



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 330 098**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12P 19/42 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03750631 .8**

(96) Fecha de presentación : **25.09.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1543124**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

(54) Título: **ADN que codifica la D-eritronato-4-fosfato-deshidrogenasa dependiente del dinucleótido flavina-adenina, pdxR, y producción microbiana de la vitamina B₆.**

(30) Prioridad: **27.09.2002 EP 02021641**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.12.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.12.2009

(73) Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

(72) Inventor/es: **Hoshino, Tatsuo;**
Ichikawa, Keiko y
Tazoe, Masaaki

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 330 098 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

ADN que codifica la D-eritronato-4-fosfato-deshidrogenasa dependiente del dinucleótido flavina-adenina, pdxR, y producción microbiana de la vitamina B₆.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de la vitamina B₆, empleando un microorganismo recombinante que comprende un ADN que codifica una D-eritronato 4-fosfato (EN4P) de deshidrogenasa dependiente de un nuevo dinucleótido flavina-adenina (FAD), originada a partir del *Sinorhizobium meliloti*, la cual está implicada en la biosíntesis de la vitamina B₆, y el microorganismo recombinante se transforma con un vector que contiene el ADN.

“La vitamina B₆” como se emplea en esta invención incluye el piridoxol (PN), el piridoxal y la piridoxamina. La vitamina B₆ es una vitamina indispensable para los seres humanos u otros animales, y se emplea como materia prima para medicinas o como aditivos para los alimentos.

La producción por fermentación de la vitamina B₆ mediante el *Sinorhizobium* [conocido también como *Rhizobium*; De Lajudie *et al.*, Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 715-733 (1994)] *meliloti*, se describe en (EP 765.938). Sin embargo, la producción eficiente de la vitamina B₆ en el procedimiento para la obtención de la vitamina B₆ empleando un microorganismo, no es muy alta y ha sido necesario señalar un nuevo microorganismo que tenga una mayor productividad de la vitamina B₆.

El camino para llegar al 4-PHT en el *E. coli* es como sigue: la síntesis del 4-PHT empieza a partir del 4-fosfato de D-eritrosa (E4P), el cual se oxida mediante una E4P deshidrogenasa para dar EN4P, seguidamente se oxida mediante una EN4P deshidrogenasa para dar 2-ceto-EN4P, y se transamina mediante una aminotransferasa para dar la 4-PHT. Las tres enzimas, E4P deshidrogenasa, EN4P deshidrogenasa, y la amino-transferasa están codificadas por tres genes, denominados epd, pdxB, y serC, respectivamente, y existe solamente un informe sobre la EN4P deshidrogenasa de *E. coli*, la cual necesita NAD⁺ como una coenzima para la reacción enzimática [Zhao *et al.*, J. Bacteriol. 177: 2804-2812 (1995)].

Por otro lado, el 4-PHT en el *S. meliloti* se sintetiza a partir de la glicina y el glicolaldehído. Sin embargo, todavía no ha sido identificado un gen responsable de la reacción. Con el propósito de identificar el gen, hemos obtenido un mutante deficiente en vitamina B₆, de *S. meliloti* IFO 14782 que es deficiente en la formación de 4-PHT. Y hemos obtenido un gen, a saber el pdxR, el cual complementa el mutante deficiente en vitamina B₆, y hemos encontrado que el pdxR codifica una nueva EN4P deshidrogenasa dependiente del FAD.

Capela *et al.*, PNAS (2001), 98 pp. 9877-9882, describen una oxidoreductasa proteína unida al dinucleótido flavina-adenina FAD, que es la translación de la secuencia del cromosoma clonado del *Sinorhizobium meliloti*.

Pease *et al.*, (J. Bact. 2002, pp. 1359-1369) describen la regulación dependiente del crecimiento positivo del gen pdxB de *E. coli*. El gen pdxB codifica una eritronato-4-fosfato deshidrogenasa, la cual no tiene sin embargo, ninguna similitud significativa con la D-eritronato-4-fosfato deshidrogenasa dependiente del FAD, como se emplea en el presente procedimiento.

De acuerdo con la presente invención, es posible aumentar considerablemente la eficiencia de la producción de la vitamina B₆ mediante fermentación, empleando un microorganismo del género *Sinorhizobium* que tiene un plásmido recombinante que comprende un vector que contiene el pdxR. La vitamina B₆ puede producirse ventajosamente en el caldo de cultivo cultivando dicho microorganismo, el cual puede recuperarse del mismo con la pureza deseada.

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de la vitamina B₆, empleando una célula anfitriona que comprende un ADN que codifica una EN4P deshidrogenasa dependiente de FAD, que se origina a partir del *Sinorhizobium*; expresión de vectores que llevan un ADN que contiene el ADN que codifica la EN4P deshidrogenasa; una célula anfitriona transformada que lleva los vectores de expresión; un polipéptido que posee la actividad de la EN4P deshidrogenasa dependiente de FAD, producida en la célula anfitriona.

Todos los términos científicos y técnicos empleados en esta invención tienen los significados habitualmente empleados en la técnica, a no ser que se especifique otra cosa.

La presente invención se basa sobre el descubrimiento de un gen denominado pdxR, el cual codifica una EN4P deshidrogenasa dependiente del FAD, la cual está implicada en la biosíntesis de la vitamina B₆ del *S. meliloti* y el empleo del gen para aumentar la producción de la vitamina B₆.

En el procedimiento de verificación de la invención, hemos descubierto un gen, denominado pdxR, el cual complementa un mutante deficiente en vitamina B₆ del *S. meliloti* IFO 14782 (DSM 10226) que requiere la 4-hidroxi-L-treonina (denominada 4-HT a partir de aquí), o vitamina B₆ para el crecimiento. El pdxR no tiene homología con ningún gen descrito como implicado en la biosíntesis de la vitamina B₆ de *E. coli*.

De acuerdo con la investigación de la base de datos del genoma de la cepa *S. meliloti* 1021 [Galibert *et al.*, Science 293:668-672 (2001)], se dedujo que la secuencia de amino-ácidos del pdxR sugería que el PdxR es una de las oxidoreductasas tales como las deshidrogenasas, reductasas y oxidasas. Sin embargo, es muy difícil predecir su sustrato

para el PdxR. El gen *pdxR*, se descubrió que complementa no solamente un mutante deficiente en vitamina B₆ del *S. meliloti* IFO 14782, sino también un mutante *pdxB*⁻ de *E. coli* al que faltaba una EN4P deshidrogenasa. Estos descubrimientos indican que el PdxR está implicado en el camino del 4-PHT de la biosíntesis de la vitamina B₆ en el *S. meliloti*, y que el *pdxR* codifica la oxidoreductasa que cataliza la oxidación del EN4P en 2-ceto-EN4P.

En otros experimentos, se descubrió un producto génico codificado por el gen *pdxR* del *S. meliloti* en la presente invención, que contenía FAD y que catalizaba la oxidación del EN4P empleando un receptor de electrones como por ejemplo el citocromo c, 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), ó ferricianuro, pero no los O₂, NAD⁺ ó NADP⁺. Se vio la evidencia de que el producto del gen *pdxR* es una deshidrogenasa con receptores de electrones más bien que una oxidasa, y completamente diferente de la EN4P deshidrogenasa con NAD⁺ de *E. coli*.

El procedimiento de la presente invención emplea una secuencia de ADN, que comprende una secuencia de ADN la cual codifica el PdxR, el cual es una EN4P deshidrogenasa dependiente de FAD, implicada en la síntesis de la vitamina B₆, como se describe en el listado de las secuencias, así como también sus cadenas complementarias, o aquellas que incluyen estas secuencias, secuencias de ADN que hibridan, de preferencia en condiciones estándar, con dichas secuencias o fragmentos de las mismas y secuencias de ADN, que a causa de la degeneración del código genético, no hibridan en condiciones estándar con dichas secuencias pero que codifican polipéptidos que tienen exactamente la misma secuencia de aminoácidos.

“Condiciones estándar” para la hibridación significa en este contexto, las condiciones que se emplean generalmente por una persona experta en la técnica para detectar señales específicas de hibridación, o de preferencia la llamada hibridación restrictiva y las condiciones de lavado no restrictivas o, con más preferencia, las llamadas condiciones moderadamente restrictivas o incluso con mayor preferencia las llamadas condiciones de hibridación restrictiva y lavado restrictivo. Por ejemplo, una condición es la hibridación en 2 x SSC y 0,5% de SDS a 45°C durante 1 hora, y lavado en 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 60°C durante 1 hora.

La presente invención emplea secuencias de ADN que son por lo menos un 80% a un 85%, de preferencia por lo menos un 86% a un 90%, con mayor preferencia por lo menos de un 91% a un 95% y con particular preferencia más del 95%, idénticas a la secuencia de ADN de acuerdo con SEQ ID NO: 1 ó un fragmento de la misma.

El procedimiento de la presente invención puede también emplear polipéptidos que tienen actividad EN4P deshidrogenasa dependiente de FAD, los cuales son derivados funcionales de los polipéptidos del caso presente. Estos derivados funcionales se definen sobre la base de secuencias de aminoácidos de la presente invención mediante adición, inserción, supresión y/o substitución de uno o más residuos de aminoácidos de dichas secuencias, en donde dichos derivados tienen todavía la actividad de la EN4P deshidrogenasa dependiente de FAD. Estos derivados funcionales pueden obtenerse o bien sea por síntesis química de péptidos ya conocida en la especialidad, o bien mediante medios recombinantes sobre la base de la secuencia de ADN como se ha descrito en la presente por métodos ya conocidos en el estado actual de la técnica. Los intercambios de aminoácidos de las proteínas y péptidos que no alteran generalmente la actividad de dichas moléculas son ya conocidos en el estado actual de la técnica. Los intercambios que ocurren más corrientemente son: Ala/Ser, Val/Ile Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/ Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, así como también los mismos a la inversa.

Además, pueden emplearse polipéptidos de acuerdo con la SEQ ID NO:2, en particular aquellos con actividad EN4P deshidrogenasa dependiente de FAD, y aquellos que son por lo menos un 80% a 85%, de preferencia por lo menos un 86 a un 90%, con más preferencia por lo menos un 91 a un 95%, y con particular preferencia más del 95%, idénticos al polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y tienen la actividad mencionada.

Para expresar eficientemente el *pdxR* ó la secuencia de ADN que codifica la EN4P deshidrogenasa dependiente de FAD, pueden emplearse varios promotores; por ejemplo el promotor original que existe corriente arriba en el gen *pdxR*, el gen promotor del antibiótico tal como la β -galactosidasa de *E. coli* (*lac*), promotor de la pequeña subunidad ribosómica del *S. meliloti* (*pS1*), *trp1*, *tac*-, promotor *trc*, en cualesquiera promotores que puedan ser funcionales en los anfitriones los cuales consisten en un microorganismo incluyendo las bacterias tales como el *E. coli* y el *S. meliloti*.

Para el objetivo anterior, pueden introducirse otros elementos reguladores tales como una secuencia Shine-Daigarno (SD) (por ejemplo AGGAGG, etc., incluyendo la secuencia natural y sintética operable en la célula anfitriona) y un terminador transcripcional (estructura invertida repetida incluyendo cualesquiera secuencias naturales y sintéticas operables en la célula anfitriona) que sean operables en las células anfitrionas en las cuales la secuencia de codificación se introducirá y se empleará con el promotor antes descrito.

Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones anfitrión/vector de clonación, en la clonación del ADN de doble cadena. El vector de clonación es generalmente un plásmido o fago que contiene un origen de replicación, elementos reguladores, un sitio de clonación que incluye un sitio múltiple de clonación y marcadores de selección tales como genes de resistencia antibiótica, incluyendo genes de resistencia para la ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, estreptomycin, gentamicina, espectinomycin, etc., (de aquí en adelante denominados como Ap, Tc, Cm, Km, Nm, Sm, Gm, Sp, respectivamente).

Vectores preferidos para la expresión del gen objeto en el *E. coli*, se seleccionan de cualesquiera vectores de los habitualmente empleados en el *E. coli* tal como por ejemplo el pBR322 ó sus derivados, incluyendo los pKK223-3, pUC18 y pBluescriptII, pACYC184 ó sus derivados, y un vector derivado de un amplio margen de plásmidos

ES 2 330 098 T3

anfitriones tales como por ejemplo el RK2 y el RSF1010. Un vector preferido para la expresión del gen objeto en el *S. meliloti*, se selecciona de cualesquiera vectores que puedan replicar en este microorganismo, así como también en un organismo preferido de clonación tal como el *E. coli*. El vector preferido es un vector de un amplio margen de anfitriones tales como por ejemplo el pVK100, pRK290, pLAFR1, y RSF1010 ó un vector que contiene un origen funcional de replicación en el *S. meliloti* y otro origen funcional en el *E. coli*.

Para construir una célula anfitriona que lleve un vector de expresión, pueden emplearse varios métodos de transferencia de ADN incluyendo la transformación, transducción y apareamiento conyugal. El método para la construcción de una célula anfitriona transformada puede seleccionarse de los métodos ya bien conocidos en el campo de la biología molecular. Los sistemas habituales de transformación y transducción pueden emplearse para el *E. coli*. El sistema de apareamiento conyugal puede ser ampliamente empleado en las bacterias gram positivas y gram negativas, incluyendo el *E. coli* y el *S. meliloti*.

El mutante deficiente en vitamina B₆ que tiene un punto de mutación en el camino que conduce a la 4-PHT, puede ser construido por mutagénesis de transposones.

El transposón es un segmento de ADN distinguible, el cual tiene una capacidad de moverse dentro del genoma. Uno de estos transposones, el Tn5, es un transposón compuesto de 5.818 bp, que consiste en dos repeticiones invertidas y tres genes que confieren resistencia a los antibióticos. El Tn5 tiene una baja especificidad de inserción y la mutagénesis del Tn5 puede realizarse [Meade *et al.*, J. Bacteriol. 149:114-122 (1982)]. Un vector suicida, el pSUP2021, que lleva Tn5 derivado del *Pseudomonas* no es aplicable en el *S. meliloti*, puede emplearse para introducir la inserción del Tn5 dentro del genoma del *S. meliloti* [Simon *et al.*, BIO/TECHNOLOGY 1:784 (1983)]. Puede emplearse un plásmido auxiliar como por ejemplo el pRK2013 (ATCC 37159) que ayuda a la transferencia del plásmido inmóvil a otros microorganismos.

El Tn5 sobre el vector suicida puede ser introducido dentro del *S. meliloti* IFO 14782 mediante un apareamiento conyugal tri-parental de la siguiente manera. El *S. meliloti* como una cepa receptora, el *E. coli* cosechando el plásmido auxiliar como una cadena auxiliar, y el *E. coli* cosechando el plásmido dador como una cadena dadora, se cultivan separadamente y se mezclan entre sí. Después del cultivo mezclado sobre la placa, el *S. meliloti* que tiene el Tn5 integrado en su genoma puede ser seleccionado sobre una placa de agar que contiene los antibióticos apropiados. Entre estos mutantes antibiótico-resistentes, los mutantes que producen menos vitamina B₆ ó ninguna, pueden seleccionarse mediante la cantidad de vitamina B₆ que producen, con la placa de detección de la vitamina B₆. Los mutantes que producen menos o ninguna vitamina B₆ pueden también ser examinados acerca de la necesidad de intermediarios en el camino a la vitamina B₆. Con estos experimentos suplementarios, puede sugerirse un punto mutado sobre el camino.

Un segmento de ADN que complementa el mutante deficiente en vitamina B₆, puede someterse a screening a partir de una biblioteca genómica de *S. meliloti*. La biblioteca genómica está compuesta de una gran variedad de ADN cromosómico parcialmente digerido, ligado dentro del cósmido y transferido a un mutante deficiente en vitamina B₆. El transconjugante complementado con un segmento diana de ADN puede obtenerse mediante el crecimiento sobre una placa exenta de vitamina B₆. Puede determinarse una secuencia de ADN del segmento, mediante métodos ya conocidos en el estado actual de la técnica.

El PdxR se sobreexpresa para investigar una función de su producto en la célula anfitriona. Cuando el PdxR se prepara para ser sobreexpresado, el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es adecuado para el sitio de reconocimiento para añadir a la enzima de restricción, para colocar el pdxR bajo control de un potente promotor. Los cebadores para la PCR se sintetizan de acuerdo con la secuencia de ADN del pdxR y la región flanqueante, y un cebador contiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción en su extremo 5'. El fragmento de ADN que contiene el pdxR puede ser amplificado mediante la PCR empleando los cebadores y el ADN cromosómico del *S. meliloti*. El ADN amplificado puede ligarse dentro de un vector replicable en *E. coli* como se ha descrito más arriba en una estructura deseada. Puede seleccionarse un plásmido, en donde se inserta el ADN amplificado, y la secuencia de la región amplificada puede determinarse por métodos ya conocidos en el estado actual de la ciencia.

Para la preparación del extracto libre de células a partir de las células obtenidas mediante cultivo, puede aplicarse un método general tal como la sonicación, rotura de las células en presencia de perlas de vidrio o mediante el homogeneizador prensa French. Si se desea, puede también aplicarse el tratamiento con una enzima lítica tal como por ejemplo la lisozima o la zimolasa de 15°C a 45°C, de preferencia de 20°C a 40°C durante 1 a 3 horas antes de la disrupción de la forma más arriba mencionada. Por ejemplo después de la centrifugación del caldo de cultivo, se lavan las células resultantes con solución salina al 0,85% (p/v), y se suspenden en un tampón como por ejemplo el tampón Tris-HCl de pH 7,5. Después de la rotura de la células, la solución resultante se centrifuga para separar los restos de las células, y el sobrenadante puede emplearse como extracto exento de células.

La concentración de la proteína se determina mediante el método de Lowry.

La actividad de la EN4P deshidrogenasa con un receptor de electrones, puede verificarse observando o midiendo espectrofotométricamente el cambio de color debido a la formación de la forma reducida a partir de la forma oxidada de un receptor de electrones tal como por ejemplo el citocromo c, el DCIP, ó el ferricianuro, cuando la EN4P deshidrogenasa de esta invención existe juntamente con uno de estos receptores de electrones en un tampón apropiado.

La célula anfitriona transformada obtenida en la presente invención se incuba en un medio que contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno digestible, una sal inorgánica y otros nutrientes necesarios para su crecimiento. Como fuente de carbono, puede emplearse por ejemplo, la glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa, sucrosa, almidón, dextrina, o glicerina. Como fuente de nitrógeno, pueden emplearse por ejemplo, peptona, extracto de germen de maíz, de soja en polvo, extracto de levadura, extracto de carne, cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, urea o mezclas de los mismos. Además, como trazas de elementos, pueden emplearse sulfatos, hidroclocloruros, o fosfatos de calcio, magnesio, zinc, manganeso, cobalto, y hierro. Si es necesario, factores nutrientes convencionales, un agente de captura de ión fosfato, o un agente antiespumante como el carbonato de magnesio, óxido de aluminio, alopino, aceite animal, aceite vegetal, o aceite mineral, pueden también añadirse suplementariamente en un medio de fermentación. El pH del medio de cultivo puede ser aproximadamente desde 5,0 hasta aproximadamente 9,0, de preferencia aproximadamente desde 6,5 hasta aproximadamente 7,5. La temperatura de cultivo puede ser aproximadamente desde 10°C hasta aproximadamente 40°C de preferencia aproximadamente desde 25°C hasta aproximadamente 35°C. La duración del cultivo puede ser aproximadamente desde 1 día hasta aproximadamente 15 días, de preferencia aproximadamente desde 2 días hasta aproximadamente 9 días. Durante el cultivo, la aireación y la agitación proporcionan habitualmente favorables resultados.

Después del cultivo, la vitamina B₆ producida puede también separarse del caldo de cultivo y purificarse. Para esta finalidad, puede aplicarse un procedimiento empleado generalmente para la extracción de un cierto producto a partir del caldo de cultivo, mediante la utilización de varias propiedades de la vitamina B₆. Así por ejemplo, las células pueden eliminarse del caldo de cultivo, la substancia deseada en el sobrenadante se absorbe sobre carbón activo, a continuación se eluye y se purifica además con una resina de intercambio iónico. Alternativamente, el filtrado del cultivo se aplica directamente a una resina de intercambio iónico y, después de la elución, el producto deseado se recristaliza a partir de una mezcla de alcohol y agua.

Se obtuvo un mutante deficiente en vitamina B₆, el *S. meliloti* 16C18, mediante el screening de una mutagénesis de inserción del Tn5 a partir del *S. meliloti* IFO 14782 (DSM 10226). El mutante que tiene un punto de mutación en el camino del 4-PHT, es necesario para el aislamiento del gen *pdxR* que codifica la EN4P deshidrogenasa, y fue depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) ("Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH") en Göttingen (Alemania) el 17 de septiembre del 2002, con el n° de registro DSM 15210, según el tratado de Budapest.

La invención se describe a continuación con más detalle, con ayuda de breves ejemplos de aplicación. El texto siguiente se pretende que indique los materiales y métodos empleados y que apoye la invención con ejemplos experimentales y ejemplos comparativos, pero no está formulado como un límite a los mismos.

Ejemplo 1

[A] Aislamiento del mutante de inserción Tn5 deficiente en vitamina B₆, *S. meliloti* 16C18

Los mutantes deficientes en vitamina B₆ fueron sometidos a screening a partir de los mutantes de inserción Tn5 del *S. meliloti* IFO 14782, el cual es un alto productor natural de vitamina B₆. El Tn5 se introdujo dentro del *S. meliloti* IFO 14782 mediante un apareamiento conyugal tri-parental, como se describe más adelante. El *S. meliloti* IFO 14782 como cepa receptora, se inoculó en 5 ml de medio líquido LBMC, que consistía en 1% de peptona triptona (Becton Dickinson Microbiology systems ("Sistemas de Microbiología Becton Dickinson"), MD, USA), 0,5% de extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson Microbiology systems ("Sistemas de Microbiología Becton Dickinson"), MD, USA), 0,5% de NaCl, 0,061% de MgSO₄·7H₂O, y 0,036% de CaCl₂·2H₂O, y se incubaron con agitación de 30°C a 140 rpm durante 16 horas. El cultivo (400 µl) se transfirió a un medio recién preparado y se incubó de nuevo durante 6 horas. *E. coli* HB101 que produce el pRK2013 (ATCC 37159) como una cepa auxiliar, se inoculó en 5 ml de medio LB líquido consistente en 1% de peptona triptona, 0,5% de extracto de levadura Bacto, y 0,5% de NaCl que contenía 50 µg/ml de Km y se incubó con agitación a 37°C a 140 rpm durante 16 horas. El cultivo (100 µl) se transfirió a un medio recién preparado y se incubó de nuevo durante 6 horas. El *E. coli* HB101 que cosechó el pSUP2021 como una cepa dadora Tn5 se inoculó en 5 ml de medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de Km y se incubó con agitación a 37°C a 140 rpm durante 16 horas. El cultivo (100 µl) se transfirió a un medio recién preparado y se incubó de nuevo durante 6 horas. Cada cepa se cosechó, y las células se mezclaron en un ratio de 1: 1: 4 (v/v/v). La mezcla se colocó en un filtro de nitrocelulosa colocado sobre una placa de agar LBMC. Después de incubar esta placa durante 20 horas a 30°C, se rascaron la células del filtro y se suspendieron en solución salina al 0,85%, esterilizada. La suspensión se diluyó apropiadamente y se pulverizó sobre placas de LBMC que contenían 20 µg/ml de NaI (para seleccionar el *S. meliloti* IFO 14782) y 50 µg/ml de Nm (para seleccionar el Tn5). Después de la incubación de las placas a 30°C durante 4 días, aparecieron aproximadamente 10.000 colonias sobre las placas. La frecuencia de colonias resistentes a la Nm fue de 4,2x10⁻⁸/recipiente.

Estas colonias se estiraron sobre placas LBMC que contenían los mismos antibióticos y se incubaron durante 2 días a 30°C. Las células crecidas sobre las placas fueron inoculadas sobre placas de ensayo de vitamina B₆ (tabla 1), que contenían el *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 como una cepa indicadora de vitamina B₆. Después de la incubación durante 2 días a 30°C se obtuvo una colonia que no tenía ningún halo de *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080. La cepa se denominó como *S. meliloti* 16C18. La cepa 16C18 no creció en la placa de EMM (tabla 1), en donde creció la cepa originaria, *S. meliloti* IFO 14782. Además, el *S. meliloti* 16C18 creció sobre la placa EMM que fue suplementada por 4 mg/L de 4-HT ó 400 µg/L de PN. Este resultado sugiere que el *S. meliloti* 16C18 es un mutante deficiente en vitamina B₆, que posee un punto de mutación en la ruta del 4-PHT.

ES 2 330 098 T3

TABLA I

Composición media (placa de ensayo de la vitamina B₆ y de la placa EMM)

	Ingrediente	placa de ensayo de la vitamina B ₆	Placa de EMM
5	Glucosa	50 g	10 g
10	Vitamina exenta de ácido casamino	---	8 g
15	L-arginina	160 mg	---
	Acido L-aspártico	20 mg	---
20	Acido L- glutámico	200 mg	---
	Glicina	40 mg	---
25	L-histidina	80 mg	---
	L- isoleucina	180 mg	---
	L- leucina	400 mg	---
30	L- lisina	280 mg	---
	L- metionina	80 mg	---
35	L- fenilalanina	160 mg	---
	L- treonina	160 mg	---
	L- tirosina	80 mg	---
40	L- valina	280 mg	---
	KH ₂ PO ₄	550 mg	---
45	MnSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg	2,5 mg
	MgSO ₄ .7H ₂ O	125 mg	125 mg
50	CaCl ₂ .2H ₂ O	125 mg	125 mg
	KCl	425 mg	425 mg
55	FeCl ₃ .6H ₂ O	2,5 mg	250 µg
	hidrocloruro de tiamina	250 µg	250 µg
60	biotina	8 µg	8 µg
	agua desionizada	1000 ml	1000 ml
65	bacto agar (Difco)	15 g	15 g
	pH	6,0	6,8

[B] Aislamiento del fragmento de ADN que complementa el crecimiento del *S. meliloti* 16C18 sobre una placa de EMM

La biblioteca genómica del *S. meliloti* IFO 14782 se construyó como una herramienta para la obtención del fragmento de ADN que hizo crecer el *S. meliloti* 16C18 sobre la placa de EMM sin 4-HT ó PN. El ADN cromosómico del *S. meliloti* IFO 14782 se preparó empleando los tipos del QUIAGEN genómico (QIAGEN, GmbH, Alemania). El ADN cromosómico fue digerido con *EcoR* I. El ADN parcialmente digerido se sometió a una electroforesis sobre gel de agarosa sobre un 0,6% de gel. Se cortó un trozo de gel que contenía fragmentos de ADN de 15 kb a 35 kb, y los fragmentos de ADN se eluyeron a partir del gel mediante electroforesis. Los fragmentos de ADN eluidos se precipitaron con etanol y se recuperaron por centrifugación. Paralelamente se digirieron completamente 400 ng del plásmido pVK100 con *EcoR* I y se desfosforilaron con fosfatasa alcalina. El pVK100 tratado se ligó con los fragmentos de ADN cromosómico citados más arriba (1 µg) del *S. meliloti* IFO 14782 mediante un kit de ligación (Takara Bio Inc., Shiga, Japón). El ADN se sometió a un empaquetamiento *in vitro* del fago (Amersham Biosciences Corp., NJ, USA). A continuación el *E. coli* ED8767 [Murray *et al.*, Mol. Gen Genet. 150:53-61 (1977)], el cual se había cosechado durante el crecimiento exponencial, se infectó con el fago, el cual contenía varios fragmentos de ADN del *S. meliloti* IFO 14782. El *E. coli* infectado se pulverizó sobre un medio LB que contenía 10 µg/ml de Tc. Después de la incubación durante 17 horas a 37°C, aparecieron aproximadamente 10.000 colonias sobre las placas. Estas colonias se rascaron todas juntas, se incubaron en medio líquido LB a 37°C durante 1 hora, se dispensaron en pequeños tubos con tapa, y se almacenaron a -120°C. Esta biblioteca genómica del *E. coli* ED8767 se introdujo dentro del *S. meliloti* 16C18 mediante apareamiento conyugal tri-parental, como se describe más adelante para el screening de los transconjugantes que crecieron en la placa EMM sin PN.

El *S. meliloti* 16C18 como cepa receptora, se inoculó en medio líquido LBMC y se incubó con agitación a 30°C a 140 rpm durante 16 horas. El cultivo (400 µl) se transfirió al mismo medio recién preparado y se incubó de nuevo durante 6 horas. El *E. coli* HB101 hospedando el pRK2013 como cepa auxiliar, se inoculó en el medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de Km y se incubó con agitación a 37°C a 140 rpm durante 16 horas. El cultivo (100 µl) se transfirió a un medio recién preparado y se incubó de nuevo durante 6 horas. El *E. coli* ED8767 almacenado congelado, que hospedaba la biblioteca genómica del *S. meliloti* IFO 14782 como una cepa dadora, se inoculó en el medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de Tc y se incubó con agitación a 30°C a 140 rpm durante 2 horas. Después de cosechar cada cepa, se mezclaron con un ratio 1:1:1, y las células mezcladas se colocaron sobre un filtro de nitrocelulosa colocado sobre una placa de agar LBMC. Después de la incubación durante 20 horas a 30°C, se rascaron las células sobre el filtro y se suspendieron en solución salina estéril al 0,85%. La suspensión se diluyó y se pulverizó sobre placas EMM que contenían 20 µg/ml de NaI (para seleccionar el *S. meliloti*) y 10 µg/ml de Tc (para seleccionar el plásmido). Después de la incubación a 30°C durante 8 días, aparecieron 4 colonias. Los plásmidos de estas colonias se prepararon, se digirieron con enzimas de restricción y se analizaron sobre gel de agarosa. Entre estos plásmidos, un plásmido el cual tenía una inserción de 23,0 kb, se denominó como pSHT09. Un fragmento de ADN de 2,5 kb generado por escisión del pSHT09 con *EcoR* I se ligó dentro del pVK100 que había sido abierto en el sitio *EcoR* I y la mezcla de ligación se transformó en células competentes *E. coli* HB101 (Takara Bio Inc., Shiga, Japón). Los plásmidos aparecidos en las colonias se prepararon, se digirieron con enzimas de restricción y se analizaron sobre gel de agarosa. Un plásmido el cual contenía una inserción de 2,5 kb, fue denominado pVK-HTS1. El plásmido fue transferido dentro del *S. meliloti* 16C18 mediante apareamiento conyugal tri parental, como se ha descrito más arriba. El *S. meliloti* 16C18 alojando el pVK-HTS1 (*S. meliloti* 16C18/pVK-HTS1) creció sobre una placa EMM sin PN ó 4-HT. Esto indica que hay un gen que complementa el crecimiento del *S. meliloti* 16C18 dentro del fragmento de ADN de 2,5 kb.

[C] especificación del gen complementario

La secuencia de ADN del fragmento de 2,5 kb, la cual se obtuvo en el ejemplo 1 [B], se determinó con un secuenciador de ADN ALFred (Amersham Biosciences Corp., NJ, USA). Dentro de la secuencia, había un marco abierto de lectura (denominado ORF a partir de aquí), cuya longitud fue de 1491 bp (SEQ ID NO: 1). La secuencia del ORF fue idéntica a la región CDS de SMc00985 (951316-952806, complemento) con el número de registro NC_003047. La secuencia de aminoácidos deducida del CDS (SEQ ID NO: 2) se pronosticó como una presunta oxidoreductasa, aunque su sustrato no había sido identificado. A continuación el ORF se denominó como pdxR. Un plásmido recombinante que lleva el pdxR, se construyó como sigue. El fragmento de ADN que contiene el pdxR y la región flanqueante, se amplificó a partir de 100 ng del ADN cromosómico del *S. meliloti* IFO 14782 con el kit para PCR de alta fidelidad (HF) (Clontech Laboratories, Inc. CA, USA), empleando 10 pmoles de los dos cebadores SEQ ID Nos: 3 y 4. Se diseñó un cebador para el terminal amino para contener un codon de iniciación justamente después del sitio *EcoR* I. Las condiciones de reacción fueron como sigue: después de mantener 15 segundos a 94°C, 25 ciclos de 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 50°C, 3 minutos a 68°C. El producto de la PCR resultante de 2,2 kb se insertó en el vector pCRII-TOPO con el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen Japan KK., Japón). Se descubrió que la secuencia de pdxR en la región amplificada era idéntica a la correspondiente región CDS del SMc00985 (951316-952806, complemento) con el número de registro NC_003047. El fragmento de ADN de 1,7 kb, correspondiente a la región amplificada se cortó con *EcoR* I y el fragmento se recuperó a partir del gel de agarosa con QIAEXII (QIAGEN, GmbH, Alemania). El fragmento de 1,7 kb, se ligó al vector de expresión pKK223-3 (Amersham Biosciences Corp., NJ, USA) que había sido abierto con *EcoR* I y desfosforilado mediante fosfatasa alcalina. Después de la transformación de las células competentes de *E. coli* JM109 (Takara Bio. Inc., Shiga, Japón) con la mezcla de ligación, se prepararon plásmidos en transformantes, se digirieron con enzimas de restricción y se analizaron sobre gel de agarosa. Un plásmido recombinante, el pKK-pdxR, en el cual se insertó el gen pdxR dentro del sitio *EcoRI* del pKK223-3, se obtuvo en la misma

ES 2 330 098 T3

dirección del promotor tac sobre el vector. El plásmido pKK-pdxR se preparó con *E. coli* JM109/pKK-pdxR con el kit QIAGEN Midi (QUIAGEN GmbH, Alemania).

El plásmido pKK-pdxR así obtenido, se digirió con *Bam*HI. El fragmento de 2 kb resultante que contenía el promotor tac y el pdxR, se purificó con gel de agarosa. El fragmento de 2 kb se ligó al pVK100 que había sido abierto con la *Bgl* II y se desfosforiló con fosfatasa alcalina. Las células competentes de *E. coli* HB 101 (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), se transformaron con esta mezcla de ligación y se prepararon los plásmidos en transformantes, se digirieron con una enzima de restricción y se analizaron sobre gel de agarosa. Se obtuvo un plásmido recombinante, el pVK-PdxR, en el cual el promotor tac y el gen pdxR, fueron insertados dentro del sitio *Bgl* II del pVK100, como el gen resistente a la Km de dirección opuesta.

El pVK-pdxR así obtenido se introdujo dentro del *S. meliloti* 16C18 mediante apareamiento conyugal tri-parental, como se ha descrito en el ejemplo 1 [B], excepto las placas de selección, las cuales contienen LBMC 20 mg/L de NaI y 10 mg/L de Tc. Se obtuvieron los transconjugantes crecidos sobre las placas de selección, y los plásmidos de los transconjugantes se determinó que tenían la misma estructura del pVK-pdxR. A continuación, estos transconjugantes fueron estriados sobre una placa de EMM que contenía 50 mg/L de Nm y 10 mg/L de Tc. Después de la incubación a 30°C, todos los transconjugantes ensayados pudieron crecer sobre la placa sobre la cual el *S. meliloti* 16C18/pVK100 no pudo crecer. Esto indica que el pdxR amplificado colocado bajo el promotor tac puede complementar el *S. meliloti* 16C18.

Ejemplo 2

Función enzimática y características de un producto génico pdxR

[A] complementación del mutante *E. coli* PdxB⁻ mediante el gen pdxR

El pKK-pdxR del ejemplo 1 [C] así obtenido, se transformó dentro del *E. coli* WG1012, el cual es un mutante PdxB⁻ (Dempsey, W. B., J. Bacteriol, vol. 100, p. 295, 1969). Los transformantes resultantes y la cepa madre, *E. coli* WG1012, se rascaron sobre las placas EMM con y sin PN. Después de la incubación durante 16 horas a 37°C, todos los transformantes ensayados pudieron crecer sobre placas EMM sin PN, sobre las cuales el *E. coli* WG1012 no pudo crecer. Esto indica que el producto del gen pdxR del *S. meliloti* tiene la misma función que el producto del gen pdxB del *E. coli*, el cual convierte el EN4P en 2-ceto-EN4P.

[B] sistema de reacción enzimático para la EN4P oxidoreductasa

(1) construcción de microorganismos para la producción del producto del gen pdxR y preparación del extracto exento de células

A continuación, el *S. meliloti* 16C18 y un clon de los transconjugantes obtenido por introducción del pVK-pdxR dentro del *S. meliloti* 16C18 como se ha descrito en el ejemplo 1 [C], *S. meliloti* 16C18/pVK-pdxR, se hicieron crecer en tubos que contenían 6 ml de un medio para la siembra compuesto de 1% de glucosa, 0,5% de polipeptona (Nihon Pharmaceutical Co., Osaka, Japón), 0,2% de extracto de levadura Bacto, 0,1% de K₂HPO₄, 0,05% de MgSO₄·7H₂O, 0,001% de MnSO₄·5H₂O, y 0,001% de FeSO₄·7H₂O a 28°C durante 17 horas.

Los cultivos de siembra (4 ml de cada uno), se transfirieron en frascos de 500 ml que contenían 200 ml de un medio de fermentación compuesto de 4% de glucosa, 4% de polipeptona S (Nihon Pharmaceutical Co., Osaka, Japón), 0,8% de extracto de levadura Bacto, 0,05% de MgSO₄·7H₂O, 0,05% de MnSO₄·5H₂O, 0,001% de FeSO₄·7H₂O, y una gota de Actocol (Takeda Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japón). Los frascos se agitaron en un agitador rotativo (180 rpm) a 28°C. Después del cultivo durante 72 horas, se obtuvieron 35,3 y 35,5 g de células húmedas a partir de 2 litros de caldo de cultivo del *S. meliloti* 16C18 y *S. meliloti* 16C18/pVK-pdxR, respectivamente, por centrifugación a 10.400 x g durante 10 minutos, y las células se lavaron con 200 ml de solución de NaCl al 0,85%, dos veces y se almacenaron a -30°C hasta su utilización.

Las células congeladas se descongelaron lentamente y a continuación, se suspendieron con 200 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. La suspensión se pasó a través de una célula de presión French a 800 kg/cm². El homogeneizado se centrifugó para eliminar los residuos de células a 37.000 x g durante 90 minutos, y a continuación, cada 165 ml de sobrenadantes se emplearon como extracto exento de células (CFE), y los contenidos en proteína del *S. meliloti* 16C18 y *S. meliloti* 16C18/pVK-pdxR, fueron de 5.030 y 5.042 mg, respectivamente.

Para confirmar la expresión del PdxR, cada uno de los CFE (5 ml) se dializó durante la noche frente a 4 litros de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, y se sometió a SDS-PAGE sobre geles al 10% (w/v) y se tiñó con azul Coomassie brillante (kit CBB de tinte rápida, nacalai tesque, Japón). Una superexpresión del polipéptido con un tamaño molecular esperado (53,0 kDa), se detectó en el *S. meliloti* 16C18/pVK-pdxR, pero no en el *S. meliloti* 16C18. Por lo tanto los CFEs se emplearon para un estudio posterior.

(2) Actividades de la EN4P oxidoreductasa del extracto exento de células

El EN4P se preparó a partir del E4P (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA) mediante oxidación con bromo, de acuerdo con el método de Horecker [Methods in Enzymology ("Métodos de Enzimología") 3: 172-174 (1957)]. El producto se confirmó como m/z 215 (M-H)⁻ mediante análisis espectrométrico de masas por bombardeo de átomos rápidos negativos (espectrómetro de masas Jeol SX-102/102) y las propiedades cromatográficas del producto fueron idénticas a las del material preparado por el método de Zhao *et al.* [J. Bacteriol. 177: 2804-2812 (1995)].

La actividad de la EN4P oxidasa con el oxígeno en el CFE, se examinó mediante la observación del cambio de color (de incoloro a rosado), debido a la formación de peróxido de hidrógeno por la modificación del sistema 4-aminoantipirina peroxidasa empleado para el ensayo de la sarcosina oxidasa por Inouye *et al.*, como sigue. La mezcla de reacción (150 μ l) contenía 50 mM de tampón de fosfatos de potasio, de pH 7,0, 2,3 mM de EN4P, 0,47 mM de 4-aminoantipirina (Wako Pure chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón), 2 mM de fenol (Wako Pure chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón), 19 U de peroxidasa de rábano silvestre (Sigma Chemical Co.) y CFE (0,16 mg de proteína), y se observaron los cambios de color de las mezclas de reacción a temperatura ambiente (21°C) ó a 37°C. Pero, después de 10 minutos no tuvo lugar ningún cambio de color tanto a las temperaturas de las mezclas de reacción con CFE preparadas a partir de células de *S. meliloti* 16C18 como de *S. meliloti* 16C18/pVK-pdxR, mientras que las soluciones estándar de peróxido de hidrógeno dieron colores rosados con una intensidad que correspondía a las concentraciones. A partir de los resultados se determinó que ambos CFEs no tenían ninguna actividad EN4P oxidasa con oxígeno.

La actividad deshidrogenasa EN4P con NAD⁺ ó NADP⁺ en CFE se determinó por la formación de NADH ó NADPH, los cuales absorben a 340 nm. La mezcla de reacción (150 μ l) para el ensayo de la actividad de la EN4P deshidrogenasa, contenía 33 mM de tampón de fosfato de potasio de pH 7,0, 2,3 mM de EN4P, 1 mM de NAD⁺ ó NADP⁺, y CFE preparado a partir de células de *S. meliloti* 16C18 ó *S. meliloti* 16C18/pVK-pdxR (cada uno, 0,16 mg de proteína). El aumento de A₃₄₀ se monitorizó a temperatura ambiente (21°C) durante 1 minuto en un espectrofotómetro UV 2200 (Shimadzu Instruments, Inc., Kyoto, Japón) para registrar UV-VIS, pero el aumento de A₃₄₀ no se observó en la mezcla de reacción enzimática con cualquiera de los CFEs. Por lo tanto se determinó que ambos CFEs no tenían ningún NAD⁺ ó NADP⁺ dependiente de la actividad de la EN4P deshidrogenasa.

La actividad de la EN4P deshidrogenasa con un receptor de electrones en el CFE, se dictaminó a temperatura ambiente (21°C) mediante el cambio de color debido a la formación de una forma reducida a partir de una forma oxidada de un receptor de electrones. La mezcla de reacción (150 μ l) contenía 33 mM de tampón de fosfato de potasio de pH 7,0, 2,3 mM de EN4P, CFE (0,16 mg de proteína), y un receptor de electrones como por ejemplo, el 2,6-diclorofenolindofenol (0,091 mM) (Wako Pure chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón) (denominado como DCIP a partir de aquí) o ferricianuro (1,3 mM) (Wako Pure chemical Industries, Ltd., Osaka, Japón). La decoloración del DCIP y el ferricianuro tuvo lugar al cabo de 30 segundos y 1 minuto respectivamente, solamente cuando el CFE preparado a partir de células de *S. meliloti* 16C18/ pVK-pdxR se empleó en un sistema de reacción enzimático que contenía EN4P, aunque la decoloración de ambos receptores de electrones tuvo lugar en un sistema de reacción enzimático sin EN4P en presencia de CFE de *S. meliloti* 16C18/pVK-pdxR ó en un sistema de reacción enzimático con y sin EN4P en presencia de CFE ó *S. meliloti* 16C18 (tabla 2). Estos resultados indican que un producto del gen pdxR oxida el EN4P con un receptor de electrones tal como el DCIP ó el ferricianuro.

TABLA 2

Cambio de color de los receptores de electrones en la mezcla de reacción

	<i>S. meliloti</i> 16C18	<i>S. meliloti</i> 16C18/pVK-pdxR
DCIP ¹⁾ + EN4P ²⁾	Ningún cambio	Decoloración a los 30 segundos
DCIP - EN4P	Ningún cambio	Ningún cambio
Ferricianuro + EN4P	Ningún cambio	Decoloración al cabo de 1 minuto
Ferricianuro - EN4P	Ningún cambio	Ningún cambio
DCIP ¹⁾ : 2,6-diclorofenolindofenol, EN4P ²⁾ : D-eritronato 4-fosfato.		

Además, se examinó la posibilidad del citocromo c en lugar del DCIP ó del ferricianuro en el sistema de reacción enzimático mencionado más arriba, de la EN4P deshidrogenasa con un receptor de electrones, midiendo el cambio de los espectros de absorción en las regiones espectrales de 400-600 nm, debido a la formación de la forma reducida de la forma oxidada del citocromo c a temperatura ambiente (21°C). La mezcla de reacción (150 µl) contenía 33 mM de tampón de fosfato de potasio de pH 7,0, 2,3 mM de EN4P, 80µM de la forma oxidada del citocromo c (a partir del corazón equino, Sigma Chemical Co.) como receptor de electrones, y CFE (0,16 mg de proteína). Los espectros de absorción de la mezcla de reacción en el tiempo cero, y después de 2, 5, 10, 15 y 20 minutos a temperatura ambiente (21°C), se monitorizaron con un espectrofotómetro UV 2200 que registraba los UV-VIS. El espectro de absorción en el tiempo cero tenía solamente un amplio pico a los 525 nm, pero en el espectro después de 2 minutos, apareció un nuevo pico a los 550 nm que correspondía a la forma reducida del citocromo c, y la absorción en la región de 550 nm después de 5, 10, 15 y 20 minutos, se incrementó durante el transcurso del tiempo. Este resultado indica que el citocromo c trabaja también como receptor de electrones en el sistema de reacción enzimático de la EN4P deshidrogenasa.

[C] *Propiedades de la EN4P deshidrogenasa*

(1) *Purificación de la EN4P deshidrogenasa con receptores de electrones*

El producto del gen pdxR que tiene actividad EN4P deshidrogenasa con los receptores de electrones en CFE, se purificó mediante la siguiente cromatografía.

Cromatografía HP de Q Sefarosa

La CFE (3,055 mg de proteínas) del *S. meliloti* 16C18/pVK-pdxR obtenido en el ejemplo 2 [B] (1), se aplicó a la columna HP de Q Sefarosa (44 mm de diámetro y 12,5 cm de altura; (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), la cual se equilibró con 10 mM de tampón de Tris-HCl de pH 7,5. Después de lavar con 100 ml de tampón de Tris-HCl 10 mM, de pH 7,5, el cual contenía 0,1 M de KCl, se cromatografió con un gradiente lineal de KCl 0,1 M a 0,4 M (volumen total, 800 ml). Después de que una pequeña porción de cada eluyente fraccionado fuera dializado durante la noche frente a tampón de Tris-HCl 10 mM, de pH 7,5, la actividad enzimática se monitorizó midiendo la disminución de la absorbancia a 600 nm a temperatura ambiente (21°C) debido a la formación de DCIP reducido. Las mezclas de ensayo (150 µl) contenían 33 mM de tampón de fosfato de potasio de pH 7,0, 2,3 mM de EN4P, 0,091 mM de DCIP, y 2 µl de muestras dializadas. La fracción activa se eluyó a la concentración de 0,37 M de KCl, se recogió y se dializó durante la noche frente a 10 mM de tampón de Tris-HCl de pH 7,5.

Cromatografía Q de investigación

La fracción activa dializada (58 mg de proteínas), obtenida en la cromatografía Q de sefarosa HP, se cromatografió con una columna Resource Q de 6 mm de columna (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), la cual se equilibró con tampón de Tris-HCl 10 mM, de pH 7,5. Después de lavar con 70 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, de pH 7,5, que contenía 0,1 M de KCl, se cromatografió con un gradiente lineal de KCl de 0,1 M a 0,4 M (volumen total, 120 ml). Después de la diálisis de cada eluyente frente a tampón de Tris-HCl 10 mM, de pH 7,5, la actividad enzimática se midió mediante el mismo método descrito en la cromatografía Q de sefarosa HP. La fracción activa se eluyó a la concentración de 0,22 M de KCl, se recogió y se dializó durante la noche frente a tampón Tris-HCl 10 mM, de pH 7,5.

Cromatografía con HiPrep 16/60 sefacril S-200HR

La muestra dializada a partir del paso anterior, se concentró por ultrafiltración (Centriplus YM-10, seguida mediante los concentradores Microcon YM-10 de Amicon Inc., Beverly, Mass., USA) a 300 µl. La muestra (21,6 mg de proteínas) se aplicó a la columna HiPrep 16/60 sefacril S-200HR (16 mm de diámetro y 60 cm de altura; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), la cual se equilibró con tampón Tris-HCl 50 mM, de pH 7,5 que contenía 150 mM de KCl. Después de la diálisis de cada eluyente frente a tampón Tris-HCl 10 mM, de pH 7,5, la actividad enzimática se midió por el mismo método descrito en la cromatografía HP de sefarosa Q. La fracción activa se sometió a SDS-PAGE sobre geles al 10% (p/v), y se tiñó con azul brillante Coomassie. El análisis indicó que la fracción activa fue casi homogénea y que tenía un polipéptido con un peso molecular de 53 kDa, el cual coincidió con el peso molecular del producto génico deducido a partir de la secuencia de ADN de pdxR.

(2) *Características de la unión de la flavina a la proteína PdxR*

Para caracterizar la unión de la flavina a la proteína PdxR, se aplicó el fraccionamiento del sulfato de amonio en la solución enzimática final purificada preparada en el ejemplo 2 [C] (1) de acuerdo con un método de Cammack [Biochem. J. 109: 45-46 (1968)]. La solución enzimática (1 ml, que contenía 4,74 mg de proteína) se dializó durante la noche frente a 1 litro de 80% (p/v) de solución de sulfato de amonio, y el precipitado resultante en la membrana de diálisis se recogió por centrifugación a 34.800 x g durante 30 minutos, se disolvió en 0,5 ml de Tris-HCl 10 mM, de pH 7,5, y se dializó durante la noche frente a 4 litros del mismo tampón. El volumen de solución de enzima dializado se pasó a 1 ml con Tris-HCl 10 mM, de pH 7,5.

La decoloración del DCIP en la mezcla de reacción enzimática que contenía 33 mM de tampón de fosfato de potasio de pH 7,0, 2,3 mM de EN4P, PdxR purificado tratado con sulfato de amonio (2,37 µg de proteína), 0,091 mM

ES 2 330 098 T3

de 2,6-diclorofenolindofenol, y mononucleótido de flavina (FMN) (Sigma Chemical Co.) ó FAD (Sigma Chemical Co.) se observó con varias concentraciones a temperatura ambiente (21°C). El grado de decoloración se dictaminó a los 3 minutos.

A partir del ensayo, la decoloración del DCIP tuvo lugar en las mezclas de reacción con concentraciones de FAD mayores de 0,014 μM , pero no tuvo lugar en las mezclas sin flavina y con cualquier concentración de FMN, como se muestra en la tabla 3. Estos resultados implican que el FAD es una coenzima de EN4P deshidrogenasa, PdxR de *S. meliloti*.

TABLA 3

Efecto de la flavina sobre la decoloración del DCIP de la mezcla de reacción

Conc. final (μM)	Grado de decoloración	
	FAD	FMN
0	–	–
0,014	+	–
0,059	++	–
0,24	+++	–
0,95	++++	–
0,38	+++++	–
15,2	+++++	–
61	+++++	–

(3) Especificidad del sustrato de PdxR

La especificidad del sustrato de PdxR, se dictaminó empleando la solución final de enzima purificada, preparada en el ejemplo 2 [C] (1). El ensayo de la enzima estándar se efectuó como sigue: la mezcla base de la reacción (volumen total 150 μl), consistía en 33 mM de tampón de fosfato de potasio (pH 7,0), 2,4 μg de proteínas, 0,091 mM de DCIP y agua hasta un volumen total de 144 μl , y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente (21°C). A continuación, se añadieron 6 μl de 57 mM de solución de los sustratos de la lista de la tabla 4, para dar una concentración final de 2,28 mM, y el conjunto se incubó a temperatura ambiente. La disminución del A_{600} se monitorizó a 21°C durante 1 minuto para la lectura de la EN4P deshidrogenasa con un espectrómetro UV 2200 para registrar UV-VIS. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima reducida por 1 nmol de DCIP durante 1 minuto bajo la acción de la EN4P deshidrogenasa en el sistema de ensayo descrito más arriba. A partir del ensayo, el PdxR oxidó solamente el EN4P, y no oxidó los otros α -hidroxiácidos ensayados.

ES 2 330 098 T3

TABLA 4

Especificidad del sustrato de PdxR

Substratos	Actividad (nmol/minuto/mg de proteína)
Ninguno	0
EN4P	946
Glicolato	0
Glioxilato	0
Acido D(+) glicérico	0
Acido L-(+)-láctico	0
D,L-lactato	0
D,L-isocitrato	0
Acido L- málico	0
D-eritronato	0
Acido glicólico 2-fosfato	0
Acido D-(-)-glicérico 3-fosfato	0

Ejemplo 3

Producción de la vitamina B₆ mediante el *S. meliloti* recombinante

El pVK-pdxR obtenido en el ejemplo 1 [C] se introdujo en el *S. meliloti* IFO 14782 mediante apareamiento conyugal tri-parental como se describe en el ejemplo 1 [C]. Se obtuvieron los transconjugantes crecidos sobre LBMC que contenía 20 mg/l de NaI y 10 mg/L de Tc. Los plásmidos de los transconjugantes fueron dictaminados como que tenían la misma estructura del pVK-pdxR. El *S. meliloti* IFO 14782/pVK-pdxR así obtenido, y la cepa madre *S. meliloti* IFO 14782, se incubaron sobre una placa de agar de LBMC a 30°C durante 48 horas, y se inoculó un asa de cada cepa a los tubos que contenían 8 ml de un medio de siembra compuesto de 1% de glucosa, 1% de extracto de germen de maíz (Nihon Syokuhin Kako Co., Ltd., Tokio, Japón), 0,2% de extracto de levadura Bacto, 0,05% de MgSO₄·7H₂O, 0,001% de MnSO₄·5H₂O y 0,001% de FeSO₄·7H₂O, de pH 7,0, y a continuación se agitaron los tubos en un agitador recíproco a 275 rpm a 30°C.

Después de agitar durante 17 horas, se transfirieron 4 ml de caldo de cultivo, a frascos de 500 ml con dos deflectores, conteniendo 200 ml de un medio de producción compuesto de 6% de glucosa, 4% de extracto de germen de maíz, 0,8% de extracto de levadura Bacto, 0,05% de MgSO₄·7H₂O, 0,05% de MnSO₄·5H₂O, 1% de Allophosite (Shinagawa Chemicals Co., Ltd., Tokio, Japón), y 0,025% de Actocol, de pH 6,8 y se agitó en un agitador rotativo a 180 rpm a 30°C.

Después del cultivo durante 7 días, se cuantificaron los contenidos de vitamina B₆ en el sobrenadante de cada caldo de cultivo, mediante cromatografía líquida de alta presión (denominada HPLC a partir de aquí) y la vitamina B₆ producida se calculó mediante el método del estándar interno con el 4'-desoxipiridoxol como se describe más adelante. Para preparar las muestras de la HPLC, se mezclaron 200 µl de 500 mg/l de 4'-desoxipiridoxol como sustancia interna, 50 µl de ácido perclórico al 60%, y 500 µl de agua, con 500 µl de las soluciones estándar de piridoxol (0-100 mg/L) ó del sobrenadante del caldo de cultivo. A continuación, la mezcla se colocó sobre hielo durante 10 minutos. Después de centrifugar a 18.000 x g durante 10 minutos, se cargó una porción de la mezcla en la siguiente columna.

ES 2 330 098 T3

Las condiciones analíticas fueron como sigue: columna, Capcell pak C18 SG120 (4,6 x 250 mm) (Shiseido Co., Ltd., Tokio, Japón); fase móvil perclorato de sodio 0,1 M, fosfato de potasio 0,1 M, y 2% de acetonitrilo (pH 3,5); temperatura de la columna, 25-26°C; velocidad del flujo, 1,0 ml/minuto; y detector, ultravioleta (UV) (a 292 nm). Como resultado, el *S. meliloti* IFO 14782/ pVK-pdxR produjo 76 mg de piridoxol por litro, aproximadamente 1,2 veces mayor que el *S. meliloti* IFO 14782 madre (tabla 5).

TABLA 5

Productividades del piridoxol del S. meliloti IFO 14782 y del S. meliloti IFO 14782/pVK-pdxR

Microorganismo	Piridoxol (mg/L)	Magnitud del aumento
<i>S. meliloti</i> IFO 14782 (DSM 10226)	63	1,0
<i>S. meliloti</i> IFO 14782/pVK-pdxR	76	1,2

Ejemplo 4

Separación de la vitamina B₆ del caldo de cultivo

La vitamina B₆ producida se recuperó del caldo de cultivo del *S. meliloti* IFO 14782/pVK-pdxR preparado en las mismas condiciones de cultivo descritas en el ejemplo 3. El piridoxol en cada paso de purificación y la concentración se siguió mediante HPLC como se ha descrito en el ejemplo 3.

Dos litros del caldo de cultivo de 168 horas, que contenían 74 mg/L de vitamina B₆, se centrifugaron a 7.500 rpm durante 10 minutos. El pH del sobrenadante resultante se ajustó a 3,1 con HCl 1N, y a continuación, el sobrenadante se aplicó a una columna (5,5 x 15 cm) empaquetada con 350 ml de Amberlite CG 120 (forma H⁺, 100-200 mallas, Rohm and Haas Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA). La columna se lavó con 500 ml de agua desionizada y a continuación se eluyó con hidróxido de amonio al 5%. Las fracciones de vitamina B₆ se concentraron a presión reducida. El residuo así obtenido se disolvió en 10 ml de agua desionizada, y la solución se cargó en una columna (5,5 x 16 cm) empaquetada con 380 ml de Dowex 1 x 4 (forma OH⁻, 200-400 mallas, Dow Chemical Co., Ltd., Midland, Michigan, USA), y a continuación se lavó con 500 ml de agua desionizada. La columna se eluyó a continuación con HCl 0,1 N. Las fracciones que contenían el piridoxol se concentraron hasta un volumen pequeño a presión reducida. Después de que el residuo sólido se hubo disuelto en una pequeña cantidad de etanol caliente, la solución se mantuvo en reposo a 4°C durante la noche. Los precipitados resultantes se recogieron por filtración y se secaron al vacío para obtener 119 mg de cristales en bruto. Se cristalizó a partir de etanol para obtener 91,6 mg de cristales blancos que tenían un punto de fusión de 160°C. La absorción por infrarrojos, la absorción UV, y el espectro de RMN del producto coincidieron con los del auténtico piridoxol.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción biológica de la vitamina B₆, el cual comprende el cultivo de una célula anfitriona transformada o transfectada mediante un ADN aislado o mediante un vector o plásmido que comprende el ADN aislado bajo la condición que conduce a la producción de la vitamina B₆, y recuperando la vitamina B₆ del cultivo, en donde el ADN aislado comprende una secuencia de nucleótidos que codifican el PdxR, el cual es una D-eritronato 4-fosfato deshidrogenasa dependiente del dinucleótido flavina-adenina, seleccionada del grupo formado por:

(a) una secuencia de ADN identificada por SEQ ID NO: 1 ó la cadena complementaria de la misma;

(b) una secuencia de ADN la cual hibrida bajo condiciones estándar con la secuencia de ADN complementaria a la secuencia de ADN definida en (a), ó un fragmento de la misma, y codifica un polipéptido que tiene la actividad de la D-eritronato 4-fosfato deshidrogenasa dependiente del dinucleótido flavina-adenina;

(c) una secuencia de ADN la cual codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN de (a) ó (b);

(d) una secuencia de ADN la cual es idéntica a la extensión de por lo menos el 80% de un ADN que codifica un polipéptido el cual comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y codifica un polipéptido que tiene la actividad de la D-eritronato 4-fosfato deshidrogenasa dependiente del dinucleótido flavina-adenina; y

(e) una secuencia de ADN la cual codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos la cual es idéntica a la extensión de por lo menos el 80% de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y codifica un polipéptido que tiene la actividad de la D-eritronato 4-fosfato deshidrogenasa dependiente del dinucleótido flavina-adenina.

2. Un procedimiento para la producción biológica de la vitamina B₆, el cual comprende la introducción del ADN aislado, según se ha reivindicado en la reivindicación 1, en uno cualquiera de los apartados (a) a (e), en una célula anfitriona adecuada, cultivando la célula anfitriona obtenida bajo las condiciones adecuadas para conducirla a la producción de la vitamina B₆, y recuperación de la vitamina B₆ del cultivo.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha célula anfitriona pertenece al género *Sinorhizobium*.

ES 2 330 098 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Vitamins AG

5 <120> ADN que codifica la ácido D-eritrónico 4-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD, implicada en la biosíntesis de la vitamina B₆

<130> secuencia para pdxR (case 19)

10

<140>

<141>

15

<160> 4

<170> PatentIn ver. 2. 1

20

<210> 1

<211> 1491

<212> ADN

25

<213> *Sinorhizobium meliloti*

<400> 1

30

atggccatcg gcacgcttga agcaaccacg tlgatccgag gcagggccat gaccaccgta 60

cttccttctc ccgaactcal cgcctccttc gtcgatatcg tcgggcctgg caatgccttc 120

35

accgcacccg ccgacacggc accctacctc gtcgagtcct gcgggctcta ccgcggcacg 180

acgccgctcg tgctcaggcc cggclcc9tc gaggattt cgctgggtgat gcggcttncc 240

40

agtcagaccc gaacggcagt cglgccgcag ggcggcaata ccggacalgt ggccggacag 300

45

50

55

60

65

ES 2 330 098 T3

	attccacgcg	agggcaaagc	cgacgtggtc	ctttccctcg	agcggctgaa	ccgcatccgc	360
5	gacatcgacc	cggtcggcaa	cgtgatcgtg	gccgacgccg	gctgtatcct	ggcggacatc	420
	cagaaggccg	ccgatgacgt	cgaccggctt	tticccctgt	cactcggctc	ggaaggcict	480
10	gcccggatcg	gcggaatct	ttcgaccaat	gccggcggca	ctgccgtgct	tgccatgagg	540
	aacatgcgcc	agctctgcct	ggggctggaa	gtcgtgctcc	cgaccgggga	gatctgggat	600
15	gggctcagac	gcctcaggaa	ggacaatacc	ggctacgata	tgccgcatct	tttcatcggc	660
	gccgagggaa	cgctcggcgt	cataaccggc	gccgttttga	agctctttcc	gaaaccgcgc	720
20	ggccaccagg	tgccctttgc	cgccctcagg	agcgtcgagg	acgcacttac	gcttttcgat	780
	cgggcaacaa	gcgtctgcgg	gccggccctg	acgggcttcg	aactgatgcc	gcggctcggc	840
25	atcgagttca	ccaccgggca	catcgccggc	gtcagagata	cgatggaaac	gacgcatccg	900
	tggtacgcgc	tgatcgatat	ctccacctcg	gataccgccg	aaagcgcgga	acggatggtg	960
30	caagaccttc	tgaagccgt	cattgccgac	ggtctcgtcg	aaaacgcggt	catgccccag	1020
	aacgaagcgc	aacgcagagc	gctctggcac	atgcgagaaa	gcatgtcgcc	ggcacaaaag	1080
35	ootgaggggtg	gtccatcaa	acatgacgtt	tcggtcccgg	tgtcgagcat	tcgggccttc	1140
	atgacggagg	cggatgcgct	ggtctccaag	gccatccccg	gcgcgcgcat	ctgcgccttc	1200
40	ggccatatgg	gcgacggcaa	tatccactac	aacatctccc	agcccgtcgg	cgcggacaag	1260
	cagagctttc	tcgatcgggtg	gcgcgagata	aatgcgatac	ttcacgccgt	cgtgctcaaa	1320
45	catgacggct	cgatctctgc	cgagcatggc	atcggccagt	tgaagcgaga	cgaactcgcg	1380
	gcgatccgct	cgccgatcga	gatcgagctc	atgcgacgga	tcaagcacgc	cttcgacccg	1440
50	gcggggatca	tgaaccccga	taaggtgctg	cgcgaggata	gaggcgagta	a	1491
	<210> 2						
	<211> 496						
	<212> PRT						
55	<213> <i>Sinorhizobium meliloti</i>						
60							
65							

ES 2 330 098 T3

<400> 2

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

ES 2 330 098 T3

Residue	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Leu	Gly	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Val	Leu	Lys	Leu	Phe	Pro	Lys	Pro	Arg					
225					230					235					240					
Gly	His	Gln	Val	Ala	Phe	Ala	Gly	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Asp	Ala	Leu					
				245					250					255						
Thr	Leu	Phe	Asp	Ara	Ala	Thr	Ser	Val	Cys	Gly	Pro	Ala	Leu	Thr	Gly					
			260					265					270							
Phe	Glu	Leu	Met	Pro	Ara	Leu	Gly	Ile	Glu	Phe	Thr	Thr	Arg	His	Ile					
		275					280					285								
Ala	Gly	Val	Arg	Asp	Pro	Met	Glu	Thr	Thr	Ile	Pro	Trp	Tyr	Ala	Leu					
	290					295					300									
Ile	Asp	Ile	Ser	Thr	Ser	Asp	Thr	Ala	Glu	Ser	Ala	Glu	Arg	Met	Val					
305				310					315					320						
Gln	Asp	Leu	Leu	Glu	Ala	Val	Ile	Ala	Asp	Gly	Leu	Val	Glu	Asn	Ala					
			325					330					335							
Val	Ile	Ala	Gln	Asn	Glu	Ala	Gln	Arg	Arg	Ala	Leu	Trp	His	Met	Arg					
		340					345				350									
Glu	Ser	Met	Ser	Pro	Ala	Gln	Lys	Pro	Glu	Gly	Gly	Ser	Ile	Lys	His					
	355					360				365										
Asp	Val	Ser	Val	Pro	Val	Ser	Ser	Ile	Pro	Ala	Phe	Met	Thr	Glu	Ala					
	370					375				380										
Asp	Ala	Leu	Val	Ser	Lys	Ala	Ile	Pro	Gly	Ala	Arg	Ile	Cys	Ala	Phe					
385				390					395					400						
Gly	His	Met	Gly	Asp	Gly	Asn	Ile	His	Tyr	Asn	Ile	Ser	Gln	Pro	Val					
			405					410					415							
Gly	Ala	Asp	Lys	Gln	Ser	Phe	Leu	Asp	Arg	Trp	Arg	Glu	Ile	Asn	Ala					
		420					425					430								
Ile	Val	His	Ala	Val	Val	Leu	Lys	His	Asp	Gly	Ser	Ile	Ser	Ala	Glu					
	435					440						445								

ES 2 330 098 T3

His Gly Ile Gly Glu Leu Lys Arg Asp Glu Leu Ala Ala Ile Arg Ser
 450 455 460
 5 Pro Ile Glu lle Glu Leu Met Arg Arg lle Lys His Ala Phe Asp Pro
 465 470 475 480
 10 Ala Gly Ile Met Asn Pro Asp Lys Val Leu Arg Glu Asp Arg Gly Glu
 485 490 495
 15 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia cebador artificialmente sintetizada
 25 <400> 3
 gaattcatgg ccatcggca 19
 30 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia cebador artificialmente sintetizada
 40 <400> 4
 ccacttcct tgtagtacga gct 23
 45
 50
 55
 60
 65