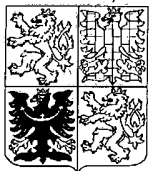


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.12.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.12.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/218700**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.10.2001**
(Věstník č. 10/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/US99/30918**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/37667**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 2285

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 P 7/58

C 12 P 7/60

C 12 N 1/21

(71) Přihlašovatel:
GENENCOR INTERNATIONAL, INC., Palo Alto,
CA, US;

(72) Původce:
Boston Matthew G., San Carlos, CA, US;
Swanson Barbara A., San Francisco, CA, US;

(74) Zástupce:
Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob produkce intermediátů kyseliny
askorbové**

(57) Anotace:
Předložené řešení se týká metod pro produkci intemediátů kyseliny askorbové, KDG, DKG a KLG a metod pro regeneraci kofaktoru. Vynález poskytuje geneticky zmanipulované hostitelské buňky obsahující heterologickou nukleovou kyselinu kódující v procesu využitelné enzymy.

CZ 2001 - 2285 A3

Způsob produkce intermediátů kyseliny askorbové

Oblast techniky

Předložený vynález se týká manipulování cest a zejména biokatalytických metod pro produkci intermediátů askorbové kyseliny. Vynález poskytuje především způsoby produkování intermediátů kyseliny askorbové v systémech nefermentativních.

Dosavadní stav techniky

Kyselina L-askorbová (vitamin C, ASA) nalézá použití ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu jako vitamin a antioxidant. Syntéza ASA získala značnou pozornost po mnoho let díky jejímu relativně velkému objemu na trhu a vysoké ceně jako speciální chemikálie. Chemická cesta z glukosy na ASA, Reichsteinova-Grussnerova metoda, byla poprvé publikována v roce 1934 (Helv. Chim. Acta 17: 311-328). Lazarus a spol. (1989, "Vitamin C: Bioconversion via a Recombinant DNA Approach", Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms, American Society for Microbiology, Washington D.C., vydal C.L. Hershberger) publikovali metodu biokonverze pro výrobu intermediátu ASA, kyseliny 2-keto-L-gulonové (2-KLG, KLG), která může být chemicky konvertována na ASA. Tato biokonverze uhlíkového zdroje na KLG zahrnuje různé intermediáty, přičemž biochemický proces je sdružen s působením reduktázy závislé na kofaktoru. Enzymatická regenerace kofaktoru zahrnuje použití enzymů k regeneraci kofaktorů jako NAD⁺ na NADH nebo NADP⁺ na NADPH na účet jiného substrátu, který je potom oxidován.

Stále zůstává potřeba ekonomicky přijatelných metod pro výrobu intermediátů kyseliny askorbové. Zejména když takové metody zahrnují enzymatické aktivity, které vyžadují kofaktor, by bylo zvláště žádoucí ovládat způsoby, které by zajišťovaly regeneraci kofaktorů. Předkládaný vynález se na takovou potřebu zaměřuje.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká nefermentativní produkce intermediátů ASA, např. KDG, DLG a KLG a nakonec jejich konverze na žádaný finální produkt, např.

erythorbát a askorbovou kyselinu, v biokatalytickém prostředí, řečené biokatalytické prostředí se zde uvádí jako bioreaktor. Biokatalytické prostředí může obsahovat životaschopné nebo neživoucí hostitelské buňky, které mají nejméně jednu enzymatickou účinnost, schopnou zpracování uhlíkového zdroje na žádaný intermediát. V jednom provedení je požadovaný intermediát před konversí na žádaný finální produkt z bioreaktoru rafinován pomocí elektrodialýzy. Pro schematickou představu produkce těchto intermediátů a produktů viz Obrázek 2.

Předkládaný vynález se také týká nefermentativního způsobu pro produkci intermediátů ASA, při němž je žádaný kofaktor regenerován. Předkládaný vynález je částečně založen na zjištění, že katalytické množství kofaktoru může být pro produkci KLG z uhlíkového zdroje regenerováno nefermentativním nebo in vitro způsobem. V jednom provedení předkládaného vynálezu je požadovaný kofaktor vyčištěn z bioreaktoru pomocí nanofiltrace a znovu použit.

Je-li požadovaným ASA intermediátem KDG, je bioreaktor opatřen uhlíkovým zdrojem, který je biokatalyticky konvertován přes nejméně jeden oxidační stupeň na KDG. V tomto provedení může hostitelská buňka obsahovat mutaci(e) v genu kódující oxidační enzymatický účinek, specifický pro oxidování KDG tak, že KDG není dále konvertována na další intermediáty nebo produkty.

Když je požadovaným ASA intermediátem DKG, je bioreaktor opatřen uhlíkovým zdrojem, který je biokatalyticky konvertován přes nejméně jeden oxidační stupeň na DKG. V závislosti na použité hostitelské buňce, může hostitelská buňka obsahovat mutaci(e) v genu kódující oxidační nebo redukční enzymatický účinek, tak, že DKG není dále konvertována na další intermediáty.

Když je požadovaným ASA intermediátem KLG, je bioreaktor opatřen uhlíkovým zdrojem, který je biokatalyticky konvertován přes nejméně jeden oxidační stupeň a přes nejméně jeden redukční stupeň na KLG. V závislosti na použité hostitelské buňce, může hostitelská buňka obsahovat mutaci(e) v genu (genech) kódujícím(ch) oxidační nebo redukční enzymatický účinek tak, že KLG není na další intermediáty dále konvertována. Jestliže oxidační stupeň a redukční stupeň vyžadují kofaktor, metoda poskytuje způsoby pro regeneraci kofaktoru.

V jednom provedení jsou hostitelské buňky rekombinantní a mají nejméně jednu heterologickou enzymatickou aktivitu. U jednoho provedení je enzymatické působení vázáno na membrány hostitelské buňky; v jiném provedení je enzymatický účinek v roztoku; u dalšího provedení je enzymatická aktivita rozpustná uvnitř buňky

a při jiném provedení je enzymatický účinek imobilizován. Proces může být uskutečněn postupováním po násadách nebo jako proces kontinuální. Hostitelské buňky jsou nejvhodněji čeledi Enterobacteriaceae a při jednom provedení je členem druh *Pantoea* a zvláště *Pantoea citrea*. *Pantoea citrea* se dá získat z ATCC a má na příklad ATCC přístupové číslo 39140.

Hostitelské buňky mohou být lyofilizovány, permeabilizovány nebo jinak zpracovány, aby snížila životaschopnost, nebo zmutovány, aby se eliminovalo využití glukosy pro růst buněk nebo metabolismus dokud je k dispozici enzymatická aktivita pro konversi uhlíkového zdroje na požadovaný intermediát. Intermediáty mohou být zpracovány dále na finální produkty jako erythorbát nebo ASA.

Podle toho, přináší předkládaný vynález z jednoho hlediska způsob pro produkci DKG nebo KDG z uhlíkového zdroje, obsahující zoxidování uhlíkového zdroje enzymaticky, nejméně jednou oxidační enzymatickou aktivitou, za vzniku DKG nebo KDG. Při jiném provedení obsahuje způsob zoxidování uhlíkového zdroje první oxidační enzymatickou aktivitou za vzniku prvního oxidačního produktu a zoxidování řečeného prvního oxidačního produktu druhou oxidační enzymatickou aktivitou za vzniku KDG. U jednoho provedení je první oxidační enzymatická aktivita GDH aktivitou a druhá oxidační enzymatická aktivita je GADH aktivitou. Hostitelské buňky mohou dále obsahovat mutaci přirozeně se vyskytující nukleové kyseliny kódující KDGDH aktivitu tak, že KDG není dále oxidována. KDG může být dále konvertována na erythorbát. Eventuelně může proces zahrnovat zoxidování KDG pomocí třetí oxidační enzymatické aktivity na DKG.

Pro produkci KLG, pokud je uhlíkovým zdrojem KDG nebo pokud je na KGD uhlíkový zdroj konvertován, obsahuje metoda stupně enzymatického zoxidování KDG na produkt oxidace nejméně jednou enzymatickou oxidační aktivitou a enzymatické zredukování řečeného produktu oxidace nejméně jednou enzymatickou redukční aktivitou na 2-KLG. Eventuelně, pokud je uhlíkovým zdrojem DKG nebo pokud je uhlíkový zdroj na DKG konvertován, je DKG konvertována na KLG redukčním enzymatickým působením.

Předkládaný vynález poskytuje způsob pro nefermentativní produkci 2-KLG z uhlíkového zdroje, kde řečený způsob zahrnuje v daném pořadí následující kroky, enzymatické zoxidování uhlíkového zdroje na produkt oxidace nejméně jednou enzymatickou oxidační aktivitou a enzymatické zredukování řečeného produktu oxidace nejméně jednou enzymatickou redukční aktivitou na 2-KLG. Při jednom

provedení vyžaduje řečená oxidační enzymová aktivita oxidovanou formu kofaktoru a řečená redukční enzymová aktivita redukovanou formu kofaktoru a řečená oxidovaná forma řečeného kofaktoru a řečená redukovaná forma řečeného kofaktoru jsou recyklovány mezi nejméně jedním oxidačním stupněm a nejméně jedním redukčním stupněm. V jednom provedení je oxidovanou formou enzymatického kofaktoru NADP⁺ a redukovanou formou řečeného enzymatického kofaktoru NADPH. V jiném provedení je oxidovanou formou řečeného enzymatického kofaktoru NAD⁺ a redukovanou formou NADH. Jiné kofaktory využitelné ve způsobu podle předkládaného vynálezu zahrnují ATP, ADP, FAD a FMN.

U jednoho zde uvedeného ilustrativního provedení zahrnuje způsob v daném pořadí následující stupně a stupně mohou během procesu probíhat současně a/nebo kontinuálně; enzymatické zoxidování uhlíkového zdroje první oxidační enzymatickou aktivitou na první oxidační produkt; enzymatické zoxidování prvního oxidačního produktu druhou oxidační enzymatickou aktivitou na druhý oxidační produkt; enzymatické zoxidování druhého oxidačního produktu třetí oxidační enzymatickou aktivitou na třetí oxidační produkt a enzymatická redukce třetího oxidačního produktu redukční enzymatickou aktivitou na 2-KLG. V jednom provedení nejméně jedna z řečené první, druhé a třetí oxidační enzymatické aktivity vyžaduje oxidovanou formu enzymatického kofaktoru a řečená redukční enzymatická aktivita vyžaduje redukovanou formu řečeného enzymatického kofaktoru a kde řečená oxidovaná forma řečeného kofaktoru a řečená redukovaná forma řečeného kofaktoru jsou recyklovány mezi nejméně jedním oxidačním stupněm a redukčním stupněm.

Při jednom provedení probíhá proces v prostředí obsahující organická rozpouštědla a v jiném probíhá proces v prostředí obsahujícím dlouhé polymery. Ještě v jiném provedení probíhá proces v prostředí obsahujícím sůl v rozsahu koncentrací soli.

Předkládaný vynález poskytuje také vektory a rekombinantní hostitelské buňky obsahující enzymatické aktivity, které se používají ve způsobech produkce intermediátů ASA. V jednom provedení obsahují hostitelské buňky heterologickou nukleovou kyselinu kódující GDH, získatelnou z druhů včetně *T. acidophilum*, *Cryptococcus uniguttalatus* a *Bacillus species* a/nebo DKG reduktázu získatelnou z *Corynebacterium* nebo *Erwinia*.

Podrobný popis preferovaných provedení

Definice

Následující zkratky, které se zde používají, se vztahují na glukosu (G); D-glukonát (GA); 2-keto-D-glukonát (2KDG); 2,5-diketo-D-glukonát (2,5DKG nebo DKG); kyselinu 2-keto-L-gulonovou (2KLG nebo KLG); kyselinu L-idonovou (ID); kyselinu askorbovou (ASA); dehydrogenázu glukosy (GDH); reduktázu 2,5-diketo-D-glukonátu (DKGR) a reduktázu 2-keto-D-glukonátu (KDGDH).

Zde používaný termín "nefermentativní" nebo "in vitro" se vztahuje na biokatalytický proces, který využívá enzymatickou aktivitu buněk. Buňky mohou být neživoucí nebo životaschopné a nevýrazně rostoucí. Buňky mohou být geneticky změněny, aby se u nich eliminovala spotřeba glukosy a/nebo kterýchkoliv produkovaných intermediátů. Proces in vitro v předkládaném vynálezu zahrnuje použití buněčných membrán, které obsahují enzymatickou aktivitu spojenou s biokatalytickým procesem, použití permeabilisovaných buněk nebo lyofylisovaných buněk obsahujících enzymatickou aktivitu spojenou s biokatalytickým procesem a použití hostitelských buněk nebo membrán či fragmentů hostitelských buněk v jakékoliv formě, která poskytuje potřebnou enzymatickou aktivitu pro biokatalytickou konversi uhlíkového zdroje na kterýkoliv z intermediátů ASA, včetně, ale neomezuje se jen na GA, KDG, DKG a KLG. Buňka může být rekombinantní buňkou, jež obsahuje heterologickou nukleovou kyselinu kódující žádanou enzymatickou aktivitu, nebo přirozeně se vyskytující buňkou, jež obsahuje žádanou enzymatickou aktivitu. Zde použitý termín "bioreaktor" se vztahuje na prostředí uvnitř něhož probíhá nefermentativní nebo in vitro proces.

Mnohé enzymy jsou aktivní pouze v přítomnosti kofaktoru, jako například NAD⁺ nebo NADP⁺. Termín kofaktor, jak je zde používán, se vztahuje na substrát druhotný co do povahy enzymatické reakce, avšak pro enzymatickou reakci životně zásadní. Jak je zde termín "kofaktor" používán zahrnuje, ale neomezuje se na NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH, ATP, ADP, FAD/FADH₂ a FMN/FMNH₂. Spojení "regenerace kofaktoru" nebo "recyklace kofaktoru" v systému in vitro se vztahuje na fenomén kontinuální oxidace a redukce požadovaného kofaktoru vlivem biokatalýzy tak, že požadovaný kofaktor je přítomen ve formě vhodné k tomu, aby došlo k enzymatické katalýze. V předkládaném vynálezu regeneraci kofaktoru obstarává prostředí, v němž redukovaná forma kofaktoru je dostupná pro redukující enzym a oxidační forma kofaktoru je k dispozici pro oxidující enzym. Předkládaný vynález

zahrnuje regeneraci kofaktoru mezi jakýmkoli enzymatickým oxidačním stupněm a jakýmkoli enzymatickým redukčním stupněm při biokatalytickém postupu od uhlíkového zdroje k intermediátu ASA, např. KLG. Požadovaný kofaktor může být přítomen v katalytických množstvích poskytovaných prostředím hostitelkých buněk, nebo může být poskytován exogenně ve stechiometrických množstvích, buď v oxidované nebo redukované formě, při zahájení procesu bioreaktoru.

Zde používaný termín uhlíkový zdroj zahrnuje vhodné uhlíkové zdroje obvykle využívané kmeny *Enterobacteriaceae*, jako šestiuhlíkové cukry zahrnující, ale neomezuující se na glukosu, gulosu, sorbosu, fruktosu, idosu, galaktosu a mannosu, všechny buď v D- nebo L-formě, nebo kombinaci šestiuhlíkových cukrů jako sacharosu, nebo šestiuhlíkové cukerné kyseliny včetně ale neomezuující se na kyselinu 2-keto-L-gulonovou, kyselinu idonovou, kyselinu glukonovou, 6-fosfoglukonát, kyselinu 2-keto-D-glukonovou, 5-keto-D-glukonovou, 2-ketoglukonátfosfát, kyselinu 2,5-diketo-L-gulonovou, 2,3-diketo-L-gulonovou, kyselinu dehydroaskorbovou, kyselinu erythroaskorbovou a kyselinu D-mannonovou nebo enzymatické deriváty takových, pokud je uhlíkový zdroj schopen konverze na intermediát ASA jako je na příklad KDG, DKG a KLG.

Jak je zde používána čeleď "*Enterobacteriaceae*" vztahuje se na bakteriální kmeny, jejichž obecnou charakteristikou je, že jsou gramnegativní, a že jsou schopné existovat za anaerobních podmínek. Preferovanými kmeny *Enterobacteriaceae* jsou ty, které produkují 2,5-diketo-D-gulonovou kyselinu z roztoků D-glukosy. V čeledi *Enterobacteriaceae* rody, které jsou schopné produkovat 2,5-diketo-D-gulonovou kyselinu z roztoků D-glukosy zahrnují na příklad rod *Erwinia*, *Enterobacter*, *Gluconobacter* a *Pantoea*. Intermediáty na mikrobiální cestě cukrů z uhlíkového zdroje k ASA zahrnují, ale neomezuují se na GA, 2KDG, 2,5DKG, 5DKG, 2KLG a IA. V předkládaném vynálezu preferovaným *Enterobacteriaceae* fermentačním kmenem je druh *Pantoea* a zejména *Pantoea citrea*. Jsou možné čtyři stereoisomery askorbové kyseliny: kyselina L-askorbová, kyselina D-araboaskorbová (kyselina erythrobová), která vykazuje C- vitaminovou aktivitu, kyselina L-araboaskorbová a kyselina D-xyloaskorbová. Zde používaný termín intermediát ASA zahrnuje jakýkoliv produkt na cestě k ASA včetně KDG, DKG a KLG, ale není to na ně omezeno.

Zde používaný termín "rekombinantní" se vztahuje na hostitelskou buňku, která obsahuje nukleovou kyselinu, která se v organismu nevyskytuje přirozeně a/nebo na hostitelskou buňku, která má další kopie endogenní nukleové kyseliny

zavedené rekombinantně. Termín "heterologický", jak se zde používá, se vztahuje na sekvence nukleové kyseliny nebo aminokyselin, které se v hostitelské buňce nevyskytují přirozeně. Jak je zde používán termín "endogenní", týká se nukleové kyseliny přirozeně se vyskytující v hostiteli.

Zde používaný termín "nukleová kyselina" se vztahuje na nukleotidovou nebo polynukleotidovou sekvenci a její fragmenty nebo části a na DNA nebo RNA genomického nebo syntetického původu, které mohou být dvouvláknové nebo jednovláknové, jestliže představují antikódující nebo kódující řetězec. Termín "aminokyselina", jak se zde používá, se vztahuje na peptidové nebo proteinové sekvence nebo jejich části.

Zde používaný termín "mutace" se vztahuje na každou změnu v nukleové kyselině tak, že produkt této nukleové kyseliny je inaktivován nebo eliminován. Příklady mutací zahrnují, ale neomezuji se jen na bodové mutace, posunové mutace a delece části nebo všech z genů kódujících enzymatickou aktivitu, jako oxidační enzymatickou aktivitu nebo redukční aktivitu. Při jednom zde uváděném provedení pro produkci KLG, pomocí něhož je regenerován kofaktor, nukleová kyselina kódující membránou vázanou GDH je takto mutována inaktivující endogenní GDH aktivita. V jiném provedení je inaktivována aktivita dehydrogenázy 2-keto-D-glukonátu poskytující takto optimalizovanou produkci intermediátu KDG.

Zde používaná fráze "oxidační enzym" se vztahuje na enzym nebo enzymový systém, který může katalyzovat konversi substrátu s daným oxidačním stavem na produkt s vyšším oxidačním stavem než má substrát. Fráze "redukční enzym" se vztahuje na enzym nebo enzymový systém, který může katalyzovat konversi substrátu s daným oxidačním stavem na produkt s nižším oxidačním stavem než má substrát. Oxidační enzymy spojené s biokatalýzou D-glukosy na KLG zahrnují mezi jinými dehydrogenázu D-glukosy, dehydrogenázu D-glukonátu a dehydrogenázu 2-keto-D-glukonátu. Redukční enzymy spojené s biokatalýzou postupných intermediátů ASA na KLG zahrnují mezi jinými reduktázu 2,5-diketo-D-glukonátu (DKGR), 2-ketoreduktázu (2-KR) a 5-ketoreduktázu (5-KR). Takové enzymy zahrnují ty, které jsou přirozeně produkovány hostitelskou kvasinkou nebo ty, které jsou zavedeny pomocí rekombinantních způsobů. Při jednom zde uvedeném provedení probíhá proces v hostitelské buňce *Pantoea citrea* mající eliminovanou přirozeně se vyskytující GDH aktivitu, membránou vázanou, na NADP+ nezávislou, a rekombinantně zaveden na GDH závislejší cytosolický NADP+. Při jiném provedení je do hostitelské

buňky zavedena heterologická nukleová kyselina kódující aktivitu reduktázy. U preferovaného provedení se aktivita reduktázy dá získat ze species *Coryneform* a *Erwinia* species. Zde používaný termín "cesta enzymu" se vztahuje na jakýkoliv enzym zúčastněný na biokatalytické konversi uhlíkového zdroje na intermediát ASA např. KDG, DKG a KLG.

Termín "isolovaný" nebo "vyčištěný" jak je zde používán, se vztahuje na nukleovou kyselinu nebo protein anebo peptid či kofaktor, který je vyjmut nejméně z jedné komponenty, ke které je přirozeně přidružen. V předkládaném vynálezu může izolovaná nukleová kyselina zahrnovat vektor obsahující nukleovou kyselinu.

V praxi je dobře známo, že deriváty kyselin sacharidů mohou existovat v různých ionizačních stavech v závislosti na mediu, které je obklopuje, zda jsou v roztoku nebo mimo roztok, z něhož jsou preparovány, pokud jsou v tuhé formě. Použitím termínu, jako na příklad idonová kyselina, pro označení takových molekul se rozumí, že zahrnuje všechny ionizační stavy organické molekuly, o níž se referuje. Tak na příklad "idonová kyselina", její cyklizovaná forma "idonolakton" a "idonát", se týká stejného organického podílu a není zamýšleno, aby specifikovaly jednotlivé ionizační stavy nebo chemické formy.

Podrobný popis

Předkládaný vynález se týká biokatalytické produkce intermediátů ASA, např. KDG, DKG a KLG, z uhlíkového zdroje v prostředí *in vitro* nebo prostředí nefermentativním. V závislosti na intermediátu, který má být produkován, může proces vyžadovat přítomnost enzymatického kofaktoru. Ve zde popisovaném preferovaném provedení je enzymatický kofaktor regenerován. Kvůli nákladům na kofaktor je vysoce výhodné použít jej při procesu *in vitro*, který dovoluje regeneraci katalytických množství kofaktoru obstaranou prostředím hostitelské buňky nebo provedenou exogeně.

Nefermentativní produkce intermediátů ASA

Předkládaný vynález poskytuje způsoby pro produkci intermediátů ASA. Takové intermediáty mohou být zpracovány na ASA, stereoisomery ASA nebo jiné produkty jako erythorbát. V jednom provedení je požadovaným produkovaným ASA intermediátem KDG a bioreaktor je opatřen živoucími nebo neživotnými hostitelskými buňkami *Pantoea citrea* majícími zmutovaný gen kódující aktivitu dehydrogenázy 2-

keto-D-glukonátu, jak je zde popsáno v příkladě II. V tomto provedení je uhlíkový zdroj biokatalyticky konvertován ve dvou oxidačních stupních na KDG, viz Obrázek 2. Při tomto provedení není regenerace kofaktoru zapotřebí.

Jestliže je žadáným ASA intermediátem DKG, je bioreaktor je opatřen živoucími nebo neživotnými hostitelskými buňkami *Pantoea citrea* a uhlíkový zdroj je biokatalyticky konvertován ve třech oxidačních stupních na DKG, viz Obrázek 2. Při tomto provedení není regenerace kofaktoru zapotřebí.

Jestliže je žadáným ASA intermediátem KLG, je bioreaktor je opatřen živoucími nebo neživotnými hostitelskými buňkami *Pantoea citrea* a uhlíkovým zdrojem, jako je glukosa, která je biokatalyticky konvertována ve třech oxidačních stupních a jedním redukčním stupněm na KLG, jak je ukázáno na Obrázku 2. V tomto provedení může být aktivita reduktázy kódována nukleovou kyselinou obsaženou uvnitř hostitelských buněk *Pantoea citrea* nebo dodanou exogenně. Při tomto provedení vyžaduje první oxidační enzymatická aktivita oxidovanou formu kofaktoru a redukční enzymatická aktivita vyžaduje redukovanou formu kofaktoru. Ve zde uvedeném preferovaném provedení je buňka *Pantoea citrea* modifikována, aby eliminovala přirozeně se vyskytující GDH aktivitu a do buňky *Pantoea* je zavedena heterologická GDH, kterou lze získat z *T. acidophilum*, *Cryptococcus uniguttalatus* nebo *Bacillus species* a mající specifitu pro NADPH+, aby poskytla kofaktor recyklující systém, který vyžaduje a regeneruje jeden kofaktor. Toto provedení poskytuje způsob pro regeneraci kofaktoru eliminující takto náklady na kontinuální přidávání exogenního kofaktoru do bioreaktoru pro produkci KLG v *Pantoea* buňkách. V tomto provedení hostitelská buňka obsahuje dále nukleovou kyselinu kódující aktivitu 2,5-DKG reduktázy nebo je do bioreaktoru exogenně dodávána 2,5-DKG reduktáza.

V jiném provedení získávání KLG je bioreaktor opatřen buňkami *Pantoea citrea* obsahující nukleovou kyselinu kódující membránou vázanou GDH příslušné enzymy a kofaktor a přidá se glukonová kyselina, která je konvertována na DKG. Za anaerobních podmínek se potom k reakční směsi přidá glukosa. GDH konvertuje glukosu na GA a reduktáza konvertuje DKG na KLG, zatímco kofaktor je recyklován. Když jsou tyto reakce dokončeny, přidá se kyslík, aby konvertovat GA na DKG a cykly pokračují.

Biokatalytické prostředí in vitro

Biokatalytický proces konvertování uhlíkového zdroje na ASA intermediát začíná s vhodným uhlíkovým zdrojem využívaným kmeny *Enterobacteriaceae*, jako s šestiuhlíkovým cukrem, zahrnujícím na příklad glukosu nebo šestiuhlíkovou cukernou kyselinou, jako na příklad KGD. Jiné zdroje metabolitů představují, ale nejsou omezeny jen na galaktosu, laktosu, fruktosu nebo enzymatické deriváty z nich. Vedle příslušného uhlíkového zdroje musí media obsahovat vhodné minerály, soli, kofaktory, pufrы a jiné komponenty, které jsou v oboru zkušeným známy pro udržování kultur a podporování enzymatických pochodů nezbytných pro produkci žádaných finálních produktů. Prefrovanými solemi do bioreaktoru jsou Na^+ , K^+ , NH_4^+ , SO_4^- a acetát. Buňky jsou nejprve pěstovány a u nefermentativního procesu je uhlíkový zdroj pro růst eliminován, pH je udržováno při tom mezi kolem pH 4 a kolem pH 9 a je přítomen kyslík.

Uhlíkový zdroj a metabolity z něj procházejí při biokatalytickém procesu in vitro enzymatickými oxidačními stupni nebo enzymatickými oxidačními stupni a enzymatickými redukčními stupni, které se mohou odehrávat mimo intracelulární prostředí hostitelské buňky, a které využívají enzymatickou aktivitu s hostitelskou buňkou spojenou a probíhají cestou vedoucí k žádanému intermediátu ASA. Enzymatické stupně mohou v bioreaktoru probíhat postupně nebo současně a některé, aby produkovaly žádaný intermediát ASA, vyžadují kofaktor. Předkládaný vynález zahrnuje in vitro proces, při němž jsou hostitelské buňky ošetřeny organickou substancí, tak, že buňky jsou neživotné, nicméně enzymy zůstávají při biokatalýze uhlíkového zdroje na intermediáty ASA využitelné pro oxidaci a redukci žádaného uhlíkového zdroje a/nebo metabolitů z něj, jak je popsáno v příkladu V. Předkládaný vynález zahrnuje také in vitro proces, při němž jsou hostitelské buňky lyofilisovány, permeabilisovány jakýmikoli způsoby, sušeny sprejováním, rozrušeny nebo jinak ošetřeny tak, aby enzymy byly využitelné ke konversi uhlíkového zdroje na intermediát ASA.

Oxidační nebo redukční enzymatické aktivity mohou být vázány na membránu hostitelské buňky, imobilisovány, jako na pryskyřici, na příklad AminoLink spojovací gel (od Pierce Chemical Co.), na polymer, nebo rozpustné v prostředí bioreaktoru. Při preferovaném provedení je na membránu vázán nejméně jeden oxidační enzym. Prostředí se může uskutečňovat v organickém nebo vodném systému nebo při kombinaci obou a postup může probíhat v jedné nebo více

nádobách. Při jednom provedení se proces uskutečňuje ve dvou nádobách, jedné, kde se využívá kyslík a jedné, která je anaerobní. Na příklad na membránu vázané enzymy, které potřebují kyslík (GDH, GADH, KDGDH), mohou být izolovány od oněch enzymů co kyslík nepotřebují (kofaktor závislá GDH, kofaktor závislá DKGR), což umožňuje použití nádob s menším objemem, které kyslík potřebují, a tím snížení nákladů. Bioreaktor může být provozován po násadách nebo kontinuálním postupem. Při systému s násadami, bez ohledu na to co se přidává, je v témž čase sklizena veškerá fermentační směs. Při kontinuálním systému je směs pravidelně odtahována proudovým postupem a čerstvý substrát se naproti tomu přidává. Produkované intermediáty mohou být získány z fermentační směsi různými způsoby, včetně pryskyřic iontoměničů, absorpčních nebo ionty zadržujících pryskyřic, aktivního uhlí, zakoncentrování ke krystalisaci, pasáže membránou atd.

Bioreaktorový proces může zahrnovat také více než jeden typ buněk, např. jedna buňka může mít oxidační aktivity a druhá buňka může obsahovat redukční aktivity. V jiném provedení se hostitelská buňka permeabilizuje nebo lyofilisuje [Izumi a spol., *J. Ferment. Technol.*, **61** (1983) 135-142] tak dlouho dokud jsou k dispozici enzymatické aktivity pro konversi uhlíkového zdroje nebo jeho derivátů. Bioreaktor může probíhat s některými enzymatickými aktivitami, které jsou poskytovány exogenně a v prostředí, v němž jsou obsažena rozpouštědla nebo dlouhé polymery, které stabilizují nebo zvyšují enzymatické aktivity. V jednom zde popisovaném provedení je ke zvýšení aktivity reduktázy použit methanol nebo ethanol. V jiném provedení je ke stabilizaci reduktázy použit Gafquat (viz Gibson a spol., US patent 5 240 843).

V jednom, zde popisovaném ilustrativním bioreaktoru, je hostitelskou buňkou permeabilisovaná buňka *Pantoea citrea* obsahující glukosu jako uhlíkový zdroj, který podléhá enzymatickými konversemi seriím oxidačních kroků. Oxidační enzymy zahrnují GDH, GADH a DGDH a redukční stupeň, který zahrnuje 2 DKGR (viz U.S. patent 3 790 444), dávají výtěžek KLG. KLG připravená postupem podle předkládaného vynálezu může být konvertována dále na kyselinu askorbovou a KDG na erythorbát prostředky, které jsou zkušným v oboru známy, viz na příklad Reichstein a Grussner, *Helv. Chim. Acta* **17**, 311-328 (1934).

Regenerace kofaktoru

Jedna z výhod postupu podle předkládaného vynálezu leží v regeneraci kofaktoru, která je pro enzymatický postup potřebná. Příklady kofaktorů, které mohou být použity v běžném postupu představují, ale nejsou omezeny na NAD^+/NADH ; $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$; ATP ; ADP , FAD/FADH a FMN/FMNH^2 .

V jednom provedení vynálezu je uhlíkový zdroj konvertován na KLG postupem, který obsahuje regeneraci kofaktoru, jak je ukázáno na Obrázku 1. Při tomto enzymatickém procesu regenerace kofaktoru je katalytickým působením GDH jeden ekvivalent D-glukosy oxidován na jeden ekvivalent D-glukonátu a jeden ekvivalent NADP^+ je redukován na jeden ekvivalent NADPH . Jeden ekvivalent D-glukonátu produkovaný účinkem GDH je potom oxidován na jeden ekvivalent 2-KDG a potom na jeden ekvivalent 2,5-DKG působením membránou vázaných dehydrogenáz GADH, respektive KDGDH. Jeden ekvivalent vytvořeného 2,5-DKG je pak redukován na jeden ekvivalent 2-KLG a NADPH je oxidován zpět na jeden ekvivalent NADP^+ působením 2,5-DKG reduktázy, účinně recyklující ekvivalentní kofaktor, aby byl k dispozici pro oxidaci druhého ekvivalentu D-glukosy. Ostatní metody regenerace kofaktoru mohou zahrnovat chemické, fotochemické a elektrochemické prostředky, kdy ekvivalent oxidovaného NADP^+ je přímo redukován na ekvivalent NADPH buď chemickými, fotochemickými nebo elektrochemickými prostředky. Množství kofaktoru přidaného exogenně do bioreaktoru je mezi asi $1 \mu\text{M}$ do asi 5mM a u preferovaného provedení mezi asi $5 \mu\text{M}$ do asi 1mM . Jak je zde v příkladech ukázáno, NaCl ovlivňuje K_m pro NADPH , zatímco KLG, species s nábojem, K_m neovlivňuje. Proto je-li v bioreaktoru přítomen NaCl , bude pro udržení optimální rychlosti zapotřebí více NADPH . Jak je v příkladech uvedeno dále, většina testovaných solí má účinek na tepelnou stabilitu reduktázy. Jak ocení zkušební odborníci, v závislosti na podmínkách bioreaktoru jako je teplota, mohou být pro získání rovnováhy mezi tepelnou stabilitou a přijatelnými rychlostmi, upravovány hladiny solí. Kofaktor dodávaný exogenně do systému *in vitro*, může být přidáván sám nebo v kombinaci s jinými substancemi spojenými s biokatalytickou konversí uhlíkového zdroje na intermediát ASA. Přítomný proces zahrnuje užití kofaktoru imobilisovaného na nosiči, chemicky změněný kofaktor, jako je připojení k dlouhému polymeru a použití kofaktoru v izolované nebo rafinované formě.

Žádaný kofaktor může být také rafinován z biokatalytického prostředí pomocí nanofiltrace a použit znovu. Metody pro užívání nanofiltračních membrán na

zachycení kofaktoru popisuje na příklad Seelbach a spol. (1997, *Enzyme and Microbial Technology*, sv. 20, str. 389-392).

Rekombinační metody

Hostitelské buňky

Jakékoli oxidační nebo redukční enzymy, nutné pro řízení cesty sacharidu hostitelské buňky na ASA intermediát, jako na příklad KDG, DKG nebo KLG, mohou být zavedeny pomocí pro zkušené odborníky běžných technik rekombinantní DNA, pokud se takové enzymy v hostitelské buňce přirozeně nevyskytují. Eventuelně enzymy, které by mohly bránit požadované cestě, mohou být metodami rekombinantní DNA zmutovány. Předkládaný vynález obsahuje rekombinantní introdukci nebo mutaci kteréhokoliv enzymu nebo intermediátu nezbytného pro dosažení požadované cesty.

V jednom provedení předkládaného vynálezu je uhlíkový zdroj, jako glukosa, konvertován na KLG přes čtené oxidační stupně a redukční stupeň. Při tomto provedení první oxidační stupeň a redukční stupeň vyžaduje kofaktor. Hostitelskou buňkou je *Pantoea citrea*, přirozeně se vyskytující nukleová kyselina kódující dehydrogenázu glukosy (GDH) je zmutována tak, že je eliminována aktivita dehydrogenázy a do buňky je zavedena heterologická GDH. Předkládaný vynález zahrnuje hostitelskou buňku mající další mutaci enzymů v cestě koloběhu uhlíku, která ovlivňuje produkci. Pro obecné techniky viz na příklad techniky popsané v Maniatis a spol., 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. a Ausubel a spol., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing "Associates and Wiley Interscience", N.Y.

V jednom provedení předkládaného vynálezu je do *Pantoea* fermentačního kmene rekombinantně zavedena nukleová kyselina kódující DKG reduktázu (DKGR). Byla nalezena řada druhů obsahujících DKGR, zvláště členové skupiny *Coryneform*, včetně rodů *Corynebacterium*, *Brevibacterium* a *Arthrobacter*. V jednom provedení předkládaného vynálezu je do *Pantoea citrea* rekombinantně zavedena 2,5-DKGR získatelná z *Corynebacterium* sp. kmen SHS752001 (Grindley a spol., 1988, *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1770-1775). V jiném provedení je do *Pantoea citrea* rekombinantně zavedena 2,5-DKG reduktáza získatelná z *Erwinia herbicola* popsaná v U. S. patentu č. 5,008,193 pro Andersona a spol.

Zdroje pro nukleovou kyselinu kódující oxidativní nebo redukční enzymy zahrnují následující:

ENZYMCITACE

dehydrogenáza glukosy

Smith a spol. Biochem. J., 261:973
Neijssel a spol. 1989,
Antonie Van Leeuwenhoek 56(1)
51-61

dehydrogenáza kyseliny glukonové

Matsushita a spol., 1979 J.
Biochem. 85:1173; Kulbe a spol.
1987, Ann. N.Y. Acad. Sci.
506:552

dehydrogenáza kyseliny 2-keto-D-glukonové

Stroshane 1997 Biotechnol.
BioEng 19(4) 459

reduktáza 2-ketoglukonátu

J. Gen. Microbiol. 1991, 137: 1479

reduktáza 2,5-diketo-D-glukonové kyseliny

U.S. patenty č. 5 795 761;
5 376 544, 5 583 025; 4 757 012;
4 758 514; 5 008 193; 5 004 690;
5 032 514**Vektorové sekvence**

Expresivní vektory používané pro expresi enzymů při přeměnách u představeného procesu v hostitelských organismech, např. dehydrogenáza nebo reduktáza, obsahují nejméně jeden promotor asociovaný k enzymu, kterýžto promotor je funkční v hostitelské buňce. V jednom provedení předkládaného vynálezu je promotor promotorem standardního typu pro vybraný enzym a v jiném provedení předkládaného vynálezu je promotor pro enzym heterologický, ale stále funkční v hostitelské buňce. Při jednom provedení předkládaného vynálezu je nukleová kyselina kódující enzym stabilně integrována do genomu mikroorganismu.

V preferovaném provedení obsahuje expresivní vektor kazetu klonující čtřná místa, která nejvhodněji obsahuje nejméně jedno místo restriční endonukleázy unikátní pro vektor, aby se napomohlo snadné manipulaci s nukleovou kyselinou. V preferovaném provedení obsahuje vektor také jeden nebo více zvolitelných značkovačů. Zde používaný termín zvolitelný značkovač se vztahuje na gen schopný

exprese v hostitelském mikroorganismu, který umožní snadnou selekci těchto, vektor obsahujících hostitelů. Příklady takových zvolitelných značkovačů zahrnují, ale neomezuji se na antibiotika jako erythromycin, aktinomycin, chloramfenikol a tetracyklin.

Preferovaným plasmidem pro rekombinantní introdukci přirozeně se nevyskytujících enzymů nebo intermediátů do kmene *Enterobacteriaceae* je RSF 1010, mobilizovatelný, ne však samopřenosný plasmid, který má schopnost replikovat v širokém rozsahu bakteriálních hostitelů, včetně gramnegativních a gram pozitivních bakterií. [Frey a spol., 1989, *The Molecular Biology of IncQ Plasmids* v Thomas (vyd.) *Promiscuous Plasmids of Gram Negative Bacteria*, Academic Press, London, str. 79-94]. Frey a spol. (1992, *Gene* 113:101-106) popisují tři oblasti, o nichž zjistili, že ovlivňují mobilizační vlastnosti RSF 1010.

Transformace

Obecné transformační procedury jsou vykládány v *Current Protocols in Molecular Biology* (sv. 1, vydal Ausubel a spol. John Wiley & Sons, Inc. 1987, kapitola 9) a představují kalcium fostátové metody, transformace za použití DEAE-dextranu a elektroporaci. Pro odborníky v oboru zkušené, jsou běžné různé transformační procedury pro introdukci nukleové kyseliny kódující enzymatický pochod v dané hostitelské buňce. Předkládaný proces zahrnuje pochody enzymů produkovaných a rafinovaných z rekombinantních hostitelských buněk a exogenně dodaných do prostředí *in vitro*, právě tak jako procesy, v nichž cesta enzymu, pro hostitelskou buňku buď heterologického nebo endogenního, je vyjádřena aktivně rostoucí hostitelskou buňkou nebo je přítomna v membráně neživotné hostitelské buňky. Řada hostitelských buněk může být použita pro rekombinantní uskutečnění pochodů enzymů, které jsou dodávány exogenně, počítaje v to buňky bakterií, hub, savců, hmyzu a rostlin. Postupy pro transformaci rostlin jsou popsány Rodriguez-em (WO 95/14099, vydán 26. května 1995).

U preferovaného provedení procesu patří hostitelská buňka do *Enterobacteriaceae*. Do skupiny *Enterobacteriaceae* jsou zahrnuty species *Erwinia*, *Enterobacter*, *Glukonobacter* a *Pantoea*. U předkládaného vynálezu preferovaným fermentačním kmenem je druh *Pantoea* a zejména *Pantoea citrea*. U jiného preferovaného provedení je hostitelskou buňkou *Pantoea citrea* obsahující procedurální enzymy schopné konvertovat uhlíkový zdroj na KLG. Předkládaný

vynález zahrnuje cesty od uhlíkového zdroje na KLG přes jakýkoliv intermediát při mikrobiálním pochodu, který dokáže využívat uhlíkový zdroj k produkování KLG, procházejícím přes intermediáty představující, avšak neomezující se na GA, 2KDG, 2,5DKG, 5DKG a IA. Při jednom provedení se nukleová kyselina kódující enzym přeměny zavádí prostřednictvím plasmidového vektoru a při jiném provedení je nukleová kyselina kódující enzym přeměny stabilně integrována v genomu hostitelské buňky.

Identifikace transformantů

Zda byla hostitelská buňka transformována, může být detegováno přítomností/nepřítomností exprese značkovacího genu, který může naznačit, zda je přítomna nukleová kyselina, o kterou jde. Avšak jeho exprese musí být potvrzena. Jestliže se na příklad nukleová kyselina kódující enzym přeměny vloží do sekvence značkovacího genu, rekombinantní buňky obsahující vložku mohou být identifikovány nepřítomností funkce značkovacího genu. Nebo může být značkovací gen umístěn jako druhý po nukleové kyselině kódující enzym přeměny za kontroly jediného promotoru. Exprese značkovacího genu v odezvě na dosazení nebo vybrání obvykle rovněž indikuje expresi enzymu.

Jinak hostitelské buňky, které obsahují kódující sekvenci pro enzym přeměny a enzym exprimují, mohou být identifikovány řadou metod, běžných pro ty, kdo mají v oboru zkušenosti. Tyto metody představují, ale neomezují se na DNA-DNA nebo DNA-RNA hybridizaci a techniky proteinového bioeseje nebo techniky imunoeseje, které, pro detekci a kvantifikaci nukleové kyseliny nebo proteinu zahrnují techniky založené na membráně, na roztoku nebo na čípech.

Vedle toho může být přítomnost sekvence polynukleotidu enzymu v hostitelském mikroorganismu detegována DNA-DNA nebo DNA-RNA hybridizací, nebo zmožením za použití vzorků, částí nebo fragmentů sekvence polynukleotidu enzymu.

Podmínky eseje

Metody detekce intermediátů ASA, ASA a stereoisomerů ASA představuje použití redox titrace s 2,6-dichlorindofenolem (Burton a spol., 1979, J. Assoc. Pub. Analysts 17:105) nebo jinými vhodnými činidly; vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HLPC) na iontoměničích (J. Chrom. 1980, 196:163); a elektro-redox

postupy (Pachia, 1976, Anal. Chem. 48:364). Zkušeni odborníci budou dobře obeznáni s kontrolními metodami, které lze aplikovat při využívání těchto detekčních metod.

Získávání intermediátů

Jakmile vznikl, může být intermediát získán a/nebo rafinován jakýmkoliv způsobem, který je pro odborníky běžný, včetně lyofilizace, krystalizace, sušení ve spreji a elektrodialýzy atd. Elektrodializační metody pro rafinaci ASA a intermediátů ASA jako KLG jsou popsány na příklad v U. S. patentu č. 5747306 vydaném 5. května 1998 a v U. S. patentu č. 4767870 vydaném 30. srpna 1998. Nebo mohou být intermediáty také formulovány přímo z bioreaktoru a granulovány nebo nasazeny do kapalné formulace.

Způsob a metoda provedení předloženého vynálezu může být zkušenými odborníky lépe pochopena s odkazem na následující příklady provedení, při čemž tyto příklady nejsou myšleny tak, že by nějakým způsobem omezovaly rozsah předkládaného vynálezu anebo patentových nároků na to zaměřených. Všechny odkazy a patentové publikace, kterých se to týká, jsou tu citovány.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 je schematické zobrazení procesu in vitro, při němž jsou mezi oxidačním a redukčním stupněm recyklovány NADP⁺ a NADPH.

Obrázek 2 je schematické zobrazení cesty k intermediátům ASA. Stupně označené A jsou enzymatické; stupně označené B jsou konversemi buď enzymatickými nebo chemickými. V tomto zobrazení enzym, který konvertuje glukosu (Glc) na GA má GDH aktivitu; oxidační enzym, který konvertuje GA na KDG má GADH aktivitu; oxidační enzym, který konvertuje KDG na DKG má KDGDH aktivitu a redukční enzym, který konvertuje DKG na KLG má DKGR aktivitu.

Obrázek 3 ilustruje aktivitu reduktázy v přítomnosti 0-40 % methanolu při pH 7 a 30°C.

Obrázek 4 ilustruje aktivitu reduktázy v přítomnosti 0-50 % ethanolu při pH 7,22 a 30°C.

Obrázek 5 ilustruje aktivitu reduktázy při pH 7 v přítomnosti NaCl, KCl, CaCl₂, K₂SO₄ nebo fosforečnanu draselného (KPi). Počáteční rychlosti byly měřeny po 1 min.

Obrázek 6 ilustruje aktivitu reduktázy zbývající po inkubaci při pH a 45°C 7 v přítomnosti a nepřítomnosti až do 500 mM 2-KLG.

Obrázek 7 ukazuje spektrofotometrické měření NADPH při recyklační reakci kofaktoru in vitro. Absorbance byla měřena při 340 nm. Počáteční odečtení absorbance bylo 0,7 před přidáním enzymu. Další alikvoty GDH byly přidávány přibližně ve 12 a 23 minutě.

Obrázek 8 ukazuje spektrofotometrické měření NADPH při recyklační reakci kofaktoru in vitro. Absorbance byla měřena při 340 nm. Dostatečné množství NaCl bylo přidáno přibližně v 5 minutách, aby se dosáhlo finální koncentrace na 0,5 M.

Obrázek 9 ukazuje K_m reduktázy a relativní V_{max} pro 2,5-DKG v přítomnosti vzrůstajícího množství 2-KLG.

Příklady provedení vynálezu

Příklad I

Tento příklad popisuje způsob produkce hostitelské buňky *Pantoea citrea* mající zmutovanou přirozeně se vyskytující GDH.

Klonování genu dehydrogenázy glukosy (GDH) z *Pantoea citrea*:

Gen dehydrogenázy glukosy byl klonován řetězovou reakcí polymerázy (PCR). Při PCR byly použity dva primery: 5'AGGGAGTGCTTACTACCTTATCTGCGGTATA3' a 5'CGCCTAGCTGTGCAATCCATTGATTTTGCACA3'. Po PCR byl DNA produkt kolem 2 kb klonován ve vektoru pGEM-T (Promega) a byla identifikována rekombinantní *E. coli* se správnou DNA vložkou a klon byl označen jako pRL. DNA vložka byla analyzována DNA sekvencováním a její sekvence byly shledána z 60-70 % identická s publikovanými sekvencemi GDH kmene *Pantoea citrea*.

Generování deletovaného GDH genu insercí resistenčního genu chloramfenikolu:

Aby se v *Pantoea citrea* generoval deletovaný gen GDH, byla nejprve generována rekombinantní kopie genu, který měl být deletován, zavedením volitelného značkovače, resistenčního genu chloramfenikolu (CAT). In vitro generovaná kopie byla zavedena do *Pantoea citrea* a nechána, aby prostřednictvím homologické rekombinace rekombinovala se standardní kopií. pRL DNA byla potom analyzována digescí s různými restričními enzymy. Byly zjištěny dvě polohy SmaI štěpení umístěné kolem 700 bp odděleně v DNA kódující GDH. pRL byl digerován se SmaI, aby se odstranil 700 bp fragment, který byl potom nahrazen se SmaI digerovanou 1,05 kb DNA obsahující resistenční gen chloramfenikolu, aby byl generován rekombinantní plasmid, označený jako pRLcm4. Metoda použitá ke generaci pRLcm4 byly standardní techniky, které v oboru zkušeně aplikují. GDH-CAT kódující sekvence z pRLcm4 byla transferována dále do plasmidu pgGP704. DNA kódující GDH-CAT kazeta byla z pRLcm4 odstraněna kombinovanou digescí a restričními enzymy AatII a SpeI. Kohesivní konce digerované DNA byly odstraněny působením T4 DNA polymerázy v přítomnosti směsi trifosfátu deoxynukleotidu. GDH-CAT kazeta byla potom svázána s EcoRV digerovaným pGP704. Rekombinantní plasmid pGP704 obsahující GDH-CAT kazetu byl identifikován a označen jako p704RLcm.

Zavedení deletovaného GDH genu do chromosomu *Pantoea citrea*:

Plasmid p704RLcm byl zaveden do standardní *Pantoea citrea* elektroporací. Transformovaná buňka byla nejprve nanášena na agarové desky obsahující 12,5 µg/ml chloramfenikolu a byly sledovány resistantní kolonie. K rozlišování skutečně deletovaného mutantu (který by měl zobrazovat na chloramfenikol resistantní fenotyp) od buněk, které v sobě jednoduše chovají plasmid p704RLcm, byly resistantní kolonie zkoumány proti ampicilinu, jinému resistenci značujícímu antibiotickému nosiči u p704RLcm. Byly identifikovány klony citlivé na ampicilin. Příslušné klony, které měly správný fenotyp (resistentní na chloramfenikol a citlivé na ampicilin) byly charakterisovány biochemickými esejí a všechny prokázaly GDH negativní fenotyp. Analýza skvrn DNA rovněž potvrdila, že standardní GDH gen byl nahrazen deletovanou kopií.

Příklad II

Příklad II popisuje způsob produkce hostitelské buňky mající mutaci v přirozeně se vyskytující dehydrogenáze 2-keto-D-glukonátu (E3).

Dehydrogenáza 2-keto-D-glukonátu (EC1.1.99.4) z *Glucanobacter melanogenus* se rafinuje podle postupu McIntire-ho a spol. [McIntire W., Singer T.P., Ameyama M., Adachi O., Matsushita K. a Shinagawa E. : Biochem. J. (1985) **231**, 651-654] a odkazů tam uvedených. Rafinovaný protein se digeruje s trypsinem a chymotrypsinem nebo jinými proteázami, aby se připravily fragmenty, které se rozdělí HPLC nebo jinými technikami. Individuální peptidy se shromáždí a sekvencují. Ze sekvence se syntetizují sondy DNA, které budou zesilovat odpovídající sekvenci v hostitelském organismu nebo genomu příbuzného organismu. Pomocí standardních PCR technik jsou větší fragmenty žádaného genu zmoženy, rafinovány a sekvencovány. Tyto fragmenty jsou použity pro hybridizování ke genu a umožňují klonování a sekvencování celého genu. Jakmile je sekvence poznána, je deletován gen jak se popisuje pro dehydrogenázu D-glukonátu (GDH) v příkladu I.

Jiné způsoby pro redukci nebo eliminaci dehydrogenázy 2-keto-D-glukonátu zahrnují inhibitory [organické kyseliny jako citrát a sukcinát jsou uváděny, že inhibují dehydrogenázu 2-keto-D-glukonátu; Shinagawa E. a Ameyama M. : Methods in Enzymology (1982) **89**, 194-198] a změny pH a teploty.

Enzym může být analyzován na aktivitu nebo ztrátu aktivity pomocí esejů, které popsal Shinagawa a Ameyama.

Příklad III

Příklad III ilustruje metodu produkce KLG v bioreaktoru, kde je regenerován kofaktor.

Materiály a metody

Permeabilisace buňky

400 ml buněk *P. citrea* majících mutaci v přirozeně se vyskytující, membránou vázané GDH, bylo pěstováno do 80 OD (600 nm) v 10 g/l glukonátu a smíseno s 16 ml směsí 10 % toluenu a 90 % acetonu na 3 minuty při 22°C. Permeabilisované buňky byly pak 10 minut centrifugovány při 9000 ot/min a vzniklý sbalek buněk byl

promyt 400 ml 50 mM Tris, pH 7. Promývání bylo opakováno ještě dvakrát, aby se zajistilo odstranění residuálního organického rozpouštědla.

Plnění reaktoru

400 ml permeabilisovaných buněk v 50 mM Tris, pH 7, uvedených shora, bylo umístěno do jednolitrové baňky opatřené míchadlem, kontrolou teploty, trubicí přivádějící kyslík, základní přívodní trubicí, vstupem pro vzorek a sondami pro kyslík a pH. K roztoku bylo přidáno 200 μ l MAZU (BASF) proti pění, aby se zvládalo nadbytečné pění, do baňky byl vháněn stlačený vzduch, teplota byla nastavena na 28°C, a míchadlo bylo zapnuto na otáčky 1200 ot/min až do té doby, kdy kyslíková sonda ukázala přes 60 % nasycení. Potom bylo přidáno 16 g krystalické glukosy a 4 g krystalického glukonátu sodného do finální koncentrace 10 g/l glukonátu a 40 g/l glukosy. Směs se nechala míchat dokud všechen glukonát nebyl konvertován na DKG. Hladina glukosy byla udržována nad 20 g/l. Díky permeabilisaci buněk vstoupila do neproduktivního buněčného metabolismu minimální množství glukosy. pH bylo udržováno při 7 kontrolovaným přidáváním 50 % NaOH od začátku do konce.

Přidávání rozpustných enzymů a kofaktorů

Jakmile byl glukonát konvertován na DKG, bylo spolu s 400 μ M NADP⁺ přidáno 2000 jednotek každé, na kofaktoru závislé, GDH a DKG reduktázy (pro DKGR se jedna jednotka rovná jedné změně OD absorbance za minutu, když se měří při 340 nm). Reaktor byl míchán, plněn vzduchem a udržován při 28 °C jako nahoře. Periodické přidávání glukosy se dělo od začátku do konce průběhu, aby byla zajištěna konstantní dodávka substrátu pro oba na kofaktoru závislé systémy.

Výsledky

Experiment v bioreaktoru byl prováděn s nerafinovanou reduktázou A:F22Y/A272G (U. S. patent č. 5,795,761) ve formě surového extraktu z *E. coli*. GDH *T. acidophilum* a NADP⁺ byly nakoupeny v rafinované formě od fy Sigma. Rychlosti GA k DKG byly větší než 10 g / l / h. Počáteční rychlosti tvorby 2KLG byly větší než 10 g / l / h. Integrovaná rychlost po prvních šesti hodinách byla přes 5 g / l / h. Kofaktor se jevil jako stabilní po prvních šest hodin a převážně v redukované formě. Celkový počet přeměn byl 537 (215 mM 2KLG / 0,4 mM NADP⁺). Během prvních

šesti hodin nešly nikdy intermediáty GA a DKG nad 4 g / l. Průběh byl zastaven 6,5 hodiny po první náplni buněk a přes noc při 22°C běžela doběhová fáze při mírném míchání. Konečný titr KLG byl kolem 42 g / l.

Během průběhu inkubace bioreaktoru byly odebírány alikvotní podíly. Tyto alikvoty byly nejprve točeny na mikroadstředivce, aby se buňky sbalily. Pro analýzu zbývající aktivity reduktázy, bylo přidáno 25 mikrolitrů supernatantu vzorku k roztoku 910 μ l pufru (50 ml bis-Tris, pH 7), 20 μ l DKG (70 mg/ml) a 250 μ M NADPH. Aktivita reduktázy byla měřena monitorováním ztráty absorbance při 340 nm za 1 min. GDH aktivita byla měřena přidáním 25 μ l vzorku k roztoku obsahujícímu 520 μ l pufru, 150 μ l NaCl (1 M), 200 μ l močoviny (8 M), 50 μ l glc (1 M) a 60 μ l NADP⁺ (5 mM) a monitorováním vzrůstu absorbance při 340 nm za 1 min. Obě, jak reduktáza tak GDH vykazaly úplnou reaktivitu v celém průběhu experimentu v bioreaktoru.

Příklad IV

Tento příklad ilustruje produkci KDG v bioreaktoru in vitro.

Buňky obsahující membránou vázané aktivity dehydrogenázy glukosy a dehydrogenázy D-glukonové kyseliny, avšak nikoliv aktivitu dehydrogenázy 2-keto-D-glukonátu, se vypěstují a seberou. Jedním příkladem takové buňky je *Pantoea citrea*, u níž je mutace v enzymu dehydrogenázy 2-keto-D-glukonátu a je vypěstována a zpracována jako v příkladu III. Buňky se permeabilisují jak je popsáno v příkladu III. Po alikvotních podílech nebo kontinuálně se přidává glukosa (krystalická nebo v roztoku). pH je udržováno kontrolovaným přidáváním koncentrovaného roztoku NaOH. Glukosa je konvertována na D-glukonovou kyselinu a potom KDG. Tvorba produktu se monitoruje analýzou alikvotů ve vhodném HPLC systému. Produkt se získá odstraněním buněk centrifugováním a koncentrováním nebo odstraněním zbylé kapaliny.

Příklad V

Tento příklad ukazuje, že přidavek organického rozpouštědla zvyšuje aktivitu reduktázy.

Do kyvety se vloží 1-2 mg DKG, 250 μ M NADPH, F22Y/A272G reduktáza A a dostatkem 50 mM bis-Tris pufru o pH 7 se doplní na konečný objem 1 ml. Aktivita reduktázy se měří monitorováním snižování absorbance při 340 nm. Množství přidané reduktázy při teplotě místnosti nebo 30°C typicky vyvolává změnu absorbance o 0,1-0,2 OD/min. Za stejných podmínek, byly k roztoku přidávány alikvotní podíly methanolu nebo ethanolu a byla měřena aktivita reduktázy. Aktivita reduktázy v přítomnosti různých množství methanolu při 30°C je uvedena na Obrázku 3 a aktivita v přítomnosti ethanolu při 22°C, je uvedena na Obrázku 4.

Jak je na obrázcích ukázáno, aktivita reduktázy vzrůstá v přítomnosti určitých množství methanolu nebo ethanolu. Optimální koncentrace se pohybují mezi 10 a 25 % organického rozpouštědla.

GDH z *T. acidophilum* má malé snížení aktivity, když se inkubuje s 10 % methanolu (podmínky eseje jsou 50 mM Tris, pH 7, 12,5 mM D-glukosy, 250 μ M NADP+, v 1 ml. Aktivita se monitoruje zvýšením absorbance při 340 nm). Permeabilisované buňky byly inkubovány s 15 % methanolu a glukonovou kyselinou. Aktivity dehydrogenázy D-glukonové kyseliny a dehydrogenázy kyseliny 2-keto-D-glukonové nebyly přidáním methanolu výrazně ovlivněny, jak bylo monitorováno tvorbou produktu (analýza HPLC).

Přídavek methanolu nebo ethanolu ke kompletní reakci v bioreaktoru bude zvyšovat aktivitu reduktázy. Ztráty aktivity GDH nebo jiných komponent mohou být překonány větším přídavkem GDH nebo buněk.

Příklad VI

Příklad VI ukazuje aktivitu reduktázy je-li přítomen Gafquat a PEG8000.

Reduktáza byla inkubována s 250 μ M NADPH, 1-2 mg/ml DKG a 0 %, 0,7 % a 2,8 % Gafquatu (ISP Technologies Inc.) nebo 0,5 % PEG8000 v 1 ml pufru (50 mM bis-Tris pufr, pH 7) při 30°C. Aktivita reduktázy byla měřena jako v příkladu V. Jak je v Tabulce 1 ukázáno, přídavek Gafquatu zvyšuje aktivitu o 80 % ve srovnání s aktivitou bez Gafquatu. PEG8000 zvyšuje aktivitu reduktázy přibližně o 15 %.

Tabulka 1

Zvýšení aktivity reduktázy v přítomnosti Gafquatu nebo PEG8000

Polymer	Přidaná % k finálnímu roztoku	% aktivity bez přídavku
Gafquat	0,7 - 2,8	180
PEG8000	0,5	115

Příklad VII

Příklad VII ukazuje aktivitu reduktázy v přítomnosti soli.

Aktivita reduktázy F22Y/A272G byla měřena v přítomnosti různých množství rozdílných solí. Esej tvořilo přidávání reduktázy do roztoku (konečný objem 1 ml), který obsahoval 250 μ M NADPH, DKG (1-1,5 mg/ml), 50 mM bis-Tris pufru, pH 7,0 a různá množství fosforečnanu draselného, NaCl, KCl, K_2SO_4 a $CaCl_2$. Všechny reakce byly prováděny při 30°C. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 5.

Jak je na Obrázku 5 ukázáno, aktivita reduktázy je stejná nebo mírně vzrůstá, když je společně inkubována s až do 100 mM NaCl nebo KCl. Potom aktivita opadá až koncentrace vzrostou na 250 mM. Aktivita reduktázy opadá, když koncentrace $CaCl_2$ nebo fosforečnanu draselného jsou 20 mM nebo více.

Vazebná konstanta reduktázy (K_m) pro NADPH v přítomnosti 200 mM NaCl byla stanovena za použití standardních biochemických technik [Fersht A.: Enzyme Structure and Mechanism (1977), W.H. Freeman and Company]. Reakce byla prováděna v bis-Tris pufru pH7 obsahujícím přibližně 1,5 mg/ml GKG při 30°C a proměnná množství NADPH. Bylo nalezeno, že K_m pro NADPH v přítomnosti 200 mM NaCl 10-40ti násobně vzrůstá proti K_m stanovené bez NaCl. Maximální rychlost (V_{max}) se solí byla podobná nebo mírně vzrostla nad V_{max} bez soli. Jedna cesta ke snížení účinku soli na aktivitu reduktázy je zvýšit koncentraci NADPH, dokud ten je při oněch podmínkách při nebo nad K_m . Jinak by mohly být odstraněny species s nábojem, včetně KLG.

Příklad VIII

Příklad VIII ukazuje stabilitu A F22Y/A272G reduktázy v přítomnosti poměru soli/produkt.

Tepelná stálost reduktázy v přítomnosti solí velice vzrostla. Reduktáza byla testována jednou z následujících cest. V prvním případě byla reduktáza přidána k pufru (50 mM bis-Tris, pH 7) v přítomnosti a nepřítomnosti různých množství 2-KLG (0-500 mM). Tyto roztoky byly potom alikvotně rozděleny (40 μ l) do 1,5 ml zkumavek eppendorf. Zkumavky byly potom umístěny do vodní lázně 45°C a vyjímány ve stanovených intervalech. Pak byla reduktáza pomocí standardních esejů pro aktivitu reduktázy, analyzována na zbývající aktivitu. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 6.

Jak je na Obrázku 6 ukázáno, v přítomnosti 500 mM 2-KGL, reduktáza za těchto podmínek žádnou aktivitu výrazně neztrácí. Avšak pouze s pufrům inkubovaná reduktáza ztrácí přibližně polovinu své aktivity v 10 min. Koncentrace intermediátu 2-KLG poskytují částečnou stabilizaci.

Reduktáza byla inkubována 10 min v přítomnosti pufru (50 mM bis-Tris, pH 7 nebo 25 mM MOPS, pH 7), 0,5 M NaCl, 0,5 M KCl, 0,5 M NH₄Cl, 0,5 M K₂SO₄ a 0,1 M NaI při pH 7 a 45°C. Jak je uvedeno v Tabulce 2 níže, v přítomnosti těchto sloučenin se ztrácí málo aktivity, zatímco reduktáza pouze s pufrům ztrácí téměř polovinu své aktivity. Tyto sloučeniny jasně reduktázu stabilizují. Nižší a vyšší hladiny těchto sloučenin by měly rovněž reduktázu stabilizovat.

Tabulka 2

Aktivita reduktázy po 10 min inkubaci při teplotě místnosti nebo 45°C.
Aktivita byla stanovována pomocí standardního eseje.

Vzorek reduktázy	Zbývá aktivita po 12 min inkubaci %	Zbývá aktivita po 10 min inkubaci %
Pufr		20-40
0,5 M NaCl		100
0,5 M KCl		100
0,5 M NH ₄ Cl		100
0,5 M K ₂ SO ₄		100
0,1 M NaI	80-85	
100mM NADPH		80-90
200 mM K ₂ PO ₄		65-78
100 mM K ₂ SO ₄		90-100

Bylo provedeno srovnání mezi stabilizací 2-KLG a NaCl. Inkubace byla provedena v 25 mM MOPS, pH 7 při teplotě 45,4 °C. Byla použita koncentrace 20 mM 2-KLG nebo 20 mM NaCl. Analyzováno bylo v čase 0,5 a 10 min. Výsledky jsou

shrnuty níže v Tabulce 3. Jak je ukázáno, stejné množství NaCl stabilizuje tak reduktázu více než 2-KLG.

Tabulka 3

Podmínky	Aktivita, 0 min, %	Aktivita, 5 min, %	Aktivita, 10 min, %
20 mM NaCl	100	72	59
20 mM 2-KLG	100	51	29

Všechna % v Tabulce 3 jsou ± 10 %.

Při 46,6-46,9°C byly stanoveny v přítomnosti 0-400 mM NaKLG pro reduktázu poločasy životnosti. Tato teplota byla volena, aby se poločasy stanovovaly při stejné teplotě. Pufr je 25 mM MOPS, pH 7. Odebraly se alikvotní podíly a analyzovaly se na zbylou aktivitu. Měření termostability poločasů životnosti byla prováděna následovně: vzorek 450 μ l obsahující pufr, reduktázu a 2-KLG (kde byl použit) byl umístěn do eppendorf-zkumavek a zahříván ve vodní lázni. Během doby průběhu, která se měnila od 10 do 30 minut bylo odebráno osm nebo devět alikvotních podílů. Každý alikvotní podíl byl nalit na led a dvojmo analyzován na konci experimentu. Aktivity byly graficky vynášeny jako čas proti zbývající aktivitě. K_T bylo stanoveno úpravou linky využívající program počítačové grafiky pro řešení exponenciálního rozkladu. Tato hodnota byla potom použita k vypočítání poločasu životnosti [Fersht A., "Enzyme Structure and Mechanism" (1977), W. H. Freeman and Co.]. Výsledky jsou uvedeny níže v Tabulce 4.

Tabulka 4

NaKLG koncentrace	0 mM	100 mM	200 mM	300 mM	400 mM
Poločas životnosti (min)	3,5 \pm 0,5	5,5 \pm 1	7,5 \pm 1,5	10 \pm 3	18,5 \pm 3

Jak ukazují výsledky v Tabulce 4, NaKLG zřetelně stabilizuje reduktázu a tato stabilizace je závislá na koncentraci.

Tato data ukazují, že zvyšující se množství soli mohou reduktázu stabilizovat. Vhodné soli, které mohou být použity v bioreaktoru představují síran amonný, octan sodný, octan amonný, chlorid amonný, síran sodný, fosforečnan draselný, fosforečnan sodný, chlorid sodný, KCl, NH₄Cl, K₂SO₄ a NaI. Zkušený odborník uzná,

že optimální rozmezí soli bude závislé na teplotě. Proto, aby se dosáhla žádoucí stabilita reduktázy, může být v bioreaktoru modifikována buď teplota nebo koncentrace soli anebo oboje. Při nižších teplotách, při kterých by byl typický reaktor provozován, by se muselo použít méně soli, aby se zajistil stejný stupeň stabilizace jak je udáno v Tabulce 4.

Příklad IX

Příklad IX ilustruje metodu měření poměru NADPH / NaDP+ a rovnováhy reakce.

Redukovaný kofaktor (NaDPH) má silnou absorbanci při 340 nm, zatímco oxidovaný kofaktor (NADP+) při takové vlnové délce neabsorbuje. Jsou-li tudíž spolu smíseny oba kofaktory, může být množství přítomného NADPH stanoveno absorbancí při 340 nm. Je-li také známo množství původně přidaného NaDP+, může být pak snadno stanoven poměr těchto dvou kofaktorů. Tato metoda může být použita pro stanovení, jak přidání různých komponent do reakce, jako na příklad reakce recyklace kofaktoru, ovlivňuje reakční rovnováhu.

1 ml reakční směsi byl při teplotě místnosti vložen do kyvety. Reakční směs tvořil pufr (50 mM bis-Tris, pH 7), 5 mg glukosy, 5 mg 2,5-DKG, 100 μ M NADPH, 100 μ M NADP+, reduktáza a dehydrogenáza glukosy (GDH). Pro nastartování reakce byly naposled přidány enzymy a hladiny kofaktoru byly monitorovány při 340 nm. Po dosažení rovnováhy (Obrázek 7) byl přidán další alikvotní podíl GDH. Rovnováha se velmi rychle posunula ve prospěch větší přítomnosti NADPH. Přidávání více GDH poskytovalo stejnou odezvu.

Jako nahoře byl připraven další 1 ml inkubační směsi. Po dosažení rovnováhy bylo do ní přidáno 29 mg NaCl tak, aby se získala finální koncentrace 0,5 M NaCl. To, jak je ukázáno na Obrázku 8, dramaticky posunulo rovnováhu ve prospěch přítomnosti NADPH.

Příklad X

Příklad X ilustruje recyklační reakce kofaktoru.

Recyklační reakce kofaktoru byly uskutečňovány přidáváním reduktázy, glukosy, 2,5-DKG a NADP⁺ do reakční nádoby. Aby se vyhodnotila reakce v přítomnosti produktu, byla k některým reakcím dodatečně přidávána rafinovaná 2-KLG. Tyto reakce byly udržovány, aby produkovaly glukonovou kyselinu a 2-KLG. Kofaktor byl recyklován mezi NADP⁺ a NADPH působením obou enzymů. Periodicky byly odebírány alikvotní podíly a pomocí HPLC analyzovány na přítomnost substrátů a produktů. Reakce byla udržována nejméně 20 hodin při teplotě místnosti.

Byly prováděny reakce už jen se 3 ml. Reduktáza, GDH, 10 mg/ml glukosy a 10 mg/l lyofilisované 2,5-DKG byly při reakci přidány do 50 mM bis-Tris pufru. K některým inkubacím byla v koncentraci 75 mg/l přidána 2-KLG. Dodáním NADP⁺ (400 μM) byla při teplotě místnosti reakce nastartována. pH roztoku bylo přidáváním malého množství NaOH udržováno mezi pH 6-7,5. Periodicky byly přidávány alikvotní podíly glukosy a 2,5-DKG. Na konci dne byla reakce přes noc uložena při 4°C. Následujícího rána byla ohřáta na teplotu místnosti, bylo upraveno pH a reakce pokračovala. Byly odebírány malé alikvotní podíly a injikovány do HPLC. Množství vytvořeného glukonátu a 2-KLG mohla být vypočtena srovnáním se standardem. Při typické reakci nejméně 60 % glukosy konvertovalo na glukonát a nejméně 60 % 2,5-DKG konvertovalo na 2-KLG.

Příklad XI

Příklad XI ilustruje kinetiku NaCl.

Když byl ke standardnímu esaji reduktázy, obsahujícímu 250 μM NADPH a 10-20 mM DKG, přidán NaCl (100 mM nebo více), snížil se podíl reduktázy. Provedením kinetické analýzy bylo zjištěno, že chlorid sodný zvyšuje K_m reduktázy pro kofaktor NADPH. Jak je NaCl přidáno více, vzrůstá K_m . Je-li použito množství NADPH pod nasycením, projevuje reduktáza inhibici vlivem NaCl. Aby se tento efekt paralyzoval, bylo do reakce přidáno více NADPH, takže to je několikanásobně nad K_m . Způsob inhibice ukazuje, že je kompetitivní.

K_m pro DKG v přítomnosti NaCl bylo stanoveno pomocí standardních technik. Koncentrace NADPH pro každé měření byla upravena nejméně trojnásobně nad její K_m pro každou koncentraci NaCl.

[NaCl], mM	Km pro NADPH (mM)	Km pro DKG (mM)
0	4-9	6-14
100	30-100	6-14
200	130-230	6-14
400	260-360	6-14

Příklad XII

Příklad XII ukazuje kinetiku 2-KLG.

Km pro DKG v přítomnosti 2-KLG bylo stanovováno pomocí standardních biochemických technik. Množství 2-KLG bylo měněno od 0 do 150 mM v pufru při pH 7. Km pro DKG za podmínek pH 7 bylo 10-12 mM. Jak koncentrace 2-KLG vzrůstá, Km pro 2,5-DKG se snižuje. Na příklad Km pro DKG při 150 mM 2-KLG je 2-4 mM. Reakční rychlost se také snižuje a dozná 2-4 násobné snížení, když koncentrace KLG vzroste z 0 na 150 ml. Toto chování je konsistentní s nekompetitivní inhibicí.

Bylo zjištěno, že Km pro NADPH v přítomnosti 100 mM 2-KLG je 4-9 mM. To bylo provedeno pomocí standardních biochemických technik při pH 7, s koncentrací 2,5-DKG větší než 14 mM a koncentracemi NADPH vymezujícími Km hodnoty.

S přítomností vzrůstajících množství KLG v prostředí bioreaktoru by se tudíž mělo očekávat, že sníží aktivitu reduktázy a zpomalí celkovou rychlost reakce. Dvěma cestami k překonání tohoto fenoménu by bylo získání KLG např. elektrodialýzou nebo alternativně přidáním více reduktázy do bioreaktoru.

Příklad XIII

Příklad XIII ilustruje syntézu 2,5-DKG.

Buňky *P. citrea* byly inkubovány s 150 mM glukonátu sodného ve vhodném pufru: použilo se 25 mM bis-Tris nebo 25 mM MOPS při pH 6. 25 ml buněk, pufr a substrát bylo vloženo do 125 ml Erlenmeyerovy baňky s přepážkou a inkubováno při 28°C za třepání přibližně 250 ot/min. Po 16-24 hodinách se baňka monitoruje na tvorbu 2,5-DKG pomocí HPLC analýzy a eseje aktivity. Buňky se odředěním usadí, a supernatant se odstraní. Materiál se za sterilních podmínek sfiltruje a může být uchováván při 4°C nebo zmražen. Jinak může být materiál lyofilizován na tuhou látku.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob nefermentativní produkce KDG nebo DKG z uhlíkového zdroje **v y z n a ě n ý t í m, ž e** zahrnuje enzymatickou oxidaci uhlíkového zdroje nejméně jednou oxidační enzymatickou aktivitou za vzniku KDG nebo DKG.
2. Způsob podle nároku 1 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** KDG je konvertován dále na erythorbát.
3. Způsob podle nároku 1 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** zahrnuje oxidaci uhlíkového zdroje první oxidační enzymatickou aktivitou za vzniku prvního oxidačního produktu a oxidaci prvního oxidačního produktu druhou oxidační enzymatickou aktivitou za vzniku KDG.
4. Způsob podle nároku 1 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** první oxidační enzymatická aktivita je aktivita GDH a druhou oxidační enzymatickou aktivitou je aktivita GADH.
5. Způsob podle nároku 1 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** probíhá v prostředí obsahujícím hostitelské buňky.
6. Způsob podle nároku 5 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** řečená hostitelská buňka je neživotná.
7. Způsob podle nároku 5 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** řečená hostitelská buňka je životná.
8. Způsob podle nároku 5 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** nejméně jeden oxidační enzym je vázán k membránám hostitelské buňky.
9. Způsob podle nároku 1 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** nejméně jedna oxidační aktivita je v roztoku.

10. Způsob podle nároku 8 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** hostitelská buňka obsahuje mutaci v přirozeně se vyskytující nukleové kyselině kódující KDGH aktivitu.

11. Způsob podle nároku 5 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** hostitelská buňka je členem čeledi Enterobacteriaceae.

12. Způsob podle nároku 11 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** členem je druh Pantoea.

13. Způsob podle nároku 1 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** nejméně jedna oxidační enzymatická aktivita je imobilizována.

14. Způsob podle nároku 3 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** dále obsahuje stupně enzymatické oxidace KDG nejméně jedním oxidačním enzymem na oxidační produkt a enzymatickou redukci oxidačního produktu nejméně jedním redukčním enzymem na 2-KLG.

15. Způsob nefermentativní produkce 2-KLG z uhlíkového zdroje **v y z n a č e n ý t í m, ž e** zahrnuje v jakémkoliv pořádku následující kroky: enzymatickou oxidaci uhlíkového zdroje nejméně jednou enzymatickou aktivitou na oxidační produkt a enzymatickou redukci oxidačního produktu nejméně jednou redukční enzymatickou aktivitou na 2-KLG.

16. Způsob podle nároku 15 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** uhlíkovým zdrojem je KDG.

17. Způsob podle nároku 15 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** oxidační enzymatická aktivita vyžaduje oxidovanou formu enzymatického kofaktoru a redukční enzymatická aktivita vyžaduje redukovanou formu enzymatického kofaktoru a kde oxidovaná forma kofaktoru a redukovaná forma kofaktoru jsou recyklovány mezi nejméně jedním oxidačním krokem a nejméně jedním redukčním krokem.

18. Způsob podle nároku 15 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** v jakémkoliv pořádku obsahuje tyto kroky:

- a. enzymatickou oxidaci uhlíkového zdroje první oxidační enzymatickou aktivitou na první oxidační produkt;
- b. enzymatickou oxidaci prvního oxidačního produktu druhou oxidační enzymatickou aktivitou na druhý oxidační produkt;
- c. enzymatickou oxidaci druhého oxidačního produktu třetí oxidační enzymatickou aktivitou na třetí oxidační produkt a
- d. enzymatickou redukci třetího oxidačního produktu redukční enzymatickou aktivitou na 2-KLG.

19. Způsob podle nároku 18 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** nejméně jedna z první, druhé a třetí oxidační enzymatické aktivity vyžaduje oxidovanou formu enzymatického kofaktoru a redukční enzymatická aktivita vyžaduje redukovanou formu enzymatického kofaktoru, a kde oxidovaná forma kofaktoru a redukovaná forma kofaktoru jsou recyklovány mezi nejméně jedním oxidačním krokem a nejméně jedním redukčním krokem.

20. Způsob podle nároku 19 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** první oxidační enzymatická aktivita vyžaduje oxidovanou formu enzymatického kofaktoru.

21. Způsob podle nároku 18 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** uhlíkovým zdrojem je glukosa a první enzymatickou aktivitou je aktivita dehydrogenázy glukosy.

22. Způsob podle nároku 21 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** aktivita dehydrogenázy glukosy se dá získat z bakteriálního, kvasinkového nebo fungálního zdroje.

23. Způsob podle nároku 22 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** aktivita dehydrogenázy glukosy se dá získat ze zdroje zahrnujícího *T. acidophilum*, *Cryptococcus uniguttalatus* a druhy *Bacillus*.

24. Způsob podle nároku 19 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** každý z prvního, druhého a třetího enzymu je aktivitou dehydrogenázy.

25. Způsob podle nároku 19 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** nejméně jedna z první, druhé, třetí a čtvrté z enzymatických aktivit je imobilizována.

26. Způsob podle nároku 19 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** nejméně jedna z první, druhé, třetí a čtvrté z enzymatických aktivit je v roztoku.

27. Způsob podle nároku 25 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** druhým enzymem je GADH aktivita.

28. Způsob podle nároku 25 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** třetím enzymem je KDGDH aktivita.

29. Způsob podle nároku 25 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** čtvrtým enzymem je aktivita reduktázy.

30. Způsob podle nároku 29 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** aktivita reduktázy se dá získat z bakteriálního, kvasinkového nebo fungálního zdroje.

31. Aktivita reduktázy podle nároku 29 **v y z n a č e n á t í m, ž e** zdroj zahrnuje *Corynebacterium* a *Erwinia*.

32. Způsob podle nároku 31 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** aktivitou reduktázy je 2,5-DKG reduktáza.

33. Způsob podle nároku 18 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** prvním oxidačním produktem je glukonát, druhým oxidačním produktem je 2-KDG a třetím oxidačním produktem je 2,5-DKG.

34. Způsob podle nároku 18 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** probíhá v prostředí obsahujícím rekombinantní hostitelské buňky.

35. Způsob podle nároku 34 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** hostitelská buňka je životná.

36. Způsob podle nároku 34 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** hostitelská buňka je neživotná.

37. Způsob podle nároku 34 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** rekombinantní hostitelské buňky zahrnují členy Enterobacteriaceae.

38. Způsob podle nároku 34 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** probíhá v prostředí obsahujícím membrány rekombinantních hostitelských buněk a v němž nejméně jeden z prvního, druhého a třetího enzymu je vázán k membránám hostitelské buňky.

39. Způsob podle nároku 37 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** rekombinantní hostitelskou buňkou je druh *Pantoea*.

40. Způsob podle nároku 39 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** rekombinantní hostitelskou buňkou je *Pantoea citrea*.

41. Způsob podle nároku 40 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** rekombinantní hostitelská buňka má mutaci nejméně v jedné, přirozeně se vyskytující aktivitě dehydrogenázy.

42. Způsob podle nároku 41 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** mutace je v membránou vázané GDH aktivitě.

43. Způsob podle nároku 41 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** hostitelská buňka obsahuje dále nukleovou kyselinu kódující heterologickou GDH aktivitu.

44. Způsob podle nároku 43 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** heterologická GDH aktivita je získatelná z *T. acidophilum*, *Cryptococcus uniguttalatus* nebo druhu *Bacillus*.

45. Způsob podle nároku 18 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** oxidovaná forma enzymatického kofaktoru je NADP⁺ a redukovaná forma enzymatického kofaktoru je NADPH.

46. Způsob podle nároku 18 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** oxidovaná forma enzymatického kofaktoru je NAD a redukována forma je NADH.

47. Způsob podle nároku 1, nároku 15 nebo nároku 18 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** je kontinuální.

48. Způsob podle nároku 1, nároku 15 nebo nároku 18 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** se děje po násadách.

49. Způsob podle nároku 1, nároku 15 nebo nároku 18 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** probíhá v prostředí obsahujícím organická rozpouštědla.

50. Způsob podle nároku 1, nároku 15 nebo nároku 18 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** probíhá v prostředí obsahujícím dlouhé polymery.

51. Způsob podle nároku 14, nároku 15 nebo nároku 18 **v y z n a ě n ý t í m, ž e** obsahuje dále krok pro získání ASA z 2-KLG.

52. Hostitelská buňka, zahrnující nukleovou kyselinu mající mutaci v genu kódujícím GDH aktivitu.

53. Hostitelská buňka, zahrnující nukleovou kyselinu mající mutaci v genu kódujícím KDGDH aktivitu.

54. Hostitelská buňka podle nároku 52 nebo 53, která je druhu *Pantoea*.

55. Hostitelská buňka podle nároku 52, dále zahrnující nukleovou kyselinu kódující heterologickou GDH aktivitu.

56. Hostitelská buňka podle nároku 55, dále zahrnující nukleovou kyselinu kódující heterologickou aktivitu reduktázy.

57. Způsob podle nároku 1 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** obsahuje případně stupeň znovuzískání KDG nebo DKG.

58. Způsob podle nároku 14, nároku 15 nebo nároku 18 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** 2-KLG je dále čištěn pomocí elektrodialýzy.

59. Způsob podle nároku 45 nebo nároku 18 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** kofaktor je čištěn pomocí nanofiltrace.

60. Způsob podle nároku 18 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** probíhá v prostředí obsahujícím sůl.

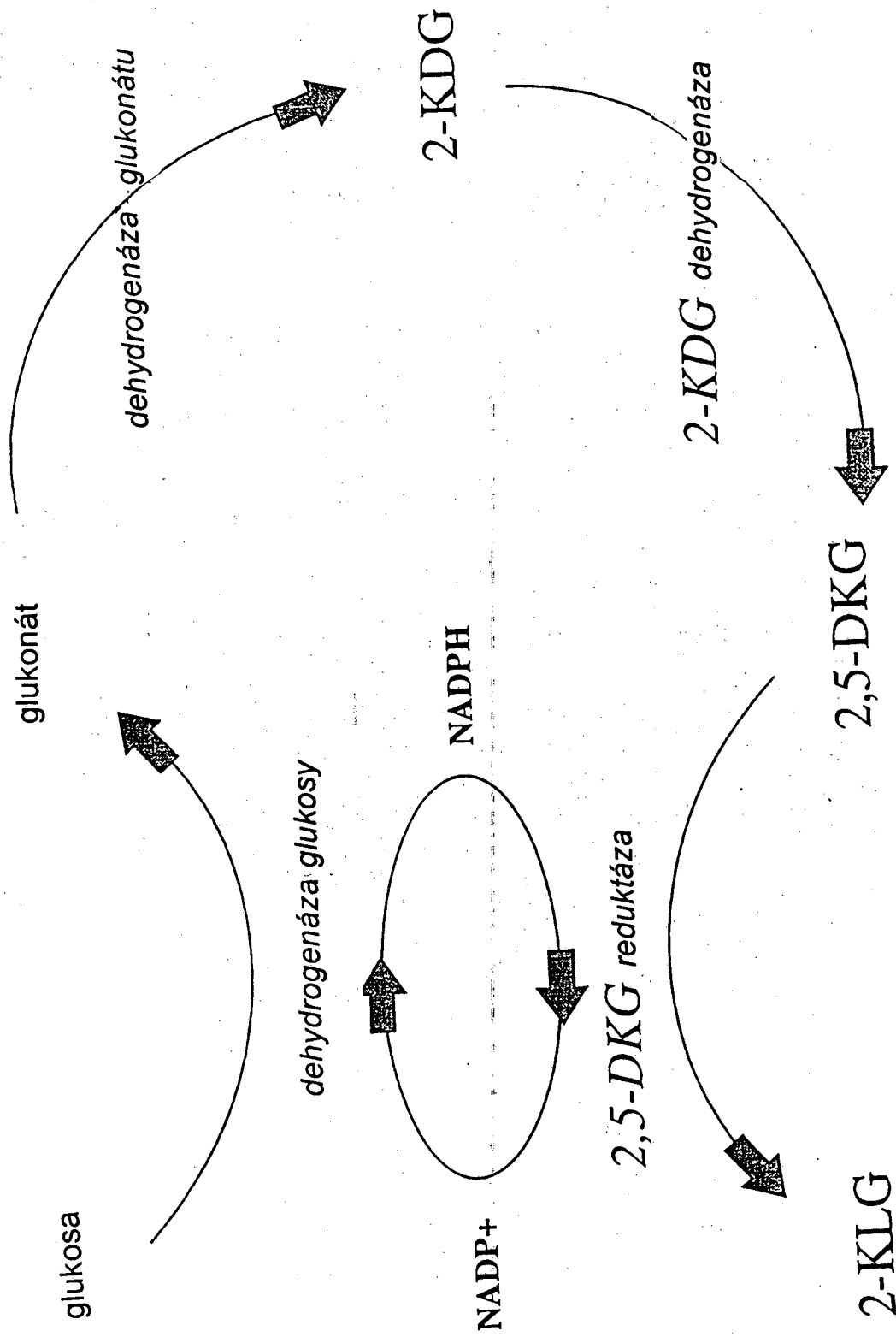
61. Způsob podle nároku 60 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** sůl zahrnuje síran amonný, octan sodný, octan amonný, chlorid amonný, síran sodný, fosforečnan draselný, fosforečnan sodný, chlorid sodný, KCl, NH₄Cl, K₂SO₄ a NaI.

62. Způsob podle nároku 60 **v y z n a č e n ý t í m, ž e** obsahuje koncentraci soli mezi 0 mM a 500 mM.

2001

FV 2001-22PV

46137

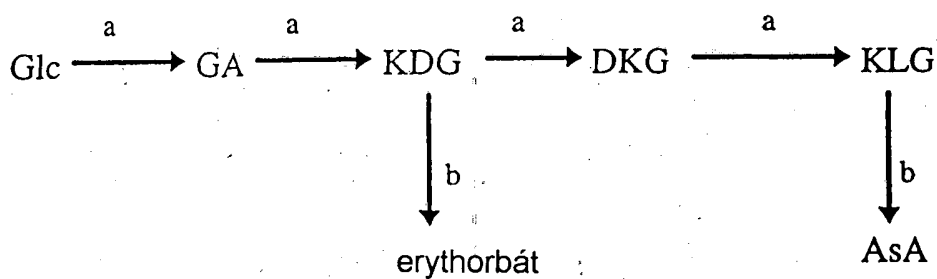


OBRÁZEK 1

2005.01

7V 2001-2225

~~46237~~



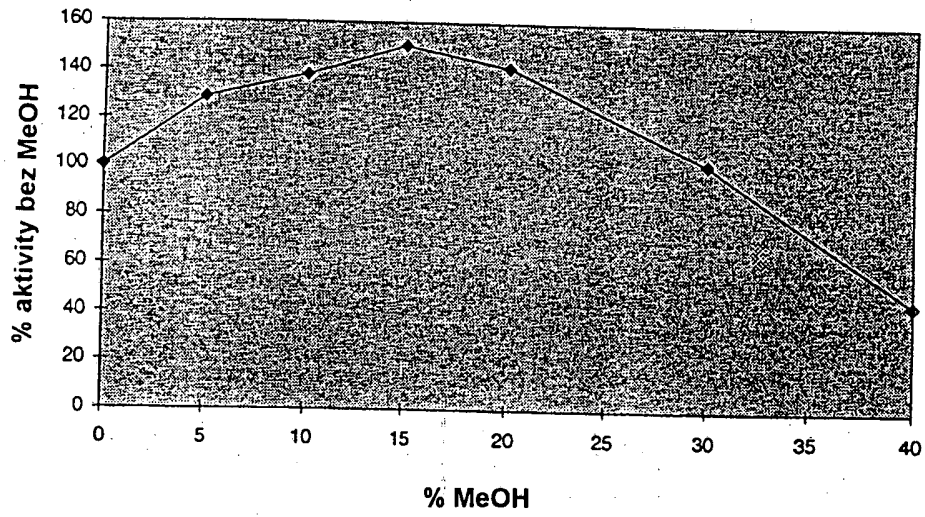
OBRÁZEK 2

2005.01

71 2001-22A

~~46 237~~

Aktivita reduktázy v MeOH

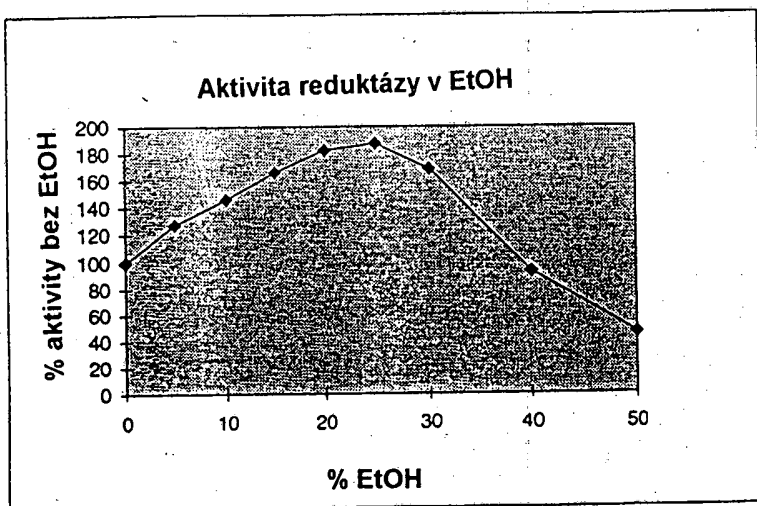


OBRÁZEK 3

2001

PV 2001-22 PV

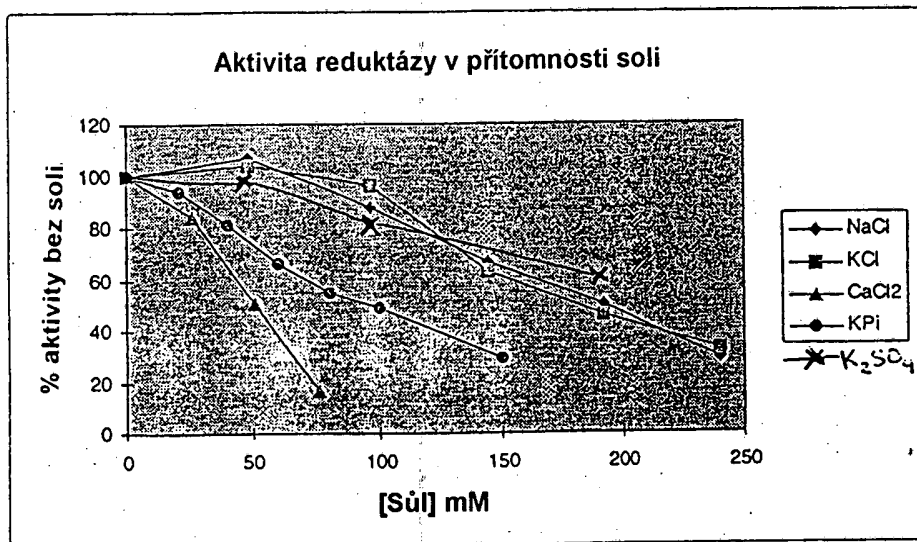
~~46837~~



OBRÁZEK 4

2005.01

FV 2001-22PJ
~~46834~~

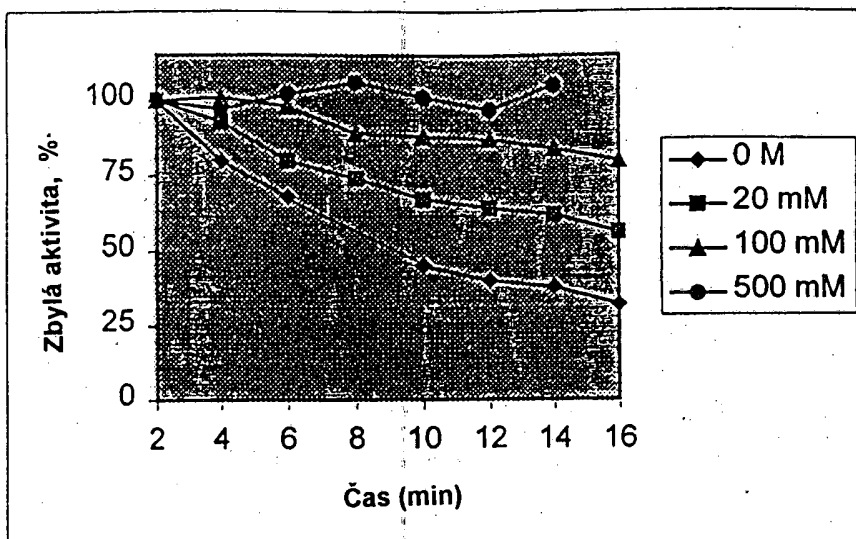


OBRÁZEK 5

2001

PV 2001-22PJ

~~46834~~

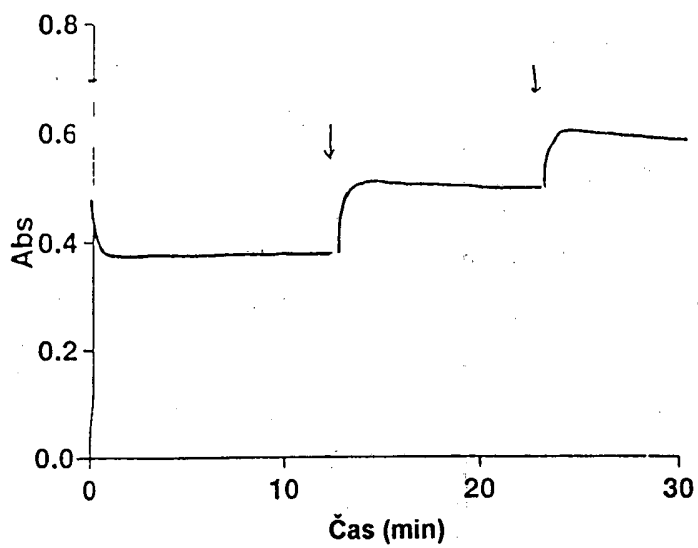


OBRÁZEK 6

2005.01

PV 2001 - 22PJ

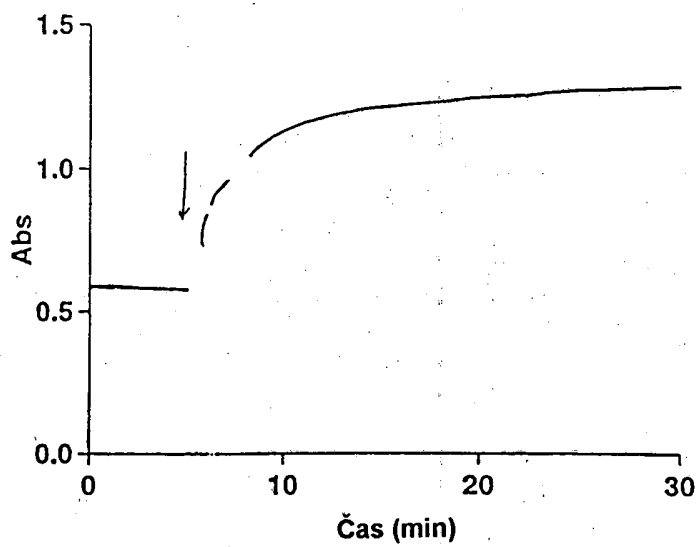
~~46P37~~



OBRÁZEK 7

200501

7V 2001-2005
46837

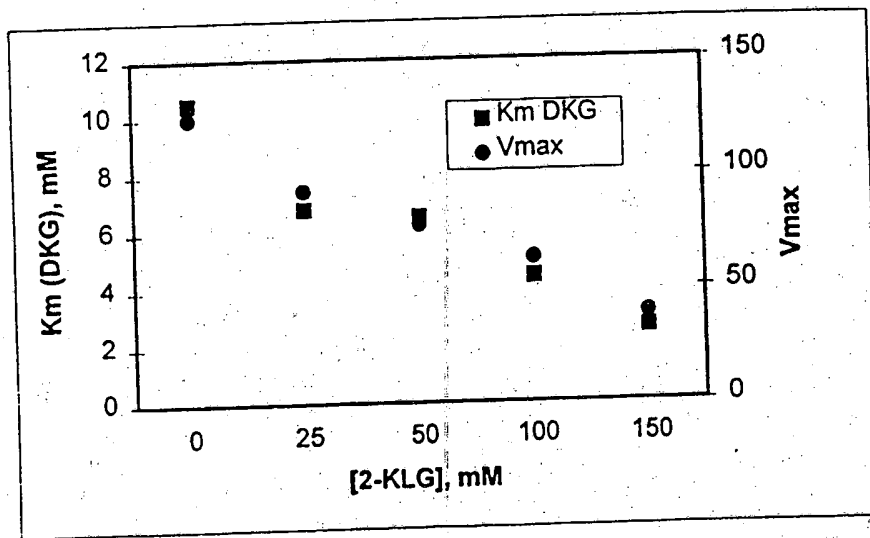


OBRÁZEK 8

2001

PV 2001 - RRPJ

~~46837~~



OBRÁZEK 9