



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 241 394**

② Número de solicitud: 200202208

⑤ Int. Cl.7: **C12P 13/04**
C12N 9/90

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **30.09.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2005**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.10.2005

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Almería**
Crta. de Sacramento, s/n
04120 La Cañada de San Urbano, Almería, ES

⑱ Inventor/es: **Rodríguez Vico, Felipe**

⑳ Agente: **Dávila Baz, Ángel**

㉔ Título: **Sistema enzimático y procedimiento para la preparación de D-aminoácidos o derivados de los mismos.**

㉖ Resumen:

Sistema enzimático y procedimiento para la preparación de D-aminoácidos o derivados de los mismos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de D-aminoácidos o derivados de D-aminoácidos, a partir de mezclas racémicas de D,L-hidantoinas caracterizado por estar constituido por las enzimas hidantoín racemasa, D-hidantoinasa y D-carbomilasa; y a un sistema enzimático de utilidad en dicho procedimiento que cataliza la conversión estereoselectiva de D-5-hidantoína hasta D-aminoácido y la racemización entre los enantiómeros de la misma.

ES 2 241 394 A1

DESCRIPCIÓN

Sistema enzimático y procedimiento para la preparación de D-aminoácidos o derivados de los mismos.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de D-aminoácidos o derivados de D-aminoácidos, a partir de la mezcla racémica de la D,L-5-*hidantoína* correspondiente y a un sistema enzimático de utilidad en dicho procedimiento que cataliza la conversión estereoselectiva de D-5-*hidantoína* hasta D-aminoácido y la racemización entre los enantiómeros de la misma. Un aspecto fundamental de este procedimiento, que mejora el estado de la técnica actual, es que la transformación de la mezcla racémica tiene un rendimiento del 100%.

Campo de la invención

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

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

25 **Estado de la técnica**

La síntesis química de aminoácidos naturales o no naturales da lugar a mezclas racémicas de D,L-aminoácidos, que deben ser resueltas hasta sus componentes ópticamente puros antes de ser utilizadas. Existen métodos químicos y biológicos para este proceso y obtener D-aminoácidos razonablemente puros. Estos métodos incluyen la cristalización de sales estereoméricas, cristalización en disolventes ópticamente activos, cromatografía y métodos enzimáticos (Greenstein, J. P. y col. *En Chemistry of the amino acids*, Krieger Publisher, USA, (1984) 1.715-759). Todos estos procedimientos tienen muy limitada aplicación industrial debido a su bajo rendimiento, baja rentabilidad y fuerte efecto contaminante del medio ambiente.

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

La racemización química espontánea de las *hidantoínas* 5-sustituidas se realiza en condiciones fuertemente alcalinas por tautomerismo ceto-enólico. La velocidad de racemización depende de la electronegatividad inductiva del sustituyente del carbono 5. La reacción de racemización de las *hidantoínas* sustituidas es de primer orden, observándose que el tiempo medio de racemización varía desde 55.9 horas, en el caso de la isopropil *hidantoína* hasta 16 minutos, en el caso de la fenil*hidantoína*. Solo esta última y la para-hidroxifenil*hidantoína* racemizan a una velocidad razonable para ser sometidas a las reacciones de transformación en sus correspondientes D,L-aminoácidos (Bommarius, A.S., y col. (1992) *NATO ASI Ser., Ser. C*, 381, 161-174). Por tanto, la inmensa mayoría de *hidantoínas* D,L-5-sustituidas no racemizan espontáneamente a una velocidad adecuada, alargando y encareciendo la obtención de aminoácidos a partir de ellas. Un aspecto fundamental de esta invención es que este problema queda resuelto al permitir el incremento en la velocidad de racemización de estas *hidantoínas* mediante un catalizador específico.

La producción mediante catalizadores enzimáticos de D-aminoácidos ópticamente puros desde sus mezclas racémicas de *hidantoínas* D,L-5-sustituidas es un procedimiento más barato y técnicamente simple que los métodos de síntesis química y quimioenzimática descritos, además es menos contaminante (Kim G. J. y col. (1995) *Enzyme Microb. Techno*, 17, 63-67. Park J. H. y col. (2000) *Biotechno Prog.*, 16, 564-570). En esta transformación enzimática, en primer lugar, el anillo de las *hidantoínas* D,L-5-sustituidas sintetizadas químicamente es hidrolizado por la enzima D-hidantoínasa. Posteriormente, la hidrólisis del D-N-carbamil aminoácido producido es llevada a cabo por la enzima estereoespecífica estricta N-carbamil-D-aminoácido amidohidrolasa (D-carbamilasa). En esta reacción se produce NH₃, CO₂, y el D-aminoácido correspondiente. Puesto que el sustrato de partida (*hidantoína* D,L-5-monosustituida) es una mezcla racémica y la transformación es enantioselectiva, el rendimiento de esta reacción para la mayoría de los sustratos es del 50% como máximo. La única aplicación industrial rentable económicamente es la que utiliza D-

fenilhidantoina y D-5-para-hidroxi- fenilhidantoina ya que son *hidantoinas* con una velocidad de racemización espontánea razonablemente rápida (Bommarius, A.S., y col. (1992) *NATO ASI Ser., Ser. C*, 381, 161-174. Pietzsch, M. and Syldatk, C. (2002) *Enzyme catalysis in organic synthesis*. Drauz, K., Waldmann, H., Eds.; Wiley-VCH, Weinheim, 761-799).

5

Las restricciones a la racemización espontánea de la mayoría de *hidantoinas* D,L-5- monosustituidas limitan su uso industrial, a pesar del valor económico de sus derivados. Pero estos compuestos pueden ser racemizados rápida y eficientemente por la acción catalítica de la enzima hidantoín racemasa. De tal forma que, la utilización conjunta de esta enzima, la D-hidatoínasa y la D-carbamilasa, permite la transformación total del sustrato, *hidantoina* D,L-5-monosustituida, en producto, D-aminoácido. Solo dos hidantoín racemasas se han estudiado a nivel bioquímico evaluándose su aplicación a la síntesis de L-aminoácidos. (Watabe, K. y col. (1992) *J. Bacteriol.* 74, 7989-7995. Wiese, A. y col. (2000) *J. Biotechnol.*, 80, 217-230. Wilms, B. y col. (2001) *J. Biotechnol.*, 86, 19-39).

10

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

15

20

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

25

30

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

35

40

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

45

50

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

55

La patente WO 01/23582 describe la construcción y uso de células de *E. coli* capaces de degradar *hidantoinas* D,L-5-monosustituidas hasta sus correspondientes aminoácidos de forma completa. Pero no hace referencia al enantiómero producido. Las células construidas son portadoras de los genes de la hidantoín racemasa, L-hidatoínasa y L-carbamilasa de *Arthrobacter aurescens* DSM 3747. Las dos últimas enzimas están descritas en la propia patente WO 01/23582 y en los documentos Wilms B. y col. (2001), *J. Biotechnol.* 86, 19-30 y Wiese A. y col. (2001), *Arch. Microbiol.*, 176, 187-196, como L-específicas y L-estereoselectivas. Esto significa, que la D,L-isopropil-5-hidatoína utilizada en los ejemplos de aplicación de esa patente es transformada selectivamente en L-triptófano con un rendimiento del 100%, pero este sistema no puede producir en ningún caso D-aminoácidos, porque no contiene enzimas que reconozcan como sustratos específicos a las *hidantoinas* D-5-monosustituidas.

60

65

ES 2 241 394 A1

Esta es la gran diferencia con la invención que aquí se presenta, ya que este nuevo sistema es el primero diseñado para producir selectiva y únicamente D-aminoácidos a partir de mezclas racémicas de D,L-hidantoinas.

5 Un objeto de la presente invención es un sistema enzimático de utilidad en la preparación selectiva y exclusiva de D-aminoácidos o derivados de los mismos a partir de mezclas racémicas de D,L-hidantoinas.

Otro objeto de la presente invención es la construcción de dicho sistema enzimático por sobre-expresión genética en microorganismos transformados con los genes de hidantoín racemasa, D-hidatoínasa y D-carbamilasa.

10 Un objeto más de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de D-aminoácidos o derivados de los mismos a partir de una mezcla racémica de *hidantoína* D,L-5-monosustituida.

Descripción de la invención

15 De acuerdo con la invención se proporciona un sistema enzimático de utilidad en la preparación selectiva y exclusiva de D-aminoácidos o derivados de los mismos a partir de mezclas racémicas de D,L-*hidantoinas*, caracterizado por estar constituido por las enzimas hidantoín racemasa, D-hidatoínasa y D-carbamilasa.

20 Además, según la invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de dicho sistema enzimático por sobre-expresión genética en microorganismos transformados con los genes de hidantoín racemasa, D-hidatoínasa y D-carbamilasa, que comprende la construcción de una factoría celular de *E. coli* portadora de D-hidatoínasa o D-carbamilasa de *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291 o hidantoín racemasa de *Agrobacterium tumefaciens* C58; clonación de los mismos en plásmidos independientes; expresión de estos genes por separado; y mezcla de cantidades definidas de cada tipo celular para obtener los parámetros cinéticos apropiados de un sistema enzimático capaz de
25 transformar todas las moléculas de una mezcla racémica de *hidantoinas* D,L-5-monosustituidas en su correspondiente D-aminoácido.

30 Según lo anterior, el sistema enzimático de la invención es producido por sobre-expresión en células de microorganismos que son obtenidos por transformación con plásmidos portadores de los genes de dichas enzimas; cultivo de cada tipo celular transformado en un medio derivado del medio LB (Luria-Bertani), con suplemento de MnCl₂ en el caso del cultivo para producir D-hidatoínasa; y combinación de proporciones definidas de las biomásas de dichos cultivos.

35 De acuerdo con este aspecto de la invención, los microorganismos se cultivan independientemente y solo son mezclados después de la inducción de la expresión de su gen foráneo, dando lugar a una mezcla enzimática que puede estar compuesta de células completas, permeabilizadas o rotas.

40 Los microorganismos hospedadores utilizados son *Escherichia coli* transformados con los plásmidos pSER11 (portador del gen de la D-hidatoínasa), pJMC38 (portador del gen de la D-carbamilasa) o pSER14 (portador del gen de la hidantoín racemasa).

45 El plásmido pSER14 contiene un fragmento de ácido desoxirribonucleico que codifica la secuencia aminoacídica de una proteína con actividad hidatoína racemasa y que resulta de la amplificación, por la reacción en cadena de la polimerasa, del genoma de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* C58. Dicho fragmento presenta la secuencia de nucleótidos de la figura 3, y los oligonucleótidos cebadores son Rac5, con la secuencia 5'-AAGAATTCGTGACAG-GAAAGCTATTATGCGTGCGATGCAT-3' y Rac3 con la secuencia 5'-AAGGTACCTTAGGCGCAGGCCGA-3'.

50 Por otro lado, de acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento para la preparación de D-aminoácidos por conversión estereo-selectiva y completa de una mezcla racémica de *hidantoína* D,L-5-monosustituida, en donde la reacción es catalizada por medio del sistema enzimático anteriormente descrito.

55 Concretamente, el procedimiento de obtención de D-aminoácidos o derivados de los mismos comprende incubación de proporciones definidas de dicho sistema enzimático y de una mezcla racémica acuosa de una hidatoína D,L-5-monosustituida; y recuperar el D-aminoácido correspondiente por métodos estándar y viables industrialmente.

Según este aspecto de la invención, la reacción de conversión se lleva a cabo usando una relación en peso de biomasa húmeda de mezcla enzimática/*hidantoína* comprende entre 1:10 y 1:50, a una temperatura de 50°C y a un pH de 8.

60 En resumen, el procedimiento de este último aspecto de la invención para la producción de D-aminoácidos, se caracteriza porque el sustrato de la reacción es una mezcla racémica de *hidantoína* D,L-5-monosustituida, el catalizador es un sistema enzimático en el que las enzimas son producidas en factorías celulares de microorganismos portadores de plásmidos recombinantes que incluyen los genes de las mismas, dichos genes (hidantoín racemasa, D-hidatoínasa y D-carbamilasa) están clonados en células independientes y deben ser inducidos con IPTG en condiciones específicas, los volúmenes relativos de cada tipo celular están definidos para un nivel de producción dado y pueden ser optimizados para las condiciones de trabajo específicas, la transformación de la mezcla racémica sustrato es completa
65 obteniéndose una preparación del D-aminoácido puro.

A continuación se detallan los diferentes aspectos de la invención.

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

Un aspecto importante de esta invención es que los genes de las D-estereoselectivas D-hidatoínasa y D-carbamilasa fueron clonados como productos de la reacción en cadena de la polimerasa. El DNA fuente fue extraído de la cepa NRRL B11291 de *Agrobacterium radiobacter* (Olivieri, R. y col. (1981) *Biotechnol Bioeng.*, 23, 2173-2183). Los oligonucleótidos cebadores para la reacción en cadena fueron diseñados en base a la secuencia del GenBank número de accesión X91070 (Grifantini, R. y col. (1998) *Microbiology*, 144, 947-954). Para la clonación del gen de la D-hidatoínasa se utilizaron los oligonucleótidos cebadores Hid5 (5'-AAGAATTCGTGACAGGAAAGCTTTATG-GATATCATCATC-3'), específico del extremo 5' del gen y que incluyó un codón de terminación de la traducción flanqueado en 3' por un sitio de unión a ribosomas, de esta forma se impide la formación de una proteína de fusión entre la D-hidatoínasa y el péptido amino-terminal de la β -galactosidasa, gen presente en el plásmido pBluescript II SK, utilizado para la donación y expresión. El oligonucleótido específico del extremo 3' del gen fue Hid3 (5'-AAGG-TACCTTATTGCTTGTATTGCGGCG-3'). En ambos oligonucleótidos cebadores se incluyó un sitio de corte con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* respectivamente, para permitir la clonación en pBluescript II SK. De esta forma se generó el vector recombinante pSER11 (figura 1), que fue introducido en células BL21 de *E. coli*. El gen de la D-carbamilasa fue clonado de forma similar. En concreto, el oligonucleótido cebador desde el extremo 5' en la reacción en cadena de la polimerasa fue Car5 (5'-AAGGATCCGTGACAGGAAAGCTTTATGACACGTCAGAT-GATACTTGC-3'). Este oligonucleótido incluye un codón de terminación de la traducción con una señal de unión a ribosomas en 3', para impedir la formación de una proteína de fusión entre la D-carbamilasa y el péptido amino-terminal de la β -galactosidasa, y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *BamHI*. La amplificación desde el extremo 3' se produjo por el oligonucleótido cebador Car3 (5'-AACTGCAGTTAGAATTCCGCGATCAGACCG-3'), el cual está diseñado con un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *PstI*. Estos oligonucleótidos permiten la clonación del fragmento amplificado en el plásmido pBluescript II SK, dando lugar al plásmido pJMC38 (figura 2), que permite la transformación de células BL21 de *E. coli* y la expresión del gen clonado.

Un aspecto de la mayor importancia de la presente invención es la construcción de una célula de *E. coli* portadora de una secuencia de DNA codificante de una proteína con actividad hidantoín racemasa. La posible presencia de un gen codificante de hidantoín racemasa en el genoma de *Agrobacterium tumefaciens* C58 ha sido comunicada en los documentos Goodner, B. y col. (2001) *Science*, 294,2323-2328, y Wood, D.W., y col., (2001) *Science*, 294, 2317-2323. La hipotética secuencia codificante de la hidantoín racemasa está depositada en el GenBank con el número de acceso N0003063 y N0003305. En el desarrollo de esta patente se obtuvieron, por vez primera, datos experimentales de que esta secuencia efectivamente codifica una proteína con actividad hidantoín racemasa. Y esta patente es el primer documento en el que se demuestra la función hidantoín racemasa de estas secuencias nucleotídicas.

La clonación del gen de la hidantoín racemasa se llevó a cabo mediante su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa. El DNA fuente fue obtenido por extracción desde la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*. Los oligonucleótidos cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias del GenBank con el número de acceso N0003063 y N0003305. El cebador de 5', Rac5 (5'-AAGAATTCGTGACAGGAAAGCTATTATGCGTGCGATGCAT-3') fue diseñado con un codón de la terminación de la traducción, flanqueado en 3' por una señal de unión a ribosomas para asegurar la formación de la hidantoín racemasa con estructura nativa, y con la secuencia de corte por la enzima de restricción *EcoRI*. Por otra parte, en el cebador de 3', Rac3 (5'-AAGGTACCTTAGGCGCAGGCGA-3') se incluyó la señal de reconocimiento para el corte con la enzima de restricción *KpnI*. El producto de la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa fue secuenciado por el método descrito por Sanger y col., (1977) *PNAS*, 74, 5463. La secuencia obtenida aparece representada en la figura 3. La digestión de los fragmentos donados con las dos enzimas codificadas en los extremos de estos fragmentos, permitió su inserción en el plásmido pBluescript II SK, para formar el vector de transformación y expresión pSER14 (figura 4). Finalmente este vector fue introducido en células BL21 de *E. coli* para formar las factorías celulares productoras de hidantoín racemasa. Y que utilizadas conjuntamente con las productoras de D-hidatoínasa y D-carbamilasa permiten sintetizar D-aminoácidos.

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

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

El sistema enzimático de la presente invención puede ser obtenido por cultivo de células de *E. coli* BL21 transformadas con los plásmidos pSER11, pJMC38 ó pSER14. Estas células crecen en cultivos independientes que pueden estar en diferentes condiciones, de forma que se potencie la producción de cada proteína de interés. El cultivo de las células debe realizarse en condiciones aeróbicas, con al menos una fuente asimilable de carbono y nitrógeno así como

varios tipos de aniones y cationes. Opcionalmente pueden usarse vitaminas tales como biotina y tiamina o aminoácidos. En general puede usarse preferentemente el medio de cultivo LB (Luria-Bertani) o una modificación de éste. El medio de cultivo debe estar suplementado con una cantidad adecuada de ampicilina, preferentemente 50 µg/mL. En orden a la utilización de esta invención, debe realizarse un precultivo para sembrar con mayor rendimiento un fermentador del volumen apropiado.

La fermentación es llevada a cabo en estrictas condiciones aeróbicas a una temperatura de 28°C y un pH de 7.0. Una vez que el cultivo ha alcanzado una densidad de población correspondiente a una turbidez de 0.4 unidades de densidad óptica se puede iniciar la fase de inducción de la expresión, válida para los tres tipos celulares. Se añade al fermentador IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactósido) hasta una concentración de 0.2 mM y se prolonga la fermentación entre 3 y 4 horas. En el caso de las células transformadas con el gen de la D-hidatoínasa la fermentación, durante la etapa de inducción, se debe suplementar con MnCl₂ 2 mM.

Para el desarrollo óptimo de esta invención las factorías celulares deben ser concentradas y lavadas por un procedimiento clásico de concentración celular, preferentemente la centrifugación a un máximo de 7000 g a 4°C durante 10 minutos. La biomasa, así obtenida, puede ser congelada y guardada hasta su utilización. Esta biomasa enriquecida en enzimas se resuspende en fosfato potásico 100 mM pH 8 hasta una D.O. de 10. En estas condiciones se pueden mezclar diferentes proporciones de las biomasas de las tres formas celulares y conseguir, de esta forma, equilibrar las velocidades de las tres enzimas. Teniendo en cuenta las actividades relativas de la hidantoín racemasa, la D-hidatoínasa y la D-carbamilasa las cantidades de biomasa portadoras de las tres enzimas, para formar la mezcla enzimática, deben estar en una proporción preferente de 2:2:1. La cantidad de mezcla enzimática para la conversión de una *hidantoína* D,L-5-monosustituida dada puede variar dependiendo de la afinidad del sistema enzimático por el sustrato particular y por la solubilidad de éste. Por tanto, la relación de cantidades de ambos componentes debe ser optimizada para cada sustrato. En general la relación en peso de mezcla enzimática:sustrato debe estar comprendida entre 1:10 y 1:50. La mezcla de reacción se mantiene a 50°C durante un tiempo comprendido entre 2 y 4 horas. El tiempo de reacción es otro parámetro que debe ser optimizado para cada *hidantoína* D,L-5-sustituida. De manera general todas las *hidantoínas* D,L-5-monosustituidas con grupos no aromáticos, y que por tanto, no racemizan espontáneamente son los sustratos ideales de este sistema. Todas las *hidantoínas* de aminoácidos naturales son convertidas, en estas condiciones, en sus correspondientes D-aminoácidos en menos de 2 horas.

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

35 Realización preferente de la invención

La producción de mezcla enzimática de los tres tipos de factorías celulares constituyentes de esta invención, portadoras de los plásmidos pSER11, pJMC38 ó pSER14, son cultivados en un medio constituido por una fuente de carbono y nitrógeno que puede ser preferentemente un hidrolizado de aminoácidos en una cantidad de 10 gr/L, extracto de levadura 5 gr/L y NaCl 5 gr/L. Para el caso de las bacterias portadoras del plásmido pSER11, el medio debe suplementarse con 2 gr/L de Mg₂Cl. Se preparan precultivos de volúmenes crecientes que son utilizados para sembrar cultivos de volumen cada vez mayor, dependiendo del escalado industrial correspondiente al nivel de producción deseado. Todos los cultivos se desarrollan en condiciones aeróbicas, 28°C y a pH 7.0. El inicio de la inducción debe producirse una vez que la fermentación llega a un nivel de población equivalente a 0.4 unidades de densidad óptica. En estas condiciones las células pueden ser recolectadas y lavadas por centrifugación, preferentemente a 7000 g, 4°C durante 10 minutos. Los sedimentos obtenidos deben ser congelados a -20°C para su posterior utilización.

El desarrollo de la conversión de *hidantoínas* D,L-5-sustituidas se inicia con la resuspensión de las células transformadas con los plásmidos de interés con fosfato potásico 100 mM pH8, hasta una D.O. de 10. Las diferentes preparaciones celulares pueden ser mezcladas en proporciones específicas para potenciar una actividad enzimática en particular. Preferentemente, las proporciones relativas para preparar una mezcla enzimática de alto rendimiento de conversión con los tipos celulares BL21 pSER11, BL21 pJMC38 y BL21 pSER14 es de 2:2:1.

Dos parámetros que deben ser tenidos en cuenta para una eficiente conversión de mezclas racémicas de *hidantoínas* D,L-5-monosustituidas en D-aminoácidos son la afinidad del sistema enzimático por cada sustrato específico y la solubilidad de éste en el medio acuoso utilizado como medio de reacción. Por tanto, ambos parámetros han de ser puestos a punto para cada D-aminoácido que quiera obtenerse. Esta optimización se consigue ajustando las cantidades relativas en peso de mezcla enzimática y sustrato. Para las *hidantoínas* D,L-5-monosustituidas cuyo substituyente es una cadena de un aminoácido natural, esta relación varía entre 1:10 y 1:50. Las *hidantoínas* D,L-5-monosustituidas deben estar disueltas, hasta saturación, en un medio acuoso compuesto por sales de fosfato, carbonato, etc., y ajustadas a un pH de 8. Una vez mezcladas en un recipiente con el diseño adecuado a la planta industrial específica, la mezcla enzimática y la disolución de *hidantoína* D,L-5-monosustituida, se deja reaccionar a 50°C, durante 2 horas para los sustratos más solubles y 4 horas para los sustratos más insolubles. La mezcla enzimática puede estar compuesta por células completas, permeabilizadas con un detergente o alcohol o células rotas por homogeneización.

Este procedimiento de conversión es especialmente útil para *hidantoínas* D,L-5-monosustituidas que no racemizan espontáneamente o que lo hacen a una velocidad baja. Por tanto, no es necesario considerar, en la aplicación industrial de esta invención, la velocidad de racemización del sustrato, ya que no es un factor limitante de la reacción. Esta

ES 2 241 394 A1

es una ventaja importante respecto a los otros sistemas de síntesis de D-aminoácidos descritos. Ya que permite una simplificación técnica y una disminución de costes que convierten al sistema descrito en esta patente en el más versátil, eficiente y económico.

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

10

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

- 15 a) Es aplicable a hidantoinas D,L-5-monosustituídas que no racemizan espontáneamente o que lo hacen a velocidad mayor a 30 minutos. A este grupo pertenecen todas menos las que poseen un grupo aromático en posición 5.
- 20 b) Permite la modificación del rendimiento de cada una de las tres reacciones que componen la ruta biosintética de D-aminoácidos desde hidantoinas D,L- 5-monosustituídas. Ya que se puede alterar la cantidad de hidantoina racemasa, D-hidatoínasa y D-carbamilasa que forman parte de la mezcla enzimática.
- 25 c) La mezcla racémica de hidantoina D,L-5-monosustituída es convertida completamente en su correspondiente D-aminoácido.
- d) El producto final está completamente puro, no siendo necesario un proceso ulterior de separación de enantiómeros.
- e) El proceso puede ser escalado fácilmente a nivel industrial o desarrollado en una columna de células inmovilizadas.

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

Ejemplo 1

35 *Conversión de D,L-5-(2-metiltoetil)-hidantoina en D-metionina por actividad D-hidatoínasa y D-carbamilasa*

Las construcciones BL21 pSER11 y BL21 pJMC38 fueron crecidas en medio LB sólido suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina a 37°C durante 12 horas. Una colonia individual, de cada tipo celular, fue utilizada para sembrar 10 mL de LB líquido con la misma concentración de ampicilina. Este cultivo fue incubado a 37°C durante 12 horas con fuerte agitación. 1 mL de este cultivo se utilizó para sembrar 100 mL de LB fresco con ampicilina. Después de 2 horas de incubación en agitación a 37°C se llegó a una DO_{600} del cultivo de 0.3 á 0.5. En este momento se inició la inducción de la expresión de los genes donados: D- hidatoínasa en el caso de BL21 pSER11 y D-carbamilasa en el caso de BL21 pJMC38. Se añadió IPTG hasta una concentración de 0.2 mM y el cultivo fue continuado a 28°C durante 4 horas. Para la producción correcta de D hidatoínasa se añadió MnCl_2 a una concentración de 2mM. Las células fueron recogidas por centrifugación a 7000 g a 4°C durante 10 minutos. Los sedimentos fueron congelados a -20°C hasta el momento de su uso.

Para la realización de la reacción de conversión de D,L-5-(2-metiltoetil)- hidantoina, un sedimento de cada tipo de enzima fue descongelado y resuspendido en fosfato potásico 100 mM pH 8, hasta una DO_{600} de 10. 100 μL de cada tipo celular fueron mezclados con 200 μL de una disolución 15 mM de D,L-5-(2-metiltoetil)-hidantoina en el mismo amortiguador. La mezcla se dejó reaccionar a 50°C durante 300 minutos. A cada periodo regular de tiempo se tomó una alícuota en la que la reacción fue detenida con un volumen equivalente de HCl 1 M. Estas muestras fueron centrifugadas y la cantidad de D,L-5-(2-metiltoetil)-hidantoina, carbamil D-metionina y D-metionina fue analizada por HPLC (Breeze HPLC System, Waters, equipado con una columna Symmetry C₁₈ 4.6 x 150 nm Waters). La fase móvil utilizada, 20 mM de ácido fosfórico pH 3 (85%) y metanol (15%), fue bombeada a un flujo de 0.75 mL/min. El detector UV a 210 nm permitió cuantificar la evolución de cada compuesto a lo largo del tiempo de reacción. Los resultados se representan en la figura 5. Como puede verse, el sistema D-hidatoínasa, D-carbamilasa convierte solo el 50% de la D,L-5-(2-metiltoetil)-hidantoina en D-metionina en 200 minutos, pero a partir de ese tiempo no se produce nueva formación de D-aminoácido. Esto significa que la mitad del sustrato, el enantiómero L-5-(2-metiltoetil)-hidatoína, queda sin transformar. Esto ocurre porque la D,L-5-(2-metiltoetil)-hidatoína no tiene racemización química espontánea. El rendimiento máximo de esta reacción es del 50% y es el mismo que pueden alcanzar los procedimientos antes descritos para la síntesis de D-aminoácidos a partir de *hidantoinas* D,L-5-monosustituídas que no racemizan espontáneamente y que no utilizan hidantoina racemasa.

65 Ejemplo 2

Conversión de D,L-5-(2-metiltoetil)-hidantoina en D-metionina por actividad hidantoina racemasa, D-hidatoínasa y D-carbamilasa

ES 2 241 394 A1

La mezcla enzimática para la reacción a partir de las construcciones BL21 pSER11, BL21 pJMC38 y BL21 pSER14 se obtuvo como en el ejemplo 1. Igualmente el proceso de conversión de D,L-5-(2-metiltioetil)-*hidantoína* en D-metionina y el análisis de los productos de la misma se efectuó como se explica en el ejemplo 1. El seguimiento de la conversión a lo largo del tiempo está resumido en la figura 6. Estos resultados demuestran que, en la presencia de la hidantoína racemasa, toda la mezcla racémica de D,L-5-(2-metiltioetil)- *hidantoína* es convertida en D-metionina en un tiempo de 150 minutos, con lo que la reacción puede darse por finalizada. El rendimiento, por tanto, de esta conversión es del 100%, mejorando en un 50% el de los otros procedimientos y realizando la misma a una velocidad compatible con las necesidades de los procesos industriales.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un sistema enzimático de utilidad en la preparación selectiva y exclusiva de D-aminoácidos o derivados de los mismos a partir de mezclas racémicas de D,L-hidantoinas, **caracterizado** por estar constituido por las enzimas hidantoín racemasa, D-hidantoinasa y D-carbamilasa.

10 2. Un procedimiento para la preparación del sistema enzimático de la reivindicación 1 por sobre-expresión genética en microorganismos transformados con los genes de hidantoín racemasa, D-hidantoinasa y D- carbamilasa, **caracterizado** porque comprende las etapas de construcción de una factoría celular de *E. coli* portadora de D-hidantoinasa o D-carbamilasa de *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291 o hidantoín racemasa de *Agrobacterium tumefaciens* C58; donación de los mismos en plásmidos independientes; expresión de estos genes por separado; y mezcla de cantidades definidas de cada tipo celular para obtener los parámetros cinéticos apropiados de un sistema enzimático capaz de transformar todas las moléculas de una mezcla racémica de hidantoinas D,L-5-monosustituídas en su correspondiente D-aminoácido.

15 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque comprende las etapas de sobre-expresión en células de microorganismos que son obtenidos por transformación con plásmidos portadores de los genes de dichas enzimas; cultivo de cada tipo celular transformado en un medio derivado del medio LB (Luria-Bertani), con suplemento de MnCl₂ en el caso del cultivo para producir D-hidantoinasa; y combinación de proporciones definidas de las biomazas de dichos cultivos.

20 4. Un procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque los microorganismos se cultivan independientemente y solo son mezclados después de la inducción de la expresión de su gen foráneo, dando lugar a una mezcla enzimática que puede estar compuesta de células completas, permeabilizadas o rotas.

25 5. Un procedimiento según las reivindicaciones 3 y 4, **caracterizado** porque los microorganismos hospedadores utilizados son *Escherichia coli* transformados con los plásmidos pSER11 (portador del gen de la D-hidantoinasa), pJMC38 (portador del gen de la D-carbamilasa) o pSER14 (portador del gen de la hidantoín racemasa).

30 6. Un procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el plásmido pSER14 contiene en un fragmento de ácido desoxirribonucleico que codifica la secuencia aminoacídica de una proteína con actividad hidantoín racemasa y que resulta de la amplificación, por la reacción en cadena de la polimerasa, del genoma de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* C58, porque dicho fragmento presenta la secuencia de nucleótidos de la figura 3, y porque los oligonucleótidos cebadores son Rac5 con la secuencia 5'-AAGAATTCGTGACAGGAAAGCTATTATGCGTGC-GATGCAT-3' y Rac3 con la secuencia 5'- AAGGTACCTTAGGCGCAGGCGA-3'.

35 40 7. Un procedimiento para la preparación de D-aminoácidos por conversión estereoselectiva y completa de una mezcla racémica de *hidantoína* D,L-5-monosustituída, en donde la reacción es catalizada por medio del sistema enzimático según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende incubar proporciones definidas de dicho sistema enzimático y de una mezcla racémica acuosa de una *hidantoína* D,L-5-monosustituída; y recuperar el D-aminoácido correspondiente por métodos estándar y viables industrialmente.

45 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la reacción de conversión se lleva a cabo usando una relación en peso de biomasa húmeda de mezcla enzimática/*hidantoína* comprendida entre 1:10 y 1:50, a una temperatura de 50°C y a un pH de 8.

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 241 394

② Nº de solicitud: 200202208

③ Fecha de presentación de la solicitud: 30.09.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12P 13/04, C12N 9/90

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HILS, M. et al. "Cloning and characterization of genes from Agrobacterium sp. IP-671 involved in hydantoin degradation", APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 2001, Vol. 57, Nº 5-6, páginas 680-688. Ver todo el documento.	1
A	GRIFANTINI, R. et al. "Efficient conversion of 5-substituted hydantoin to D-alpha-amino acids using recombinant Escherichia coli strains", MICROBIOLOGY, 1998, Vol. 144, Nº 4, páginas 947-954. Ver todo el documento.	1-8
A	CHAO, Y.P. et al. "Overproduction of D-hydantoinase and carbamoylase in a soluble form in Escherichia coli", APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 2000, Vol. 54, Nº 3, páginas 348-353. Ver todo el documento.	1-8
A	WATABE, K. et al. "Purification and characterization of the hydantoin racemase of Pseudomonas sp. strain NS671 expressed in Escherichia coli", J. BACTERIOL., 1992, Vol. 174, Nº 24, páginas 7989-7995. Ver todo el documento.	1-8
A	WILMS, B. et al. "Development of an Escherichia coli whole cell biocatalyst for the production of L-amino acids", J. BIOTECHNOL., 2001, Vol. 86, Nº 1, páginas 19-30. Ver todo el documento.	1-8
A	SYLDATK, C. et al. "Microbial hydantoinases-industrial enzymes from the origin of life?", APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 1999, Vol. 51, Nº 3, páginas 293-309. Ver todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 19.09.2005	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/1
---	--	----------------------