



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 20 797 T2** 2008.04.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 409 688 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 20 797.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NL02/00471**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 747 739.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/010312**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.07.2002**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **06.02.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.04.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **20.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.04.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/55** (2006.01)

**C12N 9/80** (2006.01)

**C12P 41/00** (2006.01)

**C12P 13/04** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**01202822**      **23.07.2001**      **EP**

**01202821**      **23.07.2001**      **EP**

(73) Patentinhaber:

**DSM IP Assets B.V., Heerlen, NL**

(74) Vertreter:

**derzeit kein Vertreter bestellt**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(72) Erfinder:

**SONKE, Theodorus, NL-6143 BK Guttecoven, NL;  
TANDLER, Renate Francisca, NL-6122 EG  
Buchten, NL; KOREVAAR, Cornelis Gerrit,  
NL-2223 VG Katwijk, NL; ASSEMA VAN, Friso  
Bernard, NL-6166 XK Geleen, NL; POL VAN DER,  
Rudolf, NL-3123 SB Schiedam, NL**

(54) Bezeichnung: **NUCLEINSÄURESEQUENZEN KODIEREND FÜR ENANTIOSELEKTIVE AMIDASEN**

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

**[0001]** Die Erfindung beschreibt Nukleinsäuresequenzen, die für enantioselektive Amidasen codieren. Außerdem betrifft die Erfindung Vektoren und Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung und Verwendung der Expressionsprodukte der Nukleinsäuresequenzen.

**[0002]** Amidasen sind Polypeptide mit Amidaseaktivität und sind Enzyme mit der Fähigkeit, die Hydrolyse von Carbonsäureamiden zu den entsprechenden Carbonsäuren und Ammoniak zu katalysieren. Enantioselektive Amidasen sind Amidasen, die eines der Enantiomere eines Carbonsäureamids als Substrat bevorzugen. Es ist bekannt, daß enantioselektive Amidasen wertvoll in kommerziell durchgeführten Bioprozessen zur Produktion von enantiomerenangereicherten Carbonsäuren sind. Carbonsäuren sind zum Beispiel  $\alpha$ -H- $\alpha$ -Aminosäuren,  $\alpha,\alpha$ -Dialkylaminosäuren,  $\alpha$ -Hydroxysäuren und/oder deren Derivate sowie Peptide. Enantiomerenangereicherte Carbonsäuren und/oder deren Derivate sowie Peptide werden in verschiedenen Industriezweigen wie zum Beispiel der pharmazeutischen Industrie, der Agrarchemikalienindustrie usw. eingesetzt. So eignet sich zum Beispiel die Aminosäure L-Valin gut als Vorstufe für Cyclosporin-A-Fermentationen;  $\alpha$ -Hydroxypropionsäure wird in der Produktion von Herbiziden eingesetzt; manche  $\alpha$ -N-Hydroxyaminosäuren können als Antitumormittel eingesetzt werden, und D-p-Hydroxyphenylglycin und D-Phenylglycin werden in der Produktion von gewissen halbsynthetischen Breitband- $\beta$ -Lactam-Antibiotika eingesetzt. Die Schrift EP 494 716 B1 beschreibt zwei Beispiele für Mikroorganismen mit Amidaseaktivität: *Ochrobactrum anthropi* NCIB 40321 (auch unter der Bezeichnung NCIMB 40321 bekannt) sowie *Klebsiella* sp. NCIB 40322.

**[0003]** W.J.J. van den Tweel et al. beschrieben *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321 als Biokatalysator mit einer breitbandartigen L-spezifischen Amidaseaktivität. *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321 wurde aufgrund seiner Fähigkeit, racemische Amide L-selektiv zu hydrolysieren, ausgewählt. Die Substratspezifität von ganzen *O. anthropi*-Zellen ist erstaunlich breit und reicht von  $\alpha$ -H- $\alpha$ -Amino-,  $\alpha$ -Alkyl- $\alpha$ -amino-, N-Hydroxy- $\alpha$ -aminosäureamiden bis zu  $\alpha$ -Hydroxysäureamiden (Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 296-300, 1993).

**[0004]** Komeda H. et al. beschrieben das Gen, das für D-stereospezifische Aminosäureamidase aus *Ochrobactrum anthropi* SV3 codiert, und das kloniert und sequenziert wurde. Aus der Analyse von 7,3 kB genomischer DNA geht das Vorliegen von sechs ORFs hervor, von denen einer (*daaA*) für die D-Aminosäureamidase codiert. Dieses Enzym, nämlich *DaaA*, besteht aus 363 Aminosäureresten (Molekulargewicht 40082 Da), und die abgeleitete Aminosäuresequenz weist eine Homologie mit der alkalischen D-Peptidase aus *Bacillus cereus* DF4-B auf (32% Identität) (Biochemistry 267, 2028-2035, 2000).

**[0005]** J-F. Mayaux et al. beschrieben eine enantiomereenselektive Amidase, die gegenüber mehreren 2-Aryl- und 2-Aryloxypropionamiden aktiv ist, aus dem Brevibakteriumsp.-Stamm R312, aus dem das Enzym aufgeklont und kloniert wurde (J. Bacteriology 172, 6764-6773, 1990).

**[0006]** B. Kaptein et al. beschrieben die Synthese im großen Maßstab von vier enantiomerenreinen, sterisch gehinderten, C- $\alpha$ -tetrasubstituierten  $\alpha$ -Aminosäuren, die alle durch eine C- $\gamma$ -C- $\delta$ -Doppelbindung in der Seitenkette gekennzeichnet sind. Durch Einsatz einer dieser Aminosäuren (L-Mag) wurde ein N- $\alpha$ -geschütztes Tetrapeptidbenzylamid hergestellt (Tetrahedron 57, 6567-6577, 2001).

**[0007]** In US 4 080 259 werden die Enzympräparate mit (L- $\alpha$ )-Aminoacylamidase-Aktivität, die durch Kultivieren von *Pseudomonas putida*, *Ps. reptilivora* oder *Ps. arvilla* auf einem Medium, das assimilierbare C-, N- und P-Quellen enthält, erhalten werden, beschrieben. Vorzugsweise wurde *Ps. putida* ATCC 12633 oder eine Mutante verwendet. Die (L- $\alpha$ )-Aminoacylamidase-Aktivität wird insbesondere für die Produktion von L-Phenylglycin und D-Phenylglycinamid aus DL-Phenylglycin und von D-phenylglycinamid aus DL-Phenylglycinamid eingesetzt. Weiterhin wird in US 4 080 259 gelehrt, daß das Enzym auf gut bekannte Weise aktiviert werden kann, z.B. durch Versetzen mit einer Metallverbindung wie einer Magnesium-, Mangan- oder Zinkverbindung (Spalte 2, Zeile 48-50).

**[0008]** WO9961633 beschrieb ein Fermentationsverfahren, das folgendes umfaßt: (a) Kultivieren einer Bakterien-Transformante in einem Bioreaktor mit einem antibiotikumfreien Batch-Medium, das eine Kohlenstoffquelle, eine Mischung von anorganischen Salzen und eine Stickstoffquelle enthält, und zwar unter Batch-Kultur-Bedingungen; (b) Füttern der Kultur von (a) und Feedback-Bedingungen zum Endpunkt der Batch-Phase nach dem Ansteigen der DO-Konzentration, (DO = Dissolved Oxygen) über einen gewissen Schwellenwert mit einem Teil eines Feedback-Mediums, das eine Kohlenstoffquelle und ein Magnesiumsalz enthält; sowie (c) Me-

tabolisierung des Feed-Mediums durch die Bakterien-Transformante. Weiterhin wurde in WO 9961633 gelehrt, daß in Schritt (a) und/oder (b) eine Spurenelementlösung zugesetzt wird, wobei die Spurenelementlösung  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen ( $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  13,8 mg/l) enthält.

**[0009]** Die Erfindung beschreibt insbesondere Nukleinsäuresequenzen, die für enantioselektive Amidasen codieren, mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit der SEQ ID: Nr. 2 aufweist. In der SEQ ID: Nr. 1 ist die Aminosäuresequenz, die für die L-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321 codiert, dargestellt. In der SEQ ID: Nr. 2 ist die Aminosäuresequenz, die der Nukleinsäuresequenz der SEQ ID: Nr. 1 entspricht, dargestellt. Überraschenderweise wurde gefunden, daß eine Fermentation, die eine Batch-Phase und eine Zufütterungsphase enthält, eines Mikroorganismus, der eine Nukleinsäure exprimiert, die für eine enantioselektive Amidase mit einer Aminosäuresequenz mit mindestens 70% Identität mit der SEQ ID: Nr. 2 codiert, in einem Fermentationsmedium zu einer erhöhten Produktion der enantioselektiven Amidaseaktivität führt, wenn dem Fermentationsmedium in der Zufütterungsphase zwischen 0,5 und 50 mg  $\text{Zn}^{2+}$  pro Liter Fermentationsmedium zugefüttert werden.

**[0010]** Diese erhöhte Produktion einer enantioselektiven Amidaseaktivität beruht vermutlich auf einer erhöhten Aktivität der enantioselektiven Amidase selbst sowie einer Erhöhung der Menge der produzierten enantioselektiven Amidase. In der Schrift EP 1 174 499 A1 wurde eine Nukleinsäuresequenz, die für eine enantioselektive Amidase aus *Enterobacter cloacae* N-7901 codiert, beschrieben; die entsprechende Aminosäuresequenz weist 68% Identität mit der Aminosäuresequenz, die der Nukleinsäuresequenz der SEQ ID Nr. 1 entspricht, auf. Die Nukleinsäuresequenzen, die für die erfindungsgemäßen enantioselektiven Amidasen codieren, sind daher neu. Die  $\text{Zn}^{2+}$ -Abhängigkeit der Fermentation der Mikroorganismen, die die Nukleinsäuresequenz, die für eine enantioselektive Amidase aus *Enterobacter cloacae* N-7901 codieren, exprimieren, ist in der EP 1 174 499 nicht beschrieben worden.

**[0011]** Die vorliegende Erfindung beschreibt vorzugsweise Nukleinsäuresequenzen, die für enantioselektive Amidasen mit Aminosäuresequenzen, die mindestens ungefähr 75%, stärker bevorzugt mindestens ungefähr 80%, noch stärker bevorzugt mindestens ungefähr 85%, am stärksten bevorzugt mindestens ungefähr 90%, noch stärker bevorzugt mindestens 95% und ganz besonders bevorzugt mindestens 97%, speziell mindestens 98%, noch spezieller mindestens 99%, am speziellsten 100%, Identität mit der SEQ ID Nr. 2 aufweisen, codieren.

**[0012]** Für die vorliegende Erfindung wird das Ausmaß der Identität zwischen zwei Aminosäuresequenzen mit dem paarweisen Alignment-Algorithmus BLASTP (NCBI) bestimmt, und zwar mit einer Identitätstabelle und den folgenden Alignment-Parametern: Mismatch = -15, Penalty = -3, Gap-Extend = 1, Match-Bonus = 1, Gap x-droff = 50, Expect = 10, Word Size = 3.

**[0013]** Außerdem beschreibt die Erfindung Nukleinsäuresequenzen, die für enantioselektive Amidasen codieren und die vorzugsweise unter mittelstarken Stringenzbedingungen, stärker bevorzugt unter Hochstringenzbedingungen und am stärksten bevorzugt unter Höchststringenzbedingungen mit (i) SEQ ID Nr. 1, (ii) einer genomischen DNA-Sequenz, die die SEQ ID Nr. 1 enthält, oder (iii) einen Komplementärstrang von (i) oder (ii) hybridisieren.

**[0014]** Hybridisierungsversuche können nach verschiedenen Methoden durchgeführt werden, mit denen der Fachmann gut vertraut ist. Allgemeine Richtlinien zum Auswählen unter diesen verschiedenen Methoden finden sich zum Beispiel in Kapitel 9 von Sambrook, J., Fritsh, E.F. und Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

**[0015]** Unter Stringenz der Hybridisierungsbedingungen versteht man die Bedingungen, unter denen die Hybridisierung, die aus der eigentlichen Hybridisierung und den Waschschritten besteht, durchgeführt werden. Waschschriffe dienen zum Abwaschen der Nukleinsäuren, die mit der Ziel-Nukleinsäure, die auf z.B. einem Nitrocellulosefilter immobilisiert ist, nicht hybridisieren. Die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen kann zum Beispiel dadurch verändert werden, daß man die Salzkonzentration der Waschlösung verändert, und/oder dadurch, daß man die Temperatur, bei der der Waschschrift durchgeführt wird (Waschtemperatur), verändert. Die Stringenz der Hybridisierung wird durch Erniedrigen der Salzkonzentration in der Waschlösung oder durch Erhöhen der Waschtemperatur gesteigert. Für die folgende Anmeldung wird die Hybridisierung ungefähr 12 Stunden lang bei ungefähr 45°C in  $6 \times$  Natriumchlorid/Natriumcitrat (SSC) durchgeführt. Zwei aufeinanderfolgende Waschschriffe für 30 Minuten in  $1 \times$  SSC, 0,1% SDS bei 50°C ist ein Beispiel für niedrige Stringenz, bei 55°C ein Beispiel für mittlere Stringenz, bei 60°C ein Beispiel für hohe Stringenz, bei 65°C ein Beispiel für

höchste Stringenz.

**[0016]** Die Erfindung beschreibt auch Nukleinsäuresequenzen, die für enantioselektive Amidasen mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID: Nr. 2 mit Modifikationen an ungefähr 15 oder weniger Aminosäurepositionen, vorzugsweise an ungefähr 10 oder weniger Aminosäurepositionen, stärker bevorzugt an ungefähr 5 oder weniger, noch stärker bevorzugt an ungefähr 3 oder weniger Aminosäurepositionen, codieren, wobei die Modifikation(en) unabhängig (i) eine Insertion einer Aminosäure, (ii) eine Deletion einer Aminosäure, (iii) eine Substitution einer Aminosäure ist/sind.

**[0017]** Nukleinsäuresequenzen, die für enantioselektive Amidasen mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 mit einer Anzahl Modifikationen codieren, können auf fachbekannte Art und Weise hergestellt werden, zum Beispiel mittels gerichteter Mutagenese der Nukleinsäuresequenz. Bei diesem Verfahren wird ein mutagenes Oligonukleotid, das für die gewünschte(n) Mutation(en), wie eine Substitution, Insertion oder Deletion an einer bestimmten Aminosäureposition, codiert, an einem Strang der interessierenden DNA angelagert und dient als Primer für die Initiation der DNA-Synthese. Mittels DNA-Synthese wird ein mutagenes Oligonukleotid in den neusynthetisierten Strang eingebaut. Häufig verfügen die fachbekannten Methoden auch über eine positive Selektionstechnik für mutagene Nukleinsäuresequenzen, um die Wirksamkeit des gerichteten Mutageneseverfahrens zu erhöhen. Bei manchen gerichteten Mutagenesetechniken wird eine PCR verwendet, in der ein mutagenes Oligonukleotid als Primer verwendet wird. Verfahren zur Erzielung von gerichteten Mutationen sind in verschiedenen Produktbroschüren von Firmen wie zum Beispiel Stratagene und Invitrogen beschrieben, und Kits für die Durchführung von gerichteten Mutationen sind im Handel erhältlich.

**[0018]** Die vorliegende Erfindung beschreibt auch Nukleinsäuresequenzen, die für enantioselektive Amidasen codieren, die eine immunologische Kreuzreaktivität mit einem Antikörper aufweisen, der gegen ein Fragment der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 erzeugt wurde. Die Länge jedes Fragments beträgt vorzugsweise mindestens 20 Aminosäuren. Die immunologische Kreuzreaktivität kann dadurch im Assay getestet werden, daß man einen Antikörper, der gegen mindestens ein Epitop des isolierten erfindungsgemäßen Polypeptids mit Amidaseaktivität erzeugt wurde oder damit reaktionsfähig ist, verwendet. Der Antikörper, der entweder monoklonal oder polyklonal sein kann, kann nach fachbekannten Verfahren hergestellt werden, wie sie zum Beispiel von Hudson et al., Practical Immunology, 3. Ausg. (1989), Blackwell Scientific Publications beschrieben sind. Die immunologische Kreuzreaktivität kann dadurch bestimmt werden, daß man fachbekannte Assays verwendet, zu denen zum Beispiel Western-Blotting, z.B. gemäß Hudson et al., Practical Immunology, 3. Ausg. (1989), Blackwell Scientific Publications, zählt.

**[0019]** Die vorliegende Erfindung beschreibt auch Nukleinsäuresequenzen, die für enantioselektive Amidase-Fusionsproteine codieren, welche aus einer Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Polypeptid codiert, in operativer Verknüpfung mit einer oder mehreren Nukleinsäuresequenzen, die für (ein) Marker-Polypeptid(e) codieren, bestehen. Unter operativer Verknüpfung versteht man, daß die beiden Nukleinsäuresequenzen so miteinander verbunden sind, daß bei ihrer Expression das enantioselektive Amidase-Fusionsprotein mit dem Marker-Polypeptid an seinem N- und/oder C-terminalen Ende produziert wird. Das Marker-Polypeptid kann für verschiedene Zwecke dienen, so kann es zum Beispiel dazu verwendet werden, um die Stabilität oder die Löslichkeit des Fusionsproteins zu erhöhen, um als Sekretionssignal zu dienen – worunter man ein Signal versteht, das das Fusionsprotein in ein bestimmtes Zellkompartiment dirigiert – oder dazu, um die Aufreinigung des Fusionsproteins zu erleichtern. Beispiele für Marker-Polypeptide, die für die Erleichterung der Aufreinigung des Fusionsproteins verwendet werden, sind der MBP- und der GST-Tag. Die Aufreinigung eines Fusionsproteins mit MBP-Tag oder GST-Tag ist zum Beispiel bei F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith und K. Struhl, Hrsg., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, 1990 beschrieben. Ein Fusionsprotein mit MBP-Tag kann zum Beispiel in einem pMAL-Vektor (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) produziert werden, während ein Fusionsprotein mit GST-Tag in einem pGEX-Vektor (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ, USA) produziert werden kann, wobei man nach der Vorschrift des jeweiligen Zulieferers vorgeht.

**[0020]** Eine in der vorliegenden Erfindung beschriebene Nukleinsäuresequenz, zum Beispiel die Nukleinsäuresequenz mit der Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1, kann nach üblichen molekularbiologischen Techniken sowie der im vorliegenden Text bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. So kann zum Beispiel die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 an *Ochrobactrum anthropi* NCIB 40321 ganz oder teilweise als Hybridisierungssonde verwendet werden, und eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz nach üblichen Hybridisierungs- und Kloniertechniken (wie sie z.B. bei Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben sind) isoliert werden.

**[0021]** Weiterhin kann eine Nukleinsäuresequenz, die die SEQ ID Nr. 1 ganz oder teilweise umfaßt, mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) isoliert werden, und zwar dadurch, daß man synthetische Oligonukleotid-Primer, die aufgrund der Sequenzinformation von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 2 entwickelt wurden, durch Einsatz von PCR an *Ochrobactrum anthropi* NCIB 40321, und könnte auch isoliert werden, wenn die Oligonukleotid-Primer an einem Mikroorganismus mit enantioselektiver Amidaseaktivität eingesetzt werden.

**[0022]** Eine in der Erfindung beschriebene Nukleinsäuresequenz kann auch unter Verwendung von z.B. genomischer DNA, cDNA oder auch der entsprechenden mRNA aus einem Mikroorganismus mit enantioselektiver Amidaseaktivität als Template und entsprechenden Oligonukleotid-Primern, die auf der im vorliegenden Text bereitgestellten Sequenzinformation beruhen, nach üblichen (RT)-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einem geeigneten Vektor kloniert und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden.

**[0023]** Weiterhin können Oligonukleotide, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen entsprechen oder mit diesen hybridisieren, nach üblichen Synthesetechniken, z.B. mit einem DNA-Syntheseautomaten, erzeugt werden.

**[0024]** Die in der Erfindung beschriebenen Nukleinsäuresequenzen können in einem geeigneten Vektor kloniert werden, und die Sequenz kann nach Einführung in einen geeigneten Wirt exprimiert werden, um die entsprechenden enantioselektiven Amidasen nach üblichen Klonierungs- und Expressionstechniken, die dem Fachmann vertraut sind (z.B. wie bei Sambrook, J., Fritsh, E.F. und Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausg. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben) herzustellen. Die Erfindung betrifft auch solche Vektoren, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthalten.

**[0025]** Geeignete Vektoren sind diejenigen Vektoren, die üblicherweise für Klonier- und Expressionszwecke verwendet werden und mit denen der Fachmann vertraut ist. Beispiele für geeignete Vektoren für die Expression in *E. coli* finden sich z.B. in Tabelle 1 in Makrides, S.C., *Microbiological Reviews*, Band 60, Nr. 3, (1996), 512-538. Vorzugsweise enthält der Vektor oberhalb der Klonierungsstelle, die die für das Polypeptid mit Amidaseaktivität kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, einen Promoter, der angeschaltet werden kann, nachdem der Wirt gezüchtet worden ist, um das entsprechende Polypeptid mit Amidaseaktivität zu exprimieren. Promoter, die an- und abgeschaltet werden können, sind dem Fachmann bekannt; es handelt sich dabei zum Beispiel um den lac-Promoter, den araBAD-Promoter, den T7-Promoter, den trc-Promoter, den tac-Promoter und den trp-Promoter. Besonders nützlich im Zusammenhang mit der Erfindung sind zum Beispiel die in WO 00/66751 beschriebenen Vektoren, z.B. pKAFssECtrp oder pKAFssECaro ohne das Insert, das Penicillin-G-Acylasegen. Geeignete Wirte sind diejenigen Wirte, die normalerweise für Klonier- und Expressionszwecke verwendet werden und mit denen der Fachmann vertraut ist. Beispiele für geeignete Wirtsstämme sind zum Beispiel *Escherichia coli*-Stämme, z.B. *E. coli* TOP10F', TOP10, DH10B, DH5a, HB101, W3110, BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS. Besonders nützlich im Zusammenhang mit der Erfindung sind *Escherichia coli* K-12-Stämme, z.B. DH1, HB101, RV308, RR1, W3110, C600.

**[0026]** Die Wahl des Vektors kann manchmal von der Wahl des Wirts abhängen und umgekehrt. Wird z.B. ein Vektor mit einem araBAD-Promoter verwendet, so wird ein *E. coli*-Wirt-Stamm, der nicht fähig ist, den Arabinose-Induktor abzubauen (ara-), stark bevorzugt.

**[0027]** Die in der Erfindung beschriebenen Nukleinsäuresequenzen können jedoch auch in das Genom einer Wirtszelle, die normalerweise keine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthält, integriert und dort (über) exprimiert werden. Dies kann nach den fachbekannten Methoden erfolgen. Die Erfindung betrifft auch eine Wirtszelle, die normalerweise keine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthält, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz umfaßt, vorzugsweise eine Wirtszelle, die einen Vektor umfaßt, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz umfaßt.

**[0028]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung des Expressionsprodukts einer Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1-5, wobei in einem ersten Schritt die Nukleinsäuresequenz in eine geeignete Wirtszelle, die normalerweise keine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthält, eingebracht wird und wobei die Nukleinsäuresequenz anschließend in diesem Wirt exprimiert wird. Die Einführung einer Nukleinsäuresequenz und die anschließende Expression sind übliche Techniken, mit denen der Fachmann vertraut ist.

**[0029]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren für die Fermentation eines Mikroorganismus in einem Fer-

mentationsmedium, wobei das Verfahren eine Batch-Phase und eine Zufütterungsphase umfaßt, und wobei der Mikroorganismus eine erfindungsgemäße Nukleinsäure exprimiert und wobei zwischen 0,5 und 50 mg (entsprechend zwischen 7,7  $\mu\text{M}$  und 770  $\mu\text{M}$ )  $\text{Zn}^{2+}$  pro Liter Fermentationsmedium während der Fermentation zugefüttert werden.

**[0030]** Typischerweise wird mit der Zufütterungsphase nach ungefähr 10 Stunden begonnen. Die  $\text{Zn}^{2+}$ -Menge von 0,5-50 mg/l Fermentationsmedium kann dem Fermentationsmedium auf einmal zugefüttert werden, wird jedoch vorzugsweise dosiert, da das Zufügen von  $\text{Zn}^{2+}$  in einer Portion zur Schaumbildung auf dem Fermentationsmedium und zu Lyse der Mikroorganismen später während der Fermentation führt. Das  $\text{Zn}^{2+}$  kann in zum Beispiel 5-10 gleichen Portionen zudosiert werden, das  $\text{Zn}^{2+}$  kann jedoch auch in unterschiedlichen Portionen während der Zufütterungsphase zudosiert werden. Vorzugsweise wird das  $\text{Zn}^{2+}$  kontinuierlich dem Fermentationsmedium zugefüttert. Wird kontinuierlich zugefüttert, ist es äußerst praktisch, das  $\text{Zn}^{2+}$  mit anderen Komponenten in einer Feed-Mischung zu vereinigen.

**[0031]**  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen sind zum Beispiel in Zinksalzen vorhanden. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden vorzugsweise solche Zinksalze verwendet, die gut wasserlöslich sind (mehr als 0,1 mol pro Liter), zum Beispiel  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZnBr}_2$ ,  $\text{ZnI}_2$ .

**[0032]** Bei dem in der Fermentation eingesetzten Mikroorganismus kann es sich um einen Mikroorganismus handeln, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auf natürliche Art und Weise besitzt und diese exprimiert, es handelt sich jedoch vorzugsweise um einen Wirt, in dem die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz exprimiert wird, stärker bevorzugt überexprimiert wird.

**[0033]** Es wurde gefunden, daß die enantioselektive Amidaseaktivität eines Expressionsprodukts einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz auch in Gegenwart von zwischen 0,01 mM und 100 mM  $\text{Zn}^{2+}$  verbessert wird. Die Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren zur Produktion einer enantiomerenangereicherten Carbonsäure und/oder eines enantiomerenangereicherten Carbonsäureamids, bei dem eine Mischung der entsprechenden D- und L-Carbonsäureamide mit einem Expressionsprodukt nach einem der Ansprüche 1-5 in Gegenwart von zwischen 0,01 mM und 100 mM  $\text{Zn}^{2+}$  in Kontakt gebracht wird, wobei eines der Enantiomere des Carbonsäureamids enantioselektiv zu der entsprechenden enantiomerenangereicherten Carbonsäure hydrolysiert wird, während das andere Enantiomer des Carbonsäureamids unverändert bleibt. Falls erwünscht, kann das verbleibende enantiomerenangereicherte Carbonsäureamid zu der entsprechenden enantiomerenangereicherten Säure hydrolysiert werden. Die Hydrolyse des verbleibenden Carbonsäureamids kann nach fachbekannten Verfahren, wie zum Beispiel unter basischen oder sauren Bedingungen oder enzymatisch, erfolgen.

**[0034]** Vorzugsweise wird die enantioselektive Hydrolyse, die durch das Expressionsprodukt einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz katalysiert wird, in Gegenwart von zwischen 0,01 und 50, stärker bevorzugt zwischen 0,05 und 20 mM  $\text{Zn}^{2+}$  durchgeführt.

**[0035]** Der pH-Wert, bei dem die enantioselektive Hydrolyse, die durch das Expressionsprodukt einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz katalysiert wird, durchgeführt wird, ist nicht kritisch; vorzugsweise wird die enantioselektive Hydrolyse bei einem pH-Wert zwischen 5 und 9, stärker bevorzugt zwischen 6,5 und 8,5, durchgeführt.

**[0036]** Die Temperatur, bei der die enantioselektive Hydrolyse in Gegenwart eines erfindungsgemäßen Expressionsprodukts durchgeführt wird, beträgt vorzugsweise zwischen 10 und 75°C, stärker bevorzugt zwischen 30 und 65°C, insbesondere zwischen 40 und 60°C.

**[0037]** Als Mischung können racemische Mischungen von D- und L-Carbonsäureamid eingesetzt werden, es können natürlich auch zufällig gewählte Mischungen von D- und L-Carbonsäureamid eingesetzt werden.

**[0038]** Beispiele für geeignete Carbonsäureamide sind:  $\alpha$ -H- $\alpha$ -Aminosäureamide mit 2-20 C-Atomen oder Derivate davon wie zum Beispiel Alaninamid, Phenylglycinamid, Phenylalaninamid, para-Hydroxyphenylglycinamid, Prolinamid, Valinamid, Leucinamid, tert.-Leucinamid, Methioninamid, Prolinamid, Glutaminsäureamid,  $\alpha$ -H- $\alpha$ -Hydroxysäureamide mit 2-20 C-Atomen, zum Beispiel Mandelsäureamid,  $\alpha$ - $\alpha$ -Dialkylaminosäureamide mit 2-20 C-Atomen, zum Beispiel  $\alpha$ -Methylvalinamid,  $\alpha$ -Methylphenylglycinamid, Ethylphenylglycinamid,  $\alpha$ -Butylphenylglycinamid, Methylphenylalaninamid,  $\alpha$ -Ethylphenylalaninamid,  $\alpha$ -Ethyl- $\alpha$ -butylglycinamid. Vorzugsweise wird in einem erfindungsgemäßen Verfahren tert.-Leucin oder  $\alpha$ -Methylphenylglycin produziert.

**[0039]** Die folgenden Beispiele, die hinzugefügt wurden, dienen der Erläuterung der Erfindung.

### Beispiele

#### Beispiel 1

Fermentation von *Escherichia coli* K-12, der in SEQ ID Nr. 1 dargestellt Aminosäuresequenz exprimiert, mit Zugabe von  $\text{Zn}^{2+}$  til Fermentationsmedium während der Zufütterungsphase.

**[0040]** Es wurde das folgende Inokulationsmedium hergestellt:

Hefeextraktpulver (DIFCO, Bacto™)	38 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	17,8 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	13,6 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	4,8 g
Destilliertes Wasser	1500 ml

**[0041]** Der pH-Wert wurde mit wäßriger NaOH auf 6,8 eingestellt. 100- und 200-ml-Portionen wurden in 500- bzw. 2000-ml-Erlenmeyerkolben gegeben und sterilisiert (20 Minuten bei 121°C). Der 500-ml-Kolben wurde aseptisch mit 1,1 ml einer 50%igen (w/v) Glucose- und 2,2 ml einer Neomycin-(1,2 g/l) Lösung versetzt (Inokulationsphase 1). Der 2000-ml-Kolben wurde mit 1 bzw. 2 ml der 50%igen (w/v) Glucose- und der Neomycin-(1,2 g/l) Lösung versetzt (Inokulationsphase 2).

**[0042]** Anschließend wurde der Erlenmeyerkolben der Inokulationsphase 1 mit 1,8 ml einer Suspension des *E. coli* K-12-Stamms, der die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 exprimiert, in 50% (v/v) Glycerin/Wasser inokuliert und das ganze wurde 22 Stunden lang bei 27°C unter ständigem kreisförmigem Schütteln kultiviert und inkubiert. Für die Expression der in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz in dem *E. coli* K-12-Stamm RV308 wurde die Nukleinsäuresequenz mittels PCR mit amidasespezifischen Primern mit Verlängerungen am 5'-Ende, die eine Restriktionsstelle enthielten (NdeI für den Forward-Primer Smal für Reverse-Primer) amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde in ein Derivat des *E. coli*-Expressionsvektors pKEC-trp kloniert, und zwar an die *E. coli* Penicillin-G-Acylase-Codiersequenz, wobei die Restriktionsenzyme NdeI und Smal verwendet wurden. Der abgeleitete Expressionsvektor ähnelt dem Konstrukt pKECtrp, dessen Konstruktion in WO 00/66751 beschrieben wurde, nur daß er den *aro*-Promoter aus *E. coli* statt des *trp*-Promoters enthält. Für die Inokulation des 2000-ml-Erlenmeyerkolbens der Inokulationsphase 2 wurde der gesamte Erlenmeyerkolben der Inokulationsphase 1 verwendet. Die Inokulationsphase 2 wurde 3 Stunden lang bei 27°C unter ständigem kreisförmigem Schütteln kultiviert und inkubiert.

**[0043]** 6,4 l Batch-Phase-Medium in einem 20-l-Glasfermenter wurden mit 2 % (v/v) Inokulationsphase 2 inokuliert. Das Batch-Phase-Medium wies die folgende Zusammensetzung auf:

Gistex® LS-Paste	24,6 g/l
Citronensäure	10 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,1 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,169 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9,0 g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,006 g/l

**[0044]**

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,004 g/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,004 g/l
Schaumhemmer: Basildon 86/013	Einige Tropfen
$\text{K}_2\text{HPO}_4^1$	8,1 g/l
Dextrose <sup>2</sup>	11,4 g/l
Neomycin <sup>2</sup>	0,012 g/l
Thiamin <sup>2</sup>	0,014 g/l

**[0045]** Das Batch-Phase-Medium wurde 65 Minuten lang bei 121°C sterilisiert, nachdem der pH-Wert (mit NaOH) auf 4,5 eingestellt wurde. Die mit <sup>1</sup> und <sup>2</sup> bezeichneten Mediumkomponenten wurden jeweils getrennt ge-

löst, und die Lösung mit den Komponenten mit der Bezeichnung <sup>1</sup> wurden 65 Minuten lang bei 121°C sterilisiert, während Lösungen mit den Komponenten, die mit <sup>2</sup> bezeichnet sind, steril filtriert wurden. Beide wurden aseptisch zu dem Medium zugegeben. Vor dem Überführen der Inokulationsphase 1 wurde der pH-Wert des Batch-Phase-Mediums auf 7,0 eingestellt. Die Fermentation wurde bei 27°C unter ständigem Rühren und optimalen Belüftungsbedingungen gefahren. Zwischen 50 und 54 Stunden wurde die Temperatur der Fermentation im Verlauf von 4 Stunden linear von 27 auf 25°C gesenkt und bei diesem Wert bis zum Ende der Fermentation aufrechterhalten.

**[0046]** Während der Fermentation (Batch-Phase und Zufütterungsphase) wurde der pH-Wert zwischen 7,00 und 7,30 schwanken gelassen. Die Batch-Phase wurde mit dem Beginnen mit Feed-Medium 1 und Feed-Medium 2 (Beginn der Zufütterungsphase) beendet, als der pH einen Wert von 7,15 erreicht hatte. Zu diesem Zeitpunkt war die Kohlenstoffquelle erschöpft. Die Batch-Phase dauerte ungefähr 9 Stunden. Das Feed-Medium 1 wies die folgende Zusammensetzung auf:

Dextrose	670 g/l
Thiamin <sup>1</sup>	0,18 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	14,4 g/l
Prolin <sup>1</sup>	6,1 g/l
Mononatriumglutamat <sup>1</sup>	12,2 g/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	0,022 g/l

**[0047]** Das Feed-Medium 1 wurde folgendermaßen hergestellt. Erst wurde die Dextrose gelöst. Die Dextroselösung wurde mit ungefähr 0,4 ml/l 4N HCl versetzt. Die Lösung wurde sterilisiert (30 Minuten bei 121°C). Thiamin, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, Prolin und Mononatriumglutamat und ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O wurden getrennt gelöst und die Lösung wurde steril filtriert, bevor sie (aseptisch) zu der Dextroselösung gegeben wurde. Das Profil, nach dem der Zulauf des Feed-Mediums 1 in das Batch-Phase-Medium erfolgte, ist unten in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Feed-Profil für den Zulauf von Feed-Medium 1.

Zeit	Sollwert [ $\frac{\text{g}_{\text{Feed-Medium}}}{(\text{l}_{\text{Start}} \cdot \text{h})}$ ]
0 (Start der Zufütterung) – 14 Stunden	$2,59 \times e^{(0,07 \times \text{Zeit})}$
14-40 Stunden	$6,91 + 0,48 \times (\text{Zeit}-14)$
40 Stunden – Ende der Fermentation	19,3

**[0048]** Das Feed-Medium 2 wies die folgende Zusammensetzung auf:

Gistex® LS-Paste	300 g/l
------------------	---------

**[0049]** Das Feed-Medium 2 wurde folgendermaßen hergestellt. Erst wurde die Hefeextraktpaste in Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 4,5 +/- 0,1 eingestellt. Die Lösung wurde sterilisiert (30 Minuten bei 121°C). Das Profil, nach dem der Zulauf des Feed-Mediums 2 in das Batch-Phase-Medium erfolgte, ist unten in Tabelle 2 angegeben. Unter 'Zeit' versteht man in den Profilen von Tabelle 1 und 2 'Stunden nach Beginn der Zufütterung'.

Tabelle 2. Profil für den Zulauf von Feed-Medium 2.

Zeit	Sollwert [ $\frac{\text{g}_{\text{Feed-Medium}}}{(\text{l}_{\text{Start}} \cdot \text{h})}$ ]
0 (Start der Zufütterung) – 14 Stunden	$0,81 \times e^{(0,07 \times \text{Zeit})}$
14-34 Stunden	$2,15 + 0,15 \times (\text{Zeit}-14)$
34-38 Stunden	5,15
38 Stunden – Ende der Fermentation	0

**[0050]** Feed-Medium 1 und Feed-Medium 2 stellen das Feed-Phase-Medium dar. Die Fermentation wurde nach 120 Stunden abgebrochen.



**[0051]** Die Fermentation wurde wiederholt, nur daß in dem Feed-Medium 1 kein  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  vorlag.

**[0052]** Die L-Amidaseaktivität in der Fermentationsbrühe (Fermentationsmedium und Zellen) nach dem Beginn der Zufütterungsphase wurde für beide Fermentationen bestimmt, und zwar folgendermaßen:

Analyse der L-Amidaseaktivität von Fermentationsbrühe (Fermentationsmedium mit Zellen)-Proben aus der Fermentation von *Escherichia coli* K-12, der die in SEQ ID Nr. 1 gezeigte Nukleinsäuresequenz exprimiert, mit  $\text{Zn}^{2+}$  in Feed-Medium 1 und ohne  $\text{Zn}^{2+}$  in Feed-Medium 1.

**[0053]** 1,5 ml Inkubationsreagens (enthält 1,1 Gew.-% L-Phenylglycinamid, 0,11 M HEPES-NaOH-Puffer, pH 8,0 und 1,1 mM  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) wurden im Wasserbad auf  $55^\circ\text{C}$  erwärmt. Nach 10 Minuten wurde das erwärmte Inkubationsreagens mit 100  $\mu\text{l}$  einer Probenlösung (enthaltend Fermentationsbrühe, die mit 20 mM HEPES-NaOH-Puffer, pH 7,5/2 mM DTT verdünnt war) versetzt. Nach 20 minütiger Inkubation der Kombination von Inkubationsreagens und Probenlösung wurde die Reaktion gestoppt, und zwar dadurch, daß man 100  $\mu\text{l}$  der Kombination des Inkubationsreagens zu 1,5 ml Stopp-Reagens (53 mM Phosphorsäure) gab. Der gestoppte Ansatz wurde 5 Minuten lang bei 14000 rpm zentrifugiert.

**[0054]** Der Überstand wurde mittels HPLC analysiert und zwar unter den folgenden Bedingungen:

Säule: Nucleosil 120-3C18 (125  $\times$  4 mm)

Wellenlängendetektor: 220 nm

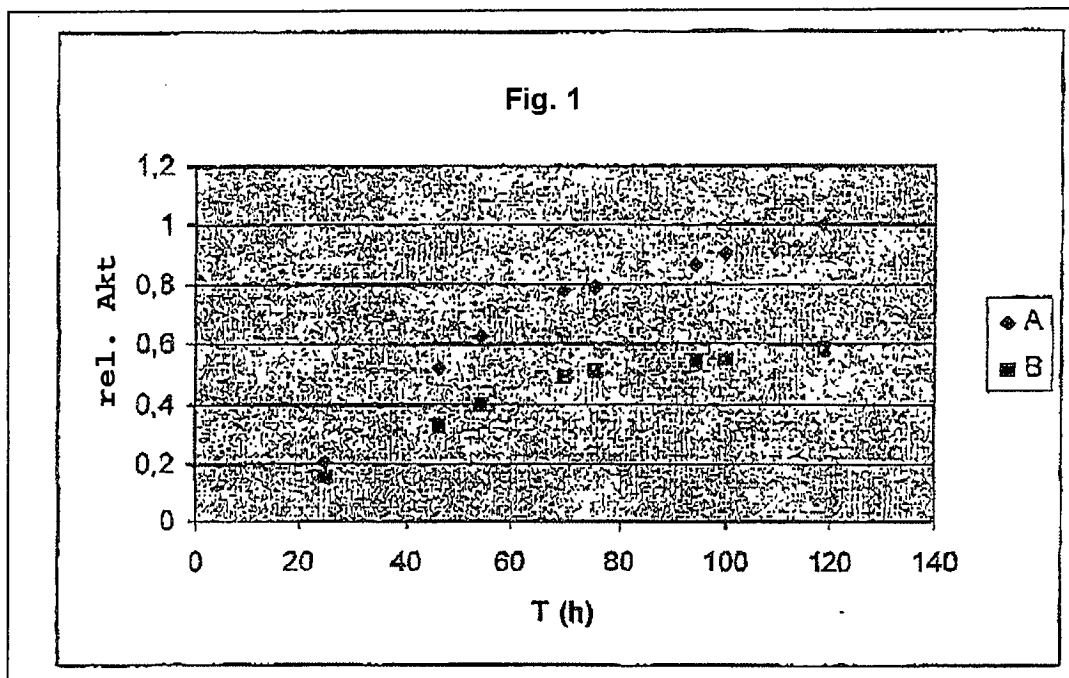
Volumendurchfluß: 1,0 ml/min

Einspritzvolumen: 20  $\mu\text{l}$

Elutionsmittel: 100 mM Phosphat-Puffer pH 3,0

**[0055]** Die Retentionszeiten von L-Phenylglycin und L-Phenylglycinamid betragen ungefähr 1,8 bzw. 2,7 Minuten.

**[0056]** Die Fläche unter dem HPLC-Peak, der dem Phenylglycin entspricht, wurde berechnet und nach Korrektur um den Verdünnungsfaktor der Fermentationsbrühe mit der Fläche unter dem Phenylglycin-Peak von anderen Proben verglichen. Die relativen Peakflächen der Proben entsprechen der relativen L-Amidaseaktivität, bei der es sich um die Aktivität der Proben untereinander handelt. Die relative L-Amidaseaktivität (rel. Akt.) in den Proben aus der Fermentation mit einem Feed-Medium 1 mit  $\text{Zn}^{2+}$  (A) und Feed-Medium 1 ohne  $\text{Zn}^{2+}$  (B) ist in **Abb. 1** dargestellt, in der die relative Aktivität gegen T(h) aufgetragen ist, dem Zeitpunkt (in Stunden nach Beginn der Batch-Phase), zu dem die Proben gezogen wurden.



**[0057]** Aus **Fig. 1** ist ersichtlich, daß mehr L-Amidaseaktivität produziert wird, wenn  $\text{Zn}^{2+}$  zu der Fermentation während der Feed-Phase zugefüttert wird.

Herstellung der Enzymlösung LAM0011 von der Fermentation mit  $\text{Zn}^{2+}$  im Feed-Medium 1.

**[0058]** Die Fermentationsbrühe von der Fermentation mit  $\text{Zn}^{2+}$  im Feed-Medium 1 wurde mit 4 g/l Octanol in der Fermentation behandelt um die Mikroorganismen abzutöten, und wurde zweimal durch Hochdruckhomogenisation (600-700 bar) homogenisiert. Nach dem Homogenisieren wurde die Brühe durch Versetzen mit 10 Vol.-%, bezogen auf das Volumen einer Brühe einer 10%igen C577-Lösung, ausgeflockt. Es wurde mit 10 Vol.-%, bezogen auf das Brühenvolumen, Dicalite 448, einem Filtrierhilfsmittel, versetzt. Die erhaltene Aufschlammung wurde über eine Membranfilterpresse filtriert und mit einem Filterkuchenvolumen Prozeßwasser gewaschen. Der Biomasse-Filterkuchen wurde eingeäschert. Das Filtrat wurde über Seitz-Filterplatten (Größe 5-15  $\mu\text{m}$ ) und anschließend über 0,1-0,3-Mikrometer-Keimefilterplatten filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde in Behältnissen aufbewahrt und bis zur Weiterverwendung tiefgefroren.

Herstellung der Enzymlösung LAM0001 aus der Fermentation ohne  $\text{Zn}^{2+}$  im Feed-Medium 1.

**[0059]** Die Fermentationsbrühe von der Fermentation ohne  $\text{Zn}^{2+}$  im Feed-Medium 1 wurde mit 4 g/l Octanol in der Fermentation behandelt um die Mikroorganismen abzutöten, und wurde zweimal durch Hochdruckhomogenisation (600-700 bar) homogenisiert. Nach dem Homogenisieren wurde die Brühe durch Versetzen mit 10 Vol.-%, auf das Volumen einer Brühe einer 10%igen C577-Lösung, ausgeflockt. Es wurde mit 10 Vol.-%, bezogen auf das Brühenvolumen, Dicalite 448, einem Filtrierhilfsmittel, versetzt. Die erhaltene Aufschlammung wurde über eine Membranfilterpresse filtriert und mit einem 2,2 Filterkuchenvolumina Prozeßwasser gewaschen. Der Biomasse-Filterkuchen wurde eingeäschert. Das Filtrat wurde über Seitz-Filterplatten mit einer Größe von 5-15 Mikrometern und anschließend über 0,1-0,3-Mikrometer-Keimefilterplatten filtriert. Hiernach wurde das erhaltene Filtrat mit 50-kD-Polysulphon-Membranen um den Faktor 3 eingengt. Das Retentat wurde mit einem Viertel des Retentatsvolumens RO-Wasser gewaschen. Hiernach wurde das Filtrat nochmals über Seitz-Filterplatten mit einer Größe von 5-15 Mikrometern und anschließend über 0,1-0,3-Mikrometer-Keimfiltrationsplatten filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde in Behältnisse gefüllt und bis zur Verwendung in der Anwendungsreaktion (Beispiele 2-5) tiefgefroren.

#### Beispiel 2

Enantioselektive Hydrolyse von DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid in Gegenwart von unterschiedlichen  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationen bei pH 6,5 mit L-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321

**[0060]** Die Auswirkung der  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration auf die Hydrolysereaktion von DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid mit der L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321 wurde dadurch bestimmt, daß man diese Reaktionen in Gegenwart von 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 und 9,0 mM  $\text{Zn}^{2+}$  durchführte. Als Kontrolle wurde außerdem eine Reaktion ohne zusätzliches  $\text{Zn}^{2+}$  durchgeführt.

**[0061]** Für diesen Versuch wurden Flaschen mit 25 g Ansatz gefüllt, wobei jeder Ansatz 2,5 g DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid (Endkonzentration 10 Gew.-%), 46  $\mu\text{l}$  *O. anthropi* NCIMB 40321 Batch-Nr. LAM0011 und entweder kein zusätzliches  $\text{ZnSO}_4$  oder 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 oder 9,0 mM  $\text{ZnSO}_4$  enthielt. Der pH-Wert betrug bei allen Ansätzen 6,5. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Enzymflüssigkeit gestartet.

**[0062]** Alle Ansätze wurden auf einem Kreisschüttler bei 55°C und 200 rpm inkubiert. Direkt nach Zugabe des Enzyms ( $t = 0$  Stunden) sowie nach 1, 4 bzw. 11 Stunden wurden Proben zu je 1 g gezogen und in Röhrchen, die 4 g 1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  zum sofortigen Abstoppen der Reaktion enthielten, übergeführt. Die genaue Menge Probe und Stop-Lösung wurden durch Wiegen bestimmt. Nach Filtration über ein 0,22  $\mu\text{m}$ -Filter wurden die Konzentrationen an  $\alpha$ -Methylphenylglycin und  $\alpha$ -Methylphenylglycinamid mittels HPLC bestimmt, und zwar nach der folgenden Vorschrift:

Säule:	Inertsil ODS-3 (3 $\mu\text{m}$ ) 50 mm * 4,6 mm i.D.
Elutionsmittel:	50 mM $\text{H}_3\text{PO}_4$ -NaOH, pH = 2,5
Volumendurchfluß:	0,8 ml/min
Temp.:	40°C
Einspritzvolumen:	15 $\mu\text{l}$
Detektion:	UV 210 nm

**[0063]** Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 3 dargestellt, in der die Umsatzraten (Menge gebildete Aminosäure im Vergleich zu der Gesamtmenge Ausgangs-Aminosäureamid) der Ansätze als relative Umsatz-

raten angegeben sind; die höchste Umsatzrate wurde gleich 100 gesetzt.

Tabelle 3. Einfluß der  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration auf die Hydrolysereaktion von DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid durch die L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321 (Batch-Nr. LAM 0011).

Bezeichnung	$[\text{Zn}^{2+}]$ (mM)	Umsatz nach		
		1 h	4 h	11 h
A	9,0	28	85	100
B	3,0	24	87	100
C	1,0	19	83	100
D	0,3	16	74	97
E	0,1	11	61	92
F	0	1,4	3,1	5,3

**[0064]** Aus Tabelle 3 geht hervor, daß das Vorhandensein von  $\text{Zn}^{2+}$  für die Aktivität der L-Amidase aus *O. anthropi* auf DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid stark bevorzugt wird. Ohne zusätzliches  $\text{Zn}^{2+}$  findet kaum eine Hydrolyse dieses Substrats statt (siehe Probenbezeichnung F).

### Beispiel 3

Enantioselektive Hydrolyse von DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid in Gegenwart von unterschiedlichen zweiwertigen Metallionen bei pH 6,5 mit L-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321

**[0065]** In einem ähnlichen Versuchsansatz wie für Beispiel 2 wurde untersucht, ob zusätzliches  $\text{Zn}^{2+}$  eine positive Auswirkung auf den Umsatz von DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid mit der L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321, die ohne überschüssiges  $\text{Zn}^{2+}$  fermentiert worden war, zeigt. Die Hydrolysereaktionen wurden in Gegenwart von äquimolaren Mengen an  $\text{Mn}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  durchgeführt. Weiterhin wurde eine Kontrollreaktion mit der L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321, die in Gegenwart von überschüssigem  $\text{Zn}^{2+}$  fermentiert worden war, durchgeführt.

**[0066]** Es wurden Flaschen mit 25 g eines Ansatzes gefüllt, wobei jeder Ansatz 2,5 g DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid (Endkonzentration 10 Gew.-%), 240  $\mu\text{l}$  L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321, Präparat LAM0001, sowie ein 1 mM entweder  $\text{MnSO}_4$  oder  $\text{ZnSO}_4$  enthielt. Es wurde ein dritter Ansatz hergestellt, der (außer dem Substrat) 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  sowie 92  $\mu\text{l}$  L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321, Präparat LAM0011 (92  $\mu\text{l}$  LAM0011 entspricht der L-Amidaseaktivität von 240  $\mu\text{l}$  LAM0001) enthielt. Die Inkubation der Substrate, die Probenahme und die Analysen wurden alle wie in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 4 dargestellt, in der die Umsatzraten (Menge gebildete Aminosäure im Vergleich zu der Gesamtmenge Ausgangs-Aminosäureamid) der Ansätze als relative Umsatzraten angegeben sind; die höchste Umsatzrate wurde gleich 100 gesetzt.

Tabelle 4. Auswirkung des  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Zusatzes auf die Hydrolyse von DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid durch die L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321, die ohne  $\text{Zn}^{2+}$  im Feed-Medium 1 (Batch-Nr. LAM0001) und mit  $\text{Zn}^{2+}$  im Feed-Medium 1 (Batch-Nr. LAM0011) fermentiert wurde.

Probenbezeichnung	Enzympräparat	Metallion	Umsatz nach		
			1 h	3 h	5 h
A	LAM0001	$\text{Mn}^{2+}$	11	33	55
B	LAM0001	$\text{Zn}^{2+}$	33	94	100
C	LAM0011	$\text{Zn}^{2+}$	36	93	100

**[0067]** Aus Tabelle 4 geht hervor, daß in Gegenwart von 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  die Umsatzraten von DL- $\alpha$ -Methylphenylglycinamid mit den mit und ohne  $\text{Zn}^{2+}$  fermentierten Enzymen ähnlich sind und beide höher als bei Umsatz in Gegenwart von 1 mM  $\text{Mn}^{2+}$  sind.

## Beispiel 4

Enantioselektive Hydrolyse von DL-tert.-Leucinamid in Gegenwart von unterschiedlichen zweiwertigen Metallionen bei pH 7,0 durch die L-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321

**[0068]** In einer ähnlichen Versuchsanordnung wie für Beispiel 2 wurde die Auswirkung des Vorhandenseins von äquimolaren Mengen an  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  in der Hydrolyse von DL-tert.-Leucinamid mit der L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321 bestimmt. Als Kontrolle wurde eine Reaktion ohne irgendein zusätzliches zweiwertiges Metallion durchgeführt.

**[0069]** Zur Durchführung dieses Versuchs wurden Flaschen mit 25 g Ansatz gefüllt, wobei jeder Ansatz 3,13 g DL-tert.-Leucinamid (Endkonzentration 12,5 Gew.-%), 1,45 ml L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321 (Batch-Nr. LAM0011) sowie 1,0 mM  $ZnSO_4$ ,  $MgSO_4$  bzw.  $MnSO_4$  enthielt. Außerdem wurde eine getrennte Reaktion ohne irgendein zusätzliches zweiwertiges Metallion durchgeführt. Der pH-Wert aller Ansätze betrug 7,0. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Enzymflüssigkeit gestartet.

**[0070]** Alle Ansätze wurden auf einem Kreisschüttler bei 55°C und 150 rpm inkubiert. Direkt nach Zugabe des Enzyms ( $t = 0$  Stunden) sowie nach 1, 3 bzw. 6,7 Stunden wurden Proben zu je 1 g gezogen und in Röhrchen, die 4 g 1 M  $H_3PO_4$  zum sofortigen Abstoppen der Reaktion enthielten, übergeführt. Die genaue Menge Probe und Stop-Lösung wurden durch Wiegen bestimmt. Nach Filtration über ein 0,22  $\mu m$ -Filter wurden die Konzentrationen an tert.-Leucin und tert.-Leucinamid mittels HPLC bestimmt, und zwar nach der folgenden Vorschrift:

Säule:	Inertsil ODS-3 (150 mm $\times$ 4,6 mm i.D., 5 $\mu$ ) von Varian-Chrompack
Elutionsmittel:	99% (v/v) 50 mM $H_3PO_4$ , pH = 2,3 mit 1N NaOH + 1% (v/v) Acetonitril
Volumendurchfluß:	1,0 ml/min
Temperatur:	30°C
Einspritz volumen:	20 $\mu$ l
Detektion:	Fluoreszenzdetektion nach Nachsäulenderivatisie- rung mit OPA/MCE <sup>(a)</sup> ( $\lambda_{ex}$ 365 nm und $\lambda_{em}$ > 420 nm).

(a) Die Nachsäulenderivatisierung erfolgte in einer Reaktionsspirale (2 m  $\times$  0,25 mm i.D.) bei Umgebungstemperatur mit 0,4 M Boratpuffer pH 10, der o-Phthalaldehyd (OPA) und 2-Mercaptoethanol (MCE) enthielt. Der Volumendurchfluß des Derivatisierungsreagens betrug 1,0 ml/min. Das Reagens wurde dadurch hergestellt, daß man zuerst 49,46 g  $H_3BO_3$  und 35 g KOH in 2 Litern Milli-Q-Wasser löste und anschließend den pH-Wert mit 1M KOH auf 10 einstellte. Anschließend wurde dieser Boratpuffer mit 1,6 g OPA (in 20 ml Ethanol) und 2 ml MCE versetzt.

**[0071]** Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 5 dargestellt, in der die Umsatzraten (Menge gebildete Aminosäure im Vergleich zu der Gesamtmenge Ausgangs-Aminosäureamid) der Ansätze als relative Umsatzraten angegeben sind; die höchste Umsatzrate wurde gleich 100 gesetzt.

Tabelle 5. Einfluß des Vorliegens von unterschiedlichen zweiwertigen Metallionen auf die Hydrolyse von DL-tert.-Leucinamid durch die L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321 (Batch-Nr. LAM 0011).

Probebezeichnung	Metallion	Umsatz nach		
		1 h	3 h	6,7 h
A	Zn <sup>2+</sup>	15	56	100
B	Mg <sup>2+</sup>	8,9	32	77
C	keines	8,1	30	69

**[0072]** Die Werte in Tabelle 5 zeigen deutlich, daß in Gegenwart von 1 mM Zn<sup>2+</sup> DL-tert.-Leucinamid schneller durch die L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321 hydrolysiert wird als in Gegenwart einer äquivalenten Menge Mg<sup>2+</sup> oder bei Fehlen von einem zusätzlichen zweiwertigen Metallion.

#### Beispiel 5

Enantioselektive Hydrolyse von DL-tert.-Leucinamid in Gegenwart von Zn<sup>2+</sup> bei unterschiedlichen pH-Werten mit L-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321

**[0073]** Um den Einfluß des pH-Werts auf die Aktivität der L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321 auf die enantioselektive Hydrolyse von DL-tert.-Leucinamid zu untersuchen, wurden Reaktionen mit und ohne 1 mM Zn<sup>2+</sup> bei pH 7,0, 8,0 bzw. 9,0 durchgeführt.

**[0074]** Die gesamte Versuchsanlage war mit der Versuchsanlage von Beispiel 3 identisch. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6. Einfluß des pH-Werts des Ansatzes auf die Hydrolyse von DL-tert.-Leucinamid mit und ohne 1 mM ZnSO<sub>4</sub> durch die L-Amidase aus *O. anthropi* NCIMB 40321 (Batch-Nr. LAM0011).

Probebezeichnung	pH-Wert	Zn <sup>2+</sup> (1 mM)	Umsatz nach		
			1 h	3 h	6,7 h
A	7	+	15	56	100
B		–	8,1	30	69
C	8	+	14	46	94
D		–	11	38	82
E	9	+	14	43	93
F		–	13	39	77

## Sequenzbeschreibung

&lt;110&gt; DMS NV

<120> Nukleinsäuresequenzen codierend für  
enantioselektive Amidasen

&lt;130&gt; 20594WO

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 945

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Ochrobactrum anthropi NCIMB 40321

&lt;400&gt; 1

```

atgtgcaata attgccatta caccattcac ggcgggcata atcatttcgg ctgggacaac 60
tcgttccagc cggetgaaac ggtcgcgccc ggctcgaccc tgaaattcga atgtctggac 120
agcggcgag gccactatca tcgcggcagc acagtcgccc atgtgtogac gatggatttt 180
tccaaggta atccggttac cggcccoato ttogtcgatg gagccaaacc gggcgatgtc 240
ctgaaaatca ccattccacca gttcgagcca tcaggcttcg gctggacggc aaatattccg 300
ggcttoggtc ttctcgccga cgacttcaag gaaccggcgc tagcattgtg gaactacaat 360
cccacaacgc tggagccagc actcttoggg gagcgtgogc gcgtgccgct gaagccgttc 420
gccggaacca tcggcgctgc accggcggaa aagggcctgc attcggctgt accaccgct 480
cgtgtcggcg gcaatctcga catccgcgat cttgcagccg gaaccacgct ttatctgccg 540
atcgaagtgc aaggcgcttt gttctccatt ggtgataccc atgcggcaca gggcgacggc 600
gaagtgtgcg gcaccgccat cgaaagcgcg atgaatgtcg ctctgacgct ggaatctcat 660
aaggatacgc cactgaagat gcccgggttc accacgcccg ggccagtac gcggcaoctc 720
gataccaagg gttacgaagt caccaccggt atcgggtcog atctgtggga aggcgcgaaa 780
gccgcctct ccaacatgat cgaccttctt tgccagacgc agaacctcaa cccggtggat 840
gcctatatgc tctgctcggc ctgcggtgat ctgcgtatca gcgaaatcgt cgatcagccg 900
aactgggtcg tctcgttcta cttccgcgct tccgttttcg aataa 945

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 314

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Ochrobactrum anthropi NCIMB 40321

&lt;400&gt; 2

```

Met Cys Asn Asn Cys His Tyr Thr Ile His Gly Arg His His His Phe
  1              5              10              15

Gly Trp Asp Asn Ser Phe Gln Pro Ala Glu Thr Val Ala Pro Gly Ser
  20              25              30

Thr Leu Lys Phe Glu Cys Leu Asp Ser Gly Ala Gly His Tyr His Arg
  35              40              45

Gly Ser Thr Val Ala Asp Val Ser Thr Met Asp Phe Ser Lys Val Asn
  50              55              60

Pro Val Thr Gly Pro Ile Phe Val Asp Gly Ala Lys Pro Gly Asp Val

```

65	70	75	80
Leu Lys Ile Thr	Ile His Gln Phe Glu	Pro Ser Gly Phe Gly Trp Thr	
	85	90	95
Ala Asn Ile Pro Gly Phe Gly Leu Leu Ala Asp Asp Phe Lys Glu Pro			
	100	105	110
Ala Leu Ala Leu Trp Asn Tyr Asn Pro Thr Thr Leu Glu Pro Ala Leu			
	115	120	125
Phe Gly Glu Arg Ala Arg Val Pro Leu Lys Pro Phe Ala Gly Thr Ile			
	130	135	140
Gly Val Ala Pro Ala Glu Lys Gly Leu His Ser Val Val Pro Pro Arg			
	145	150	155
Arg Val Gly Gly Asn Leu Asp Ile Arg Asp Leu Ala Ala Gly Thr Thr			
	165	170	175
Leu Tyr Leu Pro Ile Glu Val Glu Gly Ala Leu Phe Ser Ile Gly Asp			
	180	185	190
Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Gly Glu Val Cys Gly Thr Ala Ile Glu			
	195	200	205
Ser Ala Met Asn Val Ala Leu Thr Leu Asp Leu Ile Lys Asp Thr Pro			
	210	215	220
Leu Lys Met Pro Arg Phe Thr Thr Pro Gly Pro Val Thr Arg His Leu			
	225	230	235
Asp Thr Lys Gly Tyr Glu Val Thr Thr Gly Ile Gly Ser Asp Leu Trp			
	245	250	255
Glu Gly Ala Lys Ala Ala Leu Ser Asn Met Ile Asp Leu Leu Cys Gln			
	260	265	270
Thr Gln Asn Leu Asn Pro Val Asp Ala Tyr Met Leu Cys Ser Ala Cys			
	275	280	285
Gly Asp Leu Arg Ile Ser Glu Ile Val Asp Gln Pro Asn Trp Val Val			
	290	295	300
Ser Phe Tyr Phe Pro Arg Ser Val Phe Glu			
	305	310	

### Patentansprüche

1. Verfahren für die Fermentation eines Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium, wobei das Verfahren eine Batch-Phase und eine Zufütterungsphase umfaßt und wobei der Mikroorganismus eine Nukleinsäure kodierend für eine enantioselektive Amidase mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit SEQ ID Nr. 2 aufweist, exprimiert und wobei zwischen 0,5 und 50 mg Zn<sup>2+</sup> pro Liter Fermentationsmedium während der Fermentation zugefüttert werden.

2. Verfahren zur Produktion einer enantiomerenangereicherten Carbonsäure und/oder eines enantiomerenangereicherten Carbonsäureamids, bei dem eine Mischung der entsprechenden D- und L-Carbonsäureamide mit einem Expressionsprodukt, bei dem es sich um eine enantioselektive Amidase mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit SEQ ID Nr. 2 aufweist, handelt, in Gegenwart von 0,01 mM und 100 mM Zn<sup>2+</sup> in Kontakt gebracht wird, wobei eines der Enantiomere des Carbonsäureamids enantioselektiv zu der entsprechenden enantiomerenangereicherten Carbonsäure hydrolysiert wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen