

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 572**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12P 17/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2006** **E 11000670 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 2361976**

54 Título: **Polipéptidos y rutas biosintéticas para la producción de estereoisómeros de monatina y sus precursores**

30 Prioridad:

26.04.2005 US 674932 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.10.2016

73 Titular/es:

**CARGILL, INCORPORATED (100.0%)
15407 McGinty Road West
Wayzata, MN 55391, US**

72 Inventor/es:

**BRAZEAU, BRIAN, J.;
BURKE, ELLEN;
DE SOUZA, MERVYN;
GORT, STEVEN, J.;
HICKS, PAULA, M.;
KOLLMAN, SHERRY, R.;
LUGINBUHL, PETER;
MCFARLAN, SARA, C.;
RICHARDSON, TOBY;
SANCHEZ-RIERA, FERNANDO, A.;
SOLHEID, CHRISTOPHER;
WEINER, DAVID y
ZHAO, LISHAN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 587 572 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

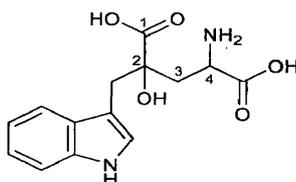
Polipéptidos y rutas biosintéticas para la producción de estereoisómeros de monatina y sus precursores.

5 **Campo de la invención**

La presente exposición proporciona polipéptidos y rutas biosintéticas que resultan útiles en la producción de determinados estereoisómeros de la monatina, tal como R,R-monatina, y sales de la misma.

10 **Antecedentes de la técnica**

La monatina es un edulcorante de alta intensidad que presenta la fórmula química:



15 La monatina incluye dos centros quirales que conducen a cuatro configuraciones estereoisoméricas potenciales. La configuración R,R (el "estereoisómero R,R" o "R,R-monatina"); la configuración S,S (el "estereoisómero S,S" o "S,S-monatina"); la configuración R,S (el "estereoisómero R,S" o "R,S-monatina") y la configuración S,R (el "estereoisómero S,R" o "S,R-monatina"). Tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, el término "monatina" se utiliza para referirse a composiciones que incluyen los cuatro estereoisómeros de la monatina, composiciones que incluyen cualquier combinación de estereoisómeros de la monatina (por ejemplo una composición que incluye únicamente estereoisómeros R,R y S,S de la monatina), así como una forma una sola forma isomérica.

25 En el contexto de la presente exposición, el esqueleto de carbonos de la monatina se numera tal como se ha ilustrado anteriormente, con el carbono directamente unido en enlace covalente con el grupo alcohol identificado como el carbono de posición 2 y el carbono directamente unido en enlace covalente con el grupo amino identificado con el carbono de posición 4. En consecuencia, las referencias en la presente memoria a R,R-monatina, S,S-monatina, R,S-monatina y S,R-monatina se refieren a: 2R,4R-monatina, 2S,4S-monatina, 2R,4S-monatina y 2S,4R-monatina, respectivamente, a menos que se indique lo contrario.

35 Debe indicarse que en la literatura el esqueleto de carbonos de la monatina también ha sido numerado utilizando una convención alternativa, encontrándose el carbono unido al grupo alcohol en la posición 4, y siendo el carbono unido al grupo amino el carbono de posición 2. De acuerdo con lo anterior, por ejemplo, las referencias a la 2S,4R-monatina en la presente exposición serían las mismas que las referencias a la 2R,4S-monatina en la literatura utilizando la convención alternativa de numeración.

40 Además, debido a las diversas convenciones de denominación, la monatina es conocida por varios nombres químicos alternativos, entre ellas: ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-amioglutárico, ácido 4-amino-2-hidroxi-2-(1H-indol-3-ilmetil)-pentanodioico, ácido 4-hidroxi-4-(3-indolilmetil)glutámico y 3-(1-amino-1,3-dicarboxi-3-hidroxi-4-but-il)indol.

45 Pueden encontrarse determinadas formas isoméricas de la monatina en la corteza de raíces de la planta *Schlerochiton ilicifolius* situada en la región Transvaal de Sudáfrica. Las solicitudes de patente US nº 10/422.366 ("la solicitud '366"), nº 10/979.821 ("la solicitud '821") y nº 11/114.922 ("la solicitud '922") dan a conocer, entre otros, polipéptidos, rutas y microorganismos para la producción in vitro e in vivo de monatina.

El documento WO 2005/020721 da a conocer D-aminotransferasas de *Bacillus*. El documento WO 2005/016022 describe la ruta biosintética de la monatina, así como la utilización de las D-aminotransferasas en dicha ruta.

50 **Breve resumen de la invención**

La presente exposición proporciona, entre otras cosas, polipéptidos y rutas biosintéticas que resultan útiles en la producción de determinados estereoisómeros de la monatina, tales como la R,R-monatina y sales de la misma. Entre los métodos se incluye la utilización de uno o más polipéptidos, y en particular enzimas, tal como las D-aminotransferasas de amplia especificidad (también denominadas D-alanina aminotransferasas) para producir R,R-monatina sin necesidad de utilizar cantidades estequiométricas de sustrato D-aminoácido como el donante aminoácido para la aminación de PM.

60 En aras de la brevedad, cuando se identifica en la memoria y en las reivindicaciones que se están formando

intermediarios/productos (por ejemplo monatina o precursor de monatina), la expresión "y/o sales de los mismos" debe apreciarse que se encuentran incluidos, en caso aplicable. En otras palabras, por ejemplo la expresión "se convierte indol-3-piruvato en PM" debería entenderse como "el ácido indol-3-pirúvico se convierte en PM y/o sales del mismo". El experto ordinario en la materia, de hecho, apreciará que bajo las condiciones de reacción mostradas, las sales de los intermediarios/productos se encuentran presentes de hecho o se encuentran adicionalmente presentes.

Según algunas formas de realización, el método produce una composición de monatina en la que el componente monatina de la composición incluye únicamente la forma R,R y S,R de la monatina. El término "únicamente", utilizado para indicar que sólo se forman determinados isómeros, a menos que se indique lo contrario se refiere a que la ruta producirá únicamente los isómeros identificados en caso de no producirse la racemización. En consecuencia, el término "únicamente" no debe interpretarse que se refiere a la ausencia de otros isómeros, sino que por el contrario un experto ordinario en la materia entenderá que pueden encontrarse presentes otras formas isoméricas en una cantidad relativamente reducida debido a que puede producirse la racemización. Según algunas formas de realización, el método produce una composición de monatina en la que el componente monatina de la composición incluye únicamente la forma R,R de la monatina (de esta manera se refiere a excepto en la medida en que se produce la racemización, resultando en otras formas isoméricas).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "composición de monatina" se refiere a una composición que incluye uno o más isómeros de monatina; la expresión también puede referirse a una composición que incluye únicamente una sola forma isomérica de la monatina y nada más, dependiendo del contexto.

Se proporciona un procedimiento para producir una composición de monatina, que incluye producir indol-3-piruvato a partir de L-triptófano, produciendo ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-ceto-glutárico ("precursor de monatina" o "PM") a partir de indol-3-piruvato, y producir monatina a partir de PM. La reacción de L-triptófano para producir indol-3-piruvato se ve facilitada por un enzima con mayor especificidad, mayor actividad o ambas para el L-triptófano como sustrato que para R-PM, R,R-monatina o ambos, y la reacción del PM para formar monatina se ve facilitada por un enzima que es estereoselectivo para R-PM.

Debe indicarse que, cuando se hace referencia a una serie de reacciones, tal como en los párrafos anteriores, la invención no requiere que se lleve a cabo explícitamente cada etapa; resulta suficiente que las etapas se lleven a cabo implícitamente. En otras palabras, por ejemplo el procedimiento para producir una composición de monatina, que incluye producir indol-3-piruvato a partir de L-triptófano, produciendo ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-ceto-glutárico ("precursor de monatina" o "PM") a partir de indol-3-piruvato, y produciendo monatina a partir de PM, en el que cada reacción se ve facilitada por un enzima apropiado, puede llevarse a cabo mediante la combinación de L-triptófano con los enzimas y condiciones del medio, de manera que las reacciones enumeradas puedan producirse. En este caso, el L-triptófano podría reaccionar para producir indol-3-piruvato, el indol-3-piruvato producido a partir de la reacción de L-triptófano podría reaccionar para formar PM, y el PM producido a partir de la reacción de indol-3-piruvato podría reaccionar para formar monatina. El procedimiento también podría llevarse a cabo, a título de ejemplo, proporcionando un compuesto que pueda producir L-triptófano, bajo condiciones adecuadas para que pueda ocurrir la producción de L-triptófano y combinando dicho compuesto con enzimas capaces de facilitar la serie de reacciones indicadas bajo condiciones que resultarían adecuadas para que ocurran dichas reacciones. A título de ejemplo adicional, el procedimiento podría llevarse a cabo proporcionando un microorganismo genéticamente modificado para producir monatina según la ruta indicada, y proporcionando condiciones apropiadas para que se produzca el proceso de la fermentación. Por ejemplo, un microorganismo que produzca naturalmente grandes cantidades de L-triptófano (o D-triptófano) podría manipularse genéticamente para producir o producir en exceso uno o más de los enzimas utilizados para facilitar las reacciones en la ruta a la monatina, y podrían proporcionarse condiciones apropiadas para que el microorganismo produzca de esta manera monatina.

Se proporciona un procedimiento para producir monatina en el que un sustrato α -acetoácido forma un L-aminoácido al convertir L-triptófano en indol-3-piruvato; el indol-3-piruvato reacciona para formar PM (que puede incluir tanto R-PM como S-PM, aunque preferentemente incluye única o predominantemente R-PM) y el L-aminoácido reacciona para regenerar (también se utiliza el término "reciclar") el sustrato α -cetoácido al convertir R-PM en R,R-monatina. La reacción de R-PM para formar R,R-monatina resulta facilitada por una aminotransferasa estereoinversora, tal como la D-metionina aminotransferasa (EC 2.6.1.41) o un enzima derivado de una D-fenilglicina aminotransferasa.

Se proporciona un procedimiento para producir una composición de monatina que incluye producir D-triptófano a partir de L-triptófano, producir indol-3-piruvato a partir de D-triptófano, producir R-PM a partir de indol-3-piruvato y producir R,R-monatina a partir de R-PM. La producción del D-triptófano a partir de L-triptófano resulta facilitada por una triptófano racemasa y equivalentes funcionales de la misma. En determinadas formas de realización adicionales, las reacciones del D-triptófano para formar indol-3-piruvato y de PM para formar monatina resultan facilitadas por el mismo enzima. En todavía otras formas de realización adicionales, la reacción del indol-3-piruvato resulta facilitada por un enzima que presenta actividad aldolasa específica de R y en consecuencia se forma R-PM, y las reacciones del D-triptófano para formar indol-3-piruvato y de R-PM para formar R,R-monatina resultan facilitadas por el mismo enzima.

Se da a conocer en la presente memoria un método para producir R,R-monatina, o una sal de la misma, que comprende, o que consiste esencialmente de (a) la producción de D-triptófano a partir de L-triptófano utilizando una triptófano racemasa (la racemasa debería presentar una actividad limitada o nula sobre la monatina), (b) la producción de indol-3-piruvato a partir de D-triptófano, (c) la producción de precursor de R-monatina a partir de indol-3-piruvato, y (d) la producción de R,R-monatina a partir de precursor de R-monatina.

Más concretamente, la presente invención proporciona un método para producir R,R-monatina, o una sal de la misma, que comprende hacer reaccionar precursor de monatina y una o más D-aminotransferasas seleccionadas de entre una D-aminotransferasa de *Bacillus halodurans* que comprende la secuencia de aminoácidos listada en el número de acceso NP_243677, una D-aminotransferasa híbrida que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 99, una D-aminotransferasa de la ATCC nº 4978 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 86, una D-aminotransferasa de la ATCC nº 7063 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 87, y homólogos de las mismas con una homología de secuencias respecto a las mismas de por lo menos 90%. De manera similar, la presente invención proporciona además la utilización de una o más D-aminotransferasas seleccionadas de entre una D-aminotransferasa de *Bacillus halodurans* que comprende la secuencia de aminoácidos listada en el número de acceso nº NP_243677, una D-aminotransferasa híbrida que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 99, una D-aminotransferasa de la ATCC nº 4978 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 86, una D-aminotransferasa de la ATCC nº 7063 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 87, y homólogos de las mismas con una homología de secuencias respecto a las mismas de por lo menos 90%, para producir R,R-monatina, o una sal de la misma. En algunas formas de realización, dicho método o utilización comprende además hacer reaccionar D-triptófano y dicha o dichas D-aminotransferasas, en particular en la que por lo menos aproximadamente 75% de la monatina producida es R,R-monatina. En una forma de realización particular de la utilización, dicha o dichas D-aminotransferasas se hacen reaccionar con precursor de monatina y/o D-triptófano. En una forma de realización, la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa de *Bacillus halodurans* que comprende la secuencia de aminoácidos listada en el número de acceso NP_243677 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencias de por lo menos 90% respecto a la misma. En otra forma de realización, la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa híbrida que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 99 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencias de por lo menos 90% respecto a la misma. En todavía otra forma de realización, la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa de la ATCC nº 4978 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 86 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencias de por lo menos 90% respecto a la misma. En todavía otra forma de realización, la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa de la ATCC nº 7063 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 87 o una secuencia de aminoácidos con una secuencia de por lo menos 90% respecto a la misma.

Finalmente, la presente invención proporciona además una D-aminotransferasa híbrida que comprende la SEC ID nº 99, o un homólogo de la misma con una homología de secuencias de por lo menos 90% respecto a la misma, una D-aminotransferasa de la ATCC nº 4978 que comprende la SEC ID nº 86, o un homólogo de la misma con una homología de secuencias de por lo menos 90% respecto a la misma, y una D-aminotransferasa de la ATCC nº 7063 que comprende la SEC ID nº 87, o un homólogo de la misma con una homología de por lo menos 90% respecto a la misma.

Aunque se dan a conocer múltiples formas de realización, podrían resultar evidentes para el experto en la materia a partir de la memoria todavía otras formas de realización de la presente invención. De acuerdo con lo anteriormente indicado, los dibujos y la descripción detallada deben considerarse como de ilustrativos y no como limitativos.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama de flujo que representa un ejemplo de un procedimiento enzimático para producir R,R-monatina a partir de L-triptófano según la invención. En el presente ejemplo, el procedimiento incluye una L-aminotransferasas (ejemplos de las cuales incluyen una L-triptófano aminotransferasa, una L-aromático aminotransferasa, una L-aspartato aminotransferasa y una L-alanina aminotransferasa) en la reacción del L-triptófano que presenta mayor especificidad y/o selectividad para el L-triptófano como sustrato que para R-PM y/o una L-aminoácido oxidasa con actividad y/o especificidad limitada para la R,R-monatina como sustrato.

La figura 2 es un diagrama de flujo que representa un ejemplo de otro procedimiento para producir R,R-monatina según la invención. En el presente ejemplo el procedimiento incluye utilizar un enzima para convertir la R-PM en monatina que es estereoselectivo para R-PM.

La figura 3 es un diagrama de flujo que representa un ejemplo de todavía otro procedimiento para producir R,R-monatina a partir de L-triptófano. En el presente ejemplo, el procedimiento incluye convertir el L-triptófano en D-triptófano utilizando una triptófano racemasa y utilizando un producto D-aminoácido en la reacción acoplada con la reacción de formación de indol-3-piruvato como sustrato en la reacción acoplada con la reacción de formación de R,R-monatina.

La figura 4 es un diagrama de flujo que representa un ejemplo de todavía otro procedimiento para producir R,R-monatina a partir de L-triptófano. En el presente ejemplo, el procedimiento incluye convertir el L-aminoácido formado

en la reacción acoplada con la reacción del L-triptófano en un D-aminoácido; dicho D-aminoácido actúa como donante de aminos para la reacción en la que el R-PM se convierte en R,R-monatina.

5 La figura 5 es un diagrama de flujo que representa un ejemplo de todavía otro procedimiento para producir R,R-monatina a partir de L-triptófano. En el presente ejemplo, el procedimiento incluye facilitar enzimáticamente la conversión de R-PM en R,R-monatina utilizando un enzima estereoinversor de manera que el L-aminoácido formado en la reacción acoplada a la reacción del L-triptófano puede utilizarse como sustrato para la reacción acoplada con la reacción de R-PM en R,R-monatina.

10 La figura 6 es un diagrama de flujo que representa un ejemplo de todavía otro procedimiento para producir R,R-monatina. En el presente ejemplo, el procedimiento incluye reciclar el L-aminoácido producido en la reacción de formación de indol-3-piruvato con el D-aminoácido utilizado como reactivo con R-PM en la reacción de formación de R,R-monatina mediante una serie de reacciones de conversión.

15 La figura 7 es un diagrama de flujo que representa un ejemplo de todavía otro procedimiento para producir R,R-monatina. En el presente ejemplo, el procedimiento incluye impulsar hacia adelante la reacción del L-triptófano (es decir, impulsar la reacción hacia la producción de indol-3-piruvato) mediante la conversión del producto secundario L-aminoácido de dicha reacción en otro producto. En el presente ejemplo, el producto secundario L-aminoácido L-aspartato se convierte en L-alanina en una reacción irreversible utilizando una descarboxilasa.

20 La figura 8 es un diagrama de flujo que representa un ejemplo de todavía otro procedimiento para producir R,R-monatina. En el presente ejemplo, el procedimiento incluye reciclar el producto secundario aminoácido de la reacción del L-triptófano con el reactivo aminoácido de la reacción de R-PM mediante una serie de reacciones de conversión.

25 La figura 9 (A y B) representa la alineación de secuencias de aminoácidos de diversas D-aminoácido aminotransferasas ("DAAT") de *Bacillus* publicadas. Los aminoácidos subrayados señalan las regiones de homología. Los cinco cebadores de PCR fueron diseñados basándose en las regiones conservadas. Los cebadores de PCR eran los siguientes: 5'-GAAGACCGTGGTTATCAATTT-3' (SEC ID nº 65) (cebador directo, F1, tal como se indica en la figura 9A), 5'-GATGGTATTTACGAAGTAATC-3' (SEC ID nº 66) (cebador directo, F2 tal como se indica en la figura 9A), 5'-AGATTTAATATCACAACGTAAC-3' (SEC ID nº 67) (cebador inverso, R1 tal como se indica en la figura 9A), 5'-GCCAAGTAAAATTTAAGATTTA-3' (SEC ID nº 68) (cebador inverso, R2 tal como se indica en la figura 9A), 5'-ATTTGCTGGGTGCGTATAAAG-3' (SEC ID nº 69) (cebador inverso, R3 tal como se indica en la figura 9B).

35 La figura 10(A y B) representa la alineación de las secuencias de aminoácidos de las dos nuevas DAAT de la ATCC nº 4978 y la ATCC nº 7063 con la DAAT de *B. sphaericus* (clonada en el Ejemplo 18). Los aminoácidos no homólogos se encuentran subrayados.

40 Descripción detallada de la invención

40 Abreviaturas y términos

Las explicaciones siguientes de los términos y métodos se proporcionan con el fin de describir mejor la presente exposición y para guiar al experto ordinario en la materia en la práctica de la presente exposición. Tal como se utiliza en la presente memoria, "incluyendo" se refiere a "comprendiendo". En adelante cuando se utilice el término "incluye" debe apreciarse "que incluye, aunque sin limitación", se indique o no explícitamente "aunque sin limitación". Además, las formas singulares "un" y "una o "el" y "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "comprendiendo una proteína" incluye una o una pluralidad de dichas proteínas, y la referencia a "comprendiendo la célula" incluye la referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidos por el experto en la materia, etc. El término "aproximadamente" comprende el intervalo de error experimental que se produce en cualquier medición. A menos que se indique lo contrario, todos los números de las mediciones se supone que presentan el término "aproximadamente" delante de los aunque no se utilice expresamente la palabra "aproximadamente".

55 Sustitución conservadora: una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido en un polipéptido, en la que la sustitución presenta muy poco o ningún impacto sobre la actividad del polipéptido. La sustitución se considera conservadora con independencia de si los aminoácidos intercambiados aparentemente son estructural o funcionalmente similares. Por ejemplo, idealmente un polipéptido triptófano aminotransferasa que incluye una o más sustituciones conservadoras conserva la actividad de triptófano aminotransferasa. Puede producirse un polipéptido para que contenga una o más sustituciones conservadoras mediante la manipulación de la secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido utilizando, por ejemplo, procedimientos estándares tales como la mutagénesis dirigida a sitio o la PCR, u otros métodos conocidos por el experto en la materia.

65 Entre los ejemplos no limitativos de aminoácidos que pueden sustituirse por un aminoácido original en una proteína y que pueden considerarse sustituciones conservadoras en caso de que se produzca poco o ningún impacto sobre la actividad del polipéptido se incluyen: Ala sustituido por Ser o Thr; Arg sustituido por Gln, His o Lys; Asn sustituido

por Glu, Gln, Lys, His, Asp; Asp sustituido por Asn, Glu o Gln; Cys sustituido por Ser o Ala; Gln sustituido por Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg; Glu sustituido por Asn, Gln, Lys o Asp; Gly sustituido por Pro; His sustituido por Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr; ILe sustituido por Leu, Met, Val o Phe; Leu sustituido por Ile, Met, Val o Phe; Lys sustituido por Asn, Glu, Gln, His o Arg; Met sustituido por Ile, Leu, Val o Phe; Phe sustituido por Trp, Tyr, Met, Ile o Leu; Ser sustituido por Thr o Ala; Thr sustituido por Ser o Ala; Trp sustituido por Phe o Tyr; Tyr sustituido por His, Phe o Trp; y Val sustituido por Met, Ile o Leu.

Puede encontrarse información adicional sobre las sustituciones conservadoras en, entre otros, Ben-Bassat et al., J. Bacteriol. 169:751-757, 1987; O'Regan et al., Gene 77:237-251, 1989; Sahin-Toth et al., Protein Sci. 3:240-247, 1994; Hochuli et al., Bio/Technology 6:1321-1325, 1988; documento WO 00/67796 (Curd et al.) y en libros de texto estándares de genética y biología molecular.

Derivado: en el contexto de la memoria y las reivindicaciones, una sustancia es "derivada" de un organismo o fuente en el caso de que cualquiera o cualesquiera de los siguientes sea cierto: 1) la sustancia se encuentra presente en el organismo/fuente, 2) la sustancia se extrae del huésped nativo, o 3) la sustancia se extrae del huésped nativo y se hace evolucionar, por ejemplo mediante mutagénesis.

Aislado: el término "aislado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia extraída de su huésped nativo; la sustancia no es necesario que muestre ningún grado específico de pureza. Por ejemplo, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico natural que no es inmediatamente contiguo a ambas secuencias con las que es inmediatamente contiguo (uno en el extremo 5' y uno en el extremo 3') en el genoma natural del organismo a partir del que se deriva. Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser, aunque sin limitación una molécula de ADN recombinante de cualquier longitud, con la condición de que se extraiga o no se encuentre presente una de las secuencias de ácidos nucleicos normalmente observadas en posición inmediatamente flanqueante a la molécula de ADN recombinante en un genoma natural. De esta manera, un ácido nucleico aislado incluye, aunque sin limitación, un ADN recombinante que existe como molécula independiente (por ejemplo un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) con independencia de otras secuencias, así como ADN recombinante que se incorpora en un vector, un plásmido de replicación autónoma, un virus (por ejemplo un retrovirus, adenovirus o herpesvirus) o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir una molécula de ADN recombinante que es parte de una secuencia de ácidos nucleicos híbrida o de fusión.

El término "aislado" tal como se utiliza en la presente memoria en referencia a un ácido nucleico incluye además cualquier ácido nucleico no natural debido a que las secuencias de ácidos nucleicos no naturales no se encuentran naturalmente y no presentan secuencias inmediatamente contiguas en un genoma natural. Por ejemplo, un ácido nucleico no natural, tal como un ácido nucleico manipulado, se considera que es ácido nucleico aislado. Los ácidos nucleicos manipulados pueden prepararse utilizando técnicas moleculares comunes de clonación o síntesis química de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos no naturales aislados pueden ser independientes de otras secuencias, o incorporarse en un vector, en un plásmido de replicación autónoma, en un virus (por ejemplo un retrovirus, adenovirus o herpesvirus) o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote. Además, un ácido nucleico no natural puede incluir una molécula de ácidos nucleicos que es parte de una secuencia de ácidos nucleicos híbrida o de fusión.

Un ácido nucleico que se encuentra entre cientos a millones de otras moléculas de ácidos nucleicos dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o genómicas, o secciones de gel que contienen una digestión de restricción de ADN genómico, no debe considerarse un ácido nucleico aislado.

Purificado: el término "purificado" tal como se utiliza en la presente memoria indica qué contaminantes han sido extraídos de la muestra de interés. El término "purificado" no requiere pureza absoluta sino que pretende ser un término relativo, a menos que el contexto indique lo contrario. De esta manera, por ejemplo una preparación purificada de polipéptidos o ácidos nucleicos puede ser una en la que el polipéptido o ácido nucleico se encuentra a una concentración más alta de la que estaría el polipéptido o ácido nucleico en su medio natural dentro de un organismo o a una concentración más alta de la que estaría en el medio del que ha sido extraído.

Aminotransferasa estereoinversora: una "aminotransferasa estereoinversora" es un polipéptido capaz de producir preferente o selectivamente un producto aminoácido quiral (tal como monatina) utilizando simultáneamente un sustrato de quiralidad contraria como el donante de aminos. Por ejemplo, una aminotransferasa estereoinversora puede ser una D-fenilglicina aminotransferasa (también denominada D-4-hidroxifenilglicina aminotransferasa) que utiliza preferente o selectivamente L-glutamato como sustrato para producir R,R-monatina. Entre los ejemplos no limitativos de aminotransferasas estereoinversoras se incluyen D-metionina aminotransferasa (EC 2.6.1.41) y enzimas que presentan actividad de D-fenilglicina aminotransferasa o actividad de D-4-hidroxifenilglicina aminotransferasa.

Gene complementario: un "gen complementario" es un gen que, al expresarse, anula una mutación en un organismo. Por ejemplo, en el caso de que un organismo presente una mutación nula en uno de los genes requeridos para la síntesis de triptófano por la célula, un gen complementario podría ser uno que, al expresarse,

permite que la cepa crezca en medio mínimo (es decir, sin triptófano).

Enzima estereoselectivo: un "enzima estereoselectivo" es un enzima que presenta una especificidad mayor y/o una actividad mayor con un isómero, en comparación con la especificidad y/o actividad con otro isómero. Por ejemplo, un enzima estereoselectivo es uno que presenta una especificidad y/o actividad mayor para R-PM que para S-PM. En formas de realización preferentes, un enzima estereoselectivo presenta una actividad limitada con un isómero en comparación con otro. El término "limitada" referido a la actividad se refiere a que la actividad es mínimamente perceptible o no es perceptible, por ejemplo según se determina en experimentos proporcionados en la presente memoria. El Ejemplo 6, por ejemplo, identifica HEXAspCP9T/R122G como un enzima con actividad limitada sobre la S,S-monatina. El Ejemplo 8 identifica TatA de *S. melloti* como otro enzima con actividad limitada sobre S-PM. En el Ejemplo 18, la D-aminotransferasa de *B. halodurans* presentaba una selectividad más elevada para R-PM que para S-PM, resultando en una estereopureza más alta de R,R-monatina. Además, el Ejemplo 19 indica que la DAT híbrida presenta una actividad limitada sobre S-PM en comparación con R-PM.

Homólogo: el término "homólogo" tal como se utiliza en la presente memoria indica que una proteína o un ácido nucleico muestra un grado de identidad de secuencias relativamente elevado respecto a una secuencia de otra proteína o ácido nucleico en el caso de que las dos secuencias se alineen utilizando métodos estándares. Por ejemplo, una aldolasa específica de R es homóloga respecto a la aldolasa de SEC ID nº 22 en el caso de que la aldolasa específica de R contenga por lo menos una identidad de secuencias de aproximadamente 50% respecto a la aldolasa de SEC ID nº 22 en el caso de que las dos secuencias se alineen utilizando métodos estándares.

Número EC: el número de clasificación de los enzimas asignado por la International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

Rutas biosintéticas para producir R,R y otros estereoisómeros de la monatina

Tal como se ha indicado en, entre otros, el documento WO 03/091396 A2 (ver, por ejemplo, las figuras 1 a 3 y 11 a 13), la monatina puede producirse a partir de triptófano mediante una ruta multietapa que implique conversiones biológicas (es decir, facilitando la reacción de un sustrato en un producto utilizando un polipéptido). Una ruta descrita implica convertir biológicamente triptófano en indol-3-piruvato, convertir biológicamente el indol-3-piruvato en ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)4-cetoglutárico ("PM") y convertir biológicamente PM en monatina. La ruta de biosíntesis que se utiliza para producir monatina puede comprender, o consistir esencialmente de, una o más de las etapas, mecanismos y/o rutas siguientes. Las etapas, mecanismos y/o rutas indicadas posteriormente se pretende simplemente sean ejemplares.

Un método para producir monatina, o una sal de la misma, comprende: (a) producir indol-3-piruvato a partir de L-triptófano, (b) producir precursor de monatina a partir de indol-3-piruvato, y (c) producir monatina a partir del precursor de monatina.

Entre los enzimas útiles para convertir triptófano en indol-3-piruvato se incluyen miembros de las clasificaciones enzimáticas ("EC") 2.6.1.27, 1.4.1.19, 1.4.99.1, 2.6.1.28, 1.4.3.2, 1.4.3.3, 2.6.1.5, 2.6.1.-, 2.6.1.1, 2.6.1.21 y 3.5.1.-. Entre estas clases se incluyen polipéptidos tales como: triptófano aminotransferasas, que convierten el L-triptófano en α -KG (es decir, α -cetoglutarato, también denominado 2-oxoglutarato) en indol-3-piruvato y L-glutamato; D-triptófano aminotransferasa, que convierte el D-triptófano y un 2-oxoácido en indol-3-piruvato y un aminoácido; la triptófano deshidrogenasa, que convierte el L-triptófano y NAD(P) en indol-3-piruvato y NH_3 y NAD(P)H; la D-aminoácido deshidrogenasa, que convierte los D-aminoácidos y FAD en indol-3-piruvato y NH_3 y FADH_2 ; la triptófano-fenilpiruvato transaminasa, que convierte el L-triptófano y el fenilpiruvato en indol-3-piruvato y L-fenilalanina; la L-aminoácido oxidasa, que convierte un L-aminoácido y H_2O y O_2 en un 2-oxoácido y NH_3 y H_2O_2 ; la D-aminoácido oxidasa, que convierte el L-triptófano y H_2O y O_2 en indol-3-piruvato y NH_3 y H_2O_2 . Estas clases contienen además tirosina aminotransferasas (aromáticas), aspartato aminotransferasa, D-aminoácido (o D-alanina) aminotransferasa y aminotransferasas amplias (múltiples sustratos) que presentan múltiples actividades de aminotransferasa, algunas de las cuales puede convertir el triptófano y un 2-oxoácido en indol-3-piruvato y un aminoácido. Además, entre estas clases se incluyen las fenilalanina desaminasas, que pueden convertir el triptófano en indol-3-piruvato y amonio en presencia de agua.

La producción de indol-3-piruvato a partir de L-triptófano también puede resultar facilitada por uno o más enzimas que presentan una mayor actividad, mayor especificidad, o ambas, para el L-triptófano como sustrato que para el PM o la monatina. Entre los enzimas que presentan una mayor actividad y/o una mayor especificidad para el L-triptófano como sustrato que para PM o la monatina se incluyen, aunque sin limitación, las L-triptófano aminotransferasas, las L-aromático aminotransferasas, las L-aspartato aminotransferasas y las L-aminoácido oxidasas.

Entre los enzimas útiles para convertir el indol-3-piruvato en PM se incluyen los elementos de las clases de enzima EC 4.1.3.-, 4.1.3.16, 4.1.3.17 y 4.1.2.-. Entre estas clases se incluyen las sintasas/liasas carbono-carbono, tales como aldolasas que catalizan la condensación de dos sustratos ácido carboxílico. La clase de enzima EC 4.1.3.- son

aquellas sintasas/liasas que forman enlaces carbono-carbono utilizando sustratos oxoácido (tales como indol-3-piruvato) como el electrófilo, mientras que EC 4.1.2.- son sintasas/liasas que forman enlaces carbono-carbono que utilizan sustratos aldehído (tales como benzaldehído) como el electrófilo. Por ejemplo, la KHG aldolasa (EC 4.1.3.16) y la ProA aldolasa (EC 4.1.3.17) es conocido que convierten el indol-3-piruvato y el piruvato en MP. Aunque la ProA aldolasa puede considerarse que identifica únicamente la 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato aldolasa derivada de *Comamonas testosteroni*, en la presente memoria la expresión ProA aldolasa se utiliza para referirse a cualquier polipéptido con actividad de 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato, a menos que se indique lo contrario. Entre los ejemplos adecuados de Pro aldolasa se incluyen ProA de *Comamonas testosteroni* (SEC ID nº 1 (secuencia de ácidos nucleicos), SEC ID nº 2 (secuencia de aminoácidos)) y ProA de *Sinorhizobium meliloti* (NCBI nº de acceso CAC46344) o enzimas que muestran homología respecto a ProA de *Comamonas testosteroni* (SEC ID nº 1 (secuencia de ácidos nucleicos), SEC ID nº 2 (secuencia de aminoácidos)) y/o ProA de *Sinorhizobium meliloti* (NCBI nº de acceso CAC46344). Por ejemplo, los enzimas adecuados presentan una identidad de secuencias de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% y/o 99% respecto a ProA de *Comamonas testosteroni* (SEC ID nº 2) y/o ProA de *Sinorhizobium meliloti* (NCBI nº de acceso CAC46344). PM también puede generarse utilizando reacciones químicas, tales como las condensaciones de aldol.

Entre los enzimas útiles para la conversión de PM en monatina se incluyen elementos de las clases de enzima (EC). triptófano aminotransferasas (2.6.1.27), triptófano deshidrogenasas (1.4.1.19), D-aminoácido deshidrogenasas (1.4.99.1), glutamato deshidrogenasas (1.4.1.2-4), fenilalanina deshidrogenasa (1.4.1.20), triptófano-fenilpiruvato transaminasas (2.6.1.28) o más generalmente, elementos de la familia de las aminotransferasas (2.6.1.-), tales como la aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1), la tirosina aminotransferasa (aromática) (2.6.1.5), la D-triptófano aminotransferasa o la D-alanina aminotransferasa (2.6.1.21) (ver la figura 2 del documento nº WO 03/091396 A2). Esta reacción también puede llevarse a cabo utilizando reacciones químicas. La aminación del cetoácido (PM) se lleva a cabo mediante aminación reductora utilizando amonio y cianoborohidruro sódico. Las figuras 11 a 13 del documento nº WO 03/091396 A2 muestran polipéptidos adicionales que pueden utilizarse para convertir PM en monatina, así como que pueden proporcionar rendimientos incrementados de monatina a partir de indol-3-piruvato o triptófano.

El perfil de sabor de una composición de monatina puede alterarse mediante el control de la cantidad relativa de los diversos estereoisómeros de la monatina en la composición. La presente exposición proporciona rutas y sustancias para producir composiciones de monatina con un porcentaje deseado de R,R-monatina y/o S,R-monatina.

La quiralidad de los compuestos de monatina que se produce mediante rutas tales como las ejemplificadas en la presente memoria puede alterarse tanto con el pH como con los polipéptidos utilizados para las conversiones biológicas. Al formarse monatina utilizando una ruta biosintética, puede considerarse lo siguiente. En una reacción biocatalítica, la quiralidad del carbono-2 de la monatina (ver la estructura química, anteriormente) se determina mediante el enzima que convierte el indol-3-piruvato en PM. Múltiples enzimas (por ejemplo de EC 4.1.2.-, 4.1.3.-) pueden convertir en indol-3-piruvato en PM. De esta manera, puede seleccionarse el enzima que forme el isómero deseado. Alternativamente, la enantioespecificidad del enzima que convierte el indol-3-piruvato en PM puede modificarse mediante la utilización de evolución dirigida o pueden manipularse anticuerpos catalíticos para catalizar la reacción deseada. Tras la producción de PM (enzimáticamente o mediante condensación química), puede añadirse el grupo amino de manera estereoespecífica. Puede configurarse la configuración R o S del carbono 4 (ver la estructura química anterior) dependiendo de si se utiliza una D- o L-ácido aromático aminotransferasa. Muchas aminotransferasas son específicas del isómero L; sin embargo, existen D-triptófano aminotransferasas en determinadas plantas (Kohiba y Mito, Proceedings of the 8th International Symposium on Vitamina B6 and Carbonyl Catalysis, Osaka, Japón, 1990). Además, se han identificado D-alanina aminotransferasas (EC 2.6.1.21), D-metionina-piruvato aminotransferasas (EC 2.6.1.41) y (R)-3-amino-2-metilpropanoato aminotransferasa (EC 2.6.1.61), (S)-3-amino-2-metilpropanoato aminotransferasa (EC 2.6.1.22) y D-fenilglicina aminotransferasa. Determinadas aminotransferasas pueden aceptar únicamente el sustrato para esta reacción con una configuración particular en el carbono C2. Por lo tanto, aunque la conversión a PM no sea estereoespecífica, la estereoquímica del producto final puede controlarse mediante la selección apropiada de una aminotransferasa. Debido a que la reacción es reversible, el PM no reaccionado (el isómero no deseado) puede reciclarse de vuelta a sus constituyentes y puede formarse nuevamente una mezcla racémica de PM.

A continuación, en referencia a las figuras debe indicarse lo siguiente. Los diagramas de flujo identifican ejemplos de rutas para producir monatina, aunque las rutas mostradas en las figuras y los métodos de la invención según se definen en las reivindicaciones no se encuentran limitadas a cualquier método particular para la puesta en práctica de las rutas, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, las rutas pueden ponerse en práctica *in vivo*, *in vitro* o con una combinación de las mismas.

Además, la práctica de un método de la exposición utilizando una o más de las rutas dadas a conocer en la presente memoria no requiere que cada uno de los componentes identificados (por ejemplo reactivos y enzimas) sea explícitamente proporcionado por el profesional sino que resulta suficiente que los componentes (o fuentes de componentes) y condiciones de reacción se encuentren presentes en la composición (o célula huésped) o de otro modo se encuentren disponibles de manera que la ruta potencialmente pueda tener lugar. En otras palabras, por ejemplo en el caso de que una figura ilustre un procedimiento para producir una composición de monatina, que

incluye producir indol-3-piruvato a partir de L-triptófano, producir ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico ("precursor de monatina" o "PM") a partir de indol-3-piruvato, y producir monatina a partir de PM, en el que cada reacción resulta facilitada por un enzima apropiado, se encuentra contemplado que la práctica de dicha ruta incluya combinar L-triptófano con α -cetoglutarato y enzimas contemplados para facilitar las reacciones identificadas, y bajo condiciones adecuadas para que tengan lugar cada una de las reacciones sin proporcionar también explícitamente indol-3-piruvato o PM. En este caso, el L-triptófano podría reaccionar con α -glutarato para producir indol-3-piruvato. Dependiendo de las condiciones y el enzima proporcionado, el indol-3-piruvato producido a partir de la reacción del L-triptófano puede reaccionar para formar PM y seguidamente, dependiendo de las condiciones y del enzima proporcionado, el PM producido a partir de la reacción del indol-3-piruvato puede reaccionar para formar monatina.

Debería indicarse también que la puesta en práctica de un método de la exposición que utiliza una o más de las rutas dadas a conocer en la presente memoria no requiere que el profesional proporcione explícitamente los materiales de partida o enzimas identificados, en caso de que dichos materiales o enzimas ya se encuentran presentes o disponibles de otro modo, o puedan ser sintetizados a partir de una sustancia que ya se encuentra presente o disponible en el medio de reacción. En otras palabras, se encuentra contemplado que la práctica de cualesquiera rutas que identifican el L-triptófano como un material de partida incluiría proporcionar un compuesto que puede producir L-triptófano, bajo condiciones adecuadas para que tenga lugar la producción de L-triptófano y la combinación de dicho compuesto con enzimas capaces de facilitar la serie de reacciones indicadas bajo condiciones que resultarían adecuadas para que se produzcan dichas reacciones. A título de ejemplo alternativo, también se encuentra contemplado que la práctica de la ruta identificada incluya proporcionar un microorganismo manipulado genéticamente para producir monatina según la ruta indicada, y proporcionar condiciones apropiadas para que se produzca el proceso de fermentación. Por ejemplo, un microorganismo, que produce de manera natural grandes cantidades de L-triptófano o D-triptófano (ver la patente US nº 5.728.555) puede manipularse genéticamente para producir o producir en exceso uno o más de los enzimas utilizados para facilitar (catalizar) reacciones en la ruta a la monatina, y pueden proporcionarse condiciones apropiadas para que el microorganismo produzca de esta manera monatina.

A continuación, en referencia a la figura 1, el diagrama de flujo mostrado esquemáticamente ilustra un procedimiento para preparar una composición de monatina que incluye R,R-monatina. Tal como se muestra en la figura 1, la ruta global implica una reacción del triptófano para formar indol-3-piruvato, una reacción del indol-3-piruvato para producir PM y una reacción de PM para producir monatina, incluyendo R,R-monatina.

La figura 1 ilustra además permutaciones específicas de dicha ruta global, diseñadas para incrementar la producción de la forma R,R de la monatina a expensas de las formas S,S, R,S, y S,R de la monatina. En particular, la figura 1 ilustra la forma de realización en la que el enzima aminotransferasa utilizado en la reacción del L-triptófano presenta una actividad y/o especificidad mayor para dicha reacción frente a las reacciones de PM y la 4S-monatina o la oxidasa presenta una actividad y/o especificidad mayor para el L-triptófano que para la 4R-monatina; el enzima que facilita la reacción del indol-3-piruvato es una aldolasa específica de R y el enzima que facilita la reacción de PM es un D-enzima de amplia especificidad, preferentemente evolucionado para funcionar más eficientemente con el isómero R del PM.

La figura 1 ilustra además permutaciones particulares diseñadas para que la producción de la R,R-monatina resulte más económica. Por ejemplo, en la figura 1, el L-triptófano (no el D-triptófano o combinaciones de L- y D-triptófano) se identifica como el material de partida. Aunque la selección de la forma específica de triptófano no presenta impacto sobre la quiralidad de los compuestos de monatina finales en la composición de monatina (debido a que la reacción del triptófano forma indol-3-piruvato, que no presenta quiralidad), algunos pueden preferir la utilización de L-triptófano como material de partida por lo menos debido a que el L-triptófano actualmente es menos caro y más fácil de obtener que el D-triptófano.

Centrándonos a continuación en la primera reacción mostrada en la figura 1, al convertir el triptófano en indol-3-piruvato, uno o más cualesquiera de alfa-cetoglutarato, oxaloacetato y/o piruvato reaccionan con el triptófano para formar un aminoácido (glutamato, aspartato y alanina, respectivamente) e indol-3-piruvato. La figura 1 ilustra la forma de realización en la que el material de partida triptófano es L-triptófano, y el alfa-cetoglutarato, el oxaloacetato y/o el piruvato producen la forma L-isómero del aminoácido (por ejemplo L-glutamato, L-aspartato y/o L-alanina, respectivamente).

Tal como se muestra en la figura 1, un enfoque para incrementar la producción de R,R-monatina implica facilitar la reacción del L-triptófano con un enzima que presenta mayor especificidad, mayor actividad o ambas, para el triptófano y no por el PM o la monatina, y que facilita la reacción de MP con un enzima específico de D. Tal como se da a conocer en el documento WO 03/091396 A2, determinados enzimas pueden facilitar la reacción del triptófano para producir indol-3-piruvato, así como la reacción de aminación de PM para producir monatina. La utilización de una L-aminotransferasa en la etapa de aminación crea un centro quiral S en la posición C-4 de la monatina, mientras que la utilización de un enzima D crea un centro quiral D en la posición C-4 de la monatina. De esta manera, en el caso de que una L-aminotransferasa, que facilita la reacción del triptófano, también se encuentre activa en la reacción de PM, puede formarse R,S-monatina y S,S-monatina, dependiendo de la forma de PM presente. Además, determinados otros enzimas (las L-aminoácido oxidasas) pueden no sólo facilitar la reacción del triptófano en indol-

3-piruvato, sino que pueden presentar una actividad lateral para la degradación de la R,R-monatina. Según algunas formas de realización, dicha actividad lateral de 4R resulta minimizada o eliminada. Una actividad lateral de oxidasa sobre las formas 4S de la monatina las reduciría o minimizaría del producto final y podría resultar deseable dependiendo de la composición final deseada. En consecuencia, cuanto mayor especificidad y/o actividad del enzima L seleccionado para el triptófano frente al MP o la monatina, mayor será la cantidad de R,R y S,R producida frente a la S,S-monatina y la R,S-monatina.

Entre los enzimas adecuados para la reacción del triptófano, de acuerdo con la forma de realización ilustrada en la figura 1, se incluyen: L-aminotransferasas capaces de facilitar una reacción del L-triptófano para formar indol-3-piruvato y que presentan una mayor especificidad para dicha reacción respecto a la reacción de R-PM para formar isómeros 4S de la monatina, y las L-aminoácido oxidasas capaces de facilitar una reacción del L-triptófano para formar indol-3-piruvato y que presentan una especificidad y/o actividad mayores para dicha reacción que la reacción de los isómeros 4R de la monatina para formar PM, y equivalentes funcionales de cualquiera de los anteriormente indicados. Más concretamente, los ejemplos no limitativos de enzimas adecuados pueden seleccionarse de entre las L-triptófano aminotransferasas (EC 2.6.1.27) y las tirosina aminotransferasas (aromáticas) (EC 2.6.1.5) y las L-aminoácido oxidasas (EC 1.4.3.2) y mutantes derivados de los enzimas con actividad de aspartato aminotransferasa.

El Ejemplo 6 identifica un enzima específico, un polipéptido HEXaspC mutante que incluye una sustitución Pro 9 a Tyr y una sustitución Arg 122 a Gly que resulta útil para facilitar las reacciones del L-triptófano y el α -KG, oxalacetato, piruvato o combinaciones de los mismos para formar indol-3-piruvato y L-glutamato, L-aspartato y L-alanina, respectivamente. Otro enzima específico que presenta una actividad "limitada" es TatA, la L-triptófano aminotransferasa de *S. meliloti*. Entre otros enzimas adecuados para la reacción del triptófano de acuerdo con formas de realización preferentes de la ruta mostrada en la figura 1 se incluyen aquellos con las características siguientes: un enzima que transamina el PM a 1/10 de la velocidad o menos de la velocidad del L-triptófano, tal como en el Ejemplo 6 o un enzima al utilizarlo con una racemasa, tal como en el Ejemplo 9, que produce más de 90% de los isómeros 4R de la monatina.

Entre los ejemplos de enzimas que no presentan un grado elevado de especificidad para la conversión de L-triptófano en indol-3-piruvato en comparación con la conversión de PM en monatina se incluyen: HEXaspC (Ejemplo 6), la aminotransferasa de amplia especificidad de *Leishmania major* (documento nº WO 03/091396 A2), la aminotransferasa porcina (documento WO 03/091396 A2) y TatA de *Rhodobacter sphaeroides* (Ejemplo 9). Sin embargo, estos enzimas pueden evolucionarse, por ejemplo mediante mutagénesis, para que presenten una actividad limitada para R-PM y/o R,R-monatina frente al triptófano.

Centrándonos a continuación en la segunda reacción identificada en la figura 1, la elección de enzima para facilitar (o catalizar) la reacción del indol-3-piruvato en PM influye sobre la cantidad relativa de R,R-monatina frente a la de S,R-monatina producida. En general, cuanto mayor sea la cantidad relativa de R-PM frente al S-PM producido, mayor será la cantidad relativa de R,R-monatina frente a la S,R-monatina producida (en el caso de que un D-enzima facilite la reacción del PM en monatina). Entre los enzimas útiles en este aspecto se incluyen cualesquiera enzimas que produzcan una proporción R-PM:S-PM más alta que la producida mediante la reacción del indol-3-piruvato y el piruvato facilitada por cualquiera de entre la KHG aldolasa de *E. coli* (GenBank nº de acceso AAC74920.1), la KHG aldolasa de *Bacillus* (GenBank nº de acceso CAB14127.1) o la ProA aldolasa de *Comamonas testosteroni* (SEC ID nº 1 (secuencia de ácidos nucleicos), SEC ID nº 2 (secuencia de aminoácidos)). De esta manera, en caso de que se desee producir preferentemente R-PM, puede utilizarse uno o más enzimas capaces de producir mayores cantidades de R-PM respecto a S-PM. En el caso de que se desee una composición de monatina que presente la forma R,R de la monatina como único componente monatina, debería utilizarse un enzima que produzca selectivamente R-PM y no S-PM (un "enzima específico de R"). Son ejemplos de enzimas específicos de R que pueden utilizarse para producir selectivamente R-PM y no S-PM son la aldolasa de SEC ID nº 22 y la HMG aldolasa de *Sinorhizobium meliloti*, tal como se muestra en el Ejemplo 3.

La figura 1 identifica la forma de realización particular en la que una aldolasa específica de R facilita la reacción del indol-3-piruvato y el piruvato para formar R-PM. Sin embargo, también se encuentra contemplada la utilización de aldolasas para la reacción del indol-3-piruvato y el piruvato que produce preferentemente R-PM, así como aldolasas que producen una proporción R-PM:S-PM más alta que la producida por cualquiera de entre la KHG aldolasa de *E. coli* (GenBank nº de acceso AAC74920.1), la KHG aldolasa de *Bacillus* (GenBank nº de acceso CAB14127.1) o la ProA aldolasa de *Comamonas testosteroni* (SEC ID nº 1 (secuencia de ácidos nucleicos), SEC ID nº 2 (secuencia de aminoácidos)). Además, también se encuentra contemplado que el indol-3-piruvato pueda reaccionar con una fuente diferente de C3 (por ejemplo serina o cisteína) para formar R-PM y en consecuencia otros enzimas (por ejemplo otras liasas o sintasas) pueden facilitar dicha reacción. También pueden utilizarse otros sustratos que se convierten fácilmente en piruvato (tal como oxalacetato). El Ejemplo 3 proporciona fuentes de enzimas aldolasa que pueden producir preferentemente o selectivamente R-PM o producir una proporción R-PM:S-PM más alta que la producida por la reacción del indol-3-piruvato y el piruvato facilitada por cualquiera de entre la KHG aldolasa de *E. coli* (GenBank nº de acceso AAC74920.1), la KHG aldolasa de *Bacillus* (GenBank nº de acceso CAB14127.1) o la ProA aldolasa de *Comamonas testosteroni* (SEC ID nº 1 (secuencia de ácidos nucleicos), SEC ID nº 2 (secuencia de aminoácidos)), tal como la aldolasa de SEC ID nº 22. El Ejemplo 5 también proporciona métodos de cribado para

identificar dichos enzimas. También se encuentra contemplado que los enzimas que producen preferentemente o selectivamente R-PM o que produzcan más R-PM que cualquiera de entre la KHG aldolasa de *E. coli* (GenBank nº de acceso AAC74920.1), la KHG aldolasa de *Bacillus* (GenBank nº de acceso CAB14127.1) o la ProA aldolasa de *Comamonas testosteroni* (SEC ID nº 1 (secuencia de ácidos nucleicos), SEC ID nº 2 (secuencia de aminoácidos)) pueden evolucionarse a partir de aldolasas conocidas o que se encuentran naturalmente. Pueden utilizarse cualesquiera técnicas conocidas para evolucionar enzimas, por ejemplo para mejorar una característica deseada, tal como incrementar la actividad de un enzima sobre un sustrato, en comparación con el enzima de tipo salvaje. Los Ejemplos 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 11 proporcionan algunas técnicas para evolucionar enzimas.

A continuación, en la última etapa de la ruta identificada en la figura 1, se muestra que la reacción de R-PM para formar R,R-monatina resulta facilitada por una D-aminotransferasa de amplia especificidad, por ejemplo la D-alanina aminotransferasa (EC 2.6.1.21, también conocida como D-aminoácido aminotransferasa o D-aspartato aminotransferasa) o una D-aminoácido deshidrogenasa. Tal como se ha expuesto anteriormente, la conversión de PM en monatina es una reacción de aminación que crea un centro quiral en el carbono C-4 de la monatina. En el caso de que se desee la forma R-quiral en la posición C-4, deberían utilizarse enzimas que produzcan centros quirales "R" en aminoácidos. Entre los enzimas ejemplificativos no limitativos se incluyen una D-alanina aminotransferasa derivada de *Bacillus* (Ejemplos 15 a 18), incluyendo la D-alanina aminotransferasa derivada de *Bacillus halodurans* (Ejemplo 18) y una aminotransferasa de cadena ramificada mutada que presenta estereoespecificidad modificada (Ejemplo 7).

Otro enzima ejemplificativa incluye una D-aminotransferasa híbrida. La D-aminotransferasa híbrida puede contener elementos estructurales de dos aminoácido aminotransferasas diferentes. La D-aminotransferasa híbrida a continuación puede evolucionarse adicionalmente (por ejemplo mediante mutagénesis o ingeniería recombinante) para un comportamiento mejorado en la conversión de PM en monatina. Se muestra un ejemplo de dicha D-aminotransferasa híbrida en el Ejemplo 19. La D-aminotransferasa híbrida ilustrada en el Ejemplo 19 incluye elementos de una D-aminotransferasa de *B. sphaericus* y una D-aminotransferasa de *G. stearothermophilus*. Se produjo la R,R-monatina utilizando dicha D-aminotransferasa (Ejemplo 19).

El Ejemplo 2 también ilustra la producción de R,R-monatina utilizando diversas D-aminotransferasas.

Según algunas formas de realización, la D-aminotransferasa presenta una mayor especificidad, una mayor actividad o ambas para R-PM como sustrato que para el indol-3-piruvato. En determinadas otras formas de realización, la D-aminotransferasa presenta actividad limitada para el indol-3-piruvato como sustrato. Los enzimas con dichas características pueden evolucionarse o mutarse a partir de enzimas preexistentes, por ejemplo tal como se muestra en el Ejemplo 6.

Además, la reacción de R-PM para formar R,R-monatina puede facilitarse con una D-aminoácido deshidrogenasa. El Ejemplo 20 ilustra la producción de R,R-monatina a partir de R-PM utilizando una D-aminoácido deshidrogenasa (D-AADH-101 a -108, BioCatalytics). Estas D-aminoácido deshidrogenasas pueden evolucionarse adicionalmente (por ejemplo mediante mutagénesis o ingeniería recombinante) para obtener un comportamiento mejorado.

La figura 2 ilustra otra estrategia para la producción dirigida de R,R-monatina. Mientras que en la forma de realización de la figura 1, la aldolasa utilizada en la reacción del indol-3-piruvato para formar R-PM influye sobre la proporción R,R:S,R formada, en la forma de realización de la figura 2, el D-enzima que facilita la conversión de PM en monatina influye sobre la proporción de R,R:S,R formada. Según la forma de realización de la figura 2, puede utilizarse un enzima no estereoespecífico para facilitar la conversión del indol-3-piruvato en PM, y en consecuencia puede formarse tanto S-PM como R-PM. Con el fin de obtener una proporción deseada de R,R-monatina a S,R-monatina, se selecciona (o se evoluciona) un D-enzima con estereoselectividad apropiada para R-PM frente a S-PM. En el caso de que se desee una composición de monatina que presenta la forma R,R de la monatina como su único componente monatina, resultaría preferido un enzima que facilite selectivamente la reacción de R-PM en monatina y no de S-PM en monatina. Por ejemplo, puede utilizarse la D-aminotransferasa de *Bacillus halodurans* (Ejemplo 18) y la D-aminotransferasa híbrida que contiene elementos estructurales de tanto *Bacillus sphaericus* como de *Geobacillus stearothermophilus* (Ejemplo 19), como el enzima que facilita selectivamente la reacción de R-PM en monatina.

La figura 3 ilustra otra ruta alternativa para la producción de composiciones enriquecidas en R,R-monatina. La ruta de la figura 3 es una modificación de la ruta de la figura 1. En la ruta mostrada en la figura 3, el indol-3-piruvato es producido indirectamente, y no directamente, a partir de L-triptófano. Más concretamente, se convierte el L-triptófano en D-triptófano, y el D-triptófano seguidamente se convierte en indol-3-piruvato. El Ejemplo 4 ilustra la producción de R,R-monatina a partir de L-triptófano utilizando una triptófano racemasa.

La conversión de L-triptófano en D-triptófano puede facilitarse con una triptófano racemasa o equivalente funcional de la misma. El Ejemplo 4 proporciona fuentes potenciales de triptófano racemasas y métodos de cribado para identificar dichos enzimas. El Ejemplo 4 describe ejemplos de triptófano racemasas que son capaces de convertir el L-triptófano en D-triptófano. Estas triptófano racemasas pueden evolucionarse adicionalmente (por ejemplo mediante mutagénesis o ingeniería recombinante) para un comportamiento mejorado.

Entre los ejemplos no limitativos de triptófano racemasas se incluyen los homólogos o mutantes de las aminoácido racemasas (EC 5.1.1.-), por ejemplo la serina racemasa, en la que los homólogos o mutantes son capaces de convertir el L-triptófano en D-triptófano. Entre los ejemplos no limitativos de fuentes a partir de las que puede derivarse la aminoácido racemasa se incluyen microorganismos tales como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus halodurans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Schizosaccaromyces pombe*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus gallinarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus pumilus*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus brevis*, *Aquifex pyrophilus*, *Lactobacilli*, *Streptococcus*, *Anabaena* sp., *Pseudomonas striata*, *Lentinus edodes*, *Scapharca brouhtonii*, *Desulfurococcus* sp., *Thermococcus* sp. y *Pseudomonas striata*. Entre los ejemplos no limitativos adicionales de fuentes a partir de las que puede derivarse la aminoácido racemasa se incluyen el gusano de la seda, el cerebro de rata o el cerebro de ratón. Estas aminoácido racemasas pueden evolucionarse (por ejemplo mediante mutagénesis o ingeniería recombinante) para un comportamiento mejorado en la conversión de L-triptófano en D-triptófano.

Entre los ejemplos no limitativos de fuentes potenciales a partir de las que pueden derivarse triptófano racemasas adecuadas se incluyen microorganismos tales como *Pseudomonas*, por ejemplo *Pseudomonas chlororaphis* (*Pseudomonas aureoreofaciens*) (ATCC nº 15926) y *Burkholderia pyrrocina* (ATCC nº 15958). Entre los ejemplos no limitativos adicionales de fuentes potenciales a partir de las que pueden derivarse triptófano racemasas adecuadas se incluyen plantas, por ejemplo plantas del tabaco, tales como *Nicotiana tabacum*, plantas del trigo, tales como *Triticum aestivum*, remolacha, tomates y *Sclerochiton ilicifolius*.

La ruta mostrada en la figura 3 presenta determinados beneficios, incluyendo que incluso en el caso de que la R,R-monatina sea el producto deseado, puede utilizarse el mismo enzima para la reacción que produce indol-3-piruvato que para la reacción que produce monatina como producto. Es decir, en la ruta ilustrada en la figura 1, una L-aminotransferasa (o L-enzima adecuado) facilita la reacción que produce indol-3-piruvato, pero una D-aminotransferasa facilita la reacción que produce monatina. En contraste, en la ruta de la figura 3, una determinada D-aminotransferasa que facilita la reacción que produce indol-3-piruvato también puede facilitar la reacción que produce monatina. En consecuencia, en las rutas según la figura 3, las D-aminotransferasas de amplia especificidad pueden resultar preferentes en el caso de que se desee utilizar el mismo enzima para la reacción de formación de indol-3-piruvato que para la reacción de formación de monatina. En contraste, en las rutas según las figuras 1, 2, 4, 6, 7 y 8, la producción de monatina puede ser más eficiente en el caso de que se seleccione una D-aminotransferasa que presenta una actividad y/o especificidad limitada para el indol-3-piruvato en comparación con R-PM.

Otro beneficio de la ruta representada esquemáticamente en la figura 3 es que el producto aminoácido de la reacción acoplada a la reacción de producción de indol-3-piruvato puede utilizarse ahora como sustrato en la reacción acoplada a la reacción de producción de monatina. Es decir, en la ruta ilustrada en la figura 1, el L-triptófano reacciona para producir indol-3-piruvato y simultáneamente oxalacetato, alfa-cetoglutarato y/o piruvato reaccionan para producir un L-aminoácido. Debido a que la reacción de R-PM para formar monatina se encuentra acoplada con una reacción que utiliza un D-aminoácido como sustrato, el L-aminoácido de la reacción que forma indol-3-piruvato no es reciclado, bajo las condiciones mostradas, para la utilización en la reacción acoplada con la reacción de R-PM. En contraste, en la ruta ilustrada en la figura 3, la reacción del D-triptófano para formar indol-3-piruvato se acopla con una reacción que forma un producto D-aminoácido, el cual puede reciclarse para la utilización en la reacción acoplada con la reacción de R-PM. Lo anterior permite utilizar cantidades no estequiométricas de aceptor de amino en la etapa uno y el donante de aminos para la etapa 3 es producido en la etapa 1.

Las figuras 4 y 5 ilustran modificaciones adicionales de la ruta mostrada en la figura 1. Estas modificaciones están dirigidas a reciclar el producto aminoácido formado por la reacción acoplada con la reacción de transaminación de L-triptófano con el reactivo aminoácido de la reacción acoplada con la reacción de PM a monatina.

En referencia a la figura 4, el reciclado se consigue proporcionando un enzima que pueda facilitar la conversión de un L-aminoácido en D-aminoácido y viceversa. Más concretamente, en el caso de que, tal como se muestra en la figura 4, el α -KG reaccione formando L-glutamato al reaccionar el L-triptófano para formar indol-3-piruvato, puede proporcionarse una glutamato racemasa (EC 5.1.1.3) o equivalente funcional que puede facilitar la conversión de L-glutamato a D-glutamato y viceversa. En este caso, el L-glutamato formado como producto conjuntamente con la producción de indol-3-piruvato es parcialmente eliminado en virtud de su conversión en D-glutamato, y el D-glutamato formado a partir de la conversión de L-glutamato se encuentra disponible entonces como sustrato para la reacción acoplada con la reacción de PM a monatina. De manera similar, el α -KG formado en la reacción del D-glutamato se encuentra disponible como sustrato para la reacción acoplada con la reacción de L-triptófano a indol-3-piruvato.

Entre los ejemplos no limitativos de fuentes potenciales a partir de las que puede derivarse una glutamato racemasa se incluyen *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus pumilus*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus brevis*, *E. coli*, *Aquifex pyrophilus* y *Bacillus subtilis*. Más concretamente (también de manera no limitativa), la glutamato racemasa puede expresarse a partir de un ácido nucleico tal como el gen *murl* de *Pediococcus pentosaceus* (GenBank, nº de acceso L22789) o la glutamato racemasa de *Lactobacillus brevis*.

En el caso de que el oxalacetato reaccione para formar L-aspartato al reaccionar el L-triptófano para formar indol-3-piruvato, puede proporcionarse una aspartato racemasa (EC 5.1.1.13) o equivalente funcional para convertir el L-aspartato en D-aspartato. En este caso, el L-aspartato que se forma en la misma reacción que produce indol-3-piruvato es parcialmente eliminado en virtud de su conversión en D-aspartato, y el D-aspartato se encuentra disponible entonces como sustrato para la reacción acoplada con la reacción de PM a monatina. De manera similar, el oxalacetato formado en la reacción del D-aspartato se encuentra disponible para actuar como sustrato para la reacción acoplada a la reacción de L-triptófano a indol-3-piruvato.

Entre los ejemplos no limitativos de enzimas adecuados que presentan actividad de aspartato racemasa se incluyen ASPR-101 (BioCatalytics, Inc., 129 N. Hill Ave, Suite 103, Pasadena, CA 91106-1955) y homólogos o mutantes de una aminoácido racemasa (EC 5.1.1.-) que son capaces de facilitar la conversión del L-aspartato en D-aspartato.

Entre los ejemplos no limitativos de fuentes potenciales a partir de las que pueden derivarse aspartato racemasas se incluyen: *Desulfurococcus*, *Thermococcus*, el molusco bivalvo *Scapharca brouhtonii*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Archaeoglobus*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Bradyrhizobium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Candida*, *Caulobacter*, *Clostridium*, *Desulfitobacterium*, *Desulfotalea*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ferroplasma*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Mannheimia*, *Medicago*, *Mesorhizobium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Oceanobacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Polaribacter*, *Pseudomonas*, *Pyrococcus*, *Ralsonia*, *Shigella*, *Sinorhizobium*, *Salmonella*, *Sphingomonas*, *Streptococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Vibrio*, *Wolinella*, *Xanthomonas*, *Xanthobacter*, *Yersinia* y *Zymomonas*.

En el caso de que el piruvato reaccione para formar L-alanina al reaccionar el L-triptófano para formar indol-3-piruvato, puede proporcionarse una alanina racemasa o equivalente funcional para convertir la L-alanina en D-alanina. En este caso, la L-alanina que se forma en la misma reacción que produce indol-3-piruvato es eliminada en virtud de su conversión en D-alanina, y la D-alanina formada a partir de la conversión de L-alanina a continuación se encuentra disponible para actuar como sustrato para la reacción acoplada a la reacción de PM en monatina. De manera similar, el piruvato formado en la reacción de la D-alanina se encuentra disponible para actuar como sustrato para la reacción acoplada a la reacción de L-triptófano en indol-3-piruvato.

Entre los ejemplos no limitativos de alanina racemasas adecuadas se incluyen A8936 (Sigma, PO Box 14508, St. Louis, MO, 63178) y la alanina racemasa de *Geobacillus stearothermophilus* tal como se indica en el Ejemplo 4.

Entre los ejemplos no limitativos de fuentes potenciales a partir de las que puede derivarse la alanina racemasa se incluyen: *Brucella abortus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Bacillus cereus* y *Lentinus edodes*.

Los Ejemplos 9 y 12 ilustran la utilización de las racemasas anteriormente indicadas, su impacto sobre el incremento de la proporción del producto monatina deseado y proporcionan fuentes potenciales para los enzimas racemasas.

En referencia a la figura 5, se utiliza una aminotransferasa estereoinversora para facilitar la reacción de R-PM en monatina. Aunque típicamente la reacción de R-PM (o S-PM) para formar R,R-monatina (o S,R-monatina) se acopla a la reacción de un D-aminoácido, una aminotransferasa estereoinversora puede facilitar las reacciones acopladas de R-PM (o S-PM) para formar R,R-monatina (o S,R-monatina) utilizando un L-aminoácido. De esta manera, el producto L-aminoácido de la reacción de la L-triptófano aminotransferasa puede utilizarse como sustrato para la transaminación del PM en monatina, y el producto (es decir, oxalacetato, piruvato y/o α -KG) de la reacción acoplada a la reacción de L-triptófano en indol-3-piruvato. Entre los ejemplos no limitativos de aminotransferasas estereoinversoras que pueden utilizarse se incluyen mutantes derivados de D-fenilglicina aminotransferasa (EC 2.6.1.72, también conocida como D-4-hidroxifenilglicina aminotransferasa), D-metionina aminotransferasa (EC 2.6.1.41, también conocida como D-met-aminotransferasa y D-metionina-piruvato aminotransferasa) y homólogos de las mismas. Entre los ejemplos no limitativos de fuentes potenciales a partir de las que pueden derivarse los mutantes de D-fenilglicina aminotransferasa se incluyen *Pseudomonas*, tales como *Pseudomonas putida* LW-4 y *Pseudomonas stutzeri* ST-201. Entre los ejemplos no limitativos de fuentes potenciales a partir de los que puede derivarse la D-metionina aminotransferasa se incluyen la coliflor y el cacahuete.

Los Ejemplos 10 y 11 conjuntamente proporcionan fuentes de enzimas estereoinversores y métodos de preparación de dichos enzimas. Los ejemplos proporcionan además métodos de cribado para identificar dichos enzimas. También se encuentra contemplado que dichos enzimas puedan evolucionarse a partir de enzimas estereoinversores conocidos o que se encuentran naturalmente. A título de ejemplo no limitativo, la aminotransferasa estereoinversora puede ser un homólogo o mutante de una D-aminoácido aminotransferasa o un homólogo o mutante de una aminoácido racemasa (EC 5.1.1.-).

Las figuras 6 y 7 también ilustran modificaciones de la ruta de la figura 1. Las rutas ilustradas en las figuras 6 y 7 proporcionan métodos para desplazar reacciones en el equilibrio hacia (es decir, en la dirección de la producción de monatina) mediante la eliminación del producto secundario de la reacción del triptófano con una reacción irreversible y en algunos casos proporcionando sustrato para la reacción del PM.

En referencia a la figura 6, la ruta mostrada elimina el producto L-aminoácido de la reacción acoplada con la reacción del triptófano mediante la conversión del mismo en un L-aminoácido diferente y CO₂, y después proporciona un sustrato para la reacción acoplada a la reacción del PM mediante la conversión del L-aminoácido nuevamente formado en un D-aminoácido. Concretamente se muestra que el L-triptófano reacciona conjuntamente con el oxalacetato para formar indol-3-piruvato y L-aspartato. Se utiliza una aspartato 4-descarboxilasa (EC 4.1.1.12) o equivalente funcional para facilitar la conversión de L-aspartato en L-alanina y dióxido de carbono, y se utiliza un enzima con actividad de alanina racemasa para facilitar la conversión de L-alanina en D-alanina, en la que la D-alanina puede servir de donante de aminos para la conversión de R-PM en monatina.

En referencia a la figura 7, la ruta mostrada ilustra métodos adicionales para eliminar el producto L-aminoácido de la reacción acoplada a la reacción del triptófano. Las formas de realización tal como se presentan en la figura producen uno o más productos secundarios que no se encuentran disponibles para reaccionar en la dirección inversa, por ejemplo debido a volatilidad (por ejemplo dióxido de carbono) o mediante conversión espontánea en un producto final no reactivo. Un ejemplo de dicho enfoque incluye formas de realización en las que el α -KG reacciona conjuntamente con el L-triptófano para producir L-glutamato y, si se desea, puede proporcionarse una glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15) o equivalente funcional para facilitar la conversión del L-glutamato en 4-aminobutanoato (con dióxido de carbono como producto secundario). Entre los ejemplos no limitativos de potenciales fuentes a partir de las que puede derivarse la L-glutamato descarboxilasa se incluyen: *Clostridium perfringens*, *C. welchii* o *E. coli*.

Otro ejemplo de dicho enfoque para desplazar la reacción de triptófano hacia delante (en la dirección de producción de monatina) incluye reacciones en las que se utiliza oxalacetato como cosustrato en la reacción que utiliza L-triptófano y en la que se convierte el oxalacetato en L-aspartato; si se desea, puede proporcionarse una aspartato descarboxilasa (EC 4.1.1.11) o equivalente funcional para facilitar la conversión de L-aspartato en β -alanina (con dióxido de carbono como producto secundario).

En referencia a la figura 8, la ruta mostrada ilustra métodos todavía adicionales para convertir el producto L-aminoácido de la reacción acoplada a la reacción de triptófano en un sustrato para la reacción acoplada a la reacción de PM. Concretamente, en el caso de que se utilice el α -KG en la misma reacción que el L-triptófano, y en el que el α -KG forma L-glutamato, puede proporcionarse un enzima con actividad de L-alanina aminotransferasa y piruvato, en el que el enzima L-alanina aminotransferasa facilita la reacción del piruvato y el L-glutamato para formar L-alanina. También puede proporcionarse una alanina racemasa o equivalente funcional con el fin de facilitar la conversión de la L-alanina en D-alanina, en la que la D-alanina puede utilizarse como sustrato conjuntamente con PM para formar monatina y piruvato. Ver el Ejemplo 12.

Se encuentran implícitamente indicadas en las rutas de biosíntesis anteriormente indicadas, y en las reacciones indicadas en los Ejemplos, posteriormente, mezclas que contienen uno o más compuestos y/o enzimas requeridos en las rutas de biosíntesis para producir monatina, incluyendo la R,R-monatina, o el precursor de la monatina, incluyendo el precursor de la R-monatina.

Para la producción *in vitro*, puede llevarse a cabo cualquiera o todas las rutas biosintéticas indicadas en la presente memoria o etapas individuales en las rutas indicadas en la presente memoria, en solución *in vitro* o *in vivo*, en una célula huésped, en serie o en paralelo. En el caso de que el método de la invención utilice una o más reacciones que se llevan a cabo *in vitro*, la reacción biosintética que se lleva a cabo *in vitro* puede llevarse a cabo combinando los ingredientes deseados para la reacción o reacciones mediante la mezcla en un medio de reacción o solución acuosa. La mezcla de reacción formada de esta manera se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para que el producto o productos deseados sean sintetizados.

Además, la actividad de uno o más enzimas puede incrementarse mediante la utilización continua de cofactores durante la purificación del enzima o enzimas. Por ejemplo, la inclusión de piridoxal-5'-fosfato durante la purificación de la D-alanina aminotransferasa de *B. sphaericus* resulta en una actividad incrementada (Ejemplo 14).

En el caso de que se lleven a cabo *in vitro* una o más de las reacciones en las rutas de la invención, cualquiera o todos los enzimas utilizados en las rutas de biosintéticas indicadas en la presente memoria pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. Entre los ejemplos de dichos soportes sólidos se incluyen los que contienen grupos epoxi, aldehído, quelantes o de amina primaria. Entre los ejemplos específicos de soportes sólidos adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, perlas de resina Eupergit® C (Rohm and Haas Company, Philadelphia, PA) y SEPABEADS® EC-EP (Resindion). El Ejemplo 21 ilustra la inmovilización de la D-alanina aminotransferasa de *B. sphaericus* sobre perlas de resina Eupergit® C. El Ejemplo 22 ilustra la inmovilización de la ProA aldolasa de *Sinorhizobium meliloti* sobre perlas de resina Eupergit® C. La producción de R,R-monatina utilizando dichos enzimas inmovilizados se muestra en el Ejemplo 23.

Las reacciones individuales mostradas en las rutas biosintéticas indicadas en la presente memoria puede facilitarse (catalizarse) con un único enzima o con una mezcla de múltiples enzimas que actúen concurrentemente.

Los métodos de la invención pueden utilizarse para preparar una composición de monatina que contenga un porcentaje deseado de R,R-monatina. Además de las etapas de reacción indicadas anteriormente, una etapa de reacción concreta puede catalizarse con más de un enzima, por ejemplo con una mezcla de enzimas, de manera que la composición o preparación resultante contenga un porcentaje deseado de R,R-monatina, incluyendo un porcentaje deseado máximo de R,R-monatina. Alternativamente, la monatina preparada mediante dos rutas manipuladas independientes según los métodos de la invención puede combinarse para producir una composición o preparación que contenga dicho porcentaje deseado de R,R-monatina.

En el caso de que se utilice un enzima de una clase designada de enzimas a título de ejemplo se espera que también pueda utilizarse en dicha reacción un enzima con una homología de por lo menos aproximadamente 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99%. Por ejemplo, podría utilizarse una aldolasa específica de R con una homología de por lo menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% respecto a la aldolasa de SEC ID nº 22 podría utilizarse en cualquiera de las rutas anteriormente indicadas para producir R,R-monatina.

Además, en el caso de que se utilice un enzima de una clase designada de enzimas a título de ejemplo, se espera que también pueda utilizarse en dicha reacción un fragmento de dicho enzima que presente la misma actividad. Por ejemplo, podría utilizarse en cualquiera de las rutas anteriormente indicadas para producir R,R-monatina un fragmento de la aldolasa de SEC ID nº 22 que también funcione como aldolasa.

La monatina que se produce utilizando uno o más de los polipéptidos o rutas biosintéticas dadas a conocer en la presente memoria es generalmente de por lo menos aproximadamente 0,5% a 30% R,R-monatina, en peso de monatina total producida. En otras formas de realización, la monatina producida utilizando uno o más de los polipéptidos o rutas biosintéticas dadas a conocer en la presente memoria es superior a 30% de R,R-monatina, en peso de monatina total producida; por ejemplo, la R,R-monatina es 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de la monatina total producida. Alternativamente, pueden agruparse diversas cantidades de dos o más preparaciones de monatina de manera que resulten en una preparación que presente un porcentaje deseado de R,R-monatina. Por ejemplo, puede agruparse una preparación de monatina que presente 30% de R,R-monatina con una preparación de monatina que presente 90% de R,R-monatina; en el caso de que se agrupen cantidades iguales de preparaciones de 30% y de 90% de R,R-monatina, la preparación de monatina resultante presentaría 60% de R,R-monatina.

La monatina, o un intermediario (incluyendo un precursor de monatina), producida utilizando uno o más de los polipéptidos o rutas biosintéticas dadas a conocer en la presente memoria, puede purificarse a partir de los componentes de la reacción. En una forma de realización, la monatina o intermediario, tal como el precursor de monatina, puede purificarse simplemente separando la sustancia que debe purificarse de la preparación de enzima en la que ha sido sintetizada.

En otras formas de realización, el intermediario, precursor de monatina o monatina es purificado a partir de una preparación en la que ha sido sintetizada, de manera que la composición o preparación "purificada" resultante presenta por lo menos aproximadamente 5% a 60% de monatina en peso de compuestos orgánicos totales. En otra forma de realización, la monatina o intermediario, tal como precursor de monatina, puede purificarse en un grado de pureza de por lo menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95% o 99% en peso de compuestos orgánicos totales.

La monatina, o el intermediario (incluyendo un precursor de monatina), producida utilizando uno o más de los polipéptidos o rutas biosintéticas dados a conocer en la presente memoria, puede purificarse a partir de los componentes de la reacción mediante cualquier método conocido por el experto ordinario en la materia. En una forma de realización, la monatina o intermediario puede purificarse tal como se indica en el Ejemplo 13. Óptimamente, la monatina o intermediario purificado puede recristalizarse repetidamente hasta alcanzar el grado de pureza deseado.

Ejemplos

Ejemplo 1

Detección de monatina, triptófano, alanina y glutamato

El presente ejemplo describe métodos utilizados para detectar la presencia de monatina, triptófano y glutamato. Describe además un método para la separación y detección de los cuatro estereoisómeros de la monatina.

Análisis de seguimiento de múltiples reacciones CL/EM/EM ("MRM") de la monatina y el triptófano

Se llevaron a cabo análisis de mezclas de monatina y triptófano obtenidos en reacciones bioquímicas in vitro o in vivo, utilizando un instrumento Waters/Micromass de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (CL/EM/EM) que incluía un cromatógrafo líquido Waters 2795 con un monitor de absorbancia de matriz de

fotodiodos Waters 996 (PDA) integrado en serie entre el cromatógrafo y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Micromass Quattro Ultima. Las separaciones de CL se llevaron a cabo utilizando una columna de cromatografía de fase inversa Xterra MS C8, de 2,1 mm x 250 mm a 40°C. La fase móvil de la CL consistía de: A) agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,05% (v/v) y B) metanol que contenía ácido trifluoroacético al 0,05% (v/v).

El gradiente de elución era lineal entre 5% de B y 35% de B, 0 a 4 min., lineal entre 35% de B y 60% de B, 4 a 6,5 min., lineal entre 60% de B y 90% de B, 6,5 a 7 min., isocrático con 90% de B, 7 a 11 min., lineal entre 90% de B y 95% de B, 11 a 12 min., lineal entre 95% de B y 5% de B, 12 a 13 min., con un periodo de reequilibrado de 2 min. entre tandas. El caudal era de 0,25 ml/min, se realizó un seguimiento de la absorbancia del PDA entre 200 y 400 nm. Se optimizaron todos los parámetros del EM-IEP y se seleccionaron basándose en la generación de iones moleculares protonados ($[M + H]^+$) de los analitos de interés y la producción de los fragmentos iones característicos. Se utilizaron los parámetros instrumentales siguientes para el análisis de seguimiento de múltiples reacciones CL/EM/EM (MRM) de la monatina y el triptófano: capilar: 3,5 kV; cono: 40 V; Hex 1: 20 V; Apertura: 0 V; Hex 2: 0 V; temperatura de la fuente: 100°C; temperatura de desolvatación: 350°C; gas de desolvatación: 500 l/h; gas del cono: 50 l/h; resolución de las masas bajas (Q1): 12,0; resolución de las masas altas (Q1): 12,0; energía iónica: 0,2; entrada: -5 V; energía de colisión: 8; Salida: 1V; resolución de masas bajas (Q2): 15; resolución de masas altas (Q2): 15; energía iónica (Q2): 3,5; Multiplicador: 650. Se utilizaron cinco transiciones de MRM de ion-padre a ion-hijo específicas de la monatina para la detección específica de monatina en reacciones in vitro e in vivo. Las transiciones monitorizadas fueron: 293,1 a 150,3, 293,1 a 168,2, 293,1 a 211,2, 293,1 a 230,2 y 293,1 a 257,2. Se realizó un seguimiento del triptófano con la transición de MRM de 204,7 a 146,4. Para la cuantificación estándar interna de la monatina y el triptófano, se analizaron cuatro estándares de calibración que contenían cuatro proporciones diferentes de cada analito respecto a d5-triptófano y d5-monatina. Estos datos se sometieron a un análisis lineal de cuadrados mínimos para formar una curva de calibración para la monatina y el triptófano. Se añadió a cada muestra una cantidad fija de d5-triptófano y d5-monatina (se sintetizó la d5-monatina a partir de d5-triptófano según los métodos del documento nº WO 03/091396 A2) y se utilizaron las proporciones de respuesta (monatina/d5-monatina; triptófano/d5-triptófano) conjuntamente con las curvas de calibración indicadas anteriormente para calcular la cantidad de cada analito en las mezclas.

Medición másica exacta de la monatina

Se llevó a cabo un análisis de EM de alta resolución utilizando un espectrómetro de masas híbrido con analizador cuadrupolo/tiempo de vuelo Q-Star de Applied Biosystems-Perkin Elmer. La masa medida de la monatina protonada utilizó el triptófano como estándar interno de calibración másica. La masa calculada de la monatina protonada, basada en la composición elemental $C_{14}H_{17}N_2O_5$ era de 293,1137. La monatina producida utilizando el procedimiento biocatalítico indicado en los Ejemplos 2 y 3 mostró una masa observada de 293,1144. Lo anterior implica un error de medición de la masa inferior a 2 partes por millón ("ppm"), proporcionando evidencia concluyente de la composición elemental de la monatina producida enzimáticamente.

Medición quiral de CL/EM/EM ("MRM") de la monatina

La determinación de la distribución de estereoisómeros de la monatina en reacciones in vitro e in vivo se llevó a cabo mediante derivatización con 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida ("FDAA"), seguido de la medición MRM de CL de fase inversa/EM/EM.

Derivatización de la monatina con FDAA

Se añadieron 200 µl de una solución al 1% de FDAA en acetona a 50 µl de muestra o estándar. Se añadieron cuarenta µl de solución de bicarbonato sódico 1,0 M y la mezcla se incubó durante 1 h a 40°C con agitación ocasional. Se extrajo la muestra y se enfrió, y se neutralizó con 20 µl de HCl 2,0 M (puede requerirse más HCl para llevar a cabo la neutralización de una mezcla biológica tamponada). Tras completar la desgasificación, las muestras estaban listas para el análisis mediante CL/EM/EM.

Seguimiento de múltiples reacciones CL/EM/EM para la determinación de la distribución de estereoisómeros de la monatina en reacciones in vitro e in vivo

Se llevaron a cabo análisis utilizando la instrumentación de CL/EM/EM indicada anteriormente. Las separaciones de CL capaces de separar la totalidad de los cuatro estereoisómeros de la monatina (específicamente FDAA-monatina) en una columna de cromatografía de fase inversa C8 Phenomenex Luna 2,0 x 250 mm (3 µm) a 40°C. La fase móvil de CL consistía de: A) agua que contenía acetato amónico al 0,05% (masa/volumen) y B) acetonitrilo. La elución era isocrática con 13% de B, 0 a 2 min., lineal de 13% de B a 30% de B, 2 a 15 min., lineal de 30% de B a 80% de B, 15 a 16 min., isocrática con 80% de B, 16 a 21 min., y lineal de 80% de B a 13% de B, 21 a 22 min, con un periodo de reequilibrado de 8 min. entre tandas. El caudal era de 0,23 ml/min y la absorbancia del PDA se monitorizó entre 200 y 400 nm. Se optimizaron todos los parámetros del EM-IEP y se seleccionaron basándose en la generación de iones moleculares desprotonados ($[M - H]^-$) de la FDAA-monatina, y la producción de fragmentos iones característicos.

Se utilizaron los parámetros instrumentales siguientes para el análisis de CL/EM de la monatina en el modo de IEP/EM de iones negativos: capilar: 2,0 kV; Cono: 25 V; Hex 1: 10 V; Apertura: 0 V; Hex 2: 0 V; Temperatura de la fuente: 100°C; Temperatura de desolvatación: 350°C; Gas de desolvatación: 500 l/h; Gas de cono: 50 l/h; Resolución de masas bajas (Q1): 12,0; Resolución de masas altas (Q1): 12,0; Energía iónica: 0,2; Entrada: -5 V; Energía de colisión: 20; Salida: 1 V; Resolución de masas bajas (Q2): 12; Resolución de masas altas (Q2): 12; Energía iónica (Q2): 3,0; Multiplicador: 650. Se utilizaron tres transiciones de ion padre a ion hijo específicas de FDAA-monatina para detectar específicamente la FDAA-monatina en reacciones in vitro e in vivo. Las transiciones eran 543,6 a 268,2, 543,2 a 499,2 y 543,6 a 525,2.

La identificación de los estereoisómeros de FDAA-monatina se basó en el tiempo de retención cromatográfica en comparación con los estereoisómeros sintéticos purificados de la monatina y los datos espectrales másicos.

Cromatografía líquida-detección de la fluorescencia post-columna de aminoácidos, incluyendo glutamato y alanina

La cromatografía líquida con detección de fluorescencia post-columna para la determinación del glutamato en reacciones in vitro e in vivo se llevó a cabo en un sistema Waters 2690 LC o equivalente combinado con un detector de escaneo de fluorescencia Waters 474 y un módulo de reacción post-columna Waters. Se llevaron a cabo separaciones de CL en una columna de intercambio iónico de interacción-cargada de sodio a 60°C. Fase móvil A: tampón Pickering Na 328 (Pickering Laboratories, Inc.; Mountain View, CA). Fase móvil B: tampón Pickering Na 740. El gradiente de elución era de 0% de B a 100% de B, 0 a 20 min., isocrático con 100% de B, 20 a 36 min., y lineal de 100% de B a 0% de B, 36 a 37 min., con un periodo de reequilibrado de 8 min. entre tandas, dependiendo de la matriz de muestras. El caudal de la fase móvil era de 0,5 ml/min. El caudal de la solución de derivatización post-columna OPA era de 0,5 ml/min. Los parámetros del detector de fluorescencia eran EX 338 nm y EM 425 nm. Se utilizó norleucina como estándar interno para el análisis. La identificación de los aminoácidos se basó en los datos de tiempo de retención cromatográfica para los estándares purificados.

Detección de L- y D-aminoácidos mediante CL/EM/EM

En primer lugar se trataron con ácido fórmico muestras que contenían una mezcla de L- y D-aminoácidos, tales como triptófano, glutamato y aspartato, con el fin de desnaturalizar las proteínas. A continuación, la muestra se centrifugó y se filtró a través de un filtro de jeringa de nilón de 0,45 µm antes del análisis de CL/EM/EM. La identificación de los L- y D-aminoácidos se basó en el tiempo de retención y la detección selectiva según la masa. La separación de CL se llevó a cabo mediante la utilización de un sistema de cromatografía líquida Waters 2690 y una columna de cromatografía Chirobiotic TAG de 2,1 mm x 250 mm ASTEC con una temperatura de columna fijada a 45°C. Las fases móviles A y B de la CL fueron ácido acético al 0,25% y ácido acético al 0,25% en metanol, respectivamente. Se fijó la elución isocrática de 60% de fase móvil A y 40% de B a un caudal de 0,25 ml/min. para el glutamato, mientras que se fijó 30% de fase móvil A y 70% de B a un caudal de 0,3 ml/min. para el aspartato y el triptófano.

El sistema de detección para el análisis de los L- y D-aminoácidos incluía un detector de matriz de fotodiodos (PDA) Waters 996 y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Micromass Quattro Ultima. El PDA, escaneando entre 195 y 350 nm, se situó en serie entre el sistema de cromatografía y el espectrómetro de masas. Se fijaron los parámetros para el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Micromass Quattro Ultima funcionando en modo de ionización por electropulverización (+IEP) en los valores siguientes: Capilar: 3,0 kV; Cono: 20 V; Hex 1: 15 V; Apertura: 1 V; Hex 2: 0 V; Temperatura de la fuente: 100°C; Temperatura de desolvatación: 350°C; Gas de desolvatación: 530 l/h; Gas del cono: 30 l/h; Resolución Q1 de masas bajas: 12,5; Resolución Q1 de masas elevadas: 12,5; Energía iónica 1: 0,2; Entrada: -5; Colisión: 8; Salida 1: 10; Resolución Q2 de masas bajas: 12,5; Resolución Q2 de masas elevadas: 12,5; Energía iónica 2: 0,5; Multiplicador: 650 V. Se configuraron los experimentos de EM/EM en modo de monitorización de múltiples reacciones (MRM) para monitorizar selectivamente las transiciones de reacción de 204,70 a 146,50, 147,8 a 84,2, 147,8 a 102,1, 134,00 a 74,30 y 134,00 a 88,2. La cuantificación de los ácidos triptófano, glutamato y aspartato se basaron en respuestas de señal de m/z=146,5, m/z=102,1 y m/z=88,2, respectivamente.

Producción de monatina y precursor de monatina ("PM") para los estándares y para los ensayos

Producción de monatina

Se produjo sintéticamente una mezcla racémica de R,R- y S,S-monatina tal como se indica en la patente US nº 5.128.482.

Se separó la R,R- y la S,S-monatina mediante una etapa de derivatización e hidrólisis. Brevemente, se esterificó la mezcla racémica de monatina, se bloqueó el grupo amino libre con Cbz, se formó una lactona y la S,S-lactona se hidrolizó selectivamente utilizando un enzima proteasa inmovilizado. La monatina también puede separarse tal como se indica en Bassoli A. et al., Eur. J. Org. Chem. 8:1652-1658, 2005.

Producción de PM

5 Se produjo R-PM mediante la transaminación de la R,R-monatina utilizando D-aminotransferasa de amplio rango AT-103 (BioCatalytics) en tampón de fosfato potásico 0,1 M utilizando piruvato sódico como el aceptor de aminos. Se produjo S-PM mediante la transaminación de la S,S-monatina utilizando L-aminotransferasa AT-102 (BioCatalytics) en tampón de fosfato potásico 0,1 M utilizando piruvato sódico como el aceptor de aminos. Ambas reacciones se llevaron a cabo a 30°C y a un pH de aproximadamente 8,0 a 8,3 durante aproximadamente 20 horas. Se purificaron ambos compuestos utilizando HPLC a escala preparativa con una resina hidrófoba Rohm y Haas (Philadelphia, PA) (XAD TM 1600) eluyendo en agua. Se recolectaron muestras que contenían precursor de monatina a una pureza superior a 90% y se liofilizaron.

Ejemplo 2**15 Producción de monatina a partir de indol-3-piruvato**

La transaminasa AT-13 era parte de una biblioteca de transaminasas obtenida de BioCatalytics (Pasadena, CA) y el enzima se sometió a ensayo para la producción de monatina en reacciones acopladas utilizando la ProA aldolasa de *C. testosteroni*. La aldolasa se preparó tal como se indica en el documento nº WO 03/091396 A2. AT-103 es una D-transaminasa de amplia especificidad (EC 2.6.1.21) de una especie de *Bacillus* que requiere un D-aminoácido (tal como D-glutamato, D-aspartato o D-alanina) como el donante de aminoácidos. Se añadieron directamente enzimas y componentes/sustratos adicionales al tampón de reacción proporcionado en el kit, que contenía tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, donante de aminos 100 mM y piridoxal-5'-fosfato ("PLP") 0,1 mM. A un ml de tampón de reacción se añadió: 4 mg de indol-3-piruvato, 20 mg de piruvato, aproximadamente 50 µg de ProA proporcionado en un extracto celular, 1 µl de MgCl₂ 2 M y 2 mg de enzima aminotransferasa. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado. Las reacciones se incubaron durante la noche a 30°C bajo agitación suave (100 rpm). Las muestras e filtraron y se sometieron a análisis de CL de fase inversa/EM/EM tal como se indica en el Ejemplo 1. Los resultados indicaban que se produjeron aproximadamente 370 µg/ml de monatina utilizando el enzima AT-103. Los resultados se analizaron adicionalmente para determinar las proporciones de S,R/R,S frente a R,R/S,S-monatina basándose en las áreas de los picos de los dos grupos de estereoisómeros que se resolvieron durante la separación cromatográfica. Del total de monatina producido por AT-103, el 69% era R,R/S,S-monatina, y no isómeros mixtos. Este enzima es homólogo al enzima DAT de *Bacillus subtilis* indicado en el documento nº WO 03/091396 A2, que es conocido que presenta una amplia especificidad para los D-aminoácidos. Se llevó a cabo un análisis quiral utilizando la metodología de FDAA indicada en el Ejemplo 1, que verificó que la D-aminotransferasa producía predominantemente R,R-monatina y cierta cantidad de S,R-monatina, tal como se esperaba. Algunos experimentos adicionales de transaminación con S,S-monatina o R,R-monatina y α-cetoglutarato como sustratos verificaron que el enzima de BioCatalytics era altamente selectivo para la configuración D en el carbono 4, tal como se esperaba. En estos experimentos no se detectó glutamato en la reacción con S,S-monatina y α-cetoglutarato como sustratos.

40 Para reducir la cantidad de S,S-monatina o R,S-monatina producida como productos secundarios en reacciones acopladas con AT-103 (la D-transaminasa de amplio rango) y la ProA aldolasa, se purificó la aldolasa utilizando cartuchos His-Bind siguiendo los protocolos del fabricante (Novagen, Madison, WI). El enzima purificado preferentemente no debería contener actividades de L-aminotransferasa de tipo salvaje que pueden encontrarse presentes en extractos celulares (tales como las actividades de AspC o TyrB de *E. coli* nativo). El eluyente His-Bind se desaló para eliminar el imidazol utilizando columnas PD-10 (G25 Sephadex, Amersham-Pharmacia) y se eluyó en Tris-HCl 50 mM, pH 7. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado en un volumen de 1 ml y contenían tampón Tris-Cl 100 mM, pH 7,8, 50 µg de ProA aldolasa, 4 mg de indol-3-piruvato, 1 o 2 mg de D-aminotransferasa, piruvato sódico 200 mM, MgCl₂ 2 mM, fosfato potásico 3 mM, PLP 0,1 mM y 14,7 mg de D-glutamato. Los tubos se incubaron a 30°C bajo agitación suave. Se seleccionaron puntos temporales de dos horas y se congelaron inmediatamente a -20°C. Se ajustó el pH a las dos horas entre 5 y 7-8 utilizando NaOH y los ensayos se incubaron durante la noche. Se filtraron las muestras y se analizaron para monatina tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Las muestras de dos horas no presentaban cantidades detectables de monatina, probablemente debido al pH bajo. Las muestras de durante la noche contenían aproximadamente 190 ng/ml de monatina al utilizar 1 mg de D-aminotransferasa y aproximadamente el 84% era R,R-monatina y el 16% era S,R-monatina. Al utilizar 2 mg de D-aminotransferasa se produjeron 540 ng/ml de monatina; aproximadamente el 71% era R,R-monatina.

Se llevaron a cabo experimentos similares utilizando tampón de aminotransferasa de Biocatalytics que contenía fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, PLP 0,1 mM y D-glutamato 100 mM. Se añadió indol-3-piruvato sólido y D-aminotransferasa, tal como anteriormente. Se añadió ProA aldolasa (50 µg), MgCl₂ y piruvato 50 mM a partir de soluciones madre. Los ensayos se trataron tal como anteriormente, aunque no se requirió ningún ajuste del pH en este caso. Se preparó un control negativo con únicamente el enzima suministrado por BioCatalytics y tampón, que no contenía enzima. Se muestran los resultados experimentales en la Tabla 1.

Tabla 1: producción de monatina a partir de indol-3-piruvato en tampón fosfato

Mg D-aminotransferasa	Tiempo (horas)	Monatina total (ng/ml)	% de R,R
0	2	0	n/a
1	2	6.780	no determinado
2	2	13.170	55%
0	16	0	n/a
1	16	15.000	no determinado
2	16	28.930	51%

La producción de monatina en el tampón fosfato era claramente superior que en los sistemas tamponados con Tris.

5 Con el fin de comparar las actividades de DAT de *B. subtilis* clonado del documento nº WO 03/091396 A2 con el enzima de BioCatalytics (AT-103), se llevaron a cabo ensayos adicionales. El gen *dat* de *B. subtilis* también se subclonó en pET30a para eliminar la etiqueta de His-6. El enzima no etiquetado y el enzima etiquetado se produjeron en BL21(DE3), tal como se indica en el documento nº WO 03/091396 A2. Se prepararon extractos
10 celulares y se llevaron a cabo ensayos de proteínas totales para estimar la concentración de proteína tal como se ha indicado anteriormente. Se llevaron a cabo reacciones de un ml por duplicado que contenían: 500 µg de D-aminotransferasa, 50 µg de ProA aldolasa, fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, 4 mg de indol-3-piruvato, piruvato sódico 200 mM, 7,35 mg (50 mM) de D-glutamato y PLP 0,1 mM. Las muestras se incubaron a 30°C
15 durante 1 hora, 2 horas y durante la noche y se filtraron para el análisis de CL/EM/EM. Las muestras contenían únicamente los estereoisómeros S,R y R,R de la monatina, tal como se determinó mediante el protocolo de derivatización con FDAA indicado en el Ejemplo 1. Se resumen los resultados en la Tabla 2, a continuación. El % de RR se determinó a partir de las áreas de los picos que se habían separado mediante cromatografía de fase inversa.

Tabla 2: comparación entre los enzimas D-aminotransferasas

20

Enzima	Tiempo (horas)	Monatina (ppb)	% de R,R-monatina
DAT-HIS de <i>B. sub.</i>	1	512	no determinado
DAT de <i>B. sub.</i> no etiquetado	1	1.056	no determinado
AT-103 de BioCatalytics	1	2.353	no determinado
DAT-HIS de <i>B. sub.</i>	2	894	~80-90%
DAT de <i>B. sub.</i> no etiquetado	2	1.913	~80%
AT-103 de BioCatalytics	2	6.887	92,5%
DAT-HIST de <i>B. sub.</i>	16	3.014	31
DAT de <i>B. sub.</i> no etiquetado	16	5.612	33
AT-103 de BioCatalytics	16	16.131	66

La eliminación de la etiqueta HIS-6 aparentemente mejoró la actividad de la D-aminotransferasa de *B. subtilis*; sin embargo, el homólogo de la D-aminotransferasa de BioCatalytics claramente presentaba la actividad más alta. También mostró una preferencia de sustrato más alta para el precursor de la R-monatina. Los tiempos de incubación
25 incrementados aparentemente reducen el exceso enantiomérico de R,R-monatina que se produce.

Debido a que los enzimas D-aminotransferasa de *Bacillus* presentan una preferencia para el piruvato como aceptor de aminos y para la D-alanina como donante de aminos, se esperaba que la D-alanina podría utilizarse como el donante de aminos para la conversión del PM en monatina con resultados similares o mejores. Se llevaron a cabo
30 reacciones de un ml por duplicado que contenían: 500 µg de D-aminotransferasa, 50 µg de ProA aldolasa purificada, fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, 4 mg de indol-3-piruvato, piruvato sódico 100 mM, D-glutamato o D-alanina 25 mM y PLP 0,1 mM. Se incubaron las muestras durante 2 horas y se trataron tal como se ha indicado anteriormente antes del análisis. Al utilizar D-alanina como el donante de aminos, se produjeron niveles ligeramente más altos de monatina (23 frente a 21 ppm), tal como se esperaba. Además, se esperaba que las elevadas
35 concentraciones de piruvato podrían inhibir la etapa de transaminación, de esta manera, la dosificación de cantidades más bajas de piruvato con el tiempo podría mejorar la velocidad global de producción de monatina. Puede observarse a partir de los datos anteriormente proporcionados que aunque se utilizó en el presente caso la mitad del piruvato en comparación con la tabla anterior, se produjo significativamente más monatina. Aunque se informa en la literatura que las ProA aldolasas producen principalmente enantiómeros S de productos de condensación de aldol, la ProA aldolasa utilizada en el presente estudio claramente produce un porcentaje elevado de R-PM y en ensayos acoplados produjo hasta 92% de R,R-monatina. El elevado porcentaje de R,R-monatina no se debe a la selectividad de la D-aminotransferasa, tal como se demuestra en el Ejemplo 19.

45 Ejemplo 3

Producción de R,R-monatina a partir de D-triptófano

A 1 ml de mezcla de reacción se añadió lo siguiente: aproximadamente 60 µg de ProA aldolasa de *C. testosteroni*

(suministrado en extractos celulares, tal como se indica en el documento n° WO 03/091396 A2), MgCl₂ 4 mM, D-triptófano 50 mM, 0,5 mg de D-aminotransferasa de BioCatalytics (AT-103), piruvato sódico 100 mM, tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, o tampón de acetato sódico 100 mM, pH 8, PLP 0,05 mM, fosfato potásico 3 mM (únicamente a las reacciones de acetato) y α-cetoglutarato 10 mM. Se llevaron a cabo los experimentos por duplicado, con controles negativos en los que no se había añadido ninguna aldolasa. Las muestras se incubaron durante la noche (20 horas) a 30°C bajo agitación suave. El pH real de las muestras de acetato sódico era de aproximadamente 5, mientras que el pH final para las muestras tamponadas con fosfato era de aproximadamente 7. Ninguna de las aldolasas aparentemente presentaba ninguna actividad significativa a pH 5; la muestra que contenía ProA aldolasa presentaba un pH ligeramente superior al del control negativo, pero probablemente no superior al error experimental. En fosfato potásico, la ProA aldolasa produjo 73,4 ppm de monatina con una proporción R,R:S,R de 1,7:1 (~63% de R,R a partir de D-triptófano).

Debido a que los enzimas D-aminotransferasa de *Bacillus* presentan una preferencia para el piruvato como aceptor de aminos y para la D-alanina como donante de aminos, se esperaba que la adición de alfa-cetoglutarato resultase innecesaria al producir R,R- o S,R-monatina a partir de D-triptófano. Se repitió el experimento anterior (en tampón de fosfato potásico 100 mM) utilizando ProA aldolasa purificada (50 a 60 µg) y un tiempo de incubación de 2,5 horas. Se llevaron a cabo experimentos por duplicado, con y sin alfa-cetoglutarato. Al añadir alfa-cetoglutarato 10 mM, se formaron 56,1 ppm de monatina utilizando D-triptófano como el sustrato (79,5% de R,R y 20,5% de S,R). Al omitir el alfa-cetoglutarato, se formaron 102,5 ppm de monatina (79% de R,R y 21% de S,R).

Comparación entre la producción de monatina total y la distribución isomérica de las HMG aldolasas de *Sinorhizobium meliloti*, *C. testosteroni* y la aldolasa de SEC ID n° 22

La transaminasa AT-103 (una D-aminotransferasa de amplia especificidad) se obtuvo de BioCatalytics (Pasadena, CA) y este enzima o el enzima recombinante de *B. sphaericus* producido en el Ejemplo 18 fue utilizado en reacciones acopladas con HMG aldolasa para producir monatina a partir de D-triptófano y piruvato tal como se indica en la solicitud publicada de patente US n° 2005/282260.

Las HMG aldolasas de *C. testosteroni* (ProA) y de *S. meliloti* se prepararon y se purificaron tal como se indica en la publicación de patente US n° 2004/0063175 y el documento n° WO 03/091396 A2. Para producir cantidades experimentales de la aldolasa de SEC ID n° 22, se cultivaron 50 ml en medio de Luria-Bertani ("LB") que contenía ampicilina (100 µg/ml) hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. La cepa que contenía el constructo SEC ID n° 21 se indujo con 200 µg/l de anhidrotetraciclina. Las células se cultivaron durante 5 horas tras la inducción y se prepararon los extractos celulares siguiendo los protocolos del fabricante (Novagen, reactivo de Bugbuster). Se añadió también benzonucleasa e inhibidor de proteasa. Se separaron las proteínas solubles en los extractos celulares en una estación automática de electroforesis Experion de BioRad Laboratories y se analizaron para la concentración y el porcentaje de expresión utilizando el software Experion versión 1.1.98.0. Se utilizó la aldolasa de SEC ID n° 22 en forma de un enzima bruto (no purificado) para las reacciones indicadas posteriormente.

Se añadió lo siguiente por cada 1 ml de mezcla de reacción: aproximadamente 50 µg de aldolasa, MgCl₂ 4 mM, D-triptófano 50 mM, 0,5 mg de D-aminotransferasa de *B. sphaericus* purificada, piruvato sódico 200 mM, tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, y PLP 0,05 mM. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, con controles negativos, a los que no se había añadido ninguna aldolasa. Las muestras se incubaron durante 1 hora y durante la noche (18 horas) a 30°C bajo agitación suave. Se produjeron cantidades reducidas de monatina (<0,5 ppm) sin aldolasa en las reacciones de durante la noche, debido a reacciones no enzimáticas catalizadas por el magnesio y el fosfato. Estos valores se restaron de los números mostrados posteriormente y se muestran los resultados de promedios. Los únicos estereoisómeros detectados al producir monatina utilizando dichos métodos eran R,R y S,R. Se lista posteriormente el porcentaje de R,R y se determinó a partir del área de los picos de la CL de fase inversa.

Tabla 3: monatina total producida a partir de D-triptófano y % de R,R

Enzima (punto temporal)	Monatina total (ppm)	% de R,R-monatina
ProA de <i>C. testosteroni</i> (1 hora)	16,63	86,45
ProA de <i>C. testosteroni</i> (18 horas)	86,86	63,1
HMG de <i>S. meliloti</i> (1 hora)	20,5	96,7
HMG de <i>S. meliloti</i> (18 horas)	88,3	89,9
SEC ID n° 22 (1 hora)	14,70	100
SEC ID n° 22 (18 horas)	95,14	97,35

La muestra de 18 horas para la aldolasa de SEC ID n° 22 también se analizó para la distribución estereoisomérica mediante el método de derivatización con FDAA listada en el Ejemplo 1, que rindió un resultado de 94,9% de R,R y 5,1% de S,R-monatina. La aldolasa de SEC ID n° 22 presenta una enantioespecificidad más elevada para la producción de R-PM que las HMG aldolasas de *C. testosteroni* y de *S. meliloti*.

Se llevaron a cabo los mismos experimentos, en paralelo, utilizando L-triptófano como el sustrato de partida y

acoplado las aldolasas con L-aminotransferasa de amplia especificidad HexAspC producida y purificada tal como se indica en la solicitud publicada de patente US nº 2005/282260. Estas reacciones deberían producir principalmente S,S-monatina y R,S-monatina. Las reacciones también se complementaron con alfa-cetoglutarato 10 mM como el aceptor de aminos para la transaminación de L-triptófano. Nuevamente en la parte inferior se proporcionan los promedios de los resultados por duplicado para la monatina total (restando los niveles de fondo sin aldolasa presente) y se muestra el porcentaje de S,S-monatina basado en el área de picos de la CL de fase inversa. En algunos casos, debido a que las aldolasas son bastante específicas de R y producen poca monatina total, las estimaciones de fase inversa de distribución estereoisomérica son menos precisas debido las colas del pico de triptófano, que puede coeluir con el pico de S,S/R,R-monatina. Las tendencias siguen siendo informativas de la comparación de la especificidad de R de las aldolasas. Los resultados de los análisis adicionales utilizando el método de derivatización con FDAA se muestran entre paréntesis para varias muestras y son más precisos. Los datos de monatina total superiores a aproximadamente 400 ppm son superiores al rango lineal de la escala de los estándares utilizados para cuantificar los resultados, de manera que son resultados cualitativos. La ProA aldolasa de *C. testosteroni* típicamente produce 95% a 100% de S,S-monatina, tal como se muestra en la solicitud publicada de patente US nº 2005/282260.

Tabla 4: monatina total producida a partir de L-triptófano y % de S,S

Enzima (punto temporal)	Monatina total (ppm)	% de S,S-monatina
ProA de <i>C. testosteroni</i> (1 hora)	440,35	92,5
ProA de <i>C. testosteroni</i> (18 horas)	958,3	92,5
HMG de <i>S. meliloti</i> (1 hora)	45,9	66,3
HMG de <i>S. meliloti</i> (18 horas)	108,1	61,4
SEC ID nº 22 (1 hora)	17,85	55,1 (18,9)
SEC ID nº 22 (18 horas)	135,5	27,3 (19,1)

Puede observarse que la especificidad de R de la aldolasa de SEC ID nº 22 es bastante elevada en comparación con el enzima ProA de referencia. Esta especificidad de R también se refleja en el bajo % de S,S-monatina producida, a pesar del elevado grado de especificidad de la HexAspC aminotransferasa para S-PM en estas reacciones. Nuevamente, la HMG aldolasa de *S. meliloti* se encuentra entre la ProA aldolasa de *C. testosteroni* y la aldolasa de SEC ID nº 22 en términos de especificidad de R, basándose en los niveles de S,S-monatina producida. La cantidad de monatina total al comparar la producción de S,S-monatina con la producción de R,R-monatina no es indicativa de la actividad de aldolasa. La D-aminotransferasa es menos activa que HexAspC para las reacciones de transaminación de PM, en particular a las concentraciones de PM que se encuentran presentes en estas reacciones.

Para una comparación adicional de la aldolasa de SEC ID nº 22 con el enzima ProA de *C. testosteroni*, se utilizaron proporciones variables de D-aminotransferasa a aldolasa en reacciones que partían de D-triptófano (no se utilizaron muestras por duplicado para estos experimentos). Las reacciones se llevaron a cabo tal como se ha indicado anteriormente. Para las reacciones en las que la concentración de aldolasa se mantuvo constante, se utilizaron aproximadamente 50 µg de aldolasa. Para las reacciones en las que se mantuvo constante la cantidad de D-aminotransferasa, se utilizaron 0,5 mg. Para la concentración de 2 y de 10 mg/ml de D-aminotransferasa, se utilizó enzima liofilizado. Para las 2 concentraciones más altas de D-aminotransferasa se analizaron muestras por duplicado.

Tabla 5: efecto de la concentración de D-aminotransferasa sobre la producción de R,R-monatina

Aldolasa	Concentración de D-aminotransferasa	Tiempo	Monatina total (ppm aproximadas)	% de R,R-monatina
SEC ID nº 22	0,25 mg/ml	1 hora	2	100
SEC ID nº 22	0,25 mg/ml	durante la noche	141	97,1
SEC ID nº 22	0,5 mg/ml	1 hora	8	100
SEC ID nº 22	0,5 mg/ml	durante la noche	273	96,5
SEC ID nº 22	1 mg/ml	1 hora	34	100
SEC ID nº 22	1 mg/ml	durante la noche	638	96,5
SEC ID nº 22	2 mg/ml	1 hora	979	100
SEC ID nº 22	2 mg/ml	durante la noche	1.910	97,3
SEC ID nº 22	10 mg/ml	1 hora	2.930	99,1
SEC ID nº 22	10 mg/ml	durante la noche	2.950	96,5
ProA de <i>C. testosteroni</i>	0,25 mg/ml	1 hora	4	78,7
ProA de <i>C. testosteroni</i>	0,25 mg/ml	durante la noche	257	61,1
ProA de <i>C. testosteroni</i>	0,5 mg/ml	1 hora	25	79,0
ProA de <i>C. testosteroni</i>	0,5 mg/ml	durante la noche	480	62,5
ProA de <i>C. testosteroni</i>	1 mg/ml	1 hora	74	73,8
ProA de <i>C. testosteroni</i>	1 mg/ml	durante la noche	810	68,1

ProA de <i>C. testosteroni</i>	2 mg/ml	1 hora	325	73,1
ProA de <i>C. testosteroni</i>	2 mg/ml	durante la noche	2.220	71,9
ProA de <i>C. testosteroni</i>	10 mg/ml	1 hora	2.910	59,7
ProA de <i>C. testosteroni</i>	10 mg/ml	durante la noche	2.450	67,5

5 Para niveles de monatina superiores a 400 ppm, los resultados no se encuentran en el rango lineal de la curva estándar y son sólo valores aproximados. La cantidad máxima de R,R-monatina producida, al diluirse apropiadamente, era de aproximadamente 1.100 ppm. Se llevó a cabo un análisis estereoisomérico de FDAA para la aldolasa de SEC ID nº 22 con muestras de D-aminotransferasa 10 mg/ml. A las dos horas, la muestra contenía 98,5% de R,R-monatina. A las 17 horas, la muestra contenía 95,9% de R,R-monatina. La aldolasa de SEC ID nº 22 produjo porcentajes elevados de R,R-monatina, incluso tras tiempos de incubación largos y la utilización de grandes cantidades de aminotransferasa. En caso de que se suministrase D-aminotransferasa adecuada, la aldolasa de SEC ID nº 22 producía tanta monatina total como ProA aldolasa de *C. testosteroni*, indicando una actividad específica similar.

Tabla 6: efecto de la concentración de aldolasa sobre la producción de R,R-monatina

Aldolasa	Concentración de D-aminotransferasa	Tiempo	Monatina total (ppm aproximadas)	% de R,R-monatina
SEC ID nº 22	25 µg/ml	1 hora	7,0	100
SEC ID nº 22	25 µg/ml	durante la noche	275	97,4
SEC ID nº 22	50 µg/ml	1 hora	9,0	97,3
SEC ID nº 22	50 µg/ml	durante la noche	334	95,7
SEC ID nº 22	100 µg/ml	durante la noche	297	93,3
ProA de <i>C. testosteroni</i>	25 µg/ml	1 hora	16	78,2
ProA de <i>C. testosteroni</i>	25 µg/ml	durante la noche	491	73,2
ProA de <i>C. testosteroni</i>	50 µg/ml	1 hora	18	64,1
ProA de <i>C. testosteroni</i>	50 µg/ml	durante la noche	437	63,0
ProA de <i>C. testosteroni</i>	100 µg/ml	1 hora	26	62,5
ProA de <i>C. testosteroni</i>	100 µg/ml	durante la noche	513	61,5

15 Al variar la concentración de aldolasa, no se produjo un gran incremento de la monatina total. El porcentaje de R,R se redujo con el tiempo también con la concentración de aldolasa, en particular en el caso de que la D-aminotransferasa fuese limitante.

20 Con el fin de examinar adicionalmente la especificidad de R de las aldolasas sometidas a ensayo, se llevaron a cabo experimentos partiendo de L-triptófano y HexAspC aminotransferasa, que se produjo y se purificó tal como se indica en la solicitud publicada de patente US nº 2005/282260. La HexAspC mostraba una fuerte selectividad para la transaminación de S-PM frente a R-PM; de esta manera, los porcentajes superiores a 50% de R,S-monatina indican una aldolasa altamente estereoespecífica. Se suministró alfa-cetoglutarato diez mM como un aceptor de aminos; sin embargo, a concentraciones altas, el piruvato también es utilizado por la L-aminotransferasa. En estas reacciones, típicamente sólo se produce S,S- y R,R-monatina dentro de los límites de detección del protocolo de derivatización con FDAA.

Tabla 7. Efecto de la concentración de L-aminotransferasa sobre la producción de S,S-monatina

Aldolasa	Concentración de D-aminotransferasa	Tiempo	Monatina total (ppm aproximadas)	% de S,S-monatina
SEC ID nº 22	0,25 mg/ml	1 hora	13	33,8
SEC ID nº 22	0,25 mg/ml	durante la noche	127	34,2
SEC ID nº 22	0,5 mg/ml	1 hora	31	30,9
SEC ID nº 22	0,5 mg/ml	durante la noche	272	26,8
SEC ID nº 22	1 mg/ml	1 hora	34	20,3
SEC ID nº 22	1 mg/ml	durante la noche	385	23,5
ProA de <i>C. testosteroni</i>	0,25 mg/ml	1 hora	523	94,2
ProA de <i>C. testosteroni</i>	0,25 mg/ml	durante la noche	1.817	93,7
ProA de <i>C. testosteroni</i>	0,5 mg/ml	1 hora	602	91,8
ProA de <i>C. testosteroni</i>	0,5 mg/ml	durante la noche	2.122	89,9
ProA de <i>C. testosteroni</i>	1 mg/ml	1 hora	873	90,2
ProA de <i>C. testosteroni</i>	1 mg/ml	durante la noche	1.237	82,6

30

Tabla 8. Efecto de la concentración de aldolasa sobre la producción de S,S-monatina

Aldolasa	Concentración de D-aminotransferasa	Tiempo	Monatina total (ppm aproximadas)	% de S,S-monatina
SEC ID nº 22	25 µg/ml	1 hora	11	25,1
SEC ID nº 22	25 µg/ml	durante la noche	112	20,0
SEC ID nº 22	50 µg/ml	1 hora	18	31,8
SEC ID nº 22	50 µg/ml	durante la noche	160	27,0
SEC ID nº 22	100 µg/ml	1 hora	33	33,2
SEC ID nº 22	100 µg/ml	durante la noche	238	41,4
ProA de <i>C. testosteroni</i>	25 µg/ml	1 hora	305	86,4
ProA de <i>C. testosteroni</i>	25 µg/ml	durante la noche	1.094	87,5
ProA de <i>C. testosteroni</i>	50 µg/ml	1 hora	575	90,9
ProA de <i>C. testosteroni</i>	50 µg/ml	durante la noche	1.449	89,5
ProA de <i>C. testosteroni</i>	100 µg/ml	1 hora	817	93,6
ProA de <i>C. testosteroni</i>	100 µg/ml	durante la noche	1.360	89,7

5 Para la aldolasas que son altamente específicas de R, tal como SEC ID nº 22, se produce menos monatina total y el incremento de la cantidad de aldolasa sí incrementa la monatina total (así como el % de S,S). Estas aldolasas producen menos sustrato S-PM, el sustrato preferente para la L-aminotransferasa utilizada. Para los enzimas que son menos específicos de R, tales como ProA, el incremento de la aldolasa no mejora significativamente la producción de monatina total o el % de S,S-monatina. El incremento de la L-aminotransferasa añadida reduce el porcentaje de S,S-monatina producida.

10 La actividad y especificidad de la aldolasa de SEC ID nº 22 se estudió adicionalmente en dos sistemas de tampón: fosfato potásico 100 mM, tal como anteriormente, y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico ("MOPS") 100 mM (con fosfato potásico 3 mM). Los ensayos se llevaron a cabo tal como anteriormente, utilizando 1 mg/ml de D-aminotransferasa AT-103 y D-triptófano 50 mM. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado durante 4,5 horas. La aldolasa de SEC ID nº 22 produjo 116 ppm de monatina y 99,1% de R,R-monatina en fosfato potásico (método de derivatización con FDAA). En MOPS, la aldolasa de SEC ID nº 22 produjo 75,5 ppm de monatina y 96,2% era R,R-monatina. Los niveles de fondo de monatina producida en MOPS, sin la aldolasa de SEC ID nº 22, eran significativamente más elevados y el porcentaje de RR era menor con MOPS, incluso en los controles. Posiblemente la selectividad y actividad de la D-aminotransferasa resultaron afectadas por la presencia del MOPS.

20 Subclonación de SEC ID nº 21

25 Se obtuvo el gen aldolasa de SEC ID nº 21 de Diversa Corp. SEC ID nº 21 era parte de una biblioteca ambiental que fue cribada por Diversa Corp. para genes de aldolasa. Sin embargo, el gen aldolasa de SEC ID nº 21 puede reconstruirse mediante cualquier método conocido por el experto ordinario en la materia. Por ejemplo, el gen aldolasa de SEC ID nº 21 puede reconstruirse utilizando métodos de ensamblaje de PCR, tal como se indica en los Ejemplos 10, 18 y 19.

30 Se utilizaron los cebadores siguientes para amplificar por PCR el gen aldolasa (SEC ID nº 21): 5'-gaggagctcgagtcagacgtatttcagtccttttc-3' (SEC ID nº 23) y 5'-agaagacatgatgattatcagccggggac-3' (SEC ID nº 24). El producto de PCR resultante se digirió con XhoI y NdeI para cortar en los sitios que habían sido introducidos en los cebadores. El fragmento se purificó en gel (kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, Valencia, CA)) y se ligó (utilizando ADN ligasa de T4) con pET28b que había sido digerido con XhoI y NdeI y purificado en gel. La ligación se transformó en células químicamente competentes TOP10F'. Se cribaron las colonias que crecían sobre las placas para inserciones y varios aislados con inserciones se sometieron a análisis de secuenciación del ADN (Agencourt, Beverly, MA).

35 Purificación de la aldolasa de SEC ID nº 22

40 Los clones de aldolasa confirmados se transformaron en BL21 (DE3) o en BL21 (DE3) pLysS. Los cultivos de durante la noche cultivados con el antibiótico apropiado se diluyeron en medio fresco (típicamente 1:100) y se cultivaron hasta una $DO_{600} \sim 0,6$ con aireación a 37°C. A continuación se indujeron los cultivos con tiogalactósido de isopropilo ("IPTG") 1 mM y se trasladaron a 30°C (con aireación) y se continuó la incubación durante la noche. Se recolectaron las células mediante centrifugación. El sedimento celular típicamente se sometió a un ciclo de congelación-descongelación para ayudar en la lisis celular. Se lisó el sedimento celular en BugBuster y benzoasa (Novagen, Madison, WI) (siguiendo el protocolo del fabricante). Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación. El extracto de proteínas en bruto se aplicó a una columna HisBind (Novagen, Madison, WI) que había sido preparado siguiendo el protocolo del fabricante. Se lavó la columna y se eluyó la proteína siguiendo el protocolo del fabricante. La proteína purificada se desaló con columnas PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El tampón utilizado para el intercambio era fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 4 mM. La proteína purificada

se concentró utilizando concentradores centrífugos Amicon (Millipore, Billerica, MA).

Ejemplo 4

5 (1) Triptófano racemasa

Se produjo R,R-monatina utilizando D-aminotransferasa y una aldolasa utilizando el D-triptófano como el material de partida (Ejemplo 3). Sin embargo, el L-triptófano puede ser un material de partida preferente por varios motivos. Por ejemplo, el L-triptófano puede resultar menos caro y encontrarse más fácilmente disponible que el D-triptófano. La presente exposición describe varios métodos para obtener una triptófano racemasa activa. Los rendimientos de R,R-monatina mejoran mediante la utilización de una aldolasa específica de R, es decir, una aldolasa que produzca preferente o selectivamente R-PM. Las figuras 1 y 2 ilustran métodos para producir R,R-monatina estereoisoméricamente enriquecida a partir de L-triptófano utilizando una triptófano racemasa, una D-aminotransferasa y una aldolasa específica de R.

Se creó una selección para una triptófano racemasa mediante la construcción de una cepa que requiere una racemasa activa para el crecimiento. Un auxótrofo para triptófano requiere una fuente de L-triptófano al cultivarlo en medio mínimo. La complementación del medio con D-triptófano es una manera de seleccionar para una racemasa que convierte el D-triptófano en L-triptófano. Se sometieron a ensayo los auxótrofos de triptófano para el crecimiento en medio mínimo complementado con D-triptófano. Las cepas CAG18455 y CAG18579 del Coli Genetic Stock Center y NRRL12264 (también lipA⁻, λDE3 lisogenizado y curado de su plásmido) no crecieron al complementarlas con D-triptófano pero crecieron al complementarlas con L-triptófano. *E. coli* puede utilizarse como organismo huésped aunque también pueden utilizarse otros organismos huésped, tales como levaduras, otras bacterias u otros organismos eucarióticos. Un auxótrofo para el triptófano (concretamente NRRL12264 (también lipA⁻, λDE3 lisogenizado y curado de su plásmido)) crecerá en D-triptófano tras ser transformado con una D-aminotransferasa. Lo anterior confirma la capacidad de *E. coli* de transportar D-triptófano al interior de la célula.

Salcher y Lingens han descrito la presencia de una triptófano racemasa en *Pseudomonas aureoreofaciens* (ATCC nº 15926). Salcher O. y Lingens F., J. Gen. Microbiol. 121:465-471, 1980. La triptófano racemasa también ha sido descrita en varias plantas, incluyendo el tabaco, la remolacha, el tomate y el trigo, y el enzima aparentemente resulta inducido por condiciones de estrés osmótico o sequía. La triptófano racemasa podría desempeñar un papel en *Sclerochiton ilicifolius* en la ruta de producción nativa de monatina. Con el fin de aislar dicha actividad de racemasa, se construyó una biblioteca de expresión a partir de ATCC nº 15926 (u otro organismo con actividad de triptófano racemasa) y la biblioteca se transformó en el auxótrofo para el triptófano. Se seleccionó una cepa que crece utilizando D-triptófano como la fuente de triptófano. También puede utilizarse un método similar para cribar muchas cepas con racemasas conocidas para buscar una racemasa con actividad sobre el D-triptófano. Entre los ejemplos de racemasas que podrían presentar actividad sobre el D-triptófano se incluyen las alanina, serina y glutamato racemasas. Yoshimura T. y Esaki N., "Amino Acid Racemasas: Functions and Mechanisms", Journal of Bioscience and Bioengineering 96:103-109, 2003.

La alanina racemasa es dependiente de PLP y ha sido clonada a partir de *Salmonella typhimurium* (gen *dadB*). Otras fuentes de alanina racemasas son *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Bacillus cereus*. Un hongo basidiomiceto, *Lentinus edodes*, también contiene una alanina racemasa de amplia actividad.

La serina racemasa también es dependiente de PLP y se encuentra en eucariotas (por ejemplo en ADNc del gusano de la seda, de cerebro de rata o de cerebro de ratón), así como en bacterias (*Enterococcus gallinarum*).

La glutamato racemasa es independiente de PLP y ha sido clonada a partir de *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus pumilus*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus brevis*, *E. coli*, *Aquifex pyrophilus* y *Bacillus subtilis*. Algunas glutamato racemasas son muy específicas y, en consecuencia, incluso los aminoácidos estructuralmente similares aspartato, asparagina y glutamina podrían no ser sustratos para el enzima.

También existen las aspartato racemasas y son independientes de PLP. Las aspartato racemasas se encuentran en *Lactobacilli*, cepas de *Streptococcus* y en algunas arqueobacterias, tales como cepas de *Desulfurococcus* y *Thermococcus*. El molusco bivalvo *Scapharca brouhtonii* también contiene una aspartato racemasa.

Entre otras racemasas presentes en la literatura se incluyen la aminoácido racemasa (EC 5.1.1.10) de *Anabaena* sp. y *Pseudomonas striata*, la prolina racemasa y la fenilalanina racemasa multifuncional. También se están sometiendo a ensayo las epimerasas o racemasas relacionadas. Se están sometiendo a ensayo racemasas potenciales para corroborar que no son D-triptófano aminotransferasas. El cribado de potenciales racemasas se lleva a cabo mediante análisis de secuencias y/o un ensayo enzimático. Este método de cribado para la selección de una triptófano racemasa también se utiliza para otras bacterias o arqueobacterias para las que ha sido descrita una triptófano racemasa, así como para bibliotecas de ADNc eucariótico que han sido construidas de manera que permitan la expresión.

Los enzimas que pasan el ensayo como triptófano racemasa son cribados para actividad sobre la monatina, tal como se indica en el Ejemplo 8. Idealmente se obtiene un enzima que es muy específico para el triptófano y presenta poca o ninguna actividad de racemasa sobre la monatina.

- 5 También puede evolucionarse y/o mejorarse una triptófano racemasa (mediante mutagénesis o ingeniería recombinante) a partir de una racemasa, transaminasa o epimerasa preexistente. Además, debido a que se conocen las estructuras cristalinas de las alanina aminotransferasas (y otras aminotransferasas), éstas pueden utilizarse como base para una mutagénesis racional, basada en la estructura. El procedimiento indicado anteriormente se utiliza como selección inicial para actividad de triptófano racemasas y como cribado para actividad mejorada.

10

(2) Bibliotecas de triptófano racemasa

Construcción de bibliotecas:

- 15 Se obtuvo *Burkholderia pyrrocinia* (ATCC nº 15958) y *Pseudomonas chlororaphis* (ATCC nº 15926) de la American Type Culture Collection. Se cultivaron tal como recomienda la ATCC y se preparó ADN genómico siguiendo el método descrito en Mekalanos J.J., "Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*", Cell 35:253-263, 1983. El ADN genómico se digirió parcialmente con el enzima de restricción Sau3AI. Se purificaron en gel 1 a 3 fragmentos de Kbp utilizando un kit de extracción en gel Qiagen QIAquick (Valencia, CA). El ADN purificado se ligó en pTrc99a (Amersham, Piscataway, NJ) que había sido digerido con BamHI y purificado tal como se ha indicado anteriormente. La ligación se llevó a cabo a temperatura ambiente con incubación durante la noche utilizando una proporción molar 3:1 de inserción a vector. La biblioteca ligada se transformó en células químicamente competentes TOP10F⁺ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se sembró en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina. Tras la incubación durante la noche de las placas de transformación, se rasparon las colonias de las placas, se lavaron con medio LB líquido y se realizó una minipreparación con un sedimento celular del tamaño apropiado utilizando un kit mini-prep Qiagen QIAquick (Valencia, CA). Se agruparon aproximadamente 30.000 colonias y se realizó una minipreparación.

20

- 25 El plásmido agrupado se transformó en CAG18455 (*trpC83::Tn10, rph-1*) o CAG18579 (*trpC::Tn10kan, rph-1*). Ambas cepas eran auxotróficas para el triptófano de manera que no pueden crecer en medio mínimo M9 (Difco) a menos que se complemente el medio con triptófano. Los transformantes se sembraron en medio mínimo M9 complementado con D-triptófano. Lo anterior selecciona para una cepa que puede convertir el D-triptófano en L-triptófano.

30

- 35 Antes de la transformación de la biblioteca, las cepas se sometieron a ensayo para el crecimiento en medio mínimo con L- o D-triptófano. Las cepas se sometieron a ensayo para el crecimiento sobre medio mínimo complementado con D-triptófano y no se observó crecimiento. Ambas cepas crecieron sobre medio idéntico complementado con L-triptófano en lugar de D-triptófano. Además, se transformó un derivado de NRRL12264 (la cepa utilizada había sido curada del plásmido con el operón triptófano, lisogenizada con λDE3 y delecionada *lipA*, además de otras mutaciones codificadas cromosómicamente (*serB*, *ΔtripED*, *tnaA2* y *aroP*)), se transformó con una aminotransferasa específica de D procedente de *Bacillus subtilis* (documento nº WO 03/091396). La cepa NRRL12264 no podía crecer en medio mínimo complementado con D-triptófano pero creció en medio idéntico complementado con L-triptófano en lugar de D-triptófano. La expresión de la D-aminotransferasa estaba regulada por el promotor de T7. La cepa transformada pudo crecer sobre medio mínimo M9 complementado con D-triptófano.

40

- 45 Se cribaron las colonias que crecían sobre el medio de D-triptófano. Se aisló el plásmido y se retransformó en la cepa parental (CAG18455 o CAG18579) para confirmar que el crecimiento sobre el medio de D-triptófano era dependiente del plásmido y no de una mutación en el huésped. Se analizó la secuencia de nucleótidos de los plásmidos que complementaban la auxotrofia para el triptófano. Los clones que se determinó que contenían un gen de triptófano racemasa se analizaron adicionalmente.

50

- 55 La triptófano racemasa de otras fuentes de tejido se aisló de manera similar. Existen publicaciones en la literatura de actividad de triptófano racemasa tanto en células en cultivo de tejido de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. Wisconsin 38) (Miura G.A. y Mills S.E., "The conversion of D-tryptophan to L-tryptophan in cell cultures of tobacco", Plant Physiol. 47:483-487, 1974) y en extractos de proteínas en bruto de trigo (*Triticum aestivum*) (Rekoslavskaya N.I. et al., "Synthesis and physiological function of D-tryptophan during wheat germination", Russian J. Plant Physiol. 44:196-203, 1997). Se preparó una biblioteca de expresión de ADNc a partir de tejido, tal como se indica en la literatura, y se utilizó la biblioteca de expresión para transformar un auxótrofo para el triptófano tal como se ha indicado anteriormente.

60

- 65 Se esperaría que la utilización de las mismas cepas y la reproducción de las condiciones de cultivo indicadas en la literatura permitiría aislar el enzima con actividad de triptófano racemasas o que podría aislarse el ARNm y que podría prepararse una biblioteca de expresión de ADNc que contendría una secuencia codificante para un enzima con actividad de triptófano racemasa. Por ejemplo, pueden ser necesarios determinados estadios del crecimiento o determinados componentes del medio para inducir la producción celular de un enzima con actividad de triptófano racemasa.

(3) Ensayo de triptófano racemasa

Los clones que se había identificado como potencialmente poseedores de una triptófano racemasa se transformaron en una cepa de *E. coli* utilizada comúnmente para la expresión de proteínas recombinantes, tal como BL21. Las células se cultivaron en caldo LB hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,4-0,6. El promotor que regulaba la expresión de la racemasa se indujo con IPTG (concentración final: 0,1 mM). Tras la inducción, se dejó que las células expresasen la proteína durante 1 a 3 horas a 37°C (con aireación). Se recolectaron las células y se lisaron con prensa francesa, sonicación o por medios químicos (tales como BugBuster (Novagen)). Se centrifugaron las células lisadas para eliminar los residuos celulares. El extracto clarificado se utilizó directamente en los ensayos.

Se añadieron cantidades variables de extracto a una solución de manera que la concentración final fuese de fosfato potásico 50 mM (pH 7,0) y L-triptófano 2 mM. Se añadió piridoxal-5'-fosfato a una concentración final de 10 µM. Se incubaron las muestras y después se analizaron mediante CL/EM. La presencia de un pico de D-triptófano en el caso de que sólo se utilice L-triptófano como sustrato indica un resultado positivo. La concentración de D-triptófano debería incrementarse con el tiempo hasta alcanzar un equilibrio, y la velocidad también debería incrementarse con la concentración de proteína hasta que la concentración de enzima sea suficientemente elevada para no estar saturada con el sustrato. El D-triptófano también puede convertirse en L-triptófano tal como se ha indicado anteriormente.

Un gen de complementación puede codificar una D-aminotransferasa. Esta reacción de transaminación requiere un alfa-cetoácido, tal como α -cetoglutarato, oxalacetato o piruvato como aceptor de aminos. Estos compuestos probablemente se encontrarán presentes en un extracto celular, habitualmente en cantidades reducidas. Estos compuestos pueden separarse utilizando una columna de desalación PD-10 y el ensayo todavía puede llevarse a cabo en un extracto en bruto. De manera similar, un gen de complementación también puede codificar una D-aminoácido oxidasa o una D-aminoácido deshidrogenasa. Estas enzimas también requieren cofactores y cosustratos que pueden separarse mediante una columna de desalación PD-10. La actividad de triptófano racemasa se purifica utilizando cromatografía de columna convencional. Finalmente, el marco de lectura abierta identificado como potencial triptófano racemasa se clonó en un vector de expresión con una etiqueta de afinidad. A continuación la potencial triptófano racemasa se purificó mediante cromatografía de afinidad. En cualquier caso, se utilizó la proteína purificada en ensayos enzimáticos esencialmente tal como se ha indicado anteriormente.

(4) Ingeniería genética inversa de la triptófano racemasa

La triptófano racemasa puede purificarse a partir de fuentes vegetales o microbianas mediante técnicas convencionales de purificación de proteínas, incluyendo el fraccionamiento con sulfato amónico y la cromatografía de columna convencional. Tras purificar la proteína de manera que un punto puede aislarse en un gel 2-D, se utilizan técnicas de microsecuenciación peptídica o secuenciación convencional de aminoácidos de tipo Edman (en Internet ver "golgi.harvard.edu/microchem/" para descripciones de los protocolos y equipos utilizados típicamente para este tipo de estudio). Sin embargo, en algunos casos no puede utilizarse la secuencia genómica del organismo como fuente de la proteína para la purificación de proteínas debido a que dicha secuencia todavía no ha sido determinada. En esta situación, puede diseñarse el primer juego de cebadores degenerados basándose en la secuencia disponible en el pariente conocido más próximo de la fuente de proteína. Seguidamente se lleva a cabo PCR degenerada y paseo genómico siguiendo protocolos establecidos para aislar la secuencia codificante de la triptófano racemasa.

(5) Clonación de la alanina racemasa a partir de *Geobacillus stearothermophilus*

Se clonó la alanina racemasa (SEC ID nº 41) de *Geobacillus stearothermophilus*. Se obtuvo el ADN genómico de *G. stearothermophilus* (ATCC nº 12980D) de la ATCC (Manassas, VA). Se utilizaron los cebadores siguientes para amplificar el gen de la alanina racemasa de *G. stearothermophilus*: 5'-atggacgagtttcaccgca-3' (SEC ID nº 25) y 5'-ttatgcatcgctcatccgc-3' (SEC ID nº 26). Se ligó el producto de PCR a pCR-Blunt-TOPO utilizando el kit de clonación de PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se confirmaron los clones correctos mediante secuenciación (Agencourt, Beverly, MA). Se utilizó el clon correcto como molde en una posterior reacción de PCR.

Se utilizaron los cebadores siguientes para amplificar la alanina racemasa: 5'-ataataggatcctcatccggccaacggcg-3' (SEC ID nº 27) y 5'-gggaaggtaccgaggaataataatggacgagtttcaccgca-3' (SEC ID nº 28). El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción KpnI y BamHI. Estas enzimas cortan en sitios que han sido introducidos en los cebadores. El producto de PCR digerido se purificó en gel y se ligó a pTrc99a que había sido digerido con KpnI y BamHI y posteriormente se purificó en gel. La ligación se transformó en células químicamente competentes TOP10F' y se sembró en placas con LB complementado con 50 µg/ml de canamicina. Se cribaron los aislados para inserciones y se confirmó que varios aislados con una inserción presentaban la secuencia correcta (SEC ID nº 40) mediante análisis de secuencias (Agencourt, Beverly, MA).

El constructo de pTrc99a/alanina racemasa se sometió a mutagénesis dirigida a sitio ("MDS") utilizando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios Quick-Change de Stratagene (La Jolla, CA). Los cebadores mutágenos eran los siguientes:

- 5 5'-gccggacgacacgcacattnnkcggtcgtgaaggcgaacgcc-3' (SEC ID nº 29),
 5'-gtgaaggcgaacgcctatggannkgggatgtgcaggtggcaagg-3' (SEC ID nº 30),
 5'-cctcccgctgcggttgccnkttgatgaggcgtcgtttaa-3' (SEC ID nº 31),
 5'-caaccaggcgaaaagggtgagcnnkgtgacgtacactgacgag-3' (SEC ID nº 32),
 5'-gatcgggacgattccgatcggcnnkcggtgctccgccc-3' (SEC ID nº 33),
 10 5'-gccattggaaacgatcaacnknkaagtccttgacgatcag-3' (SEC ID nº 34)
 (n=cualquier nucleótido y k=g o t).

Los residuos para la mutagénesis se seleccionaron mediante análisis de la estructura cristalina existente de la alanina racemasa de *G. stearothermophilus*. Se seleccionaron los residuos aminoácidos grandes situados entre 5 y 10 Å del sitio activo.

Se utilizó la totalidad de los seis cebadores en la reacción de MDS siguiendo las instrucciones en el protocolo del fabricante. La reacción de MDS se transformó en XL-10 Gold siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción de transformación se sembró en una placa con medio LB complementado con 100 µg/ml de ampicilina. Se añadió caldo LB a las placas y se rasparon las colonias de las placas. Las células resuspendidas se dejaron crecer a 37°C durante varias horas y se realizó una minipreparación de los plásmidos utilizando el kit miniprep QIAquick. La biblioteca mutagenizada resultante a continuación se utilizó para transformar el auxótrofo para triptófano CAG18455. La transformación se sembró en una placa con medio mínimo M9 que había sido complementado con glucosa, elementos traza, vitaminas, 100 µg/ml de ampicilina, IPTG 100 µM y D-triptófano 3 mM. Tras varios días de incubación a 37°C, crecieron las colonias. Estas colonias se sembraron en LB (100 µg/ml de ampicilina). Se aislaron los plásmidos a partir de dichos aislados y se retransformaron en CAG18455. Las células retransformadas se sembraron en LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina. Tras formarse las colonias aisladas, se sembraron en medio M9 D-triptófano tal como se ha indicado anteriormente. Aparentemente todas las colonias volvieron a crecer, indicando que el crecimiento se debía a la versión mutagenizada de la racemasa. No se observó crecimiento de las células de control.

Se sometieron a ensayo algunos de los aislados para actividad *in vitro*. Las células se cultivaron hasta una DO600 de aproximadamente 0,6 y se indujeron con IPTG 100 µM. Las células se incubaron a 37°C durante dos horas adicionales y se recolectaron mediante centrifugación. Los sedimentos celulares se almacenaron a -80°C hasta la utilización al día siguiente. Los sedimentos celulares se descongelaron sobre hielo. Se rompieron las células con reactivo de lisis celular BugBuster (sin aminos primarias) y benzoasa (Novagen). Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación (~10.000 x g durante 30 minutos a 4°C). Se reservó el sobrenadante como el extracto celular en bruto.

El tampón de ensayo contenía fosfato potásico 50 mM (pH 8,0), piridoxal fosfato 10 µM, β-mercaptoetanol al 0,1% y D- o L-triptófano 50 mM. Se añadieron 200 µl de extracto por cada ml de ensayo. Las muestras se congelaron, momento que representa el punto temporal 0, con puntos temporales en 30 minutos y durante la noche. Se centrifugaron las muestras, se filtraron y se transfirieron a SRC para el análisis.

Tabla 9: resultados del ensayo a partir de L-triptófano

Tiempo (minutos)	L-triptófano (ppm)	D-triptófano (ppm)
0	1.240	3,6
30	1.193	24,5
Durante la noche	1.192	583,2

Tabla 10: resultados del ensayo a partir de D-triptófano

Tiempo (minutos)	L-triptófano (ppm)	D-triptófano (ppm)
0	0,5	7.506
30	0,5	7.519
Durante la noche	14,9	7.463

Se determinó la secuencia de ADN del gen de racemasa en dicho aislado (SEC ID nº 42) y se encontró que el aislado presentaba tres mutaciones. Las mutaciones en el aislado de proteína correspondiente eran las siguientes: M35C, F66E e Y354A (SEC ID nº 43). Se encontró una mutación adicional (P197L) en dicho mutante. Ésta es una mutación espontánea y no era parte de la mutagénesis dirigida a sitio.

Se clonó la racemasa mutagenizada en pET30 para la expresión y la purificación. Se utilizaron los cebadores siguientes para amplificar por PCR el gen de racemasa a partir del constructo pTrc99a: 5'-

gggaaaggtaccgaggaataataaatggcagagtttcaccgcg-3' (SEC ID nº 35) y 5'-gcgccgcatggcagagtttcaccgcg-3' (SEC ID nº 36). El producto de PCR se digirió con NcoI y BamHI, se purificó en gel y se ligó en pET30 que había sido digerido con NcoI y BamHI y posteriormente purificado en gel. La ligación se transformó en células químicamente competentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los aislados de la transformación se cribaron para inserciones. Los plásmidos con una inserción se sometieron a secuenciación (Agencourt, Beverly, MA). Los aislados con la secuencia correcta se transformaron en BL21 λDE3 o BL21 λDE3 pLysS para la expresión y purificación. El nuevo constructo se denominó pET30Trp racemasa.

(6) Purificación de la triptófano racemasa

Un cultivo de durante la noche con el constructo de pET30Trp racemasa se subcultivó en medio LB fresco con los antibióticos adecuados (50 µg/ml de canamicina y 20 µg/ml de cloranfenicol) y se cultivó hasta una DO_{600} -0,6 (a 37°C bajo aireación). Se indujo la expresión con IPTG 100 µM y se continuó la incubación a 37°C bajo aireación durante 2 horas. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se almacenaron a -80°C hasta la utilización. El sedimento celular se descongeló sobre hielo y las células se lisaron utilizando el reactivo de lisis celular sin aminos primarios BugBuster y la nucleasa benzoasa (Novagen, Madison, WI). Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación y el sobrenadante se utilizó como el extracto de proteínas en bruto. El extracto de proteínas en bruto se filtró utilizando un filtro de jeringa de 0,45 µm y se aplicó a una columna HisBind (Novagen, Madison, WI) que había sido preequilibrada siguiendo las instrucciones del fabricante. Se lavó la columna y la proteína se eluyó tal como indicaba el protocolo del fabricante. La proteína purificada se desaló con una columna PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) utilizando fosfato potásico 50 mM, pH 8,0, piridoxal-5'-fosfato 10 µM ("PLP") como el eluyente. La proteína desalada se concentró utilizando concentradores centrifugos Amicon (Millipore, Billerica, MA). La alanina racemasa de tipo salvaje se purificó tal como se ha indicado anteriormente.

(7) Ensayo de la triptófano racemasa

La racemasa purificada se sometió a ensayo en varios ensayos. En un ensayo, se utilizó como sistema de detección la producción de peróxido de hidrógeno por una D-aminoácido oxidasa. El sustrato D-triptófano para la oxidasa se produjo a partir de L-triptófano mediante el enzima racemasa aislado tal como se indica en el presente Ejemplo. El ensayo incluía 0, 1, 10, 25, 50, 100 y 200 µg de enzima en cada ensayo, fosfato potásico 50 mM, pH 8,0, PLP 10 µM y L-triptófano 50 mM. Los ensayos se incubaron durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, se añadieron 100 mg/ml de D-aminoácido oxidasa (AOD-101 BioCatalytics, Pasadena, CA) y FAD 0,5 mM a la mezcla de reacción. Se midió la generación de peróxido de hidrógeno utilizando el kit de reactivos Amplex Red (Molecular Probes, Eugene, OR) y un fluorímetro lector HTS 7000 Plus BioAssay de Perkin Elmer (Wellesley, MA). Se resumen los datos de ensayo en las Tablas 11 y 12, a continuación.

Tabla 11: curva estándar

Concentración de H ₂ O ₂ (µM)	Lectura del fluorímetro
0	485
1	8.691
2	16.958
3	24.719
4	31.692
5	38.083

Tabla 12: resultados del ensayo

Concentración de proteína (µg/ensayo)	Racemasa de tipo salvaje (lectura de fluorímetro)	Racemasa mutante (Trp) (lectura de fluorímetro)
0	5.226	5.192
1	4.272	6.215
10	4.149	10.543
25	4.239	21.177
50	3.141	30.465
100	3.160	39.068
200	2.370	35.163

Los resultados del ensayo indican que la racemasa mutante resulta necesaria para la producción de peróxido de hidrógeno. La cantidad de peróxido de hidrógeno producida se incrementa al incrementarse la cantidad de racemasa mutante añadida.

Se analizó la actividad de la racemasa (de tipo salvaje y mutante) sobre la alanina. El tampón de reacción contenía: fosfato potásico 100 mM, pH 8,0, PLP 10 µM, L-alanina 50 mM, 12 µg/ml de racemasa de tipo salvaje o 94 µg/ml de racemasa mutante. Las reacciones se detuvieron con 1 volumen de ácido fórmico 0,5 M y se analizaron mediante

CL/EM/EM utilizando una columna Chirobiotic tal como se indica en el Ejemplo 1.

Los datos de ensayo se resumen en la Tabla 13, a continuación.

5 Tabla 13

Tiempo (minutos)	Racemasa de tipo salvaje (ppm de D-alanina producidos)	Racemasa mutante (ppm de D-alanina producidos)
0	65	87
5	334	2.430
10	1.161	3.257
20	1.670	4.003
30	3.075	4.621
40	3.177	4.931
60	3.986	5.328

La racemasa mutante aparentemente conservaba la actividad sobre el sustrato original, la alanina.

- 10 Se sometió a ensayo la actividad de la racemasa mutada utilizando uno de entre L-triptófano, D-triptófano, L-alanina y D-alanina como sustrato. El tampón de reacción contenía: fosfato potásico 100 mM, pH 8,0, PLP 10 µM, sustrato 50 mM, 94 µg/ml de racemasa mutante. Las reacciones se detuvieron con 1 volumen de ácido fórmico 0,5 M y se analizaron tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Los ensayos con alanina como sustrato se incubaron a temperatura ambiente (~22°C) y los ensayos con triptófano como sustrato se incubaron a 37°C. Se resumen los resultados en la Tabla 14, a continuación.
- 15

Tabla 14

Tiempo (minutos)	Ppm de D-trp producidos a partir de L-trp	Ppm de L-trp producidos a partir de D-trp	Ppm de D-ala producidos a partir de L-ala	Ppm de L-ala producidos a partir de D-ala
0	No detectado	0,8	420,5	565,9
5	No detectado	1	1.268	1.874
10	No detectado	1,4	1.448	1.968
20	No detectado	2,2	1.590	1.505
30	0,3	2,8	1.840	1.923
40	3,1	2,8	1.779	1.960
60	9	3,7	1.295	1.070
1.080	57,4	66,7	1.611	2.932

- 20 El enzima racemasa funcionaba en ambas direcciones y conservaba la actividad de tipo salvaje.

Se sometió a ensayo la racemasa mutante sobre varios sustratos. El enzima utilizado en el ensayo se purificó tal como se ha comentado anteriormente. Las condiciones de ensayo eran las siguientes: fosfato potásico 50 mM, pH 8,0, PLP 10 µM, sustrato 25 mM, 40 µg/ml de racemasa mutante. Las reacciones se detuvieron con 1 volumen de ácido fórmico 2 M y se analizaron tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Los ensayos se incubaron a 37°C. Los resultados (en ppm de isómero D producido a partir del isómero L) se resumen en la Tabla 15, a continuación (nd=no detectado).

25

Tabla 15

30

Tiempo (minutos)	Lys	Ala	Glu	Met	Tyr	Leu	Trp	Phe
0	12	156	86	104	nd	nd	nd	nd
3	2310	2180	607	1200	nd	37	nd	nd
5	2450	1310	1110	1290	nd	80	nd	14
10	6630	2850	1950	2260	11	139	nd	14
20	9550	1970	4660	2090	30	280	nd	47
30	15500	2090	4860	1750	63	320	nd	22
60	10200	2540	4490	2150	136	710	nd	54
120	18000	2430	6340	1940	224	1050	nd	188
240	13200	1830	6560	1990	515	1170	15	490

Es probable que dicha racemasa racemizará otros aminoácidos además de los sometidos a ensayo en la presente memoria.

Aunque la racemasa mutada aparentemente presenta actividad sobre una amplia diversidad de aminoácidos, aparentemente no existe actividad de racemasa sobre la monatina. El enzima utilizado en el ensayo se purificó tal como se ha comentado anteriormente. Las condiciones de ensayo fueron las siguientes: fosfato potásico 100 mM, pH 8,0, PLP 10 μ M, monatina 50 mM y 1 mg/ml de racemasa mutante. Los ensayos se incubaron a 37°C. Los ensayos se analizaron mediante derivatización con FDAA tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados del ensayo en la Tabla 16, a continuación.

Tabla 16

Tiempo (horas)	Sustrato de partida S,S-monatina	Sustrato de partida R,R-monatina
0	100% de S,S	100% de R,R
1	100% de S,S	100% de R,R
18	100% de S,S	100% de R,R

Incluso tras 18 horas no se produjo ninguna conversión aparente de S,S-monatina en S,R-monatina o de R,R-monatina en R,S-monatina utilizando la racemasa mutante.

El enzima ideal presenta actividad sobre el triptófano, pero poca o ninguna actividad sobre otros aminoácidos o compuestos de tipo aminoácido, en particular la monatina. En el caso de que el enzima presente actividad significativa sobre la monatina, el enzima puede mutagenizarse para reducir la actividad sobre la monatina y/o el glutamato, manteniendo la actividad sobre el triptófano sin modificaciones o a un nivel suficientemente elevado para que el enzima resulte útil en la producción de monatina. Entre las técnicas que pueden utilizarse para la mutagénesis se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la PCR con tendencia a errores, la mutagénesis dirigida a sitio, el modelaje para identificar dianas para la mutagénesis dirigida a sitio (sitios que podrían participar en la unión al sustrato), pase a través de cepas mutagénicas y la reorganización del ADN.

(8) Producción de monatina por la triptófano racemasa

Se añadió lo siguiente por cada 1 ml de mezcla de reacción: aproximadamente 50 μ g de aldolasa de SEC ID nº 22, 16 mg/ml de triptófano racemasa purificada, $MgCl_2$ 4 mM, L-triptófano 50 mM, 0,5 mg de D-aminotransferasa (purificada a partir de *Bacillus sphaericus*, tal como se indica en el Ejemplo 14), piruvato sódico 100 mM; tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, y PLP 0,05 mM. Debido a que el piruvato es un aceptor de aminos aceptable para la D-aminotransferasa de amplia especificidad, no se utilizó α -cetoglutarato. Se incluyó un control en el que el D-triptófano era el sustrato de partida y no se incluía ninguna racemasa. Las muestras se incubaron durante 2 horas o durante la noche (20 horas) a 30°C bajo agitación suave. Las muestras se analizaron tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados del ensayo en la Tabla 17 a continuación (nd=no detectado).

Tabla 17

Tiempo (horas)	Sustrato de partida	ppm de monatina total	% de RR/SS RPLC	% de RS/SR RPLC	% de RR FDAA	% de SR FDAA
2	L-trp	Nd	0	0		
18	L-trp	7,4	100	0	96,5	3,5
2	D-trp	12	99,17	0,83		
18	D-trp	170	98,65	1,35	97,5	2,5

La Tabla 17 muestra la producción de R,R-monatina utilizando una triptófano racemasa para convertir el sustrato L-triptófano en D-triptófano. La producción de R,R-monatina a partir de D-triptófano, sin utilizar la triptófano racemasa, se utilizó como control. El porcentaje de R,R-monatina producida es prácticamente el mismo con L- o D-triptófano como material de partida. Este resultado indica que la racemasa no presenta actividad detectable en la catálisis de la racemización de la R,R-monatina.

(9) Aislamiento de los cambios de aminoácidos clave

Se crearon varios revertientes de la alanina racemasa mutagenizada. Los revertientes se prepararon mediante mutagénesis dirigida a sitio utilizando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA) tal como se ha indicado anteriormente, utilizando los cebadores siguientes:

5'-gccatttgaaacgatcaactatgaagtccttgacgatcag-3' (SEC ID nº 37)
 5'-ctcccgcctggcgggtgctcttggatgagggcctcgcttaag-3' (SEC ID nº 38)
 5'gccggacgacacgcattatggcggctggaaggcgaacgcc-3' (SEC ID nº 39)

Los cebadores se utilizaron individualmente y en combinación, en un intento de generar las seis posibles combinaciones de las tres mutaciones en las posiciones 35, 66 y 354 (numeración basada en la secuencia de

aminoácidos derivada de ATCC nº 12980). Se crearon varias combinaciones de las mutaciones y se sometieron a ensayo para la actividad de triptófano racemasa. Las condiciones de ensayo eran las siguientes: fosfato potásico 50 mM, pH 8,0, PLP 10 µM, L-triptófano 30 mM, 100 µg/ml de enzima. Los ensayos se incubaron a 37°C durante el periodo de tiempo especificado. Las muestras se analizaron tal como se ha indicado en el Ejemplo 1.

5

Se resumen los resultados de los ensayos en la Tabla 18 a continuación (nd=no detectado).

Tabla 18

Tiempo (minutos)	MF1	MF2	MY1	Racemasa mutada
0	nd	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd
10	nd	nd	nd	nd
20	nd	nd	nd	nd
30	nd	nd	nd	nd
40	nd	nd	nd	nd
60	9,8	nd	nd	12,5
1.080	54,8	90,8	nd	92,4

10

Lista de mutaciones:

MF1: N41S (mutación espontánea), P197L, Y354A

MF2: F66E, P197L, Y354A

15

MY1: M35C, F66E, P197L

Racemasa mutagenizada: M35C, F66E, P197L, Y354A

Los resultados indican que la mutación Y354A resulta necesaria para la actividad sobre el triptófano. En el caso de que esta mutación se encuentre ausente, no había actividad detectable sobre el triptófano.

20

Una alanina racemasa puede convertirse adicionalmente en una racemasa de especificidad más amplia mediante métodos aleatorios tales como la PCR mutagénica, el pase a través de cepas mutagénicas u otros métodos conocidos de la técnica. Una evolución más enfocada de la alanina racemasa puede centrarse en residuos del sitio activo, incluyendo Lys129, Met134 y los residuos entre Gly283 y Trp288, ambos inclusive (numeración de *Geobacillus stearothermophilus*).

25

Ejemplo 5

Método de selección para el cribado de piruvato aldolasas en *E. coli* recombinante

30

Muchas de las proteasas indicadas en los Ejemplos 4(5), 9 y 10(3), y mostradas en las figuras 1 a 9, funcionarán óptimamente con una aldolasa que produzca preferentemente R-PM a partir de indol-3-piruvato y piruvato. Por lo tanto, se describen métodos para aislar y someter a ensayo clones que contienen ácidos nucleicos codificantes de una aldolasa que produce preferentemente R-PM. Han sido descritas anteriormente cepas de *Escherichia coli* que requieren complementación de piruvato al cultivarlas en medio mínimo M9 con ribosa como fuente de carbono. Ponce E. et al., "Cloning of the two pyruvate kinase isoenzymes structural genes from *Escherichia coli*. The relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis", J. Bacteriol. 177:5719-5722, 1995. El genotipo relevante de la cepa es: $\Delta pykA \Delta pykF$. La doble inactivación se generó mediante el método de Datsenko y Wanner, Proceed. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645, 2000. Estas cepas pueden formar la base para un cribado de aldolasa generador de piruvato y para el cribado para aldolasas que son más activas sobre un estereoisómero específico de la monatina, un estereoisómero particular de precursor de monatina, o un análogo de la monatina o un precursor de la monatina. Un análogo de precursor de la monatina incluye compuestos que han sido identificados como sustratos para las ProA aldolasas o las KHG aldolasas, tales como 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato, 4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadipato, 4-hidroxi-4-metil-2-oxoadipato u otros compuestos ricos en carboxilos que se convierten en piruvato en una reacción de aldol. Un ejemplo de un análogo de monatina que puede utilizarse es el ácido 4-hidroxi-4-metilglutámico, que puede ser fácilmente transaminado a 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato (un sustrato de ProA) por aminotransferasas nativas en una célula de ensayo.

45

Clonación

50

Se utilizaron los cebadores siguientes para generar la inactivación de *pykA*:

5'-ATGTCCAGAAGGCTTCGCAGAACAAAAATCGTTACCACGTTAGGTGTA
GGCTGGAGCTGCTTC-3' (SEC ID nº 3) y

5'-CTCTACCGTTAAAATACGCGTGGTATTAGTAGAACCCACGGTACCATA
TGAATATCCTCCTTAG-3' (SEC ID nº 4).

Se utilizaron los cebadores siguientes para generar la inactivación de *pykF*:

5'-AGGACGTGAACAGATGCGGTGTTAGTAGTGCCGCTCGGTACCAGCATA
TGAATATCCTCCTTAG-3' (SEC ID nº 5) y

5'-ATGAAAAAGACCAAAATTGTTTGCACCATCGGACCGAAAACCGGTGTA
GGCTGGAGCTGCTTC-3' (SEC ID nº 6).

Se llevó a cabo una reacción de PCR con pKD3 o pKD4 como molde utilizando protocolos estándares. Se electroporó el producto de PCR en una cepa de *E. coli* que expresa el sistema de recombinación homóloga lambda rojo. El producto de PCR presentaba homología con *pykA* o *pykF* y se recombinaba en el cromosoma en esos sitios. Al producirse un doble entrecruzamiento, la progenie resultante portaba un gen *pykA* o *pykF* deleciónado y un marcador de resistencia antibiótica. Los genes deleciónados con los marcadores de resistencia antibiótica se transdujeron en una cepa de *E. coli* (MG1655) utilizando técnicas de transducción de P1 estándares.

Análisis de cepas

Se sometió a ensayo la doble inactivación para crecimiento en medio mínimo (sales M9) (Difco) complementadas con solución de vitaminas de Balch, solución de elementos traza modificada de Balch (Balch W.E. et al., "Methanogens: reevaluation of a unique biological group", Microbiol. Rev. 43:260-296, 1979) y D-ribosa al 0,4%. No se observó crecimiento del doble mutante a menos que también se incluyese piruvato 5 mM en el medio. MG1655 de tipo salvaje creció en el medio anteriormente indicado, tanto en presencia como en ausencia de piruvato. SE sometió a ensayo la doble inactivación para crecimiento en el medio mínimo indicado anteriormente complementado con glucosa al 0,4% y no con ribosa. El crecimiento en dicho medio fue similar al observado con la cepa de tipo salvaje. Con dicho medio, puede generarse piruvato a partir de glucosa mediante el producto del gen *ptsI* (el enzima del sistema fosfotransferasa que produce piruvato a partir de fosfoenolpiruvato y transfiere el fosfato a la glucosa). La cepa de doble inactivación también se sometió a ensayo para el crecimiento utilizando el medio indicado anteriormente, complementado con L-arabinosa al 0,4% o D-xilosa al 0,4% y no con ribosa. No se generó piruvato a partir del crecimiento sobre dichos sustratos que contienen 5 carbonos (no PTS). La doble inactivación no creció bajo dichas condiciones a menos que se complementase con piruvato 5 mM, mientras que la cepa de tipo salvaje crecía normalmente tanto en presencia como en ausencia de piruvato.

El gen *proA* aldolasa de *Comamonas testosteroni* indicada en el Ejemplo 2 del documento nº WO 03/091396 A2 (clonado en pET30 Xa/LIC) y el operón génico *aspC/proA* indicado en el Ejemplo 3 del documento nº WO 03/091396 A2 (clonado en pET30 Xa/LIC y pET32) se subclonaron en pBAD-TOPO utilizando el kit de expresión pBAD TOPO TA (Invitrogen).

La expresión del gen o genes en estos constructos se encuentra regulada por el promotor inducible *araBAD*. En presencia de arabinosa (por ejemplo al 0,4%) e IPTG, se expresa el gen o genes. A menos que se complemente con piruvato o una fuente de piruvato, la cepa no crecerá sobre medio mínimo. El medio puede complementarse con monatina, precursor de monatina o un análogo de monatina o precursor de monatina. Los rangos típicos de sustrato utilizados en la literatura son de 0,5 a 5 mM. La *proA* aldolasa puede, por ejemplo, convertir el precursor de monatina en piruvato e indol-3-piruvato, proporcionando a la cepa una fuente de piruvato y permitiendo el crecimiento sobre medio mínimo con arabinosa al 0,4%. El constructo que expresa los dos genes *proA* y *AspC* puede convertir la monatina en el precursor de monatina y el precursor de monatina en piruvato e indol-3-piruvato. Además, la aminotransferasa puede convertir el indol-3-piruvato en L-triptófano y complementar una auxotrofia de triptófano. Este sistema se utiliza para cribar para aldolasas y para cribar para aldolasas que son más activas sobre un estereoisómero específico de la monatina, un estereoisómero específico de precursor de monatina o un análogo de monatina o precursor de monatina. Por ejemplo, en el caso de que se lleve a cabo evolución dirigida de cualquiera de las aldolasas dadas a conocer en el Ejemplo 2 del documento nº WO 03/091396 A2, se utiliza un ensayo de palca que utiliza medios que contienen precursor de monatina R o S para comparar la enantioespecificidad del enzima mutante resultante. En el caso de que se produzca crecimiento sobre las placas que contienen precursor de R-monatina y se produzca poco o ningún crecimiento sobre la placa que contiene precursor de S-monatina, la aldolasa presenta especificidad para sustratos que contienen la quiralidad R en el sitio de reacción.

Se prepararon placas con medio mínimo M9 que contenía 1x solución de vitaminas de Balch y solución de elementos traza modificada de Balch. Balch W.E. et al., "Methanogens: reevaluation of a unique biological group", Microbiol. Rev. 43:260-296, 1979. Se incluyó glucosa o arabinosa como la fuente de carbonos (al 0,4% p/v) y las placas se complementaron con monatina 5 mM (mezcla racémica R,R:S,S) que había sido disuelta en tampón de fosfato potásico 20 mM (pH 8,0) o un volumen igual de tampón de fosfato potásico sin monatina. Se resume el

crecimiento en la Tabla 20, a continuación.

Tabla 20

	Glucosa	Glucosa monatina	Arabinosa	Arabinosa monatina
MG1655	++++	++++	++++	++++
MG1655 $\Delta pykA \Delta pykF$	++++	++++	+	+
MG1655 $\Delta pykA \Delta pykF + AspC_{proA/pBAD-TOPO}$	++++	++++	+	++

5

Se espera que el cribado pueda optimizarse mediante el control de los niveles de ProA y AspC, incrementando la incorporación de monatina, utilizando el precursor de monatina en lugar de monatina (en este caso no se requeriría la presencia de la aminotransferasa) o utilizando un análogo menos hidrofóbico de la monatina, tal como los indicados anteriormente. Entre los métodos para incrementar la incorporación de monatina se incluyen la adición de mezclas de aminoácidos, la adición de aminoácidos específicos y la utilización de detergentes, antibióticos, análogos de antibióticos o enzimas que ayuden a permeabilizar la pared celular y la adición de una pequeña cantidad de piruvato para permitir el crecimiento en el caso de que la aldolasa no pueda proporcionar suficiente piruvato para permitir el crecimiento. Se ha descrito el nonapéptido polimixina B (Dixon y Chopra, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 29:781-788, 1986) y la microcistina RR (Dixon et al., FEMS Microbiology Letters 230:167-170, 2004) como agentes que permeabilizan la membrana externa de *E. coli*.

10

15

Se espera que puedan utilizarse otros sistemas/plásmidos en dicho sistema de cribado con resultados equivalentes. Entre los ejemplos se incluyen sistemas de promotores de T7 y promotores inducibles con IPTG tales como *tac* y *lac*.

20

Los genes *aspC* y *proA* se clonaron en el vector de expresión pTrc99a (Amersham, Piscataway, NJ). El vector resultante se transformó en los auxótrofos para triptófano CAG18455 o CAG18579 (ver el Ejemplo 4 para las descripciones de las cepas). Los transformantes se sembraron en una placa sobre medio mínimo M9 con IPTG 0,1 mM y monatina 5 mM. Tras 3 días a 37°C, las cepas con los plásmidos de operón formaron colonias, mientras que las cepas parentales aparentemente no crecieron. Además, el crecimiento era dependiente de la presencia de IPTG, indicando que la expresión del operón era necesaria para el crecimiento. En el presente estudio de complementación, el operón *aspC/proA* formó PM a partir de monatina e indol-3-piruvato a partir de PM. El indol-3-piruvato seguidamente pudo convertirse en L-triptófano, permitiendo que los auxótrofos para el triptófano pudiesen crecer sobre medio mínimo M9.

25

30

Varios organismos potenciales pueden presentar la aldolasa específica de R y pueden someterse a ensayo tal como se ha indicado anteriormente. La presencia de R,R-monatina ha sido detectada en sobrenadantes de cultivo de *Corynebacterium glutamicum*. Lo anterior sugiere la presencia de un enzima que es capaz de generar el precursor de la R-monatina. Además, se ha detectado la presencia de múltiples isómeros de la monatina en extractos sin células de *Sinorhizobium meliloti* utilizando la cromatografía de fase inversa, indicando nuevamente la posible presencia de una aldolasa o aminotransferasa capaz de producir un estereoisómero R de precursor de la monatina.

35

Pseudomonas straminea (*Pseudomonas ochraceae* NGJ1), *Sinorhizobium meliloti*, *Sphingomonas* sp. LB126, *Arthrobacter keyseri* 12B, *Yersinia pestis* cepa CO92, *Bradyrhizobium japonicum* str. USDA 110, *Sphingomonas* (*Pseudomonas*) *paucimobilis*, *Yersinia pestis* KIM, *Ralstonia metallidurans* CH34, *Yersinia pseudotuberculosis* IP 32953, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* rhiz23g02-p1k_1009_341 (Sanger Institute), *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444, *Pseudomonas putida* KT2440, *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, *Xanthomonas campestris* ATCC-33913, *Xanthomonas axonopodis* citri 306 y *Streptomyces avermitilis* MA-4680 presentan homólogos que han sido identificados mediante análisis BLAST utilizando *proA* (*Comamonas testosteroni*) como el molde. Ver la solicitud de patente US nº 2005/0282260. Estos organismos pueden ser utilizados como fuente de ADN y someterse a ensayo en el cribado indicado anteriormente.

40

45

Los organismos capaces de crecer sobre ácido gálico, ácido siríngico, protocatecuato, ftalato, parahidroxibenzoato y fluoreno podrían presentar una aldolasa que puede producir monatina y presentan el potencial para el cribado indicado anteriormente. Los organismos siguientes metabolizan el protocatecuato mediante la ruta de la 4,5-dioxigenasa y pueden presentar una aldolasa que puede resultar útil: *Bordetella bronchiseptica* RB50, *Bordetella parapertussis* 12822, *Klebsiella pneumoniae* MGH78578, *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, *Sphingomonas aromaticivorans* F199, *Xanthomonas axonopodis* citri 3096 y *Xanthomonas campestris* ATCC nº 33913.

50

55

Además, los organismos siguientes degradan el protocatecuato mediante la ruta de la 3,4-dioxigenasa y presentan una aldolasa que puede resultar útil: *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1, *Acinetobacter* especie ATCC nº 33305, ADP1, *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Azotobacter vinelandii* AvOP, *Bradyrhizobium japonicum* str. USDA 110, *Bradyrhizobium japonicum* tr. USDA 438, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* 16M, *Brucella melitensis suis* 1330, *Brukhoderia cepacia* J2315, *Brukhoderia fungorum* LB400, *Brukhoderia pseudomallei* K96243, *Corynebacterium*

60

5 efficiens YS-314, *Corynebacterium glutamicum* ATCC-13032, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* str. k10, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, *Pseudomonas fluorescens* SBW25, *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* str. DC3000, *Ralstonia solanacearum*, *Rhodococcus* sp. cepa I24 (IG-15), *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Streptomyces avermitilis* MA-4680, *Streptomyces coelicolor* A3 (2), *Xanthomonas axonopodis* citri 306, *Xanthomonas campestris* ATCC-33913.

Ejemplo 6

10 Mutagénesis dirigida a sitio de HEXaspC

Descripción general experimental

15 Se encontró que un hexamutante de *E. coli* AspC (HEXaspC) presentaba mejor actividad que AspC en la producción de la S,S-monatina, tal como se indica en el Ejemplo 6 del documento n° WO 03/091396 A2. HEX (número de acceso: /AHFA gi:127190) contiene las mutaciones siguientes de AspC (numeración en *E. coli*) V35L, K37Y, T43I, N64L, T104S y N285S. Basándose en el análisis estructural y publicaciones en la literatura (Rothman S. y Kirsch J., J. Mol. Biol. 327:593-608, 2003; Rothman S. et al., Protein Science 13:763-772, 2004), se crearon 5 mutantes adicionales que se esperaba que incrementasen la actividad cinética hacia sustratos utilizados en la ruta de producción de monatina: L-triptófano, S-PM o ambos. Dos de los mutantes incrementaron las velocidades de transaminación para tanto el L-triptófano como la S,S-monatina. Dos de los mutantes mostraron una estereoselectividad incrementada para la formación de S,S-monatina, mientras que uno era menos estereoselectivo. Basándose en lo anterior, se espera que una D-aminotransferasa de amplia especificidad de *Bacillus* sp. con mutaciones similares resultaría útil como la D-aminotransferasa en las rutas de la R,R-monatina mostradas en la figura 3 y descritas en el Ejemplo 4(4). Uno de los mutantes (HEXaspCP9T/R122G) presentaba una actividad incrementada para la transaminación del L-triptófano, pero la actividad de producción de S,S-monatina o la transaminación de la S,S-monatina se redujeron significativamente. De esta manera, se espera que dicho enzima resulte útil en la primera etapa de producción de R,R-monatina mostradas en las figuras 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8 y descritas en los Ejemplos 9 y 10(3). En general, una aminotransferasa que presente una actividad similar a la de AspC sobre el L-triptófano y una actividad limitada sobre R-PM y S-PM, resultaría útil para los procedimientos ilustrados en las figuras 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8.

Métodos y materiales

35 El gen HEX clonado en pUC19 fue proporcionado por el Profesor J.F. Kirsch (Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, Berkeley, CA 94720-3206) y utilizado como molde para la clonación del gen en pET23a. Ver Onuffer J.J. y Kirsch J.F., "Redesign of the substrate specificity of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase by homology modeling and site-directed mutagenesis", Protein Science 4:1750-1757, 1995. Ver también NCBI n° de acceso 1AHF_A GI:127190 (secuencia de aminoácidos de HEX). Se diseñaron los cebadores siguientes para la clonación del gen *HEX* en el vector pET23a (Novagen, Madison, WI):

cebadores *HEXaspC*:

45 extremo N-terminal: 5'-GCGGAACATATGTTTGAGAACATTACCGCC-3' (SEC ID n° 7),
extremo C-terminal: 5'-ATAACCGGATCCTTACAGCACTGCCACAATCG-3' (SEC ID n° 8).

50 Se utilizó el protocolo de PCR siguiente para la amplificación génica: en una reacción de 100 µl, se añadieron 50 ng de ADN molde, 1,0 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1 U de polimerasa *Pfu* Turbo (Stratagene, La Jolla, CA) y 1X tampón *Pfu* clonado. El programa del termociclador utilizó un inicio en caliente a 94°C durante 5 minutos, seguido de 25 ciclos de una etapa de desnaturalización a 94°C (30 s), una etapa de hibridación a 55°C (1 min.), una etapa de extensión a 72°C (2 min.) y finalmente una etapa de finalización a 72°C (7 min.). El producto de PCR purificado se digirió con los enzimas de restricción BamHI y NdeI (New England Biolabs). El producto de PCR se ligó en pET23a que también había sido digerido con NdeI y BamHI, utilizando el kit de ligación rápida de ADN de Roche. Las ligaciones desaladas se electroporaron en células de *E. coli* DH10B utilizando un sistema Bio-Rad Gene Pulser II siguiendo los protocolos del fabricante. Se preparó un miniprep del ADN utilizando un kit Miniprep Qiagen Spin y se utilizó como molde para las reacciones de mutagénesis. El plásmido se transformó en células *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo los protocolos del fabricante (Novagen).

60 Se cree que el residuo triptófano en la posición 130 resulta importante para las interacciones de apilamiento con el anillo piridoxilo aunque aparentemente también es una fuente de impedimento estérico con el sustrato precursor de S-monatina ("S-PM") basándose en las observaciones de modelaje de proteínas. Por lo tanto, se utilizó un aminoácido con una cadena lateral hidrofóbica más pequeña (fenilalanina) para sustituir al triptófano. El resto de las mutaciones se basó en los datos cinéticos en la literatura, aunque se crearon nuevas combinaciones de mutaciones deseables. Todas las mutaciones de HEXaspC, con la excepción de W130F, se realizaron utilizando el kit Stratagene Multi-Change siguiendo las instrucciones del fabricante. La mutación W130F se generó utilizando el kit Stratagene QuikChange siguiendo las instrucciones del fabricante, siendo la única excepción que la temperatura de

extensión para la reacción de PCR se redujo a 66°C. Los cebadores para el kit multi-modificación se diseñaron utilizando la herramienta de diseño de cebadores QuikChange multi-kit en <www.stratagene.com>, excepto para los cebadores de mutación única W130F.

5 Las secuencias de los cebadores se listan en la Tabla 21, a continuación:

Tabla 21

Cebador	Secuencia (5' a 3')
spCW130F_backward	CGCTCTTATGGTTCGGTTTGCTTGGGTTGCTCACCC (SEC ID nº 9)
aspCW130F_forward	GGGTGAGCAACCCAAGCTTCCGAACCATAAGAGCG (SEC ID nº 10)
R122G-1α	CAAAAAATACCAGCGTTAAGGGAGTGTGGGTGAGCAACC (SEC ID nº11)
P9T_4α	CATTACCGCCGCTACTGCCGACCCGATTC (SEC ID nº 12)
I68V-1 α	CACCAAAAATTACCTCGGCGTAGACGGCATCCCTGAATT (SEC ID nº 13)
T156Aα	TGATGCGGAAAATCACGCTCTTGACTTCGATGCAC (SEC ID nº 14)

^a indica un cebador que ha sido modificado mediante fosforilación 5'.

10

Expresión de genes mutantes HEXaspC y análisis de la actividad enzimática

Se inocularon cultivos líquidos (5 ml) de Novagen Overnight Express™ Autoinduction System 2 (nº de catálogo 71366-3, soluciones 1 a 6) a partir de placas nuevas o cultivos madre congelados en glicerol de las cepas siguientes:

15

- E. coli* BL21(DE3)::HEXaspCpET23a
- E. coli* BL21(DE3)::HEXaspCW130FpET23a
- E. coli* BL21(DE3)::HEXaspCT156ApET23a
- E. coli* BL21(DE3)::HEXaspCP9T/T156ApET23a
- E. coli* BL21(DE3)::HEXaspCP9T/R122GpET23a
- E. coli* BL21(DE3)::HEXaspCR122G/T156ApET23a

20

25

Los cultivos se incubaron a 37°C a 230 rpm durante 6 a 8 h. Se determinó la DO₆₀₀ de cada cultivo y se calculó el volumen de cultivo necesario para obtener una DO₆₀₀ de entre 0,03 y 0,05 en 25 ml. Los volúmenes calculados de cada cultivo líquido se transfirieron a matraces que contenían 25 ml del mismo medio. El sistema Overnight Express™ Autoinduction System 2 es un medio químicamente definido completo para la expresión a alto nivel con sistemas de expresión inducibles con IPTG que utiliza lactosa como el agente inductor y no requiere el seguimiento del crecimiento celular. Los cultivos Overnight Express se incubaron a 30°C bajo agitación a 230 rpm durante 18 h. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se lavaron una vez con MOPS 50 mM frío, pH 7,0. A continuación, las células se lisaron utilizando el reactivo de extracción BugBuster™ (sin aminas primarias) (Novagen nº de catálogo 70923-3) que contenía 1 µg/ml de nucleasa benzoasa (Novagen nº de catálogo 70746-3), 5 µl/ml de cóctel inhibidor de proteasas juego II (catálogo de Novagen nº 539132) y 0,33 µl/10 ml de r-lisozima (catálogo de Novagen nº 71110-3) siguiendo el protocolo recomendado por Novagen. Tras la incubación a 25°C durante 15 min. bajo agitación suave, los residuos celulares de cada suspensión se peletizaron mediante centrifugación a 21.000g durante 15 min. a 4°C. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se analizó como extracto libre de células. Se aislaron las fracciones de cuerpos de inclusión mediante la suspensión de las fracciones de residuos celulares en reactivo de extracción Bugbuster™ al 30% (sin aminas primarias), centrifugando a 21.000 x g durante 10 min.; suspensión de los sedimentos centrifugados en reactivo de extracción Bugbuster™ al 10% (sin aminas primarias) y nueva centrifugación para aislar los sedimentos lavados.

30

35

40

45

Los extractos sin células y las fracciones de cuerpos de inclusión se analizaron para la expresión de proteínas mediante SDSPAGE en geles de gradiente 4-15% (Bio-Rad nº 161-1104). Para las muestras de extracto celular, se cargaron veinte microgramos de proteína soluble en cada carril de gel (premezclado con 1X tampón de carga de proteínas y se calentó a 95°C durante 5 min.). Las fracciones de cuerpos de inclusión se disolvieron en 1X tampón de carga de proteínas (0,2 ml), se calentó durante 10 min. a 95°C y se cargaron 5 µl de cada solución en cada carril del gel. Se calculó la cantidad de cada mutante de HEX en comparación con la cantidad total de proteínas solubles cargadas en cada carril mediante el análisis de la intensidad de la banda utilizando la herramienta del gel Labworks Biolmaging 1D (UVP, Inc. Upland, CA) y se proporciona en la Tabla 22, a continuación.

50

Tabla 22

Muestra	Proteína HEXaspC/ proteínas solubles totales
<i>E. coli</i> BL21(DE3)::HEXaspCP9T/T156ApET23a CFE	0,310
<i>E. coli</i> BL21(DE3)::HEXaspCP9T/R122ApET23a CFE	0,145
<i>E. coli</i> BL21(DE3)::HEXaspCpET23a CFE	0,172
<i>E. coli</i> BL21(DE3)::HEXaspCR122A/T156ApET23a CFE	0,174

<i>E. coli</i> BL21(DE3)::HEXaspCW130FpET23a CFE	0,114
<i>E. coli</i> BL21(DE3)::HEXaspCT156ApET23a CFE	0,120

El análisis de los geles demostró que el mutante HEXaspCR122A/T156A era la única proteína que se encontró en cantidades sustanciales en forma de cuerpos de inclusión. La proteína HEXaspCP9T/156A proporcionó el nivel más alto de expresión, aproximadamente 90% mejor que la proteína HEXaspC. En contraste, las proteínas W130F, T156A y P9T/R122G a concentraciones más bajas que HEXaspC.

La actividad de las proteínas mutantes HEXaspC para la producción de S,S-monatina se midió utilizando las condiciones de reacción siguientes: cada 1 ml de reacción contenía TAPS 50 mM, pH 8,2, MgCl₂ 4 mM, fosfato sódico 3 mM, pH 8,0, piruvato sódico 200 mM (pH ajustado a 8), α -cetoglutarato 5 mM (pH ajustado a 8), triptófano 50 mM, piridoxal-3-fosfato 0,05 M, 50 μ g/ml de ProA aldolasa (añadido en forma de extracto libre de células) y concentraciones variables (aproximadamente 50 y 500 μ g/ml) de aminotransferasa (añadido en forma de extracto sin células). Se utilizó agua desaireada para preparar las soluciones madre y ajustar el volumen de las mezclas de reacción a 1,0 ml. Se añadió piridoxal fosfato inmediatamente antes de la adición de los enzimas. Los tubos de reacción se incubaron a 30°C bajo agitación suave durante 4 h. Se extrajeron muestras (0,01 ml) 1, 2 y 4 h después de la adición de los enzimas, se filtraron y se analizaron mediante CL/EM/EM, tal como se indica en el Ejemplo 1. Se normalizó la producción de monatina respecto a la cantidad de aminotransferasa presente en las reacciones.

Bajo las condiciones de dichos ensayos, HEXaspC y HEXaspCT156A produjeron el máximo de monatina total por mg de aminotransferasa, mientras que la proteína P9T/R122G produjo el mínimo, seguido de HEXaspCW130F. Los enzimas HEXaspCW130F y P9T/R122G mostraron la mayor estereoselectividad para S-PM (más de 98% de S,S-monatina), incluso al utilizar concentraciones elevadas de enzima (superiores a 300 μ g/ml). El porcentaje de producto S,S-monatina se redujo a menos de 90% en las reacciones enzimáticas que contenían el enzima P9T/T156A a alta concentración. Los otros mutantes mostraron una estereoselectividad de producto muy similar a la del mutante HEXaspC original (aproximadamente 95% de S,S-monatina). El análisis del producto de la reacción que contenía el enzima HEXaspC utilizando el reactivo de derivatización con FDAA indicado en el Ejemplo 1 demostró que el segundo estereoisómero formado era la R,S-monatina.

Ensayo del triptófano y de la actividad de monatina aminotransferasa

Los mutantes se sometieron a ensayo para la actividad de transaminación utilizando S,S-monatina y L-triptófano como sustratos. Se midió la actividad de aminotransferasa mediante el seguimiento de la formación del coproducto de la reacción, glutamato, mediante HPLC con derivatización post-columna con OPA tal como se indica en el Ejemplo 1. La mezcla de reacción contenía, en 1,0 ml, tampón HEPES 100 mM, pH 8,0, alfa-cetoglutarato 20 mM, piridoxal fosfato 0,08 mM, triptófano 25 mM o S,S-monatina y enzima (suministrado como 2,5 mg en proteína de extractos celulares). Se mezclaron todos los componentes excepto el enzima. Se añadió el enzima al inicio de la reacción y la solución de reacción se incubó a 30°C (agitación suave) durante 90 min. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado, con controles negativos en los que no se añadió enzima. SE detuvo la reacción mediante la adición de ácido fórmico al 10% (concentración final), la mezcla se centrifugó a 21.000 rpm y se separó cuidadosamente el sobrenadante y se filtró. Los datos se corrigieron para los niveles de fondo de glutamato y para la dilución por la adición de ácido para precipitar las proteínas, después se normalizó respecto a la cantidad de aminotransferasa mutante añadida. Al utilizar triptófano como sustrato, HEXaspC produjo 13,0 mM de glutamato por mg de aminotransferasa cada hora. La actividad relativa, expresada como porcentaje, de los mutantes era la siguiente: HEXaspCW130F (156%), HEXaspCT156A (151%), HEXaspCP9T/T156A (63,7%), HEXaspCP9T/R122G (116%) y HEXaspCR122G/T156A (107%). Al utilizar S,S-monatina como sustrato, HEXaspC produjo 7,43 mM de glutamato por cada mg de aminotransferasa cada hora. La actividad relativa, expresada como porcentaje de los mutantes era la siguiente: HEXaspCW130F (113%), HEXaspCT156A (87,7%), HEXaspCP9T/T156A (67,3%), HEXaspCP9T/R122G (11,2%) y HEXaspCR122G/T156A (114%).

El mutante HEXaspCP9T/R122G presentaba una actividad incrementada de conversión de triptófano en indol-3-piruvato, pero redujo la actividad de transaminación de la S,S-monatina. La proporción de actividades de triptófano a monatina era de 18,2 en comparación con 1,75 para HEXaspC, convirtiéndola en un candidato deseable para la producción de R,R-monatina utilizando rutas que requieren una L-aminotransferasa, tales como las indicadas en los Ejemplos 9 y 10(2). De esta manera, HEXaspCP9T/R122G es un ejemplo de una aminotransferasa con actividad limitada sobre la S,S-monatina, así como PM.

La mayoría de las mutaciones mejoró la actividad del L-triptófano, pero sólo dos mutantes incrementaron la actividad hacia tanto L-triptófano como S,S-monatina (HEXaspCW130F y HEXaspCR122G/T156A). Debido a que se utilizaron 25 mM de sustrato en estos ensayos, los enzimas estaban muy probablemente saturados y la actividad era un reflejo de la k_{cat} de los enzimas. Sin embargo, bajo las condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos de producción de S,S-monatina, indicados anteriormente, es improbable que la concentración de S-PM resulte suficiente para saturar el enzima por lo que no se produjo un incremento global de la producción de S,S-monatina debido a que el incremento de k_{cat} resultaba compensado por un incremento de K_m . Se ha informado, para sustratos similares, que algunas de las mutaciones incrementa la k_{cat} aunque también incrementa la K_m aparente para el sustrato aminoácido. En el caso de concentraciones crecientes de sustratos, se espera que estos dos mutantes

proporcionarían una ventaja en las tasas de producción de S,S-monatina en comparación con HEXaspC. La mutación HEXaspCT156A aparentemente presenta tasas de transaminación de triptófano incrementadas sin presentar un efecto significativo sobre la tasa de transaminación de PM bajo las condiciones indicadas anteriormente para la producción de S,S-monatina.

5 Mediante la comparación de las estructuras de HEXaspC y uno de los enzimas D-aminotransferasas de *Bacillus* (ver, por ejemplo, Sugio S. et al., *Biochemistry* 34:9661-9669, 1995), las mutaciones W130F, R122G, T156A y HEX de AspC podrían localizarse en residuos correspondientes en la estructura de la D-aminotransferasa. Se espera que mutaciones similares en la D-aminotransferasa de amplia especificidad mejorarían la producción global de R,R-monatina, tal como se indica en el Ejemplo 3. Por ejemplo, la funcionalidad proporcionada por el triptófano 130 en AspC es sustituida en las D-aminotransferasas de *Bacillus* mediante enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales de las serinas 179 a 181 y el glutamato 166 (esquema de numeración YM-1). Con el fin de reducir los impedimentos estéricos, el glutamato podría mutarse en un residuo aspartato. Algunas D-aminotransferasas presentan un residuo treonina en la posición 179, que incrementaría el impedimento estérico y debería ser evitado. El enzima de *B. sphaericus* presenta una alanina en lugar de la serina en la posición 181, que también podría reducir los impedimentos estéricos.

Puede aplicarse información adicional procedente de estudios sobre la aspartato aminotransferasa también en la D-aminotransferasa. Mientras que el enzima AspC presenta una arginina en el sitio activo que interactúa con la cadena lateral de los sustratos dicarboxilato, la D-aminotransferasa presenta un bucle entre Ser240 y Ser243. Las cadenas laterales de Ser240, Thr242 y Ser243 se orientan en la misma dirección y forman un bolsillo con el grupo hidroxilo de Ser180 que proporciona una superficie para que puedan interactuar tanto sustratos no polares como polares. Ser180 participa en la unión de PLP; sin embargo, para mejorar la actividad de una D-aminotransferasa con R-PM, pueden modificarse los residuos Ser240, Thr242 o Ser243 para aceptar residuos de mayor tamaño o para favorecer sustratos cargados negativamente. Por ejemplo, Thr242 puede mutarse en Ser para reducir la longitud de la cadena lateral. Uno de los residuos puede mutarse en lisina o arginina, tal como Ser243. Los residuos (numeración YM-1) Val30-Val36 se encuentran situados en una cadena beta a través del sitio activo de la D-aminotransferasa y también son importantes para la actividad. Se cree que Tyr31, Val33, Glu32 y Lys35 se encuentran orientados hacia el sitio activo. Tyr31, Glu32 y Val33 son invariantes en todos los homólogos de *Bacillus*. Ro et al., *FEBS Lett.* 398:141-145, 1996, mutagenizaron Val33 a Ala y observaron una eficiencia catalítica ligeramente incrementada para la transaminación del alfa-cetoglutarato y una eficiencia catalítica significativamente mejorada para sustratos más voluminosos (menos impedimento estérico). En algunos homólogos la Lys35 es sustituida por Arg, pero si los impedimentos estéricos son problemáticos, el residuo Lys puede resultar preferible. Las valinas 34 y 36 también resultan preferibles a sustituciones conservadoras tales como la isoleucina, nuevamente debido a los menores impedimentos estéricos para moléculas grandes, tal como PM. Debido a que la nueva D-aminotransferasa ("4978") indicada en los Ejemplos 15 y 16 presentaba una actividad más elevada que el enzima de *B. sphaericus* y la DAT híbrida indicado en el Ejemplo 19, es la elección evidente para reacciones adicionales de mutagénesis. Las ideas anteriormente indicadas, basadas en el análisis de la estructura cristalina de la D-aminotransferasa YM-1, puede aplicarse a la D-aminotransferasa de ATCC cepa nº 4978. La numeración anteriormente indicada está retrasada en un aminoácido respecto al aminoácido correspondiente en la secuencia de la proteína 4978.

Ejemplo 7

Utilización de aminotransferasas de cadena ramificada ("ATCR") en la producción de monatina

45 AT-102 y AT-104 son L-transaminasas de cadena ramificada (EC 2.6.1.42) que se obtuvieron de BioCatalytics (Pasadena, CA). Los enzimas se sometieron a ensayo para la actividad de transaminación utilizando sustratos S,S-monatina y R,R-monatina que se produjeron químicamente. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 0,5 ml y se llevaron a cabo por duplicado. Los ensayos contenían Tris 50 mM, pH 7,8, PLP 0,08 mM, α -cetoglutarato 10 mM (" α -KG"), monatina 5 mM y 1 mg/ml de enzima aminotransferasa. Los controles negativos no contenían enzima aminotransferasa exógeno. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 30°C bajo agitación a 100 rpm. Las muestras se filtraron y se llevó a cabo un análisis de CL/EM/EM, tal como se indica en el Ejemplo 1, para determinar los niveles de glutamato. Los niveles del glutamato deberían correlacionarse estequiométricamente con la producción de PM. Al utilizar R,R como el sustrato de reacción, se encontraban presentes niveles muy bajos de glutamato en los controles negativos. AT-104 produjo ligeramente más glutamato que los controles negativos, indicando un nivel bajo de actividad con el sustrato R,R-monatina (un D-aminoácido). Ambas L-aminotransferasas de cadena ramificada mostraron actividad sobre la S,S-monatina. AT-102 produjo 102 μ g/ml de glutamato y AT-104 produjo 64 μ g/ml de glutamato. En comparación, una aminotransferasa de amplia especificidad (AT-101, también de Bio-Catalytics) produjo 75 μ g/ml bajo estas condiciones. La elevada actividad con una aminotransferasa de cadena ramificada es bastante inesperada debido a que la monatina presenta más similitudes estructurales con los aminoácidos dicarboxílicos y aminoácidos aromáticos que normalmente servirían de sustratos para la amplia especificidad de las aspartato aminotransferasas. Sin embargo, debido al esqueleto de ácido glutámico de la monatina, muchas aminotransferasas que pueden utilizar glutamato como donante de aminos también pueden presentar actividad sobre la monatina.

65

Producción de monatina a partir de indol-3-piruvato utilizando ATCR

Se sometieron a ensayo AT-102 y AT-104 para la producción de monatina en reacciones acopladas utilizando la Pro aldolasa de *C. testosteroni* (producida tal como se indica en el documento nº WO 03091396 A2). Se añadieron directamente enzimas y componentes/sustratos adicionales al tampón de reacción proporcionado en el kit, que contenía tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, L-glutamato 100 mM y PLP 0,1 mM. A un ml de tampón de reacción se añadió: 4 mg de indol-3-piruvato, 20 mg de piruvato, aproximadamente 50 µg de ProA proporcionados en un extracto celular, 1 µl de MgCl₂ 2 M y 2 mg de enzima aminotransferasa bajo ensayo. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado y se llevó a cabo una reacción de control negativo sin adición de aminotransferasa adicional. Se utilizó un control positivo (AT-101) para la comparación; este enzima es una L-aminotransferasa de amplia especificidad. La producción de fondo de monatina se debe a las aminotransferasas de *E. coli* nativas presentes en el extracto celular del enzima ProA recombinante. Las reacciones se incubaron durante la noche a 30°C bajo agitación suave (100 rpm). Se filtraron las muestras y se sometieron a análisis de CL de fase inversa/EM/EM tal como se indica en el Ejemplo 1. Se presentan los resultados en la Tabla 23, a continuación.

Tabla 23

Enzima	µg/ml de monatina producida
AT-101	173,05
AT-102	122,05
AT-104	133,05
negativo	73,25

Las aminotransferasas AT-102 y AT-104 produjeron claramente más monatina que el control negativo y presentaban aproximadamente 50%-60% de la actividad del control positivo.

El enzima aminotransferasa de cadena ramificada de *E. coli* ha sido bien estudiado y las estructuras cristalinas han sido analizadas en detalle (Okada K. et al., J. Biochem. (Tokyo) 121:637-641, 1997). El enzima presentaba un pliegue global similar y una homología de secuencias significativa respecto a los enzimas D-aminotransferasas de *Bacillus*, tales como los indicados en los Ejemplos 2, 3 y 6. Además, los enzimas ATCR y las D-aminotransferasas de *Bacillus* son los únicos dos tipos de aminotransferasa dependiente de PLP que muestran estereoespecificidad para la adición en la cara *re* de hidrógeno a PLP (Yoshimura T. et al., J. Am. Chem. Soc. 115:3897-3900, 1993). Se cree que ATCR es el único enzima en el que el sustrato alfa-aminoácido se une a su grupo carboxilo en la misma cara que el grupo fosfato, permitiendo que el enzima presente un pliegue y mecanismo similares a las D-aminotransferasas, conservando simultáneamente la especificidad para los L-aminoácidos (Peisach D. et al., Biochemistry 37:4958-4967, 1998). Se cree que la especificidad de L de la ATCR radica en el hecho de que las cadenas laterales de los aminoácidos polares de la D-aminotransferasa que posicionan el grupo alfa-carboxilo del sustrato son sustituidos por residuos no polares en la ATCR. Se espera que la totalidad o algunos de los residuos se mutan en los aminoácidos correspondientes de la D-aminotransferasa de *Bacillus*, podría convertirse la ATCR en una aminotransferasa específica de D. Pueden llevarse a cabo las mutaciones siguientes en la ATCR de *E. coli* (numeración basada en el número de acceso gi:14719463): Phe37 a Tyr, Val110 a His y Met108 a Arg. También pueden llevarse a cabo otras sustituciones de aminoácido polar en estos sitios, para adaptar el sitio activo del enzima para que pueda aceptar sustratos ácido dicarboxílico de gran tamaño, tal como se indica en el Ejemplo 6. También puede resultar necesario convertir la Tyr165 en Leu, para que corresponda con la interacción de PLP de la D-aminotransferasa; también puede resultar necesario mutar Tyr96 (a Phe), Arg41 y Arg98 para evitar la unión del grupo alfa-carboxilo en la orientación incorrecta del enzima ATCR. Trp127 también puede mutarse a Tyr para reducir la probabilidad de que las cadenas laterales hidrofóbicas se unan en una configuración pro-S; Tyr32 y Tyr130 pueden interactuar con el L-glutamato en el sitio activo de la ATCR y pueden mutarse en aminoácidos cargados negativamente para minimizar dicha interacción (Goto M. et al., Biochemistry 42:3725-3733, 2003; Okada K., Biochemistry 40:7453-7463, 2001).

Debido a que tanto los enzimas D-aminotransferasa como la aminotransferasa de cadena ramificada presentan actividad en la producción de monatina, se espera que la ATCR pueda convertirse en una D-aminotransferasa con actividad en la producción de R,R-monatina, proporcionando simultáneamente otro posible enzima D-aminotransferasa para la utilización en los esquemas de reacción indicados en muchos de los Ejemplos. Basándose en los resultados anteriormente proporcionados, resulta posible que el enzima AT-104 ya muestre alguna actividad hacia las configuraciones D-amino de la monatina.

Clonación y mutagénesis de aminotransferasa de cadena ramificada de *Bacillus*

Bacillus licheniformis contiene una aminotransferasa de cadena ramificada putativa que está más estrechamente relacionada con las D-aminotransferasas que la aminotransferasa de cadena ramificada de *E. coli*. Se sometió a ensayo para la actividad de D-transaminación y se mutagenizó basándose en los residuos predichos del sitio activo indicados anteriormente para la ATCR de *E. coli*.

Cepa

Se cultivó *B. licheniformis* (ATCC número 14580) en agar nutritivo a 30°C durante la noche. Se introdujeron grupos de colonias en 100 µl de agua estéril y se calentaron durante 10 minutos a 95°C para romper las células. Se utilizaron tres µl en amplificaciones posteriores mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa

Se diseñaron cebadores para el gen de *B. licheniformis* (915 pb) para la donación en los vectores pET 28b y pET 30a (Novagen, Madison, WI) y pTRC99a (GE Healthcare Life Sciences), utilizando los sitios *NcoI* y *Sall*. El constructo pET30 contiene una etiqueta de His N-terminal y una etiqueta S, mientras que el constructo pET 28 no presenta etiquetas.

Cebadores de *bcat* de *B. licheniformis*:

extremo N-terminal: 5'-GGTTAAGGCCATGGGGGACCAGAAAGACCA-3' (SEC ID nº 44) y
extremo C-terminal: 5'-GGCCTTCCGTCGACTCAGCTGACACTTAAGCT -3' (SEC ID nº 45).

Se amplificó la reacción codificante utilizando el protocolo de PCR siguiente. En una reacción de 50 µl se utilizaron 3 µl de molde, 1 µM de cada cebador, 0,4 mM de cada dNTP, 3,5 U de polimerasa Expand High Fidelity y 1X tampón Expand™ (Roche, Indianapolis, IN) con Mg. El programa del termociclador utilizado incluía un inicio en caliente a 96°C durante 5 minutos, seguido de 30 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 1 minuto 45 segundos y 72°C durante 2 minutos 15 segundos. Tras 30 ciclos, la muestra se mantuvo a 72°C durante 7 minutos y después se almacenó a 4°C. Se obtuvieron productos de PCR limpios del tamaño correcto (aproximadamente 900 pb).

Clonación

El producto de PCR se purificó y se digirió con *Sall* y *NcoI* en tampón *Sall* (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los vectores digeridos (pET28, pET30 y pTRC99a) y la inserción se purificaron utilizando el kit de extracción en gel Qiagen QIAquick. Las ligaciones se llevaron a cabo utilizando el kit de ligación de ADN Roche Rapid (Roche) y se purificaron. Las ligaciones se transformaron en *Escherichia coli* DH10B utilizando una cubeta de 0,2 cm y un sistema Bio-Rad Gene Pulser II, tal como se indica en el manual de electroporación de Bio-Rad. Se dejó que las células se recuperasen en 900 µl de medio SOC durante 30 minutos a 37°C a 225 rpm. Las células se sembraron en placas de LB-agar que contenía canamicina (25 µg/ml). El plásmido de ADN se purificó utilizando el kit miniprep Qiagen spin y se cribó para las inserciones correctas mediante digestión de restricción con *Sall* y *NcoI*. Las secuencias de los plásmidos que aparentemente presentaban la inserción correcta se verificaron mediante secuencias de ADN determinación de cadena con dideoxi en Agencourt BioScience Corporation (Beverly, MA). La secuenciación verificó la secuencia codificante presente en NCBI número de acceso CP000002 GI 56160984 2851268..2850354, que produce una proteína con la secuencia de aminoácidos listada en el número de acceso AAU24468 GI:52004526.

Expresión génica y ensayos

Se transformó el ADN de plásmido (vectores pET) en el huésped de expresión *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI) para constructos en vectores pET. Los cultivos se cultivaron y los plásmidos se aislaron utilizando el kit miniprep de Qiagen y se analizaron mediante digestión de restricción para confirmar la identidad. La inducción típicamente se llevó a cabo en medio LB que contenía canamicina (50 µg/ml). Las células se cultivaron hasta una DO₆₀₀ de entre 0,4 y 0,8 a 37°C y se indujeron con IPTG (isopropil-tiogalactósido) 0,1 mM y se muestrearon 3 a 4 horas después de la inducción. Se prepararon extractos celulares según el protocolo adjunto al reactivo BugBuster™ de Novagen (con nucleasa benzoasa y se añadió cóctel inhibidor de proteasa completo de Roche). Se obtuvieron niveles elevados de proteína soluble al peso molecular predicho, según el SDS-PAGE. Las proteínas solubles en los extractos celulares se separaron mediante SDS-PAGE.

Se analizaron los extractos celulares para la actividad de D-aminotransferasa siguiendo la producción de alanina a partir de piruvato (o de glutamato a partir de alfa-cetoglutarato) y D-triptófano utilizando el protocolo siguiente. Típicamente se llevaron a cabo reacciones de un ml por duplicado en tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7,5), piridoxal fosfato 50 µM, piruvato sódico 25 mM y D-triptófano 50 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de extractos libres de células o enzima purificado y se incubaron durante 15 minutos o durante la noche a 30°C, bajo agitación suave. Se añadió aproximadamente el mismo nivel de D-aminotransferasa (típicamente de aproximadamente 0,5 mg) en cada ensayo con fines comparativos, y con frecuencia se utilizó AT-103 (BioCatalytics) como enzima de referencia. Se añadió ácido fórmico hasta una concentración final de dos por ciento para detener la reacción y la proteína precipitada se separó mediante centrifugación. También se llevaron a cabo reacciones de control sin proteína añadida. También se utilizaron puntos de tiempo cero como controles negativos. Se detectó la alanina y el glutamato utilizando la derivatización con OPA tal como se indica en el Ejemplo 1. La aminotransferasa de cadena ramificada presentaba niveles bajos de actividad de D-aminotransferasa en comparación con los enzimas AT-103 y de *B. sphaericus*.

También se sometió a ensayo la aminotransferasa de cadena ramificada para la capacidad de producir monatina a partir de D-triptófano (tal como en el Ejemplo 3) pero aparentemente no presentaba actividad bajo las condiciones sometidas a ensayo.

Se transformó el constructo pTRC99a en células *E. coli* CAG18455 electrocompetentes que eran auxotróficas para la producción de triptófano. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con vitaminas de Balch y 100 mg/l de L-triptófano, glucosa al 0,4% y cloruro de calcio. Las células no eran capaces de crecer sin L-triptófano. Se sometió a ensayo la inducción con 10, 100 y 1.000 μM de IPTG, a una DO_{600} de 0,4 durante 4,5 horas. Las bandas en el PM corregido eran visibles en el SDS-PAGE. El plásmido se mutagenizó utilizando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange® (Stratagene). Los cebadores en la Tabla 24 se diseñaron tal como indicaba el fabricante.

Tabla 24

Mutación de aminoácido (numeración de <i>E. coli</i>)	Mutación de nucleótido (numeración de <i>B. lich.</i>)	Secuencia del cebador
Y32F	tac 96-->ttc	ATCACGGATTTTTATTTCGGGGACGGCGTG (SEC ID nº 46)
Y32D	tac 96-->gac	ATCACGGATTTTTAGACGGGGACGGCGTG (SEC ID nº 47)
F37Y	ttt 111 --> tat	GGACGGCGTGTATGAAGGGATCAGGG (SEC ID nº 48)
R41K	agg 123 -->aag	TGTTTGAAGGGATCAAGGTATACGACGGCAAC (SEC ID nº 49)
F37Y + R41K		GACGGCGTGTATGAAGGGATCAAGGTATACGACG (SEC ID nº 50)
Y96F	tac276-->ttc	GCTGAAAGACGCTTTCATCCGCTTGGTTCG (SEC ID nº 51)
Y96H	tac276 -->cac	GCTGAAAGACGCTCACATCCGCTTGGTTC (SEC ID nº 52)
R98Y	cgc282 -->tac	CTGAAAGACGCTTACATCTACTTGGTCGTTTCAAGAGG (SEC ID nº 53)
Y96F + R98Y		GGCTGAAAGACGCTTTCATCTACTTGGTCGTTTCAA GAGG (SEC ID nº 54)
Y96H + R98Y		GCTGAAAGACGCTCACATCTACTTGGTCGTTTCAAG AGG (SEC ID nº 55)
L108R	ctc 312 --> cgc	GCAGGTGACCGCGGACTCGATCCAAAC (SEC ID nº 56)
L110H	ctc318 --> cac	GCAGGTGACCTCGGACACGATCCAAAC (SEC ID nº 57)
L108R + L110H		GCAGGTGACCGCGGACACGATCCAAACAATTG (SEC ID nº 58)
L127Y	ttg369 --> tac	GTCATCATAATTGTGCGAACCATACGCAATATTCCCG AAAC (SEC ID nº 59)
L127K	ttg369-->aag	GTCATCATAATTGTGCGAACCAGGCAATATTCCCG AAAC (SEC ID nº 60)
I130E	ata375-->gaa	GTCATCATAATTGTGCGAACCATTGGCAGAATTCCCG AAAC (SEC ID nº 61)
L127Y + I130E		CGAGTGTATCATAATTGTGCGAACCATACGCAGAA TTCCCGAAAC (SEC ID nº 62)
L127K + I130E		CCGAGTGTATCATAATTGTGCGAACCAGGCAAGG CAGA ATTCCCGAAAC (SEC ID nº 63)
Y165L	tac477 --> ttg	AATCGCTGAACTTGTTAAACAATATTCTTGTCCGGA TCGAGG (SEC ID nº 64)

Las mutaciones de aminoácidos se basaron en la estructura cristalina de la ACR de *E. coli* y la numeración en la tabla anteriormente proporcionada es para la proteína de *E. coli*. La numeración de las mutaciones de ADN se basa en el gen *bcat* de *B. licheniformis*.

Los cebadores se diluyeron a 0,1 mg/ml y típicamente se utilizaron 100 ng de cada cebador oligonucleótido en 50 μl de reacción de mutagénesis; se utilizaron concentraciones proporcionalmente superiores para los cebadores de mayor tamaño. Para los cebadores oligonucleótidos que esencialmente competían para la hibridación con la misma región molde, en ocasiones se utilizó una suma de 100 ng para el reservorio completo de cebadores en esa región. Se utilizaron doscientos nanogramos de molde (*bcat* de *B. lich.* en pTRC99a) en la reacción, con 5 μl de 10X tampón QuikChange, 2 μl de dNTP y 2 μl de la mezcla de enzimas. Los productos de amplificación se trataron con endonucleasa de restricción DpnI (Stratagene) (2 μl) durante 2 horas a 37°C y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml de paredes gruesas para la precipitación con etanol. La mezcla de reacción resuspendida (concentrada) se transformó (2,5 μl) en células XL10-Gold Ultracomp incluidas en el kit QuikChange. Se realizó una miniprep de varias colonias y se secuenciaron para garantizar que las mutaciones eran aleatorias y para estimar el nivel de mutagénesis alcanzado. Las colonias se resuspendieron de la placa y se llevaron a cabo minipreps globales. El ADN de las

minipreps seguidamente se transformó en la cepa auxotrófica para triptófano y se sembró en una placa con el medio mínimo (con IPTG) indicado anteriormente o utilizando medio mínimo que contenía D-triptófano como única fuente de nitrógeno. Se llevó a cabo una segunda y una tercera rondas de mutagénesis en los minipreps globales utilizando cebadores que aparentemente no se incorporaron bien en las rondas anteriores. En cada estadio, las colonias que crecieron rápidamente en el medio mínimo (colonias más grandes) se conservaron para los análisis posteriores. Los mutantes mostrados en la Tabla 25, a continuación, se aislaron a partir de las placas de selección. En algunos casos estos mismos mutantes aparecieron en el medio de selección en más de una ocasión.

Tabla 25

Clon	Mutaciones
4	F37Y, Y96F
6	Y96F
28	F37Y, Y165L
32	Y96F, L127K
5-1	F37Y, Y96F, R98Y, L108R, L110H, L127Y
5-2	F37Y, R41K, Y96F, R98Y, L108R, L110H, L127Y

Los constructos mutantes se indujeron para producir proteína recombinante en medio LB y se prepararon extractos celulares tal como se ha indicado anteriormente. Las proteínas solubles en los extractos celulares se separaron en una estación de electroforesis automatizada Experion de BioRad Laboratories y se analizaron para la concentración y el porcentaje de expresión utilizando el software Experion versión 1.1.98.0. Se observaron niveles muy bajos de proteína recombinante soluble; de esta manera, la cuantificación de la banda de interés no resultó posible. Se llevaron a cabo ensayos para someter a ensayo la transaminación del D-triptófano tal como anteriormente, utilizando 50 a 250 µl de extractos celulares. Se sometieron a ensayo los clones 4, 6, 28 y 32 utilizando tanto alfa-cetoglutarato como piruvato como el aceptor de aminos, y se incubaron durante 2 horas y durante la noche a 30°C. Se restaron los niveles de fondo de alanina/glutamato presentes procedentes de los extractos celulares. Para los ensayos con 5-1 y 5-2, las concentraciones de proteínas estimadas por el software Experion para las ATCR fueron de 275,1 ng/µl para el enzima de tipo salvaje, de 409,3 ng/µl para la ATCR 5-1 y de 148,2 ng/µl para la ATCR 5-2. Se muestran los resultados de los ensayos en las Tablas 26 a 28, a continuación.

Tabla 26

ATCR	Glutamato (mM) 2 horas	Glutamato (mM) Durante la noche
Tipo salvaje (100 µl)	0,0912	0,2304
Tipo salvaje (250 µl)	0,251	0,521
4 (100 µl)	0,0642	0,1202
4 (250 µl)	0,154	0,295
6 (100 µl)	0,053	0,112
6 (250 µl)	0,141	0,289
28 (100 µl)	0,0586	0,1402
28 (250 µl)	0,155	0,367
32 (100 µl)	0,0616	0,1236
32 (250 µl)	0,167	0,339

Tabla 27

ATCR	Alanina (mM) 2 horas	Alanina (mM) Durante la noche
Tipo salvaje (250 µl)	0,199	0,438
4 (250 µl)	0,093	0,249
6 (250 µl)	0,097	0,249
28 (250 µl)	0,117	0,325
32 (250 µl)	0,102	0,285

Tabla 29

ATCR	Glutamato (mM) 1 hora	Glutamato (mM) Durante la noche
Tipo salvaje (50 µl)	0,018	0,075
Tipo salvaje (100 µl)	0,037	0,152
5-1 (50 µl)	0,005	0,017
5-1 (100 µl)	0,01	0,045

5-2 (50 µl)	0,001	0,011
5-2 (100 µl)	0,003	0,031

Resulta evidente que, al igual que la mayoría de L-aminotransferasas, los enzimas presentan una preferencia para el alfa-cetoglutarato frente al piruvato como aceptor de aminos. Todos los mutantes sí presentaban actividad de D-aminotransferasa, del mismo modo que la cepa parental de tipo salvaje. No está claro si el enzima de tipo salvaje presentaba más o menos actividad de D-aminotransferasa debido a que no resultó posible la cuantificación exacta de la proteína ATCR a partir de los extractos celulares. Sin embargo, se espera que los enzimas mutantes presenten menos actividad de L-aminotransferasa que el de tipo salvaje; de esta manera, la proporción de tasas de D- a L-transaminación se mejora. La mutagénesis continua podría proporcionar un enzima alternativo en las rutas a la monatina.

Ejemplo 8

Clonación, expresión y ensayo de glutamato y aspartato racemasas

El presente ejemplo describe los métodos utilizados para clonar y someter a ensayo los enzimas aminoácido racemasa, los cuales pueden utilizarse para la interconversión entre L-glutamato y D-glutamato (o L- y D-aspartato, o L- y D-alanina). Las glutamato, aspartato o alanina racemasas resultan útiles en una ruta biosintética para producir R,R-monatina en el caso de que una etapa en dicha ruta produzca un L-aminoácido (por ejemplo L-glutamato, L-aspartato o L-alanina) y otra etapa en la ruta consume un D-aminoácido (por ejemplo D-glutamato, D-aspartato o D-alanina). La figura 4 ilustra una ruta biosintética para producir R,R-monatina a partir de L-triptófano utilizando una aminotransferasa específica de L-triptófano, una aldolasa específica de R, una D-aminotransferasa y una glutamato (o aspartato o alanina) racemasa.

Se clonaron genes en los vectores pET28 y pET30 para generar tanto proteínas no etiquetadas como proteínas de fusión con etiqueta HIS₆/etiquetas de T7 N-terminales escindibles. Las proteínas resultantes se purificaron utilizando cromatografía de afinidad para metal inmovilizado.

Descripción general experimental

Los genes codificantes de las glutamato racemasas (EC 5.1.1.3) de *Lactobacillus brevis* (GenBank nº de acceso D29627, secuencia de ácidos nucleicos) y de *Pediococcus pentosaceus* (gen *murl*) (GenBank nº de acceso L22789) se clonaron y se expresaron en *E. coli*. Los extractos se sometieron a ensayo para la actividad de conversión de L-glutamato en D-glutamato y de D-glutamato en L-glutamato. También se sometió a ensayo el enzima aspartato racemasa de Bio-Catalytics (EC 5.1.1.13) para la interconversión entre L- y D-aspartato.

Aislamiento del ADN genómico para la clonación

Se obtuvo ADN genómico de *L. brevis* (ATCC nº 8287D) de la American Type Culture Collection. Se cultivó *P. pentosaceus* (ATCC nº 25745) a 37°C en caldo MRS de *Lactobacilli* y se utilizaron 2 ml para el aislamiento del ADN genómico utilizando el método de Mekalanos J.J., "Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*", Cell 35:253-263, 1983.

Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa

Se diseñaron cebadores con sitios de restricción 5' y extremos protuberantes para la clonación en los vectores pET28 y pET30 (Novagen, Madison, WI).

Cebadores de glutamato racemasa de *L. brevis*:

extremo N-terminal: 5'-GCGGCGCCATGGAAAATGATCCGATTGGTCTAATG -3' (SEC ID nº 15) y
extremo C-terminal: 5'-GCGGCGGTGCGACGCAATTACAATTGTGTTTGTC-3' (SEC ID nº 16).

Cebadores de glutamato racemasa de *P. pentosaceus*:

extremo N-terminal: 5'- GCGGCGCCATGGATGTATGTATAATTTTATTTAG -3' (SEC ID nº 17) y
extremo C-terminal: 5'-GCGGCGGTGCGACAAATTTTCATTATTCTAATTT -3' (SEC ID nº 18).

El gen derivado de *L. brevis* se amplificó utilizando el protocolo de PCR siguiente. En una reacción de 50 µl se utilizaron 0,150 µg de molde, 1,6 µM de cada cebador, 0,4 mM de cada dNTP, 2,8 U de polimerasa Expand High Fidelity™ (Roche, Indianapolis, IN), 0,5 U de polimerasa Pfu (Stratagene, La Jolla, CA) y tampón 1X Expand™ con Mg. El programa del termociclador utilizado incluía un inicio en caliente a 96°C durante 3 minutos, 8 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 45 segundos y 72°C durante 2 minutos, seguido de 22 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 45 segundos y 72°C durante 2 minutos. Tras las 22 repeticiones, la muestra se mantuvo a 72°C durante 7 minutos y después se almacenó a 4°C.

Este protocolo de PCR produjo un producto de ~830 pb, según la comparación con los marcadores de tamaño de ADN.

El gen derivado de *P. pentosaceus* se amplificó utilizando el protocolo de PCR siguiente. En una reacción de 50 µl, se utilizaron 0,15 µg de molde, 1,6 µM de cada cebador, 0,4 mM de cada dNTP, 2,8 U de polimerasa Expand High Fidelity™ (Roche, Indianapolis, IN), 0,5 U de polimerasa Pfu (Stratagene, La Jolla, CA) y tampón 1X Expand™ con Mg. El programa del termociclador utilizado incluía un inicio en caliente a 96°C durante 3 minutos, seguido de 8 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 37°C durante 45 segundos y 72°C durante 2 minutos, seguido de 8 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 45°C durante 45 segundos y 72°C durante 2 minutos, seguido de 14 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 2 minutos. Tras las 14 repeticiones, la muestra se mantuvo a 72°C durante 7 minutos y después se almacenó a 4°C. Este protocolo de PCR produjo un producto de ~840 pb, según la comparación con los marcadores de tamaño de ADN.

15 Clonación

Los productos de PCR se purificaron en gel a partir de geles de TAE al 0,8%-agarosa utilizando el kit de extracción de gel Qiagen (Valencia, CA). Los productos de PCR se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro SmartSpec 3000™. Los productos se digirieron con enzimas de restricción *NcoI* y *Sall* siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante (New England Biolabs, Beverly, MA) y purificados en geles de TAE al 0,8%-agarosa utilizando el kit de extracción de gel Qiagen. Se prepararon los vectores pET28 y pET30 mediante digestión con los enzimas de restricción *NcoI* y *Sall*, seguido del tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba y la purificación a partir de geles de TAE al 0,8%-agarosa utilizando el kit de extracción de gel Qiagen.

Los vectores digeridos e inserciones se ligaron utilizando el kit de ligación de ADN Rapid™ (Roche, Indianapolis, IN). Se incubaron aproximadamente 50 ng de inserción tratada, 100 ng de vector tratado (proporción molar 3 a 1 de inserción a vector), 5 U de ADN ligasa de T4 (incluida en el kit de ligación de ADN Rapid™) y 1X tampón de ligación, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones de ligación se purificaron utilizando el kit de purificación de producto de PCR High Pure (Roche) y se utilizaron para transformar células *E. coli* DH10B electrocompetentes (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se añadieron diez µl de cada reacción de ligación a 40 µl de célula sDH10B y se transformaron mediante electroporación utilizando el BioRad Gene Pulser II bajo las condiciones siguientes: 2,5 kV, 25 µF, 200 ohmios en una cubeta de 0,2 cm. Se dejó que las células se recuperasen en 1 ml de SOC a temperatura ambiente durante 1 hora a 37°C bajo agitación a 225 rpm. Las células se sembraron en placas LB que contenía canamicina (50 µg/ml).

Se purificó el ADN plasmídico a partir de los transformantes resultantes utilizando el kit miniprep spin de Qiagen y se cribaron para las inserciones correctas mediante digestión de restricción con *NcoI* y *Sall*. Las secuencias de los plásmidos que aparentemente presentaban la inserción correcta se verificaron mediante secuenciación de ADN de terminación de cadena dideoxi.

40 Expresión génica y ensayos

El ADN plasmídico, verificado mediante análisis de secuencias, se subclonó en el huésped de expresión *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI). Se cultivaron los cultivos y se aislaron los plásmidos utilizando el kit miniprep Qiagen y se analizaron mediante digestión de restricción para confirmar la identidad.

La inducción en BL21(DE3) se llevó a cabo inicialmente con glutamato racemasas de *L. brevis* y *P. pentosaceus* en vectores tanto pET28 (no etiquetado) como pET30 (etiquetado con histidinas). Se llevó a cabo un estudio de curso temporal con cultivos mantenidos en 250 ml de LB que contenía canamicina (50 mg/l) hasta una DO₆₀₀ de 0,5-0,6 y se indujeron con IPTG (isopropil tiogalactósido) 100 mM y se muestrearon a las 0 y 3 horas posteriores a la inducción. Las células de 600 µl (0 horas) y de 275 µl (3 horas) se resuspendieron en 40 µl de tampón dodecilsulfato sódico que contenía 2-mercaptoetanol y se calentaron a 95°C durante 10 minutos y se enfriaron. Se analizaron alícuotas de dichas muestras de proteínas celulares totales mediante SDS-PAGE utilizando un gel de gradiente 4% a 15%.

También se prepararon extractos celulares a partir de cultivos de 3 horas mediante la suspensión de sedimentos celulares procedentes de 5 ml de cultivo en 0,625 ml de reactivo BugBuster™ de Novagen que contenía 0,625 µl de nucleasa benzoasa y 3 µl de cóctel inhibidor de proteasas juego nº 3 (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA) a temperatura ambiente durante 20 minutos bajo agitación suave, y centrifugando a 16.000 x g para eliminar los residuos celulares. Los sobrenadantes (extractos celulares) se cargaron en geles de gradiente 4% a 15% para el análisis de las proteínas celulares solubles.

Las muestras de las 3 horas de glutamato racemasa de *L. brevis* y de glutamato racemasa de *P. pentosaceus* clonadas mostraron tanto proteínas totales como solubles que correspondían al tamaño correcto (aproximadamente 31 kDa). El producto génico pET30 (etiquetado con histidinas) de *L. brevis* se sobreexpresaba a un nivel más alto, y también era más soluble (>20% de proteína soluble) que el producto génico de pET28 (no etiquetado) de *L. brevis*,

así como los productos génicos de *P. pentosaceus* en ambos vectores. El producto génico de *P. pentosaceus* mostró igual sobreexpresión y solubilidad en los vectores pET28 y pET30, que era significativamente inferior a la observada para el producto génico de pET30 de *L. brevis*.

5 Las células de los cultivos inducidos (250 ml) se centrifugaron y se lavaron una vez con NaCl al 0,85%. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 5 ml/g de peso celular húmedo de reactivo BugBuster™ (Novagen) que contenía 5 µl/ml de cóctel inhibidor de proteasas juego nº 3 (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA) y 1 µl/ml de nucleasa benzoasa. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos en un agitador orbital. Los residuos celulares insolubles se eliminaron mediante centrifugación a 16.000 X g durante 20 minutos a 4°C.

10 Los extractos celulares se sometieron a ensayo para actividad de glutamato racemasa utilizando el protocolo siguiente. Se llevaron a cabo reacciones de 400 µl en fosfato potásico 10 mM (pH 8,0), ditioneitol ("DTT") 0,2 mM y L-glutamato o D-glutamato 10 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 20 a 100 µl de extractos libres de células y se incubaron a temperatura ambiente. Se extrajeron alícuotas de muestra durante un curso temporal de 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos y 1 hora (las muestras de cero minutos sirvieron como reacciones de control). Se añadió ácido fórmico 2 M (25 µl) a cada alícuota de muestra de 40 µl para detener la reacción y la proteína precipitada se separó mediante centrifugación. Se separaron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C hasta el análisis mediante CL/EM/EM.

15 Los resultados de ensayo de los extractos celulares de la inducción de pET30 con IPTG 100 mM (3 horas) demuestran que los enzimas de *L. brevis* (GenBank nº de acceso BAA06106.1 GI:468450) y *P. pentosaceus* (GenBank nº de acceso AAA16761.1 GI:349029) presentan niveles significativos de actividad de racemasa sobre ambos isómeros de glutamato. La racemasa de *P. pentosaceus* (20 µl de extractos celulares) alcanzó el equilibrio entre L-glutamato y D-glutamato en 10 a 20 minutos partiendo de cualquiera de los sustratos. El enzima de *L. brevis* (20 µl de extractos celulares) también alcanzó el equilibrio en aproximadamente 20 minutos.

20 Un enzima aspartato racemasa parcialmente purificado (nº de catálogo ASPR-101) obtenido de BioCatalytics, Inc. (Pasadena, CA) se sometió a ensayo para la actividad sobre el L-aspartato y el D-aspartato utilizando un protocolo similar al indicado anteriormente. El enzima comercial mostró actividad de racemasa sobre ambos isómeros. Utilizando 0,5 a 1 mg de enzima se alcanzó el equilibrio en 20 a 60 minutos.

25 Las tres racemasas (glutamato racemasa de *L. brevis*, glutamato racemasa de *P. pentosaceus* y la aspartato racemasa de BioCatalytics) también fueron sometidas a ensayo para la actividad sobre la S,S-monatina utilizando el protocolo siguiente. Se llevaron a cabo reacciones de 400 µl en fosfato potásico 10 mM (pH 8,0), DTT 0,2 mM y S,S-monatina 10 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de extractos libres de células (*L. brevis* y *P. pentosaceus*) o enzima purificado (aspartato racemasa de BioCatalytics) y se incubaron a temperatura ambiente. Se extrajeron alícuotas de muestra durante un curso temporal de 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos y 1 hora (las muestras de minuto cero sirvieron como reacciones de control, así como las muestras sin enzima). Se añadió ácido fórmico 2 M (25 µl) a cada alícuota de muestra de 40 µl para detener la reacción y se separó la proteína precipitada mediante centrifugación. Se separaron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C hasta el análisis mediante CL/EM/EM (Ejemplo 1). No se observó reducción de la concentración de S,S-monatina con el tiempo, ni se produjo ningún incremento de la S,R-monatina (presente inicialmente como <5% del producto secundario contaminante, incluso en el control de no enzima). Por lo tanto, ninguna de las racemasas sometidas a ensayo mostró actividad sobre la monatina.

Ejemplo 9

Producción de R,R-monatina a partir de L-triptófano utilizando alanina, glutamato o aspartato racemasas

30 El presente ejemplo describe métodos de producción de R,R-monatina estereoisoméricamente enriquecida a partir de L-triptófano utilizando una L-triptófano (L-tirosina o aromático) aminotransferasa, ProA aldolasa, alanina, glutamato o aspartato racemasa, y una D-aminoácido aminotransferasa de amplia especificidad. La figura 5 es un diagrama que ilustra la ruta. Este enfoque a la producción de R,R-monatina estereoisoméricamente enriquecida requiere un enzima para la etapa 1 que presente una baja actividad en la producción de monatina a partir de precursor de monatina (PM). Basándose en resultados anteriores, los presentes inventores utilizaron los productos del gen *tatA* de *Sinorhizobium meliloti* y de *Rhodobacter sphaeroides* indicados en el Ejemplo 1 del documento nº WO 03/091396 A2.

60 Materiales y métodos

Se produjeron las glutamato racemasas de *L. brevis* y de *P. pentosaceus* en *E. coli* tal como se ha indicado en el Ejemplo 8. En algunos casos se purificó la versión etiquetada con His6 de dichos enzimas utilizando cartuchos His-Bind 900 siguiendo los protocolos del fabricante (Novagen, Madison, WI) y se desalaron para eliminar el imidazol utilizando columnas PD-10 (G25 Sephadex, Amersham-Pharmacia). Los enzimas se eluyeron en fosfato potásico 25 mM, pH 8,0. Se obtuvo la aspartato racemasa (ASPR-101) y la D-amino transferasa (AT-103) de BioCatalytics, Inc.;

la alanina racemasa se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO) (número de catálogo A8936). Las tirosina (aromático) aminotransferasas de *S. meliloti* y de *R. sphaeroides* se prepararon tal como se indica en el Ejemplo 1 del documento nº WO 03/091396 A2. Se preparó ProA aldolasa de *Comamonas testosteroni* tal como se indica en el Ejemplo 4 del documento nº WO 03/091396 A2. Se llevaron a cabo ensayos de proteínas totales utilizando el ensayo de proteínas de Bio-Rad siguiendo los protocolos del fabricante (Hercules, CA).

Reducción de la cantidad de S,S-monatina producida utilizando racemasas

Las mezclas de reacción (volumen de 1 ml, ejecutadas por duplicado) contenían tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 8), MgCl₂ 2 mM, piridoxal-5'-fosfato 0,05 mM ("PLP"), piruvato sódico 200 mM, α-cetoglutarato u oxalacetato 5 mM, aproximadamente 280 µg/ml de TatA de *S. meliloti* suministrado en un extracto celular, 1 mg/ml de D-aminotransferasa de BioCatalytics (AT-103), 100 µl/ml de extracto celular de glutamato racemasa o 1 mg/ml de aspartato racemasa, y aproximadamente 100 µg/ml de Pro aldolasa proporcionada en forma de extracto celular. Se añadió triptófano sólido a una concentración de 10,2 mg/ml. Los controles negativos no contenían racemasa. Las muestras se incubaron a 30°C (agitación a 250 rpm) durante 1 hora, 2 horas o durante la noche. Las muestras se centrifugaron para separar los precipitados, se filtraron a través de jeringa y se almacenaron a -80°C previamente al análisis para la monatina utilizando el método de CL/EM/EM indicado en el Ejemplo 1.

La mayoría de las muestras contenía >95% de S,S-monatina debido a las cantidades de L-aminotransferasa nativa presente en los extractos celulares. Sin embargo, las muestras que contenían racemasa presentaban una cantidad reducida de monatina total como resultado de que los enzimas racemasas reducían la disponibilidad de L-glutamato para la transaminación del PM. Sin racemasa se produjeron 1.545-2.355 ppm de monatina (predominantemente S,S) durante el curso temporal. Con las racemasas presentes, sólo se produjeron 879 ppm (enzima de *L. brevis*), 444 a 531 ppm (enzima de *P. pentosaceus*) y 506 a 1.460 ppm de monatina (aspartato racemasa). Estos datos indican que las racemasas son activas bajo las condiciones de reacciones requeridas para producir monatina. Para minimizar la formación de S,S-monatina a partir de los enzimas del extracto celular, tales como las aspartato aminotransferasas, se llevaron a cabo experimento adicionales con enzimas purificados y una proporción más alta de enzima D-aminotransferasa a L-aminotransferasa.

Conversión del L-triptófano en isómeros de monatina que contiene 4-R

Se repitieron los experimentos anteriormente indicados utilizando aproximadamente 54 µg de L-aminotransferasa purificada (TatA de *S. meliloti* o de *R. sphaeroides*), 1 mg de aspartato aminotransferasa (BioCatalytics), 1 mg de D-aminotransferasa, oxalacetato 5 mM como el aceptor de aminos y 75 µg de aldolasa purificada. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado con un tiempo de muestreo de 2 horas y tiempo de incubación de toda la noche. Los controles negativos se prepararon con L-aminotransferasa de *S. meliloti*, aunque sin racemasas. Además de la cuantificación de los picos de R,R/S,S y S,R/R,S-monatina basándose en cromatografía de fase inversa, se determinó el porcentaje de cada estereoisómero utilizando la técnica de derivatización con FDAA indicada en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados en la Tabla 29, a continuación.

Tabla 29

L-aminotransferasa	Tiempo de incubación	Monatina total (ppm)	% de S,S	% de R,R	% de R,S	% de S,R
<i>TatA</i> de <i>S. meliloti</i>	2h	17,1	10,2	58,1	0,8	31,0
<i>TatA</i> de <i>S. meliloti</i>	2h	15,8	13,3	55,3	1,0	30,4
<i>TatA</i> de <i>S. meliloti</i>	durante la noche	77,7	25,8	40,0	1,3	32,9
<i>TatA</i> de <i>S. meliloti</i>	durante la noche	67,9	29,4	37,3	1,5	31,8
<i>TatA</i> de <i>R. sphaeroides</i>	2h	241,2	96,3	2,3	0,8	0,6
<i>TatA</i> de <i>R. sphaeroides</i>	2h	223,2	95,7	2,7	1,0	0,6
<i>TatA</i> de <i>R. sphaeroides</i>	durante la noche	600,4	96,6	1,8	0,5	1,1
<i>TatA</i> de <i>R. sphaeroides</i>	durante la noche	618,5	96,1	2,1	0,5	1,3
sin racemasa control	2 h	7,1	92,0	1,4	6,6	0,0
sin racemasa control	2h	5,7	94,0	1,2	4,8	0,0
sin racemasa control	durante la noche	44,6	93,5	1,3	4,7	0,5
sin racemasa	durante la	37,5	95,4	0,9	3,7	0,0

control	noche					
---------	-------	--	--	--	--	--

Claramente la presencia de la racemasa incrementó la cantidad total de monatina producida al utilizar TatA de *S. meliloti* como el enzima para la transaminación del L-triptófano. Los niveles de monatina se incrementaron de una media de 6,4 a 16,5 ppm en el ensayo de dos horas, y de 41 a 73 ppm en el ensayo de durante la noche. Además, el porcentaje de R,R formado se incrementó de aproximadamente 1% hasta incluso 58% mediante la utilización del enzima racemasa. El estereoisómero S,R de la monatina, otro potente edulcorante, fue el otro componente principal, que se incrementó de prácticamente 0 en los controles negativos a 31%. La TatA de *R. sphaeroides* claramente presentaba mucha más actividad sobre S-PM que la L-transaminasa de *S. meliloti*, demostrando la importancia de disponer de un enzima que presente elevada especificidad de sustrato para el L-triptófano en comparación con PM en el caso de que los productos deseados sean los isómeros 4-R de la monatina. Siendo 4S aproximadamente 10% de la monatina total en el punto temporal de las dos horas, TatA de *S. meliloti* puede considerarse que presenta una actividad limitada sobre PM.

Se repitieron los experimentos con la TatA de *S. meliloti* purificada (54 µg) y la glutamato racemasa de *L. brevis*. Al utilizar glutamato racemasa purificada, se utilizaron aproximadamente 64 µg por cada 1 ml de reacción. También se sometieron a ensayo extractos celulares que contenían la glutamato racemasa y se utilizaron 1,4 mg de proteína soluble. Se utilizó nuevamente un control negativo de no racemasa y todas las muestras se sometieron a ensayo por duplicado. Se muestran los resultados en la Tabla 30, a continuación.

Tabla 30

L-aminotransferasa	Tiempo de incubación	Monatina total (ppm)	% de S,S	% de R,R	% de R,S	% de S,R
<i>L. brevis</i> (purificado)	2h	3,3	49,1	34,2	3,7	13,0
<i>L. brevis</i> (purificado)	2h	3,6	47,9	35,2	3,5	13,4
<i>L. brevis</i> (purificado)	durante la noche	29,3	58,9	24,7	3,2	13,2
<i>L. brevis</i> (purificado)	durante la noche	40,2	55,1	25,0	4,7	15,3
<i>L. brevis</i> (extracto celular)	2h	10,5	45,8	35,9	1,1	17,2
<i>L. brevis</i> (extracto celular)	2h	10,5	47,4	33,9	1,1	17,6
<i>L. brevis</i> (extracto celular)	durante la noche	79,4	70,3	17,9	1,3	10,5
<i>L. brevis</i> (extracto celular)	durante la noche	80,1	69,1	19,1	1,1	10,7
ninguna	2 h	2,7	84,1	7,1	6,3	2,4
ninguna	2h	3,2	84,9	6,0	6,8	2,2
ninguna	durante la noche	36,5	92,3	2,3	4,2	1,2
ninguna	durante la noche	30,5	92,7	2,0	4,1	1,3

Nuevamente, resulta evidente que la adición de la racemasa incrementa la monatina total producida a partir de L-triptófano, así como el incremento de las cantidades relativas de los isómeros que contienen 4R de la monatina en comparación con la S,S-monatina. La utilización de aldolasa, racemasa y L-aminotransferasa purificadas mejora en gran medida la capacidad de control de la formación del estereoisómero deseado. La proporción de L- a D-aminotransferasa también es un modo de manipular la estereoquímica del producto final.

Al comparar los resultados mostrados en las Tablas 1 y 2 en el Ejemplo 2 con los resultados obtenidos bajo condiciones de reacción similares a las condiciones anteriormente indicadas, puede observarse la formación de aproximadamente 7 a 29 ppm de monatina a partir de indol-3-piruvato y que los porcentajes de R,R-monatina formada fueron de aproximadamente 51% a 90%. La utilización de la aspartato racemasa incrementó la cantidad total de monatina producida a 16-78 ppm de monatina, con un % de R,R de aproximadamente 40% a 58%. Además, se utilizó una materia prima (L-triptófano) más estable y más económica. En el Ejemplo 3 se produjeron aproximadamente 73 ppm de monatina a partir de D-triptófano a una proporción de R,R:S,R de aproximadamente 1,7:1. La cantidad total de isómeros 4R era >80% de la monatina total. Debido a que tanto la R,R-monatina como la R,S-monatina son potentes edulcorantes (>1.000 veces más dulces que la sacarosa), resulta crucial la capacidad de enriquecer en estos isómeros, sin necesidad de los caros sustratos D-aminoácidos.

Se prevé que la disponibilidad de una aldolasa no específica o específica de R incrementaría la velocidad de

reacción además de incrementar el porcentaje de R,R-monatina formada. Ver el Ejemplo 5. Aunque la ProA aldolasa de *C. testosteroni* utilizada en estos ensayos se ha informado de que favorece predominantemente los sustratos en la configuración S en reacciones de fisión, dicha ProA aldolasa claramente sí produce R-PM. De esta manera, las aldolasas que producen más preferentemente PM en la configuración R pueden ayudar a generar porcentajes incluso mayores de R,R-monatina. Además, se prevé que la identificación de una L-triptófano aminotransferasa con una actividad incluso más baja para la producción de monatina también reduciría la cantidad de S,S- y R,R-monatina formada. Por último, pueden realizarse mejoras del enzima D-aminotransferasa, o pueden utilizarse enzimas D-aminotransferasa alternativos, que incrementarían la especificidad de sustrato para R-PM frente a S-PM. Lo anterior incrementaría también la formación del producto R,R, en caso de que se deseara.

Se repitieron los experimentos con aspartato racemasas con el fin de comparar la actividad de la aldolasa selectiva para R de SEC ID nº 22 con la actividad de la ProA aldolasa de *C. testosteroni*. Aproximadamente 50 µg de L-aminotransferasa purificada (TatA de *S. meliloti*), 1 mg de aspartato racemasa (BioCatalytics), 1 mg de D-aminotransferasa (AT-103, BioCatalytics), oxalacetato 5 mM como el aceptor de aminos y 50 µg de la aldolasa purificada apropiada. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado y se incubaron durante la noche a 30°C. Se determinó el porcentaje de cada estereoisómero utilizando la técnica de derivatización con FDAA indicada en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados en la Tabla 31, a continuación.

Tabla 31

Aldolasa	Monatina total (ppm)	% de S,S	% de R,R	% de R,S	% de S,R
SEC ID nº 22	211		72,7		27,3
<i>C. testosteroni</i>	422	30,2	38,5		31,3

La distribución de isómeros de ProA de *C. testosteroni* es consistente con los experimentos anteriores, mientras que al utilizar la aldolasa selectiva para R de SEC ID nº 22, el porcentaje de R,R es mucho más alto, se forman cantidades indetectables de S,S y la cantidad de S,R-monatina es más baja.

Tal como se indica en los Ejemplos 2 y 3, la D-alanina puede servir como donante de aminos para la transaminación de PM en monatina. Muchas L-aminotransferasas presentan la capacidad de utilizar el piruvato como aceptor de aminos en cierta medida y producir L-alanina. Debido a que las reacciones anteriormente indicadas utilizan concentraciones elevadas de piruvato, es probable que parte del piruvato se convierta en L-alanina. Por ejemplo, durante la transaminación del L-triptófano, el enzima HexAspC indicado en el Ejemplo 6 se ha encontrado que convierte 10% a 18% del piruvato (concentraciones iniciales de 50 a 200 mM) en L-alanina en 2 horas en ausencia de alfa-cetoglutarato. El enzima mostró una preferencia de 10 veces por el alfa-cetoglutarato en caso de hallarse presentes ambos aceptores de amino a concentraciones elevadas (>50 mM). AspC (descrito en el documento nº WO 03/091396 A2) también produjo cierta cantidad de L-alanina a partir de piruvato. Por lo tanto, se esperaba que pudiese omitirse la adición de alfa-cetoglutarato o de oxalacetato en las reacciones anteriormente indicadas y utilizar una alanina racemasa (EC 5.1.1.1) en lugar de glutamato o aspartato racemasa.

Los enzimas alanina racemasas fueron identificados por primera vez en *Brucella abortus* y en *Streptococcus faecalis* (Marr A.G. y Wilson P.W., Arch. Biochem. Biophys. 49:424-433, 1954; Wood W.A. y Gunsalus I.C., J. Biol. Chem. 190:403-416, 1951). El gen *dadB* en *Salmonella typhimurium* fue identificado como la fuente de actividad de alanina racemasa y pueden encontrarse varios cientos de homólogos en bases de datos genómicas. Otras fuentes conocidas de actividad de alanina racemasa son *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Bacillus cereus*. Un hongo basidiomiceto, *Lentinus edodes*, también contiene una alanina racemasa de amplia actividad. Se encuentra disponible comercialmente un homólogo termoestable de *Bacillus stearothermophilus* de Sigma-Aldrich (nº de catálogo A8936) y ha sido inmovilizado para aplicaciones comerciales (Inagaki K., Biochemistry 25:3268, 1986).

Producción de monatina con alanina racemasa

Se sometió a ensayo la producción de monatina utilizando la ProA aldolasa de *C. testosteroni*. Aproximadamente 50 µg de L-aminotransferasa purificada (TatA de *S. meliloti*), 1 mg de D-aminotransferasa (AT-103, BioCatalytics), piruvato como el aceptor de amino, 50 µg de aldolasa purificada y 70 µg de alanina racemasa obtenida de Sigma (St. Louis, MO) (número de catálogo A8936). Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado y se incubaron durante la noche. Se determinó el porcentaje de cada estereoisómero utilizando la técnica de derivatización con FDAA indicada en el Ejemplo 1. Se incluyeron controles sin racemasa. Se muestran los resultados en la Tabla 32, a continuación.

Tabla 32

Condiciones	Monatina total	% de S,S	% de R,S	% de R,R	% de S,R
Ala racemasa (1 hora)	4	66	21	12	1
Sin Ala racemasa (1 hora)	2,7	69	26	5	0

Ala racemasa (24 horas)	82,9	90	5	4	2
Sin Ala racemasa (24 horas)	170,3	89	5	4	2

Se observó tres veces más cantidad de R,R-monatina en el punto temporal de una hora en presencia de alanina racemasa que en la muestra en ausencia de alanina racemasa. Este resultado demuestra que resulta posible producir R,R-monatina utilizando la alanina racemasa. El porcentaje de R,R-monatina producido podría mejorarse utilizando una aldolasa que produjese selectivamente el precursor de la R-monatina, una L-aminotransferasa que no es activa o presenta una actividad limitada sobre el precursor de la R-monatina y una D-aminotransferasa que no presenta actividad o presenta actividad limitada sobre el indol-3-piruvato.

Ejemplo 10

D-fenilglicina aminotransferasa (D-4-hidroxifenilglicina aminotransferasa)

Tal como se muestra en la figura 3, resulta útil una aminotransferasa estereoinversora en una ruta biosintética para la producción de monatina. Por ejemplo, una D-fenilglicina aminotransferasa o un mutante de la misma podría producir R,R-monatina a partir de R-PM con L-glutamato como el donante de aminos.

(1) Síntesis por PCR de la D-hidroxifenilglicina aminotransferasa de *P. stutzeri* a partir de cebadores oligonucleótidos

El presente ejemplo describe métodos que se utilizaron para sintetizar 4D-hidroxifenilglicina aminotransferasa, un enzima estereoinversor que puede utilizarse para convertir el precursor de R-monatina en R,R-monatina utilizando el L-glutamato como donante de aminos.

Diseño de cebadores

La secuencia publicada (GenBank nº de acceso AY319935, secuencia de ácidos nucleicos; GenBank nº de acceso AAQ8290, secuencia de proteína) para la 4D-hidroxifenilglicina aminotransferasa de *Pseudomonas stutzeri* (4D-HPG AT) se utilizó como molde para el diseño de cebadores de PCR. Alternativamente se utilizó la 4-D-hidroxifenilglicina aminotransferasa de *Pseudomonas putida* (CAD42450 (proteína), AX467211 (nucleótidos)) como secuencia molde. Se diseñó un total de 34 cebadores directos y 35 cebadores inversos; los cebadores directos e inversos era 40-meros que compartían 20 pares de bases solapantes. Además, se diseñaron 2 cebadores externos con sitios de restricción 5' y extremos protuberantes para la clonación en los vectores pET28 y pET30 (Novagen, Madison, WI).

Cebadores externos de 4D-HPG AT de *P. stutzeri*: extremo N-terminal (con sitio NdeI):

5'-GGCCGGCATATGTCGATCCTTAACGACTACAAACGT-3' (SEC ID nº 19) y

extremo C-terminal (con sitio XhoI):

5'-GGAGGCTCGAGTCATGATTGGTTCCAGACAAATT-3' (SEC ID nº 20).

Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa

Se amplificó la secuencia génica de *P. stutzeri* utilizando los protocolos siguientes. La reacción de PCR primaria de 100 µl incluía 0,05 µM de cada uno de los 69 cebadores internos, 0,4 mM de cada dNTP, 10 U de polimerasa rTth XL (Roche, Indianapolis, IN), 0,625 U de polimerasa Pfu (Stratagene, La Jolla, CA), 1X tampón XL y Mg(OAc)₂ 1 mM. El programa de termociclador utilizado incluía un inicio en caliente a 94°C durante 3 minutos, 15 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 42°C durante 30 segundos y 68°C durante 15 segundos, seguido de 10 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos, seguido de 10 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto y 15 segundos. Tras los 10 ciclos finales, la muestra se mantuvo a 68°C durante 7 minutos y después se almacenó a 4°C. Este protocolo de PCR produjo una distribución de producto en ~0,5 kb en un gel de TAE al 0,8%-agarosa.

Se preparó la reacción secundaria de PCR utilizando la reacción de PCR primaria como molde. La reacción secundaria de PCR de 100 µl incluía 2,5 µl de la reacción de PCR primaria, 0,5 µM de cada uno de los 2 cebadores externos (con los sitios de restricción NdeI y XhoI), 0,4 mM de cada dNTP, 10 U de polimerasa rTth XL, 0,625 U de polimerasa Pfu, 1X tampón XL y Mg(OAc)₂ 1 mM. El programa del termociclador utilizado incluía un inicio en caliente a 94°C durante 3 minutos, 10 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto 30 segundos, seguido de 15 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto 30 segundos. Tras las 15 repeticiones, la muestra se mantuvo a 68°C durante 7 minutos y después se almacenó a 4°C. Este protocolo de PCR produjo una banda de producto clara en ~1,4 kb en un gel de TAE al 0,8%-agarosa.

El producto de PCR se purificó en gel a partir del gel de TAE al 0,8%-agarosa utilizando el kit de extracción de gel de Qiagen (Valencia, CA). El producto se clonó con TOPO y se transformó en células TOP 10 siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se purificó el ADN plasmídico a partir de los transformantes resultantes utilizando el kit de miniprep spin de Qiagen y se cribaron para las inserciones correctas mediante digestión de restricción con *NdeI* y *XhoI*. Las secuencias de los plásmidos que aparentemente presentaban la inserción correcta se verificaron mediante secuenciación de ADN por terminación de cadena dideoxi con los cebadores universales directos e inversos de M13. De los 10 clones secuenciados, la totalidad presentaba por lo menos una mutación respecto a la secuencia deseada. El mejor clon presentaba una mutación de un único par de bases que resultaba en un cambio de aminoácido. La secuencia de dicho clon se corrigió utilizando el protocolo de mutagénesis QuickChange siguiendo las recomendaciones del fabricante (Stratagene, La Jolla, CA).

El clon TOPO corregido se digirió con los enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante (New England Biolabs, Beverly, MA) y se purificó en gel a partir de geles de TAE al 0,8%-agarosa utilizando el kit de extracción de gel de Qiagen. Se prepararon los vectores pET28 y pET30 mediante digestión con los enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, seguido del tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba y la purificación a partir de geles de TAE al 0,8%-agarosa utilizando el gel de extracción de gel de Qiagen.

Los vectores digeridos y la inserción se ligaron utilizando el kit de ligación Quick Ligation Kit de NEB (Beverly, MA). Se incubaron aproximadamente 50 ng de inserción tratada, 100 ng de vector tratado (proporción molar 3 a 1 de inserción a vector), 5 U de ADN ligasa de T4 y 1X tampón de ligación, durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de ligación se transformó en células químicamente competentes TOP10F' (Invitrogen). Se dejó que las células se recuperasen en 0,25 ml de SOC a temperatura ambiente durante 1 hora a 37°C bajo agitación a 225 rpm. Las células se sembraron en placas de LB que contenía canamicina (50 µg/ml). El ADN plasmídico se purificó a partir de los transformantes resultantes utilizando el kit miniprep spin de Qiagen y se cribaron para las inserciones correctas mediante digestión de restricción con *NdeI* y *XhoI*.

Expresión génica y ensayos

Se transformó el ADN plasmídico en el huésped de expresión *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI). Los cultivos se cultivaron y los plásmidos se aislaron utilizando el kit miniprep de Qiagen mediante digestión de restricción para confirmar la identidad.

La inducción en BL21(DE3) se llevó a cabo con D-4-hidroxifenilglicina aminotransferasa de *P. stutzeri* en los vectores pET28 (etiquetado con histidinas) y pET30 (sin etiquetas). Se llevó a cabo un estudio de curso temporal con cultivos cultivados en 250 ml de LB que contenía canamicina (50 mg/l) hasta una DO_{600} de entre 0,5 y 0,6, se indujeron con isopropil tiogalactósido ("IPTG") 100 mM y se muestrearon 0 y 3 horas después de la inducción. Se resuspendió un volumen apropiado de células de las 0 y 3 horas en 40 µl de tampón de dodecilsulfato sódico que contenía 2-mercaptoetanol, se calentaron a 95°C durante 10 min. y se enfriaron. Se analizaron alícuotas de dichas muestras de proteínas celulares totales mediante SDS-PAGE utilizando un gel de gradiente 4% a 15%.

Los extractos celulares también se prepararon a partir de cultivos de 3 horas mediante la suspensión de sedimentos celulares de 5 ml de cultivo en 0,625 ml de reactivo BugBuster™ de Novagen que contenía 0,625 µl de nucleasa benzoasa y 3 µl de cóctel inhibidor de proteasas juego nº 3 (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA) a temperatura ambiente durante 20 minutos bajo agitación suave y centrifugación a 16.000 x g para eliminar los residuos celulares. Los sobrenadantes (extractos celulares) se cargaron en geles de gradiente 4% a 15% para el análisis de las proteínas solubles celulares. En los casos en que se indica, la proteína se purificó utilizando cartuchos His-Bind 900 siguiendo los protocolos del fabricante (Novagen, Madison, WI) y se desalaron para eliminar el imidazol utilizando columnas PD-10 (G25 Sephadex, Amersham-Pharmacia).

(2) Aislamiento de organismos con D-fenilglicina aminotransferasa ("DPGAT")

Los organismos del género *Pseudomonas* y géneros similares, con una D-fenilglicina aminotransferasa estereoinversora (también denominada D-4-hidroxifenilglicina aminotransferasa) se aíslan de la manera siguiente. Se incuban muestras de suelo en placas Petri con el medio siguiente: (en cada litro) 15 g de agar, 3,4 g de KH_2PO_4 , 3,55 de Na_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 8 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg de extracto de levadura, 1 ml de solución 1000x de elementos traza (Balch W.E. et al., "Methanogens: reevaluation of a unique biological group", Microbiol. Rev. 43:260-296, 1979) y 1 g de D-fenilglicina (D-4-hidroxifenilglicina).

Se aislaron aislados mediante PCR para la presencia de aminotransferasa estereoinversora (los cebadores se diseñaron a partir de D-fenilglicina aminotransferasas conocidas) o se enriquecieron adicionalmente para la presencia de aminotransferasa estereoinversora de la manera siguiente: pueden cultivarse aislados a partir de las placas en medio líquido tal como anteriormente, sin el agar, a 30°C bajo agitación hasta una DO_{600} de aproximadamente 1,0. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se lavaron dos veces con NaCl al 0,85%. Una muestra de 10 mg (peso húmedo) se suspendió en 1 ml de tampón de fosfato potásico (pH 7,0) y D-fenilglicina 5 mM o D-4-hidroxifenilglicina. Se añadió ácido (aminooxi)acético 15 mM neutralizado a muestras por duplicado preparadas tal como se ha indicado anteriormente. Se midió mediante HPLC el consumo de D-fenilglicina

(o D-4-hidroxiglicina).

Los aislados capaces de degradar la D-fenilglicina (o D-4-hidroxifenilglicina) degradan a una velocidad más lenta en presencia de ácido (aminoxil)acético y fueron seleccionados para el análisis posterior. Se sometieron a ensayo los aislados, mediante PCR, para la presencia de una aminotransferasa estereoinversora (los cebadores se diseñaron a partir de D-fenilglicina aminotransferasas).

La presencia de la aminotransferasa estereoinversora se confirmó cultivando un cultivo en un medio líquido tal como se ha indicado anteriormente, recolectando las células y preparando un extracto en bruto sin células ("ESC") y realizando un ensayo para actividad de D-fenilglicina aminotransferasa o D-4-hidroxifenilglicina aminotransferasa. Se añadió ESC a una mezcla de reacción con las concentraciones finales siguientes: ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico ("CAPS") 0,1 M (pH 9,5), L-glutamato (sal sódica) 60 mM, benzoilformato 5 mM o 4-hidroxibenzoato y PLP 50 µM.

La reacción inversa se midió mediante la adición de ESC a una mezcla de reacción con las concentraciones siguientes: fosfato potásico 50 mM (pH 7,0), D-fenilglicina o D-4-hidroxifenilglicina 60 mM, α-cetoglutarato 5 mM y PLP 50 µM. Los ensayos se incubaron a 35°C y se extrajeron alícuotas en puntos temporales y se detuvieron mediante ebullición durante 2 minutos. El producto se cuantificó mediante el método de HPLC de Gil-Av E. et al., "Resolution of underivatized amino acids by reversed phase chromatography", J. Am. Chem. Soc. 102:5115-5117, 1980, o mediante los métodos indicados en el Ejemplo 1 dirigidos a la medición de la formación de glutamato.

Como alternativa a los métodos basados en PCR, la D-fenilglicina aminotransferasa estereoinversora se purificó a partir de las bacterias aisladas mediante técnicas convencionales de purificación de proteínas, incluyendo el fraccionamiento con sulfato amónico y la cromatografía de columna convencional. Tras la purificación de la proteína en un grado razonable, se utilizaron técnicas de microsecuenciación de péptidos o de secuenciación convencional de aminoácidos de tipo Edman (ver <http://golgi.harvard.edu/microchem/> para descripciones de los protocolos y equipos utilizados para este tipo de estudio). Se diseñaron cebadores degenerados basándose en la secuencia disponible del pariente más próximo de la fuente de proteína. A continuación se llevó a cabo PCR degenerada y paseo genómico siguiendo protocolos establecidos con el fin de aislar la secuencia codificante de la D-fenilglicina estereoinversora.

(3) Producción de monatina con DPGAT

Se utilizaron D-hidroxifenilglicina aminotransferasas, tal como se indica en (1) y (2), anteriormente, en extractos en bruto de proteínas libres de células o purificadas tal como se ha indicado en (1), anteriormente. Se prepararon tirosina (aromático) aminotransferasas de *S. meliloti* y de *R. sphaeroides* tal como se indica en el Ejemplo 1 del documento nº WO 03/091396 A2. Se preparó la ProA aldolasa de *Comamonas testosteroni* tal como se indica en el Ejemplo 4 del documento nº WO 03/091396 A2. Se llevaron a cabo ensayos de proteínas totales utilizando el ensayo de proteínas de Bio-Rad siguiendo los protocolos del fabricante (Hercules, CA).

Las mezclas de reacción (volumen de 1 ml, ejecutadas por duplicado) contenían tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 8), MgCl₂ 2 mM, piridoxal 5'-fosfato ("PLP") 0,05 mM, piruvato sódico 200 mM, α-cetoglutarato sódico 5 mM, aproximadamente 280 µg/ml de TatA de *S. meliloti* suministrado en un extracto celular, 100 µl/ml de extracto celular de D-hidroxifenilglicina aminotransferasa o 1 mg/ml de D-hidroxifenilglicina aminotransferasa purificada y aproximadamente 100 µg/ml de ProA aldolasa proporcionada en forma de un extracto celular. Se añadió triptófano sólido a una concentración de 10,2 mg/ml. Se prepararon controles negativos sin D-hidroxifenilglicina aminotransferasa. Las muestras se incubaron a 30°C bajo agitación suave durante ~1 hora o durante la noche. Las muestras se centrifugaron para eliminar los precipitados, se filtraron a través de jeringa y se almacenaron a -80°C previamente al análisis para monatina utilizando el método de CL/EM/EM indicado en el Ejemplo 1.

Se prepararon D-hidroxifenilglicina aminotransferasas con actividad mejorada para la producción de monatina utilizando técnicas de mutagénesis conocidas por el experto en la materia, entre ellas: PCR mutagénica, pase a través de cepas mutagénicas, mutagénesis dirigida a sitio, PCR con tendencia a errores, o mediante métodos tales como la reorganización de ADN u otras tecnologías de evolución dirigida. Las D-hidroxifenilglicina aminotransferasas mejoradas se seleccionaron mediante el crecimiento sobre medio mínimo con R,R-monatina como fuente de nitrógeno. Inicialmente, la selección se basó en el crecimiento, pero debido a que se seleccionan aminotransferasas mejoradas, el cribado se basó en la velocidad de crecimiento. Es decir, se cultivaron las células con versiones mutadas del gen y el gen se expresó en medio mínimo con R,R-monatina como la fuente de nitrógeno. Las velocidades de crecimiento de las células con las versiones mutadas del gen se compararon con la versión no mutada. Aquellas células con un crecimiento más rápido se seleccionaron y se analizó su aminotransferasa adicionalmente. La D-hidroxifenilglicina aminotransferasa puede mutagenizarse adicionalmente hasta obtener la actividad deseada.

(4) Ensayo de DPGAT

La versión sin etiquetas de His de la DPGAT se expresó tal como se ha indicado en (1), anteriormente, y se

utilizaron los extractos en los ensayos. Se prepararon ensayos que incluían fosfato potásico 100 mM, pH 7,0, D-fenilglicina 60 mM, α -cetoglutarato 5 mM y piridoxal-5'-fosfato 50 μ M. Los ensayos se iniciaron mediante la adición de 100 μ l de extracto, preparados tal como se ha indicado anteriormente en el presente ejemplo, por cada ml de volumen de ensayo. Se extrajeron muestras en varios puntos temporales (0, 1, 2, 5, 10, 30, 60 y 120 minutos) y se detuvieron con un volumen igual de ácido fórmico 2 M. También se extrajo una muestra tras la incubación durante la noche (~1.200 minutos). Se analizaron las muestras para la producción de glutamato mediante el método OPA indicado en el Ejemplo 1. Se resumen los resultados en la Tabla 33, a continuación.

Tabla 33

Condición	Tiempo (minutos)	μ moles/ml de L-glutamato
Sin sustrato	0	0,033
	1	0,033
	2	0,033
	5	0,035
	10	0,034
	30	0,036
	60	0,044
	120	0,038
	~1200	0,058
	D-fenilglicina	0
1		0,112
2		0,169
5		0,315
10		0,387
30		0,892
60		1,304
120		1,514
~1200		1,056

El enzima claramente presentaba alguna actividad sobre la D-fenilglicina. También se sometió a ensayo la actividad del enzima sobre la R,R-monatina. Se preparó el ensayo tal como se ha indicado anteriormente y se incluyó R,R-monatina a una concentración de 60 mM. Se indican los resultados en la Tabla 34, a continuación.

Tabla 34

Condición	Tiempo (minutos)	μ moles/ml de L-glutamato
R,R-monatina	0	0,041
	1	0,040
	2	0,041
	5	0,041
	10	0,041
	30	0,042
	60	0,041
	120	0,040
	~1.200	0,045

Aparentemente no había ninguna actividad detectable sobre la R,R-monatina. Sin embargo, se prevía que los métodos aleatorios o de SDM indicados en la presente parte (3) del presente Ejemplo podrían utilizarse para mejorar la actividad de transaminación sobre la R,R-monatina o R-PM. Por ejemplo, se llevaron a cabo la cristalización y el análisis preliminar del enzima de *P. stutzeri* (Kongsaree P. et al., Acta Cryst. D59:953-954, 2003). Tras la publicación de la estructura, pueden llevarse a cabo experimentos de conexión ("docking") utilizando software tal como Accelrys con el fin de determinar en qué sitios los impedimentos estéricos o la repulsión iónica están bloqueando la unión de la R,R-monatina al sitio de unión al sustrato D-hidroxifenilglicina. La D-hidroxifenilglicina es un aminoácido bastante grande, al igual que la R,R-monatina. Ambos compuestos presentan regiones hidrofóbicas y grupos hidroxilo. Pueden llevarse a cabo modificaciones del bolsillo de unión, tal como se indica en el Ejemplo 6, para que el enzima se ajuste mejor a los sustratos ácido dicarboxílico. Por ejemplo, puede modificarse un residuo próximo al segundo grupo carboxilo para formar una base tal como arginina. Además, el gen de *P. putida* indicado en la parte (1) y los genes adicionales que pueden aislarse tal como se indica en (2) pueden utilizarse como moldes para la reorganización génica. Además, el gen de *P. stutzeri* ensamblado en el presente Ejemplo puede mutagenizarse utilizando la reorganización de oligonucleótidos u otros métodos de mutagénesis aleatoria y cribarse tal como se indica en (3), anteriormente.

Ejemplo 11**Descubrimiento de un gen de D-metionina aminotransferasa**5 Antecedentes

Se cree que la D-metionina-piruvato aminotransferasa (EC 2.6.1.41) es otro ejemplo, aunque raro, de una transaminasa estereoinversora. Dicho enzima cataliza la conversión reversible de la D-metionina y el piruvato en L-alanina y 4-metiltio-2-oxobutanoato. El oxalacetato, fenilpiruvato, 2-oxobutirato, 2-oxovalerato, 2-oxoheptanoato, glioxilato y oxoglutarato también pueden ser utilizados como aceptores de amino.

La transaminación de la D- o L-metionina se cree que forma parte de una ruta a la producción de etileno en las plantas superiores (col, tomate, manzana, guisante, plátano o cacahuete), así como en microorganismos del suelo (*Escherichia coli*, *Pseudomonas pisi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus mycoides*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila* B12E, *Rhizobium trifolii* N2P7, *Penicillium digitatum*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Corynebacterium* D7F) (Billington D.C. et al., *Biochem. J.* 182:827-836, 1978). En las bacterias, la L-metionina se utiliza típicamente como sustrato en los estudios de producción de etileno y se cree que los enzimas de amplia especificidad, tales como TyrB o AspC de *E. coli* son responsables de la transaminación. Sin embargo, Primrose S.B., *J. Gen. Microbiol.* 95:159-65, 1976, y Primrose S.B., *J. Gen. Microbiol.* 98:519-528, 1977, han demostrado que la cepa *E. coli* SPA O (colección de cultivos de la University of Warwick) produce prácticamente tanto etileno a partir de la D-metionina como a partir de L-metionina en cultivos por lotes. Debido a que no se ha identificado ninguna D-aminotransferasa de amplia especificidad en *E. coli*, una posible explicación podría ser que la D-aminoácido deshidrogenasa de *E. coli* (codificada por el gen *dadA*) convierte la D-metionina en 4-metiltio-2-oxobutanoato. También resulta posible que exista una metionina racemasa en *E. coli*; sin embargo, este enzima no ha sido descrito en la literatura.

En contraste con *E. coli*, en los ramilletes de la coliflor (preparaciones de extractos mitocondriales) y en semillas de cacahuete en germinación, la producción de etileno era más elevada al suministrar D-metionina y piruvato al extracto enzimático que L-metionina y piruvato (Mapson L.W. et al., *Biochem. J.* 115:653-661, 1969; Durham J.I. et al., *Phytochemistry* 12:2123-2126, 1973). Por lo tanto, la posibilidad de una combinación de metionina racemasa y una L-aminotransferasa no está respaldada por los datos. La actividad de una deshidrogenasa se descartó mediante diálisis de los extractos celulares de la coliflor: no se observó presencia de NAD en las mezclas de ensayo. Se descartó la actividad de oxidasa ya que no se observaba consumo de oxígeno y no había requerimiento de FAD. Se purificó la D-metionina aminotransferasa a partir de tejidos del cacahuete, demostrando que era dependiente de PLP y demostrando que era independiente de la actividad de la L-metionina aminotransferasa. Existe la posibilidad de que estas D-metionina-piruvato aminotransferasas de hecho produzcan D-alanina como producto secundario (de manera similar a los enzimas de *Bacillus* indicados en los Ejemplos 2 y 3) y que las células contengan alanina racemasa para reciclar la D-alanina en L-alanina (o un donante de aminos análogo). En cualquier caso, el descubrimiento de la D-aminotransferasa de amplia especificidad de las plantas superiores resulta ventajoso para el desarrollo de procedimientos de producción de R,R-monatina o S,R-monatina.

Descripción general experimental

Se purificó parcialmente D-metionina aminotransferasa a partir de ramilletes de coliflor y embriones de cacahuete en germinación utilizando protocolos de cromatografía estándares y un sistema AKTA Explorer de Pharmacia. Se determinaron las secuencias de proteínas homólogas mediante técnicas de identificación de huella de CL/EM/EM y búsquedas en bases de datos realizadas por las instalaciones de Harvard Microchemistry. Se clonaron las regiones codificantes de los genes vegetales a partir de una biblioteca de ADNc utilizando protocolos de PCR estándares o mediante la síntesis del gen tal como se indica en el Ejemplo 10(1).

Alternativamente, se construyeron bibliotecas de expresión de ADNc (Stratagene, La Jolla, CA) a partir de tejido de coliflor o semillas de cacahuete cultivadas en presencia de D-metionina (y productor de etileno). Se transformaron las bibliotecas en auxótrofos para metionina de *E. coli* del Genetic Stock Center (Yale) de *E. coli*, tal como las cepas RC519 o AB1931. Los plásmidos de cepas capaces de crecimiento sobre medio mínimo que contiene D-metionina contienen la región codificante de interés (ver ele Ejemplo 4(1), una técnica de cribado análoga).

Tras obtener las regiones codificantes de interés y expresarlas en una cepa de laboratorio estándar de *E. coli*, los productos génicos resultantes pueden utilizarse en ensayos para producir R,R-monatina, tal como se indica en el Ejemplo 10(3) en lugar de la D-hidroxifenilglicina aminotransferasa, con la excepción de que el pH es 7,5 (el pH óptimo para la aminotransferasa). En el caso de que la D-metionina aminotransferasa presente un requisito estricto de sustratos donantes de D-aminoácido, el enzima puede utilizarse para producir R,R-monatina tal como se indica en los Ejemplos 2 y 3. El gen puede mutagenizarse y cribarse para actividad incrementada tal como se indica en el Ejemplo 10(3).

MétodosAislamiento a partir de col

5 Se extrajeron cuatrocientos gramos de ramilletes recién recolectados de coliflor utilizando 400 ml de una solución de sacarosa/tampón a 4°C (sacarosa 0,4 M y tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4) mediante maceración y mezcla alternantes en un mezclador. Se eliminaron los residuos celulares mediante filtración a través de estopilla y la solución resultante se centrifugó a 40.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El material sólido (que contiene orgánulos mitocondriales) se resuspendió en 20 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, y se extrajeron los enzimas con 200 ml de acetona fría (-30°C). La suspensión se centrifugó nuevamente y el precipitado se secó utilizando un Savant Speed Vac. El material sólido se disolvió en tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, y la acetona residual se eliminó utilizando una columna PD-10.

15 Se sometió a ensayo la actividad de aminotransferasa mediante incubación de la preparación de enzima con D-metionina 5 mM, piruvato 1 mM, PLP 0,05 mM y EDTA 2 mM en tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4. Los ensayos se llevaron a cabo a 25°C durante 16 horas. Se midió el 4-metiltio-2-oxobutanoato mediante la formación del derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona utilizando CL/EM (m/z de 328) y la metodología similar indicada en el Ejemplo 1. Se preparó una solución al 0,4% (p/v) de 2,4-dinitrofenilhidrazina en ácido sulfúrico 2 M y se añadió un medio volumen a la mezcla de ensayo tras la incubación. Se mezcló la mezcla bajo agitación suave a 30°C durante 30 minutos y se recolectó el precipitado mediante centrifugación y se analizó mediante CL/EM. Las fracciones de proteínas separadas mediante técnicas cromatográficas estándares se sometieron a ensayo para actividad de una manera similar aunque el coproducto alanina se midió mediante la técnica de derivatización post-columna con OPA indicada en el Ejemplo 1.

25 Aislamiento a partir del cacahuete (*Arachia hypogea* L. cv. Starr)

El enzima D-metionina aminotransferasa de homogenado de embriones de cacahuete en germinación (sin cotiledones) se purificó siguiendo el método de Durham J.I. et al., *Phytochemistry* 12:2123-2126, 1973. Se utilizaron agentes reductores durante la preparación de los extractos en bruto para estabilizar los enzimas y se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación a 33.000 x g. Una fracción de sulfato amónico al 35-50% se purificó adicionalmente mediante incubación a temperatura baja y mediante separación de las proteínas en el precipitado. El sobrenadante se fraccionó adicionalmente utilizando acetona. A continuación, los reservorios activos se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel (Sephadex 200 G.E. Healthcare, Piscataway, NJ).

35 A medida que las fracciones de proteína se enriquecieron en proteína transaminasa, se utilizó la electroforesis en gel 2D para separar el enzima de interés para la microsecuenciación. Tras elucidar las regiones codificantes homólogas en secuencias de plantas depositadas en el NCBI, la proteína D-aminotransferasa se produjo recombinantemente en *Escherichia coli* utilizando técnicas estándares de biología molecular. Se espera que los extractos celulares de ramilletes de coliflor o de semillas de cacahuete o los enzimas homólogos producidos recombinantemente puedan utilizarse en la producción de R,R-monatina tal como se indica en el Ejemplo 10(3) (en el caso de una transaminasa estereoinversora) o en los Ejemplos 2 y 3 (en el caso de una D-aminotransferasa de amplia especificidad).

Ejemplo 1245 **L-alanina aminotransferasa/alanina racemasa/D-alanina aminotransferasa**

La figura 8 ilustra la ruta biosintética para producir R,R-monatina enriquecida estereoisoméricamente a partir de L-triptófano utilizando L-aminoácido aminotransferasas (tales como L-aromático aminotransferasas, L-alanina aminotransferasas y/o L-triptófano aminotransferasas), una aldolasa específica de R, una alanina racemasa y una D-alanina aminotransferasa.

En el Ejemplo 6 se describe una aminotransferasa específica de triptófano. Alternativamente, se preparan tirosina (aromático) aminotransferasas de *S. meliloti* y de *R. sphaeroides* tal como se indica en el Ejemplo 1 del documento n° WO 03/091396 A2. Se preparó ProA aldolasa de *Comamonas testosteroni* tal como se indica en el Ejemplo 4 del documento n° WO 03/091396 A2. Los ensayos de proteínas totales se llevaron a cabo utilizando el ensayo de proteínas de Bio-Rad siguiendo los protocolos del fabricante (Hercules, CA). Se obtuvo alanina racemasa de Sigma (St. Louis, MO) (número de catálogo A8936). La D-alanina aminotransferasa se obtuvo de BioCatalytics (Pasadena, CA) (número de catálogo AT-103).

60 Las L-alanina aminotransferasas se encuentran ampliamente distribuidas en eucariotas, bacterias y arqueobacterias. Se ha identificado (basándose en la homología de secuencias) que los organismos siguientes contienen una L-alanina aminotransferasa (EC 2.6.1.2): *Arabidopsis thaliana*, *Ashbya gossypii*, *Azotobacter vinelandii*, *Bifidobacterium longum*, *Caenorhabditis elegans*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cryptococcus neoformans*, *Debaryomyces hansenii*, *Homo sapiens*, *Hordeum vulgare*, *Kluyveromyces lactis*, *Magnaporthe grisea*, *Medicago truncatula*, *Mus musculus*, *Neurospora crassa*, *Oryza sativa*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pinus taeda*, *Pseudomonas putida*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*,

Rattus norvegicus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Takifugu rubripes*, *Trypanosoma cruzi*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Yarrowia lipolytica* y *Zea mays*. Además, muchas aminotransferasas presentan una actividad de alanina aminotransferasa de bajo nivel y con niveles elevados de L-glutamato y piruvato pueden convertirlos en L-alanina y α -cetoglutarato. Un enzima con baja actividad se mejora con técnicas de mutagénesis estándares, tales como la PCR con tendencia a errores y el pase a través de cepas mutagénicas o mediante técnicas de evolución dirigida. El gen para una L-alanina aminotransferasa se clona utilizando secuencias disponibles públicamente para diseñar cebadores y utilizando técnicas estándares para amplificar, clonar, expresar y purificar el gen/enzima.

Las mezclas de reacción (volumen de 1 ml, ejecutadas por duplicado) contenían tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 8), $MgCl_2$ 2 mM, piridoxal 5'-fosfato ("PLP") 0,05 mM, piruvato sódico 200 mM, α -cetoglutarato sódico 5 mM, aproximadamente 280 μ g/ml de TatA de *S. meliloti* suministrado en un extracto celular (u otra aminotransferasa específica de L-triptófano) (tal como en el Ejemplo 4, sección (5)), 100 μ g de una L-alanina aminotransferasa, 100 μ l/ml de extracto celular de alanina racemasa o 1 mg/ml de alanina racemasa purificada (Sigma), aproximadamente 280 μ g/ml de una D-alanina aminotransferasa de amplia especificidad suministrada en un extracto celular (los Ejemplos 15 y 18 presentan ejemplos de D-aminotransferasa que podrían funcionar en esta reacción) y aproximadamente 100 μ g/ml de ProA aldolasa proporcionada como extracto celular. Se añadió triptófano sólido a una concentración de 10,2 mg/ml. Se prepararon controles negativos sin alanina racemasa. Las muestras se incubaron a 30°C bajo agitación suave durante ~1 hora o durante la noche. Las muestras se centrifugaron para separar el precipitado, se filtraron a través de jeringa y se almacenaron a -80°C antes del análisis para monatina utilizando el método de CL/EM/EM indicado en el Ejemplo 1.

Ejemplo 13

25 Purificación de R,R-monatina a partir de una mezcla de reacción enzimática

El producto, la R,R-monatina, se purificó a partir de la mezcla de reacción siguiente. En 0,33 litros, se mezcló bicarbonato amónico 50 mM, pH 8,2, $MgCl_2$ 4 mM, piridoxal fosfato ("PLP") 0,05 mM, piruvato sódico 200 mM y D-triptófano 50 mM, a temperatura ambiente en una botella de vidrio de 500 ml hasta la disolución del triptófano. El líquido se burbujeó con nitrógeno durante varios minutos y después se añadieron 3,0 mg/ml de D-transaminasa de amplio rango de Biocatalytics, Inc. (Pasadena, CA) (nº de catálogo AT-103) y 0,1 mg/ml de aldolasa purificada de SEC ID nº 22. La mezcla de reacción se agitó suavemente a temperatura ambiente. La aldolasa se purificó tal como se indica en el Ejemplo 3. Se añadieron alícuotas adicionales de D-triptófano 50 mM en forma de sólido 15 horas y 22 horas después de la preparación inicial de la mezcla. El espacio de cabeza se enjuagó con nitrógeno tras cada adición. No se disolvió la totalidad del triptófano añadido pero la concentración se mantuvo en aproximadamente 50 mM. Tras 40 horas, se separó mediante filtración el triptófano sólido restante. El análisis de la mezcla de reacción mediante cromatografía líquida de detección fluorescente post-columna (ver el Ejemplo 1) demostró que la concentración de triptófano en la solución era 49 mM y la concentración de monatina era de 3,9 mM.

El producto monatina se purificó utilizando dos etapas de cromatografía de intercambio iónico. La solución de reacción filtrada en primer lugar se aplicó a una columna de resina BioRad AG50W-X8 (140 ml, capacidad de unión: 1,7 meq/ml). La columna se lavó con 2x150 ml de H_2O y después se eluyó con NH_4OH 1 M (1x450 ml, seguido de 3x150 ml). Las fracciones de NH_4OH se agruparon, se neutralizaron con HCl y se filtraron sucesivamente a través de filtros de 0,45 μ m de microfibras de vidrio Whatman (Maidstone, Inglaterra) y Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). A continuación, la solución clarificada se ultrafiltró utilizando una celda bajo agitación de ultrafiltración Amicon (Millipore, Billerica, MA) (modelo 8200) con un YM100 (MWCO: 100 kDa). El filtrado de la ultrafiltración se evaporó hasta aproximadamente 160 ml utilizando un evaporador rotatorio con un baño de agua templada. El líquido se clarificó nuevamente mediante filtración a través de filtros de microfibras de vidrio.

La solución resultante se aplicó a una columna Fast Flow DEAE Sepharose de 1 l (Amersham Biosciences) previamente convertida a la forma bicarbonato mediante lavado con 0,5 l de NaOH 1 M, H_2O y bicarbonato amónico 1,0 M, pH 8,3, seguido de un lavado adicional con H_2O . La solución se cargó a <2 ml/min. y la columna se lavó con agua a 3-4 ml/min. hasta que la absorbancia a 280 nm fuese <1. Se eluyó la R,R-monatina con bicarbonato amónico 50 mM, pH 8,3 (2,5 l). Esta fracción se evaporó utilizando un evaporador giratorio con un baño de agua templada. El jarabe resultante se incubó a 4°C durante varios días hasta la formación de cristales. Se recolectaron los cristales, se lavaron con etanol al 100% frío y se secaron en un desecador de vacío (0,38 g).

El análisis del producto sólido para pureza isomérica utilizando la derivatización con FDAA seguido del seguimiento de múltiples reacciones mediante CL/EM/EM (ver el Ejemplo 1) demostró que la muestra era 96,3% de R,R-monatina y 3,7% de S,R-monatina.

La muestra también se analizó para la pureza con respecto a otros compuestos orgánicos utilizando el método de monatina total (ver el Ejemplo 1). Se escaneó la absorbancia de UV entre 200 y 500 nm utilizando un detector de matriz de fotodiodos. Basándose en las áreas integradas de los picos, se calculó que la monatina constituía 96,1% del área (incluyendo tanto los picos de R,R como de S,R).

El análisis de la muestra mediante cromatografía líquida con detección fluorescente postcolumna demostró que la composición de aminoácidos de la muestra era de 98,8% monatina con cantidades traza de triptófano (1,2%) y alanina (0,02%).

- 5 Se llevó a cabo un análisis elemental en Midwest Microlab, LLC (Indianapolis, IN). El análisis indicó que la muestra contenía 1% de material no combustible (inorgánico) en peso y residuos de amonio y bicarbonato.

Ejemplo 14

10 Mejora de la conservación de la actividad de D-aminotransferasa durante la purificación

Procedimiento estándar para la purificación de HIS₆-D-alanina aminotransferasa de *B. sphaericus*

15 Partiendo de una placa de cultivo nuevo (agar LB con 50 µg/ml de canamicina) de BL21(DE3)::*B. sphaericus* dat pET30a (Ejemplo 18), las células se cultivaron en 5 ml de caldo de Luria-Bertani ("LB") con 50 µg/ml de canamicina, a 37°C y bajo 225 rpm durante 3 a 5 horas. A continuación, el cultivo se transfirió a razón de 0,25% (v/v) a matraces que contenían soluciones 1-6 de Novagen Overnight Express System II (EMD Bioscience, Madison, WI) más 50 µg/ml de canamicina. Las células se cultivaron a 37°C y 225 rpm durante la noche (16 a 18 horas). Al alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 8,0, se recolectaron las células mediante centrifugación en una centrífuga Beckman J25II (Fullerton, CA) con un rotor JS-16.25 a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento celular se lavó una vez con tampón EPPS 50 mM frío (pH 8,2) y las células se centrifugaron nuevamente. El sedimento celular lavado se recolectó y se utilizó inmediatamente o se congeló a -80°C hasta que se requirió para la purificación.

25 Para preparar el extracto libre de células que contenía la proteína HIS₆-D-alanina aminotransferasa de *B. sphaericus* (HIS6-BsphDAT), las células se suspendieron en 3 a 4 volúmenes de EPPS 50 mM, pH 8,2 y después se rompieron utilizando un homogenizador Microfluidics (Newton, MA) (3 pases a 20.000 psi), manteniendo una temperatura de la suspensión inferior a 15°C. Todas las etapas de purificación posteriores se llevaron a cabo a 4°C. El extracto celular se centrifugó durante 15 minutos a 15.000 x g para eliminar los residuos celulares. Se decantó el sobrenadante y se utilizó inmediatamente o se congeló a -80°C. Se aplicó una alícuota del extracto libre de células a columnas Novagen HIS-Bind (nº de catálogo 70971-4) o a una columna de resina Sepharose™ Fast Flow quelante de GE Healthcare (Piscataway, NJ) (forma níquel (II)) (en una proporción de entre 1,2 y 1,5 v/v) que había sido previamente equilibrada con EPPS 50 mM, pH 8,2, que contenía cloruro sódico 200 mM. Tras cargar la muestra, la columna se lavó/eluyó sucesivamente con 3 a 5 volúmenes del tampón de equilibrado, 3 a 5 volúmenes del tampón de equilibrado que contenía imidazol 25 mM, 3 a 5 volúmenes del tampón de equilibrado que contenía imidazol 100 mM y 3 a 5 volúmenes del tampón de equilibrado que contenía imidazol 500 mM. La proteína HIS₆-BsphDAT eluyó en el último lavado. El lavado de imidazol 500 mM se concentró 2 a 10X utilizando dispositivos de filtración-centrifugación Amicon (Billerica, MA), Centricon-70 o Ultra-15 (MWCO: 10 kDa). Se eliminó el imidazol y el cloruro sódico mediante pase a través de columnas de desalado PD10 desechables de GE Healthcare previamente equilibradas con EPPS 50 mM, pH 8,2, que contenía PLP 50 µM.

40 Se determinó la concentración de proteína de la solución desalada utilizando el kit de ensayo Pierce BCA (Rockford, IL). Se determinó la pureza de cada fracción y el nivel de expresión en la fracción de extracto libre de células utilizando un sistema de chip microcapilar Experion Pro260 de Bio-Rad (Hercules, CA) o mediante SDS-PAGE con geles de gradiente 4% a 15%. Típicamente, este procedimiento produce más de 300 mg de enzima (de 600 ml de cultivo Overnight Express II) que era puro al ~90% según el Software Experion. Se almacenaron alícuotas (1 a 5 ml) del enzima purificado a -80°C hasta la utilización.

Procedimiento mejorado

50 Se preparó un extracto libre de células tal como se ha indicado anteriormente. De manera similar se purificó la proteína His₆-BsphDAT con los cambios siguientes: todos los tampones utilizados para la rotura celular y la purificación de la proteína contenía fosfato potásico 100 mM, pH 7,8, con PLP 50 µM. La proteína se purificó exclusivamente con resina Sepharose™ Fast Flow quelante de GE Healthcare (forma níquel (II)).

Ensayo de actividad

60 La formación de indol-3-piruvato y alanina a partir de triptófano y piruvato se sometió a ensayo utilizando el enzima preparado mediante ambos procedimientos de purificación. Las mezclas de reacción contenían fosfato potásico 100 mM, pH 7,8, piridoxal fosfato 0,05 mM, piruvato sódico 100 mM, D-triptófano 40 mM y 0,03 a 0,1 mg/m de enzima purificado. El triptófano se añadió en forma de sólido. Todos los componentes excepto el enzima se mezclaron y se incubaron a 30°C hasta la disolución del triptófano. A continuación se añadió el enzima y la solución de reacción se incubó a temperatura ambiente. En puntos temporales predeterminados, las reacciones se muestrearon y las muestras se almacenaron inmediatamente sobre hielo y se diluyeron para el análisis de la alanina mediante el método de cromatografía líquida con detección fluorescente postcolumna indicado en el Ejemplo 1. La Tabla 34 a continuación, lista la actividad específica de las preparaciones de enzima como la concentración de alanina formada por cada mg de enzima por minuto.

Tabla 3: efecto del procedimiento de purificación mejorado sobre la actividad enzimática

Preparación de enzima	Actividad específica ($\mu\text{moles de alanina}(\text{mg})^{-1}(\text{min}^{-1})$)
His ₆ -BsphDAT purificado sin PLP 50 μM	2,9
His ₆ -BsphDAT purificado con PLP 50 μM	14,2

- 5 Los resultados mostrados en la Tabla 34 indican que la utilización de piridoxal fosfato durante el procedimiento de purificación resultaron en una actividad mejorada.

Ejemplo 15

10 Clonación de dos nuevas D-aminoácido aminotransferasas de *Bacillus*

Se produjeron recombinantemente varias D-aminoácido aminotransferasas de *Bacillus* (EC 2.6.1.21, también conocidas como D-alanina aminotransferasa o D-aspartato aminotransferasa) para la utilización en ensayos acoplados para la producción de R,R-monatina, tal como se indica en el Ejemplo 18. Estos enzimas son homólogos de las D-aminoaminotransferasas indicadas anteriormente para la producción de monatina (publicación de patente US nº 2004/0063174 y publicación de patente US nº 2005/282260). Un enfoque utilizado para la selección de cepas que podrían ser candidatos que contienen nuevas D-aminoácido aminotransferasas ("DAAT") fue revisar la lista de cepas de *B. sphaericus* depositadas en la ATCC y analizar algunas que habían sido depositadas anteriormente bajo diferentes nombres de especie. Se solicitaron los organismos siguientes de la ATCC: ATCC nº 4978 - *Bacillus sphaericus* depositado originalmente como *Bacillus rotans*, y ATCC nº 7063 - *Bacillus sphaericus*, depositado originalmente como *Bacillus serositidis* y ATCC nº 21538 - *Bacillus sphaericus*, originalmente depositado como *Bacillus circulans*. Las secuencias conocidas de la proteína DAAT de *Bacillus sphaericus*, *Bacillus halodurans*, *GeoBacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* se alinearon con el fin de obtener regiones de secuencia que estaban conservadas en las diversas proteínas DAAT. Se diseñaron cebadores en las regiones de conservación de secuencia de la proteína y se utilizaron para la amplificación mediante reacciones en cadena de la polimerasa ("PCR") de las secuencias del gen DAAT de las cepas de la ATCC indicadas anteriormente.

Se diseñaron cinco cebadores de PCR basándose en regiones conservadas en la alineación de las secuencias de DAAT de *Bacillus* publicadas (ver la alineación en la figura 9).

Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa

Se diseñaron cebadores tal como se ha indicado anteriormente basándose en regiones conservadas en la alineación de las DAAT. Las secuencias de los cebadores oligonucleótidos se indican a continuación:

5' GAAGACCGTGGTTATCAATTT 3' (SEC ID Nº65) (cebador directo),
 5' GATGGTATTTACGAAGTAATC 3' (SEC ID Nº66) (cebador directo),
 5' AGATTTAATATCACAAACGTAAC 3' (SEC ID Nº67) (cebador inverso),
 5' GCCAAGTAAAATTTAAGATTTA 3'(SEC ID Nº68) (cebador inverso),

5' ATTTGCTGGGTGCGTATAAAG 3' (SEC ID Nº69) (cebador inverso). Tamaños esperados de fragmentos de PCR basados en la alineación de combinaciones de cebadores con las DAAT conocidas: SEC ID nº 65 y SEC ID nº 67 - aprox. 380 pb; SEC ID nº 65 y SEC ID nº 68 - aprox. 395 pb; SEC ID nº 65 y SEC ID nº 69 - aprox. 534 pb; SEC ID nº 66 y SEC ID nº 67 - aprox. 336 pb; SEC ID nº 66 y SEC ID nº 68 - aprox. 346 pb; SEC ID nº 66 y SEC ID nº 69 - aprox. 510 pb.

Se utilizaron combinaciones de los cebadores anteriormente indicados para la PCR de colonias a partir de las cepas de la ATCC siguientes: ATCC nº 4978 - *Bacillus sphaericus*, originalmente depositada como *Bacillus rotans*; ATCC nº 7063 - *Bacillus sphaericus*, originalmente depositado como *Bacillus serositidis*, y ATCC nº 21538 - *Bacillus sphaericus*, originalmente depositado como *Bacillus circulans*.

Las tres cepas anteriormente indicadas se cultivaron sobre agar nutritivo a 30°C. Se raspó una única colonia de las placas y se resuspendió en 25 μl de agua destilada estéril. Las células se lisaron a 96°C durante 10 minutos. Se llevó a cabo la PCR de la manera siguiente: por cada reacción de 50 μl , 5 μl de células lisadas, 0,8 μl de cada cebador, 2 μl de dNTP, 0,8 μl de polimerasa Expand High Fidelity (Roche, Indianapolis, IN) y 1X tampón ExpandTM. Se llevó a cabo un inicio en caliente de 3 minutos a 94°C, seguido de 15 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 40°C durante 45 segundos y 72°C durante 2 minutos. Se llevaron a cabo quince ciclos más con una temperatura de hibridación incrementada de 45°C. Finalmente, se llevó a cabo una etapa de extensión de cadena durante siete minutos a 72°C. Varias combinaciones de cebadores proporcionan los tamaños de producto de PCR esperados para las cepas anteriormente indicadas. Los productos de PCR se clonaron utilizando el kit de clonación Zero Blunt TOPO® siguiendo los protocolos del fabricante (Invitrogen) y se secuenciaron mediante secuenciación de ADN por terminación de cadena dideoxi en Agencourt BioScience Corporation (Beverly, MA). Las secuencias tanto al nivel del

ADN como de aminoácidos se alinearon con la secuencia de DAAT de *B. sphaericus*. Se obtuvieron secuencias de DAAT/DAT válidas de la totalidad de las tres cepas: ATCC nº 4978, ATCC nº 7063 y ATCC nº 21538. Dos cepas específicas, ATCC nº 4978 y ATCC nº 7063, proporcionaron productos de PCR que al traducirse rindieron secuencias de proteína con cambios de residuo aminoácido claros al compararlos con la secuencia de D-aminotransferasa de *B. sphaericus*.

Se llevó a cabo un paseo genómico para obtener las secuencias génicas completas para las cepas de ATCC nº 4978 y ATCC nº 7063. Se cultivó la cepa ATCC nº 4978 en caldo nutritivo a 30°C.

La cepa ATCC nº 7063 se cultivó en agar nutritivo. Se preparó el ADN genómico de cada cepa utilizando el kit Genra (Genra Systems, Minneapolis, MN) siguiendo los protocolos del fabricante. Se construyeron cuatro bibliotecas para cada cepa siguiendo los protocolos del fabricante (kit universal BD GenomeWalker™, Clontech, www.Clontech.com). Se diseñaron cebadores específicos de gen siguiendo los protocolos del fabricante de GenomeWalker™ basándose en secuencias obtenidas utilizando combinaciones de cebadores conservadas (ver anteriormente), considerando un solapamiento de varios cientos de pares de bases homólogos con el producto original. Estos cebadores específicos de un gen se utilizaron posteriormente con cebadores adaptadores GenomeWalker™ para PCR de secuencias anteriores y posteriores en la cadena para completar los ORF de DAT.

Las secuencias de cebador oligonucleótido específicas de un gen se indican a continuación:

4978 DAT GSP1 Upstrm 5' GACATGCTCCTCCGCTGTAAATAATTCACC 3' (SEC ID nº 70)
 4978 DAT GSP1 Dwnstr 5' CCCTGGTGATGAAGTGAAGCCAGTATTAAC 3' (SEC ID nº 71)
 4978 DAT GSP2 Upstrm 5' ATCGCCAAATTGATAACCACGGTCTTC 3' (SEC ID nº 72)
 4978 DAT GSP2 Dwnstr 5' ACGTCCCGTAGCAAACCTTTGAAAAAGGTGT 3' (SEC ID nº 73)
 7063 DAT GSP1 Upstrm 5' TGCATAGAATCGGTTCGATATGTTTCAGTAGC 3' (SEC ID nº 74)
 7063 DAT GSP1 Dwnstr 5' GCGGAGAAACGATTACAGAAGGTTCTTCAA 3' (SEC ID nº 75)
 7063 DAT GSP2 Upstrm 5' GTCACCAAATTGATAACCACGGTCTTC 3' (SEC ID nº 76)
 7063 DAT GSP2 Dwnstr 5' GGTGTACTTTATACGCACCCAGCAAAT 3' (SEC ID nº 77)

Secuencias de cebador oligonucleótido adaptador:

AP1 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3' (SEC ID nº 78)
 AP2 5' ACTATAGGGCAGCGTGGT 3' (SEC ID nº 79)

Se llevaron a cabo varias PCR primarias GenomeWalker™ de la manera siguiente: por cada 50 µl de reacción, se añadieron 2,5 µl de biblioteca de ADN, 2 µl de cada cebador (AP1 (SEC ID nº 78) y el GSP1 apropiado), 1,5 µl de dNTP, 1X tampón de PCR XL, acetato de magnesio 1 mM y 1 µl de polimerasa RTTH (Roche, Indianapolis, IN). Se llevó a cabo un inicio en caliente de 3 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Se llevaron a cabo veinte ciclos adicionales con una temperatura de hibridación reducida de 48°C. Finalmente, se llevó a cabo una etapa de extensión de cadena durante siete minutos a 68°C. Se llevaron a cabo PCR secundarias Genome Walker™ de la manera siguiente: por cada 50 µl de reacción, se añadió 1,0 µl (de una dilución 1:50) de la reacción primaria de PCR, 2 µl de cada cebador (AP2 (SEC ID nº 79) y el GSP2 apropiado), 1,5 µl de dNTP, 1X tampón de PCR XL, acetato de magnesio 1 mM y 1 µl de polimerasa RTTH. Se llevó a cabo un inicio en caliente de 3 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto. Se llevaron a cabo quince ciclos adicionales con una temperatura de hibridación reducida de 48°C. Finalmente, se llevó a cabo una etapa de extensión de cadena durante siete minutos a 68°C.

Varias bibliotecas proporcionaron productos de PCR de tamaño comprendido entre ~200 pb y ~1,5 Kb. Los productos de PCR se clonaron mediante TOPO (tal como anteriormente) y se secuenciaron mediante secuenciación de ADN por terminación de cadena dideoxi en Agencourt BioScience Corporation (Beverly, MA); estas nuevas secuencias se alinearon con secuencias iniciales obtenidas utilizando las combinaciones de cebadores conservadas y se identificaron los codones de inicio y de parada. De esta manera se obtuvieron los ORF completos de DAAT. Se diseñaron nuevas parejas de cebadores (con sitios de restricción para la clonación) basadas en las secuencias de DAAT completas específicas para amplificar por PCR el gen DAAT entero de las cepas ATCC nº 4978 y nº 7063, individualmente.

Se indican las secuencias de los cebadores oligonucleótidos a continuación:

ATCC4978DAATNde1F 5' GGCCTTGGCATATGAGTTATAGCTTATGGAATGACC 3' (SEC ID nº 80)
 ATCC4978DAATBamH1R 5' GGCTTAAGGATCCTTATGCGCGAATACCTTTTGGG 3' (SEC ID nº 81)
 ATCC7063DAATNde1F 5' GGCCTTGGCATATGAGCTACACTTTATGGAATGA 3' (SECID nº 82)
 ATCC7063DAATBamH1R2a 5' GGCCAAGGATCCGCTACCCACTAATCATTAGA 3' (SEC ID nº 83)

Las regiones codificantes de los genes DAAT de ATCC nº 4978 y de ATCC nº 7063 se amplificaron utilizando el protocolo de PCR siguiente. En una reacción de 50 µl, se añadieron 3 µl de ADN genómico, 0,8 µl de cada cebador,

2 µl de dNTP, 0,8 µl de polimerasa Expand High Fidelity (Roche, Indianapolis, IN), 1X tampón Expand™ con Mg y 0,2 µl de polimerasa Pfu (Stratagene, La Jolla, CA). El programa de termociclador utilizado incluía un inicio en caliente a 94°C durante 3 minutos, seguido de 8 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos. Se llevaron a cabo veintidós ciclos posteriores con una temperatura de hibridación de 58°C. Finalmente, se llevó a cabo una etapa de extensión de cadena durante siete minutos a 72°C. Se obtuvieron productos de PCR limpios del tamaño correcto (aproximadamente 850 pb) para ambas cepas.

Los productos de PCR para los genes DAAT de ATCC nº 4978 y ATCC nº 7063 se purificaron utilizando el kit de purificación por PCR QIAquick de Qiagen (Valencia, CA) y se digirieron con *NdeI* y *BamHI* en tampón de *BamHI* (New England Biolabs, Ipswich, MA). Se purificaron los vectores digeridos con *NdeI* y *BamHI* (pET28 y pET30) y la inserción utilizando el kit de extracción de gel QIAquick de Qiagen. Las ligaciones se llevaron a cabo utilizando el kit de ligación de ADN "Rapid DNA Ligation" de Roche (Roche) y se purificaron utilizando el kit de purificación por PCR QIAquick. Las ligaciones se transformaron en *Escherichia coli* DH10B utilizando una cubeta de 0,2 cm y un sistema Gene Pulser II de Bio-Rad tal como se indica en el manual de electroporación de Bio-Rad. Se dejó que las células se recuperasen en 900 µl de medio SOC durante 30 minutos a 37°C a 225 rpm. Las células se sembraron en placas con LB-agar que contenía canamicina (50 µg/ml). El ADN plasmídico se purificó utilizando un kit miniprep spin de Qiagen y se cribaron para las inserciones correctas mediante PCR y digestión de restricción con *NdeI* y *BamHI*. Las secuencias de los plásmidos que aparentemente presentaban la inserción correcta se verificaron mediante secuenciación de ADN por terminación de cadena dideoxi en Agencourt BioScience Corporation (Beverly, MA). Los análisis de secuencias verificaron la secuencia codificante de los genes DAAT de ATCC nº 4978 y de ATCC nº 7063, que produjeron las secuencia de ADN de SEC ID nº 84 (secuencia de ADN de DAAT ATCC nº 4978) y SEC ID nº 85 (secuencia de ADN de DAAT ATCC nº 7063) y la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 86 (secuencia de aminoácidos de DAAT ATCC nº 4978) y SEC ID nº 87 (secuencia de aminoácidos de DAAT de ATCC nº 7063).

Las alineaciones de los dos nuevos DAAT de ATCC nº 4978 y de ATCC nº 7063 con el DAAT de *B. sphaericus* (clonado en el Ejemplo 18) se muestran en la figura 10.

Los presentes inventores obtuvieron nuevas D-aminotransferasas de las cepas ATCC nº 4978 y ATCC nº 7063 con secuencias de proteínas que presentan diferentes cambios de residuos aminoácidos en comparación con la D-aminotransferasa de *B. sphaericus*. Los DAAT de ATCC nº 4978 y ATCC nº 7063 presentan únicamente una identidad de 72% y 67% respecto a DAAT de *B. sphaericus* (ATCC nº 10208). Aunque ambas cepas se listan actualmente como *B. sphaericus* en la ATCC, se depositaron como *B. rotans* y *B. serositudis*. Basándose en las alineaciones de secuencias y las diferencias subrayadas entre estas dos nuevas DAAT y la DAAT de *B. sphaericus*, se identificaron varios residuos candidatos que pueden evaluarse para su papel (individualmente o en combinación) en el incremento de la actividad de DAAT en la biosíntesis de la R,R-monatina, en éstas además de en otras secuencias de DAAT.

Ejemplo 16

Expresión génica y ensayos para las proteínas DAAT de ATCC nº 4978 y de ATCC nº 7063

Las nuevas DAAT de ATCC nº 4987 y de ATCC nº 7063, tal como se indica en el Ejemplo 15 (en vectores pET) se transformaron en el huésped de expresión *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI). Los cultivos se cultivaron utilizando los protocolos indicados anteriormente y los plásmidos se aislaron utilizando el kit miniprep de Qiagen y se analizaron mediante digestión de restricción, tal como se ha indicado anteriormente, para confirmar la identidad de los plásmidos.

La inducción del gen DAAT típicamente se llevó a cabo en medio LB que contenía canamicina (50 µg/ml). Las células se cultivaron hasta una DO₆₀₀ de entre 0,4 y 0,8 a 37°C, se indujeron con IPTG (isopropil tiogalactósido) 0,1 mM y se muestrearon 3-4 horas después de la inducción. Se prepararon extractos celulares según el protocolo adjunto al reactivo BugBuster™ de Novagen (con adición de nucleasa benzoasa y cóctel inhibidor de proteasas completo de Roche). Se obtuvieron proteínas solubles del peso molecular predicho, según el SDS-PAGE, para los productos génicos de ATCC nº 4978 y de ATCC nº 7063 en los vectores pET. Se observaron niveles elevados de proteínas solubles utilizando constructos sin etiquetas de His (pET30). Se separaron las proteínas solubles en los extractos celulares en una estación automática de electroforesis Experion de BioRad Laboratories (Hercules, CA) y se analizaron para la concentración y el porcentaje de expresión utilizando el software Experion versión 1.1.98.0.

Se analizaron los extractos de proteínas de células con constructos sin etiquetas (pET30) para la actividad de D-aminotransferasa mediante el seguimiento de la producción de alanina a partir de piruvato y D-triptófano (o R,R-monatina) utilizando el protocolo siguiente. Se llevaron a cabo reacciones de 500 µl por duplicado, a menos que se indique lo contrario posteriormente, en tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7,5), piridoxal fosfato 80 µM, piruvato sódico 25 mM y D-triptófano o R,R-monatina 50 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de extractos libres de células (4978 o 7063) o enzima purificado (*B. sphaericus*) y se incubaron durante 15 minutos a 2 horas a 30°C, bajo agitación suave. Se añadió aproximadamente el mismo nivel de proteínas totales (1,0 mg), a menos que se indique lo contrario posteriormente, en cada ensayo con fines comparativos. Se utilizó aminotransferasa de *B.*

sphaericus purificada (ATCC nº 10208) como enzima de referencia. Se añadió ácido fórmico hasta una concentración final de dos por ciento para detener la reacción y la proteína precipitada se separó mediante centrifugación. También se llevaron a cabo reacciones de control sin proteína añadida. Se detectó alanina utilizando la derivatización con OPA tal como se indica en el Ejemplo 1. Los resultados de medias de las reacciones por duplicado se muestran en las Tablas 35 y 36, a continuación.

Tabla 35: actividad de transaminación de D-aminotransferasas de ATCC nº 4978 y de ATCC nº 7063 (15 min.)

D-aminotransferasa	Alanina (mM)	
	D-triptófano como sustrato	R,R-monatina como sustrato
ATCC nº 4978	7,78	0,32
ATCC nº 7063	0,28	0,025
<i>B. sphaericus</i> (no etiquetado)	11,93	3,57

Tabla 36: actividad de transaminación de D-aminotransferasas de ATCC nº 4978 y de ATCC nº 7063 (2 horas)

D-aminotransferasa	Alanina (mM)	
	D-triptófano como sustrato	R,R-monatina como sustrato
ATCC nº 4978	16,46	2,33
ATCC nº 7063	2,51	0,21
<i>B. sphaericus</i> (no etiquetado)	13,73	12,23

De esta manera, los presentes inventores demostraron que las D-aminoácido aminotransferasas de ATCC nº 4978 y de ATCC nº 7063 en efecto presentan actividad de D-aminotransferasa y presentan la capacidad de producir R,R-monatina. La actividad de la DAAT de ATCC nº 4978 era más elevada que la observada para la DAAT de ATCC nº 7063. No pudo realizarse una comparación cuantitativa entre 4978 y *B. sphaericus* ya que 4978 no había sido purificado.

Ejemplo 17

Producción de R,R-monatina utilizando la DAAT de ATCC nº 4978

También se sometió a ensayo la aminotransferasa de ATCC nº 4978 para la capacidad de producir monatina a partir de D-triptófano (tal como en el Ejemplo 3). Por cada 1 ml de mezcla de reacción se añadió lo siguiente: aproximadamente 50 µg de aldolasa (ProA aldolasa de *C. testosteroni* o la aldolasa de SEC ID nº 22, purificada), MgCl₂ 4 mM, D-triptófano 50 mM (suministrado en forma de sólido), 1,0 mg de D-aminotransferasa, piruvato sódico 100 mM, tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5 y PLP 0,05 mM. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, con controles negativos en los que no se había añadido aminotransferasa. Las muestras se incubaron durante diversos periodos de tiempo a 30°C bajo agitación suave. Los únicos estereoisómeros detectados al producir monatina utilizando dichos métodos eran R,R y S,R. Se estimó la monatina total y el porcentaje de R,R-monatina tal como se indica en el Ejemplo 1 y se listan en las Tablas 37 a 39, a continuación. Los resultados mostrados en cada una de las Tablas 37 a 39 son valores medios de reacciones por duplicado.

Tabla 37: comparación entre las D-aminotransferasas de *B. sphaericus* y ATCC nº 4978 respecto a la producción de monatina utilizando aproximadamente 50 µg de ProA de *C. testosteroni*

D-aminotransferasa	Monatina total (mg por cada g de proteína DAT) 15 minutos	Monatina total (mg por cada g de proteína DAT) 30 minutos	Monatina total (mg por cada g de proteína DAT) 1 hora	Monatina total (mg por cada g de proteína DAT) 2 horas
ATCC nº 4978	419,3	598	1.017	1.348
<i>B. sphaericus</i> (etiquetado)	46,5	128	232	241

Tabla 38: comparación entre las D-aminotransferasas de *B. sphaericus* y ATCC nº 4978 respecto a la producción de monatina utilizando aproximadamente 50 µg de ProA de *C. testosteroni*

D-aminotransferasa	% de R,R-monatina 15 minutos	% de R,R-monatina 30 minutos	% de R,R-monatina 1 hora	% de R,R-monatina 2 horas
ATCC nº 4978	48,9	38,4	34,4	33,25
<i>B. sphaericus</i> (etiquetado)	72,3	63,4	56,1	53,5

Tabla 39:

D-aminotransferasa	Monatina total (mg por cada g de proteína DAT) 2 horas	% de R,R-monatina 2 horas
ATCC n° 4978	501	92,1
<i>B. sphaericus</i> (etiquetado)	201	95,6

De esta manera, los presentes inventores demuestran que la D-aminoácido aminotransferasa de la ATCC n° 4978 presenta la capacidad de producir R,R-monatina. La actividad de la DAAT de la ATCC n° 4978 al comparar la producción de monatina total en términos de mg de proteína por cada gramo de proteína, era más elevada que la observada para la DAAT de *B. sphaericus*. La utilización de una aldolasa específica de R de SEC ID n° 22 claramente produjo una mejoría en el porcentaje de R,R-monatina formado en comparación con la cantidad de monatina total producida.

Ejemplo 18

Clonación de D-aminoácido aminotransferasas de *Bacillus* publicadas

Se produjeron recombinantemente varias D-aminoácido aminotransferasas de *Bacillus* (EC 2.6.1.21, también conocidas como D-alanina aminotransferasa o D-aspartato aminotransferasa) para la utilización en ensayos acoplados para la producción de R,R-monatina. Estos enzimas son homólogos respecto a las D-aminotransferasas indicadas anteriormente para la producción de monatina (publicación de patente US n° 2004/0063175 y publicación de patente US n° 2005/282260).

Cepas

Se cultivaron *B. sphaericus* (ATCC número 10208) y *B. licheniformis* (ATCC n° 10716) en agar nutritivo a 30°C durante la noche. Se introdujeron grupos de colonias en 100 µl de agua estéril y se calentaron durante 5 minutos a 95°C, para romper las células. Se utilizaron tres µl en ampliaciones posteriores mediante reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Se obtuvo ADN genómico para *B. halodurans* (ATCC número BAA-125D) y se resuspendió en agua a una concentración de 100 ng/µl. También se obtuvo ADN genómico de *Bacillus cereus* (ATCC números 1-987D y 14579D) para la clonación.

Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa

Se diseñaron cebadores para el gen *dat* de *B. sphaericus* para la clonación en los vectores pET28b y pET30a (Novagen, Madison, WI) utilizando los sitios *NcoI* y *BamHI*. El constructo pET30 contenía una etiqueta de His N-terminal y una etiqueta T, mientras que el constructo pET28 no presentaba etiquetas.

Cebadores de *dat* de *Bacillus sphaericus*:

Extremo N-terminal: 5'-GATATACCATGGCATACTCATTATGGAATG-3' (SEC ID n° 88) y
extremo C-terminal: 5'-GTTATCGGATCCTTAGGCATTAATTGAAATTG-3' (SEC ID n° 89).

Los cebadores de *B. licheniformis* y los cebadores de *B. halodurans* se diseñaron para la clonación en los vectores pET28b y pET30a utilizando los sitios *NdeI* y *BamHI*. Los constructos pET30 no estaban etiquetados en este caso, mientras que los constructos pET28 contenían una pequeña etiqueta de his N-terminal.

Cebadores de *dat* de *B. licheniformis*:

Extremo N-terminal: 5'-GGCCGGTTCATATGAAAGTTCTTTTAAACGGC (SEC ID n° 90) y
extremo C-terminal: 5'-CCTTCCGGATCCTTAAACCGTTTTGGCTGTCT-3' (SEC ID n° 91).

Cebadores de *B. halodurans*:

Extremo N-terminal: 5'-GATATACATATGGATTATTGCCTTTACCAA-3' (SEC ID n° 92) y
extremo C-terminal: 5'-GAATCCGGATCCTCACTGCTTCATCGCTGTTT-3' (SEC ID n° 93).

Se diseñaron cebadores para las secuencias codificantes de *B. cereus*. Un juego de cebadores rindió la secuencia listada en NCBI con el número de acceso AE016877 gi:29899096 5138634... 5139506 (873 pb). Un juego de cebadores rindió un producto con 12 pb adicionales cadena arriba, similar al *dat* predicho de *B. thuringiensis* número de acceso del NCBI AE017355 gi:49328240 4965653... 4966537 (885 pb). Ambos juegos de cebadores se diseñaron con *NdeI* para la región N-terminal y el sitio de restricción *BamHI* para la región C-terminal. Los cebadores se diseñaron para la clonación en pBAD-TOPO TA.

Cebadores de *B. cereus*

Extremo N-terminal: 5'-TAAGAGGAATAACATATGGCATAACGAAAGATTT-3' (SEC ID nº 94) y

5 extremo C-terminal: 5'-GAATTCGGATCCTTAAGAAGATGACATATTGG-3' (producto de PCR más corto) (SEC ID nº 95)

Extremo N-terminal: 5-TAAGAGGAATAACATATGGGATCGAAATTGGCA-3' (producto de PCR más largo) (SEC ID nº 96)

10 Las regiones codificantes de los genes *dat* de *B. sphaericus*, *B. halodurans* y *B. licheniformis* se amplificaron utilizando el protocolo de PCR siguiente. En una reacción de 50 µl, se utilizaron 3 µl de molde (2 µl para el ADN genómico), 1,6 µM de cada cebador, 0,25 mM de cada dNTP, 3,5 U de polimerasa Expand High Fidelity (Roche, Indianapolis, IN) y 1X tampón Expand™ con Mg. El programa de termociclador utilizado incluía un inicio en caliente a 94°C durante 3 minutos, seguido de 8 repeticiones de las etapas siguientes: 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos. Se llevaron a cabo veintidós ciclos posteriores con una temperatura de hibridación de 58°C. Tras 30 ciclos, la muestra se mantuvo a 72°C durante 7 minutos y después se almacenó a 4°C. Se obtuvieron productos de PCR limpios del tamaño correcto (aproximadamente 850 pb para el gen *dat*).

20 Se construyó *dat* de *Geobacillus stearothermophilus* (número de acceso J04460 gi:142541), que codifica la proteína de número de acceso AAA22252 (gi:142542) utilizando técnicas de ensamblaje de PCR. Con frecuencia se hace referencia a la fuente de dicho gen/proteína como *Bacillus* sp., especie de *Bacillus* termoestable o *Bacillus* YM-1. El procedimiento de ensamblaje fue el siguiente: se ordenaron 43 oligonucleótidos (40-meros) desde IDT basándose en la secuencia génica anteriormente indicada y su secuencia de ADN complementaria, con solapamientos de 20 pares de bases entre las cadenas de sentido y antisentido. Los cebadores se diluyeron a 250 µM y se mezclaron entre sí 5 µl de cada cebador en un tubo de microcentrífuga.

30 Se llevó a cabo la PCR de la manera siguiente: por cada 100 µl de reacción, se añadieron 1,5 µl del grupo de cebadores, 4 µl de dNTP, 1X tampón de PCR XL, acetato de magnesio 1 mM, 2 µl de polimerasa *rTth* (Roche, Indianapolis, IN) y 0,25 µl de polimerasa *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA). Se llevó a cabo un inicio en caliente de 3 minutos a 94°C, seguido de 15 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 40°C durante 30 segundos y 68°C durante 15 segundos. Se llevaron a cabo diez ciclos adicionales con una temperatura de hibridación incrementada de 44°C y un tiempo de extensión de 30 segundos (a 68°C). Se llevaron a cabo diez más ciclos a una temperatura de hibridación de 48°C y un tiempo de extensión de 75 segundos. Finalmente, se llevó a cabo una etapa de extensión de cadena durante siete minutos a 68°C. Se llevó a cabo una PCR secundaria utilizando los cebadores siguientes, diseñados para la clonación con *NdeI* (extremo N-terminal) y *BamHI* (extremo C-terminal):

Extremo N-terminal: 5'- GGCCTTGGCATATGGGATACACTTTATGGAATGACC-3' (SEC ID nº 97) y

Extremo C-terminal: 5'- TTGGAACCGGATCCTTATATATGAAGCGGTTTTGG-3' (SEC ID nº 98).

40 La PCR contenía por cada 100 µl, se añadieron 2,5 µl de la reacción primaria, 0,4 µl de cada cebador, 3 µl de dNTP, 1X tampón de PCR XL, acetato de magnesio 1 mM, 2 µl de polimerasa *rTth* y 0,25 µl de polimerasa *Pfu*. Se llevó a cabo un inicio en caliente de 3 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 42°C durante 30 segundos y 68°C durante 90 segundos. Se llevaron a cabo quince ciclos más con una temperatura de hibridación incrementada de 48°C y finalmente se llevó a cabo una etapa de extensión de cadena durante siete minutos a 68°C. Se llevó a cabo una tercera reacción de PCR utilizando molde de la segunda PCR y bajo las mismas condiciones que la segunda reacción de PCR. Era visible un producto de aproximadamente 900 pb en el gel de agarosa.

Clonación

50 El producto de PCR de DAT de *B. sphaericus* se purificó utilizando el kit de purificación por PCR QIAquick de Qiagen (Valencia, CA) y se digirió con *BamHI* y *NcoI* en tampón de *BamHI* (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los vectores digeridos (pET28 y pET30) e inserción se purificaron utilizando el kit de extracción de gel QIAquick de Qiagen. Las ligaciones se llevaron a cabo utilizando el kit de ligación de ADN rápida de Roche (Roche) y se purificaron utilizando el kit de purificación por PCR QIAquick. Las ligaciones se transformaron en *Escherichia coli* DH10B utilizando una cubeta de 0,2 cm y un sistema Gene Pulser II de Bio-Rad tal como se indicaba en el manual de electroporación de Bio-Rad. Se dejó que las células se recuperasen en 900 µl de medio SOC durante 30 minutos a 37°C a 225 rpm. Las células se sembraron en placas de LB-agar que contenía canamicina (25 µg/ml). El ADN plasmídico se purificó utilizando el kit miniprep spin de Qiagen y se cribó para las inserciones correctas mediante digestión de restricción con *BamHI* y *NcoI*. Las secuencias de plásmidos que aparentemente presentaban la inserción correcta se verificaron mediante secuenciación de ADN mediante terminación de cadena dideoxi en Agencourt BioScience Corporation (Beverly, MA). La secuenciación verificó la secuencia codificante encontrada en NCBI número de acceso AF081278, región: 134..985 (gi: 3513754), que produce una proteína con la secuencia de aminoácidos listada en el número de acceso AAC33964 (gi: 3513755).

65 Los productos de PCR para DAT de *B. licheniformis* (~850 pb) y *G. stearothermophilus* se purificaron en gel y se

clonaron utilizando el kit de clonación Zero Blunt TOPO® siguiendo los protocolos del fabricante (Invitrogen). Los plásmidos se transformaron en células químicamente competentes TOP10 para el cribado inicial. Se cribó el ADN plasmídico mediante digestión de restricción y se verificó que las secuencias se correspondían con la secuencia codificante encontrada en el NCBI. Para *B. licheniformis*, la secuencia correspondía al número de acceso U26947, región 247..1098 (gi:857560), que produce una proteína con una secuencia de aminoácidos listada en el número de acceso P54692 (gi:1706292), con la excepción de una mutación silenciosa en la posición 429 de A a G. Para *G. stearothermophilus*, la secuencia se correspondía con el número de acceso listado anteriormente. Se subclonaron las regiones codificantes mediante digestión de restricción (NdeI/BamHI), se ligaron en los vectores pET, y se transformaron en células electrocompetentes DH10B para la amplificación.

El producto de PCR para DAT de *B. halodurans* se purificó en gel y se digirió con *NdeI* y *BamHI* y se ligó en los vectores pET28 y pET30, tal como anteriormente. La amplificación del vector se llevó a cabo en células DH10B. El ADN del miniprep se cribó mediante PCR y se verificó la secuencia. La secuencia génica puede encontrarse en el número de acceso NC_002570 (gi:57596592) 2934903..2935754, codificante de una proteína con la secuencia de aminoácidos listada en el número de acceso NP_243677 (gi:15615374).

Las secuencias codificantes de *B. cereus* se amplificaron utilizando un protocolo típico de PCR y se clonaron siguiendo los protocolos del fabricante (Invitrogen).

20 Expresión génica y ensayos

Se subclonó el ADN plasmídico en el huésped de expresión *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI) para constructos en vectores pET. Se cultivaron los cultivos y los plásmidos se aislaron utilizando el kit miniprep de Qiagen y se analizaron mediante digestión de restricción para confirmar la identidad. La inducción se llevó a cabo típicamente en medio LB que contenía canamicina (50 µg/ml). Las células se cultivaron hasta una DO600 de entre 0,4 y 0,8 a 37°C, se indujeron con IPTG (isopropil tiogalactósido) 0,1 mM y se muestrearon 3-4 horas después de la inducción. Los extractos celulares se prepararon según el protocolo que acompañada al reactivo BugBuster™ de Novagen (con adición de nucleasa benzoasa y cóctel inhibidor de proteasa completo de Roche). Se obtuvieron niveles elevados de proteína soluble del peso molecular predicho, según SDS-PAGE, para ambos productos génicos de *B. halodurans*, ambos productos génicos de *B. sphaericus*, ambos productos génicos de *G. stearothermophilus* y el producto génico de *B. licheniformis* no etiquetado. Para las reacciones en las que se utilizó proteína purificada, los productos génicos etiquetados con His se purificaron utilizando cartuchos His-Bind siguiendo los protocolos del fabricante (Novagen, Madison, WI). Las fracciones de eluyente se desalaron en columnas PD-10 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se eluyeron en tampón de fosfato potásico 25-100 mM, pH 7,5. Los ensayos de proteínas totales se llevaron a cabo utilizando el kit Pierce BCA y se estimó el porcentaje de expresión a partir del SDS-PAGE. Alternativamente, las proteínas solubles en los extractos celulares se separaron en una estación automática de electroforesis Experion de BioRad Laboratories y se analizaron para la concentración y el porcentaje de expresión utilizando el software Experion versión 1.1.98.0. Los constructos pBAD-TOPO que contenían los genes de *B. cereus* se expresaron tal como recomienda Invitrogen, pero los niveles de expresión de los DAAT eran tales que la proteína recombinante no podía distinguirse de las demás proteínas durante el análisis de SDS-PAGE.

Los extractos celulares se analizaron para actividad de D-aminotransferasa mediante el seguimiento de la producción de alanina a partir de piruvato y D-triptófano (o R,R-monatina) utilizando el protocolo siguiente. Se llevaron a cabo típicamente reacciones de un ml por duplicado en tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7,5), piridoxal fosfato 50 µM, piruvato sódico 25 mM y D-triptófano o R,R-monatina 50 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de extractos libres de células o enzima purificado y se incubaron durante 15 minutos-durante la noche a 30°C, con agitación suave. Se añadió aproximadamente el mismo nivel de D-aminotransferasa (típicamente aproximadamente 0,5 mg) a cada ensayo con fines comparativos. Se utilizó AT-103 (BioCatalytics) como control positivo (o de referencia). Se añadió ácido fórmico a una concentración final de dos por ciento para detener la reacción y se separó la proteína precipitada mediante centrifugación. También se llevaron a cabo reacciones de control, sin proteína añadida. También se utilizaron los puntos temporales cero como controles negativos. Se detectó la alanina utilizando la derivatización con OPA tal como se indica en el Ejemplo 1.

También se sometieron a ensayo las aminotransferasas para su capacidad de producir monatina a partir de D-triptófano (tal como en el Ejemplo 3). Por cada ml de mezcla de reacción se añadió lo siguiente: aproximadamente 50-100 µg de aldolasa (típicamente ProA aldolasa de *C. testosteroni*, purificada), MgCl₂ 4 mM, D-triptófano 50 mM (suministrado en forma de sólido), 0,5 a 2 mg de D-aminotransferasa, piruvato sódico 200 mM, tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5 y PLP 0,05 mM. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, con controles negativos a los que no se añadió aminotransferasa. Las muestras se incubaron durante 1 hora, 2 horas y durante la noche (17 a 20 horas) a 30°C bajo agitación suave. Los únicos estereoisómeros detectados al producir monatina utilizando dichos métodos fueron R,R y S,R. El porcentaje de R,R se lista posteriormente y se determinó partir del área del pico de la CL de fase inversa. Los resultados de actividad de transaminación de las D-aminotransferasas de *B. sphaericus*, *B. licheniformis* y *B. halodurans* tras 1 hora se muestran en la Tabla 40, a continuación. Los datos se normalizaron respecto a 0,5 mg de la D-aminotransferasa por ml.

Tabla 40: actividad de transaminación de las D-aminotransferasas de *B. sphaericus*, *B. licheniformis* y *B. halodurans*

D-aminotransferasa	Alanina (mM)	
	D-triptófano como sustrato	R,R-monatina como sustrato
<i>B. halodurans</i> (etiquetado)	15,5	1,3
<i>B. halodurans</i> (no etiquetado)	17,5	1,4
<i>B. licheniformis</i> (no etiquetado)	28,4	0,21
<i>B. sphaericus</i> (no etiquetado)	29,0	22,5
<i>B. sphaericus</i> (etiquetado)	17,1	12,0

5 La producción de monatina utilizando las D-aminotransferasas de *B. sphaericus*, *B. licheniformis* y *B. halodurans* se muestra en la Tabla 41, a continuación. Cada reacción contenía aproximadamente 90 μ g de ProA de *C. testosteroni*. Los datos de monatina total producida se normalizaron respecto a la utilización de 0,5 mg de la D-aminotransferasa.

10 Tabla 41: comparación entre las D-aminotransferasas de *B. sphaericus*, *B. licheniformis* y *B. halodurans* respecto a la producción de monatina

D-aminotransferasa	Monatina total (ppm) 3 horas	Monatina total (ppm) Durante la noche	% de R,R 3 horas	% de R,R Durante la noche
<i>B. halodurans</i> (etiquetado)	3,2	13,7	100	99,3
<i>B. halodurans</i> (no etiquetado)	4	15,5	100	99,3
<i>B. licheniformis</i> (no etiquetado)	0,6	8,1	100	29,3
<i>B. sphaericus</i> (no etiquetado)	279,6	577,6	61,55	65,7
<i>B. sphaericus</i> (etiquetado)	111,2	246	61,0	63,1

15 La D-aminotransferasa de *B. sphaericus* (no etiquetada) presentaba la actividad más elevada de producción de monatina a partir de D-triptófano pero el enzima de *B. halodurans* presentaba una selectividad mucho más elevada para R-PM frente a S-PM que los demás enzimas, resultando en una estereopureza más elevada de R,R-monatina. Los extractos celulares de *B. cereus* no presentaban cantidades detectables de actividad bajo las condiciones sometidas a ensayo, aunque los genes podrían no haberse expresado en los huéspedes seleccionados.

20 La DAT de *G. stearothermophilus* (no etiquetada, se expresa mejor) se sometió a ensayo tal como anteriormente y se comparó con la DAT de *B. sphaericus* purificada y AT-103 (BioCatalytics). Los resultados se muestran en las Tablas 42 y 43, a continuación. Se sometió a ensayo la actividad de transaminación de AT-103 de *G. stearothermophilus* y de la D-aminotransferasa de *B. sphaericus* utilizando 0,5 mg de D-aminotransferasa por ml (Tabla 42).

25 Tabla 42: actividad de transaminación de *G. stearothermophilus*, AT-103, y D-aminotransferasas de *B. sphaericus* (purificadas)

D-aminotransferasa	Alanina (mM) - 15 minutos D-triptófano como sustrato	Alanina (mM) - 15 minutos R,R-monatina como sustrato	Alanina (mM) - 2 horas D-triptófano como sustrato	Alanina (mM) - 2 horas R,R-monatina como sustrato
AT-103	8,91	1,21	9,47	6,13
<i>B. sphaericus</i> (etiquetada)	8,91	1,65	9,53	7,17
<i>G. stearothermophilus</i> (no etiquetada)	2,05	0,053	8,10	0,78

30 Tabla 43: comparación entre *G. stearothermophilus*, AT-103 y *B. sphaericus* (purificada) para la producción de monatina total

D-aminotransferasa	Monatina total (ppm) 2 horas	Monatina total (ppm) Durante la noche	% de R,R 2 horas	% de R,R Durante la noche
AT-103	450	645	65,5	60,6
<i>B. sphaericus</i> (etiquetada)	110	175	64	54
<i>G. stearothermophilus</i> (no etiquetada)	nd	10	n/a	27

35 El enzima de *G. stearothermophilus* nativo era claramente menos activo en la transaminación de la monatina que la AT-103 y los enzimas de *B. sphaericus*.

Ejemplo 19**Creación de una D-aminotransferasa híbrida**

5 Se han descrito varias D-aminoácido aminotransferasas de *Bacillus* en los Ejemplos 18 y 15. Aunque el enzima de *G. stearothermophilus* presentaba una baja actividad de transaminación sobre la monatina, causando una menor producción de monatina total a partir de D-triptófano, todavía presentaba elementos estructurales de interés y es un enzima termoestable. Por lo tanto, se creó una proteína híbrida entre el enzima de actividad más elevada (*B. sphaericus*) y el enzima de *Geobacillus*.

10

Ensamblaje de secuencia codificante de DAT híbrido

La secuencia de la proteína diana que se diseñó era SEC ID nº 99. La secuencia SEC ID nº 100, la secuencia codificante correspondiente a SEC ID nº 99, se diseñó basándose en el uso de codones de *E. coli*.

15

La DAT híbrida se construyó utilizando técnicas de ensamblaje de PCR. El procedimiento de ensamblaje fue el siguiente: se ordenaron 43 oligonucleótidos (40-meros) desde IDT basándose en la secuencia génica anteriormente indicada y su secuencia de ADN complementaria, con solapamientos de 20 pares de bases entre las cadenas de sentido y antisentido. Los cebadores se diluyeron a 250 µM y se mezclaron entre sí 5 µl de cada cebador en un tubo de microcentrífuga. Se llevó a cabo la PCR de la manera siguiente: por cada 100 µl de reacción, se añadieron 1,5 µl del reservorio de cebadores, 4 µl de dNTP, 1X tampón de PCR XL, acetato de magnesio 1 mM, 2 µl de polimerasa *rTth* (Roche, Indianapolis, IN) y 0,25 µl de polimerasa *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA). Se llevó a cabo un inicio en caliente de 3 minutos a 94°C, seguido de 15 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 40°C durante 15 segundos y 68°C durante 30 segundos. Se llevaron a cabo diez ciclos más con una temperatura de hibridación incrementada de 44°C y un tiempo de hibridación incrementado de 30 segundos. Se llevaron a cabo diez ciclos más a una temperatura de hibridación de 48°C y un tiempo de extensión de 75 segundos. Finalmente, se llevó a cabo una etapa de extensión de cadena durante siete minutos a 68°C. Se llevó a cabo una PCR secundaria utilizando los cebadores siguientes, diseñada para la clonación con *NdeI* (extremo N-terminal) y *BamHI* (extremo C-terminal):

30 Extremo N-terminal-5'-GGCCTTGGCATATGGGATACACTTTATGGAATGACCA -3' (SEC ID nº 101) y extremo C-terminal-5'-TTGGAACCGGATCCTTAGCTGTTAAGGCTCAGTGGAA -3' (SEC ID nº 102).

La PCR contenía 100 µl, 2,5 µl de la reacción primaria, 3 µl de dNTP, 1X tampón de PCR XL, acetato de magnesio 1 mM, 2 µl de *rTth* y 0,25 µl de polimerasa *Pfu*. Se llevó a cabo un inicio en caliente de 3 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 42°C durante 30 segundos y 68°C durante 75 segundos. Se llevaron a cabo quince ciclos más con una temperatura de hibridación incrementada de 48°C y finalmente se llevó a cabo una cadena de extensión de cadena durante siete minutos a 68°C. En el gel de agarosa era visible un producto de aproximadamente 850 pb.

Clonación

El producto de PCR se purificó en gel utilizando el kit de extracción de gel QIAquick de Qiagen (Valencia, CA) y se clonó utilizando el kit de clonación Zero Blunt TOPO® siguiendo los protocolos del fabricante (Invitrogen). Los plásmidos se transformaron en células químicamente competentes TOP10 para el cribado inicial mediante PCR. El ADN plasmídico se cribó mediante digestión de restricción y se verificó la secuencia del ADN.

Se digirieron los minipreps de plásmidos con *BamHI* y *NdeI* (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los vectores digeridos (pET28 y pET30) y la inserción se ligaron utilizando el kit de ligación de ADN rápida de Roche (Roche) y se purificaron utilizando el kit de purificación de productos de PCR High-Pure de Roche. Las ligaciones se transformaron en *Escherichia coli* DH10B utilizando una cubeta de 0,2 cm y un sistema Gene Pulser II de Bio-Rad tal como se indica en el manual de electroporación de Bio-Rad. Se dejó que las células se recuperasen en 900 µl de medio SOC durante 30 minutos a 37°C a 225 rpm. Se sembraron las células sobre placas de LB-agar que contenía canamicina (25 µg/ml). Se purificó el ADN plasmídico utilizando el kit de miniprep spin de Qiagen y se cribó para las inserciones correctas mediante digestión de restricción con *BamHI* y *NdeI*.

55

Expresión génica y ensayos

El ADN plasmídico se transformó en el huésped de expresión *E. coli* BL21(DE3) siguiendo los protocolos del fabricante (Novagen, Madison, WI). Se cultivaron los cultivos y los plásmidos se aislaron utilizando el kit de miniprep de Qiagen y se analizaron mediante PCR para confirmar la identidad. La inducción se llevó a cabo en medio LB que contenía canamicina (50 µg/ml). Las células se cultivaron hasta una DO₆₀₀ de 0,5 a 37°C, se indujeron con IPTG (isopropil tiogalactósido) 0,1 mM y se muestrearon 3 horas después de la inducción. Los extractos celulares se prepararon según el protocolo que acompañaba al reactivo BugBuster™ de Novagen (con adición de nucleasa benzoasa y cóctel inhibidor de proteasas completo de Roche). Se obtuvieron niveles elevados de proteínas totales del peso molecular predicho, según estimación mediante SDS-PAGE, para ambos productos génicos. Sin embargo, los niveles solubles de proteína eran más bajos. La versión no etiquetada del producto génico se expresó mejor y se

65

sometió a ensayo en forma de extracto celular. Las proteínas solubles en los extractos celulares se separaron en una estación automática de electroforesis Experion de BioRad Laboratories y se analizaron para la concentración y el porcentaje de expresión utilizando el software Experion versión 1.1.98.0, para normalizar la cantidad de D-aminotransferasa utilizada en ensayo comparativos.

Los extractos celulares se analizaron para la actividad de D-aminotransferasa mediante el seguimiento de la producción de alanina a partir de piruvato y D-triptófano (o R,R-monatina) utilizando el protocolo siguiente. Se llevaron a cabo reacciones de un ml por duplicado en tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7,5), piridoxal fosfato 50 μ M, piruvato sódico 25 mM y D-triptófano o R,R-monatina 50 mM (a menos que se indique lo contrario). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de extractos libres de células o enzima purificado y se incubaron durante 15 minutos-toda la noche a 30°C, bajo agitación suave. Se añadió aproximadamente el mismo nivel de D-aminotransferasa (0,5 mg) a cada ensayo con fines comparativos (a menos que se indique lo contrario). Se utilizó AT-103 (BioCatalytics) o D-aminotransferasa de *B. sphaericus* (Ejemplo 18) como enzima de referencia. Se añadió ácido fórmico a una concentración final de dos por ciento para detener la reacción y la proteína precipitada se separó mediante centrifugación. También se llevaron a cabo reacciones de control sin proteína añadida. También se utilizaron los puntos temporales cero a modo de controles negativos. Se detectó alanina utilizando la derivatización post-columna con OPA tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados de las reacciones con 0,5 mg de D-aminotransferasa por cada 1 ml de volumen de reacción en la Tabla 44, a continuación.

Tabla 44: actividad de transaminación de las D-aminotransferasas de *B. sphaericus* (purificada), *G. stearothermophilus* y híbridas

D-aminotransferasa	Alanina (mM)- 15 minutos D- triptófano como sustrato	Alanina (mM)- 15 minutos R,R-monatina como sustrato	Alanina (mM)- 2 horas D-triptófano como sustrato	Alanina (mM)- 2 horas R,R-monatina como sustrato
DAT híbrido (no etiquetado)	13,5	0,084	14,2	0,54
<i>B. sphaericus</i> (etiquetado)	13,6	4,60	13,9	10,6
<i>G. stearothermophilus</i> (no etiquetado)	6,6	0,18	13,5	2,2

Las aminotransferasas también se sometieron a ensayo para su capacidad de producir monatina a partir de D-triptófano (tal como en el Ejemplo 3). Se añadió lo siguiente por cada 1 ml de mezcla de reacción: aproximadamente 50 a 100 μ g de ProA aldolasa de *C. testosteroni* purificada, $MgCl_2$ 4 mM, D-triptófano 50 mM (suministrado en forma de sólido), 0,5 a 2 mg de D-aminotransferasa, piruvato sódico 200 mM, tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, y PLP 0,05 mM. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, con controles negativos en los que no se había añadido ninguna aminotransferasa. Las muestras se incubaron durante 1 hora, 2 horas y durante la noche (17 a 20 horas) a 30°C bajo agitación suave. Los únicos estereoisómeros detectados al producir monatina utilizando dichos métodos fueron R,R y S,R. El porcentaje de R,R se lista en la Tabla 45, posteriormente, y se determinó a partir del área de pico en la CL de fase inversa. A concentraciones bajas de monatina, el porcentaje de R,R no es tan exacto según se juzga a partir del área de pico de RPLC. Por lo tanto, algunas de las muestras se analizaron adicionalmente mediante el método de derivatización con FDAA indicado en el Ejemplo 1. Los números de dichos resultados se muestran en la tabla entre paréntesis.

Tabla 45: comparación entre *G. stearothermophilus*, DAT híbrido y *B. sphaericus* (purificada) para la producción de monatina total

D-aminotransferasa	Monatina total (ppm) 2 horas	Monatina total (ppm) Durante la noche	% de R,R 2 horas	% de R,R Durante la noche
DAT híbrido (no etiquetado)	9,5	42,5	84,1 (79,8)	81,1 (69,6)
<i>B. sphaericus</i> (etiquetado)	68,5	182,5	62,7 (53,8)	55,1 (53,5)
<i>G. stearothermophilus</i> (no etiquetado)	4,5	15,0	34,1 (20,7)	32,1 (21,7)

La DAT híbrida produce más monatina que el enzima de *G. stearothermophilus*, aunque la velocidad de transaminación de la monatina de la DAT híbrida es más baja. Posiblemente bajo las condiciones de producción de la monatina (en las que las concentraciones de PM son bajas), el híbrido se comporta mejor, posiblemente debido a la K_m más baja. Además, la DAT híbrida produce un porcentaje más alto de R,R que cualquiera de los enzimas parentales. Dicho enzima aparentemente presenta una enantioselectividad más alta para R-PM que los enzimas parentales. Se llevaron a cabo los mismos ensayos (tiempo de incubación: 4 horas) utilizando la aldolasa de *Sinorhizobium* indicada en el Ejemplo 3 con la DAT híbrida. La DAT híbrida produjo cantidades similares de

monatina tal como anteriormente, pero la utilización de la aldolasa alternativa produjo 95% de R,R (según la derivatización con FDAA), frente al 80% con la ProA aldolasa de *C. testosteroni*.

5 La DAT híbrida también se sometió a ensayo para la actividad de transaminación de R-PM frente a S-PM (producido tal como se indica en el Ejemplo 1). Se llevaron a cabo ensayos de dos horas y durante la noche a 30°C utilizando R-PM o S-PM 10 mM, D-alanina 50 mM, fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, 0,5 mg/ml de D-aminotransferasa y PLP 50 µM. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y se restaron los niveles de fondo de monatina de las muestras de PM. Las proporciones de monatina producida a partir de cada sustrato se presentan para ambas D-aminotransferasas en la Tabla 46, posteriormente. Se observaron tendencias similares al representar gráficamente las proporciones de piruvato (producido). Resulta evidente que la DAT híbrida es más selectiva para R-PM que la D-aminotransferasa AT-103, que aparentemente no es selectiva.

Tabla 46: comparación entre la DAT híbrida y AT-103 para la transaminación de S-PM y R-PM

D-aminotransferasa	Actividad R/Actividad S 2 horas	Actividad R/Actividad S Toda la noche
DAT híbrido (no etiquetado)	8,6	2,2
AT-103	0,68	1,68

15 En un intento por mejorar adicionalmente la actividad de la DAT híbrida, se llevó a cabo mutagénesis dirigida a sitio. Se diseñaron cebadores tal como los sugeridos en el kit de mutagénesis dirigida a sitios múltiples QuikChange (Stratagene). Se crearon dos mutantes diferentes: DAT 2 híbrida y DAT 3 híbrida. La DAT 2 híbrida incluía una mutación en la posición aminoácida 153 de alanina a arginina y una delección de la serina 181. La mutación de alanina a arginina se diseñó para ayudar a coordinar el segundo grupo carboxilo en el sustrato precursor de monatina, tal como se ha demostrado que se encuentra presente en la AspC L-aminotransferasa. La delección de la serina eran un intento por eliminar algunos de los impedimentos estéricos, de manera que la molécula más grande del precursor de monatina pueda alcanzar el sitio activo con mayor facilidad. La DAT 3 híbrida contiene una delección de las serinas 180 a 182 sustituidas por una arginina. Se crearon dos mutantes adicionales que presentan únicamente la mutación de 153 Ala a Arg o la delección de la serina, respectivamente. Los tres mutantes que contenían delecciones no produjeron proteína soluble, aunque se sobreexpresaron a concentraciones muy elevadas. Claramente resulta importante estructuralmente no eliminar aminoácidos de dicha región. El mutante ala153arg no produjo monatina bajo las condiciones sometidas a ensayo (tal como anteriormente). Existe un nivel considerable de impedimento estérico en una región próxima a la posición 153, que dificultaría encajar el sustrato precursor de monatina sin las delecciones en la región n180-182. Se espera que la mutación de las serinas por aminoácidos de menor tamaño, tal como glicina o alanina, mejoraría la actividad hacia el precursor de monatina, particularmente en combinación con la mutación ala153arg.

35 Ejemplo 20 (cancelado)

35 Ejemplo 21

Inmovilización de la D-alanina aminotransferasa de *B. sphaericus*

40 Se purificó la D-alanina aminotransferasa de *Bacillus sphaericus* en forma de proteína etiquetada con His₆, tal como se indica en el Ejemplo 14.

45 El enzima se inmovilizó sobre perlas de resina Eupergit® C siguiendo el procedimiento de Mateo C. et al., Biotechnology Progress 18:629-634, 2002. El enzima purificado (4 ml a 6,0 mg/ml) se dializó en 0,4 l de fosfato potásico 0,5 M, pH 7,8, utilizando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer de Pierce (7 K de MWCO, n° de catálogo 66370; Rockford, IL) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se cambió el tampón y se continuó la diálisis durante 1 hora.

50 Se añadió piridoxal fosfato ("PLP") hasta una concentración final de 0,05 mM y la solución resultante se mezcló con 0,2 g de resina Eupergit® C obtenida de Sigma-Aldrich (Fluka, n° de catálogo 46115; St. Louis, MO). La suspensión de enzima-resina se incubó a temperatura ambiente bajo mezcla suave durante la noche. Se separaron las perlas de resina de la solución de enzima mediante centrifugación a 4.000xg durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante y la resina se lavó con 3 x 3 ml de fosfato potásico 100 mM, pH 7,8, que contenía PLP 0,05 mM. La mezcla se centrifugó a 3.000 x g durante 5 minutos entre lavados. Se determinó la cantidad de proteína unida a la resina mediante la medición de la cantidad de proteína en cada sobrenadante y restando la suma de la cantidad original de proteína que debía inmovilizarse. Se midieron las concentraciones de proteína utilizando un kit de ensayo de proteínas BCA TM de Pierce con albúmina de suero bovino como estándar (n° de catálogo 23225; Rockford, IL). Las perlas de enzima inmovilizado lavadas finalmente se suspendieron en 4 ml de fosfato potásico 100 mM, pH 7,8, que contenía PLP 0,05 mM. Los grupos epoxi no reaccionados de las perlas con enzima inmovilizado se bloquearon mediante incubación con alanina 1,9 M a temperatura ambiente bajo agitación suave. Tras 24 horas, las perlas se lavaron, tal como se ha indicado anteriormente, para eliminar el exceso de alanina y finalmente se resuspendieron en fosfato potásico 100 mM, pH 7,8, que contenía PLP 0,05 mM. La concentración final de enzima inmovilizado era

de 118 mg de proteína por cada g de perla de resina.

Ejemplo 22

5 Inmovilización de ProA aldolasa de *S. meliloti*

Se purificó la HMG aldolasa ("proA") de *Sinorhizobium meliloti* en forma de la proteína etiquetada con HIS₆ utilizando un procedimiento similar al indicado en el Ejemplo 14 para la D-alanina aminotransferasa de *B. sphaericus* etiquetada con HIS₆.

10 Partiendo de una placa de cultivo nueva (LB-agar con 50 µg/ml de canamicina) de células BL21(DE3)::*S. meliloti* proA pET30(Xa/LIC), se cultivaron las células en 5 ml de caldo de Luria-Bertani ("LB") con 50 µg/ml de canamicina, a 37°C y a 225 rpm durante la noche. A continuación, el cultivo se transfirió al 0,5%-0,6% (v/v) a matraces que contenían 800 ml de caldo LB con 50 µg/ml de canamicina. Las células se cultivaron a 37°C y 225 rpm hasta que la DO₆₀₀ alcanzó un valor de entre 0,6 y 0,7. Se indujo la expresión génica mediante la adición de IPTG 0,2 mM. Los cultivos se incubaron adicionalmente a 30°C durante 4 horas a 225 rpm y después se recolectaron mediante centrifugación en una centrífuga J25II de Beckman (Fullerton, CA) con un rotor JS-16.25 a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se lavó una vez el sedimento celular con tampón EPPS 50 mM frío, pH 8,2, y las células se centrifugaron nuevamente. El sedimento celular lavado se recolectó y se utilizó inmediatamente. Para preparar el extracto libre de células que contenía la proteína HIS₆-proA aldolasa de *S. meliloti* (HIS₆-SmelproA), las células se suspendieron en 3 a 4 volúmenes de EPPS 50 mM, pH 8,2, que contenía NaCl 100 mM, y después se rompieron utilizando un homogeneizador Microfluidics (Newton, MA) (3 pases a 20.000 psi), manteniendo una temperatura de la suspensión inferior a 15°C. Todas las etapas posteriores de purificación se llevaron a cabo a 4°C. Se centrifugó el extracto celular durante 15 minutos a 15.000 x g para eliminar los residuos celulares. Se aplicaron alícuotas del extracto libre de células, conteniendo cada una entre 15 y 20 mg de proteína soluble, a columnas HIS-Bind de Novagen (nº de catálogo 70971-4) que habían sido previamente equilibradas con el tampón Bind de Novagen. Las columnas se lavaron con 2x10 ml de tampón Bind de Novagen y 1x10 ml del tampón de lavado de Novagen diluido 1:1 con el tampón Bind. La proteína HIS₆-SmelproA se eluyó con 5 ml del tampón de eluido de Novagen de cada columna. Las fracciones de elución de cada columna se agruparon y se concentraron 2X con dispositivos de filtración-centrifugación Ultra-15 de Amicon (Billerica, MA) (MWCO: 10 kDa). El tampón se intercambiò mediante pase a través de columnas de desalado PD10 desechables de GE Healthcare (nº de catálogo 17-0851-01) previamente equilibradas con EPPS 50 mM, pH 8,2, que contenían NaCl 100 mM.

35 La concentración de proteína de la solución desalada se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCATM de Pierce (nº de catálogo 23225; Rockford, IL). Se determinó la pureza de cada fracción y el nivel de expresión en la fracción de extracto libre de células mediante SDS-PAGE con un sistema minigel Protean II de Bio-Rad (Hercules, CA) y geles de gradiente 4%-15%. Típicamente este procedimiento produjo aproximadamente 60 a 70 mg de enzima a partir de 3.200 ml de cultivo en LB con una pureza de ~90%. Se almacenaron alícuotas (1 a 5 ml) del enzima purificado a -80°C hasta la utilización.

40 El enzima se inmovilizó sobre perlas de resina Eupergit® C siguiendo el procedimiento de Mateo C. et al., *Biotechnology Progress* 18:629-634, 2002, y tal como se indica en el Ejemplo 21 para la D-alanina aminotransferasa de *B. sphaericus*, excepto en que se encontraba presente cloruro de magnesio 4 mM en el tampón durante la inmovilización en lugar de PLP 0,05 mM. Tras bloquear con glicina, el enzima inmovilizado lavado se suspendió en fosfato potásico 100 mM, pH 7,8, que contenía cloruro de magnesio 4 mM. La concentración final de proA aldolasa de *S. meliloti* era de 52 mg de proteína por cada gramo de perla de resina.

Ejemplo 23

50 Producción de R,R-monatina utilizando enzimas inmovilizados

La D-alanina aminotransferasa etiquetada con HIS₆ de *B. sphaericus* y la proA aldolasa etiquetada con HIS₆ de *R. meliloti* se purificaron y se inmovilizaron tal como se ha indicado en los Ejemplos 21 y 22.

55 Se prepararon soluciones de piruvato sódico 50 mM, D-triptófano 40 mM, MgCl₂ 4 mM y PLP 50 µM en fosfato potásico 100 mM, pH 7,8, en tubos de polipropileno de 15 ml con tapas enroscables. Las suspensiones resultantes se incubaron a temperatura ambiente bajo agitación suave durante hasta 24 horas. El progreso de cada reacción se siguió mediante análisis de HPLC y/o CL-EM, midiendo el D-triptófano, la D-alanina, la R,R-monatina y el ácido pirúvico. Se determinó la pureza isomérica del producto monatina utilizando CL/EM/EM quiral. Todos los métodos analíticos se indican en el Ejemplo 1. Los resultados típicos de los experimentos con enzimas inmovilizados se muestran en la Tabla 47, a continuación. El análisis de la pureza isomérica de la monatina formada durante la reacción demostró que el producto de las reacciones enzimáticas era de entre 74% y 80% de R,R.

Tabla 47. producción de R,R-monatina utilizando enzimas inmovilizados

Concentración de proA aldolasa (µg/ml)	Concentración de D-alanina aminotransferasa (µg/ml)	Concentración de monatina (mM) (punto temporal de 4 horas)	Concentración de triptófano (mM) (punto temporal de 4 horas)	Concentración de alanina (mM) (punto temporal de 4 horas)
50	500	0,06	17,75	20,51
50	1.000	0,29	15,03	24,71
100	1.000	0,33	15,17	24,73
100	2.000	0,54	14,40	29,45

Listado de secuencias

- 5 <110> Cargill, Incorporated
Brazeau, Brian J.
Burke, Ellen
de Souza, Mervyn
- 10 Gort, Steven J.
Hicks, Paula M.
Kollmann, Sherry R.
Luginbuhl, Peter
McFarlan, Sara C.
- 15 Richardson, Toby
Sanchez-Riera, Fernando A.
Solheid, Christopher
Weiner, David
Zhao, Lishan
- 20 <120> Polipéptidos y rutas biosintéticas para la producción de estereoisómeros de monatina y sus precursores
- <130> 2464.014PC01/MAC/M-R
- 25 <150> 60/674,932
<151> 2005-04-26
- <160> 102
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 684
<212> ADN
- 35 <213> *Comamonas testosteroni*
- <400> 1
atgtacgaac tgggagttgt ctaccgcaat atccagcgcg cgcgaccgcgc tgctgctgac 60
ggcctggccg ccctgggctc cgccaccgtg cagcaggcca tgggcccgcgt cggctgctc 120
aagccctata tgcgccccat ctatgccggc aagcaggtct cgggcaccgc cgtcacggtg 180
ctgctgcagc cgggcgacaa ctggatgatg catgtggctg ccgagcagat tcagcccggc 240
gacatcgtgg tcgcagccgt caccgcagag tgcaaccgac gctacttcgg cgatctgctg 300
gccaccagct tccaggcgcg cggcgcacgt gcgctgatca tcgatgccgg cgtgcgcgac 360
gtgaagacgc tgcaggagat ggactttccg gtctggagca aggccatctc ttccaagggc 420
acgatcaagg ccaccctggg ctcggtaaac atccccatcg tctgcgccgg catgctggtc 480
acgcccggtg acgtgatcgt ggccgacgac gacggcgtgg tctgcgtgcc cgccgcgcgt 540
gccgtggaag tgctggccgc cgcccagaag cgtgaaaact tcgaaggcga aaagcgcgcc 600
aagctggcct cgggcatcct cggcctggat atgtacaaga tgcgcgagcc cctggaaaag 660
gccgcgctga aatatattga ctaa 684
- 40 <210> 2

ES 2 587 572 T3

<211> 227
 <212> PRT
 <213> *Comamonas testosteroni*

5 <400> 2
 Met Tyr Glu Leu Gly Val Val Tyr Arg Asn Ile Gln Arg Ala Asp Arg
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ala Leu Gly Ser Ala Thr Val His Glu
 20 25 30
 Ala Met Gly Arg Val Gly Leu Leu Lys Pro Tyr Met Arg Pro Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Gly Lys Gln Val Ser Gly Thr Ala Val Thr Val Leu Leu Gln Pro
 50 55 60
 Gly Asp Asn Trp Met Met His Val Ala Ala Glu Gln Ile Gln Pro Gly
 65 70 75 80
 Asp Ile Val Val Ala Ala Val Thr Ala Glu Cys Thr Asp Gly Tyr Phe
 85 90 95
 Gly Asp Leu Leu Ala Thr Ser Phe Gln Ala Arg Gly Ala Arg Ala Leu
 100 105 110
 Ile Ile Asp Ala Gly Val Arg Asp Val Lys Thr Leu Gln Glu Met Asp
 115 120 125
 Phe Pro Val Trp Ser Lys Ala Ile Ser Ser Lys Gly Thr Ile Lys Ala
 130 135 140
 Thr Leu Gly Ser Val Asn Ile Pro Ile Val Cys Ala Gly Met Leu Val
 145 150 155 160
 Thr Pro Gly Asp Val Ile Val Ala Asp Asp Asp Gly Val Val Cys Val
 165 170 175
 Pro Ala Ala Arg Ala Val Glu Val Leu Ala Ala Ala Gln Lys Arg Glu
 180 185 190
 Ser Phe Glu Gly Glu Lys Arg Ala Lys Leu Ala Ser Gly Ile Leu Gly
 195 200 205
 Leu Asp Met Tyr Lys Met Arg Glu Pro Leu Glu Lys Ala Gly Leu Lys
 210 215 220
 Tyr Ile Asp
 225

<210> 3
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 1 pykA inactivado

15

ES 2 587 572 T3

<400> 3
 atgtccagaa ggcttcgcag aacaaaaatc gttaccacgt taggtgtagg ctggagctgc 60
 ttc 63

<210> 4
 <211> 64
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 2 pykA inactivado

10 <400> 4
 ctctaccgtt aaaatacgcg tggattagtg agaaccacg gtaccatag aatatacctcc 60
 ttag 64

<210> 5
 15 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Cebador 1 pykF inactivado

<400> 5
 aggacgtgaa cagatgcggt gttagtagtg ccgctcggta ccagcatatg aatatacctcc 60
 ttag 64

25 <210> 6
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador 2 pykF inactivado

<400> 6
 atgaaaaaga ccaaaattgt ttgcaccatc ggaccgaaaa ccggtgtagg ctggagctgc 60
 ttc 63

35 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador 1 HEXaspC

<400> 7
 45 gcggaacata tgttgagaa cattaccgcc 30

<210> 8
 <211> 32
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 2 HEXaspC

55 <400> 8
 ataaccgat ccttacagca ctgccacaat cg 32

ES 2 587 572 T3

<210> 9
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Cebador inverso aspCW130F

<400> 9
10 cgctcttatg gttcggtttg cttgggtgc tcaccc 36

<210> 10
<211> 36
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo aspCW130F
20
<400> 10
gggtgagcaa cccaagcttt ccgaaccata agagcg 36

<210> 11
<211> 39
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador R122G-1
30
<400> 11
caaaaaatac cagcgtaag ggagtgtggg tgagcaacc 39

<210> 12
<211> 29
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Cebador P9T_4

<400> 12
cattaccgcc gctactgccg acccgattc 29
45
<210> 13
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Cebador I68V-1

<400> 13
55 caccaaaaat tacctcggcg tagacggcat ccctgaatt 39

<210> 14
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
60
<220>
<223> Cebador T156A

<400> 14
65 tgatcgggaa aatcacgctc ttgacttca tgac 35

<210> 15
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> *L. brevis* Glutamate Cebador Racemasa 1
 <400> 15
 10 gcggcgccat ggaaatgat cggattggtc taatg 35
 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 2 glutamato racemasa de *L. brevis*
 20 <400> 16
 gcggcggtcg acgcaattac aattgtggtt gtc 33
 <210> 17
 <211> 34
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 1 glutamato racemasa de *P. pentosaceus*
 30 <400> 17
 gcggcgccat ggatgtatgt ataatttat ttag 34
 <210> 18
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador 2 glutamato racemasa de *P. pentosaceus*
 <400> 18
 gcggcggtcg acaaattca ttattcattc taattt 36
 45 <210> 19
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador externo 1 4 D-HPG AT de *P. stutzeri*
 <400> 19
 55 ggccggcata tgtgatcct taacgactac aaacgt 36
 <210> 20
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador externo 2 4 D-HPG AT de *P. stutzeri* 4
 <400> 20
 65 ggaaggctcg agtcatgatt ggttccaga caaatt 36

ES 2 587 572 T3

<210> 21
 <211> 693
 <212> ADN
 <213> Aldolasa (*Bacillus subtilis*)

5

<400> 21
 atgatttatc agccggggac aacaggcatc gtcgtgcagg atattgcacg cgctgatcaa 60
 gccattatcg atggcctagc agaatgtggt gtggcgacgg tgcattgaggc acaggggacg 120
 aagggcctgt tggcggatta tatgacgccg atttactcgg gcgcgcgcat cgctggatct 180
 gcggtgacca ttctggcacc gccgtgtgac aattggatga tccatgtggc ggtagaacag 240
 ttgcaaaagg gcgatgtggt gctgctgggc acgatcacac cgtccaatgc tggctatttc 300
 ggtgacttgc tggccacgtc agccatggcg cacggttgtc gcggattgat cattgatggc 360
 ggtgtgcgcy atgtgcaaga gctgacggat atgggctttc cggtttggtc caaggccgta 420
 catgcccaag gcacaatcaa agaaacgctg ggatcgggtca acgtgccagt tgtctgcggc 480
 caagagttgg taaaccccggt tgatattgtg gtggccgacg atgacggggt gtgcgttgtg 540
 cgccgcgaag aagctgctga tgtgctggct aaggcgcggg cgcgcgagag caatgaagcg 600
 gccaaagcgcg cgcgttttga ggccggtgag ctggggctgg atatctatga catgcgcgcg 660

10 <210> 22
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Aldolasa (*Bacillus subtilis*)

<400> 22

ES 2 587 572 T3

Met Ile Tyr Gln Pro Gly Thr Thr Gly Ile Val Val Gln Asp Ile Ala
1 5 10 15

Arg Ala Asp Gln Ala Ile Ile Asp Gly Leu Ala Glu Cys Gly Val Ala
20 25 30

Thr Val His Glu Ala Gln Gly Arg Lys Gly Leu Leu Ala Asp Tyr Met
35 40 45

Thr Pro Ile Tyr Ser Gly Ala Arg Ile Ala Gly Ser Ala Val Thr Ile
50 55 60

Leu Ala Pro Pro Cys Asp Asn Trp Met Ile His Val Ala Val Glu Gln
65 70 75 80

Leu Gln Lys Gly Asp Val Leu Leu Leu Gly Thr Ile Thr Pro Ser Asn
85 90 95

Ala Gly Tyr Phe Gly Asp Leu Leu Ala Thr Ser Ala Met Ala His Gly
100 105 110

Cys Arg Gly Leu Ile Ile Asp Gly Gly Val Arg Asp Val Gln Glu Leu
115 120 125

Thr Asp Met Gly Phe Pro Val Trp Ser Lys Ala Val His Ala Gln Gly
130 135 140

Thr Ile Lys Glu Thr Leu Gly Ser Val Asn Val Pro Val Val Cys Gly
145 150 155 160

Gln Glu Leu Val Asn Pro Gly Asp Ile Val Val Ala Asp Asp Asp Gly
165 170 175

Val Cys Val Val Arg Arg Glu Glu Ala Ala Asp Val Leu Ala Lys Ala
180 185 190

Arg Ala Arg Glu Ser Asn Glu Ala Ala Lys Arg Ala Arg Phe Glu Ala
195 200 205
Gly Glu Leu Gly Leu Asp Ile Tyr Asp Met Arg Ala Arg Leu Ala Glu
210 215 220

Lys Gly Leu Lys Tyr Val
225 230

5 <210> 23
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador Aldolasa

<400> 23
gaggagctcg agtcagacgt attcagctcc tttttc 36

<210> 24
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador Aldolasa
 <400> 24
 10 agaagacata tgattatca gccggggac 29
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Alanina Racemasa
 20 <400> 25
 atggacgagt ttcaccgca 20
 <210> 26
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Alanina Racemasa
 30 <400> 26
 ttatgcatcg cttcatccgc 20
 <210> 27
 <211> 31
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador Alanina Racemasa
 <400> 27
 ataataggat cctcatccgc ggccaacggc g 31
 45 <210> 28
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador Alanina Racemasa
 <400> 28
 55 gggaaaggtta ccgaggaata ataatggac gagtttcacc gcg 43
 <210> 29
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador mutágeno
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)

<223> n is a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (21)..(21)
 <223> n is a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (22)..(22)
 <223> k is g o t
 <400> 29
 gccggacgac acgcacatn nkgcggctgt gaaggcgaac gcc 43
 15 <210> 30
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador mutágeno
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n is a, c, g o t
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> k is g o t
 <400> 30
 35 gtgaaggcga acgcctatgg annkggggat gtgcaggtgg caagg 45
 <210> 31
 <211> 45
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador mutágeno
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n is a, c, g o t
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> k is g o t
 55 <400> 31
 cctcccgcct ggcggtgcc nnkttggatg aggcgctcgc tttaa 45
 <210> 32
 <211> 45
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador mutágeno
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n is a, c, g o t

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> k is g o t

10 <400> 32
 caaccaggcg aaaaggtgag cnnkgtgcg acgtacactg cgag 45

<210> 33
 <211> 45

15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n is a, c, g o t

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> k is g o t

30 <400> 33
 gatcgggacg attccgatcg gcnnkcgga cggctggctc cgccg 45

<210> 34
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n is a, c, g o t

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> k is g o t

50 <400> 34
 gccatttga aacgatcaac nnkgaagtgc cttgcacgat cag 43

55 <210> 35
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador Racemasa

<400> 35
 gggaaaggta ccgaggaata ataaatggac gagtttcacc gcg 43

65 <210> 36

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador Racemasa

<400> 36
 gcggcgccat ggacgagttt caccgcg 27

10 <210> 37
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador Alanina Racemasa

<400> 37
 gccattgga aacgatcaac tatgaagtgc cttgcacgat cag 43

<210> 38
 <211> 45
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador Alanina Racemasa

30 <400> 38
 ctcccgcctg gcggttgct tcttgatga ggcgctcgct ttaag 45

<210> 39
 <211> 43
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador Alanina Racemasa

40 <400> 39
 gccggacgac acgcacatta tggcggcgt gaaggcgaac gcc 43

45 <210> 40
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> Alanina Racemasa (*Geobacillus stearothermophilus*)

<400> 40

ES 2 587 572 T3

```

atggacgagt ttcaccgcga tacgtgggcg gaagtggatt tggacgccat ttacgacaat    60
gtggagaatt tgcgccgttt gctgccggac gacacgcaca ttatggcggg cgtgaaggcg    120
aacgcctatg gacatgggga tgtgcagggtg gcaaggacag cgctcgaagc gggggcctcc    180
cgcttggcgg ttgccttttt ggatgaggcg ctcgctttaa gggaaaaagg aatcgaagcg    240
ccgattctag ttctcggggc ttcccgtcca gctgatgcgg cgctggccgc ccagcagcgc    300
attgccctga ccgtgttccg ctccgactgg ttggaagaag cgtccgccct ttacagcggc    360
ccttttccta ttcatttcca tttgaaaatg gacaccggca tgggacggct tggagtgaaa    420
gacgaggaag agacgaaaac aatcgtagcg ctgattgagc gccatccgca ttttgtgctt    480
gaaggggtgt acacgcattt tgcgactgcg gatgaggtga acaccgatta tttttcctat    540
cagtataccc gttttttgca catgctcgaa tggtgccgt cgcgcccgcc gctcgtccat    600
tgcgccaaac gcgcagcgtc gctccgtttc cctgaccgga cgttcaatat ggtccgcttc    660
ggcattgcca tgtatgggct tgccccgtcg cccggcatca agccgctgct gccgatcca    720
ttaaagaag cattttcgtc ccatagccgc ctcgtaacg tcaaaaaact gcaaccaggc    780
gaaaaggatg gctatggtgc gacgtacact gcgcagacgg aggagtggat cgggacgatt    840
ccgatcggct atgcggacgg ctggctccgc cgctgcagc actttcatgt ctttgttgac    900
ggacaaaagg cgccgattgt cggccgcatt tgcattgacc agtgcattgat ccgctgcct    960
ggtccgctgc cggtcggcac gaaggtgaca ctgattggtc gccaaagggg cgaggtaatt   1020
tccattgatg atgtcgctcg ccatttggaa acgatcaact acgaagtgcc ttgcacgatc   1080
agttatcgag tgccccgtat ttttttccgc cataagcgta taatggaagt gagaaacgcc   1140
gttggccgcg ga                                     1152

```

5 <210> 41
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> Alanina Racemasa (*Geobacillus stearothermophilus*)

10 <400> 41

ES 2 587 572 T3

Met Asp Glu Phe His Arg Asp Thr Trp Ala Glu Val Asp Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Ile Tyr Asp Asn Val Glu Asn Leu Arg Arg Leu Leu Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

His Ile Met Ala Val Val Lys Ala Asn Ala Tyr Gly His Gly Asp Val
 35 40 45

Gln Val Ala Arg Thr Ala Leu Glu Ala Gly Ala Ser Arg Leu Ala Val
 50 55 60

Ala Phe Leu Asp Glu Ala Leu Ala Leu Arg Glu Lys Gly Ile Glu Ala
 65 70 75 80

Pro Ile Leu Val Leu Gly Ala Ser Arg Pro Ala Asp Ala Ala Leu Ala
 85 90 95

Ala Gln Gln Arg Ile Ala Leu Thr Val Phe Arg Ser Asp Trp Leu Glu
 100 105 110

Glu Ala Ser Ala Leu Tyr Ser Gly Pro Phe Pro Ile His Phe His Leu
 115 120 125

Lys Met Asp Thr Gly Met Gly Arg Leu Gly Val Lys Asp Glu Glu Glu
 130 135 140

Thr Lys Arg Ile Val Ala Leu Ile Glu Arg His Pro His Phe Val Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Val Tyr Thr His Phe Ala Thr Ala Asp Glu Val Asn Thr Asp

ES 2 587 572 T3

165 170 175

Tyr Phe Ser Tyr Gln Tyr Thr Arg Phe Leu His Met Leu Glu Trp Leu
180 185 190

Pro Ser Arg Pro Pro Leu Val His Cys Ala Asn Ser Ala Ala Ser Leu
195 200 205

Arg Phe Pro Asp Arg Thr Phe Asn Met Val Arg Phe Gly Ile Ala Met
210 215 220

Tyr Gly Leu Ala Pro Ser Pro Gly Ile Lys Pro Leu Leu Pro Tyr Pro
225 230 235 240

Leu Lys Glu Ala Phe Ser Leu His Ser Arg Leu Val His Val Lys Lys
245 250 255

Leu Gln Pro Gly Glu Lys Val Ser Tyr Gly Ala Thr Tyr Thr Ala Gln
260 265 270

Thr Glu Glu Trp Ile Gly Thr Ile Pro Ile Gly Tyr Ala Asp Gly Trp
275 280 285

Leu Arg Arg Leu Gln His Phe His Val Leu Val Asp Gly Gln Lys Ala
290 295 300

Pro Ile Val Gly Arg Ile Cys Met Asp Gln Cys Met Ile Arg Leu Pro
305 310 315 320

Gly Pro Leu Pro Val Gly Thr Lys Val Thr Leu Ile Gly Arg Gln Gly
325 330 335

Asp Glu Val Ile Ser Ile Asp Asp Val Ala Arg His Leu Glu Thr Ile
340 345 350

Asn Tyr Glu Val Pro Cys Thr Ile Ser Tyr Arg Val Pro Arg Ile Phe
355 360 365

Phe Arg His Lys Arg Ile Met Glu Val Arg Asn Ala Val Gly Arg Gly
370 375 380

<210> 42
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Ala Racemasa mutagenizada

<400> 42

ES 2 587 572 T3

atggacgagt ttcaccgca tacgtgggcg gaagtggatt tggacgcat ttacgacaat 60
 gtggagaatt tgcgccgttt gctgccggac gacacgcaca tttgtgcggt cgtgaaggcg 120
 aacgcctatg gacatgggga tgtgcagggtg gcaaggacag cgctcgaagc gggggcctcc 180
 cgctggcggt ttgccgagtt ggatgaggcg ctcgctttaa gggaaaaagg aatcgaagcg 240
 ccgattctag ttctcggggc ttcccgtcca gctgatgcgg cgctggccgc ccagcagcgc 300
 attgccctga ccgtgttccg ctccgactgg ttggaagaag cgtccgcctt ttacagcggc 360
 ccttttctta ttcatttcca tttgaaaatg gacaccggca tgggacggct tggagtgaaa 420
 gacgaggaag agacgaaacg aatcgtagcg ctgattgagc gccatccgca ttttgtgctt 480
 gaaggggtgt acacgcattt tgcgactgcg gatgagggtga acaccgatta tttttcctat 540
 cagtataccc gttttttgca catgctcgaa tggtgcccgt cgcgcccgtc gctcgtccat 600
 tgcgccaaca gcgcagcgtc gctccgtttc cctgaccgga cgttcaatat ggtccgcttc 660
 ggcattgcca tgtatgggct tgccccgtcg cccggcatca agccgctgct gccgtatcca 720
 ttaaaagaag cattttcgct ccatagccgc ctcgtagcgc tcaaaaaact gcaaccaggc 780
 gaaaaggtga gctatggtgc gacgtacact gcgcagacgg aggagtggat cgggacgatt 840
 ccgatcggct atgcggacgg ctggctccgc cgctgcagc actttcatgt ccttgttgac 900
 ggacaaaagg cgccgattgt cggccgcatt tgcatggacc agtgcgatgat ccgcctgcct 960
 ggtccgctgc cggtcggcac gaaggtgaca ctgattggtc gccaaagggga cgaggtaatt 1020
 tccattgatg atgtcgctcg ccatttgaa acgatcaacg cggaagtgcc ttgcacgatc 1080
 agttatcgag tgccccgtat ttttttccgc cataagcgtg taatggaagt gagaaacgcc 1140
 gttggccgcg ga 1152

<210> 43
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Ala Racemasa mutagenizada

10

<400> 43
 Met Asp Glu Phe His Arg Asp Thr Trp Ala Glu Val Asp Leu Asp Ala
 1 5 10 15
 Ile Tyr Asp Asn Val Glu Asn Leu Arg Arg Leu Leu Pro Asp Asp Thr
 20 25 30
 His Ile Cys Ala Val Val Lys Ala Asn Ala Tyr Gly His Gly Asp Val
 35 40 45

ES 2 587 572 T3

Gln Val Ala Arg Thr Ala Leu Glu Ala Gly Ala Ser Arg Leu Ala Val
50 55 60

Ala Glu Leu Asp Glu Ala Leu Ala Leu Arg Glu Lys Gly Ile Glu Ala
65 70 75 80

Pro Ile Leu Val Leu Gly Ala Ser Arg Pro Ala Asp Ala Ala Leu Ala
85 90 95

Ala Gln Gln Arg Ile Ala Leu Thr Val Phe Arg Ser Asp Trp Leu Glu
100 105 110

Glu Ala Ser Ala Leu Tyr Ser Gly Pro Phe Pro Ile His Phe His Leu
115 120 125

Lys Met Asp Thr Gly Met Gly Arg Leu Gly Val Lys Asp Glu Glu Glu
130 135 140

Thr Lys Arg Ile Val Ala Leu Ile Glu Arg His Pro His Phe Val Leu
145 150 155 160

Glu Gly Val Tyr Thr His Phe Ala Thr Ala Asp Glu Val Asn Thr Asp
165 170 175

Tyr Phe Ser Tyr Gln Tyr Thr Arg Phe Leu His Met Leu Glu Trp Leu
180 185 190

Pro Ser Arg Pro Leu Leu Val His Cys Ala Asn Ser Ala Ala Ser Leu
195 200 205

Arg Phe Pro Asp Arg Thr Phe Asn Met Val Arg Phe Gly Ile Ala Met
210 215 220

Tyr Gly Leu Ala Pro Ser Pro Gly Ile Lys Pro Leu Leu Pro Tyr Pro
225 230 235 240

Leu Lys Glu Ala Phe Ser Leu His Ser Arg Leu Val His Val Lys Lys
245 250 255

Leu Gln Pro Gly Glu Lys Val Ser Tyr Gly Ala Thr Tyr Thr Ala Gln
260 265 270

Thr Glu Glu Trp Ile Gly Thr Ile Pro Ile Gly Tyr Ala Asp Gly Trp
275 280 285

Leu Arg Arg Leu Gln His Phe His Val Leu Val Asp Gly Gln Lys Ala
290 295 300

ES 2 587 572 T3

Pro Ile Val Gly Arg Ile Cys Met Asp Gln Cys Met Ile Arg Leu Pro
305 310 315 320

Gly Pro Leu Pro Val Gly Thr Lys Val Thr Leu Ile Gly Arg Gln Gly
325 330 335

Asp Glu Val Ile Ser Ile Asp Asp Val Ala Arg His Leu Glu Thr Ile
340 345 350

Asn Ala Glu Val Pro Cys Thr Ile Ser Tyr Arg Val Pro Arg Ile Phe
355 360 365

Phe Arg His Lys Arg Ile Met Glu Val Arg Asn Ala Val Gly Arg Gly
370 375 380

<210> 44

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador BCAT de *B. licheniformis*

10

<400> 44

ggttaaggcc atgggggacc agaaagacca 30

<210> 45

15 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador BCAT de *B. licheniformis*

<400> 45

ggcctccgt cgactcagct gacacttaag ct 32

25 <210> 46

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador mutágeno

<400> 46

35 atcacggatt ttattcggg gacggcgtg 29

<210> 47

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Cebador mutágeno

<400> 47

45 atcacggatt ttagacggg gacggcgtg 29

<210> 48

<211> 26

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

5 <400> 48
 ggacggcgtg tatgaagga tcaggg 26

<210> 49
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

15 <400> 49
 tgttgaagg gatcaagga tacgacggca ac 32

<210> 50
 <211> 34
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

25 <400> 50
 gacggcgtgt atgaaggat caaggtatac gacg 34

<210> 51
 <211> 29
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

<400> 51
 40 gctgaaagac gcttcatcc gcttggtcg 29

<210> 52
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador mutágeno

<400> 52
 50 gctgaaagac gctcacatcc gcttggtc 28

<210> 53
 <211> 38
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

<400> 53
 60 ctgaaagacg cttacatcta ctggtcgtt tcaagagg 38

<210> 54
 <211> 40
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

5 <400> 54
 ggctgaaaga cgcttcatc tacttggtcg ttcaagagg 40

<210> 55
 <211> 39
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

15 <400> 55
 gctgaaagac gctcacatct acttggtcgt ttcaagagg 39

<210> 56
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

25 <400> 56
 gcaggtgacc gcggactcga tccaaac 27

<210> 57
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

<400> 57
 gcaggtgacc tcggacacga tccaaac 27

40 <210> 58
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador mutágeno

<400> 58
 50 gcaggtgacc gcggacacga tccaaacaat tg 32

<210> 59
 <211> 40
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

<400> 59
 60 gtcataaa ttgtcgaacc atacgcaata tccccgaaac 40

<210> 60
 <211> 40
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

5 <400> 60
 gtcatacaaa ttgtcgaacc aaaggcaata ttcccgaaac 40

<210> 61
 <211> 40
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

15 <400> 61
 gtcatacaaa ttgtcgaacc attggcagaa ttcccgaaac 40

<210> 62
 <211> 45
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

25 <400> 62
 cgagtgtcat cataattgtc gaaccatacg cagaattccc gaaac 45

<210> 63
 <211> 46
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador mutágeno

<400> 63
 ccgagtgtca tcataattgt cgaaccaaag gcagaattcc cgaaac 46

40 <210> 64
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador mutágeno

<400> 64
 aatcgctgaa cttgtaaac aatattcttg tccggatcga gg 42

<210> 65
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador Oligo

60 <400> 65
 gaagaccgtg gttatcaatt t 21

<210> 66
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador Oligo
 5 <400> 66
 gatggtattt acgaagtaat c 21
 <210> 67
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Oligo
 15 <400> 67
 agattaata tcacaacgta ac 22
 <210> 68
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador Oligo
 <400> 68
 gccaaagtaaa atttaagatt ta 22
 30 <210> 69
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador Oligo
 <400> 69
 atttgctggg tgcgtataaa g 21
 40 <210> 70
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador 4978 DAT GSP1 Upstrm
 <400> 70
 50 gacatgctcc tccgctgtaa ataattcacc 30
 <210> 71
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 4978 DAT GSP1 Dwnstr
 60 <400> 71
 ccctggtgat gaagtgaagc cagtattaac 30
 <210> 72
 <211> 27
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 4978 DAT GSP2 Upstrm
 5 <400> 72
 atcgccaaat tgataaccac ggtcttc. 27
 <210> 73
 <211> 30
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 4978 DAT GSP2 Dwnstr
 15 <400> 73
 acgtcccga gcaaacttg aaaaagggtg 30
 <210> 74
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador 7063 DAT GSP1 Upstrm
 <400> 74
 tgcatagaat cggtcgatat gttcagtagc 30
 30 <210> 75
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador 7063 DAT GSP1 Dwnstr
 <400> 75
 40 gcggagaac gattacagaa ggttctcaa 30
 <210> 76
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador 7063 DAT GSP2 Upstrm
 <400> 76
 50 gtcaccaa at tgataaccac ggtcttc 27
 <210> 77
 <211> 27
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 7063 DAT GSP2 Dwnstr
 60 <400> 77
 ggtgtacttt atacgcaccc agcaaat 27
 <210> 78
 <211> 22
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Adaptor Cebador Oligo 1
 5 <400> 78
 gtaatacgac tcactatagg gc 22
 <210> 79
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Adaptor Cebador Oligo 2
 15 <400> 79
 actatagggc acgctggt 19
 <210> 80
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador Oligo ATCC4978DAATNde1F
 <400> 80
 ggcttgca tatgagttat agcttatgga atgacc 36
 30 <210> 81
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> ATCC4978DAATBamH1R Cebador Oligo
 <400> 81
 40 ggcttaagg atccttatgc gcgaatacct ttggg 36
 <210> 82
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador Oligo ATCC7063DAATNdeIF
 <400> 82
 50 ggcttgca tatgagctac acttatgga atga 34
 <210> 83
 <211> 32
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Oligo ATCC7063DAATBamH1R2a
 60 <400> 83
 ggccaaggat ccgctacca ctaatcatta ga 32
 <210> 84
 <211> 852
 65 <212> ADN
 <213> *Bacillus rotans*

ES 2 587 572 T3

<400> 84
 atgagttata gcttatggaa tgaccaaaatt gtgaatgatg aagaagtagt agttgataag 60
 gaggaccgtg gctatcaatt tggcgtatggt gtttatgaag ttgtaaaagt atataacggt 120
 gaattattta cagcggagga gcatgtcgat cgtttttacg cgagtgtcga aaaaattcgc 180
 gttacgatcc cttatacaaa agacaaattg catcaattat tgcatacagtt agttgaaatg 240
 aataaagttc aaacaggaca tatttatttc caaattacgc gtggtgcagg ccctcgtaat 300
 catattttcc ctggtgatga agtgaagcca gtattaacag gtaataccaa ggaaaatcca 360
 cgtcccgtag caaactttga aaaagggtg aaagcaacat ttgtagaaga cattcgttgg 420
 ttacgctgtg acattaaatc attaaattta cttggtgcgg tacttgctaa acaagaagca 480
 catgaaaaag gatgctatga agcggtttta catcgtgatg aaatcgtaac agaaggctct 540
 tcttcaaata tttatggaat taaagatggc gtattataca cacatccagc gaataacttc 600
 atcttaaag gtattacagc tcaagtaatc attaaatgtg ctgctgaaat tggcttacca 660
 gtgaaggaag aagcaatgac aaaaactcag cttcttgcaa tggatgaagt gattgtttca 720
 tcaacgactt cagaagtaac gccaaattatc gacatagatg gaacagtaat tgggtcgggt 780
 aaaccgggtg actggacagc taaattacaa gcacaatttg atacgaaaat cccaaaaggt 840
 attcgcgcat aa 852

5 <210> 85
 <211> 870
 <212> ADN
 <213> *Bacillus serositidis*

10 <400> 85
 atgagctaca ctttatggaa tgacaaaatt gtggatgata accaagtatt cattaataaa 60
 gaagacagag gctatcaatt tgggtgacggc gtttatgaag ttataaaaagt atatgatggg 120
 gaaatgttta ctgctactga acatatcgac cgattctatg caagtgcaga gaagattaaa 180
 ttgactgtac cctatacaaa gcataaactg catcaattac tgcatagaatt agtggaaagca 240
 aacgagctga aaactggaaa cttatacttt cagataacac gcggtgcgctc tccgcgtaat 300
 catctatttc caggagacga tgtacttccg gtattaacgg gaaatgtaaa agaagcacca 360
 cgctccatcg aaaaatgcga aaaagggtgta aaagccacat ttgcagaaga tattcgttgg 420
 ctgctgctgc atattaaatc gctaaatctt ttaggggctg ttttagcgaa acaagaggca 480
 catgaaaag gctgctacga agcaatttta catcgcggag aaacgattac agaaggttct 540
 tcaacaaacg ttttcggtat aaaaaatggt gtactctata cacatccagc tgataatttc 600
 atcttaagcg gcattacagc cgggtgttgt ttggcatgtg cgaacgaaat tggacttctc 660
 gtaaaacaag aagcatttac aaaagacaaa gcaactgcaa tggacgaaat gttcgtatcc 720
 tctactactt ctgaaataac accagttatc gatcttgatg gagtggccat taatggtgga 780
 gaaattggcg aatggacgcg caagctgcaa aagcaatttg caacgaagct tccggaagc 840
 ccagcatata atttaacaga atataaatag 870

15 <210> 86
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> *Bacillus rotans*

<400> 86

ES 2 587 572 T3

Met Ser Tyr Ser Leu Trp Asn Asp Gln Ile Val Asn Asp Glu Glu Val
 1 5 10 15

Val Val Asp Lys Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Val Tyr
 20 25 30

Glu Val Val Lys Val Tyr Asn Gly Glu Leu Phe Thr Ala Glu Glu His
 35 40 45

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

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

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

Gly Pro Arg Asn His Ile Phe Pro Gly Asp Glu Val Lys Pro Val Leu
 100 105 110

Thr Gly Asn Thr Lys Glu Asn Pro Arg Pro Val Ala 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

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

Thr Glu Gly Ser Ser Ser Asn Ile Tyr Gly Ile Lys Asp Gly Val 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 Ile Lys Cys Ala Ala Glu Ile Gly Leu Pro Val Lys Glu Glu
 210 215 220

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

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

Ile Gly Ala Gly Lys Pro Gly Asp Trp Thr Arg Lys Leu Gln Ala Gln
 260 265 270

Phe Asp Thr Lys Ile Pro Lys Gly Ile Arg Ala
 275 280

<210> 87
 <211> 289
 <212> PRT

5

ES 2 587 572 T3

<213> *Bacillus serositidis*

<400> 87

Met Ser Tyr Thr Leu Trp Asn Asp Lys Ile Val Asp Asp Asn Gln Val
 1 5 10 15

Phe Ile Asn Lys Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Val Tyr
 20 25 30

Glu Val Ile Lys Val Tyr Asp Gly Glu Met Phe Thr Ala Thr Glu His
 35 40 45

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

Tyr Thr Lys His Lys Leu His Gln Leu Leu His Glu Leu Val Glu Ala
 65 70 75 80

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

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

Thr Gly Asn Val Lys Glu Ala Pro Arg Ser Ile Glu Asn Ala Gln Lys
 115 120 125
 Gly Val Lys Ala Thr Phe Ala 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

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

Thr Glu Gly Ser Ser Thr Asn Val Phe Gly Ile Lys Asn Gly Val Leu
 180 185 190

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

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

Ala Phe Thr Lys Asp Lys Ala Leu Gln Met Asp Glu Met Phe Val Ser
 225 230 235 240

Ser Thr Thr Ser Glu Ile Thr Pro Val Ile Asp Leu Asp Gly Val Ala
 245 250 255

Ile Asn Gly Gly Glu Ile Gly Glu Trp Thr Arg Lys Leu Gln Lys Gln
 260 265 270

Phe Ala Thr Lys Leu Pro Gly Ser Pro Ala Tyr Asn Leu Thr Glu Tyr
 275 280 285

5 Lys

<210> 88
 <211> 29
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 1 DAT de *B. sphaericus*

 10 <400> 88
 gatataccat ggatactcat tatggaatg 29

 <210> 89
 <211> 32
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 2 DAT de *B. sphaericus*
 20
 <400> 89
 gttatcggat ccttaggcat taattgaaat tg 32

 <210> 90
 25 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Cebador 1 DAT de *B. licheniformis*

 <400> 90
 ggccgggtca tatgaaagt cttttaacg gc 32

 35 <210> 91
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador 2 DAT de *B. licheniformis*

 <400> 91
 45 ccttccggat ccttaaaccg tttggctgt ct 32

 <210> 92
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador 1 de *B. halodurans*

 <400> 92
 55 gatatacata tggattattg ctttaccaa 30

 <210> 93
 <211> 33
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 2 de *B. halodurans*

 65 <400> 93
 gaatccggat cctcactgct tcacgctgt ttg 33

<210> 94
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 1 de *B. cereus*

 10 <400> 94
 taagaggaat aacatatggc atacgaaaga ttt 33

 <210> 95
 <211> 32
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 2 de *B. cereus*
 20
 <400> 95
 gaattcggat ccttaagaag atgacatatt gg 32

 <210> 96
 25 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Cebador 3 de *B. cereus*

 <400> 96
 taagaggaat aacatatggg atcgaaattg gca 33

 35 <210> 97
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador Ndel

 <400> 97
 45 gccttgca tatgggatac actttatgga atgacc 36

 <210> 98
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador BamHI

 <400> 98
 55 ttggaaccgg atccttatat atgaagcgg tttgg 35

 <210> 99
 <211> 283
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> DAT híbrida

 65 <400> 99

ES 2 587 572 T3

Ser Ile Ser Pro Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Val Tyr
 20 25 30

Glu Val Val Lys Val Tyr Asn Gly Asn Met Phe Thr Val Asn Glu His
 35 40 45

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

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

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

Ser Ser Arg Ala His Val Phe Pro Glu Ala Thr Val Pro Ala Val Ile
 100 105 110

Thr Gly Asn Val Lys Ser Gly Glu Arg Ala Leu Glu Asn Leu 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

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

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

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

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

Pro Phe Thr Lys Gly Glu Ile Leu Thr Met Asp Glu Leu Phe Val Thr
 225 230 235 240

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

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

Phe Glu Ala Lys Ile Pro Leu Ser Leu Asn Ser
 275 280

ES 2 587 572 T3

<211> 852
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> DAT híbrida

<400> 100
 atgggatata ctttatggaa tgaccaaatac gtggaagatg gtagcgtcag tattagcccc 60
 gaagatcgcg gttatcaatt cggatgatggc gtatatgaag ttgtgaaagt atataacggg 120
 aacatgttta ctgtaaatac acatattgac cgcttatatg catcagctga aaaaatccgt 180
 attgttattc catatacaaa ggatgtgttt cataagttgc tgcatagaatt agtggaaaaa 240
 aataacttaa acactgggca tttttatctt caagttactc gcggaacttc gagtcgtgcg 300
 catgttttcc ctgaggccac tgtaccagcg gtaatcaccg gtaacgtgaa aagcggcgag 360
 cgtgcgttag aaaatcttga aaaaggtgta aaagctacct ttgtggaaga tatccggttg 420
 ttacgctgtg atattaaatc tttgaacttg cttggtgcag tattagcaaa acaagaagct 480
 agcgaaaaag gctgctatga agcagattctg catcagggcg acatcgtaac agaatgctct 540
 tcttcaaatg ttttggaaat caaagatggt aagttgtata cccatcctgc aaacaatctg 600
 attttaaatg gaatcactcg ccagggtgtc attaaatgtg cagaggaaat taatatccct 660
 gtagtggaag agccatttac aaaagcgcaa atcttgacga tggatgaatt atttgtaaca 720
 agtgttactt ctgaaattac gccggttatt gaaatcgatg gtaatcagat tgggtgcagga 780
 gtgccaggag aatggactcg taaattacaa aaagcttttg aagccaaaat tccactgagc 840
 cttaacagct aa 852

10 <210> 101
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador Ndel

20 <400> 101
 ggccctggca tatgggatac actttatgga atgacca 37

<210> 102
 <211> 37
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador BamHI

30 <400> 102
 ttggaaccgg atccttagct gtaaggctc agtggaa 37

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para producir R,R-monatina o una sal de la misma, que comprende hacer reaccionar un precursor de la monatina y una o más D-aminotransferasas seleccionadas de entre una D-aminotransferasa de *Bacillus halodurans* que comprende la secuencia de aminoácidos presentada en el número de acceso NP_243677, una D-aminotransferasa híbrida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 99, una D-aminotransferasa de ATCC 4978 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 86, una D-aminotransferasa de ATCC 7063 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 87, y homólogos de las mismas con una homología de secuencia de por lo menos 90% a las mismas.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además hacer reaccionar D-triptófano y dichas una o más D-aminotransferasas.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que por lo menos aproximadamente 75% de la monatina producida es R,R-monatina.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa de *Bacillus halodurans* que comprende la secuencia de aminoácidos presentada en el número de acceso NP_243677 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa híbrida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 99 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa de ATCC 4978 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 86 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa de ATCC 7063 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 87 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.
8. D-aminotransferasa híbrida que comprende la SEC ID nº 99, o un homólogo de la misma con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.
9. D-aminotransferasa de ATCC 4978 que comprende la SEC ID nº 86, o un homólogo de la misma con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.
- 40 10. D-aminotransferasa de ATCC 7063 que comprende la SEC ID nº 87, o un homólogo de la misma con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.
- 45 11. Utilización de una o más D-aminotransferasas seleccionadas de entre una D-aminotransferasa de *Bacillus halodurans* que comprende la secuencia de aminoácidos presentada en el número de acceso NP_243677, una D-aminotransferasa híbrida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 99, una D-aminotransferasa de ATCC 4978 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 86, una D-aminotransferasa de ATCC 7063 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 87, y homólogos de las mismas con una homología de secuencia de por lo menos 90% a las mismas, para producir R,R-monatina, o una sal de la misma.
- 50 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que dichas una o más D-aminotransferasas se hacen reaccionar con un precursor de la monatina y/o D-triptófano.
- 55 13. Utilización según la reivindicación 11 o 12, en la que la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa híbrida que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 99 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.
- 60 14. Utilización según la reivindicación 11 o 12, en la que la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa de ATCC 4978 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 86 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.
15. Utilización según la reivindicación 11 o 12, en la que la D-aminotransferasa es una D-aminotransferasa de ATCC 7063 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 87 o una secuencia de aminoácidos con una homología de secuencia de por lo menos 90% a la misma.

FIG. 1

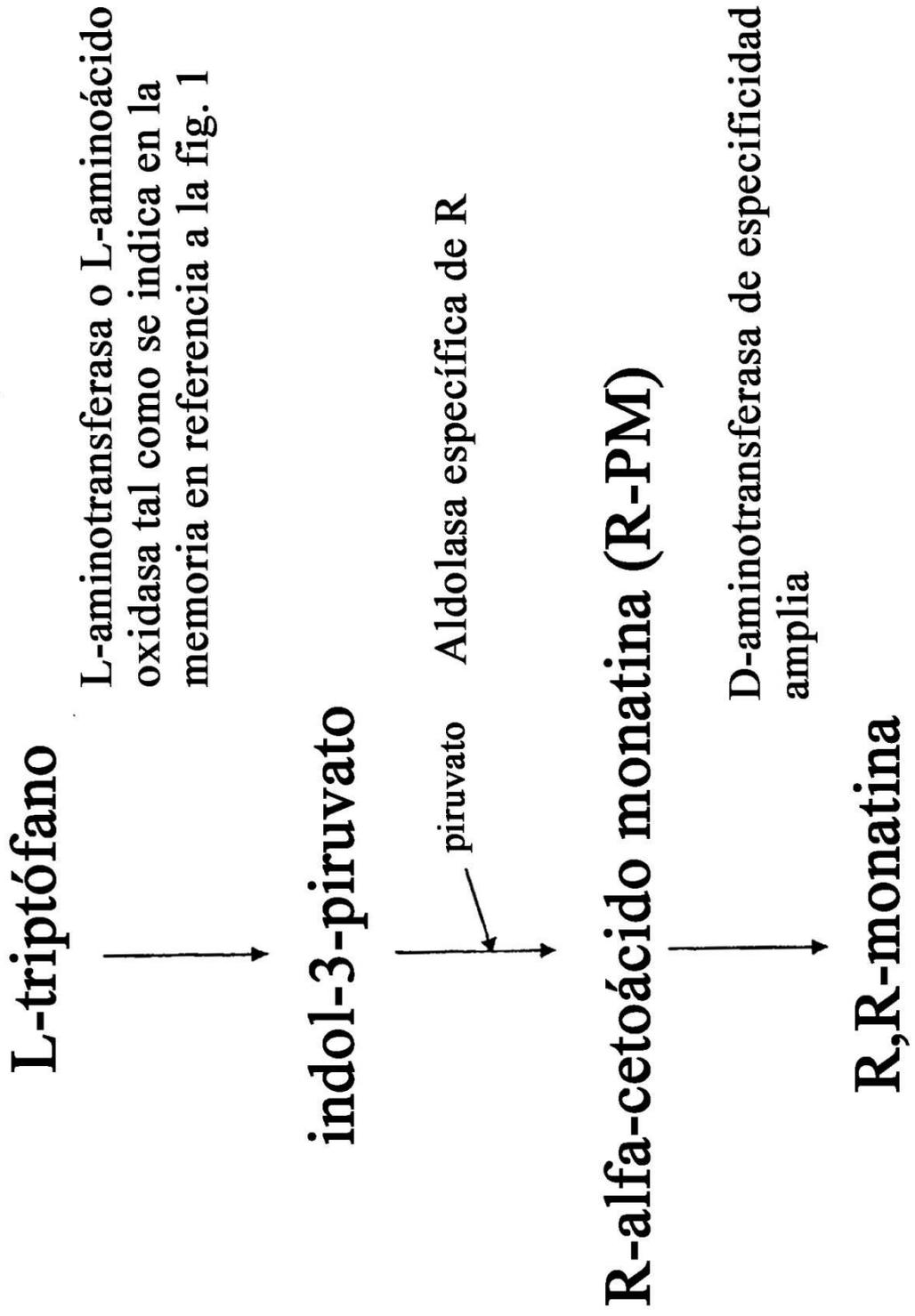


FIG. 2

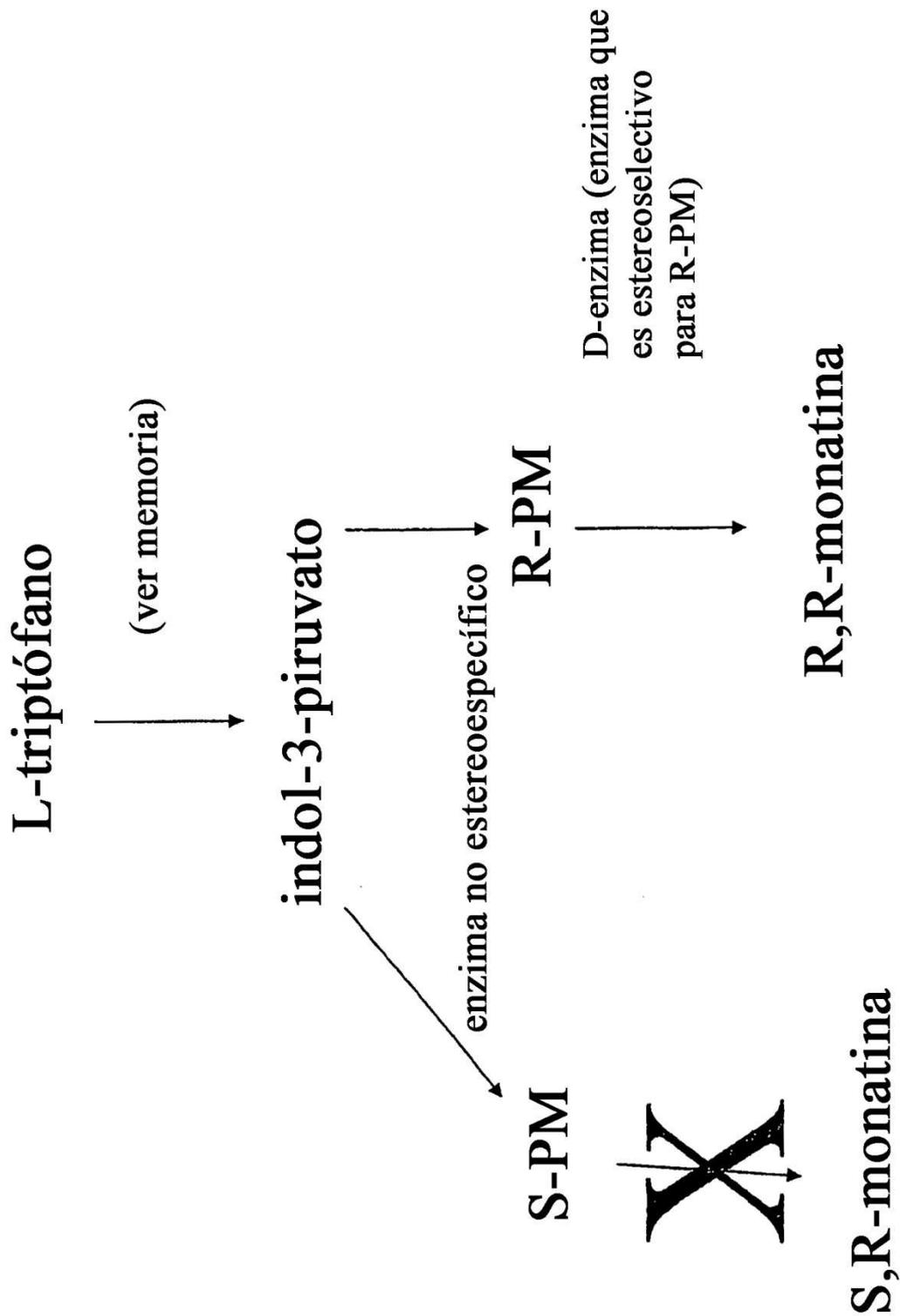


FIG. 3

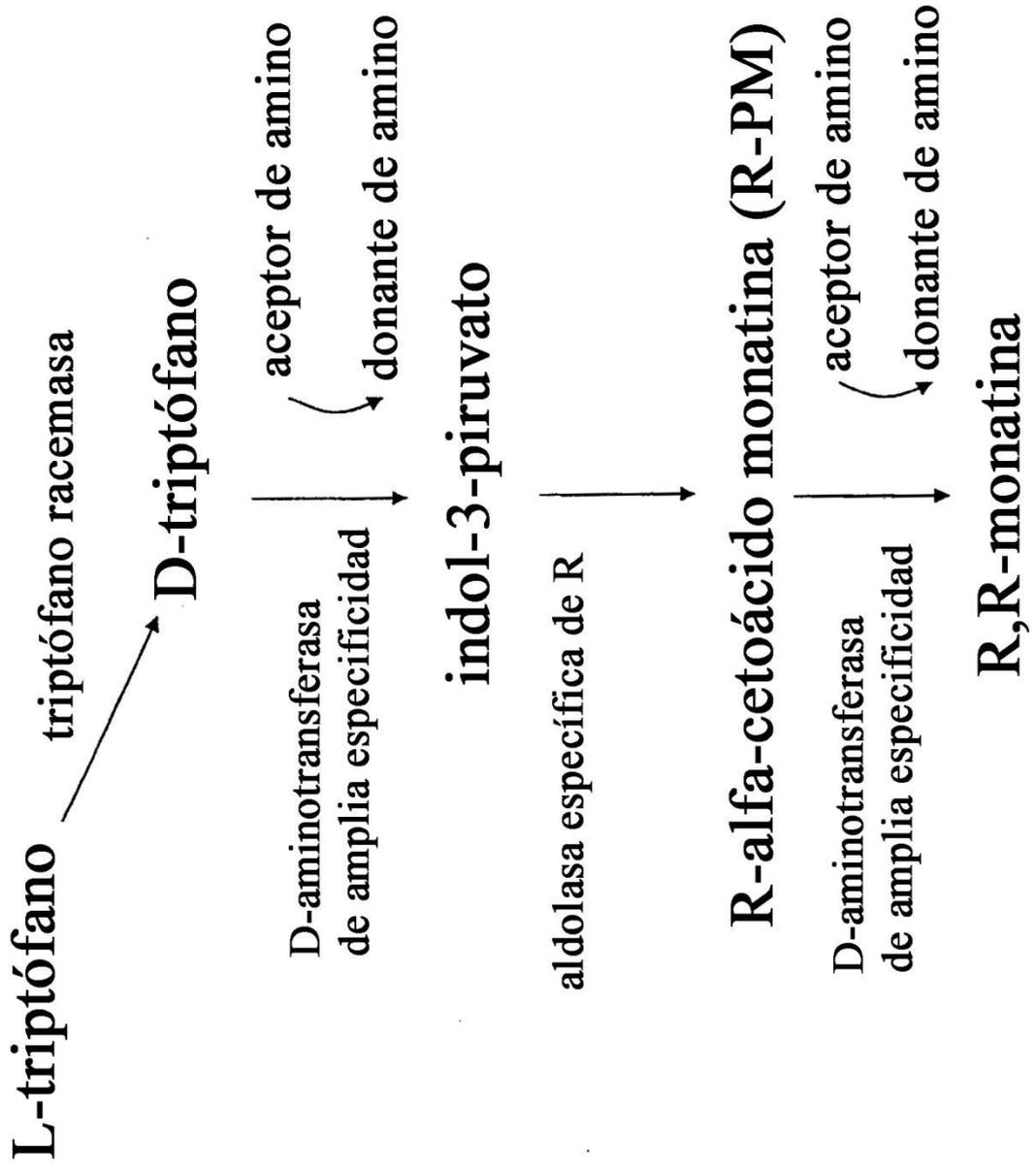


FIG. 4

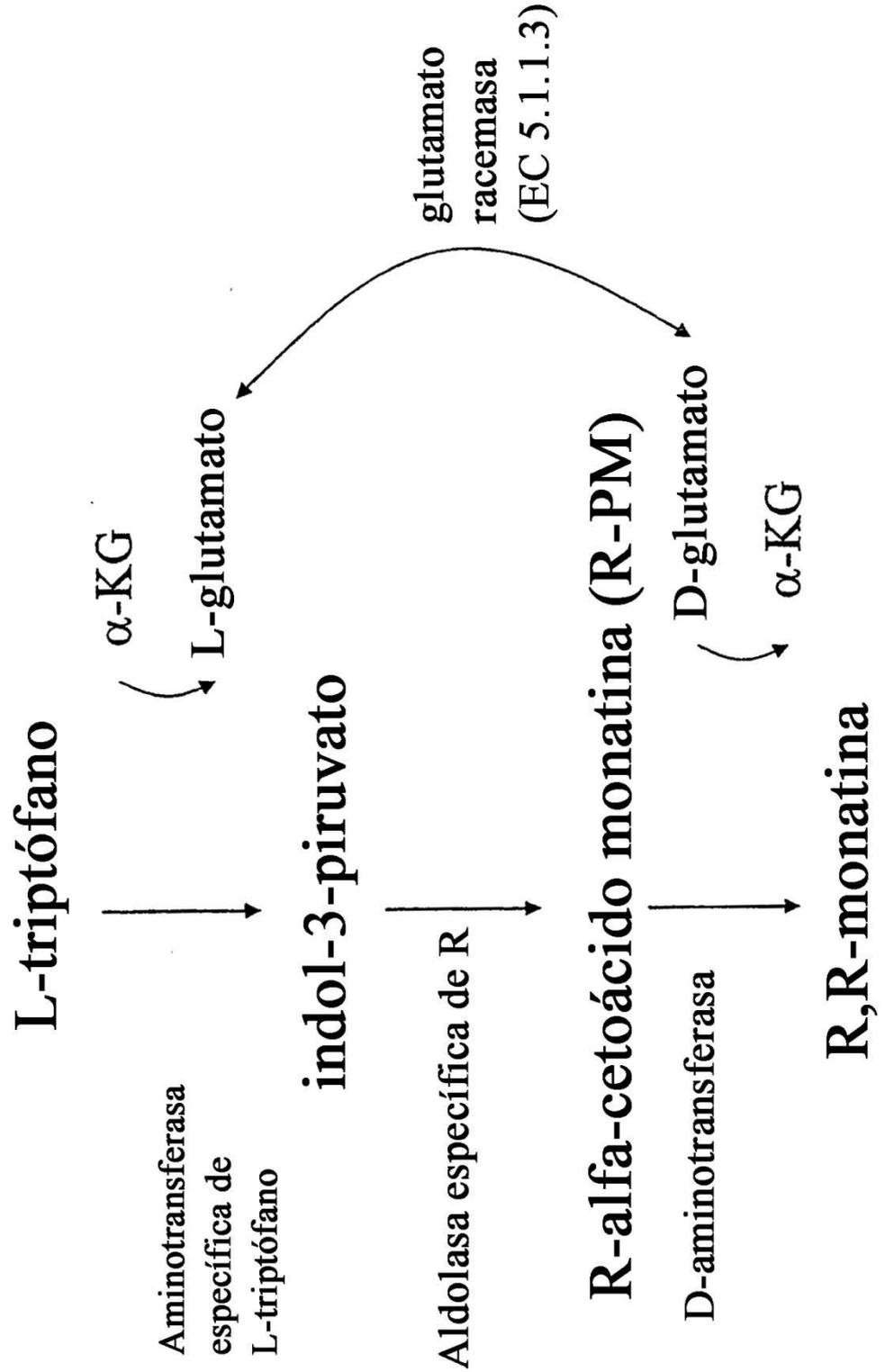


FIG. 5

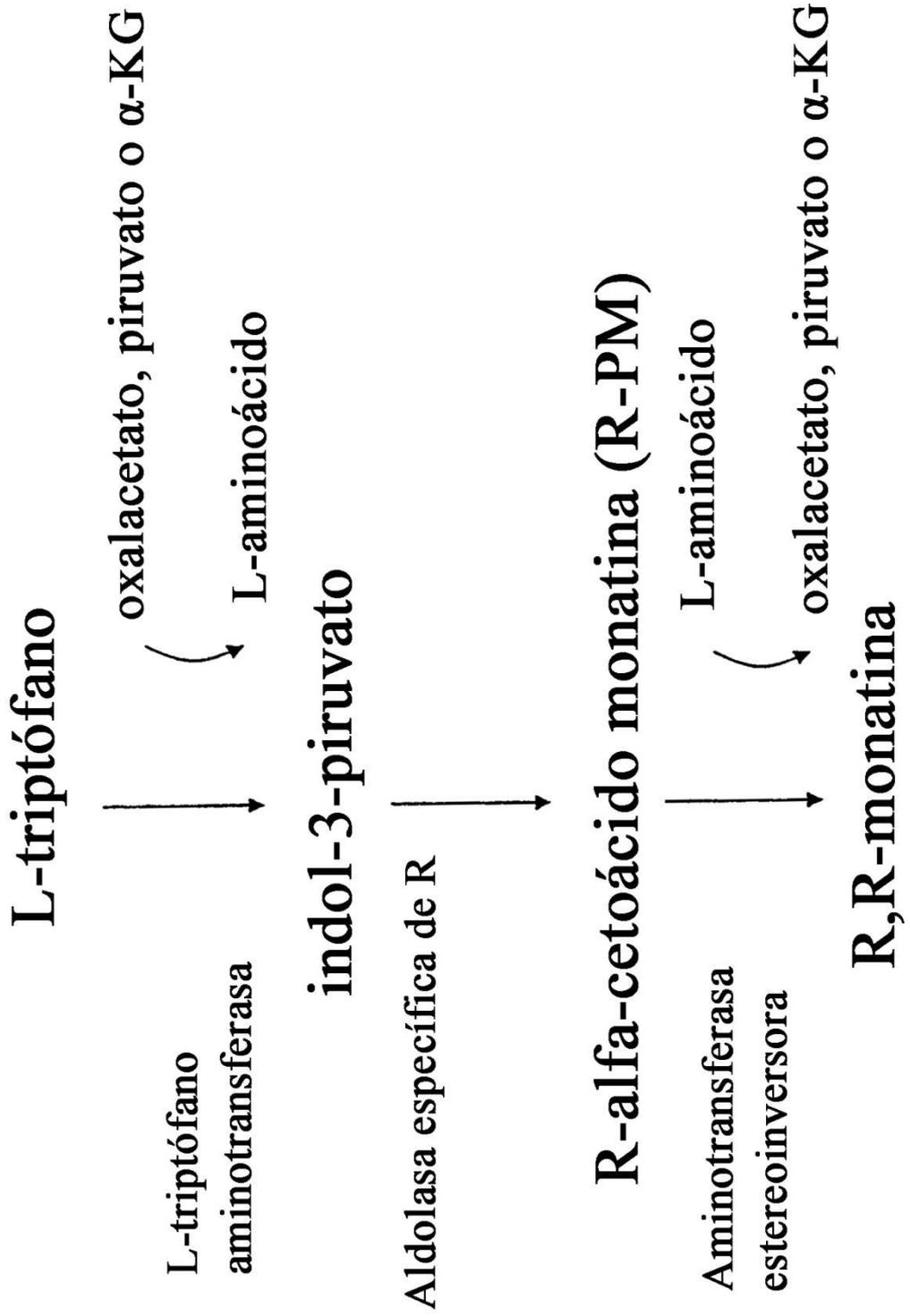


FIG. 6

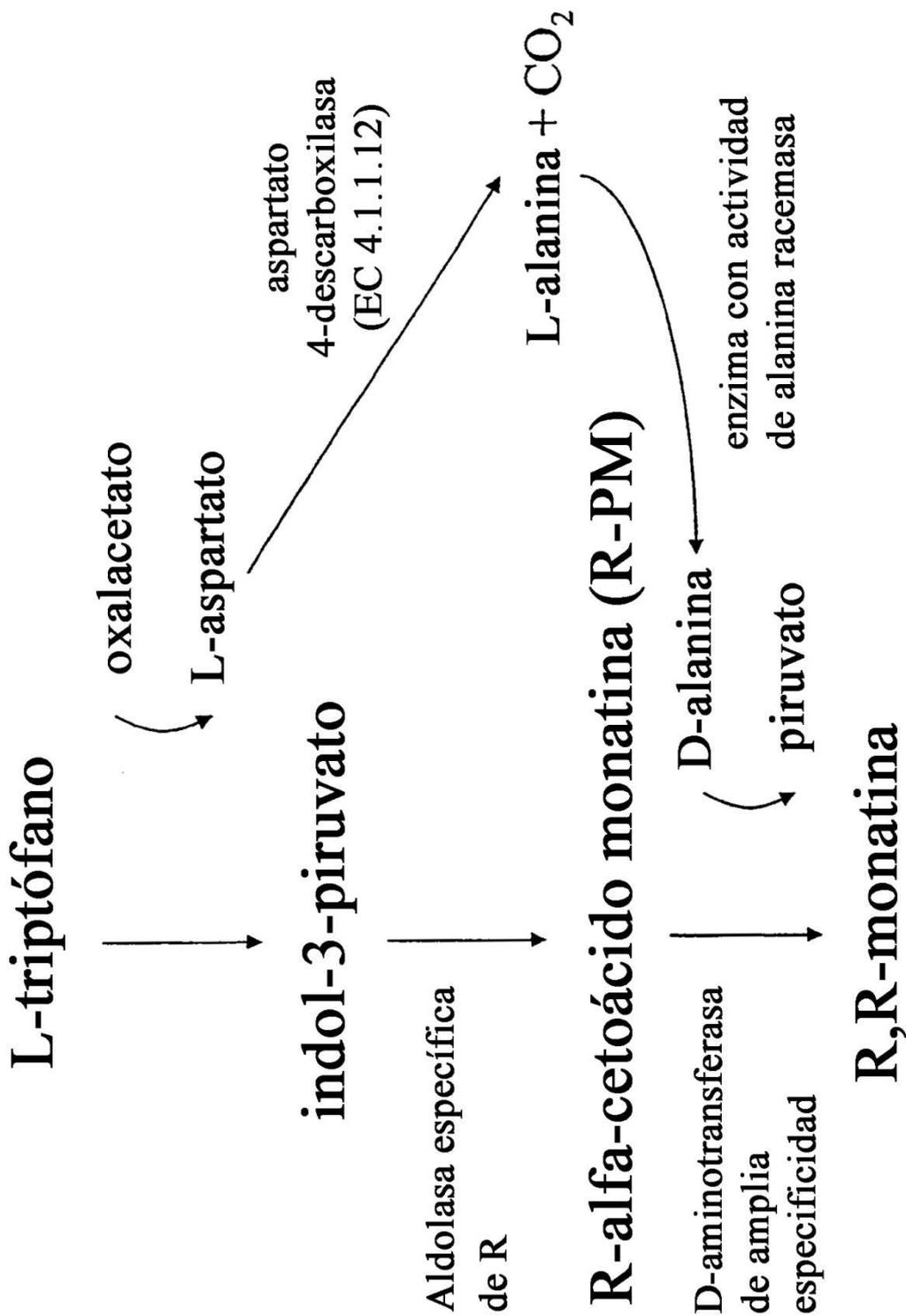


FIG. 7

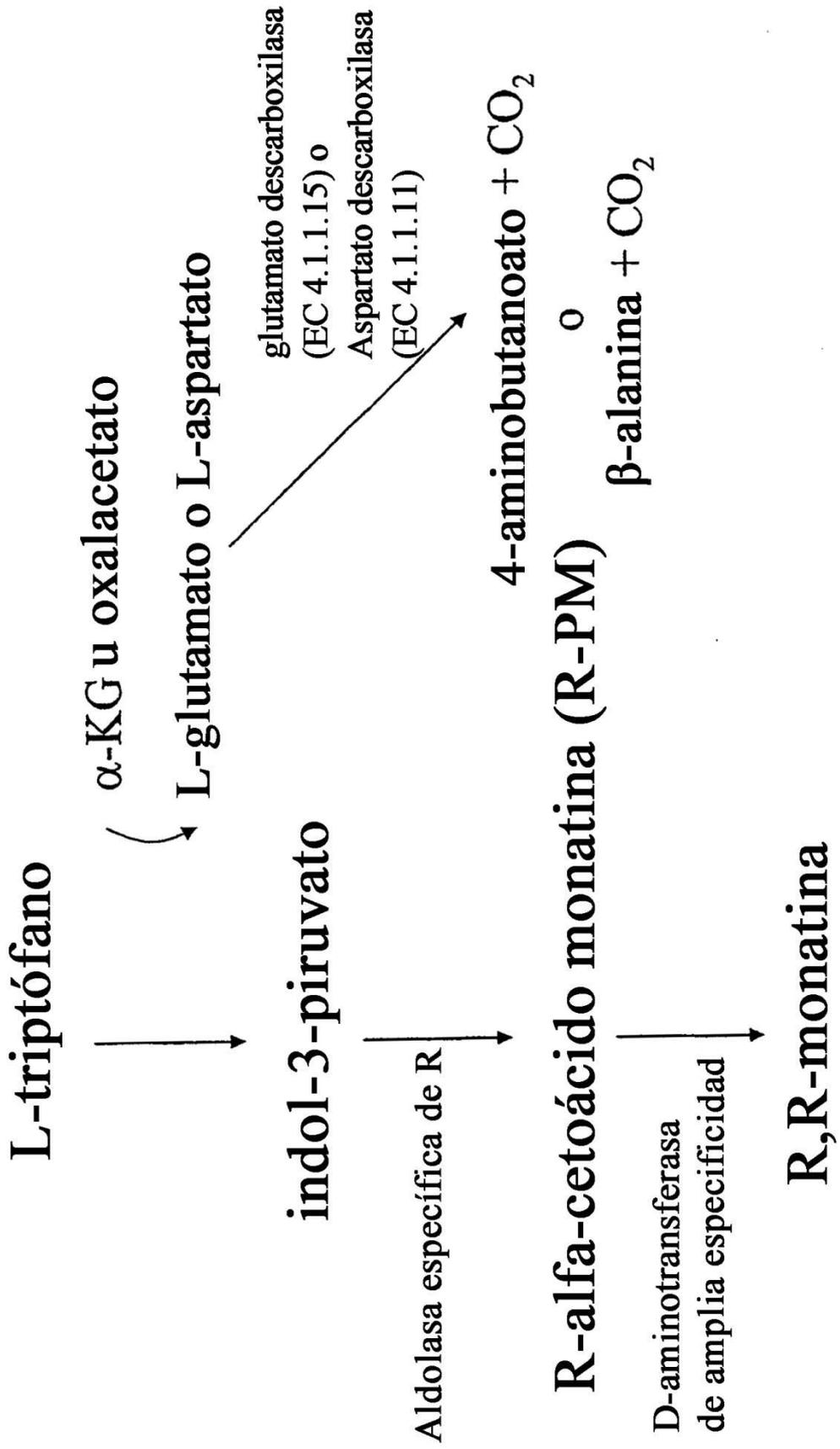


FIG. 8

