



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 20 026 T2 2004.01.15**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 937 156 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 20 026.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/17133**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 943 546.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/014602**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.09.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.04.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.08.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **19.03.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.01.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12P 13/04**
C12N 15/52

(30) Unionspriorität:

723896 30.09.1996 US

(73) Patentinhaber:

PCBU Services, Inc., Wilmington, Del., US

(74) Vertreter:

Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**FOTHERINGHAM, G., Ian, Vernon Hills, US;
TAYLOR, P., Paul, Arlington Heights, US; TON, L.,
Jennifer, Palatine, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON D-AMINOSÄUREN DURCH DIREKTE GÄRUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die Erfindung betrifft Materialien und Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren. Insbesondere betrifft die Erfindung die Herstellung von sowohl natürlichen als auch nicht-natürlichen D-Aminosäuren unter Verwendung von rekombinanten Wirtszellen. Die Erfindung betrifft speziell ein Fermentationsverfahren unter Verwendung von rekombinanten Zellen, um enantiomerenreine D-Aminosäuren herzustellen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Mit Ausnahme von Glycin, Threonin und Isoleucin existiert jede der üblichen, in der Natur vorkommenden Aminosäuren als eines von zwei optischen Isomeren, die als linksdrehend oder rechtsdrehend bezeichnet werden, abhängig von der Richtung, in welche sie die Drehung einer Ebene von polarisiertem Licht bewirken. Glycin, das kein asymmetrisches Kohlenstoffatom aufweist, hat keine optischen Isomere. Threonin und Isoleucin, die jeweils zwei asymmetrische Kohlenstoffatome aufweisen, haben vier optische Isomere. Einige Aminosäuren, wie Alanin und Glutamin, sind rechtsdrehend, indem sie eine positive (rechtsläufige) Drehung erzeugen. Andere, wie Phenylalanin und Tryptophan, sind linksdrehend, indem sie eine negative (linksläufige) Drehung erzeugen. Folglich können Aminosäuren als l- oder d-Aminosäuren bezeichnet werden, um ihre Chiralität bei einer Isolierung wiederzugeben. Die spezielle Drehung, die durch eine gegebene Aminosäure erzeugt wird, variiert mit Temperatur und pH.

[0003] Durch Konvention werden Aminosäuren auch als D oder L bezeichnet (im Gegensatz zu den d- oder l-Bezeichnungen, auf die oben Bezug genommen wurde) basierend darauf, ob die Konfiguration an dem α -Kohlenstoffatom der Aminosäure dem D- oder L-Stereoisomer (Enantiomer) von Glycerinaldehyd, der willkürlich festgelegten Standardverbindung, entspricht. Basierend auf jener Standardverbindung sind die meisten in der Natur vorkommenden Aminosäuren L-Aminosäuren trotz der Tatsache, dass einige von diesen rechtsdrehend (d) sind, wenn sie bei neutralem pH in eine wässrige Lösung eingebracht werden. Die meisten Enzyme, die auf Aminosäuren einwirken, haben asymmetrische Bindungsdomänen, die nur die L-Form der Aminosäure erkennen. Dementsprechend umfassen die meisten in der Natur vorkommenden Proteine L-Aminosäuren.

[0004] Es gibt jedoch Ausnahmen, bei denen D-Aminosäuren von Zellen produziert und verwendet werden. Unter diesen ist die Produktion von D-Glutamat und D-Alanin durch bestimmte Mikroorganismen am wichtigsten. D-Glutamat und D-Alanin werden primär in Bakterienzellen produziert und werden bei der Mureinsynthese eingesetzt. In Abwesenheit von D-Glutamat und D-Alanin wird eine schadhafte bakterielle Zellwand produziert, was zu Zellyse führt. Die meisten Bakterien produzieren D-Aminosäuren nicht durch direkte Synthese, sondern durch Umwandlung der entsprechenden L-Aminosäure durch eine Aminosäure-spezifische Racemase. Viele Bakterienzellen besitzen beispielsweise eine Alaninracemase, die die in beiden Richtungen verlaufende Umwandlung zwischen L-Alanin bzw. D-Alanin katalysiert, was zu einer racemischen (50 : 50-) Mischung von L- und D-Alanin führt. In ähnlicher Weise produziert eine Glutamataracemase eine racemische Mischung von D-Glutamat und L-Glutamat, das Erstgenannte für einen Einbau in die Zellwand und das Letztgenannte u. a. für die Bildung von Proteinen. Die Spezifität jener zwei Enzyme wird durch die Tatsache gezeigt, dass das Fehlen von einem der beiden zu Zellyse aufgrund der Bildung einer schadhafte Zellwand führt.

[0005] Bestimmte Bakterien, wie Mitglieder der Gattung Bacillus, besitzen eine Alternative zu Racemasen für die Herstellung von D-Aminosäuren in Form eines Enzyms, das als D-Aminotransferase bekannt ist. Ein solches Enzym katalysiert reversibel die Transaminierung von verschiedenen D-Aminosäuren und entsprechenden α -Ketosäuren. In der PCT-Veröffentlichung WO 91/05870 berichtet Manning über ein Verfahren zur mikrobiellen Synthese von D-Alanin und D-Glutamat über eine Katalyse durch eine Aminotransferase. Während Manning auf Seite 2 über die Verwendung einer Bacillus sphaericus-D-Aminotransferase berichtet, berichtet jene Veröffentlichung tatsächlich nur über die Klonierung, Isolierung und Verwendung einer thermophilen Spezies von D-Aminotransferase, die nicht in der Lage ist, die Synthese von mehr als Spuren Mengen der D-Aminosäure wirksam zu katalysieren. Darüber hinaus berichtet Manning nicht über irgendwelche Mittel oder Maßnahmen zur Isolierung oder Verwendung einer Bacillus sphaericus-D-Aminotransferase oder einer jeglichen anderen D-Aminotransferase, die die Synthese von enantiomerenreinen D-Aminosäuren katalysiert.

[0006] Hinweise darauf, dass Mannings Bezugnahme auf eine Bacillus sphaericus-D-Aminotransferase ein Irrtum ist, finden sich auf Seite 2 der Veröffentlichung von Manning, wo Manning angibt, dass die D-Aminotransferase-DNA in das Plasmid pICT113 kloniert wurde. Wie in Stoddard et al., J. Mol. Biol., 196: 441-442 (1987) berichtet wurde, enthält das Plasmid pICT113 die thermophile Spezies von D-Aminotransferase und nicht die Spezies aus Bacillus sphaericus. Die Bedeutung dieser Tatsache liegt darin, dass die thermophile Spezies eine signifikante Produktion eines D-Phenylalanins nicht wirksam katalysieren kann und dementsprechend bei Verfahren unter Verwendung von Techniken der in vitro-Nukleinsäure-Rekombination zur Produktion

einer D-Phenylalanin-Säure nutzlos ist.

[0007] Vor der vorliegenden Anmeldung ist der einzige Bericht über eine Bacillus sphaericus-D-Aminotransferase eine partielle C-terminale Sequenz, die in Transaminases, Christen et al. (Hrsg.), 464 (1985) gefunden wird. Wie sich jedoch aus der vorliegenden Erfindung ergibt, ist jene partielle Sequenz falsch und ist nicht nützlich, um die Bacillus sphaericus-D-Aminotransferase zu isolieren. Dementsprechend berichtet keine frühere Referenz über eine Bacillus sphaericus-D-Aminotransferase bei der Herstellung, durch Mittel oder Maßnahme der in vitro-Nukleinsäure-Rekombination oder anderswie, einer D-Aminosäure. Es sind andere D-Aminotransferasen isoliert worden, aber anders als jene, die durch die Bacillus sphaericus-Spezies produziert wird, ist D-Phenylalanin ein relativ schlechtes Substrat für jene Enzyme. Tanizawa et al., J. Biol. Chem., 264: 2445-2449 (1989).

[0008] Diese Erfindung stellt rekombinante Materialien und Verfahren zur Herstellung von enantiomerenreinen natürlichen und nicht-natürlichen D-Aminosäuren zur Verfügung.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die Erfindung betrifft Materialien und Verfahren zur Herstellung von natürlichen und nicht-natürlichen D-Aminosäuren. Die Erfindung betrifft insbesondere ein Fermentationsverfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren unter Verwendung von rekombinanten Wirtszellen.

[0010] Speziell betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer D-Aminosäure in einer Zelle, Schritte umfassend, bei denen man:

- (a) ein D-Aminotransferase-Gen und ein L-Aminodesaminase-Gen in die Zelle einbringt;
- (b) die Zelle in einem Zellkulturmedium zieht; und
- (c) die D-Aminosäure aus dem Zellkulturmedium isoliert.

[0011] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von D-Phenylalanin in einer Zelle, Schritte umfassend, bei denen man:

- (a) ein D-Aminotransferase-Gen, ein L-Aminodesaminase-Gen und Mittel zur Erhöhung der Produktion von Phenylpyruvat in die Zelle einbringt;
- (b) die Zelle in einem Zellkulturmedium zieht; und
- (c) das D-Phenylalanin aus dem Zellkulturmedium isoliert.

[0012] Die Verfahren der Erfindung können ferner den Schritt umfassen, eine D-Aminodesaminase-Gen-Mutation in die Zelle einzuführen, so dass das D-Aminodesaminase-Gen nicht funktionell ist.

[0013] Die Erfindung betrifft auch die Herstellung von rekombinanten Zellen für eine Verwendung bei der Herstellung von enantiomerenreinen D-Aminosäuren.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0014] **Fig. 1.** ist ein allgemeines Schema, das das Verfahren der Erfindung zur Herstellung von D-Aminosäuren veranschaulicht.

[0015] **Fig. 2.** ist ein Schema, das die Herstellung von D-Phenylalanin unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung veranschaulicht. In **Fig. 2** werden die folgenden Abkürzungen verwendet, E4P ist Erythrose-4-phosphat, PEP ist Phosphoenolpyruvat und DAHP ist 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat.

[0016] **Fig. 3.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pIF1002 zeigt.

[0017] **Fig. 4.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pIF1003 zeigt.

[0018] **Fig. 5.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pIF318 zeigt.

[0019] **Fig. 6.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pJN326 zeigt.

[0020] **Fig. 7.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pIF319 zeigt.

[0021] **Fig. 8.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pIF320 zeigt.

[0022] **Fig. 9.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pIF321 zeigt.

[0023] **Fig. 10.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pIF333 zeigt.

[0024] **Fig. 11.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pALR18 zeigt.

[0025] **Fig. 12.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pPT362 zeigt.

[0026] **Fig. 13.** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion des Plasmids pPT363 zeigt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0027] Die Erfindung betrifft Materialien und Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren. Das allgemeine Verfahren der Erfindung wird in **Fig. 1** veranschaulicht. Die Erfindung betrifft ein Verfahren, in welchem ein D-Aminotransferase-Gen (dat) und ein L-Aminodesaminase-Gen (lad) in eine Bakterienzelle eingebracht wer-

den. Das Produkt des D-Aminotransferase-Gens, d. h. das D-Aminotransferase-Enzym (Dat) katalysiert eine Transaminierungsreaktion zwischen einem D-Aminosäure-Substrat und einer Ketosäure-Vorstufe. In der Transaminierungsreaktion wird die Ketosäure-Vorstufe in deren entsprechende D-Aminosäure umgewandelt und das D-Aminosäure-Substrat wird in deren Ketosäure-Form umgewandelt. Folglich dient das D-Aminosäure-Substrat der Funktion, bei der Transaminierungsreaktion ein Amino-Donor zu sein.

[0028] Ein Produkt des L-Aminotransferase-Gens, d. h. ein L-Aminotransferase-Enzym (Lat), ist in Zellen von Natur aus vorhanden. Das Produkt des D-Aminotransferase-Gens tritt in der Zelle mit dem Produkt des L-Aminotransferase-Gens in Wettbewerb um die Ketosäure-Vorstufe als Substrat. Das L-Aminotransferase-Enzym katalysiert die Transaminierungsreaktion zwischen einem L-Aminosäure-Substrat und der Ketosäure-Vorstufe unter Bildung der L-Aminosäure von der Form der Ketosäure-Vorstufe. Wenn jedoch ein L-Aminodesaminase-Gen in die Zelle eingebracht wird, katalysiert dessen Genprodukt die Desaminierung einer jeglichen L-Aminosäure, die in der Zelle vorhanden ist, zu deren entsprechender Ketosäure-Form. Die aufgrund der Desaminierung der L-Aminosäure gebildete Ketosäure stellt weitere Ketosäure-Vorstufe für eine Verwendung als Substrat durch das D-Aminotransferase-Enzym bereit. Die Umwandlung der Ketosäure-Vorstufe zu deren entsprechender D-Aminosäure-Form durch D-Aminotransferase ist irreversibel, da in der Zelle kein D-Aminodesaminase-Gen vorhanden ist, um ein D-Aminodesaminase-Enzym zu produzieren, um das D-Aminosäureprodukt zu desaminieren.

[0029] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können auch Gene, die Enzyme für die Produktion von Aminosäure-Substraten und Ketosäure-Vorstufen kodieren, in die Zelle eingebracht werden, um eine Überproduktion der gewünschten Substrate, die den D-Aminotransferase- und L-Aminotransferase-Enzymen zur Verfügung stehen, zu erreichen. Die eingebrachten Gene können Racemase-Gene sein oder Gene, die geschwindigkeitslimitierende Enzyme, die an der Biosynthese von Aminosäure-Substraten oder Ketosäure-Vorstufen beteiligt sind, kodieren. Alternativ können die Aminosäure-Substrate und/oder die Ketosäure-Vorstufen als Teil des Kulturmediums für die Zellen während der Produktion der D-Aminosäuren bereitgestellt werden. Im Falle des Zellkulturmediums, das L-Aminosäuren oder racemische Aminosäuren als Substrat enthält, wird in die Zelle vorzugsweise ein Racemase-Gen eingebracht, um eine Überproduktion eines Racemase-Enzyms zu ermöglichen, um die als Teil des Zellkulturmediums zugesetzte L-Aminosäure in D-Aminosäure umzuwandeln. Zusätzlich wird die Anwesenheit des Produkts des L-Aminodesaminase-Gens die in der Zelle vorhandene L-Aminosäure desaminieren, wodurch deren entsprechende Ketosäure-Vorstufe für eine Verwendung als Substrat durch das D-Aminotransferase-Enzym produziert wird.

[0030] Zellen, die für eine Verwendung in dem Verfahren der Erfindung geeignet sind, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf die folgenden Bakterienzellen, wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* und *Escherichia coli*. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung ist die Zelle *Escherichia coli*.

[0031] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung hat die Verwendung von *Bacillus stearothermophilus*-Zellen den zusätzlichen Vorteil, dass diese moderate Thermophile sind, wodurch ermöglicht wird, dass die Herstellung von D-Aminosäuren bei erhöhten Temperaturen, wo die Reaktionsgeschwindigkeiten schneller sind, ausgeführt werden kann. Dementsprechend können Produktionszeiten für die Herstellung von D-Aminosäuren verringert werden.

[0032] In einer bevorzugten Ausführungsform werden ein L-Aminodesaminase-Gen aus *Proteus myxofaciens* und ein D-Aminotransferase-Gen aus *Bacillus sphaericus* in eine Zelle eingebracht. Beide Gene kodieren Enzyme, die sehr breite Substratbereiche aufweisen, wie in der folgenden Tabelle 1 gezeigt. Die Substrate umfassen sowohl natürliche als auch nicht-natürliche D- und L-Aminosäuren. Zusätzlich kann der Substratbereich für diese Enzyme durch Mutation der jeweiligen Gene unter Verwendung von Standard-Mutationsverfahren erhöht werden.

Dat-Substrat	Lad-Substrat
Alanin	Brenztraubensäure
Phenylalanin	Phenylbrenztraubensäure
Isoleucin	α -Ketoisocaproat
Leucin	α -Ketoisövaleriansäure
Tryptophan	Indol-3-brenztraubensäure
Tyrosin	Hydroxyphenylbrenztraubensäure
Valin	α -Ketoisovaleriansäure
Arginin	5-Guanidino-2-oxovaleriansäure
Asparagin	2-Oxosuccinamidsäure
Glutamin	Nicht getestet
Methionin	2-Oxo-4-(methylthio)buttersäure
Ornithin	5-Amino-2-oxopentansäure
Serin	3-Hydroxybrenztraubensäure
Norleucin	2-Oxohexansäure
Norvalin	2-Oxopentansäure
Dihydroxyphenylalanin	Dihydroxyphenylbrenztraubensäure
Citrullin	α -Oxo- γ -ureidonovaleriansäure
Cystein	Nicht getestet
Histidin	2-Oxo-4-imidazolpropionsäure
Lysin	6-Amino-2-oxohexansäure

Tabelle 1

Natürliche und nicht-natürliche Aminosäure-Substrate für Lad- und Dat-Enzyme.

[0033] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden ein L-Aminodesaminase-Gen aus *Proteus mirabilis* und ein D-Aminotransferase-Gen aus *Bacillus sphaericus* in eine Zelle eingebracht.

[0034] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die bevorzugte Wirtszelle ein *Escherichia coli*-Stamm pIF3. Der *Escherichia coli*-Stamm pIF3 ist von einem RY347-Stamm abgeleitet, der von der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A. (ATCC-Aufnahmenummer 69766) erhalten werden kann. Der pIF3-Stamm unterscheidet sich von RY347 darin, dass Wildtyp-Kopien der L-Aminotransaminase-Gene *tyrB*⁺ und *ilvE* in das Chromosom der Zelle durch Transduktion mit einem Bakteriophagen P1, wie in Miller et al., *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992), beschrieben, eingebracht worden sind. Die *tyrB*⁺- und *ilvE*-Gene kodieren L-Aminotransaminase-Enzyme, die Ketosäure-Vorstufen in deren entsprechende L-Aminosäure-Form umwandeln.

[0035] Das erneute Einbringen der Wildtyp-Aminotransaminase-Gene *tyrB*⁺ und *ilvE* in pIF3-Zellen hat den zusätzlichen Vorteil, dass die Zellvermehrung gegenüber jener von RY347 erhöht wird, vermutlich aufgrund von irgendeiner undefinierten zusätzlichen Funktion der L-Aminotransaminase-Genprodukte. Bevorzugte L-Aminotransaminase-Gene umfassen insbesondere, sind aber nicht beschränkt auf *aspC*, *tyrB* und *ilvE*.

[0036] Die Chromosomen der Zellen, die bei der Produktion von D-Aminosäuren der Erfindung verwendet werden, können unter Verwendung von Standardtechniken mutiert werden, wie in Miller et al., *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992), beschrieben. In einer besonderen Ausführungsform wird eine *dadA*-Genmutation in die *Escherichia coli*-Zellen eingeführt, so dass das *dadA*-Gen nicht funktionell ist. *Escherichia coli*-Zellen haben ein *dad*-Operon, das die Gene *dadA* und *dadX* umfasst. Das *dadX*-Gen kodiert das Alaninracemase-Enzym, das an der Racemisierung von Aminosäuren zwischen deren D- und L-Formen beteiligt ist. Das *dadA*-Gen kodiert eine D-Aminodesaminase, welche die oxidative Desaminierung von verschiedenen D-Aminosäuren ausführt. Das *dad*-Operon wird in Gegenwart von D-Alanin induziert und produziert die D-Aminodesaminase- und D-Alaninracemase-Enzyme. Die *DadX*- und *DadA*-Enzyme bilden einen Membrankomplex, der an der Aufnahme und dem Katabolismus von D-Alanin zu Pyruvat beteiligt ist. Das *DadA*-Enzym kann auch andere D-Aminosäuren, wie D-Phenylalanin, desaminieren. Dementsprechend ist es bei *Escherichia coli*-Zellen, die in der Überproduktion von D-Aminosäuren involviert sind, vorteilhaft, das *dadA*-Gen zu mutieren, um eine Produktion des *DadA*-Enzyms zu verhindern.

[0037] Zusätzlich können *Escherichia coli*-Stämme, die Mutationen in den L-Aminotransaminase-Genen *aspC*, *ilvE*, *tyrB* oder in dem D-Aminodesaminase-*dadA*-Gen tragen, von dem *coli* Genetic Stock Center (Yale University, New Haven, CT) erhalten werden. Von dem *coli* Genetic Stock Center können beispielsweise die folgenden *Escherichia coli*-Stämme DG30, DG31, DG34 und DG, die Mutationen in den L-Aminotransaminase-Genen *aspC*, *ilvE* und *tyrB* aufweisen, und der *Escherichia coli*-Stamm EB105, der eine Mutation in dem D-Aminodesaminase-*dadA*-Gen aufweist, erhalten werden.

[0038] Mutationen, die Deletionen einschließen, können in das Chromosom der Zelle in einer ortsgerichteten Weise unter Verwendung von temperaturempfindlichen rekombinanten Plasmiden, die in vitro erzeugte Frag-

mente des Zielgens tragen, in das Wirtszellchromosom eingeführt werden. Beispielsweise das Plasmid pHSG415, das in dem U.S.-Patent Nr. 5,354,672 offenbart wird, bei welchem die temperaturempfindliche Natur der Plasmidreplikationskontrollregion verwendet werden kann, um Rekombinationsereignisse zwischen dem Plasmid und dem Wirtszellchromosom zu identifizieren. Die deletierte Kopie eines Zielgens auf dem Plasmid kann unter Verwendung von pHSG415 gegen die Wildtyp-Kopie desselben Gens auf dem Zellchromosom ausgetauscht werden. Der nachfolgende Verlust des Plasmids aus der Wirtszelle bedingt, dass die Zelle in dem Zielgen mutiert ist. Dementsprechend stellt pHSG415 ein wirksames Mittel bereit, um damit entweder ein Wirtszellchromosom zu mutieren oder um damit ein Wildtyp-Gen in ein Wirtszellchromosom, das mutiert worden war, erneut einzuführen.

[0039] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Herstellung von D-Phenylalanin in einer Zelle, in die Zelle ein D-Aminotransferase-Gen und ein L-Aminodesaminase-Gen einzuführen. Das Produkt des D-Aminotransferase-Gens katalysiert eine Transaminierungsreaktion zwischen einem D-Alanin-Substrat und einer Ketosäure-Vorstufe, Phenylpyruvat, wodurch D-Phenylalanin und Pyruvat hergestellt werden. Die Substrate D-Alanin und Phenylpyruvat sind in der Zelle normalerweise vorhanden, das Erstgenannte für einen Einbau in die Zellwand, das Letztgenannte als die letzte Vorstufe in dem Stoffwechselweg, der zur Biosynthese von L-Phenylalanin führt. Zusätzlich katalysiert das von Natur aus vorhandene Produkt des L-Aminotransferase-Gens die Transaminierungsreaktion zwischen L-Alanin und Phenylpyruvat, wodurch L-Phenylalanin und Pyruvat hergestellt werden. Jedoch führt das Einbringen des L-Aminodesaminase-Gens in die Zelle zu der Produktion des L-Aminodesaminase-Enzyms, das den größten Teil des synthetisierten L-Phenylalanins zurück zu Phenylpyruvat desaminiert, während der Rest des vorhandenen L-Phenylalanins bei der Proteinproduktion verwendet wird. Das als Ergebnis der Desaminierungsreaktion hergestellte Phenylpyruvat kann durch das D-Aminotransferase-Enzym als Substrat eingesetzt werden, um mehr D-Phenylalanin herzustellen. Die Herstellung von D-Phenylalanin in der Zelle ist irreversibel, da in der Zelle kein Produkt eines D-Aminodesaminase-Gens vorhanden ist, um das D-Phenylalanin zu desaminieren.

[0040] Bei der Herstellung von D-Aminosäuren unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung ist es wünschenswert, dass erhöhte Spiegel von D-Aminosäure-Substrat für eine Verwendung als Amino-Donor bei der Transaminierungsreaktion vorliegen. Beispielsweise stellt bei der Herstellung von D-Phenylalanin eine Zugabe von D-Alanin zu der Zelle ausreichend hohe Spiegel von D-Alanin-Substrat für die Transaminierungsreaktion sicher.

[0041] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine racemische Mischung von Alanin den Zellen als Teil des Zellkulturmediums während der Fermentation zugesetzt. Zusätzlich wird ein zytoplasmatisches Alaninracemase-Gen (alr), das ein Alaninracemase-Enzym kodiert, in die Zelle eingebracht. Das Alaninracemase-Enzym hält in der Zelle das 50/50-D-/L-Alanin-Gleichgewicht aufrecht. Wenn die Menge von D-Alanin in der Zelle aufgrund der Wirkung des D-Aminotransaminase-Enzyms verbraucht wird, wandelt das Alaninracemase-Enzym L-Alanin zu D-Alanin um. Auf diese Weise wird die Gesamtmenge der D-,L-Alanin-Mischung für das D-Aminotransferase-Enzym als D-Alanin-Substrat für eine Verwendung als Amino-Donor bei der Transaminierungsreaktion außer der kleinen Menge, die in die Zellwand eingebaut wird, verfügbar gemacht. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das in die Zelle eingebrachte alr-Gen aus *Salmonella typhimurium* kloniert.

[0042] Andere geeignete Amino-Donoren, die Zellkulturen während der Produktion von D-Aminosäuren zugesetzt werden können, umfassen L-Alanin, L-Glutamat, L-Phenylalanin, L-Aspartat oder eine racemische Mischung von einer der vorerwähnten L-Aminosäuren. Vorzugsweise wird auch ein Racemase-Gen in die Zelle eingebracht, wie Glutamatracemase, Aspartatracemase oder Phenylalaninracemase, abhängig von dem vorhandenen Amino-Donor. Dementsprechend verfügt das D-Aminotransaminase-Enzym über erhöhte Mengen an D-Amino-Donor-Substrat, die für eine Verwendung bei der Transaminierungsreaktion zur Verfügung stehen.

[0043] Um die Produktion von D-Phenylalanin in der Zelle zu erhöhen, kann die Menge der Ketosäure-Vorstufe, d. h. Phenylpyruvat, in der Zelle erhöht werden, indem Gene eingebracht werden, die die geschwindigkeitslimitierenden Enzyme, die Phenylpyruvat produzieren, kodieren. Die Phenylpyruvatproduktion aus dem zellulären aromatische Aminosäuren-Biosynthese-Stoffwechselweg wird durch zwei geschwindigkeitslimitierende Enzyme, PheA und AroH, reguliert. Das Einbringen der Gene, die PheA und AroH kodieren, in die Zelle führt zu einer Überproduktion von Phenylpyruvat. Dementsprechend stellt das Erhöhen der Menge von Phenylpyruvat mehr Substrat für das Produkt des D-Aminotransferase-Gens für eine Umwandlung in D-Phenylpyruvat bereit.

[0044] Die Menge der Ketosäure-Vorstufe in der Zelle kann auch durch Hinzugeben der entsprechenden L-Aminosäure zu der Zelle erhöht werden. Im Falle der Zugabe einer L-Aminosäure desaminiert das L-Aminodesaminase-Enzym die L-Aminosäure unter Bildung der entsprechenden Ketosäure-Vorstufe. Die Ketosäure-Vorstufe kann dann durch das D-Aminotransferase-Enzym als ein Substrat verwendet werden, um in deren entsprechende D-Aminosäure umgewandelt zu werden.

[0045] Die Erfindung betrifft auch eine rekombinante Zelle, die ein exogenes D-Aminotransferase-Gen und ein exogenes L-Aminodesaminase-Gen umfasst. Die rekombinante Zelle der Erfindung kann des weiteren eine

D-Aminodesaminase-Gen-Mutation in der Zelle umfassen, so dass das D-Aminodesaminase-Gen nicht funktionell ist. Die rekombinante Zelle der Erfindung kann des weiteren ein exogenes Alaninracemase-Gen, ein exogenes aroH-Gen und ein exogenes pheA-Gen umfassen. Das exogene D-Aminotransferase-Gen kann ein *Bacillus sphaericus*-D-Aminotransferase-Gen sein, das exogene L-Aminodesaminase-Gen kann ein *Proteus myxofaciens*-L-Aminodesaminase-Gen oder ein *Proteus mirabilis*-L-Aminodesaminase-Gen sein und das exogene Racemase-Gen kann ein *Salmonella typhimurium*-Racemase-Gen sein.

[0046] Kulturen von rekombinanten Zellen der Erfindung werden verwendet, um enantiomerenreine D-Aminosäuren herzustellen. Der prozentuale Enantiomerenüberschuss (ee; „enantiomeric excess“) einer D-Aminosäure gegenüber einer L-Aminosäure, hergestellt unter Verwendung des offenbarten Verfahrens, kann bestimmt werden, indem die vorhandene Menge an L-Aminosäure von jener der vorhandenen D-Aminosäure abgezogen wird, durch die Gesamtmenge von D- und L-Aminosäure geteilt und mit 100 multipliziert wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird D-Phenylalanin in im wesentlichen reiner Form und in hohen Ausbeuten produziert. Das Herstellungsverfahren von D-Phenylalanin wird in **Fig. 2** veranschaulicht.

[0047] Eine Verwendung von Kulturen von rekombinanten Zellen der Erfindung unter Zugabe von D-, L-Alanin und L-Phenylalanin als zusätzliche Quellen von D-Alanin- und Phenylpyruvat-Substraten für das Produkt des D-Aminotransferase-Gens führte zu der Herstellung von 13,66 g/l D-Phenylalanin und 0,47 g/l L-Phenylalanin, einem 94%-igen Enantiomerenüberschuss. In dem Falle, wo nur D-, L-Alanin den Kulturen während des Fermentationsprozesses zugesetzt worden waren, führte dies zu der Herstellung von 4,15 g/l D-Phenylalanin und keinem L-Phenylalanin, einem 100%-igen Enantiomerenüberschuss. Im Gegensatz dazu werden, wenn kein D-, L-Alanin oder L-Phenylalanin den Zellkulturen während des Fermentationsprozesses zugesetzt wurden, 1,12 g/l D-Phenylalanin und 0,47 g/l L-Phenylalanin hergestellt, ein 41%-iger Enantiomerenüberschuss.

[0048] Die gemäß dem Verfahren der Erfindung hergestellten D-Aminosäuren können unter Verwendung von Vorgehensweisen, die den Fachleuten auf diesem Gebiet wohlbekannt sind, isoliert werden. Ein Verfahren zur Isolierung der unter Verwendung des offenbarten Verfahrens hergestellten D-Aminosäuren ist beispielsweise, wie folgt. Nach vollständigem Abschluss der Fermentation wird die Fermentationsbrühe von den Zellen abdekantiert. Die Brühe kann eingeeengt werden, um die Konzentration des D-Aminosäure-Produkts zu erhöhen. Die Einengung der Brühe wird typischerweise durch Erwärmen der Brühe auf Temperaturen zwischen 30°C und 100°C unter Vakuum ausgeführt. Die D-Aminosäure wird dann ausgefällt, indem der pH der Brühe auf einen Bereich von $\pm 1^\circ\text{C}$ ausgehend von dem isoelektrischen Punkt des Aminosäure-Produkts eingestellt wird. Während der pH-Einstellung wird das D-Aminosäure-Produkt ausfallen. Als nächstes wird der Niederschlag der D-Aminosäure von der Brühe durch Standardmethoden, die Filtration, Zentrifugation oder Dekantierung umfassen können, abgetrennt. Das isolierte Aminosäure-Produkt wird dann gewaschen und getrocknet.

[0049] In *Escherichia coli* werden die Aminosäuren Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Tyrosin, Valin, Leucin und Isoleucin direkt aus deren Ketosäure-Vorstufen synthetisiert. Zusätzlich zu einem Zugabe von entweder L-Aminosäuren oder racemischen Mischungen zu den rekombinanten Zellen während der Fermentation kann eine Überproduktion der Ketosäure-Vorstufe einer gewünschten Aminosäure durch das Einbringen von Genen, die die geschwindigkeitslimitierenden Enzyme für eine bestimmte Ketosäure produzieren, erreicht werden.

[0050] Die folgenden Beispiele werden bereitgestellt, um bestimmte Ausführungsformen der praktischen Ausführung der Erfindung spezieller und detaillierter zu erläutern. Sie dienen nur Veranschaulichungszwecken und es versteht sich, dass geringfügige Änderungen und Abänderungen an den Ausgangsmaterialien und/oder den Verfahrensparametern vorgenommen werden können.

Beispiel 1

ISOLIERUNG VON D-AMINOTRANSFERASE-DNA

[0051] Kulturen von *Bacillus sphaericus* wurden von der American Type Culture Collection, ATCC (ATCC-Aufnahmenummer **10208**) als Quelle von D-Aminotransferase-DNA erhalten. Kulturen wurden auf nicht-ergänzttem LB-Medium ausgestrichen und man ließ sie über Nacht sich bei 37°C vermehren. Um chromosomale DNA herzustellen, wurde eine einzelne Kolonie verwendet, um 50 ml Luria Broth in einem 1 l-Kolben, der über Nacht bei 300 Upm und 37°C geschüttelt wurde, anzupflanzen. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 10000 g für 5 min geerntet, in 0,85 Kochsalzlösung gewaschen und erneut bei 10000 g 5 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 5 ml 10 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, und 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) resuspendiert. Ein Aliquot von 50 µl RNase A wurde zugesetzt und die Lösung wurde sanft gemischt. Nachfolgend wurden 10 ml 0,4% Natriumdodecylsulfat (SDS) und 100 µg/ml Protease K der gemischten Lösung zugesetzt, die dann bei 37°C inkubiert wurde, bis sie klar war. Dann wurde Natriumacetat, pH 5,2, bis zu einer Endkonzentration von 300 mM zugesetzt. Sanfte Phenolextraktionen wurden unter Verwendung eines Volumens von Phenol, das ungefähr gleich zu der wässrigen Phase war, ausgeführt, bis an der Phasengrenzfläche kein weißes Präzipitat mehr sichtbar war. Die wässrige Phase wurde dann entfernt und die chro-

mosomale DNA wurde unter Verwendung von 2,5 Volumen Ethanol ausgefällt. Das DNA-Pellet wurde entfernt und in 300 mM Natriumacetat, pH 5,2, erneut solubilisiert. Es wurde eine Ethanol-Präzipitation ausgeführt und das DNA-Pellet wurde entfernt, getrocknet und in 2 ml destilliertem Wasser gelöst.

[0052] Die DNA-Konzentration wurde zu 150 µg/ml bestimmt. Zusätzlich zu der oben beschriebenen Vorgehensweise sind für die Isolierung von bakterieller DNA Standardverfahren bekannt und über diese wird beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, 2.4.1.-2.4.5 (Ausubel et al., Hrsg., 1994) berichtet.

[0053] Die wie oben beschrieben erhaltene chromosomale DNA wurde dann teilweise mit MboI verdaut. Ein idealer Verdau, der Fragmente im Bereich von 2–10 kb lieferte, wurde unter Verwendung von 13 µg chromosomaler DNA und Verdau für 40 min mit 2,5 MboI (New England Biolabs, Beverly, MA) erhalten. Ungefähr 13 µg wie oben angegeben hergestellte chromosomale DNA wurden mit 2,5 E MboI in einem Gesamtvolumen von 100 µl bei 37°C in MboI-Puffer von Biolabs teilweise verdaut. Proben von 17 µl wurden nach 5, 10, 20, 30, 40 Minuten entnommen und eine 15 µl-Probe wurde nach 50 min entnommen. Alle Proben wurden auf 65°C erwärmt, um jegliches Restriktionsenzym, das in der Probe vorhanden war, zu zerstören, welche Probe dann auf Eis gestellt wurde. Ein 5 µl-Aliquot von jeder Probe wurde einer Elektrophorese auf einem 0,8%-Agarosegel unter Verwendung von TBE-Puffer, wie in Sambrook et al (Hrsg.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press): 6.3-6.32 (1989), beschrieben, unterzogen. Aus den Elektrophoresedaten wurde bestimmt, dass die nach 40 Minuten entnommene Probe die Hauptmenge der DNA in dem 2–10 kb-Größenbereich enthielt, und es waren jene Fragmente, die verwendet wurden, um eine Bibliothek in dem Plasmid pIF306 für eine Expression der D-Aminotransferase zu konstruieren.

[0054] Das Plasmid pIF306 wurde von pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) abgeleitet. Um pIF306 zu konstruieren, wurde ein modifizierter pheA-Promotor zwischen den einmalig vorkommenden HindIII- und SphI-Stellen auf pBR322 inseriert. Innerhalb des HindIII bis SphI-Inserts gibt es einmalig vorkommende BamHI und BglII-Stellen. Der modifizierte pheA-Promotor war von jenem abgeleitet, der in dem von der Anmelderin ebenfalls besessenen U.S.-Patent Nr. 5,120,837 von Fotheringham et al., das, charakterisiert worden war, so dass die Sequenz, wie folgt, war:

```

HindIII          35          10
AAGCTTTTGTGACAGCGTGAAAACAGTACGGCTATAAFACT

          BamHI          Start
AAAGTCACAAGGAGGATCCACTATGACATCGGAAAACCCGTTACT

HaeII
GGCGCT (SEQ ID NO: 1).

```

Vektor-DNA wurde hergestellt, indem pIF306 mit BamHI und BglII, von welchen jedes Ende produziert, die mit jenen, die durch MboI produziert werden, verträglich oder kompatibel sind, vollständig verdaut wurde. Der Verdau wurde bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 h unter Verwendung von 0,5 µg Plasmid-DNA und 2 Einheiten von jedem Enzym ausgeführt. Es wurden Fragmente von 4,25 kb und 1,25 kb erzeugt und durch Elektrophorese auf einem 1%-Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Das gewünschte 4,25 kb-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung eines Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) zurückgewonnen. Jenes Fragment wurde dann mit Phosphatase aus Kälberdarm (New England Biolabs, Beverly, MA) bei 37°C 1 h in einem Volumen von 20 µl mit 1 Einheit des Enzyms in Biolabs-Puffer # 2 gemäß den Anweisungen des Herstellers behandelt, um die Enden der DNA zu dephosphorylieren und eine Rezirkularisierung zu verhindern. Die Mischung wurde dann mit einem PCR-Reinigungskit (Qiagen) behandelt, um das DNA-Fragment frei von Enzym zu isolieren.

[0055] Das pIF306-Vektorfragment wurde an die Fragmente aus dem vierzigminütigen teilweisen Verdau (siehe oben) von chromosomaler ATCC 10208-DNA ligiert, indem ungefähr 20 ng Vektorfragment mit den restlichen ungefähr 12 µl des vierzigminütigen teilweisen Verdau zusammengegeben wurden. Die Ligation wurde unter Verwendung eines Takara Ligation Kit (Takara Biochemicals, PanVera Corporation, Madison, WI) gemäß den Anweisungen des Herstellers bewerkstelligt. Die Ligation wurde bei 17°C 2 h ausgeführt, zu welchem Zeitpunkt die DNA unter Verwendung eines PCR-Reinigungskits (Qiagen) in einem Endvolumen von 50 µl zurückgewonnen wurde. Die resultierenden Plasmide wurden in Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA) durch Elektroporation unter Verwendung eines auf 2,5 kV eingestellten Bio-Rad Gene Pulser™ mit 25 µF Kapazität und eines Bio-Rad-Pulskontrollgeräts, das auf 200 Ohm Widerstand eingestellt war, eingeschleust.

[0056] Transformanten wurden auf LB-Medium, ergänzt mit 50 µg/ml Ampicillin, ausplattiert. Es wurden ungefähr 20000 Transformanten hergestellt und gepoolt. Dann wurde Plasmid-DNA isoliert, wie in Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., Hrsg., 2. Aufl., 1989) berichtet. Die resultierende Plasmid-DNA wurde in Escherichia coli, Stamm WM335, durch Elektroporation unter Verwendung eines auf 2,5 kV einge-

stellten Bio-Rad Gene Pulser™ mit 25 µF Kapazität und eines Bio-Rad-Pulskontrollgeräts, das auf 200 Ohm Widerstand eingestellt war, eingeschleust. Der Stamm WM335 kann von der Phabagen Collection, Department of Molecular Cell Biology, State University of Utrecht, Niederlande, erhalten werden und darüber war in Lugtenberg et al., J. Bacteriol., 114: 499-506 (1973) berichtet worden. Zellen wurden in BioRad Gene Pulser™-Küvetten mit einem 0,2 cm-Spalt gepulst. Zu transformierende Escherichia coli-Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,7 bei 600 nm gezogen (50 ml-Kulturen). Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 10000 g für 5 min gewonnen und in 30 ml entionisiertem destilliertem Wasser gewaschen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 200 µl entionisiertem destilliertem Wasser resuspendiert und 40 µl Zellen wurden mit 10 µl der gewonnenen Ligationsmischung zusammengegeben und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Küvette wurde mit einem einzigen Puls behandelt und 500 µl SOC-Medium (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) wurden zugesetzt und mit der Zellsuspension gemischt. Der Inhalt der Küvette wurde dann in ein 20 ml-PVC-Röhrchen transferiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann auf passenden Medien ausplattiert und selektiert, wie oben beschrieben. Für das Transformieren/Transfizieren von Mikroorganismen mit DNA sind zahlreiche Medien bekannt und können in Verfahren gemäß der Erfindung verwendet werden. Siehe z. B. Chang et al. (Hrsg.), Guide to Electroporation and Electrofusion (Academic Press, 1992).

[0057] Transformanten wurden auf LB-Medium, ergänzt mit 50 µg/ml Thymin und 60 µg/ml Ampicillin, dem aber D-Glutamat fehlte, ausplattiert. Nur jene Transformanten, die in der Lage waren, D-Glutamat herzustellen, überleben auf jenem Medium. Gemäß Berichten in der Literatur sollten alle derartigen Zellen notwendigerweise Transformanten sein, die das dat-Gen von Bacillus sphaericus tragen, da angenommen wurde, dass Bacillus sphaericus eine Glutamatracemase fehlt. Es wurden jedoch zwei unterschiedliche Klassen von Transformanten durch die oben beschriebene Vorgehensweise isoliert, eine, die das dat-Gen enthielt, und die andere, die eine Glutamatracemase enthielt. Der Racemase enthaltende Klon wurde als pIF1001 bezeichnet und der dat enthaltende Klon wurde als pIF1002 bezeichnet. **Fig. 3** ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion von pIF1002 zeigt.

[0058] In jedem Falle wurden die Klone durch Restriktionsendonukleaseverdau kartiert und die Gene wurden sequenziert. Die Sequenz des dat-Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz des kodierten Proteins sind in SEQ ID NOS: 2 und 3 gezeigt. Es wurde festgestellt, dass das dat-Gen ein hohes Ausmaß an Sequenzhomologie zu der einzigen anderen bekannten dat-Gensequenz aufwies. Siehe Tanizawa et al., J. Biol. Chem., 264: 2450-2454 (1989). Jedoch stimmte die C-terminale Aminosäuresequenz der durch das Bacillus sphaericus-dat-Gen in pIF1002 kodierten D-Aminotransferase nicht mit jener des einzigen anderen veröffentlichten Berichts über eine Bacillus sphaericus-D-Aminotransferase, in welchem nur eine C-terminale Sequenz veröffentlicht worden war, überein. Jene Sequenz, über die in Transaminases, Christen et al. (Hrsg.), 464 (1995), berichtet wurde, war Val-Ile-(Phe-Tyr)-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 4). Im Gegensatz dazu ist die korrekte C-terminale Sequenz, wie sie in der vorliegenden Erfindung bereitgestellt wird, Leu-Pro-Ile-Ser-Ile-Asn-Ala (SEQ ID NO: 5). Es wurde ohne Erfolg versucht, die in Christen berichtete Sequenz zu verwenden, um ein Bacillus sphaericus-D-Aminotransferase kodierendes Gen zu isolieren.

[0059] Beide Klone wurden dann einem biologischen Assay auf die Anwesenheit des dat-Gens hin unterzogen. Über jenen Assay war in Methods in Enzymology, 113: 108-113 (19), berichtet worden. Kurz zusammengefasst, wurden Kulturen von pIF1001 oder pIF1002 in WM335-Zellen in 50 ml LB-Medium, ergänzt mit 50 µg/ml Thymin und 200 µg/ml Ampicillin, erstellt. Die Kulturen wurden über Nacht in 500 ml-Kolben in einem Inkubationsschüttler bei 37°C gezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 10000 g für 5 min geerntet und in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 8,5 gewaschen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 1 ml 50 mM Kaliumphosphat bei pH 8,5 aufgenommen. Die Zellen wurden dann unter Verwendung einer French-Press bei 1000 lbs/in² lysiert und die Lysate wurden 30 min in einer Mikrofuge bei 14000 g zentrifugiert, zu welchem Zeitpunkt der Überstand durch eine Mikropipette entnommen wurde. Die resultierenden Zellextrakte wurden unter Verwendung des Lactatdehydrogenasegekoppelten Assays, wie in Methods in Enzymology, 113: 108-113 (19) berichtet, untersucht. Die Assaymischung enthielt 0,3 M Kaliumphosphat, pH 8,5, 25 mM D-Alanin, 25 mM α-Ketoglutarat, 0,1 mM NADH, 70 µg/ml Lactatdehydrogenase und 50 µl Zellextrakt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des NADH und der Lactatdehydrogenase zu den anderen Komponenten in einer 1 ml-Küvette bei 25°C gestartet. Die Reaktion erzeugte eine Veränderung bei der Absorption bei 338 nm als Nachweis der Oxidation von NADH. Um eine Korrektur hinsichtlich einer nichtspezifischen Oxidation vorzunehmen, erfolgten Kontrollassays unter Verwendung einer Assay-Mischung, der Zellextrakt fehlte. Als eine zusätzliche Kontrolle erfolgten Assays unter Verwendung einer Assay-Mischung, der D-Alanin fehlte. Extrakte von nicht-transformierten WM335-Zellen und Kontrollen erzeugten im wesentlichen identische Veränderungen bei der Absorption, wohingegen WM335-Zellen, die pIF1002 trugen, Veränderungen bei der Absorption zeigten, die mehr als 30-fach größer waren als die Kontrollen. Der dat enthaltende Klon wies Aktivitätsniveaus auf, die ungefähr 100-fach größer waren als bei Extrakten von Bacillus sphaericus, eine Folge einer Überexpression auf dem Plasmid pIF306 mit hoher Kopienzahlen. Das Plasmid pIF1001 hatte eine Aktivität, die identisch zu jener der Kontrollen war.

Beispiel 2

KONSTRUKTION DES PLASMIDS pIF1003

[0060] Das Plasmid pIF1003 war ein Derivat von pIF1002, das den Partitions (Par)-Genort des Plasmids pLG338 (Stoker et al., Gene 18: 355–341 (1982)) trägt. Der Partitions-Genort von Plasmid pLG338 (Stoker et al., Gene 18: 355–341 (1982)). Der Partitions-Genort kontrolliert die Plasmidpartitionierung oder -aufteilung während der Zellteilung, und indem er dies tut, verleiht dieser Plasmid-Vektoren eine erhöhte Segregationsstabilität. Er ist nützlich, um die Notwendigkeit für eine Antibiotika-Selektion bei der Erhaltung von Plasmiden zu verringern oder zu beseitigen. Der Partitions-Genort kann aus pLG338 isoliert werden unter Verwendung von PCR mit den folgenden Oligonukleotid-Primern:

5'GCCATCTCCTTGCATGCACCATTC 3' (SEQ ID NO: 6)

5'CCCTCGCAAGCTCGTCCGGAGGCAAATCGCTGAATATTCC 3' (SEQ ID NO: 7)

Das resultierende 992 bp-Fragment wurde dann mit den Restriktionsenzymen SphI und BspEI (New England Biolabs, Beverly, MA) verdaut und das resultierende SphI bis BspEI-Fragment von 965 bp wurde unter Verwendung eines QIAquick-Gelextraktionskits (QIAGEN) nach einer Elektrophorese auf einem 1%-Agarose-TBE-Gel isoliert. Dieses Fragment wurde dann an das 5,8 kD-DNA-Fragment, das durch BspEI-Spaltung und teilweise SphI-Spaltung von pIF1002 produziert worden war, ligiert, wodurch pIF1003 erzeugt wurde. Fig. 4 ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion von pIF1003 zeigt.

Beispiel 3

KONSTRUKTION DES PLASMIDS pIF321

[0061] Um einen Vektor zu konstruieren, der die Herstellung von D-Phenylalanin in einer Wirtszelle ermöglicht, wurde das dat-Gen aus pIF1002 unter Verwendung von PCR isoliert. Eine Amplifizierung der dat kodierenden Region erfolgte unter Verwendung eines Amplitag™-PCR-Kits (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) in einem 0,2 ml MicroAmp™-Reaktionsröhrchen (Perkin-Elmer, Norwalk, CT), zu welchem 100 ng pIF1002-DNA (1 µl); jeweils 5 µl der Primer

MB1809 5' CGCAGATCTACTATGGCATACTCATTATGG 3' (SEQ ID NO: 8); und

MB1810 5' CATGCCATGGATCCTCCTTTTAGGTAGCTCTTTTAAATC 3' (SEQ ID NO: 9)

in einer Konzentration von jeweils 10 nM/ml; jeweils 2 µl von dATP, dCTP, dTTP und dGTP (jeweils 10 mM); 10 µl Puffer, umfassend 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl₂, 100 mM Tris (pH 8,3) und 0,01% Gelatine; eine Taq-DNA-Polymerase (0,5 µl bei 5 E/µl, Amplitag™); und destilliertes Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 100 µl zugesetzt wurden. Das Röhrchen wurde mit einer Kappe verschlossen und in einen 9600 Thermal Cycler von Perkin Elmer gesetzt. Die Amplifizierung wurde durch Vorwärmen für 3 min bei 94°C, gefolgt von 25 Zyklen von Denaturierung für 30 s bei 94°C, Anhybridisierung ("annealing") für 30 s bei 50°C und Verlängerung für 90 s bei 72°C ausgeführt. Die Reaktionsmischung wurde bei 4°C aufbewahrt.

[0062] Das resultierende PCR-Produkt von ungefähr 914 bp wurde mit BglII und NcoI verdaut und das Produkt wurde dann in das BamHI bis NcoI-Fragment von 4,5 kb von pIF306 unter Verwendung eines Ligation Kit (Takara Biochemicals) gemäß den Anweisungen des Herstellers ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als pIF318 bezeichnet. Die Konstruktion von pIF318 ist in Fig. 5 gezeigt.

[0063] Das Plasmid pIF319 basierte auf dem Plasmid pLG338, das in dem von der Anmelderin ebenfalls besessenen U.S.-Patent Nr. 5,354,672 offenbart wurde, wobei der Kanamycinresistenz-Marker durch einen Chloramphenicolresistenz-Marker ersetzt war, um einen Konflikt mit einem potentiellen Wirtstamm, Escherichia coli HW857, der ein Kanamycinresistenzgen trägt, zu vermeiden. Das Plasmid pIF319 enthält das pheA34-Gen, wie in dem von der Anmelderin ebenfalls besessenen U.S.-Patent 5,120,837 offenbart, und das aroH-Gen in einem synthetischen Operon zwischen den einmalig vorkommenden EcoRI- und Sall-Stellen in pLG338. Das pheA34-Allel enthält eine Modifizierung in der pheA kodierenden Sequenz, die die Phenylala-

nin-vermittelte Rückkopplungs-Hemmung des Enzyms substantiell verringert. Es enthält auch eine deregulierte Version der pheA-Promotorregion, der die Attenuator-Sequenz fehlt und die eine erhöhte Expression von damit verbundenen Genen ermöglicht. Die Anwesenheit von pheA34 und aroH dereguliert wirksam Stoffwechselwege zu Phenylpyruvat in *Escherichia coli* W3110 und in einem jeglichen *Escherichia coli*-K12-Stamm. Das Plasmid pIF319 kann auch von pJN307, das in dem U.S.-Patent Nr. 5,120,837 offenbart wird, durch Einführung des *Escherichia coli*-aroH-Gens zwischen die einmalig vorkommenden BamHI- und Sall-Stellen in pJN307, gefolgt von einer Einführung des *Escherichia coli*-aspC-Promotors in die BamHI-Stelle abgeleitet werden. Das aroH-Gen wurde aus *Escherichia coli* W3110 durch PCR unter Verwendung der Primer

5' CGCGGATCCTCGTCATGAACAGAACTGACGAACTCCG 3' (SEQ ID NO: 10)

und 5' ACGCGTCGACTCAGAAGCGGGTATCTACCGCAGAGG 3' (SEQ ID NO:

11) isoliert. Das resultierende PCR-Fragment wurde mit BamHI und Sall geschnitten und an das 8 kb-Fragment, das durch eine entsprechende Spaltung von pJN307 erzeugt worden war, ligiert. Die aspC-Promotorregion wurde dann an der einmalig vorkommenden BamHI-Stelle in dem resultierenden intermediären Plasmid inseriert. Die aspC-Promotorregion wurde aus *Escherichia coli* W3110 durch PCR isoliert unter Verwendung der Primer

5' GGAAGATCTTACATCATCAACCAGATCGATTCTG 3' (SEQ ID NO:

12) und 5' CGCGGATCCATTATGGTTACAGAAGGGAAGTCC 3' (SEQ ID

NO: 13). Das resultierende Fragment von ungefähr 278 bp wurde dann mit BglII und BamHI geschnitten und an den an einer einmalig vorkommenden BamHI-Stelle geschnittenen Vektor ligiert. Die resultierende Ligation führt zu einer DNA-Sequenz, die mit BglII nicht und mit BamHI nur einmal geschnitten werden kann und bietet dementsprechend ein einfaches Mittel für die Verifizierung der Orientierung des aspC-Promotors. Das resultierende Konstrukt ist pJN326. Die Konstruktion von pJN326 ist in Fig. 6 gezeigt. Das Plasmid pJN319 wurde aus pJN326 durch Deletion des Hauptteils (520 bp) des Kanamycinresistenzgens durch Spaltung mit HindIII und XhoI und Insertion eines DNA-Fragments, das das Chloramphenicolresistenzgen von pHSG415 kodiert, erzeugt. Das Chloramphenicolresistenzgen von pHSG415 wurde durch PCR isoliert unter Verwendung der Primer

5' CCGCTCGAGCCCGACGCACTTTGCGCCGA 3' (SEQ ID NO: 14) und

5' CCCAAGCTTATCAGGCTCTGGGAGGCAG 3' (SEQ ID NO: 15).

[0064] Das resultierende Fragment von ungefähr 1191 bp wurde mit HindIII und XhoI geschnitten und an das 8,87 kb-Fragment, das durch eine entsprechende Spaltung von pJN326 erzeugt worden war, ligiert. Das resultierende Plasmid ist pIF319. Die Konstruktion von pJN319 ist in Fig. 7 gezeigt.

[0065] Das pIF318-Plasmid wurde mit BamHI und SphI für die Insertion eines dadX-Gens geschnitten, um das Plasmid pIF320 zu konstruieren. Der MB1810-Primer, auf den oben Bezug genommen wurde, enthält eine BamHI-Stelle (GGATCC), die mit der NcoI-Stelle in jenem Primer überlappt. Es ist die BamHI-Stelle (und die stromabwärts liegende SphI-Stelle), die für die Einführung von dadX zur Bildung eines synthetischen Operons, das dat und dadX umfasst, verwendet wurde. Die dadX-Gensequenz wurde aus der Datenbank Genbank, Referenzcode ECODADAX, erhalten. Ausgehend von jener Sequenz wurden die PCR-Primer

MB1811, 5' CGCGGATCCACTATGACCCGTCCGATACAGGCC 3' (SEQ ID

NO: 16) und

MB1816, 5' TGCCATGCATGCCTACAGTTGCTGACCAGCCGG 3' (SEQ ID

NO: 17)

gestaltet und verwendet, um das dadX-Gen aus *Escherichia coli*, Stamm W3110, (ATCC-Aufnahmenummer 27325) zu isolieren. Die Amplifizierungsbedingungen waren genau, wie oben beschrieben. Das Gen wurde ohne seinen nativen Promotor isoliert und unmittelbar stromabwärts von dem dat-Geninsert ligiert. Eine Amplifizierung führt zu einem Fragment von ungefähr 1171 bp, das mit BamHI und SphI geschnitten und an pIF318, das in entsprechender Weise unter Bildung eines Fragment von ungefähr 4,8 kb verdaut worden war, ligiert wurde. Das resultierende Plasmid wurde als pIF320 bezeichnet und trägt die dat- und dadX-Gene in einem synthetischen Operon. Die Konstruktion von pIF320 ist in Fig. 8 gezeigt.

[0066] Dann wurde ein zusätzliches Plasmid, das als pIF321 bezeichnet wurde, konstruiert. Das Plasmid pIF321 wurde erzeugt, indem pIF320 mit HindIII und SphI geschnitten wurde und das 2,1 kb-Fragment, das

die dat- und dadX-Gene trägt, isoliert wurde, das dann an das durch eine entsprechende Spaltung von pIF319 erzeugte 9,2 kb-Fragment ligiert wurde. Die Konstruktion von pIF321 ist in **Fig. 9** gezeigt. Das pIF321-Plasmid enthält dat und dadX-Gene von pIF320 isoliert auf einem HindIII bis SphI-Fragment (HindIII – Promotor – dat – dadX – SphI) und ligiert in pIF319, das das oben beschriebene pheA34-Allel zusammen mit dem aroH-Gen, das die Tryptophan-abhängige DAHP-Synthase von Escherichia coli kodiert, enthält.

Beispiel 4

KONSTRUKTION DES PLASMIDS pIF333

[0067] Um Plasmid pIF333 zu erzeugen, wurde das Plasmid pIF321 zuerst unter Verwendung der Enzyme SphI und Sall geschnitten, wodurch Fragmente von 6,9 kB und 4,5 kB erhalten wurden. Das 6,9 kB-Fragment kann unter Verwendung eines QIAquick-Geleextraktionskits (QIAGEN) nach einer Elektrophorese auf einem 1%-Agarose-TBE-Gel isoliert werden. Dieses Fragment wurde dann an das 89 bp-Fragment, das ausgehend von einer SphI- und Sall-Spaltung von pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) erzeugt und in entsprechender Weise aus einem 2%-Agarose-TBE-Gel isoliert worden war, ligiert. Das resultierende Plasmid ist pIF333. Die Konstruktion von pIF333 ist in **Fig. 10** gezeigt.

Beispiel 5

KONSTRUKTION VON pALR18

[0068] Das alr-Gen, das Alaninracemase kodiert, wurde aus dem Salmonella typhimurium-Stamm mit der ATCC-Aufnahmenummer 19585, der von der ATCC erhalten worden war, isoliert. Das alr-Gen wurde durch PCR isoliert unter Verwendung der Oligonukleotid-Primer:

5' CGCGGATCCACTATGCAAGCGGCAACAGTCGTC 3' (SEQ ID NO:
19)

5' GGAGCATGCTTATTCAATATACTTCATCGCCAC 3' (SEQ ID NO:
19)

[0069] Das 1098 bp-PCR-Produkt wurde mit BamHI und SphI geschnitten, was ein BamHI bis SphI-Fragment von 1082 ergibt, das unter Verwendung eines QIAquick-Geleextraktionskits (QIAGEN) nach einer Elektrophorese auf einem 1%-Agarose-TBE-Gel isoliert wurde. Dieses Fragment wurde dann an das 5,7 kB-Fragment von pIF333 ligiert, wodurch pALR18 erzeugt wurde. Die Konstruktion von pALR18 ist in **Fig. 11** gezeigt.

Beispiel 6

ISOLIERUNG DES L-AMINODESAMINASE-GENS UND KONSTRUKTION DES PLASMIDS pPT363

[0070] Das L-Aminodesaminase-Gen (lad) wurde aus dem Chromosom eines Proteus myxofaciens-Stamms mit der ATCC-Aufnahmenummer 19692 isoliert unter Verwendung einer PCR-Reaktion, welche unter Standardbedingungen ausgeführt wurde unter Verwendung einer Verlängerungszeit von 2 min und der folgenden Oligonukleotide:

ME 2198:

5' TTTAGCGCATGCAAGGAGGATCAACTATGAACATTTCAAGGAGAAAG 3'
(SEQ ID NO:20)

ME2201:

5' AGCTTTGTGTCGACGGGCCCTTACTTAAAACGATCCAAAC 3' (SEQ ID
NO:21)

[0071] Das Fragment wurde durch die Enzyme SphI und Sall geschnitten und an das 6,84 kb-Fragment von pALR18, das durch eine entsprechende Spaltung hergestellt worden war, ligiert. Das resultierende Plasmid wurde pPT362 benannt. Die Konstruktion von pPT362 ist in **Fig. 12** gezeigt.

[0072] Das Plasmid pPT363 wurde aus pPT362 und dem Plasmid pIF321 erzeugt. Sowohl pPT362 als auch

pIF321 wurden mit XhoI und Apal geschnitten. Das 4,67 kB-Fragment von pPT362 und das 7,49 kB-Fragment von pIF321 wurden isoliert und ligiert, wodurch pPT363 erzeugt wurde. Die Konstruktion von pPT363 ist in **Fig. 13** gezeigt.

Beispiel 7

KONSTRUKTION DES STAMMS IF3

[0073] Der Escherichia coli-Stamm pIF3 wurde von RY347 (ATCC-Aufnahmenummer **69766**) abgeleitet. RY347 wurde zu tyrB⁺ unter Verwendung der Standard-P1-Transduktionsmethodik, wie in Miller et al., A Short Course in Bacterial Genetics, beschrieben, transduziert. Die Selektion auf tyrB⁺-Transduktanten war der Verlust von Tyrosin-Auxotrophie; in entsprechender Weise wurde der Stamm zu ilvE⁺ transduziert, wobei auf den Verlust von Isoleucin-Auxotrophie selektiert wurde. Das resultierende Isolat wurde als pIF3 bezeichnet.

Beispiel 8

FERMENTATIONSVERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON D-PHENYLALANIN OHNE ZUGABE EINES EXTERNEN AMINO-DONORS

[0074] Der Stamm IF3 wurde mit den Plasmiden pPT363 und pIF1003 transformiert. Der transformierte IF3-Stamm wurde verwendet, um einen 2800 ml-Fernbach-Kolben anzupflegen, der 1 l des folgenden Kulturmediums enthielt:

Dikaliumhydrogenphosphat	13 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g
Ammoniumphosphat	4 g
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,24 g
Hefeextrakt	2 g
Magnesiumsulfat (7*H ₂ O)	1 g
Wasser	930 ml

[0075] Der Stamm wurde bis zu 800–900 Klett-Einheiten gezogen und verwendet, um den Fermenter anzupflegen. Der Fermenter war ein 20 l-Biolaffite 78–100 (St. Germain-en-Laye, Frankreich). Das Folgende sind die Bedingungen, unter welchen der Fermenter betrieben wurde.

Bewegung	500 Upm
Temperatur	32°C
Gegendruck	0,7 bar
pH	7,2 mit 50% KOH
Belüftung	1 vvm
Festgelegtes Volumen	10 l
Animpfung	1 l
Laufzeit	67 h

[0076] Das verwendete Fermentationsmedium ist in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Magnesiumsulfat (7*H ₂ O)	5,35 g l
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,3 g/l
Dikaliumhydrogenphosphat	4,6 g l
Mangansulfat	0,023 g/l
Schaumverhütungsmittel Mazur Mazu DF204	0,4 ml
(NH ₄) ₂ HPO ₄	21 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
L-Alanin	1 g/l

[0077] Während des Fermentationsprozesses wurde Glucose mit einer variablen Rate eingespeist, so dass eine Konzentration von 10–15 g/l während der ersten 12 h, dann weniger als 1 g/l während der restlichen Zeit bei insgesamt 1204 g in 48 h erzielt wurde. Die Fermentation führte dazu, dass 1,12 g/l D-Phenylalanin und 0,47 g/l L-Phenylalanin hergestellt wurden.

Beispiel 9

FERMENTATIONSVERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON D-PHENYLALANIN MIT ZUSÄTZLICHER EIN-
SPEISUNG VON D-,L-ALANIN ALS AMINO-DONOR

[0078] Das Fermentationsverfahren für Beispiel 9 war identisch zu dem Fermentationsverfahren in Beispiel 8 mit Ausnahme der folgenden Aspekte. Die gesamte eingespeiste Glucose betrug 1976 g über 48 h. Der Hefeextrakt wurde in einer Konzentration von 2 g/l verwendet. Das Fermentationsmedium umfasste eine Einspeisung von D-, L-Alanin, wobei eine Gesamtmenge von 1400 ml von 167 g/l D-, L-Alanin mit einer Rate von 1,9 ml/min beginnend 12 h nach dem Beginn der Fermentation eingespeist wurde. Die Fermentation führte dazu, dass 4,15 g/l D-Phenylalanin und 0 g/l L-Phenylalanin hergestellt wurden.

Beispiel 10 FERMENTATIONSVERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON D-PHENYLALANIN UNTER ZUGA-
BE VON D-,L-ALANIN ALS AMINO-DONOR UND L-PHENYLALANIN ALS KETOSÄURE-VORSTUFE

[0079] Das Fermentationsverfahren für Beispiel 10 war identisch zu Beispiel 8 mit Ausnahme der folgenden Aspekte. Das bei der Fermentation verwendete Kulturmedium ist in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Magnesiumsulfat (7*H ₂ O)	8,03 g l
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,195 g/l
Dikaliumhydrogenphosphat	6,9 g/l
Mangansulfat	0,0345 g l
Schaumverhütungsmittel Mazur Mazu) DF204	0,6 ml
(NH ₄) ₂ HPO ₄	31,5 g/l
Hefeextrakt	7,5 g/l
L-Alanin	1,5 g/l

[0080] Die eingespeiste Glucosemenge betrug 2021 g über 52 h. Das Fermentationsmedium umfasste eine Einspeisung von D-, L-Alanin, wobei eine Gesamtmenge von 1400 ml von 167 g/l D-, L-Alanin mit einer Rate von 1,9 ml/min beginnend 12 h nach dem Beginn der Fermentation eingespeist wurde. Zusätzlich wurde L-Phenylalanin mit derselben Konzentration und Rate wie das D-, L-Alanin eingespeist. Die Fermentation führte dazu, dass 13,66 g/l D-Phenylalanin und 0,87 g/l L-Phenylalanin hergestellt wurden.

Beispiel 11

KONSTRUKTION DES PLASMIDS pPT361

[0081] Das Plasmid pPT361 wurde von pIF306 abgeleitet, wie folgt. pIF306 wurde mit den Enzymen BamM und SphI geschnitten. Das 3,9 kb-Fragment wurde isoliert und an ein in entsprechender Weise geschnittenes Fragment ligiert, welches das Escherichia coli K12-ilvE-Gen enthielt, das durch PCR ausgehend von dem W3110-Chromosom erzeugt worden war unter Verwendung der folgenden Oligonukleotid-Primer:

5' CGC GGA TCC ACT ATG ACC ACG AAG AAA GCT GAT TAC ATT
TGG 3' (SEQ ID NO:22)

5' CAG CGT GCA TGC TTA TTG ATT AAC TTG ATC TAA CCA GC
3'
(SEQ ID NO:23)

[0082] Der resultierende Vektor wurde pIF307 benannt. Das Plasmid pIF307 wurde mit den Enzymen EcoRI und PstI geschnitten und das 4,1 kb-Fragment isoliert. Dieses wurde an ein in entsprechender Weise geschnittenes und gereinigtes 982 bp-DNA-Fragment ligiert, das das Kanamycinresistenzgen aus pLG338 enthielt. Dieses wurde erzeugt unter Verwendung von PCR mit den folgenden Oligonukleotid-Primern:

5' CCG GAA TTC ACG TTG TGT CTC AAA ATC TCT GAT 3'
(SEQ ID NO:24)

5' CCG CTG CAG GCC GTC CCG TCA AGT CAG CGT AAT G 3'
(SEQ ID NO:25)

[0083] Das resultierende geschnittene Plasmid wurde pIF312 benannt. Das Plasmid pIF12 wurde durch EcoRI und BamHI geschnitten und an das C1857-Gen des Phagen lambda ligiert, das in entsprechender Weise geschnitten worden war nach einer Isolierung durch PCR unter Verwendung des Lambda-ZapII-Vektors (Stratagene, La Jolla, CA) als Matrice und der folgenden Oligonukleotid-Primer:

5' TTTGGATCCTCCTTAGTACATGCAACC 3'
(SEQ ID NO:26)

5' TTTGAATTCGGATGAAGATTCTTGCTCGATTGT 3'
(SEQ ID NO:27)

[0084] Das resultierende Plasmid wurde pPT353 benannt. Dieses Plasmid wurde dann mit PstI und EagI geschnitten und das 3,17 kb-Fragment wurde isoliert. Dieses wurde an das in entsprechender Weise geschnittene 2,5 kb-Fragment ligiert, das durch eine entsprechende Spaltung von pIF1003 erzeugt worden war. Der resultierende Vektor wurde isoliertes 4,7 kb-Fragment benannt. Dieses wurde an den folgenden Oligonukleotid-Linker ligiert

5'
GATCCTAGGTACCGGTGCGGCCGCATGCTGACTGACTGAAGATCCCGGGCGATTCTACGCCCCGGGTTTTTTATG 3' (SEQ ID NO:28)

5'
TCGACATAAAAAACCCGGGCGTAGAATCGCCCGGGATCTTCAGTCAGTCAGCATGCGGCCGCACCGGTACCTAG 3' (SEQ ID NO:29)

[0085] Das resultierende Plasmid wurde pPOT2 benannt. Dieses Plasmid wurde mit XhoI und PstI geschnitten und das 3,9 kb-Fragment isoliert. Dieses wurde an ein Fragment ligiert, welches das Chloramphenicolresistenzgen enthielt, das durch PCR isoliert worden war unter Verwendung von pIF319-Plasmid-DNA als Matrice und der folgenden Oligonukleotid-Primer.

5' GAC CTC GAG GCA CTT TGC GCC GAA TAA ATA CCT GTG 3'
(SEQ ID NO:30)

5' GAC CTG CAG CAC CAG GCG TTT AAG GGC ACC AAT AAC 3'
(SEQ ID NO:31)

[0086] Das resultierende Plasmid wurde pPOT3 benannt. Dieses wurde mit BamHI und SphI geschnitten. Das 4,8 bp-Fragment wurde isoliert und an ein in entsprechender Weise geschnittenes Fragment, das das Proteus myxofaciens-Lad-Gen enthielt, ligiert. Dieses wurde durch PCR aus dem Chromosom aus ATCC 19692 isoliert unter Verwendung der folgenden Oligonukleotid-Primer:

5' TTTGGATCCAAGATGAACATTTCAAGGAGAAAG 3'
(SEQ ID NO:32)

5' AGCTTTGTGCGACGCATGCTTACTTCTTAAAACGATCCAAAC 3'
(SEQ ID NO:33)

Beispiel 12

BESTIMMUNG VON Lad-AMINOSÄURE-SUBSTRATEN

[0087] Es wurde unter Verwendung des folgenden Dünnschichtchromatographie (DSC)-Lad-Assays bestimmt, dass jedes der in Tabelle 1 aufgelisteten Aminosäure-Substrate ein geeignetes Substrat für das Lad-Enzym war. Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, erhalten.

[0088] Die Assaymischung enthielt 10 mg/ml von einem der in Tabelle 1 aufgelisteten Aminosäuresubstrate und 100 mM Tris-HCl mit einem pH von 7,5. Die Assaymischung (2 ml) wurde zu 100 mg Zellpellet von dem Stamm W3110, der das Plasmid pPT361, welches das Lad-Gen enthielt, enthielt, zugesetzt.

[0089] Zellen wurden ausgehend von einer Übernachtskultur von 200 ml LB-Medium (Difco, Detroit, Michigan) bei 37°C in 1 l-Schüttelkolben hergestellt. Zellen wurden einmal in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert. Die Reaktion wurde 16 h bei 37°C ausgeführt. 0,005 ml der Reaktionsmischung wurden auf Kieselgel-DSC-Platten #60 F-254 (EM Science Cincinnati OH) als Fleck aufgetragen.

[0090] Die Chromatographie wurde unter Verwendung des folgenden Laufmittels ausgeführt: Wasser (40%); Methanol (40%); und Acetonitril (20%). Die DSC-Platten wurden luftgetrocknet und mit 2% Ninhydrin in Ethanol besprüht und dann 10 min gebacken.

[0091] Die Umwandlung von jeder der in Tabelle 1 aufgelisteten Aminosäuren zu deren entsprechenden Ketosäuren wurde anhand des Fehlens von sich von Aminosäure ableitenden Flecken gegenüber gleichzeitig der Chromatographie unterzogenen bekannten Standardverbindungen bestimmt. Es wurde festgestellt, dass jedes der in Tabelle 1 aufgelisteten Aminosäure-Substrate ein geeignetes Substrat für das Lad-Enzym war.

Beispiel 13

BESTIMMUNG VON Dat-KETOSÄURE-SUBSTRATEN

[0092] Das Dat-Enzym wurde mit jedem in Tabelle 1 aufgelisteten Ketosäure-Substrat in einem gekoppelten Enzymassay unter den folgenden Bedingungen untersucht. Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, erhalten.

[0093] Die Assaymischung enthielt 500 E/ml Dat; 30 mM D-Alanin; 30 mM Ketosäure-Substrat; 0,2 mM NADH; und 100 mM Tris-HCl. Der pH der Assaymischung betrug 8,3. Der Assay wurde unter Verwendung von 1 ml Lösung, die 0,85 ml Assaymischung, 0,05 ml D-Lactat und 0,1 ml W3110-Zellen (ATCC27325), die das Plasmid pIF1003 enthielten, bei einer O.D.₆₀₀ von 0,5–1,0 enthielt, ausgeführt.

[0094] Die Zellen wurden ausgehend von einer Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium (Difco, Detroit, Michigan) bei 37°C in 1 l-Schüttelkolben hergestellt. Die Zellen wurden einmal in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen, zentrifugiert und in Wasser aufgenommen. Die Reaktion für jedes der Ketosäure-Substrate in Tabelle 1 wurde überwacht, indem ΔA_{340} bei 37°C gemessen wurde. Es wurde festgestellt, dass jedes der dem Assay unterzogenen Ketosäure-Substrate in Tabelle 1 ein geeignetes Substrat für das Dat-Enzym war.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: Fotheringham, Ian G.

Taylor, Paul P.

Ton, Jennifer L.

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Herstellung von D-Aminosäuren durch direkte Fermentationsmaßnahmen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 33

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto

(B) STRASSE: 277 Park Avenues

(C) STADT: New York

(D) BUNDESLAND: NY

(E) LAND: Vereinigte Staaten von Amerika

(F) POSTLEITZAHL: 10172-0194

(v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel

- (C) BETRIEBSSYSTEM; PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER:
 - (B) HINTERLEGUNGSDATUM:
 - (C) KLASSIFIZIERUNG:
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:
 - (A) TELEFON: 212-758-2400
 - (B) TELEFAX: 212-758-2982

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäures
 - (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG; SEQ ID NO: 1:

```
AAGCTTTTTT GTTGACAGCG TGAAAACAGT ACGGGTATAA TACTAAAGTC ACAAGGAGGA      60
TCCACTATGA CATCGGAAAA CCCGTTACTG GCGCT                                     95
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1424 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäures
 - (C) STRANGFORM: einzelsträngigs
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (ix) MERKMAL
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS (kodierende Sequenz)
 - (B) LAGE: 427..1275
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG; SEQ ID NO: 2:

ACAAGGAGGA TCCGTTAATC CAAACGTTAG CTGGTGTTTA TCGCCGACAA ACGGGCGATA	60
ACGAAACACC TTTACTTTCA ACAGGCGGTG GAACGTATGC ACGCGTCTTG AAAAAAGGTG	120
TGGCATTCCG CATGCTTTTC CCTGGTGATC CAGATGTCAT GCATCGTGCG GATGAATATG	180
TAATTGTTGA TAAATTAGTA CAAGCTGCTG CTATTTATGC AGAAGCCATT GCAGAACTGG	240
CTGGGAAGTA AGTGTCAATTA AGAGCGTAAT GTTTTCTTGC CAAAGAGATC ACCAAGCTTC	300
ACACGCCAAG CACTTCACTG AAAAATCTAC TTTGATTTAC TGCATCTGGT CTTACTTGAT	360
CGTCTAGTGG GAATCATTGT ACTTAAAAAT GTGAAAATAA CTTAAAAATG AAAAGGATGT	420
ATAAAC ATG GCA TAC TCA TTA TGG AAT GAC CAA ATC GTT GAA GAA GGA	468
Met Ala Tyr Ser Leu Trp Asn Asp Gln Ile Val Glu Glu Gly	
1 5 10	
TCT ATT ACA ATT TCA CCA GAA GAC CGT GGT TAT CAA TTT GGT GAT GGT	516
Ser Ile Thr Ile Ser Pro Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly	
15 20 25 30	
ATT TAC GAA GTA ATC AAA GTA TAT AAC GGG CAT ATG TTT ACA GCA CAA	564
Ile Tyr Glu Val Ile Lys Val Tyr Asn Gly His Met Phe Thr Ala Gln	
35 40 45	
GAG CAC ATC GAT GCT TTC TAT GCT AGT GCC GAA AAA ATT CGC CTT GTT	612
Glu His Ile Asp Ala Phe Tyr Ala Ser Ala Glu Lys Ile Arg Leu Val	
50 55 60	
ATT CCT TAT ACA AAA GAT GTA TTA CAC AAA TTA TTG CAT GAT TTA ATC	660
Ile Pro Tyr Thr Lys Asp Val Leu His Lys Leu Leu His Asp Leu Ile	
65 70 75	
GAA AAA AAT AAT TTA AAT ACA GGT CAT GTT TAC TTC CAA ATT ACA CGT	708
Glu Lys Asn Asn Leu Asn Thr Gly His Val Tyr Phe Gln Ile Thr Arg	
80 85 90	
GGA ACA ACT TCT CGT AAC CAC ATT TTC CCG GAT GCA AGC GTA CCA GCA	756
Gly Thr Thr Ser Arg Asn His Ile Phe Pro Asp Ala Ser Val Pro Ala	
95 100 105 110	
GTG CTA ACA GGT AAT GTT AAA ACT GGT GAA CGT TCA ATT GAA AAT TTC	804
Val Leu Thr Gly Asn Val Lys Thr Gly Glu Arg Ser Ile Glu Asn Phe	
115 120 125	

GAA AAA GGC GTA AAA GCG ACA TTG GTT GAA GAT GTT CGT TGG TTA CGT Glu Lys Gly Val Lys Ala Thr Leu Val Glu Asp Val Arg Trp Leu Arg 130 135 140	852
TGT GAT ATT AAA TCT TTA AAT TTA CTT GGC GCG GTA CTT GCG AAA CAA Cys Asp Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Ala Val Leu Ala Lys Gln 145 150 155	900
GAA GCA TCT GAA AAA GGT TGT TAC GAA GCC ATT TTA CAC CGT GGA GAT Glu Ala Ser Glu Lys Gly Cys Tyr Glu Ala Ile Leu His Arg Gly Asp 160 165 170	948
ATT ATC ACA GAA TGT TCT TCT GCT AAT GTC TAT GGT ATT AAA GAT GGT Ile Ile Thr Glu Cys Ser Ser Ala Asn Val Tyr Gly Ile Lys Asp Gly 175 180 185 190	996
AAA CTT TAT ACG CAC CCA GCA AAT AAC TAC ATC TTA AAT GGT ATT ACA Lys Leu Tyr Thr His Pro Ala Asn Asn Tyr Ile Leu Asn Gly Ile Thr 195 200 205	1044
CGC CAA GTT ATA TTA AAA TGT GCC GCT GAA ATA AAT TTA CCA GTG ATT Arg Gln Val Ile Leu Lys Cys Ala Ala Glu Ile Asn Leu Pro Val Ile 210 215 220	1092
GAA GAG CCG ATG ACA AAA GGC GAT TTA TTA ACA ATG GAT GAA ATT ATT Glu Glu Pro Met Thr Lys Gly Asp Leu Leu Thr Met Asp Glu Ile Ile 225 230 235	1140
GTG TCT TCT GTT TCA TCT GAA GTG ACA CCG GTT ATC GAT GTG GAT GGT Val Ser Ser Val Ser Ser Glu Val Thr Pro Val Ile Asp Val Asp Gly 240 245 250	1188
CAG CAA ATT GGT GCA GGT GTT CCT GGT GAA TGG ACT CGT AAA TTG CAA Gln Gln Ile Gly Ala Gly Val Pro Gly Glu Trp Thr Arg Lys Leu Gln 255 260 265 270	1236
AAA GCA TTT GAG GCA AAA TTA CCA ATT TCA ATT AAT GCC TAATCTGTAT Lys Ala Phe Glu Ala Lys Leu Pro Ile Ser Ile Asn Ala 275 280	1285
AAATGATTAA AAAGAGCTAC CTAAAACTTG GTTATTCGCC AAGTTAGGAG GGTAGCTCTT	1345
TTTTATAGAA TAAAATATGC ATGTATTCTC CTGAAACGTC ATGTAAAATA AAAAAGATAG	1405
CGCCTTTAGT CGATATCAC	1424

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 283 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```

Met Ala Tyr Ser Leu Trp Asn Asp Gln Ile Val Glu Glu Gly Ser Ile
 1           5           10           15
Thr Ile Ser Pro Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Ile Tyr
          20           25           30
Glu Val Ile Lys Val Tyr Asn Gly His Met Phe Thr Ala Gln Glu His
          35           40           45
Ile Asp Ala Phe Tyr Ala Ser Ala Glu Lys Ile Arg Leu Val Ile Pro
          50           55           60
Tyr Thr Lys Asp Val Leu His Lys Leu Leu His Asp Leu Ile Glu Lys
          65           70           75           80
Asn Asn Leu Asn Thr Gly His Val Tyr Phe Gln Ile Thr Arg Gly Thr
          85           90           95
Thr Ser Arg Asn His Ile Phe Pro Asp Ala Ser Val Pro Ala Val Leu
          100          105          110
Thr Gly Asn Val Lys Thr Gly Glu Arg Ser Ile Glu Asn Phe Glu Lys
          115          120          125
Gly Val Lys Ala Thr Leu Val Glu Asp Val Arg Trp Leu Arg Cys Asp
          130          135          140
Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Ala Val Leu Ala Lys Gln Glu Ala
          145          150          155          160
Ser Glu Lys Gly Cys Tyr Glu Ala Ile Leu His Arg Gly Asp Ile Ile
          165          170          175
Thr Glu Cys Ser Ser Ala Asn Val Tyr Gly Ile Lys Asp Gly Lys Leu
          180          185          190
Tyr Thr His Pro Ala Asn Asn Tyr Ile Leu Asn Gly Ile Thr Arg Gln
          195          200          205
Val Ile Leu Lys Cys Ala Ala Glu Ile Asn Leu Pro Val Ile Glu Glu
          210          215          220
Pro Met Thr Lys Gly Asp Leu Leu Thr Met Asp Glu Ile Ile Val Ser
          225          230          235          240
Ser Val Ser Ser Glu Val Thr Pro Val Ile Asp Val Asp Gly Gln Gln
          245          250          255
Ile Gly Ala Gly Val Pro Gly Glu Trp Thr Arg Lys Leu Gln Lys Ala
          260          265          270
Phe Glu Ala Lys Leu Pro Ile Ser Ile Asn Ala
          275          280

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

```

Val Ile Phe Tyr Leu Ala Leu
1           5

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Leu Pro Ile Ser Ile Asn Ala
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GCCATCTCCT TGCATGCACC ATTCC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäures
- (C) STRANGFORM: einzelsträngigs
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCCTCGCAAG CTCGTCCGGA GGCAAATCGC TGAATATTCC

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 30 Basenpaares
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CGCAGATCTA CTATGGCATA CTCATTATGG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngigs
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CATGCCATGG ATCCTCCTTT TAGGTAGCTC TTTTAAATC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 37 Basenpaares
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngigs
 (D) TOPOLOGIE linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CGCGGATCCT CGTCATGAAC AGAACTGACG AACTCCG

37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngigs
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ACGCGTCGAC TCAGAAGCGG GTATCTACCG CAGAGG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 34 Basenpaares
 (B) ART: Nukleinsäures
 (C) STRANGFORM: einzelsträngigs
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GGAAGATCTT ACATCATCAA CCAGATCGAT TCTG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 33 Basenpaares
 (B) ART: Nukleinsäures
 (C) STRANGFORM: einzelsträngigs
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

CGCGGATCCA TTATGGTTAC AGAAGGGAAG TCC

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CCGCTCGAGC CCGACGCACT TTGCGCCGA

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CCCAAGCTTA TCAGGCTCTG GGAGGCAG

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CGCGGATCCA CTATGACCCG TCCGATACAG GCC

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TGCCATGCAT GCCTACAGTT GCTGACCAGC CGG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

CGCGGATCCA CTATGCAAGC GGCAACAGTC GTC

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GGAGCATGCT TATTCAATAT ACTTCATCGC CAC

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig

- (D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

TTTAGCGCAT GCAAGGAGGA TCAACTATGA ACATTTCAAG GAGAAAG

47

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

AGCTTTGTCTG ACGGGCCCTT ACTTAAAACG ATCCAAAC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

CGCGGATCCA CTATGACCAC GAAGAAAGCT GATTACATTT GG

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

CAGCGTGCAT GCTTATTGAT TAACTTGATC TAACCAGC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

CCGGAATTCA CGTTGTGTCT CAAAATCTCT GAT

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

CCGCTGCAGG CCGTCCCGTC AAGTCAGCGT AATG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

TTTGGATCCT CCTTAGTACA TGCAACC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

TTTGAATTCTG GATGAAGATT CTTGCTCGAT TGT

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GATCCTAGGT ACCGGTGCGG CCGCATGCTG ACTGACTGAA GATCCCGGGC GATTCTACGC

60

CCGGGTTTTT TATG

74

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

TCGACATAAA AAACCCGGGC GTAGAATCGC CCGGGATCTT CAGTCAGTCA GCATGCGGCC

60

GCACCGGTAC CTAG

74

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

GACCTCGAGG CACTTTGCGC CGAATAAATA CCTGTG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

GACCTGCAGC ACCAGGCGTT TAAGGGCACC AATAAC

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

TTTGGATCCA AGATGAACAT TTCAAGGAGA AAG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

AGCTTTGTGCG ACGCATGCTT ACTTCTTAAA ACGATCCAAA C

41

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer D-Aminosäure in einer Zelle, Schritte umfassend, bei denen man:

- (a) ein D-Aminotransferase-Gen und ein L-Aminodesaminase-Gen in eine Zelle einbringt;
- (b) die Zelle in einem Zellkulturmedium zieht;
- (c) und die D-Aminosäure aus dem Zellkulturmedium isoliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die D-Aminosäure eine natürliche oder nicht-natürliche D-Aminosäure ist.

3. verfahren nach Anspruch 2, bei dem die natürliche oder nicht-natürliche D-Aminosäure aus der Gruppe bestehend aus Isoleucin, Leucin, Tryptophan, Tyrosin, Valin, Arginin, Asparagin, Glutamin, Methionin, Ornithin, Serin, Norleucin, Norvalin, Phenylalanin, Dihydroxyphenylalanin, Citrullin, Cystein, Histidin und Lysin ausgewählt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die natürliche D-Aminosäure Phenylalanin ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Kulturmedium ein L-Aminosäuresubstrat enthält.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem das L-Aminosäuresubstrat aus der Gruppe bestehend aus Isoleucin, Leucin, Tryptophan, Tyrosin, Valin, Arginin, Asparagin, Glutamin, Methionin, Ornithin, Serin, Norleucin, Norvalin, Phenylalanin, Dihydroxyphenylalanin, Citrullin, Cystein, Histidin und Lysin ausgewählt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem eine enantiomerenreine D-Aminosäure in der Zelle hergestellt und in enantiomerenreiner Form aus dem Zellkulturmedium isoliert wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die D-Aminosäure D-Phenylalanin ist und bei dem das Verfahren

ferner das Einbringen von Mitteln oder die Aufnahme von Maßnahmen zur Erhöhung der Produktion von Phenylbenztraubensäure in die Zelle in (a) umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 1 oder 8, das ferner den Schritt der Einführung einer D-Aminodesaminase-Gen-Mutation in die Zelle umfasst, so dass das D-Aminodesaminase-Gen nicht funktionell ist.

10. Verfahren nach Anspruch 1 oder 8, bei dem die Zelle eine Bakterienzelle ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem die Bakterienzelle aus der Gruppe bestehend aus *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* und *Escherichia coli* ausgewählt ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem die Zelle *Escherichia coli* ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, das ferner den Schritt einer Einführung einer *dadA*-Gen-Mutation in *Escherichia coli* umfasst, so dass das *dadA*-Gen nicht funktionell ist.

14. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem das D-Aminotransferase-Gen ein *Bacillus sphaericus* D-Aminotransferase-Gen ist.

15. Verfahren nach Anspruch 1 oder 8, bei dem das L-Aminodesaminase-Gen ein *Proteus myxofaciens* L-Aminodesaminase-Gen oder ein *Proteus mirabilis* Aminodesaminase-Gen ist.

16. Verfahren nach Anspruch 1 oder 8, das ferner den Schritt des Einbringens eines Rasemase-Gens in die Zelle umfasst.

17. Verfahren nach Anspruch 16, bei dem das Rasemase-Gen aus der Gruppe bestehend aus Alaninracemase, Glutamatracemase, Aspartatracemase oder Phenylalaninracemase ausgewählt ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, bei dem das Rasemase-Gen Alaninracemase ist.

19. Verfahren nach Anspruch 1 oder 8, bei dem das Kulturmedium einen Aminodonor enthält.

20. Verfahren nach Anspruch 19, bei dem der Aminodonor aus der Gruppe bestehend aus L-Alanin, L-Glutamat, L-Phenylalanin, L-Aspartat und einem racemischen Gemisch von einer der vorgenannten L-Aminosäuren ausgewählt ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, bei dem das racemische Gemisch Aspartat ist.

22. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem das Kulturmedium L-Phenylalanin als ein Substrat enthält.

23. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem das Mittel oder die Maßnahme zur Erhöhung der Produktion von Phenylpyrovat das Einbringen eines *aroH*-Gens in die Zelle umfasst.

24. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem das Mittel oder die Maßnahmen zur Erhöhung der Produktion von Phenylpyrovat das Einbringen eines *pheA*-Gens in die Zelle umfasst.

25. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem die D-Aminosäure D-Phenylalanin ist.

26. Verfahren nach Anspruch 1 oder 25, bei dem das D-Aminotransferase-Gen und das L-Aminodesaminase-Gen durch Verwendung eines Plasmides in die Zelle eingebracht werden.

27. Rekombinante Zelle, die ein exogenes D-Aminotransferase-Gen und ein exogenes L-Aminodesaminase-Gen umfasst.

28. Rekombinante Zelle nach Anspruch 27, die ferner eine D-Aminodesaminase-Gen-Mutation in der Zelle umfasst, so dass das D-Aminodesaminase-Gen nicht funktionell ist.

29. Rekombinante Zelle nach Anspruch 27, bei der das exogene D-Aminotransferase-Gen ein *Bacillus sphaericus* D-Aminotransferase-Gen ist.

30. Rekombinante Zelle nach Anspruch 27, bei der das exogene L-Aminodesaminase-Gen ein *Proteus myxofaciens* L-Aminodesaminase-Gen oder ein *Proteus mirabilis* L-Aminodesaminase-Gen ist.

31. Rekombinante Zelle nach Anspruch 27, die ferner ein exogenes Racemase-Gen umfasst.

32. Rekombinante Zelle nach Anspruch 31, bei der das exogene Racemase-Gen ein *Salmonella typhimurium*-Gen ist.

33. Rekombinante Zelle nach Anspruch 32, bei der das *Salmonella typhimurium*-Gen Alaninracemase ist.

34. Rekombinante Zelle nach Anspruch 29, die ferner ein exogenes *aroH*-Gen und ein exogenes *pheA*-Gen umfaßt.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

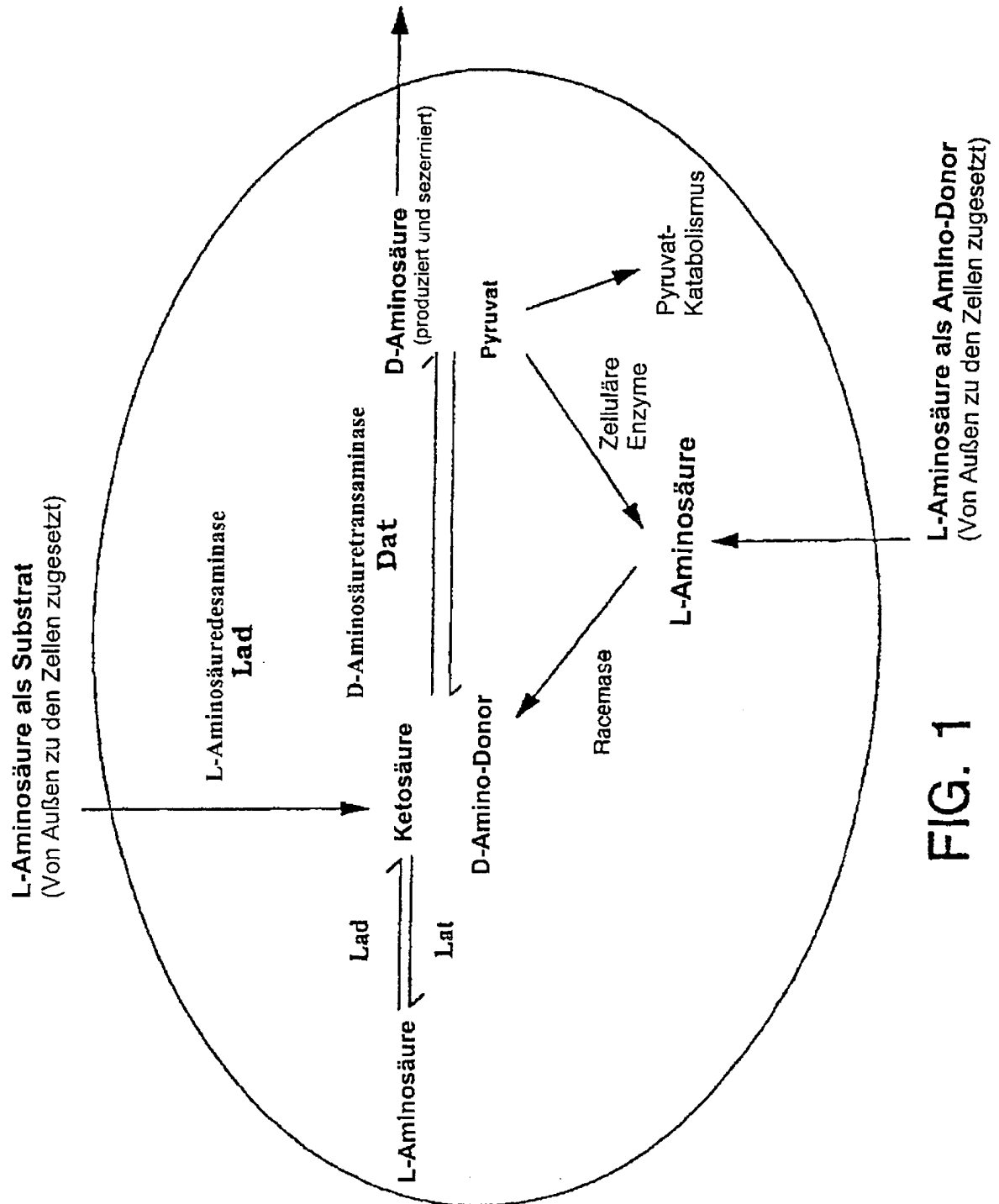


FIG. 1

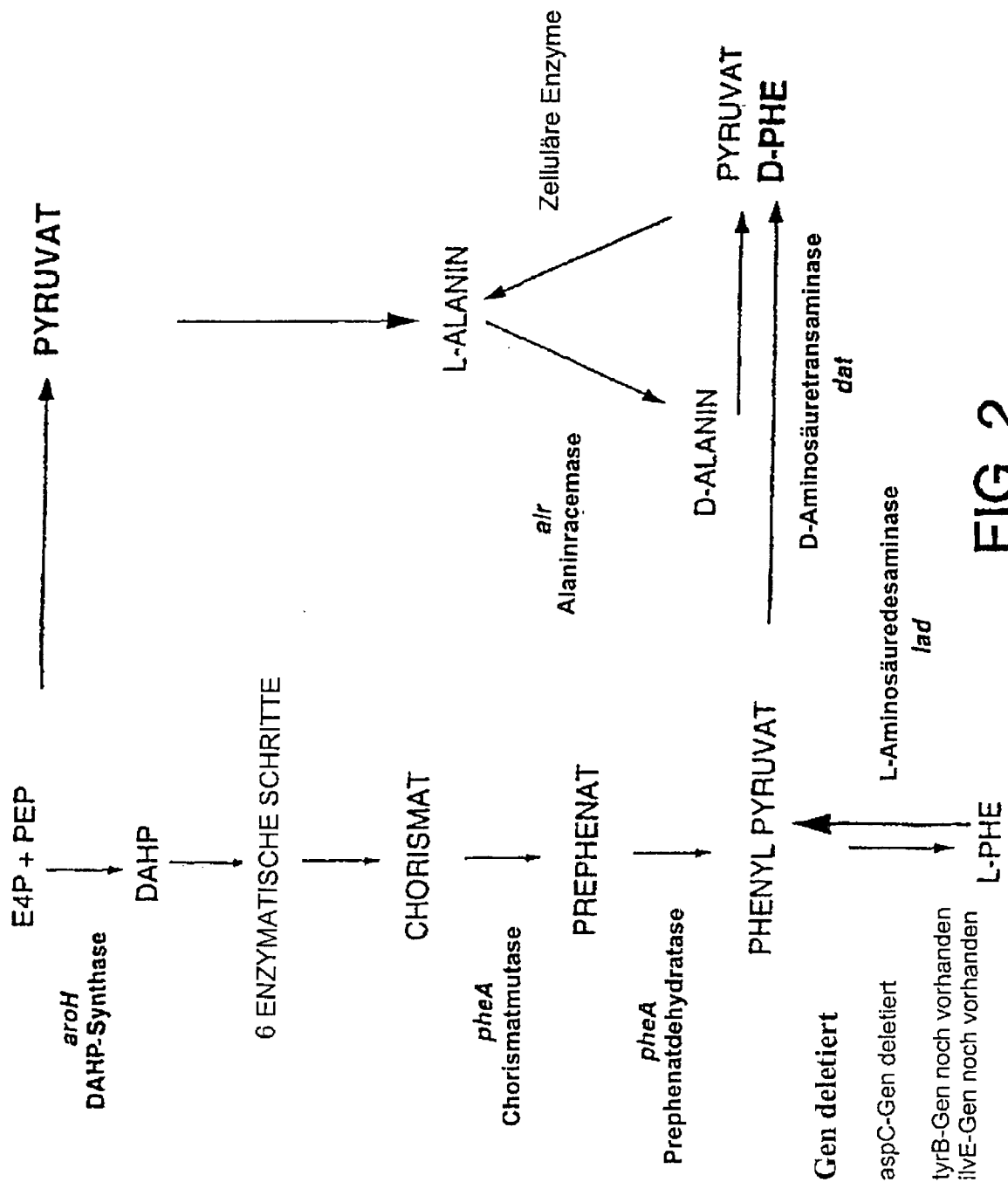


FIG. 2

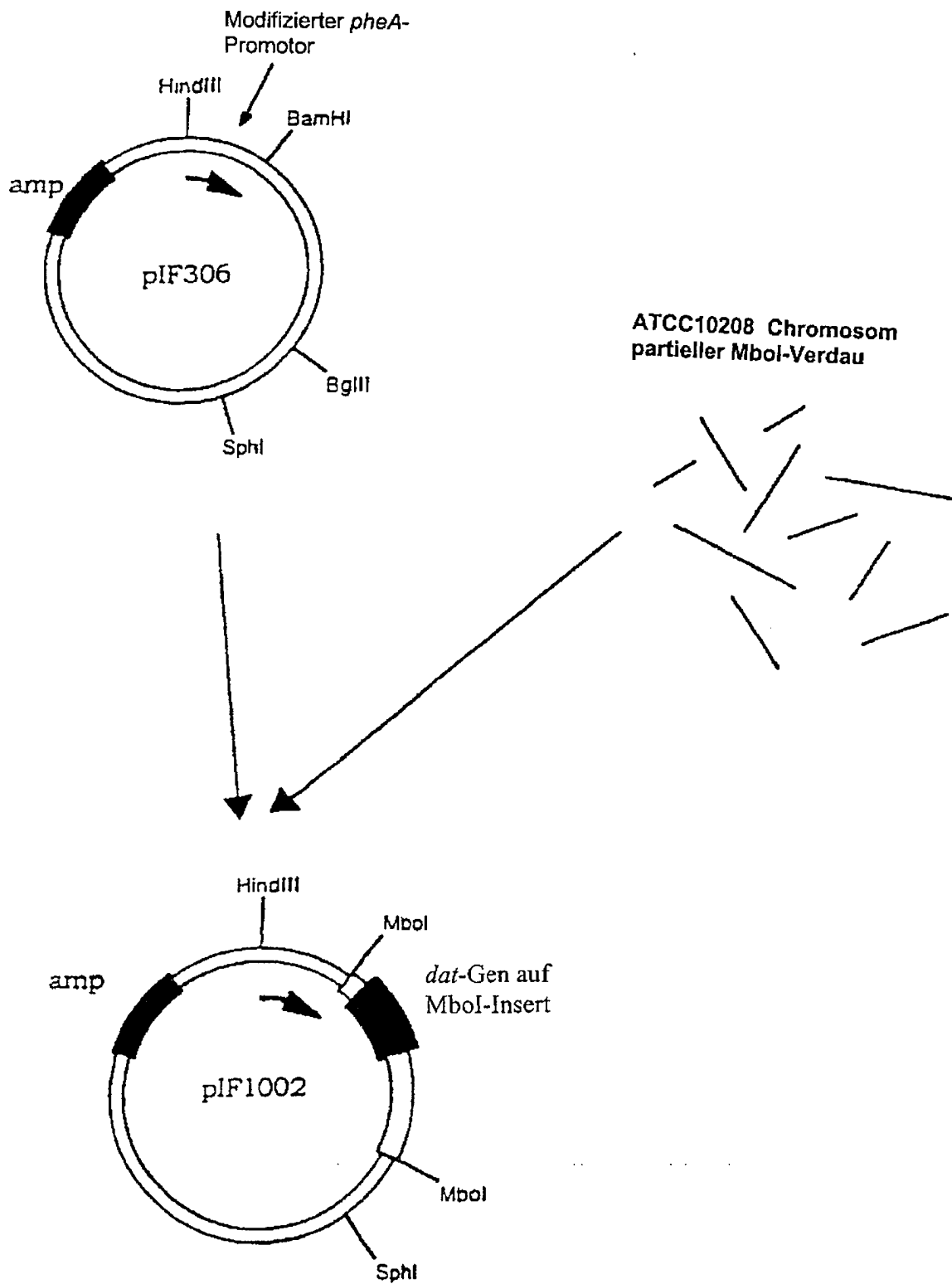


FIG. 3

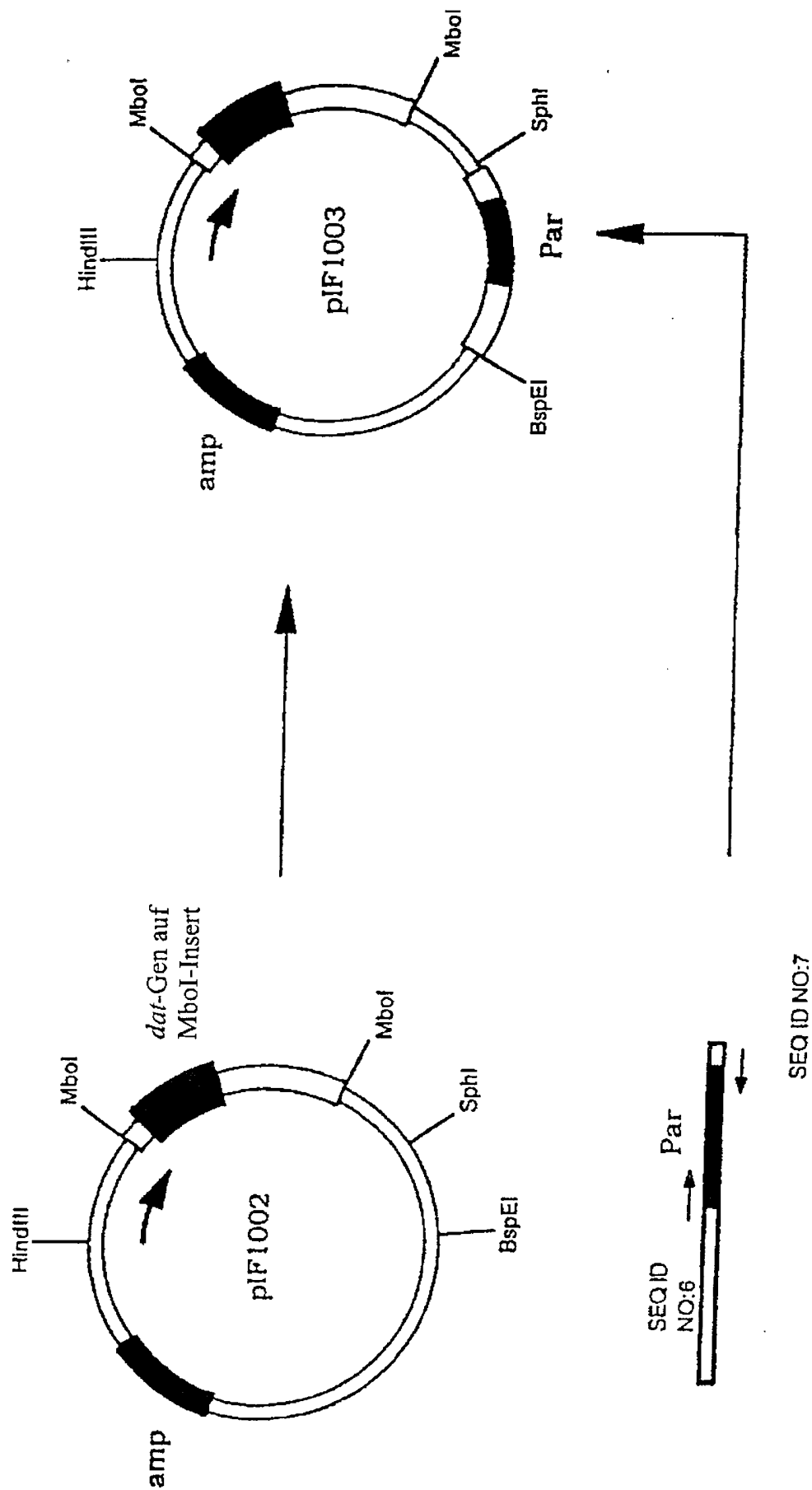


FIG. 4

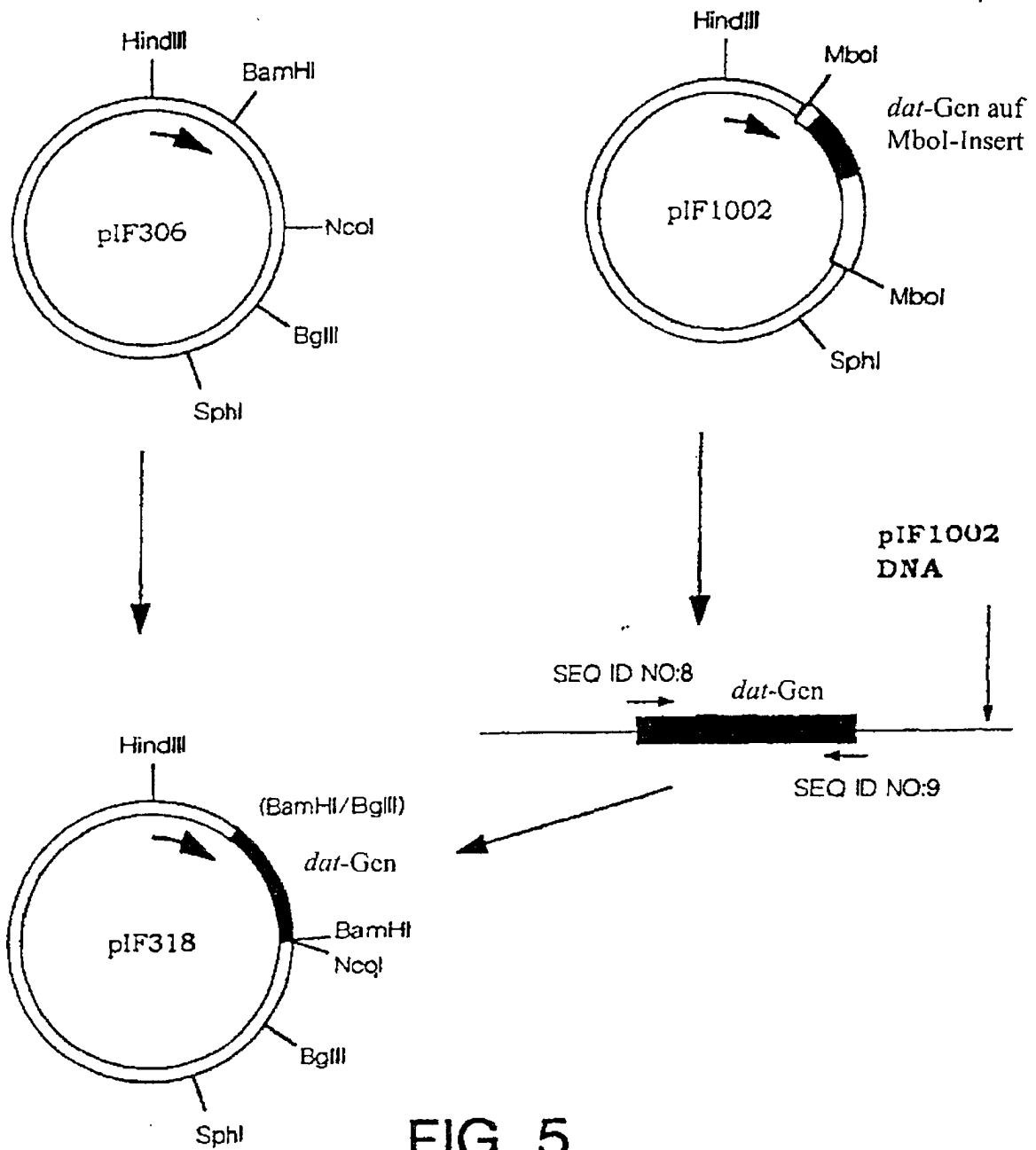


FIG. 5

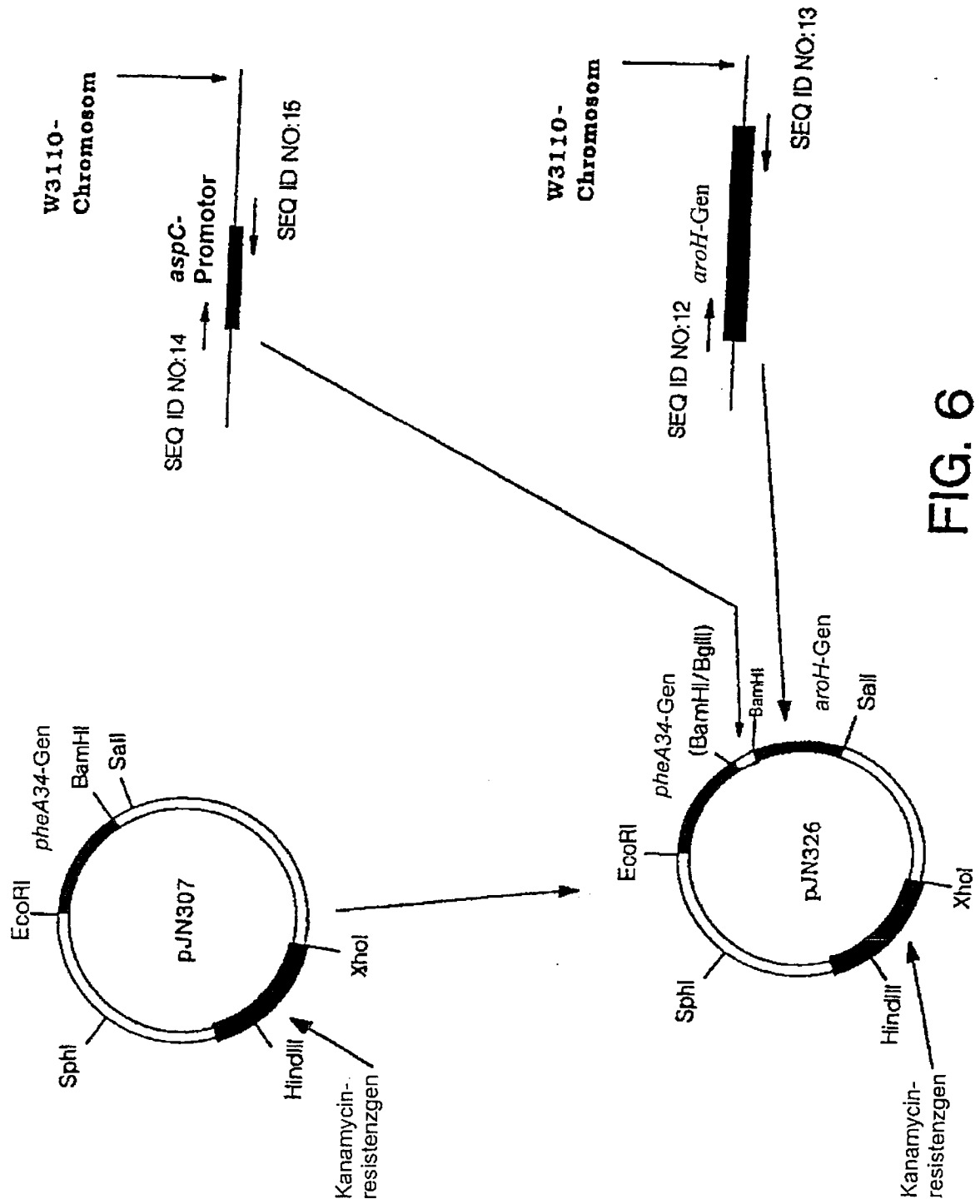


FIG. 6

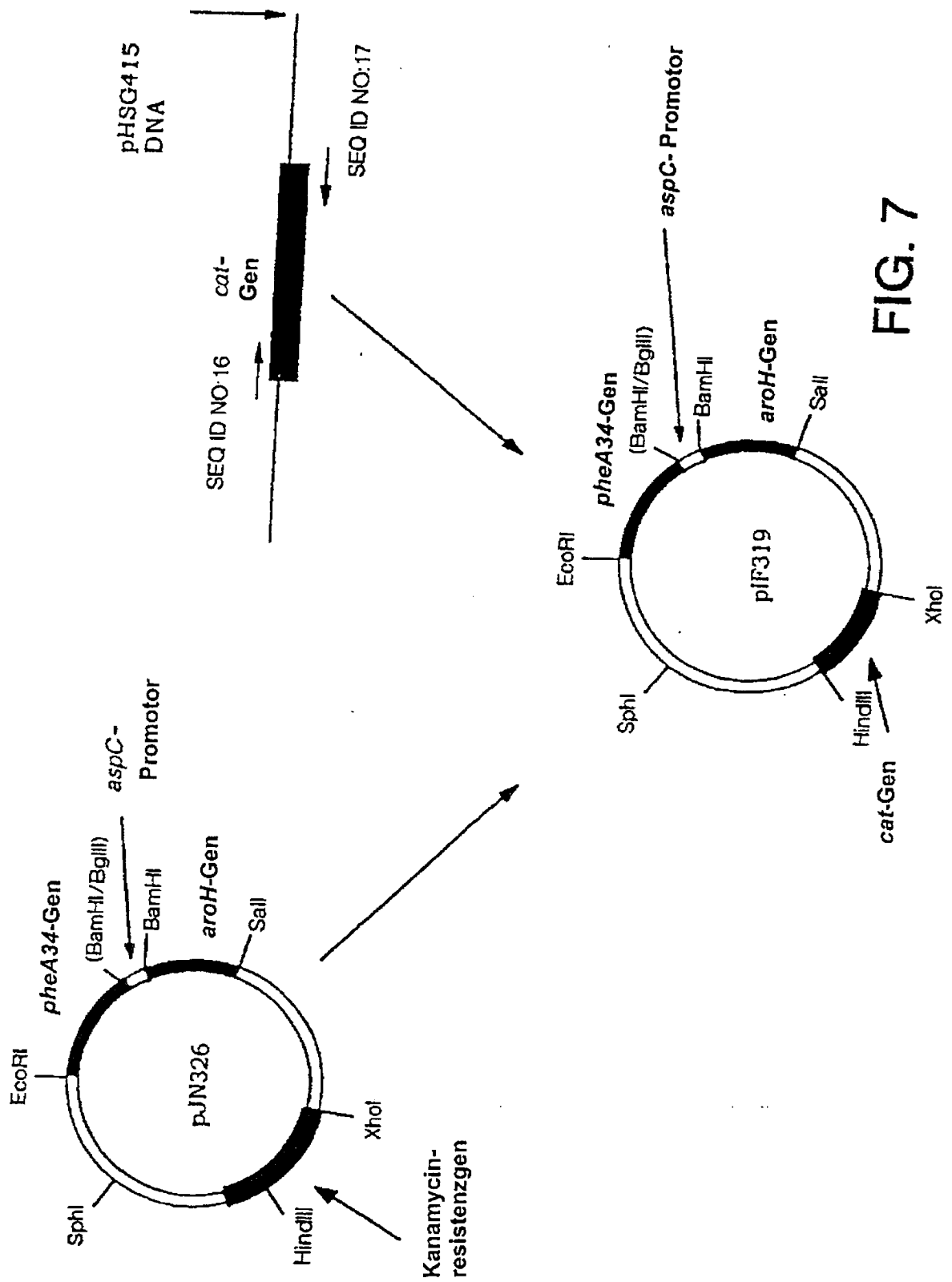


FIG. 7

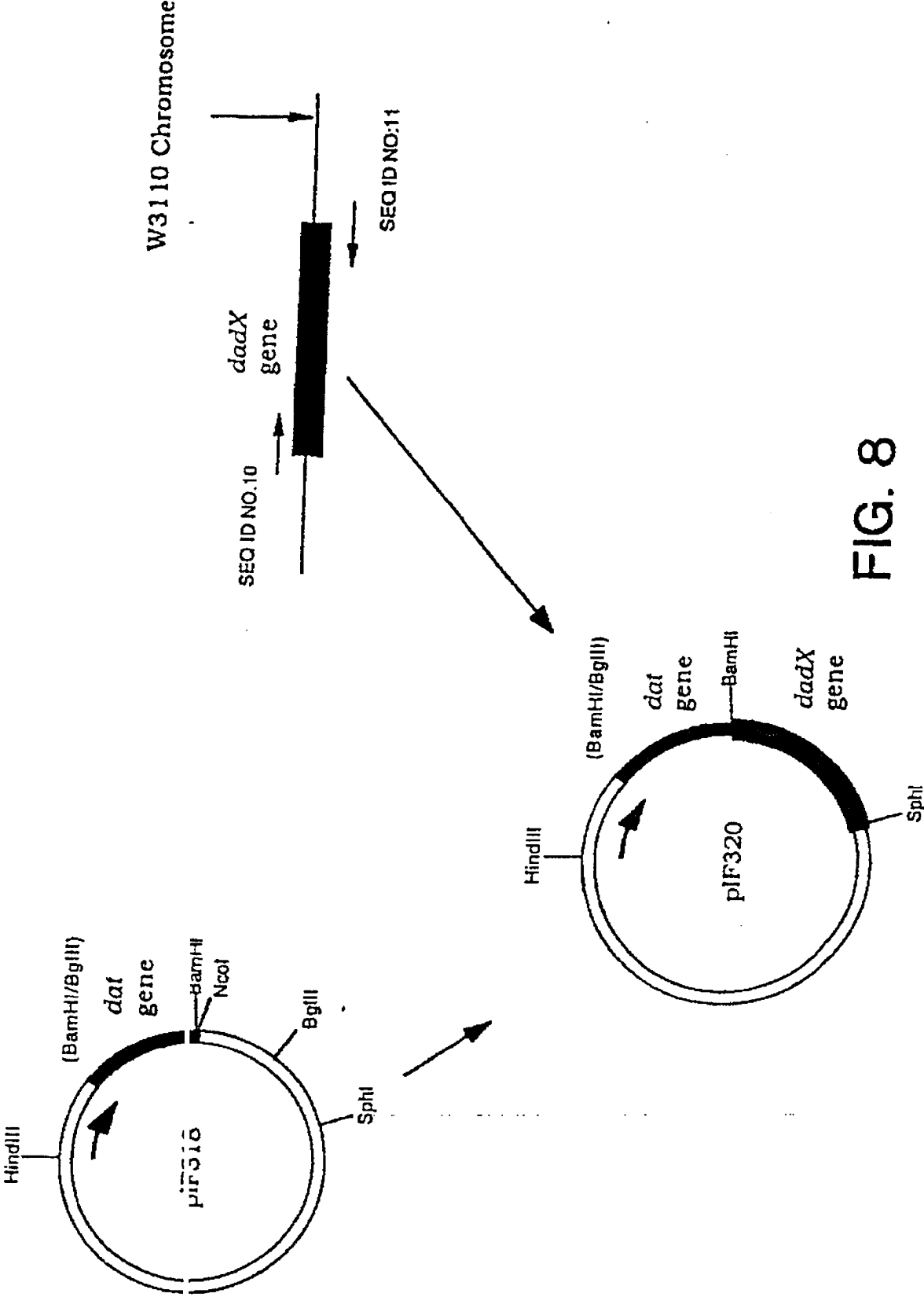


FIG. 8

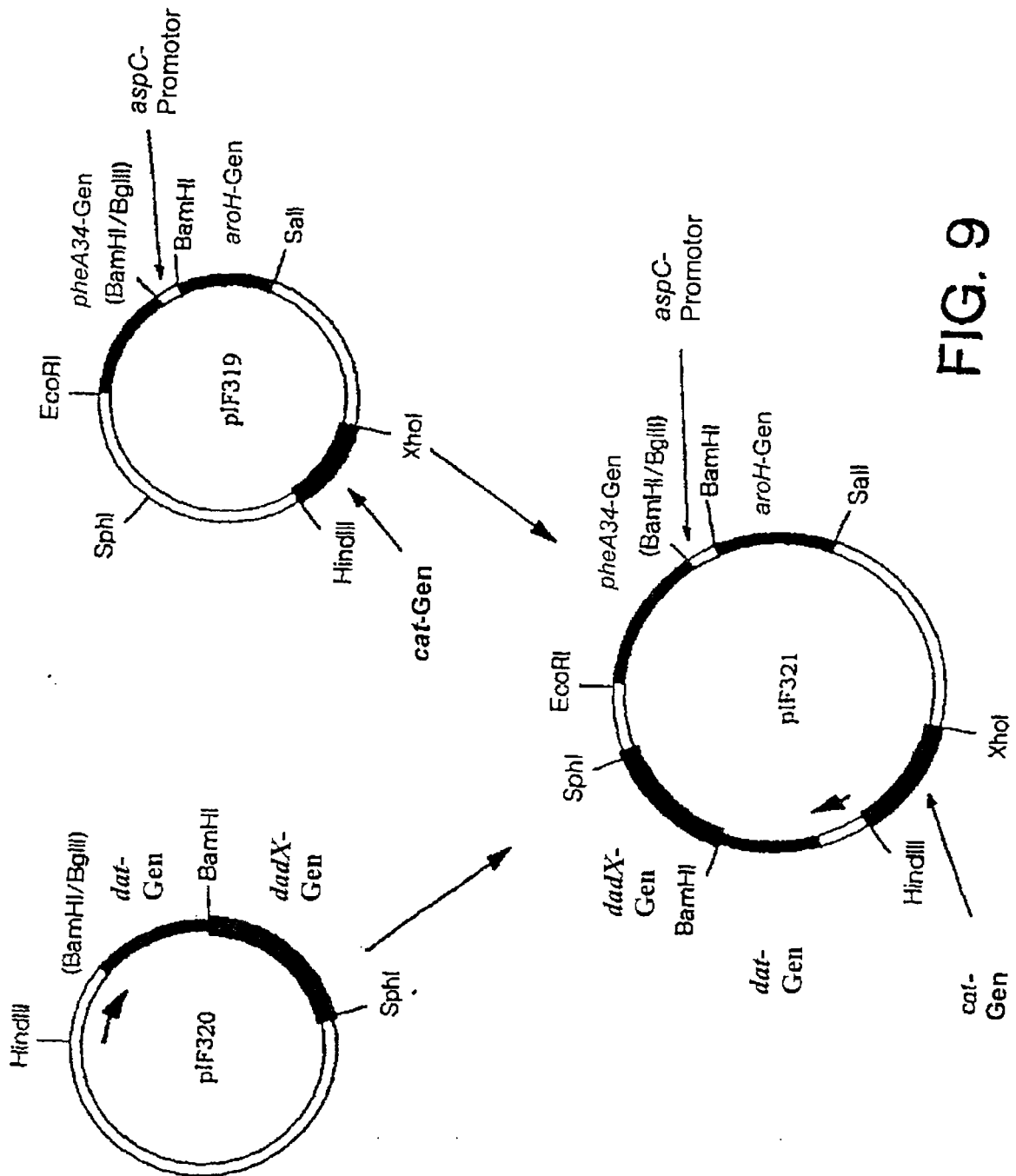


FIG. 9

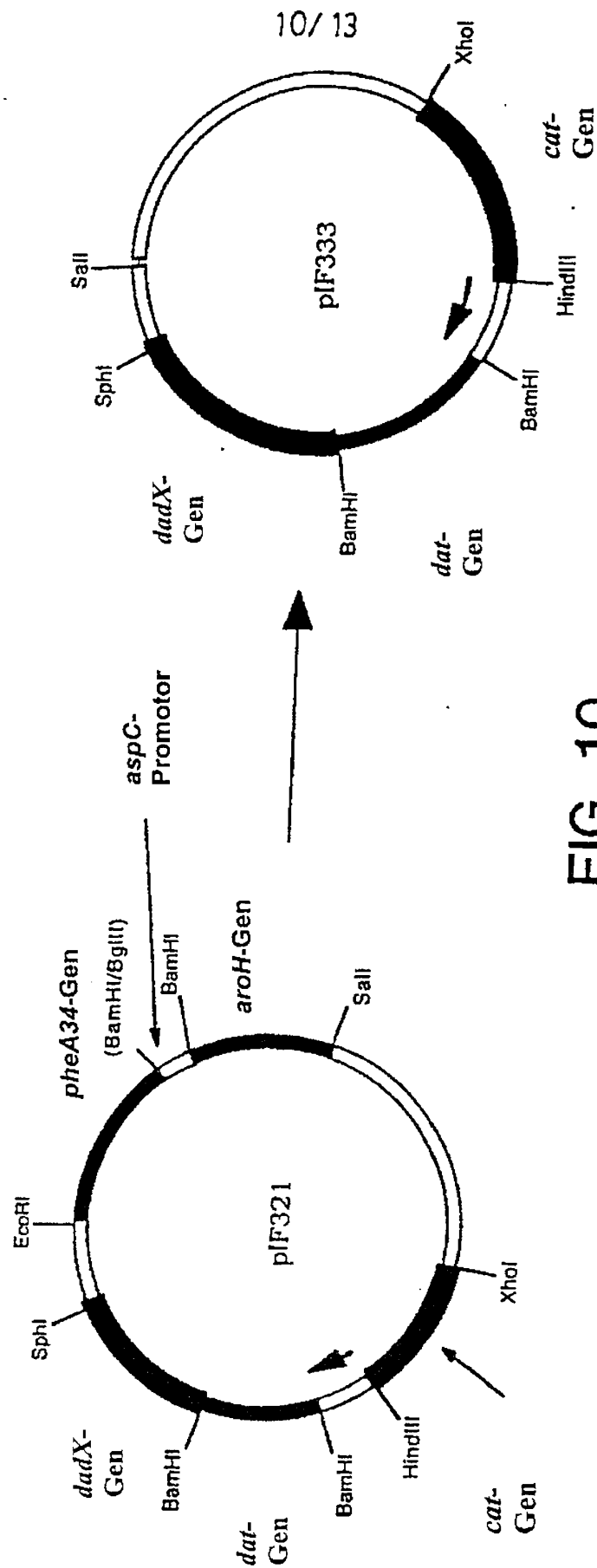
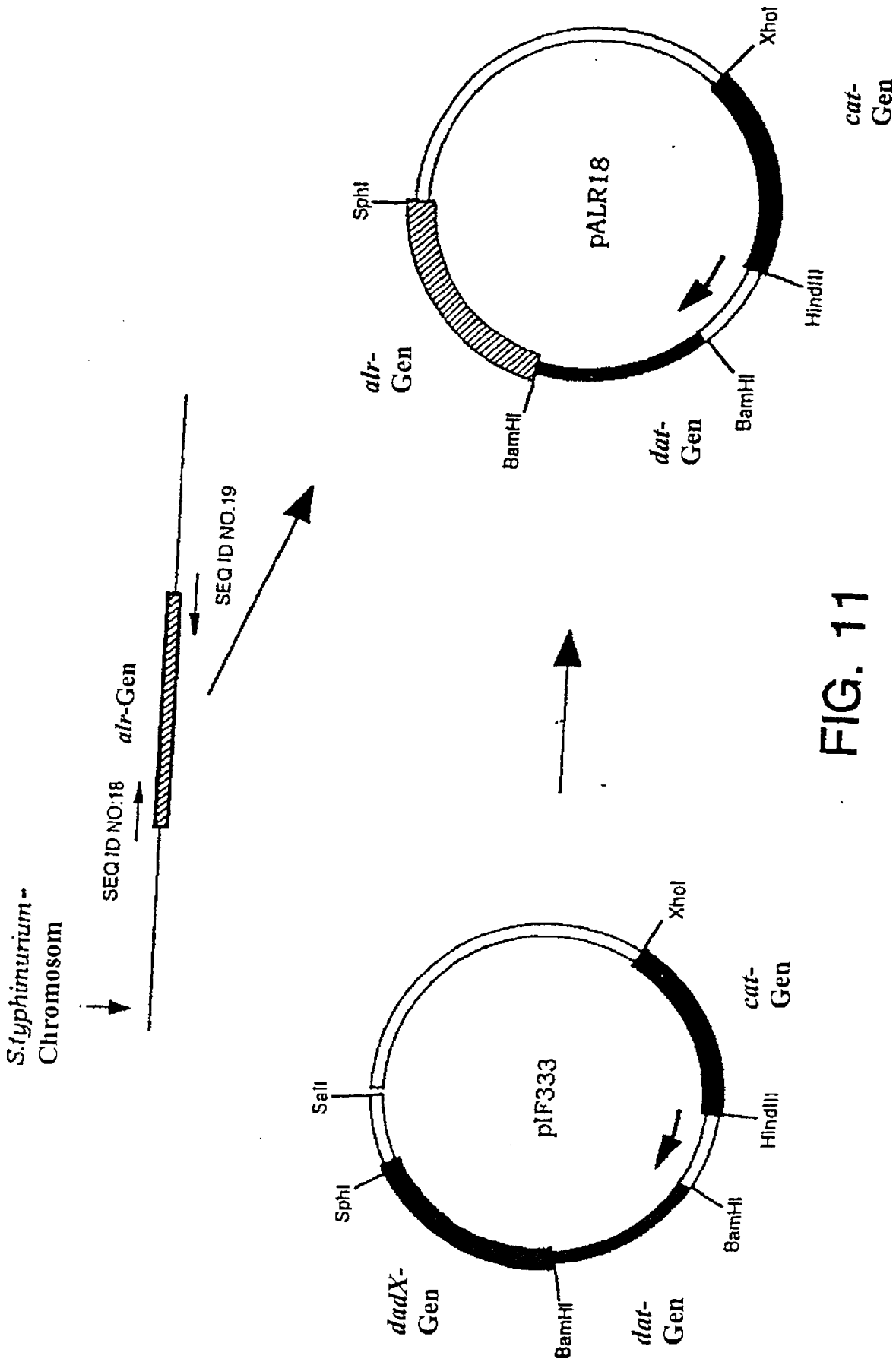


FIG. 10



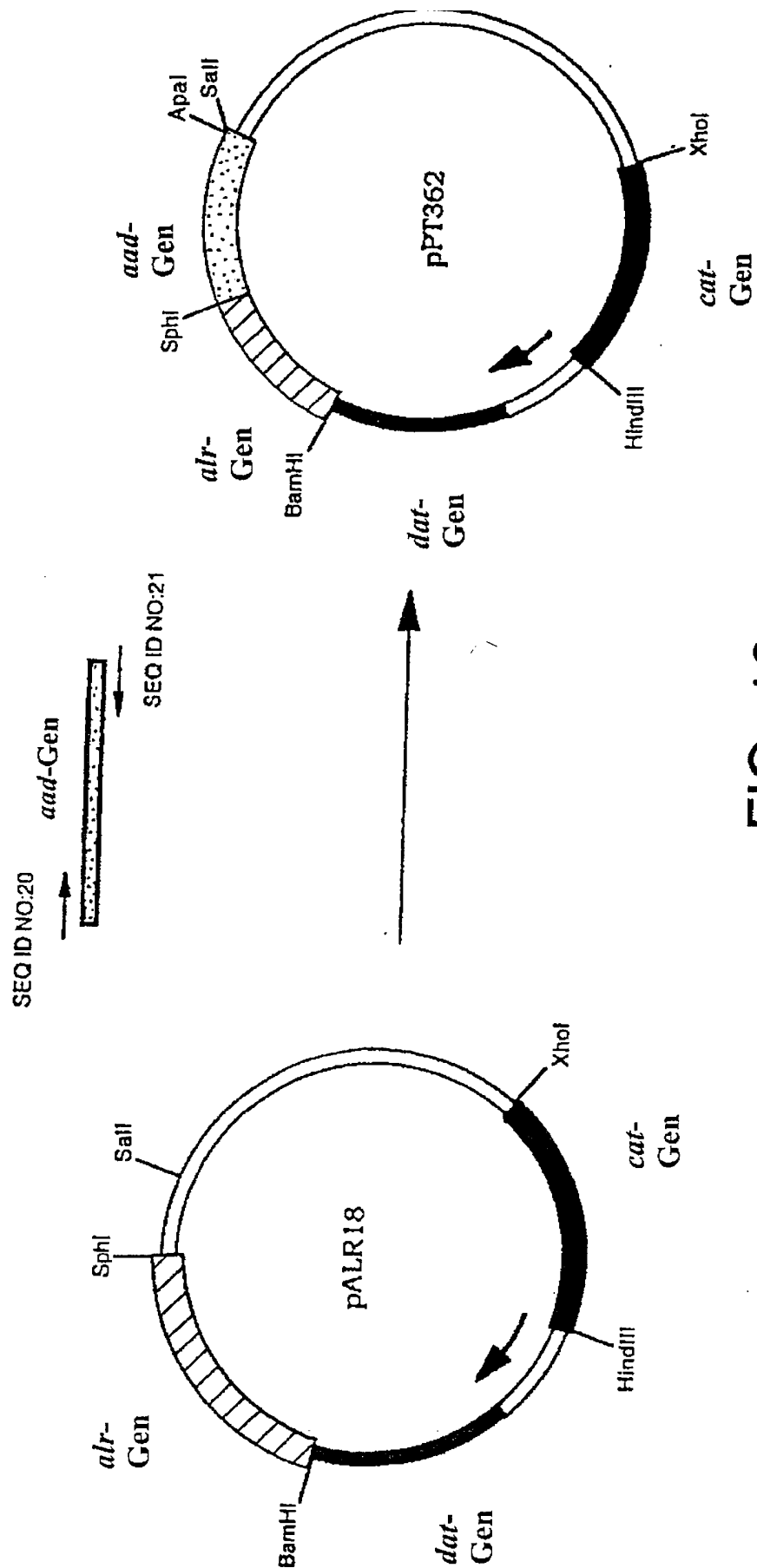


FIG. 12

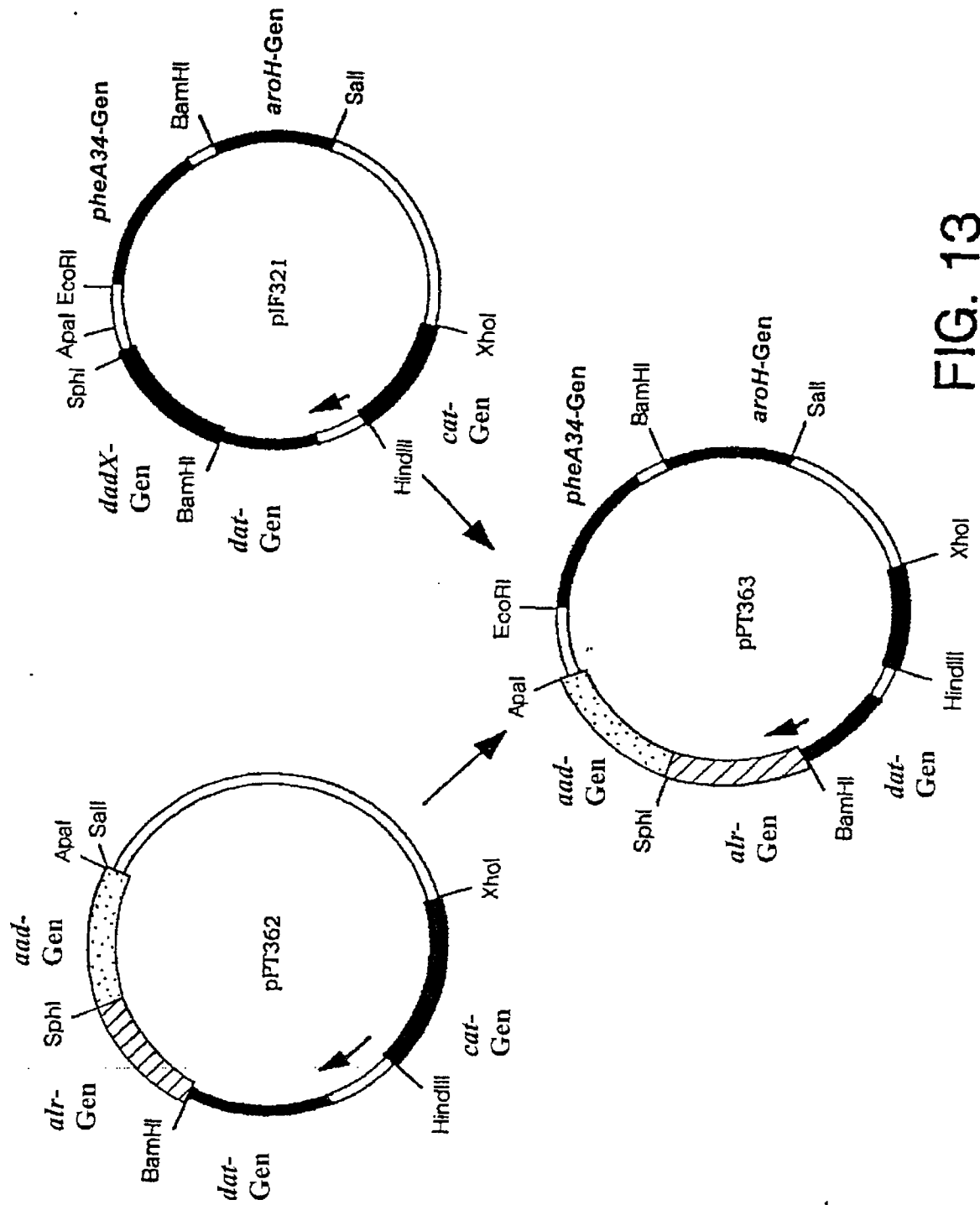


FIG. 13