aldolasa se añadieron a una solución de reacción de tampón 100 mM (Tris-HCl, pH 8,0 o pH 9,0 y glicina-NaOH pH 10,0), ácido indol-3-piruvico 50 mM, ácido piruvico 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, y tolueno 1% v/v a 10% p/v, para reacción bajo agitación a 33°C durante 4 horas. La solución de reacción de enzima se diluyó en forma adecuada, para medir el IHOG resultante.

Tabla 9 Cantidad de IHOG generada con aldolasa

pH	Aldolasa	IHOG (mM)
8	+	9,2

(Cont.)

8	-	0,42
9	+	12,1
9	-	1,6
10	+	10,7
10	-	5,4

Por consiguiente, la cantidad de IHOG generado aumentó en el lote con adición de E.coli que expresaba aldolasa. Se logró que IHOG sea generado por la aldolasa.

(3-6) Expresión a gran escala de IHOG aldolasa en E. coli (Núm. 2)

5 1. Construcción del plásmido pTrp4 que porta el promotor trp y el finalizador rrnB

Por el uso de oligonucleótidos de la Tabla 10 como cebadores (una combinación de las SEQ ID Núm. 10 y 11), se amplificó por PCR la región del promotor en el operón trp sobre el ADN cromosomal de E. coli W3110 como la región del gen pretendido. El fragmento de ADN resultante se ligó al vector pGEM-Teasy (fabricado por Promega Ltd.). En la solución de ligación, se transformó E. coli JM109, para seleccionar una cepa con el plásmido pretendido en la que el promotor trp se insertó a lo largo de una dirección inversa a la dirección del promotor lac entre las cepas resistentes a ampicilina resultantes. Después, el plásmido se trató con Eco0109I/EcoRI, para obtener un fragmento de ADN que contenía el promotor trp, que después se ligó en el producto de digestión Eco 0109i/EcoRI de pUC19 (fabricado por TAKARA BIO INC.). En la solución de ligación, se transformó E. coli JM109, para seleccionar una cepa con el plásmido pretendido entre las cepas resistentes a ampicilina resultantes. El plásmido se designó pTrp1. Después, pKK223-3 (fabricado por Amersham Pharmacia) se trató con HindIII/HincII, para obtener un fragmento de ADN que contenía el finalizador rrnB, que después se ligó a un producto de digestión de HindIII/PvuII de pTrp1. En esta solución de ligación, se transformó E. coli JM109 para obtener una cepa con el plásmido pretendido entre las cepas resistentes a ampicilina resultantes. El plásmido se designó pTrp2. Posteriormente, se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 10 como cebadores (una combinación de las SEQ ID Núm. 10 y 12) y pTrp2 como una plantilla para PCR para amplificar la región del promotor trp. El fragmento de ADN resultante se trató con Eco0109I/NdeI y se ligó al producto de digestión de Eco0109I/NdeI de pTrp2. En la solución de ligación, se transformó E. coli JM109, para seleccionar una cepa con el plásmido pretendido entre las cepas resistentes a ampicilina resultantes. Después, el plásmido se designó pTrp4.

Tabla 10

<b>SQ ID Núm. 10 lado-5'</b>	<b>GTATCACGAGGCCCTAGCTGTGGTGTCATGGTCCGGTGATC Eco0109I</b>
------------------------------	---

(Cont.)

<b>SQ ID Núm. 11 lado-3´</b>	<b>TTCGGGATTCCATATGATACCCCTTTTTACGTGAACTTGC NdeI</b>
<b>SQ ID Núm. 12 lado-3´</b>	<b>GGGGGGGGGCATATGCGACCTCCTTATTACGTGAACTTG NdeI</b>

2. Construcción de plásmidos ptrpADL1 y ptrpALD2 que expresan el gen de la aldolasa y expresión en E. coli

Por el uso de los cebadores mostrados en la Tabla 11 (SEQ ID Núm. 9 y 13), un fragmento amplificado a partir del ADN cromosomal de la cepa ATCC4683 de *P. taetrolens* se trató con NdeI/HindIII y se insertó en el sitio NdeI/HindIII de pTrp4 para construir un plásmido ptrpALD1. El plásmido expresa el gen de la aldolasa de la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 3 a partir de ATG 444 como el codón de iniciación de la traslación en la secuencia de nucleótidos SEQ ID Núm. 1. Además, por el uso de los cebadores (SEQ ID Núm. 9 y 14), un fragmento amplificado a partir del ADN cromosomal de la cepa ATCC4683 de *P. taetrolens* se trató con NdeI/HindIII y se insertó en el sitio NdeI/HindIII de pTrp4, para construir un plásmido ptrpALD2. El plásmido expresa el gen de la aldolasa de la secuencia de aminoácidos SEQ ID Núm. 2 a partir de ATG 456 como el codón de iniciación de la traslación en la secuencia de nucleótidos SEQ ID Núm. 1. Los plásmidos de expresión individualmente construidos se introdujeron en E. coli JM109. El transformante resultante se agitó en un medio de cultivo LB que contenía ampicilina 50 µg/ml a 37°C día y noche (precultivo). Se sembraron al 1% 50 ml del precultivo líquido en 50 ml del medio de cultivo LB, para un cultivo a 37°C. Aproximadamente 2 horas después del comienzo del cultivo, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM, para un cultivo adicional de 3 horas. Una vez completo el cultivo, las células microbianas se cosecharon y enjuagaron, se suspendieron en 1 ml de Tris 20 mM-HCl, pH 7,6, y se rompieron con Multi-bead Shocker (fabricado por Yasui Kikai Corporation). Tras la ruptura, la solución se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se definió como una solución de enzima en bruto.

Tabla 11 Cebadores

SQ ID Núm. 9	ALD-3´	Hind (5´-CCG AAG CTT TCA GTT CGC CAG GCC AGC C-3´)
SQ ID Núm. 13	ALD-5´	Nde-1 (5´-GGT TCA GTC ACA TAT GGA GGT CGC TAT GTC-3´)
SQ ID Núm. 14	ALD-5´	Nde-2(5´-ATG GAG GTC CAT TAG TCA TTG CCC GGT TCA CGC-3´)

Por el uso de la solución de enzima en bruto, la actividad de la aldolasa se midió por el uso de PHOG como el sustrato. Si bien no se detectó actividad de la PHOG aldolasa en E. coli que portaba pTrp4 (control), la actividad de la PHOG aldolasa de proteína 16,1 U/mg se observó en la cepa que portaba ptrpADL1, mientras que la actividad de la PHOG aldolasa de



proteína 36,0 U/mg se observó en la cepa que portaba ptrpADL2. Esto indica que el gen de la aldolasa de la SEQ ID Núm. 2 y 3 tiene actividad de aldolasa.

#### Ejemplo 4

5 El Ejemplo 4 se refiere a la reacción 3 de la invención. En el Ejemplo 4, en la presente, se ensayaron monatina y ácido 4-fenilmetil-4-hidroxi-glutámico (PHG) por cromatografía líquida de alto rendimiento por el uso de "Inertsil ODS-80A" (5 µm, 6 X 150 mm) fabricado por GL Sciences, Inc. Se presentan a continuación las condiciones analíticas.

Fase móvil: acetonitrilo 12% v/v/solución de ácido trifluoroacético acuoso 0,05% v/v

Caudal: 1.5 ml/min

10 Temperatura de columna: 30°C y

Detección: UV 210 nm

Bajo las condiciones analíticas, se fraccionaron y evaluaron (2S, 4S)-monatina y (2R,4R)-monatina con un tiempo de retención de 12,1 minutos, (2S, 4R)-monatina y (2R, 4S)-monatina con un tiempo de retención de 9,7 minutos, (2S, 4S)-PHG y (2R, 4R)-PHG con un tiempo de retención de 7,2 minutos, y (2S, 4R)-PHG y (2R, 4S)-PHG con un tiempo de retención de 6,0 minutos.

En caso de ser necesario, además, se llevó a cabo un análisis por HPLC por el uso de una columna de resolución óptica "CROWNPAK CR (+)" (4,6 X 150 mm) fabricada por Daicel Chemical Industries, Ltd. Se presentan a continuación las condiciones analíticas.

20 (En el caso de monatina)

Fase móvil: solución de ácido perclórico acuoso, pH 1,5/metanol 10% v/v

Caudal: 0,5 ml/min

Temperatura de columna: 30°C y

Detección: UV 210 nm

25 Bajo las condiciones analíticas, se fraccionaron y evaluaron isómeros ópticos de monatina (2R, 4S), (2R, 4R), (2S, 4R) y (2S, 4S) en tiempos de retención de 42, 57, 64, y 125 minutos en este orden.

(En el caso de PHG)

Fase móvil: solución de ácido perclórico acuoso, pH 1,5

30 Caudal: 1 ml/min

Temperatura de columna: 30°C y

Detección: UV 210 nm

Bajo las condiciones analíticas, pueden ensayarse y evaluarse isómeros ópticos de PHG (2R,4S), (2R, 4R), (2S, 4R) y (2S, 4S) en tiempos de retención de 20 minutos, 28 minutos, 35 31 minutos y 46 minutos en este orden.

## (4-1) Producción de (2S, 4S)-monatina con L-aminoácido transaminasa

Los microorganismos mostrados a continuación en la Tabla 12 se inocularon sobre un medio de cultivo de placa de caldo (Eiken Chemical Co., Ltd.), para un cultivo a 30°C durante 24 horas. Las células microbianas se inocularon en 1 ml de una solución de reacción de Tris 100 mM-HCl, pH 7,6, IHOG 30 mM, L-glutamato monosódico 100 mM, piridoxal-5'-fosfato 1 mM, y tolueno 0,5 (v/v) en un peso de células microbianas humectadas de 5% en peso, para incubación a 30°C durante 16 horas. Una vez completa la reacción, se ensayó la monatina generada. Los resultados se muestran en la Tabla 12. Podría generarse (2S, 4S)-monatina a partir de IHOG.

Tabla 12

Cepas	Monatina generada (mM)
<i>Aeromonas hydrophila</i> IFO3820	1,2
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IFO3058	1,9
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC8750	1,6
<i>Beijerinckia indica</i> ATCC9037	0,2
<i>Escherichia coli</i> ATCC12814	0,6
<i>Proteus rettgeri</i> IFO13501	0,7
<i>Morganella morganii</i> IFO3848	1,2

## (4-2) Producción de (2S, 4S)-PHG con L-aminoácido transaminasa

Los microorganismos mostrados a continuación en la Tabla 13 se inocularon sobre un medio de cultivo de placa de caldo (Eiken Chemical Co., Ltd.), para un cultivo a 30°C durante 24 horas. Las células microbianas se inocularon en 1 ml de una solución de reacción de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, PHOG 30 mM, L-glutamato monosódico 100 mM o L-aspartato monosódico, piridoxal-5'-fosfato 1 mM, y tolueno 0,5 (v/v) en un peso de células microbianas humectadas de 5% en peso, para incubación a 30°C durante 16 horas. Una vez completa la reacción, se ensayó el PHG generado. Los resultados se muestran en la Tabla 13. Podría generarse (2S, 4S)-PHG a partir de PHOG.

Tabla 13

Cepas	PHG generado (mM)	
	L-Glu	L-Asp
<i>Aeromonas hydrophila</i> IFO3820	8,9	8,9
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IFO3058	8,2	8,0

(Cont.)

Alcaligenes faecalis ATCC8750	4,9	10,7
Beijerinckia indica ATCC9037	7,4	2,7
Escherichia coli ATCC12814	9,0	3,3
Proteus rettgeri IFO13501	10,2	9,0
Morganella morganii IFO3848	10,4	5,2

## (4-3) Producción de (2S, 4S)-PHG con L-aminoácido transaminasa

Los microorganismos mostrados a continuación en la Tabla 14 se inocularon sobre un medio de cultivo de placa de caldo (Eiken Chemical Co., Ltd.), para un cultivo a 30°C durante 24 horas. El medio de cultivo que contenía ácido fumárico 0,5 g/dl, extracto de levadura 1 g/dl, peptona 1 g/dl, sulfato de amonio 0,3 g/dl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/dl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 g/dl, FeSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 1 mg/dl, y MnSO<sub>4</sub> • 4H<sub>2</sub>O 0,1 g/dl, pH 7,0 se dividió en porciones de 50 ml en matraces Sakaguchi de 500 ml y se esterilizaron a 110°C durante 10 minutos. Sobre el medio de cultivo líquido resultante se inoculó una ansada, para un cultivo bajo agitación a 30°C durante 16 horas. Se centrifugó 1 ml del cultivo líquido, para obtener células microbianas, que después se enjuagaron y cosecharon con Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 y se suspendieron posteriormente en 1 ml de una solución de reacción de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, PHOG 50 mM, L-glutamato monosódico 100 mM, piridoxal-5'-fosfato 1 mM y tolueno 0,5 v/v. La suspensión resultante se transfirió a tubo de ensayo de 10 ml, para reacción bajo agitación a 30°C durante 18 horas. Se ensayó el PHG generado una vez completa la reacción. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Podría generarse (2S, 4S)-PHG a partir de PHOG.

Tabla 14

Cepas	PHG generado (mM)
Aeromonas hydrophila IFO3820	16,4
Alcaligenes faecalis ATCC8750	12,3
Proteus rettgeri IFO13501	17,5
Morganella morganii IFO3848	17,2

## (4-4) Producción de 2R-PHG con D-aminoácido transaminasa

Los microorganismos mostrados a continuación en la Tabla 15 se inocularon sobre un medio de cultivo de placa de caldo (Eiken Chemical Co., Ltd.), para un cultivo a 30°C durante 24 horas. Estos se inocularon en 1 ml de una solución de reacción que contenía Tris 100 mM-HCl, pH 7,6, PHOG 50 mM, ácido D-glutámico 100 mM, D-alanina 100 mM, piridoxal-5'-fosfato

1 mM y tolueno 0,5 v/v en un peso final de células microbianas humectadas de 5% en peso, para incubación a 30°C durante 16 horas. Una vez completa la reacción, se ensayó el PHG generado. Los resultados se muestran en la Tabla 15. Podría generarse (2R, 4S)-PHG y (2R, 4R)-PHG a partir de PHOG.

5 Tabla 15

Cepas	PHG generado (mM)	
	(2R,4R)	(2R,4S)
Bacillus sphaericus ATCC10208	16,6	16,5
Bacillus pulvifaciens AJ1327	2,8	2,6
Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens ATCC13537	3,0	2,8
Bacillus macerans AJ1617*	7,1	7,0
Paenibacillus macerans ATCC8244	6,5	6,5
Bacillus lentus AJ12699	4,6	4,6
Bacillus lentus ATCC10840	4,2	4,3
*FERM P-18653		

(4-5) Preparación de *E. coli* que expresa DAT derivada de *Bacillus sphaericus* (denominada en adelante BSDAT) y producción de 2R-PHG por reacción con células microbianas enjuagadas 1. Construcción de un plásmido de expresión.

Con el fin de expresar el gen de la D-aminoácido transaminasa (abreviada en adelante "bsdats") derivada de *Bacillus sphaericus* en *E. coli*, se construyó un plásmido pUCBSDAT de acuerdo con lo presentado a continuación, en el que el gen de bsdats se conjugó corriente abajo al promotor lac de pUC18. Por el uso del ADN cromosomal de la cepa ATCC10208 de *Bacillus sphaericus* como una plantilla y oligonucleótidos mostrados a continuación en la Tabla 16 como cebadores, en primer lugar, el gen se amplificó por PCR. En tal forma, puede amplificarse un fragmento de ADN correspondiente a las posiciones 8 a 1278 en la secuencia de nucleótidos de bsdats descrita como SEQ ID Núm. 2 en el texto de la Publicación de Patente Europea 0.736.604. El fragmento se trató con BamHI y PstI, se conjugó al producto de digestión de BamHI/PstI de pUC18, y se introdujo en *E. coli* JM109. A partir de las cepas resistentes a ampicilina resultantes, se seleccionó una cepa con el plásmido pretendido, para construir un plásmido de expresión pUCBSDAT.

Tabla 16

SQ ID Núm. 15	5'-CCG GGA TTC GTT AAT CCA AAC GTT AGC TG
SQ ID Núm. 16	5'-GGC CTG CAG TTA GGC ATT AATTGA AAT TGG

## 2. Preparación de E. coli que expresa BSDAT

Un transformante E. coli con pUCBSDAT se cultivó con semillas en un medio de cultivo LB (bacto-triptona 1 g/dl, extracto de levadura 0,5 g/dl, y NaCl 1 g/dl) que contenía ampicilina 0,1 mg/ml a 37°C durante 16 horas. Se añadió 1 ml del cultivo líquido de semillas a un matraz de 500 ml Sakaguchi cargado con 50 ml del medio de cultivo LB, para un cultivo a 37°C. 2,5 horas después del comienzo del cultivo, se añadió 1-tio-β-D-galactopiranosida de isopropilo (IPTG) a una concentración final de 1 mM, para un cultivo adicional de 4 horas. A partir del cultivo líquido resultante, las células microbianas se cosecharon y enjuagaron, para preparar E. coli que expresa BSDAT.

## 3. Reacción con células microbianas enjuagadas, por el uso de E. coli que expresa BSDAT

Las células microbianas preparadas en el apartado 2 anterior se suspendieron en 1 ml de una solución de reacción que contenía Tris 100 mM-HCl, pH 7,6, PHOG 50 mM, donantes de aminoácido 100 mM (D-Glu, D-Ala, L-Glu, L-Ala), piridoxal-5'-fosfato 1 mM y tolueno 0,5% v/v en un peso final de células microbianas humectadas del 5%, y la suspensión resultante se transfirió a un tubo de ensayo de 10 ml, para reacción bajo agitación a 30°C durante 18 horas. El PHG generado se ensayó una vez completa la reacción. Los resultados se muestran en la Tabla 17. Podría generarse (2R, 4R), (2R, 4S) y (2S, 4S)-PHG a partir de PHOG.

Tabla 17 PHG (mM) generado vía la reacción con células microbianas enjuagadas, por el uso de E. coli que expresa BSDAT

PHG generado	Donantes de aminoácido añadidos			
	D-Glu	D-Ala	L-Glu	L-Ala
(2R,4R)	20,7	25,1	N.D.	15,4
(2R,4S)	17,5	17,0	22,7	7,0
(2S, 4S)	Trazas	Trazas	22,7	Trazas

(4-6) Preparación de E. coli que expresa DAT derivada de Bacillus macerans AJ1617 (denominada en adelante BMDAT) y producción de 2R-monatina por reacción con células microbianas enjuagadas

## 1. Preparación de ADN cromosomal

La cepa AJ1617 de Bacillus macerans se cultivó hasta el día siguiente en un medio de cultivo de caldo de 50 ml a 30°C (precultivo). Se cultivaron 5 ml del cultivo líquido como una bacteria para siembra en un medio de cultivo de caldo de 50 ml. Tras el cultivo de la cepa

microbiana hasta la última etapa del crecimiento logarítmico, se trataron 50 ml del cultivo líquido por un procedimiento de centrifugación (12.000 X, 4°C, 15 minutos) para cosechar las células microbianas. Por el uso de las células microbianas, se preparó el ADN cromosomal por el procedimiento de rutina.

5           2. Aislamiento del gen de la D-aminoácido transaminasa (denominada en adelante bmdat) derivado de *Bacillus macerans* a partir de librerías de genes

En primer lugar, se añadió una unidad de una enzima de restricción EcoRI a 30 µg del ADN cromosomal de la cepa AJ1617 de *Bacillus macerans*, para una reacción de 3 horas a 37°C para digestión parcial. Después, se recuperaron fragmentos de 3 a 6 kbp del ADN por electroforesis en gel de agarosa. Estos fragmentos se ligaron a 1 µg del producto de escisión EcoRI del plásmido pUC118 (después del tratamiento BAP; fabricado por TaKaRa Brewery, Co., Ltd.), para transformar *E. coli* JM109 para preparar librerías de genes, que después se laminaron sobre un medio de cultivo de LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5 %, cloruro de sodio 1%, agar 2%, pH 7,0) que contenía ampicilina para formar colonias. Las colonias desarrolladas se cultivaron hasta el día siguiente en un medio de cultivo líquido LB que contenía ampicilina y 1-tio-β-D-galactopiranosida de isobutilo (IPTG) de 0,1 mM a 37°C, para centrifugación para cosechar las células microbianas resultantes. Las células microbianas resultantes se inocularon en una solución de reacción de Tris 100 mM-HCl, pH 8,0, piruvato de sodio 50 mM, ácido D-glutámico 100 mM, piridoxal-5'-fosfato 1 mM y tolueno 1% v/v, para reacción a 30°C durante 30 minutos. Una vez completa la reacción, la solución de reacción se centrifugó. Se añadieron 5 µl del sobrenadante separado resultante a una placa de 96 pocillos que contenía 200 µl de una solución de reacción para un ensayo de ácido pirúvico (Tris 100 mM-HCl, pH 7,6, NADH 1,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, deshidrogenasa de lactato 16 U/ml (fabricada por Oriental Yeast Co., Ltd.)), para reacción a 30°C durante 10 minutos. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 340 nm con un lector de placas (SPECTRA MAX190, fabricado por Molecular Device). El mismo ensayo se llevó a cabo por la adición de piruvato de sodio a una concentración final de 0,2 mM a 1 mM. Por el uso de esto como un estándar, se ensayó la cantidad reducida de ácido pirúvico, para detectar la actividad de la D-aminoácido transaminasa.

30           Vía la evaluación de los clones con actividad de DAT, se recolectaron los clones con la actividad de DAT. A partir de estos transformantes, se prepararon plásmidos que contenían bmdat y se definieron como pUCBMDAT. El plásmido pUCBMDAT se trató con EcoRI y se trató por electroforesis en gel de agarosa, de modo que se estimó que el fragmento insertado tenía una longitud de aproximadamente 3,3 kbp.

35           3. Secuencia de nucleótidos del fragmento insertado

La secuencia de nucleótidos del fragmento insertado en el plásmido pUCBMDAT se determinó por el procedimiento de dideoxi. Se halló el ORF de aproximadamente 850 bp correspondiente a las posiciones 630 a 1481 en la secuencia SEQ ID Núm. 17 en el listado de secuencias. Se examinó la homología del ORF a secuencias conocidas. El ORF tenía una homología del 91% al gen de la D-aminoácido transaminasa derivada de *Bacillus sphaericus* ATCC10208 en términos de una secuencia de aminoácidos y una homología del 66% al gen de la D-aminoácido transaminasa derivada de *Bacillus* sp. YM-1 en términos de una secuencia de aminoácidos y una homología del 42% al gen de la D-aminoácido transaminasa derivada de *Bacillus licheniformis* ATCC10716 en términos de una secuencia de aminoácidos. Los resultados muestran claramente que el ORF codifica los genes de la D-aminoácido transaminasa. En la presente, la homología se calculó por el uso de un software de análisis de genes "genetyx ver. 6" (GENETYX) mientras que varios parámetros se utilizaron de acuerdo con un ajuste inicial.

#### 4. Preparación de *E. coli* que expresa BMDAT

Un transformante *E. coli* con pUCBMDAT se cultivó con semillas en un medio de cultivo LB (bacto-triptona 1 g/dl, extracto de levadura 0,5 g /dl y NaCl 1 g/dl) que contenía ampicilina 0,1 mg/ml a 37°C durante 16 horas. Se añadió 1 ml del cultivo líquido de semillas a un matraz Sakaguchi de 500 ml con 50 ml del medio de cultivo LB, para un cultivo a 37°C. 2,5 horas después del comienzo del cultivo, se añadió 1-tio-β-D-galactopiranosida de isopropilo (IPTG) a una concentración final de 1 mM, para un cultivo adicional de 4 horas. A partir del cultivo líquido resultante, las células microbianas se cosecharon y enjuagaron, para preparar *E. coli* que expresa BMDAT.

#### 5. Reacción con células microbianas enjuagadas, por el uso de *E. coli* que expresa BMDAT

Las células microbianas preparadas con anterioridad en el apartado 4 se suspendieron en 1 ml de una solución de reacción que contenía Tris 100 mM-HCl, pH 8,0, IHOG 50 mM, D-alanina 200 mM, piridoxal-5'-fosfato 1 mM y tolueno 0,5% v/v en un peso final de células microbianas humectadas de 5%, y la suspensión resultante se transfirió a un tubo de ensayo de 10 ml, para reacción bajo agitación a 33°C durante 20 horas. La 2R-monatina generada se ensayó una vez completa la reacción. Por consiguiente, podría generarse 2R-monatina 22 mM.

#### Aplicabilidad Industrial

De acuerdo con la invención, el procedimiento para producir derivados de glutamato de acuerdo con la invención puede producir eficientemente los derivados de glutamato especificados que incluyen monatina promisoria como un edulcorante y similares, por el uso de

una reacción de transaminasa. Por lo tanto, el procedimiento es extremadamente útil en términos industriales.

5 Además, el procedimiento para producir monatina de acuerdo con la invención utiliza el procedimiento para producir derivados de glutamato de acuerdo con la invención y puede producir monatina muy eficientemente mediante el uso como un material de inicio de triptófano como uno de aminoácidos, por una reacción de transaminasa. Este procedimiento es muy útil en términos industriales, particularmente, en el campo de los alimentos.



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ajinomoto co., inc.

<120> PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR DERIVADOS DE GLUTAMATO

<130> PAMA-14278, PAMA-03066

<140>

<141>

<150> JP2001-396471

<151> 2001-12-27

<150> JP2002-095760

<151> 2002-03-29

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1296

<212> ADH

<213> Pseudomonas taetrolens

<220>

<221> Inventores: Sugiyama Masakazu; Watanabe Kunihiko; Funakoshi Hao; Amino Yusuke  
; Kawahara Shigeru; Takemoto Tadashi

<220>

<221> CDS

<222> (456) .. (1118)

<223> ALD1

<220>

<221> CDS

<222> (444) .. (1118)

<223> ALD2

<400> 1

gtacaccgctc ctgactcagg gcgcgctcgg cacgggttga tctatgagcg ctgtttgccc 60  
 agaatgacgt cggggtcacg tacgatcaaa gcaactacct gatcgcccag tgggectgac 120  
 ctgtccggtg tcggcatcag ctacctgcct cgccaagtgt ctctcgccat tgggtggacca 180  
 gggtcgggct actagtcacg gaaaccgagc ctgcgctgcc tcccatccaa tacategccc 240  
 tacaccgccc cgatcgtctt cagggcctca gcgctgaggt tgcacgtctg gcagctcgtt 300  
 gctgtgattt cagccgcatg gtgtggtaac acaggcctg gatcagagaa aaaaagcgat 360  
 gtattttcat agataaatat cgetaatagt gccaaagcagc ctttcttact atgaacgcat 420  
 agcccacaag ggttcagtca ttc atg gag gtc gct atg tca ttg ccc ggt tca 473  
 Met Glu Val Ala Met Ser Leu Pro Gly Ser  
 1 5 10  
 cgc atc tac cct tet ccg ccc cag gca cca cgc tca ctg ctg gac gcg 521  
 Arg Ile Tyr Pro Ser Pro Pro Gln Ala Pro Arg Ser Leu Leu Asp Ala  
 15 20 25  
 ttt cag aac gta gtg acg ccg cat atc agt gat aac ctc ggg cgt cac 569  
 Phe Gln Asn Val Val Thr Pro His Ile Ser Asp Asn Leu Gly Arg His  
 30 35 40  
 atc ggt gcc cgg ggg ctg acg cgc tat aac cac acc ggc aaa ctg gtg 617  
 Ile Gly Ala Arg Gly Leu Thr Arg Tyr Asn His Thr Gly Lys Leu Val  
 45 50 55  
 ggc acc gcc ctg acg gtg aag act cgc ccc ggc gac aac ctc tac atc 665  
 Gly Thr Ala Leu Thr Val Lys Thr Arg Pro Gly Asp Asn Leu Tyr Ile  
 60 65 70  
 tac aaa gca ctg acg ctg atc gaa ccc gga cac gtg ctg gtg atc gac 713  
 Tyr Lys Ala Leu Thr Leu Ile Glu Pro Gly His Val Leu Val Ile Asp  
 75 80 85 90  
 gct cag ggt gac gcg acc aac gcg gtc att ggt gag ctg atc aag ctc 761

Ala Gln Gly Asp Ala Thr Asn Ala Val Ile Gly Glu Leu Ile Lys Leu  
95 100 105

tac gcg cag caa cgt ggc tgt gtc ggc ttc gtc gtc gac ggc gcc atc 809  
Tyr Ala Gln Gln Arg Gly Cys Val Gly Phe Val Val Asp Gly Ala Ile  
110 115 120

cgc gat gtc gcc agt ttt gaa gat acg cct tgc tat gcc cgt agc gtg 857  
Arg Asp Val Ala Ser Phe Glu Asp Thr Pro Cys Tyr Ala Arg Ser Val  
125 130 135

gtg cat tgc ggt ccc tac aaa agc ggc cca ggg gaa atc aat gtc ccg 905  
Val His Cys Gly Pro Tyr Lys Ser Gly Pro Gly Glu Ile Asn Val Pro  
140 145 150

gtg tca atc ggc ggg atg atc atc aat ccg ggc gac atc att gtc ggt 953  
Val Ser Ile Gly Gly Met Ile Ile Asn Pro Gly Asp Ile Ile Val Gly  
155 160 165 170

gac gag gat ggg ctg gtt gcc ttc tgg ccc gac cat gcc gag cag gtg 1001  
Asp Glu Asp Gly Leu Val Ala Phe Ser Pro Asp His Ala Glu Gln Val  
175 180 185

ttg gtc aag gcg cga gag cat gac gcg cat gaa cag cag gtc aaa gcc 1049  
Leu Val Lys Ala Arg Glu His Asp Ala His Glu Gln Gln Val Lys Ala  
190 195 200

gaa atc gcc act ggc gcc atc gat cag tca tgg ctg gac aaa gtg ctg 1097  
Glu Ile Ala Thr Gly Ala Ile Asp Gln Ser Trp Leu Asp Lys Val Leu  
205 210 215

gaa aag gct ggc ctg gcg aac tgaaaaaac tgtgtaatcg ccttgctgca 1148  
Glu Lys Ala Gly Leu Ala Asn  
220 225

gcgacattgc tgcggacag gatgatctga cgcttcagtt acgcgttctt gggcgaccg 1208

cgccacgtca ggaagtggct gctgccgcat gcaggtgaca tgtcatgtac catggcagca 1268

gcacgtgaca tgcacgatgt gctcacgc 1296

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 225

&lt;212&gt; PRT

<213> *Pseudomonas taetrolens*

&lt;400&gt; 2

```

Met Glu Val Ala Met Ser Leu Pro Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Ser Pro
  1          5          10          15
Pro Gln Ala Pro Arg Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gln Asn Val Val Thr
          20          25          30
Pro His Ile Ser Asp Asn Leu Gly Arg His Ile Gly Ala Arg Gly Leu
          35          40          45
Thr Arg Tyr Asn His Thr Gly Lys Leu Val Gly Thr Ala Leu Thr Val
          50          55          60
Lys Thr Arg Pro Gly Asp Asn Leu Tyr Ile Tyr Lys Ala Leu Thr Leu
          65          70          75          80
Ile Glu Pro Gly His Val Leu Val Ile Asp Ala Gln Gly Asp Ala Thr
          85          90          95
Asn Ala Val Ile Gly Glu Leu Ile Lys Leu Tyr Ala Gln Gln Arg Gly
          100          105          110
Cys Val Gly Phe Val Val Asp Gly Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Phe
          115          120          125
Glu Asp Thr Pro Cys Tyr Ala Arg Ser Val Val His Cys Gly Pro Tyr
          130          135          140
Lys Ser Gly Pro Gly Glu Ile Asn Val Pro Val Ser Ile Gly Gly Met
          145          150          155          160
Ile Ile Asn Pro Gly Asp Ile Ile Val Gly Asp Glu Asp Gly Leu Val
          165          170          175
Ala Phe Ser Pro Asp His Ala Glu Gln Val Leu Val Lys Ala Arg Glu
          180          185          190
His Asp Ala His Glu Gln Gln Val Lys Ala Glu Ile Ala Thr Gly Ala
          195          200          205
Ile Asp Gln Ser Trp Leu Asp Lys Val Leu Glu Lys Ala Gly Leu Ala
          210          215          220
Asn
225

```

<210> 3

<211> 221

<212> PRT

<213> *Pseudomonas taetrolens*

<400> 3

```

Met Ser Leu Pro Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Ser Pro Pro Gln Ala Pro
 1           5           10           15
Arg Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gln Asn Val Val Thr Pro His Ile Ser
           20           25           30
Asp Asn Leu Gly Arg His Ile Gly Ala Arg Gly Leu Thr Arg Tyr Asn
           35           40           45
His Thr Gly Lys Leu Val Gly Thr Ala Leu Thr Val Lys Thr Arg Pro
           50           55           60
Gly Asp Asn Leu Tyr Ile Tyr Lys Ala Leu Thr Leu Ile Glu Pro Gly
65           70           75           80
His Val Leu Val Ile Asp Ala Gln Gly Asp Ala Thr Asn Ala Val Ile
           85           90           95
Gly Glu Leu Ile Lys Leu Tyr Ala Gln Gln Arg Gly Cys Val Gly Phe
           100          105          110
Val Val Asp Gly Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Phe Glu Asp Thr Pro
           115          120          125
Cys Tyr Ala Arg Ser Val Val His Cys Gly Pro Tyr Lys Ser Gly Pro
           130          135          140
Gly Glu Ile Asn Val Pro Val Ser Ile Gly Gly Met Ile Ile Asn Pro
145          150          155          160
Gly Asp Ile Ile Val Gly Asp Glu Asp Gly Leu Val Ala Phe Ser Pro
           165          170          175
Asp His Ala Glu Gln Val Leu Val Lys Ala Arg Glu His Asp Ala His
           180          185          190
Glu Gln Gln Val Lys Ala Glu Ile Ala Thr Gly Ala Ile Asp Gln Ser
           195          200          205
Trp Leu Asp Lys Val Leu Glu Lys Ala Gly Leu Ala Asn
           210          215          220

```

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> *Pseudomonas taetrolens*

<400> 4

Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gln Asn Val Val Thr Pro His Ile Ser Asp

1 5 10 15

Asn Leu Gly Arg

20

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> *Pseudomonas taetrolens*

<400> 5

Ala Glu Ile Ala Thr Gly Ala Leu Asp Gln Ser Trp

1 5 10

<210> 6

<211> 22

<212> ADH

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores 1

<400> 6

ttycaraayg tsgtsacscc sc

22

<210> 7

<211> 29

<212> ADH

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores 2

<400> 7 tgrtcratng cncsgtngc ratytcngc	29
<210> 8 <211> 31 <212> ADH <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial:ALD-5' Bam	
<400> 8 gccgcatcca caagggttca gtcattcatg g	31
<210> 9 <211> 28 <212> ADH <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial:ALD-5' Hind	
<400> 9 ccgaagcttt cagttcqcca ggccagcc	28
<210> 10 <211> 40 <212> ADH <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores	
<400> 10 gtatcacgag gcctagctg tggtgcatg gtcggtgatc	40

<210> 11

<211> 40

<212> ADH

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores

<400> 11

ttcgggggatt ccatatgata ccctttttac gtgaacttgc

40

<210> 12

<211> 38

<212> ADH

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores

<400> 12

ggggggggca tatgcgacct ccttattacg tgaacttg

38

<210> 13

<211> 30

<212> ADH

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ALD-5'NdeI

<400> 13

ggttcagtca catatggagg tcgctatgtc

30

<210> 14

<211> 33

<212> ADH

<213> Secuencia Artificial



<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:ALD-5\*Nde2

<400> 14

atggagggtcc attagtcatt gcccggttca cgc

33

<210> 15

<211> 29

<212> ADH

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: BMDAT1

<400> 15

ccgggattcg ttaatccaaa cgtagctg

29

<210> 16

<211> 30

<212> ADH

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: BMDAT2

<400> 16

ggcctgcagt taggcattaa ttgaaattgg

30

<210> 17

<211> 1709

<212> ADH

<213> bacillus macerans

<220>

<221> CDS

<222> (630) .. (1481)

<400> 17

tacatcaggt agcgcctatgc atgacagaaa gggatcatga gcgttatctg ctgcgtttac 60

aacagagtga cgactgagtc agagcaattg tcgactttat cgcagaggtt tttatcagga 120

tcattatgcc atcagcttga gttgcaattc gaggatgcca tgtctggcca gacaacatta 180

aatccaggca ttgtagcta tgatgtcagt aaaggtggca gtttagtgat tagtatgcgc 240

tattctgtgt cctatccatt cgatgaaaaa ttacggaggc tcaacgttta gttgtaaaaa 300

gaggattttc attagatatt caagacgact ccaagcccca ttatgtcagt gaagatgatc 360

catttatcca aacattagcg gctatttata gacgtcaatc aggagataca gaacaccgt 420

tattatctac aggtggtgga acgtatgcac gtgtgctgaa aaaagcgtg gcctttggca 480

tgctattccc tggggagcag gatgtggcgc atcgggcgga tgagtttcta gtgattgaaa 540

atcttgtaaa agcagcggct atttatgcgg aagcaattgt tgagcttgcg ggaaaaaaat 600

aacataaaga cgaaaaggat gaacggaaa atg gca tat tca tta tgg aat gat 653  
Met Ala Tyr Ser Leu Trp Asn Asp  
1 5

caa att gtt gaa gaa gga tct att gca atc tca cca gaa gac aga ggt 701  
Gln Ile Val Glu Glu Gly Ser Ile Ala Ile Ser Pro Glu Asp Arg Gly  
10 15 20

tat cag ttt ggt gac ggt att tat gaa gta att aaa gtt tat aac gga 749  
Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Ile Tyr Glu Val Ile Lys Val Tyr Asn Gly  
25 30 35 40

aat atg ttt aca gca caa gag cac att gat cgt ttc tat gcg agc gcc 797  
Asn Met Phe Thr Ala Gln Glu His Ile Asp Arg Phe Tyr Ala Ser Ala  
45 50 55

gaa aaa att cgc ctt gtt atc cct tat aca aaa gat gtt tta cac aag 845  
Glu Lys Ile Arg Leu Val Ile Pro Tyr Thr Lys Asp Val Leu His Lys

60	65	70	
tta cta cat gag cta att gaa aag aat aat cta gaa aca gga cat gtt			893
Leu Leu His Glu Leu Ile Glu Lys Asn Asn Leu Glu Thr Gly His Val			
75	80	85	
tat ttt caa atc act cgt ggg gct aat tca cgt aat cac gtt ttc ccg			941
Tyr Phe Gln Ile Thr Arg Gly Ala Asn Ser Arg Asn His Val Phe Pro			
90	95	100	
gat gca agt att cct gct gta tta act gga aat gta aaa gcg ggt gaa			989
Asp Ala Ser Ile Pro Ala Val Leu Thr Gly Asn Val Lys Ala Gly Glu			
105	110	115	120
cgt gca tat gaa aac ttt gaa aaa ggt gtt aaa gcc act ttt gtt gag			1037
Arg Ala Tyr Glu Asn Phe Glu Lys Gly Val Lys Ala Thr Phe Val Glu			
125	130	135	
gat att cgt tgg ttg cgt tgt gac att aaa tct tta aac ttg ctt ggt			1085
Asp Ile Arg Trp Leu Arg Cys Asp Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly			
140	145	150	
gca gta tta gca aaa caa gaa gct gcg gag aaa ggt tgt tat gaa gcg			1133
Ala Val Leu Ala Lys Gln Glu Ala Ala Glu Lys Gly Cys Tyr Glu Ala			
155	160	165	
atc tta cat cgc gga gat atc gtg aca gaa tgc tct tca gct aat gtt			1181
Ile Leu His Arg Gly Asp Ile Val Thr Glu Cys Ser Ser Ala Asn Val			
170	175	180	
tac gga att aaa gat gga aaa ctt tat aca cat cca gct aat aat ttc			1229
Tyr Gly Ile Lys Asp Gly Lys Leu Tyr Thr His Pro Ala Asn Asn Phe			
185	190	195	200
atc tta aat ggt att aca cgt caa gtc att tta aaa tgt gcg gaa gaa			1277
Ile Leu Asn Gly Ile Thr Arg Gln Val Ile Leu Lys Cys Ala Glu Glu			
205	210	215	
att aat tta cca gta atc gaa gag cca atg acg aaa gct gat tta cta			1325
Ile Asn Leu Pro Val Ile Glu Glu Pro Met Thr Lys Ala Asp Leu Leu			

	220	225	230	
aca atg gat gaa atc att gtg tcg tct gta tct tct gag gtt acg cca				1373
Thr Met Asp Glu Ile Ile Val Ser Ser Val Ser Ser Glu Val Thr Pro				
	235	240	245	
gtc att gat gtg gac ggc aac caa att ggg gct gga gtt ccc ggt gaa				1421
Val Ile Asp Val Asp Gly Asn Gln Ile Gly Ala Gly Val Pro Gly Glu				
	250	255	260	
tgg act cgt caa tta cag caa tca ttt gaa gcg aaa tta cca ctt tca				1469
Trp Thr Arg Gln Leu Gln Gln Ser Phe Glu Ala Lys Leu Pro Leu Ser				
	265	270	275	280
atg aat acc aaa taaaagaacc ttgtagagaa ctatctgtat ggatagttct				1521
Met Asn Thr Lys				
ctttatttat.ggggtgtaatg ttgggtctcg tcatgtaaaa taaaaggat agtagaataa				1581
tcttacagat tgaatttgt agagcaatgt cgatgtaatg aatacataag aatgcataga				1641
ctctttttac aaaggggatc gagaaaaaag agaactaaag agatggtaag taagaatgga				1701
gtgacctt				1709
<210> 18				
<211> 284				
<212> PRT				
<213> bacillus macerans				
<400> 18				
Met Ala Tyr Ser Leu Trp Asn Asp Gln Ile Val Glu Glu Gly Ser Ile				
1 5 10 15				
Ala Ile Ser Pro Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Ile Tyr				
20 25 30				
Glu Val Ile Lys Val Tyr Asn Gly Asn Met Phe Thr Ala Gln Glu His				
35 40 45				

Ile Asp Arg Phe Tyr Ala Ser Ala Glu Lys Ile Arg Leu Val Ile Pro  
 50 55 60

Tyr Thr Lys Asp Val Leu His Lys Leu Leu His Glu Leu Ile Glu Lys  
 65 70 75 80

Asn Asn Leu Glu Thr Gly His Val Tyr Phe Gln Ile Thr Arg Gly Ala  
 85 90 95

Asn Ser Arg Asn His Val Phe Pro Asp Ala Ser Ile Pro Ala Val Leu  
 100 105 110

Thr Gly Asn Val Lys Ala Gly Glu Arg Ala Tyr Glu Asn Phe Glu Lys  
 115 120 125

Gly Val Lys Ala Thr Phe Val Glu Asp Ile Arg Trp Leu Arg Cys Asp  
 130 135 140

Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Ala Val Leu Ala Lys Gln Glu Ala  
 145 150 155 160

Ala Glu Lys Gly Cys Tyr Glu Ala Ile Leu His Arg Gly Asp Ile Val  
 165 170 175

Thr Glu Cys Ser Ser Ala Asn Val Tyr Gly Ile Lys Asp Gly Lys Leu  
 180 185 190

Tyr Thr His Pro Ala Asn Asn Phe Ile Leu Asn Gly Ile Thr Arg Gln  
 195 200 205

Val Ile Leu Lys Cys Ala Glu Glu Ile Asn Leu Pro Val Ile Glu Glu  
 210 215 220

Pro Met Thr Lys Ala Asp Leu Leu Thr Met Asp Glu Ile Ile Val Ser  
 225 230 235 240

Ser Val Ser Ser Glu Val Thr Pro Val Ile Asp Val Asp Gly Asn Gln  
 245 250 255

Ile Gly Ala Gly Val Pro Gly Glu Trp Thr Arg Gln Leu Gln Gln Ser  
260 265 270

Phe Glu Ala Lys Leu Pro Leu Ser Met Asn Thr Lys  
275 280

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ajinomoto co., inc.

<120> PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR DERIVADOS DE GLUTAMATO

<130> PAMA-14278, PAMA-03066

<140>

<141>

<150> JP2001-396471

<151> 2001-12-27

<150> JP2002-095760

<151> 2002-03-29

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1296

<212> ADN

<213> Pseudomonas taetrolens

<220>

<221> Inventor:Sugiyama Masakazu; Watanabe Kunihiro; Funakoshi Nao; Amino Yusuke  
; Kawahara Shigeru; Takemoto Tadashi

<220>

<221> CDS

<222> (456) .. (1118)

<223> ALD1

<220>

<221> CDS

<222> (444) .. (1118)

<223> ALD2

<400> 1  
gtacaccgtc ctgactcagg gcgcgctcgg cacgggttga tetatgagcg ctgtttgcc 60  
agaatgacgt cggggtcacg tacgatcaaa gcaactacct gatcgcccag tgggectgac 120  
ctgtccgggtg tcggcatcag ctacctgcct cgccaagtgt ctctcgccat tggtaggacca 180  
gggtcgggct actagtcctc gaaaccgagc ctgcgctgcc tcccatccaa tacatcgccg 240  
tacaccgcgc cgatcgtctt cagggcctca gcgtcgaggt tgcacgtctg gcagctcgtt 300  
gctgtgattt cagccgcctg gtgtggtaac acaggcgctg gatcagagaa aaaaagcgt 360  
gtattttcat agataaatat cgctaatagt gccaaagcgc ctttcttact atgaacgcat 420  
agccccacaag ggttcagtca ttc atg gag gtc gct atg tca ttg ccc ggt tca 473  
Met Glu Val Ala Met Ser Leu Pro Gly Ser  
1 5 10  
cgc atc tac cct tct ccg ccc cag gca cca cgc tca ctg ctg gac gcg 521  
Arg Ile Tyr Pro Ser Pro Pro Gln Ala Pro Arg Ser Leu Leu Asp Ala  
15 20 25  
ttt cag aac gta gtg acg ccg cat atc agt gat aac ctc ggg cgt cac 569  
Phe Gln Asn Val Val Thr Pro His Ile Ser Asp Asn Leu Gly Arg His  
30 35 40  
atc ggt gcc cgg ggg ctg acg cgc tat aac cac acc ggc aaa ctg gtg 617  
Ile Gly Ala Arg Gly Leu Thr Arg Tyr Asn His Thr Gly Lys Leu Val  
45 50 55  
ggc acc gcc ctg acg gtg aag act cgc ccc ggc gac aac etc tac atc 665  
Gly Thr Ala Leu Thr Val Lys Thr Arg Pro Gly Asp Asn Leu Tyr Ile  
60 65 70  
tac aaa gca ctg acg ctg atc gaa ccc gga cac gtg ctg gtg atc gac 713  
Tyr Lys Ala Leu Thr Leu Ile Glu Pro Gly His Val Leu Val Ile Asp  
75 80 85 90  
gct cag ggt gac gcg acc aac gcg gtc att ggt gag ctg atc aag etc 761



Ala Gln Gly Asp Ala Thr Asn Ala Val Ile Gly Glu Leu Ile Lys Leu  
 95 100 105

tac gcg cag caa cgt ggc tgt gtc ggc ttc gtc gtc gac ggc gcc atc 809  
 Tyr Ala Gln Gln Arg Gly Cys Val Gly Phe Val Val Asp Gly Ala Ile  
 110 115 120

cgc gat gtc gcc agt ttt gaa gat acg cct tgc tat gcc cgt agc gtg 857  
 Arg Asp Val Ala Ser Phe Glu Asp Thr Pro Cys Tyr Ala Arg Ser Val  
 125 130 135

gtg cat tgc ggt ccc tac aaa agc ggc cca ggg gaa atc aat gtc ccg 905  
 Val His Cys Gly Pro Tyr Lys Ser Gly Pro Gly Glu Ile Asn Val Pro  
 140 145 150

gtg tca atc ggc ggg atg atc atc aat ccg ggc gac atc att gtc ggt 953  
 Val Ser Ile Gly Gly Met Ile Ile Asn Pro Gly Asp Ile Ile Val Gly  
 155 160 165 170

gac gag gat ggg ctg gtt gcc ttc tgc ccc gac cat gcc gag cag gtg 1001  
 Asp Glu Asp Gly Leu Val Ala Phe Ser Pro Asp His Ala Glu Gln Val  
 175 180 185

ttg gtc aag gcg cga gag cat gac gcg cat gaa cag cag gtc aaa gcc 1049  
 Leu Val Lys Ala Arg Glu His Asp Ala His Glu Gln Gln Val Lys Ala  
 190 195 200

gaa atc gcc act ggc gcc atc gat cag tca tgg ctg gac aaa gtg ctg 1097  
 Glu Ile Ala Thr Gly Ala Ile Asp Gln Ser Trp Leu Asp Lys Val Leu  
 205 210 215

gaa aag gct ggc ctg gcg aac tgaaaaaacac tgtgtaatcg cettgctgca 1148  
 Glu Lys Ala Gly Leu Ala Asn  
 220 225

gcgacattgc tgteggacag gatgatctga cgcttcagtt acgcgttctt ggggtgcaccg 1208

cgccacgtca ggaagtggct gctgccgcat gcaggtgaca tgtcatgtac catggcagca 1268

gcacgtgaca tgcacgatgt gctcacgc 1296

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 225

&lt;212&gt; PRT

<213> *Pseudomonas taetrolens*

&lt;400&gt; 2

```

Met Glu Val Ala Met Ser Leu Pro Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Ser Pro
  1           5           10          15
Pro Gln Ala Pro Arg Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gln Asn Val Val Thr
          20           25           30
Pro His Ile Ser Asp Asn Leu Gly Arg His Ile Gly Ala Arg Gly Leu
          35           40           45
Thr Arg Tyr Asn His Thr Gly Lys Leu Val Gly Thr Ala Leu Thr Val
          50           55           60
Lys Thr Arg Pro Gly Asp Asn Leu Tyr Ile Tyr Lys Ala Leu Thr Leu
          65           70           75           80
Ile Glu Pro Gly His Val Leu Val Ile Asp Ala Gln Gly Asp Ala Thr
          85           90           95
Asn Ala Val Ile Gly Glu Leu Ile Lys Leu Tyr Ala Gln Gln Arg Gly
          100          105          110
Cys Val Gly Phe Val Val Asp Gly Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Phe
          115          120          125
Glu Asp Thr Pro Cys Tyr Ala Arg Ser Val Val His Cys Gly Pro Tyr
          130          135          140
Lys Ser Gly Pro Gly Glu Ile Asn Val Pro Val Ser Ile Gly Gly Met
          145          150          155          160
Ile Ile Asn Pro Gly Asp Ile Ile Val Gly Asp Glu Asp Gly Leu Val
          165          170          175
Ala Phe Ser Pro Asp His Ala Glu Gln Val Leu Val Lys Ala Arg Glu
          180          185          190
His Asp Ala His Glu Gln Gln Val Lys Ala Glu Ile Ala Thr Gly Ala
          195          200          205
Ile Asp Gln Ser Trp Leu Asp Lys Val Leu Glu Lys Ala Gly Leu Ala
          210          215          220
Asn
225

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 221

&lt;212&gt; PRT

<213> *Pseudomonas taetrolens*

&lt;400&gt; 3

```

Met Ser Leu Pro Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Ser Pro Pro Gln Ala Pro
  1           5           10           15
Arg Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gln Asn Val Val Thr Pro His Ile Ser
      20           25           30
Asp Asn Leu Gly Arg His Ile Gly Ala Arg Gly Leu Thr Arg Tyr Asn
      35           40           45
His Thr Gly Lys Leu Val Gly Thr Ala Leu Thr Val Lys Thr Arg Pro
      50           55           60
Gly Asp Asn Leu Tyr Ile Tyr Lys Ala Leu Thr Leu Ile Glu Pro Gly
      65           70           75           80
His Val Leu Val Ile Asp Ala Gln Gly Asp Ala Thr Asn Ala Val Ile
      85           90           95
Gly Glu Leu Ile Lys Leu Tyr Ala Gln Gln Arg Gly Cys Val Gly Phe
      100          105          110
Val Val Asp Gly Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Phe Glu Asp Thr Pro
      115          120          125
Cys Tyr Ala Arg Ser Val Val His Cys Gly Pro Tyr Lys Ser Gly Pro
      130          135          140
Gly Glu Ile Asn Val Pro Val Ser Ile Gly Gly Met Ile Ile Asn Pro
      145          150          155          160
Gly Asp Ile Ile Val Gly Asp Glu Asp Gly Leu Val Ala Phe Ser Pro
      165          170          175
Asp His Ala Glu Gln Val Leu Val Lys Ala Arg Glu His Asp Ala His
      180          185          190
Glu Gln Gln Val Lys Ala Glu Ile Ala Thr Gly Ala Ile Asp Gln Ser
      195          200          205
Trp Leu Asp Lys Val Leu Glu Lys Ala Gly Leu Ala Asn
      210          215          220

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

<213> *Pseudomonas taetrolens*

<400> 4

Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gln Asn Val Val Thr Pro His Ile Ser Asp

1 5 10 15

Asn Leu Gly Arg

20

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> *Pseudomonas taetrolens*

<400> 5

Ala Glu Ile Ala Thr Gly Ala Leu Asp Gln Ser Trp

1 5 10

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores 1

<400> 6

ttycaraayg tsqtsacscc sc

22

<210> 7

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores 2

<400> 7	
tgrtcratng cncsqtngc ratytengc	29
<210> 8	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ALD-5' Bam	
<400> 8	
gccgatcca caaggttca gtcattcatg g	31
<210> 9	
<211> 28	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ALD-5' Hind	
<400> 9	
ccgaagcttt cagttcgcca ggccagcc	28
<210> 10	
<211> 40	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores	
<400> 10	
gtatcacgag gccctagctg tgggtgcatg gtcggtgatc	40

<210> 11

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores

<400> 11

ttcgggggatt ccatatgata ccctttttac gtgaacttgc

40

<210> 12

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: mezcla de cebadores

<400> 12

ggggggggca tatgcgacct ccttattacg tgaacttg

38

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: ALD-5\*Nde1

<400> 13

ggttcagtca catatggagg tcgctatgtc

30

<210> 14

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: **ALD-5 \*Nde2**

<400> 14

atggaggtcc attagtcatt gcccggttca cgc

33

<210> 15

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: **BMDAT1**

<400> 15

ccgggattcg ttaatccaaa cgtagctg

29

<210> 16

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: **BMDAT2**

<400> 16

ggcctgcagt taggcattaa ttgaaattgg

30

<210> 17

<211> 1709

<212> ADN

<213> **bacillus macerans**

<220>

<221> CDS

<222> (630) .. (1481)

<400> 17

tacatcaggt agcgccatgc atgacagaaa gggatcatga gcggttatctg ctgcgtttac 60

aacagagtga cgactgagtc agagcaattg tcgactttat cgcagagggtt tttatcagga 120

tcattatgcc atcagcttga gttgcaattc gaggatgcca tgtctgggtca gacaacatta 180

aatccaggca ttgtagcta tgatgtcagt aaagtggtgca gtttagtgat tagtatgcgc 240

tattctgtgt cctatccatt cgatgaaaaa ttacggaggc tcaacgttta gttgtaaaaa 300

gaggattttc attagatatt caagacgact ccaagcccca ttatgtcagt gaagatgatc 360

catttatcca aacattagcg gctatttata gacgtcaatc aggagataca gaaacaccgt 420

tattatctac aggtggtgga acgtatgcac gtgtgctgaa aaaagcgtg gcctttggca 480

tgctattccc tggggagcag gatgtggcgc atcgggcgga tgagtttgta gtgattgaaa 540

atcttgtaaa agcagcggct atttatgcgg aagcaattgt tgagcttgcg ggaaaaaat 600

aacataaaga cgaaaaggat gaacggaaa atg gca tat tca tta tgg aat gat 653  
Met Ala Tyr Ser Leu Trp Asn Asp  
1 5

caa att gtt gaa gaa gga tct att gca atc tca cca gaa gac aga ggt 701  
Gln Ile Val Glu Glu Gly Ser Ile Ala Ile Ser Pro Glu Asp Arg Gly  
10 15 20

tat cag ttt ggt gac ggt att tat gaa gta att aaa gtt tat aac gga 749  
Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Ile Tyr Glu Val Ile Lys Val Tyr Asn Gly  
25 30 35 40

aat atg ttt aca gca caa gag cac att gat cgt ttc tat gcg agc gcc 797  
Asn Met Phe Thr Ala Gln Glu His Ile Asp Arg Phe Tyr Ala Ser Ala  
45 50 55

gaa aaa att cgc ctt gtt atc cct tat aca aaa gat gtt tta cac aag 845  
Glu Lys Ile Arg Leu Val Ile Pro Tyr Thr Lys Asp Val Leu His Lys



60	65	70	
tta cta cat gag cta att gaa aag aat aat cta gaa aca gga cat gtt			893
Leu Leu His Glu Leu Ile Glu Lys Asn Asn Leu Glu Thr Gly His Val			
75	80	85	
tat ttt caa atc act cgt ggg gct aat tca cgt aat cac gtt ttc ccg			941
Tyr Phe Gln Ile Thr Arg Gly Ala Asn Ser Arg Asn His Val Phe Pro			
90	95	100	
gat gca agt att cct gct gta tta act gga aat gta aaa gcg ggt gaa			989
Asp Ala Ser Ile Pro Ala Val Leu Thr Gly Asn Val Lys Ala Gly Glu			
105	110	115	120
cgt gca tat gaa aac ttt gaa aaa ggt gtt aaa gcc act ttt gtt gag			1037
Arg Ala Tyr Glu Asn Phe Glu Lys Gly Val Lys Ala Thr Phe Val Glu			
125	130	135	
gat att cgt tgg ttg cgt tgt gac att aaa tct tta aac ttg ctt ggt			1085
Asp Ile Arg Trp Leu Arg Cys Asp Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly			
140	145	150	
gca gta tta gca aaa caa gaa gct gcg gag aaa ggt tgt tat gaa gcg			1133
Ala Val Leu Ala Lys Gln Glu Ala Ala Glu Lys Gly Cys Tyr Glu Ala			
155	160	165	
atc tta cat cgc gga gat atc gtg aca gaa tgc tct tca gct aat gtt			1181
Ile Leu His Arg Gly Asp Ile Val Thr Glu Cys Ser Ser Ala Asn Val			
170	175	180	
tac gga att aaa gat gga aaa ctt tat aca cat cca gct aat aat ttc			1229
Tyr Gly Ile Lys Asp Gly Lys Leu Tyr Thr His Pro Ala Asn Asn Phe			
185	190	195	200
atc tta aat ggt att aca cgt caa gtc att tta aaa tgt gcg gaa gaa			1277
Ile Leu Asn Gly Ile Thr Arg Gln Val Ile Leu Lys Cys Ala Glu Glu			
205	210	215	
att aat tta cca gta atc gaa gag cca atg acg aaa gct gat tta cta			1325
Ile Asn Leu Pro Val Ile Glu Glu Pro Met Thr Lys Ala Asp Leu Leu			

ES 2 357 765 T3

	220		225		230	
aca atg gat gaa atc att gtg tcg tct gta tct tct gag gtt acg cca						1373
Thr Met Asp Glu Ile Ile Val Ser Ser Val Ser Ser Glu Val Thr Pro						
	235		240		245	
gtc att gat gtg gac ggc aac caa att ggg gct gga gtt ccc ggt gaa						1421
Val Ile Asp Val Asp Gly Asn Gln Ile Gly Ala Gly Val Pro Gly Glu						
	250		255		260	
tgg act cgt caa tta cag caa tca ttt gaa gcg aaa tta cca ctt tca						1469
Trp Thr Arg Gln Leu Gln Gln Ser Phe Glu Ala Lys Leu Pro Leu Ser						
	265		270		275	280
atg aat acc aaa taaaagaacc ttgtagagaa ctatctgtat ggatagttct						1521
Met Asn Thr Lys						
ctttatttat ggggtgaatg ttgggtctcg tcatgtaaaa taaaaggat agtagaataa						1581
tettacagat tgaatttgt agagcaatgt cgatgtaatg aatacataag aatgcataga						1641
ctcttttttac aaaggggatc gagaaaaaag agaactaaag agatggtaag taagaatgga						1701
gtgacctt						1709
<210> 18						
<211> 284						
<212> PRT						
<213> bacillus macerans						
<400> 18						
Met Ala Tyr Ser Leu Trp Asn Asp Gln Ile Val Glu Glu Gly Ser Ile						
1 5 10 15						
Ala Ile Ser Pro Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Ile Tyr						
20 25 30						
Glu Val Ile Lys Val Tyr Asn Gly Asn Met Phe Thr Ala Gln Glu His						
35 40 45						

Ile Asp Arg Phe Tyr Ala Ser Ala Glu Lys Ile Arg Leu Val Ile Pro  
 50 55 60  
 Tyr Thr Lys Asp Val Leu His Lys Leu Leu His Glu Leu Ile Glu Lys  
 65 70 75 80  
 Asn Asn Leu Glu Thr Gly His Val Tyr Phe Gln Ile Thr Arg Gly Ala  
 85 90 95  
 Asn Ser Arg Asn His Val Phe Pro Asp Ala Ser Ile Pro Ala Val Leu  
 100 105 110  
 Thr Gly Asn Val Lys Ala Gly Glu Arg Ala Tyr Glu Asn Phe Glu Lys  
 115 120 125  
 Gly Val Lys Ala Thr Phe Val Glu Asp Ile Arg Trp Leu Arg Cys Asp  
 130 135 140  
 Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Ala Val Leu Ala Lys Gln Glu Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Glu Lys Gly Cys Tyr Glu Ala Ile Leu His Arg Gly Asp Ile Val  
 165 170 175  
 Thr Glu Cys Ser Ser Ala Asn Val Tyr Gly Ile Lys Asp Gly Lys Leu  
 180 185 190  
 Tyr Thr His Pro Ala Asn Asn Phe Ile Leu Asn Gly Ile Thr Arg Gln  
 195 200 205  
 Val Ile Leu Lys Cys Ala Glu Glu Ile Asn Leu Pro Val Ile Glu Glu  
 210 215 220  
 Pro Met Thr Lys Ala Asp Leu Leu Thr Met Asp Glu Ile Ile Val Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Val Ser Ser Glu Val Thr Pro Val Ile Asp Val Asp Gly Asn Gln  
 245 250 255

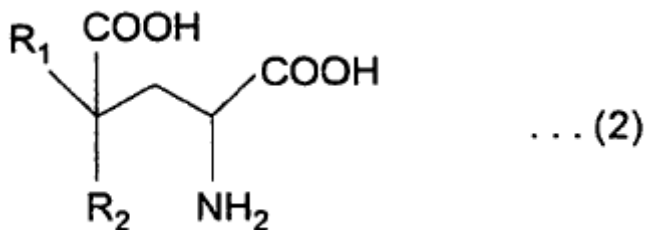
ES 2 357 765 T3

Ile Gly Ala Gly Val Pro Gly Glu Trp Thr Arg Gln Leu Gln Gln Ser  
260 265 270

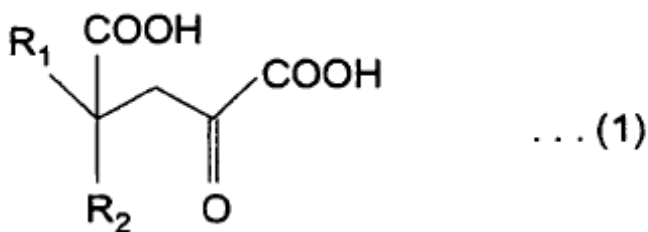
Phe Glu Ala Lys Leu Pro Leu Ser Met Asn Thr Lys  
275 280

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato, incluyendo formas salinas del mismo, de la fórmula general (2)



5 en la que R<sup>1</sup> representa un grupo fenilmetilo o un grupo 3-indolilmetilo, y R<sup>2</sup> representa un grupo hidroxilo, en presencia de una transaminasa que cataliza una reacción para producir el derivado de glutamato de la fórmula general (2) a partir de un ácido α-ceto sustituido de la siguiente fórmula general (1)



10 en la que R<sup>1</sup> representa un grupo fenilmetilo o un grupo 3-indolilmetilo, y R<sup>2</sup> representa un grupo hidroxilo, que incluye una etapa de proseguir la reacción.

2. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 1, en el que el sistema de reacción para la transaminasa contiene uno o varios tipos de aminoácidos como donantes de grupos de aminoácidos.

15 3. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 2, en el que los aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, triptófano, fenilalanina, isoleucina, leucina, tirosina, valina, arginina, asparagina, glutamina, metionina, ornitina, serina, cisteína, histidina y lisina.

20 4. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima es una L-aminoácido transaminasa.

5. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima es una D-aminoácido transaminasa.

25 6. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 5, en el que el sistema de reacción para el mismo contiene una enzima con una actividad que cataliza la reacción para convertir L-aminoácido en D-aminoácido.

7. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 4, en el que la L-aminoácido transaminasa es una enzima derivada de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en los géneros *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Beijerinckia*, *Escherichia*, *Proteus* y *Morganella*.

5 8. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 7, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Aeromonas hydrophila*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Beijerinckia indica*, *Escherichia coli*, *Proteus rettgeri* y *Morganella morganii*.

10 9. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 5 o 6, en el que la D-aminoácido transaminasa es una enzima derivada de un microorganismo del género *Bacillus* o *Paenibacillus*.

15 10. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 9, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus sphaericus*, *Bacillus pulvifaciens*, *Bacillus macerans*, *Bacillus lentus*, *Paenibacillus larvae* subespecie *pulvifaciens* y *Paenibacillus macerans*.

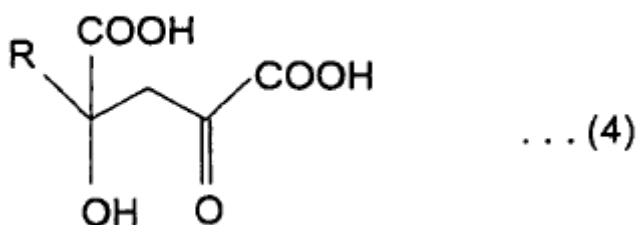
11. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 1, en el que la enzima es una enzima generada por un microorganismo con el gen de la D-aminoácido transaminasa introducido en el mismo.

20 12. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 11, en el que el microorganismo es *Escherichia coli*.

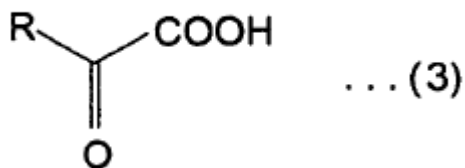
13. Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 11 o 12, en el que el gen de la D-aminoácido transaminasa deriva de *Bacillus sphaericus* o *Bacillus macerans*.

25 14. El procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que además incluye al menos la siguiente etapa [I]:

[I] Una etapa para producir un ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (4)



30 en la que R representa un grupo fenilmetilo o un grupo 3-indolilmetilo, en presencia de una enzima que cataliza la reacción para producir el ácido  $\alpha$ -ceto sustituido de la fórmula general (4) a partir de un ácido  $\alpha$ -ceto sustituido representado por la fórmula general (3)



en la que R representa un grupo fenilmetilo o un grupo 3-indolilmetilo, y ácido oxaloacético o ácido pirúvico, que incluye una etapa de proseguir la reacción.

5 **15.** Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 14, en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [I] deriva de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium* y *Xanthomonas*.

10 **16.** Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 15, en el que el microorganismo es *Pseudomonas taetrolens*, *Pseudomonas coronafaciens*, *Pseudomonas desmolytica*, *Erwinia* sp., *Flavobacterium rhenanum* o *Xanthomonas citri*.

**17.** Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 16, en el que el microorganismo es *Pseudomonas taetrolens* ATCC4683 o *Pseudomonas coronafaciens* AJ2791.

15 **18.** Un procedimiento para producir un derivado de glutamato de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 14, en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [I] es cualquiera de las siguientes proteínas:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias;

20 (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos preparada por la sustitución, eliminación, inserción, adición y/o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias que tienen la actividad de aldolasa;

(c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 3;

25 (d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos preparada por la sustitución, eliminación, inserción, adición y/o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 3 en el listado de secuencias que tienen la actividad de aldolasa.

30 **19.** Un procedimiento para producir un derivado de glutamato descrito en la reivindicación 14, en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [I] es una enzima obtenida a partir de un recombinante en el que el gen que codifica cualquiera de las siguientes proteínas está amplificado y expresado:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias;

(b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos preparada por la sustitución, eliminación, inserción, adición y/o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 2 en el listado de secuencias que tienen actividad de aldolasa;

(c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm.3;

(d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos preparada por la sustitución, eliminación, inserción, adición y/o inversión de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Núm. 3 en el listado de secuencias que tienen la actividad de aldolasa.

**20.** Un procedimiento para producir monatina que incluye al menos las siguientes etapas [A] a [C]:

[A] una etapa para producir ácido indol-3-pirúvico en presencia de una enzima que cataliza la reacción para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico, permitiendo la reacción del triptófano;

[B] una etapa para producir ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico a partir de ácido indol-3-pirúvico, y ácido oxaloacético o ácido pirúvico;

[C] una etapa para producir monatina en presencia de una transaminasa que cataliza la reacción para producir monatina a partir del ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico, permitiendo la reacción del ácido 4-(indol-3-ilmetil)-4-hidroxi-2-oxoglutarico.

**21.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 20, en el que la etapa [A] incluye permitir la reacción de triptófano en presencia de una enzima que cataliza la reacción para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico produciendo así ácido indol-3-pirúvico, y la solución resultante se trata con cualquiera de un tratamiento de desaireación, tratamiento de desoxigenación y tratamiento de ajuste del pH hasta pH 2 como máximo para recolectar ácido indol-3-pirúvico.

**22.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 21, en el que el tratamiento de desaireación o el tratamiento de desoxigenación es un procedimiento para sustituir la totalidad o una parte del gas contenido en la solución de reacción con un gas inactivo.

**23.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 22, en el que el gas inactivo es cualquiera de nitrógeno, argón y helio.

**24.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en las reivindicaciones 21 a 23, en el que el ajuste del pH se lleva a cabo por la adición de un ácido a



la solución de reacción, y el procedimiento además comprende una etapa de cristalización del ácido indol-3-pirúvico producido como una consecuencia del ajuste del pH y la recolección del ácido indol-3-pirúvico.

5       **25.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 24, en el que el ácido es cualquiera de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido fosfórico.

**26.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en las reivindicaciones 20 a 25, en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [A] deriva de un microorganismo que tiene actividad de aminoácido oxidasa y actividad de catalasa.

10       **27.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en las reivindicaciones 20 a 26, en el que la enzima que cataliza la reacción en la etapa [A] deriva de cualquiera de los géneros *Achromobacter*, *Proteus* y *Morganella*.

**28.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 27, en el que la enzima deriva de cualquiera de *Achromobacter* sp. AJ2425, 15 *Proteus rettgeri* IFO13501 y *Morganella morganii* IFO3168.

**29.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en la reivindicación 20, en el que la etapa [A] comprende la interacción de un cultivo de un microorganismo con triptófano, en el que dicho microorganismo posee una capacidad para convertir triptófano en ácido indol-3-pirúvico y se selecciona de los géneros *Achromobacter*, 20 *Proteus*, *Morganella*, *Pseudomonas* y *Neurospora*, y que además comprende la producción de ácido indol-3-pirúvico y después la recolección del ácido indol-3-pirúvico.

**30.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en las reivindicaciones 20 a 29, en el que la etapa [B] se lleva a cabo en presencia de una enzima que cataliza la reacción.

25       **31.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en las reivindicaciones 20 a 29, en el que la etapa [B] se lleva a cabo de acuerdo con un procedimiento químico sintético.

**32.** Un procedimiento para producir monatina de acuerdo con lo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 20 a 31, en el que la etapa [C] comprende un procedimiento descrito en 30 cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.