

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 615**

51 Int. Cl.:

C12P 7/24 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2008 E 08156108 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2119770**

54 Título: **Producción de compuestos de carbonilo alfa-oxifuncionalizados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.01.2014

73 Titular/es:

**RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-
UNIVERSITÄT BONN (100.0%)
REGINA-PACIS-WEG 3
53113 BONN, DE**

72 Inventor/es:

DEPPENMEIER, UWE, PROF. DR.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 437 615 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de compuestos de carbonilo alfa-oxifuncionalizados

La invención se refiere a un procedimiento para preparar compuestos carbonilo α -oxifuncionalizados a partir de compuestos α -cetocarbonilo.

5 **Antecedentes de la invención**

Los compuestos carbonilo alfa-oxifuncionalizados son bloques componentes indispensables para la síntesis asimétrica debido a sus versátiles grupos funcionales que se transforman fácilmente en otras funcionalidades, por ejemplo derivados dioles, halo o amino y epóxidos. De hecho, se han usado con éxito cetonas o α -hidroxiácidos ópticamente activos como materiales de partida para la síntesis asimétrica de varias moléculas biológicamente activas (p. ej., efedrinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de leucotrienos, azoles antifúngicos y cerebrósidos). Claramente, la síntesis conveniente y eficiente de compuestos α -hidroxicarbonilo ópticamente activos tiene gran significación y hay una gran demanda de la misma. En esencia, el potencial de esta reacción biocatalítica en la síntesis de una biblioteca de hidroxicarbonilos quirales es enorme.

En la química orgánica clásica, la reducción regioespecífica de un único grupo ceto de una α -dicetona, sin reducir el segundo grupo ceto, es casi imposible, una reducción estereoespecífica de uno de dichos grupos ceto es todavía más problemática. Esto se aplica *mutatis mutandis* a la reducción regioespecífica del grupo ceto en α -cetoaldehídos y cetoácidos.

Por otro lado, existen procedimientos para preparar β -hidroxicetonas ópticamente activas, aunque estos protocolos no son adecuados para la preparación de α -hidroxicetonas. Además, en la técnica se conocen enzimas capaces de producir compuestos α -hidroxicarbonilos (Nakagawa, J. y col., J. Biol. Chem. 277:17883-17891 (2002); Bryn, K. y col., Eur. J. Biochem., 18:116-119 (1971)), estas enzimas no son específicas y no solo catalizan las reducciones del grupo ceto deseado sino que también reducen otros residuos funcionales (p. ej., el segundo grupo ceto o grupos aldehídos).

Muchos compuestos orgánicos útiles, como sustancias farmacéuticas y aditivos alimentarios, tienen átomos de carbono asimétricos y existen formas enantioméricas de estas sustancias. En la mayoría de los casos solo un enantiómero es útil como sustancia biológicamente activa, mientras que el otro enantiómero no muestra esta actividad e incluso puede tener un efecto dañino. A menudo, las mezclas racémicas de estos compuestos no se pueden usar, especialmente para sustancias farmacéuticas. Por tanto, la difícil resolución de la mezcla racémica por medio de un procedimiento de síntesis orgánica convencional para dichas sustancias ópticamente activas es inevitable.

La bacteria del ácido acético *Gluconobacter oxydans* se usa en procedimientos industriales a gran escala para la conversión estereoselectiva de moléculas orgánicas (p. ej., en la producción de vitamina C). Esta conversión es catalizada por proteínas, las denominadas oxidoreductasas. Hasta ahora se han caracterizado numerosas de estas oxidoreductasas (Deppenmeier U. y col., Appl. Microbiol. Biotechnol., 60:233-242 (2002)) pero ninguna de ellas reacciona en compuestos α -cetocarbonilo.

35 **Breve descripción de la invención**

Se ha aislado una nueva clase de enzimas de la bacteria del ácido acético *Gluconobacter oxydans* que catalizan una reducción regioselectiva de compuestos α -cetocarbonilo (p. ej., α -dicetonas, α -cetoácidos y α -cetoaldehídos) para formar los respectivos compuestos α -hidroxicarbonilo. En el caso de las α -dicetonas solo se reduce el resto carbonilo adyacente a la cadena alquilo más corta de la molécula, los α -cetoaldehídos se reducen exclusivamente en el resto ceto, de modo que solo forma hidroxialdehídos. No se produce una reducción de resto aldehído químicamente más reactivo. Esto se aplica *mutatis mutandis* a α -cetoácidos, que se reducen exclusivamente en el resto ceto. Las enzimas producen de forma selectiva los respectivos isómeros ópticamente activos, es decir proporcionan una reducción enantioselectiva. Todas las enzimas dependen de la presencia del cofactor NAD(P)H. Se desarrolló un procedimiento para regenerar dicho cofactor, en el que una aldehído deshidrogenasa convirtió el NAD(P) en la forma reducida de modo que el cofactor solo es necesario en cantidades catalíticas.

Estos nuevos biocatalizadores son innovadoras herramientas en la preparación de intermedios clave ópticamente puros para productos farmacéuticos en procedimientos industriales actuales y futuros. Por consiguiente, la invención proporciona

50 (1) un procedimiento para la producción enzimática regio y enantioselectiva de compuestos α -hidroxicarbonilo que comprende hacer reaccionar un compuesto α -cetocarbonilo con una α -cetocarbonilreductasa derivada de *Gluconobacter oxydans*, en el que la α -cetocarbonilreductasa

55 (i) tiene un peso molecular aparente de 20 a 52 kDa y una actividad para reducir selectivamente el resto α -ceto en α -cetoaldehídos y/o α -cetoésteres y/o el resto ceto de una dicetona próxima a la cadena alquilo más corta de la molécula; y

(ii) comprende la secuencia de aminoácidos de Gox0313 (SEC ID N°:2), Gox0502 (SEC ID N°:4), Gox0644 (SEC ID N°:6), Gox0646 (SEC ID N°:8) Gox1615 (SEC ID N°:10), Gox2107 (SEC ID N°:12), Gox2684 (SEC ID N°:14), o un mutante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con las reductasas nativas de SEC ID N1:2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 y que tiene la actividad enzimática de la respectiva reductasa nativa de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14;

(2) una realización preferida de (1) anterior, en la que el cofactor reductor NAD(P)H se aplica en cantidades catalíticas y se regenera con acetaldehído y una aldehído deshidrogenasa, preferentemente una aldehído deshidrogenasa derivada de *Gluconobacter oxydans*;

(3) una realización preferida de (2) anterior, en la que la aldehído deshidrogenasa derivada de *Gluconobacter oxydans* es Gox1122 (SEC ID N°: 16), o un fragmento de la misma que tiene la actividad de la aldehído deshidrogenasa Gox1122, o un mutante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con la aldehído deshidrogenasa nativa de SEC ID N°: 16 y que tiene la actividad de la aldehído deshidrogenasa Gox1122.

El procedimiento biocatalítico descrito en la presente invención permite una producción eficaz y económica de los compuestos α -hidroxi carbonilo diana y reemplaza a los procedimientos de múltiples etapas de la química orgánica clásica. Otras ventajas del procedimiento son su baja demanda de energía, el uso de productos de partida baratos, una menor demanda de disolventes peligrosos y un acceso fácil positivo para el medioambiente de los reactivos (enzimas) de fuentes naturales (microorganismos) Por último, el procedimiento proporciona la producción de compuestos α -hidroxi carbonilo, que son bastante difíciles de producir mediante los procedimientos de síntesis orgánica clásica conocidos hasta la fecha o son imposibles de producir mediante dichos procedimientos.

Breve descripción de las figuras

Fig.1: Estrategias de clonación que usan Bsal (A) o que usan BbsI (B).

Fig. 2: (A) Análisis NATIVE-PAGE de Gox0313 Gox0644 y Gox1615, la calle 1 representa los patrones del peso molecular de 66 kDa, 140 kDa, 232 kDa, 440 kDa y 669 kDa, las calles 2, 3 y 4 representan Gox0313, Gox1615 y Gox0644, respectivamente. (B) Análisis NATIVE-PAGE de Gox2107 y Gox0502, las flechas indican los patrones del peso molecular [desde la parte superior: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), lactato deshidrogenasa (140 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa)], M: marcador del peso molecular, calle 1: Gox2107 (2 μ g de proteína), calle 2: Gox0502 (2 μ g de proteína). (C) Análisis NATIVE-PAGE de Gox2684 y Gox0646, las flechas indican los patrones del peso molecular [desde la parte superior: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), lactato deshidrogenasa (140 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa)]. M: marcador del peso molecular, calle 2: Gox2684 (1 μ g de proteína), calle 3: Gox0646 (2 μ g de proteína).

Fig. 3: Análisis SDS-PAGE de Gox1122, Gox2107, Gox0502, Gox1615, Gox0313 Gox0644, Gox0646 y Gox2684. Las proteínas se compararon con el marcador de peso molecular para determinar el tamaño aproximado (calle 1, marcadores de peso molecular de 14 kDa, 21 kDa, 30 kDa, 45 kDa, 55 kDa, 66 kDa, 80 kDa, 97 kDa, 116 kDa y 205 kDa). Gox 1122 (calle 2) = 50,5 kDa, Gox 2107 (calle 3) = 21,7 kDa, Gox0502 (calle 4) = 39,1 kDa, Gox1615 (calle 5) = 37,1 kDa, Gox0313 (calle 6) = 36,3 kDa, Gox0644 (calle 7) = 31,5 kDa, Gox0646 (calle 8) = 27,7 kDa, y Gox2684 (calle 9) = 39,4 kDa.

Descripción detallada de la invención

La secuenciación del genoma de *Gluconobacter oxydans* reveló sorprendentemente varias oxidorreductasas desconocidas hasta ahora. Ocho de estas enzimas son realizaciones preferidas de la presente invención y son particularmente adecuadas para la producción estereo y regioselectiva de compuestos α -hidroxicarbonilo a partir de compuestos α -cetocarbonilo.

El procedimiento para la producción enzimática regio y enantioselectiva de compuestos α -hidroxicarbonilo del aspecto (1) de la invención comprende hacer reaccionar un compuesto α -cetocarbonilo con una α -cetocarbonilreductasa derivada de *Gluconobacter oxydans*, que

(i) tiene un peso molecular aparente de 20 a 52 kDa y una actividad para reducir selectivamente el resto α -ceto en α -cetoaldehídos y/o α -cetoésteres o, con respecto a las α -dicetonas, el grupo ceto que está proximal a la cadena más corta de la molécula, y

(ii) comprende la secuencia de aminoácidos de las siguiente α -cetocarbonil reductasas: Gox0313 (SEC ID N°:2), Gox0502 (SEC ID N°:4), Gox0644 (SEC ID N°:6), Gox0646 (SEC ID N°:8), Gox1615 (SEC ID N°:10), Gox2107 (SEC ID N°:12), Gox2684 (SEC ID N°:14), y mutantes de las mismas como se ha definido anteriormente. Estas reductasas tienen las siguientes propiedades físicas y químicas:

Gox0313 pertenece a la clase de deshidrogenasas que se unen a cinc y está compuesta por cinco subunidades idénticas con masas moleculares de 36,5 kDa. Las enzimas catalizan la reducción dependiente

de NADH de diversas α -dicetonas, α -cetoaldehído y otros aldehídos alifáticos/aromáticos, que forman α -hidroxicetonas, α -hidroxialdehídos y alcoholes, respectivamente. Las enzimas también usan NADPH pero las actividades son menores. Los sustratos que muestran las actividades más altas fueron 2,3-pentanodiona ($K_m = 3,1$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 97$ U/mg de proteína), 2,3 hexanodiona y acetaldehído ($K_m = 0,5$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 95$ U/mg de proteína). El valor de pH óptimo es de 7 y la temperatura óptima para la biotransformación fue 30°C.

Además, la enzima también fue capaz de catalizar la oxidación dependiente de NAD de algunos alcoholes primarios y secundarios.

Gox0502 pertenece a la clase de NADH:flavina oxidorreductasas y está compuesta por dos subunidades idénticas con masas moleculares de 39,2 kDa. Las enzimas catalizan la reducción dependiente de NADPH de diversos α -cetoaldehídos, α -dicetonas, vinilcetonas de cadena corta y quinonas, que forman α -hidroxialdehídos, α -hidroxicetonas y cetonas. Sustratos que muestran las actividades más altas son 3-butenona ($K_m = 0,1$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 21$ U/mg de proteína) y fenilglioxal. El valor de pH óptimo es de 7 y la temperatura óptima para la biotransformación es de 30°C. La proteína contiene 1 mol de flavinmononucleótido (FMN) por mol de subunidad.

Gox0644 pertenece a la clase de aldo-ceto reductasas y está compuesta por dos subunidades idénticas con masas moleculares de 31,7 kDa. Las enzimas catalizan la reducción dependiente de NADPH de diversas α -dicetonas y α -cetoaldehídos que forman α -hidroxicetonas y α -hidroxialdehídos. Los sustratos que muestran las actividades más altas son 2,3-pentanodiona ($K_m = 5,6$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 79$ U/mg de proteína), fenilglioxal ($K_m = 4,7$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 93$ U/mg de proteína) y fenil-1,2-propanodiona. El valor de pH óptimo es de 6,8 y la temperatura óptima para la biotransformación es de 37°C.

Gox0646 pertenece a la clase de la familia de deshidrogenasa/reductasa de cadena corta y está compuesta por dos subunidades idénticas con masas moleculares de 27,7 kDa. Las enzimas catalizan la reducción dependiente de NADPH de diversas α -dicetonas que forman α -hidroxicetonas. Sustratos que muestran las actividades más altas son 2,3-pentanodiona ($K_m = 9$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 10$ U/mg de proteína) y 2,3-hexanodiona. El valor de pH óptimo es 7 y la temperatura óptima para la biotransformación es 32 °C. Gox1615 pertenece a la clase de aldo-ceto reductasas y está compuesta por dos subunidades idénticas con masas moleculares de 37,2 kDa. Las enzimas catalizan la reducción dependiente de NADPH de diversas α -dicetonas y α -cetoaldehídos que forman α -hidroxicetonas y α -hidroxialdehídos. Los sustratos que muestran las actividades más altas son 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona ($K_m = 3,2$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 6$ U/mg de proteína), fenilglioxal y metilglioxal ($K_m = 3,8$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 22$ U/mg de proteína). El valor de pH óptimo es de 6,5 y la temperatura óptima para la biotransformación es de 30°C.

Gox2107 pertenece a la clase de proteínas flavodoxina y está compuesta por tres subunidades idénticas con masas moleculares de 21,9 kDa. Las enzimas catalizan la reducción dependiente de NADPH del α -cetoaldehído fenilglioxal y diversas vinilcetonas de cadena corta y quinonas, que forman 2-hidroxi-2-fenilacetaldehído, cetonas y quinonas reducidas respectivamente. Los sustratos que muestran las actividades más altas son 1,4-naftoquinona ($K_m = 0,01$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 217$ U/mg de proteína), 3-buten-2-ona ($K_m = 3,8$ mM, $V_{m\acute{a}x} = 119$ U/mg de proteína) y fenilglioxal. El valor de pH óptimo es de 6 y la temperatura óptima para la biotransformación es de 35°C. La proteína contiene 1 mol de dinucleótido de flavinadenina (FAD) por mol de subunidad.

Gox2684 pertenece a la clase de NADH:flavín oxidorreductasas y contiene un dominio de unión a FMN. La enzima está compuesta por dos subunidades idénticas con masas moleculares de 39,4 kDa. El biocatalizador es capaz de reducir diversos α -cetoaldehídos, α -dicetonas y quinonas. Los sustratos con las actividades más altas fueron 2,3-hexanodiona (2,3 U/mg de proteína) y fenilglioxal (2,1 U/mg de proteína).

Las modificaciones, es decir las mutantes de las enzimas nativas mencionadas anteriormente de las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 incluyen mutantes de adición, sustitución, inversión y delección, que tienen al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la enzima nativa según los aminoácidos (principalmente mutantes en los que se añaden, se sustituyen, se invierten y/o se delecionan de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10, residuos de aminoácidos consecutivos o separados; para los mutantes de sustitución particularmente preferida es la sustitución conservadora), aunque con la condición de que dichas enzimas modificadas tengan la actividad enzimática de las enzimas nativas.

Para Gox0644, es particularmente preferido que las modificaciones estén en las siguientes regiones (la numeración de las bases se muestra en la SEC ID N°: 6): región 1: 1-10 (extremo N); región 2: 66-72; región 3: 112-120 (bucle entre β_4 y α_4); región 4: 192-202 (bucle entre β_7 y H1); región 5: 266-279 (bucle en el extremo C); en particular los aminoácidos K234, R240, W30, A272.

Para Gox1615, es particularmente preferido que las modificaciones estén en las siguientes regiones (la numeración de las bases de la SEC ID N°: 10): región 1: 1-10 (extremo N); región 2: 321-332 (bucle en el extremo C); región 3: 84-90 y región 4: 233-252.

Para Gox0313, Gox0646, Gox2107, Gox0502, Gox2684, Gox1122 se prefiere que las modificaciones estén en las

regiones terminales de N y terminales de C.

En el aspecto del procedimiento (1) se prefiere que la reacción se realice en un ambiente sin células, en el que la α -cetocarboxilreductasa está presente como enzima libre o está presente como lisado celular o como enzima inmovilizada. Como alternativa, la reacción se puede realizar en presencia de transformantes que producen la α -cetocarboxilreductasa *in-situ*.

El compuesto α -cetocarboxilo que puede estar reducido se selecciona de α -dicetonas, α -cetoácidos, α -cetoésteres, α -cetoaldehídos y compuestos vinílicos/fenílicos de los mismos (es decir, 4-oxo- α -alq-2,3-en-aldehídos y ácido acetofenona-4-carboxílico). Otro compuesto α -cetocarboxilo que puede estar reducido se selecciona de cloruros de α -cetoácidos y/o anhídridos α -cetoácidos.

10 La reacción puede realizarse en modo discontinuo o en modo continuo.

Es particularmente preferido en el procedimiento de acuerdo con el aspecto (1) que

la α -cetocarboxil reductasa es Gox0313 (SEC ID N°: 2) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N° 2 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N° 2 y el compuesto cetocarboxilo a reducir es una α -dicetona o un α -cetoaldehído; o

15 la α -cetocarboxil reductasa es Gox0502 (SEC ID N° 4) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 4 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 4 y el compuesto cetocarboxilo a reducir es una α -dicetona o un α -cetoaldehído; o

20 la α -cetocarboxil reductasa es Gox0644 (SEC ID N°: 6) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 6 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 6 y el compuesto cetocarboxilo a reducir es una α -dicetona, un α -cetoéster o un α -cetoaldehído; o

la α -cetocarboxil reductasa es Gox0646 (SEC ID N°: 8) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 8 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 8 y el compuesto cetocarboxilo a reducir es una α -dicetona; o

25 la α -cetocarboxil reductasa es Gox1615 (SEC ID N° 10) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 10 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 10 y el compuesto cetocarboxilo a reducir es un α -cetoaldehído o una α -dicetona; o

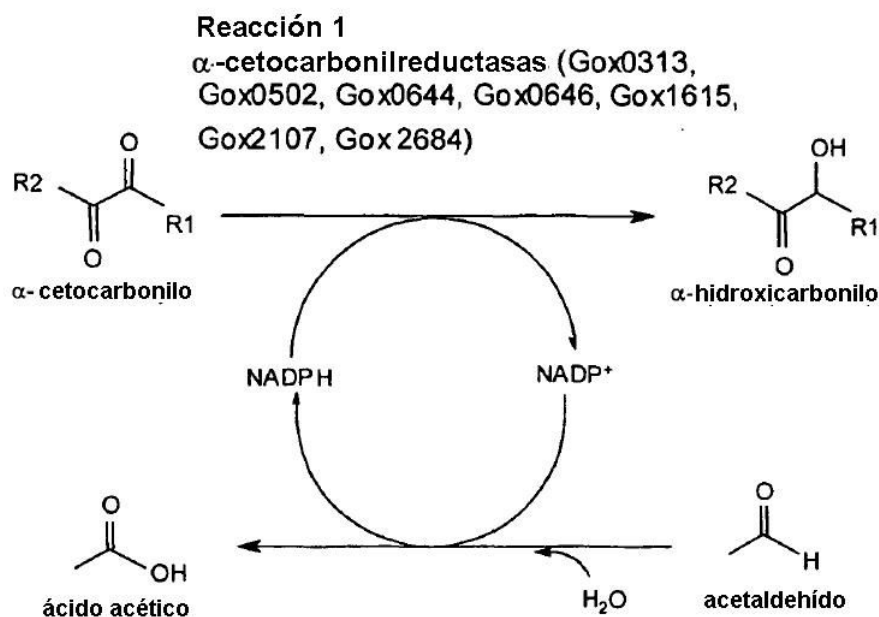
30 la α -cetocarboxil reductasa es Gox2107 (SEC ID N°: 12) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 12 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 12 y el compuesto cetocarboxilo a reducir es un α -cetoaldehído; o

35 la α -cetocarboxil reductasa es Gox2684 (SEC ID N°: 14) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 14 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°:14 y el compuesto cetocarboxilo a reducir es una α -dicetona o un α -cetoaldehído. De acuerdo con los aspectos (2) y (3) de la invención, el cofactor NADPH reductor se aplica en cantidades catalíticas y se regenera con acetaldehído y una aldehído deshidrogenasa. Dicha (3) aldehído deshidrogenasa deriva, preferentemente, de *Gluconobacter oxydans* y, en particular, es Gox1122 (SEC ID N°: 16), o un fragmento de la misma que tiene la actividad de la aldehído deshidrogenasa Gox1122, o un mutante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con la aldehído deshidrogenasa nativa de SEC ID N°: 16 y que tiene la actividad de la aldehído deshidrogenasa Gox1122.

40 Gox1122 es una aldehído deshidrogenasa dependiente de NADP y exhibe una masa molecular aparente de 50,1 kDa. La masa de la subunidad fue 50,5 kDa, lo que indica una estructura monomérica de la enzima nativa. El valor de *K_m* de Gox1122 para acetaldehído, estimado usando varias concentraciones del aldehído de 0,0025 a 10 mM, fue 255 μ M. El valor de *K_m* aparente para NADP fue 73 μ M. El valor de *V_{max}* aparente, estimado a una concentración fija de NADP 0,5 mM con acetaldehído a medida que variaba el sustrato, fue 196 U/mg de proteína, La enzima también oxidó otros aldehídos alifáticos y aromáticos de cadena corta con tasas menores. El valor de pH óptimo es 8 y la temperatura óptima para la biotransformación fue de 30 °C. No se observó reacción de reducción inversa de ácido acético usando NADPH un intervalo de pH de 4-10. La enzima se usa en una reacción enzimática combinada entre las reductasas dependientes de NADPH (véase anteriormente) que forman compuestos α -hidroxycarboxilo. En esta reacción combinada, Gox1122 cataliza la conversión de acetaldehído en ácido acético y de NADP en NADPH.

En cuanto a las mutaciones de la aldehído deshidrogenasa se hace referencia a las mutaciones comentadas en relación con las reductasas anteriores.

La reacción de acuerdo con el aspecto (2) y (3) se explica adicionalmente en el esquema de reacción 1 siguiente.

Esquema de reacción 1

Las α -cetocarboxilreductasas usadas en el aspecto (1) de la invención son α -cetocarboxilreductasas que comprenden la secuencia de aminoácidos Gox0502 (SEC ID N°:4), Gox0644 (SEC ID N°:6), Gox0646 (SEC ID N°:8), Gox1615 (SEC ID N°:10), Gox2107 (SEC ID N°:12) Y Gox2684 (SEC ID N°:14) y mutantes de las mismas como se ha definido anteriormente. α -cetocarboxilreductasas concretas preferidas son las que tienen la secuencia de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12 o 14.

En este contexto, cabe destacar que las búsquedas Blast en el NCBI en las bases de datos "Patented protein sequences" y "Non-redundant protein sequences" usando el algoritmo "blastp" y la matriz "BLOSUM62" se realizaron para las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16. No se encontraron proteínas homólogas (corte = identidad del 75%) para las SEC ID N°: 4, 6, 10, 12, 14 y 16 en dichas bases de datos. La SEC ID N°: 2 era un 100% idéntica a la secuencia 4 de la patente de EE.UU. 6.242.228, que describe la reducción de xilulosa en xilitol usando la proteína de la secuencia 4. Además, la SEC ID N° 2 reveló una identidad del 81% con una proteína de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 que no se ha caracterizado todavía y no tiene una actividad conocida.

La SEC ID N° 8 mostró una identidad del 99% con la proteína de adaptación de acetato AapL de *Acetobacter aceti*. Se encontró que AapL está implicada en la adaptación hacia concentraciones elevadas de acetato en el medio de crecimiento. No se describió una función fisiológica específica o una actividad enzimática (Steiner Y Bauer, Appl. Environ. Microbiol. 67:5474-81 (2001))

En Shinagawa y col., Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:260-4 (2008) se divulga una enzima que tiene los primeros 9 residuos de aminoácidos en el extremo N de Gox0502 (SEC ID N°: 4). No obstante, dicha enzima no se ha encontrado en las búsquedas Blast indicadas anteriormente.

Además se divulgan secuencias de ADN que codifican las α -cetocarboxilreductasas mencionadas anteriormente o mutantes de las mismas. Es particularmente preferido que dichas secuencias de ADN tienen la secuencia mostrada en las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 13. También se incluyen homólogos de dichas secuencias de ADN con una identidad superior al 80% en base a los nucleótidos.

También se divulgan vectores o vectores de expresión que comprenden al menos una de las secuencias de ADN mencionadas anteriormente. Los vectores de expresión dependen considerablemente del huésped de expresión e incluyen los de la serie pASK-IBA para la expresión en *E. coli* y los de la serie pGEX (Schleyer y col., 2008, Int. J.

Food Microbiol. en prensa) para la (sobre)expresión en especies de *Gluconobacter*.

También se divulgan células huésped que contienen al menos una de las secuencias de ADN mencionadas y/o los vectores de expresión mencionados en lo que antecede. Cualquier tipo de célula huésped procariota es aplicable de acuerdo con la presente invención, aunque se prefieren particularmente las especies de *Gluconobacter* y *E.coli*.

- 5 También se divulga un procedimiento para preparar una α -cetocarboxil reductasa derivada de *Gluconobacter oxydans* como utiliza el procedimiento de (1) anterior, que comprende cultivar una célula huésped mencionada anteriormente y aislar la α -cetocarboxil reductasa del caldo de cultivo o las células huésped. El procedimiento puede contener además etapas de purificación adecuadas.

La invención se describe con más detalle en el ejemplo siguiente.

10 Ejemplos

Materiales y procedimientos

- 15 Microorganismos y condiciones de cultivo: *G. oxydans* 621H (DSMZ 2343) se cultivó en un medio complejo que contiene 0,6 % (p/v) de extracto de levadura y 2% (p/v) de manitol a 30 °C. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en caldo Luria (LB) (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl por litro) a 37 °C. Para la sobreproducción enzimática, *E. coli* DH5 α se cultivó en medio de inducción máxima modificado (MI) (Mott, J.E. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:88-92 (1985)) que contiene 3,2% (p/v) de triptona, 2% (p/v) de extracto de levadura con adiciones de sales M9 (CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, FeNH₄ citrato 1 μ M). Se añadió ampicilina hasta una concentración final de 100 μ g/ml.

- 20 Preparación y manipulaciones de ácidos nucleicos: El plásmido usado para clonar y para la expresión de *gox0313*, *gox0502*, *gox0644*, *gox0646*, *gox1615*, *gox2107*, *gox2884* y *gox1122* en *E. coli* fue pASK-IBA5 (IBA GmbH, Goettingen, Alemania; SEC ID N^o: 33). El sitio de clonación múltiple dentro del vector contenía sitios de restricción para *Bsal*, que permitía la fusión precisa del gen estructural con una *Strep-tag*[®] II en N-terminal. El vector también codificó la resistencia a ampicilina y tenía un sistema de promotor / represor *tet A* controlable.

- 25 El vector de expresión pASK-IBA5 (SEC ID N^o 33) contiene un promotor Tet fuerte regulable, codones de iniciación y de terminación, un sitio de unión al ribosoma, la secuencia *Strep TagII*, secuencia de unión para escindir *Strep TagII* y los sitios de las endonucleasas de restricción dentro de la secuencia de clonación múltiple (SCM). Además, el vector se ha optimizado para la expresión de proteínas en cepas de *E. coli*, lo que genera grandes cantidades de la proteína recombinante homóloga.

- 30 Se preparó ADN plasmídico a partir de *E. coli* con los kit GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas GmbH). Un cultivo de *E. coli* (3 ml) se precultivó durante la noche en medio LB que contiene el correspondiente antibiótico a 37 °C se transfirió a tubos de Eppendorf estériles y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos (Biofuge 15, Heraeus GmbH, Osterode, Alemania). El sedimento celular se suspendió en 250 μ l de una solución de resuspensión (Fermentas GmbH), se añadieron 250 μ l de solución de lisis (Fermentas GmbH) y se agitó hasta obtener una solución transparente. La solución se neutralizó mediante la adición de 350 μ l de la solución de neutralización (Fermentas GmbH) y agitando. Después de centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a la mini-columna GeneJET, que se centrifugó después a 12.000 rpm durante 30 segundos. Se desechó el eluyente primario. Después, la columna se trató dos veces con 500 μ l de la solución de lavado (Fermentas GmbH), en la que la solución se aplicó a la columna y se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 segundos. De nuevo se descartó el eluyente. El ADN plasmídico se eluyó de la columna aplicando 50 μ l de tampón de elución (Fermentas) a pH 8,0. Después de incubar durante 2 minutos, la columna se centrifugó (12.000 rpm, 1 min) y el ADN eluido se almacenó a 4 °C.

- 45 Aislamiento de ADN: El ADN total de *G. oxydans* se aisló mediante el procedimiento CTAB (Ausubel, F.M. in Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman y Struhl (eds): Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, Vol 5: pág. 2-11 (2002)). *G. oxydans* se cultivó previamente en 50 ml de medio de levadura-manitol hasta la fase estacionaria. Las células se sedimentaron mediante centrifugación (8.000 rpm, 4 °C, 15 min en SS 34-Rotor en la centrífuga Sorvall RC-5B (Fa. Du Pont, Bad Homburg) y el sedimento se resuspendió en 0,95 ml de tampón TE (Tris / HCl 10 mM y EDTA 1mM, pH 8,0). Después de la adición de 50 μ l de 10 % (p/v) de SDS y 5 μ l de la solución de proteinasa K (20 mg/ml), la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora. Después se añadieron 0,18 ml de NaCl 5M y 0,15 ml de solución de CTAB/NaCl (NaCl 700 mM y CTAB 275 mM). se mezclaron y la suspensión se mantuvo en un baño de agua a 65 °C durante 2 horas. Para la extracción de las proteínas se añadieron 0,133 ml (1 vol) de fenol/CHCl₃ 24:1 (v/v) y se mezclaron cuidadosamente. Después de centrifugar, se extrajo la fase acuosa superior de 0,5 vol de CHCl₃/alcohol isoamílico a 1:1 (v/v). Para la precipitación del ADN se añadieron 0,6 vol de isopropanol a la fase acuosa resultante, seguida de centrifugación a 6.000 rpm, 4 °C durante 15 minutos. El sedimento se lavó con 0,1 ml de etanol acuoso al 70% (v/v) frío, se secó durante 10 minutos a 60 °C y después se suspendió en 0,2 ml de tampón TE con agitación en vórtex. Después, el ADN se incubó durante 10 minutos en un baño de agua a 70 °C, se centrifugó y se pipeteó para obtener una solución viscosa homogénea. El ADN se almacenó a 4 °C.

5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Construcción de los cebadores: El cebador para PCR se construyó usando el programa Primer D'Signer 1.1 (IBA GmbH, Goettingen, Alemania). Los genes de la oxidorreductasa se amplificaron mediante PCR con la introducción de los sitios de corte *Bsal*, *BbsI* o *BsmBI* para complementar el vector plasmídico digerido. (véase más adelante). Como alternativa, se pudo introducir *BsmBI* o *BbsI* en los extremos de los fragmentos de PCR cuando los genes contenían sitios *Bsal* internos. Por tanto, los cebadores para todos los genes de deshidrogenasa/oxidorreductasa solubles se construyeron con los sitios de corte para las endonucleasas de restricción *Bsal*, *BsmBI* o *BbsI* introducidos en ambos extremos del gen (véase la Tabla 1 más adelante).

10 Los cebadores con los sitios de restricción *Bsal* fueron: *gox0644*, *gox0502*, *gox2107* y *gox1122*. No obstante, en el caso en el que el gen contenía sitios de corte internos con *Bsal* se usaron las enzimas de restricción alternas *BsmBI* o *BbsI* para la construcción de cebadores. Las enzimas *BsmBI* y *BbsI* alternas también son idealmente adecuadas para el uso con el vector pASK-IBA5. Los cebadores *gox0313* contenían el sitio *BbsI*, mientras que *gox1615* contenía el sitio *BsmBI*.

Tabla 1: Cebadores usados para PCR

Cebador (SEC ID N°)	Secuencia del cebador	Sitio de restricción introducido
GOX0313_5f (17)	ATGGTAGAAGACAAGCGCCGCTGATACAATGCTCGCCGCC	BbsI
GOX0313_5r (18)	ATGGTAGAAGACAATATCAGGACCGGAAGTCGAGCACTGT	BbsI
GOX0502_5f (19)	ATGGTAGGTCTCAGCGCCCCAACCTGTTCGATCCCATTG	Bsal
GOX0502_5r (20)	ATGGTAGGTCTCATATCAGTTGGGGCCGAGGTGGCG	Bsal
GOX0644_5f (21)	ATGGTAGGTCTCAGCGCCTCGTCACAGTTCCATCCGCC	Bsal
GOX0644_5 (22)	ATGGTAGGTCTCATATCAGAATTCGCCGTATTCGGATCAG	Bsal
GOX0646_5f (23)	ATGGTAGGTCTCAAATGCTGAACCTCGATCTGAGCGGC	Bsal
GOX0646_5r (24)	ATGGTAGGTCTCAGCGCTGATGGTATCGACGGTGCCGCC	Bsal
GOX1615_5f (25)	ATGGTACGTCTCAGCGCCGCATCCGACACCATCCGCATC	BsmBI
GOX1615_5r (26)	ATGGTACGTCTCATATCAGTCCCGTGCCGGGGGCGC	BsmBI
GOX2107_5f (27)	ATGGTAGGTCTCAGCGCCACGAAAATTCTTCTCCTTAACGGC	Bsal
GOX2107_5r (28)	ATGGTAGGTCTCATATCAGGACGCCGTACCGATGACGTC	Bsal
GOX2684_5f (29)	ATGGTAGGTCTCAGCGCCACCAGCCTGTTTGAGCCGATTG	Bsal
GOX2684_5r (30)	ATGGTAGGTCTCATATCAGCGAGCAAGCGGATAATCCGTA	Bsal
GOX1122_5f (31)	ATGGTAGGTCTCAGCGCCGCTTACGCTACGATCAACCCTTA	Bsal
GOX1122_5r (32)	ATGGTAGGTCTCATATCAGAACGGCGCGTCGATATCAACA	Bsal

15 Condiciones de PCR: Las mezclas de la reacción de amplificación contenían 10 ng de ADN total de *G. oxydans*, 0,5 pmol de cada cebador oligonucleotídico, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 5 µl de 10x de tampón de la *Pfu* polimerasa clonada y 2,5 U de *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) en un volumen total de 50 µl. La mezcla se sometió a amplificación por PCR en un ciclador térmico de ADN (Bio-Rad MyCycler) durante 30 ciclos. Cada ciclo se definió por una etapa de desnaturalización de 45 segundos a 95°C, una etapa de hibridación de 1 minuto a 55 °C y una etapa de polimerización de 2 minutos 30 segundos a 72 °C. Los productos de la PCR se analizaron mediante separación electroforética en un gel de agarosa al 0,8%. Los fragmentos de la PCR se microdializaron con filtros de membrana de 0,025 µm durante 1 hora. El tamaño de los fragmentos de la PCR se

20

analizó mediante separación electroforética en un gel de agarosa al 0,8% y un sistema de tampón Tris-acetato. Desarrollo del clon: Después de generar productos de PCR, los fragmentos de ADN se clonaron en el vector pASK. *Bsal*, *BsmBI* y *BbsI* pertenecen a las enzimas de restricción de tipo IIS, que escinden el ADN fuera de sus sitios de reconocimiento. De este modo, la digestión con una sola enzima puede generar dos extremos pegajosos independientes diferentes con salientes que permiten la clonación unidireccional. Cada una de estas tres endonucleasas de restricción reconocen una secuencia de corte diferente, pero todas producen el mismo saliente 5' - 3' que consiste en GCGC que complementa de un modo preciso el saliente de CGCG en 3'-5' de pASK-IBA5. En el extremo 3' del gen, las enzimas de restricción producen la secuencia TATC, que es complementaria a la secuencia de 3' a 5' ATAG en el plásmido.

El vector pASK-IBA5 se digirió con *Bsal* para clonar los productos de PCR tratados con endonucleasa de restricción que representan los genes *gox0313*, *gox0502*, *gox0644*, *gox0646*, *gox1615*, *gox2107*, *gox2684* y *gox1122*. La estrategia de clonación se muestra en la Fig. 1. La Fig. 1A describe la complementación de secuencia de *gox0644* después de la digestión de restricción con *Bsal*. *gox0644* representa todos los genes usando los sitios de corte de *Bsal* que producen la secuencia 5' CGCG 3' y la secuencia 5' TATCA 3' en la hebra inversa, lo que permite una unión precisa en el vector pASK vector. La . 1B describe la complementación de secuencia de *gox0313* tras la digestión de restricción con *BbsI*. *gox0313* representa todos los genes usando los sitios de corte de *BbsI* que producen la secuencia 5' CGCG 3' y la secuencia 5' TATCA 3' en la hebra inversa, lo que permite la unión precisa en el vector pASK.

La incorporación satisfactoria de la construcción del gen de la oxidorreductasa de PCR en el vector pASK IBA se consiguió de acuerdo con el protocolo de unión usando la T4 ligasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). Para este procedimiento se mezclaron 2 µl de tampón de la T4 ligasa con 2 µl de pASK5 digerido con *Bsal*, 15 µl de producto de PCR digerido con *Bsal* (o *BbsI* o *BsmBI* como se indica en la Tabla 1) y 1 µl de T4 ligasa. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Este procedimiento incorpora el gen digerido con enzimas de restricción de interés con una secuencia saliente en 5' GCGC en el vector pASK-IBA5 con el saliente de la secuencia complementaria. El saliente en 3' del gen que contiene la secuencia GATA se condensó con la secuencia saliente complementaria (Esquemas de la Fig.1A-B de las estrategias de clonación). Este protocolo alcanzó una elevada tasa de éxito de unión en base a la elevada proporción del producto de PCR purificado cortado con endonucleasas de restricción (*Bsal*, *BbsI*, *BsmBI*) en el plásmido cortado con *Bsal*.

Una vez ligados los plásmidos que contienen los insertos se transformaron en células DH5 α de *E. coli* competentes (Inoue H. y col., Gene 96: 23-28 (1990)). Se dejó que las células de *E. coli* competentes que contienen el plásmido con los genes de la oxidorreductasa recombinante crecieran en 500 µl de medio LB durante una hora a 37°C. Alícuotas crecientes de 20 µl, 50 µl y 150 µl de células DH5α de *E. coli* se sembraron en placas LB que contenían 1 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C para asegurar el crecimiento con separación adecuada entre colonias para facilitar la selección de colonias.

Las colonias se eligieron de forma aleatoria y se cultivaron durante la noche a 37 °C en caldo LB que contiene 1ug/ml de ampicilina con el fin de validar la incorporación correcta del gen de interés en el plásmido pASK. Los plásmidos se purificaron como se ha descrito anteriormente. Con el fin de comprobar todos los aspectos asociados con la construcción del plásmido los siguientes componentes del plásmido: Strep TagII, sitio de unión al ribosoma, secuencia de unión, codón de iniciación, codón de terminación y un inserto génico unido en el marco de lectura adecuado con el codón de iniciación, se analizaron secuenciando la correspondiente región del plásmido en el centro Madison Biotechnology Sequencing.

Sobreexpresión: Los cultivos iniciadores durante la noche de la reserva validada de pASK-IBA5 oxidorreductasas en DH5α de *E. coli* se cultivaron a 37°C en 20 ml de medio LB que contiene 20 ug de ampicilina. Los matraces de cultivo con espacio superior del 80% proporcionaron una aireación óptima a velocidades del agitador de 200 rpm o mayores para la sobreexpresión de proteínas heterólogas. Estos cultivos iniciadores de células en replicación actualmente se usaron para generar un rápido crecimiento celular a 37 °C cuando se añaden al medio de inducción máxima que contiene extracto de levadura y triptona (medio MI en los procedimientos). De nuevo se añadió ampicilina (1 µg/µl) para inhibir organismos sensibles a ampicilina. El crecimiento de *E. coli* y la expresión de proteínas se optimizaron en medio MI a través de un sistema de producción bifásico. La primera fase de crecimiento soportó replicación celular, en la que la proteína represora de tetraciclina inhibió la producción de proteínas heterólogas en el promotor de tetraciclina (promotor de ensayo). La segunda fase se centró en la expresión optimizada de proteínas heterólogas en las que los recursos disponibles estaban dirigidos predominantemente hacia la síntesis de proteínas. La síntesis de proteína se inició mediante la adición de 100 µl de la solución madre de anhidrotetraciclina de 2 mg/ml para 1 litro de cultivo celular cuando la densidad del cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4-0,6. Se dejó que las células crecieran durante cuatro horas adicionales para completar la producción de proteínas.

Las células se recogieron mediante centrifugación a 4.500 g a 4 °C. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 15 ml de tampón W (Tris/HCl 100 mM Tris/HCl a pH 8,0, NaCl 150 mM) a 4 °C. A los sedimentos celulares resuspendidos se añadió el conjunto cóctel de proteasas III (10 µl/l de células) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y ADNasa I (20 U/l de células) (Abgene, Epsom, Reino Unido) y se dejaron incubar en hielo durante diez minutos. Las células resuspendidas se lisaron mediante ultrasonidos a 4 °C (30-35W durante intervalos de 10 s en 10 minutos). Los lisados se centrifugaron a 24.000 g a 4 °C y se recogió el lisado aclarado.

En este punto se resuspendió la oxidorreductasa soluble sobreexpresada en el tampón junto con otras proteínas celulares solubles que requieren purificación adicional mediante el sistema de purificación Strep Tag II. Las cromatografías en columna se llevaron a cabo a 4 °C con una columna de afinidad Strep-Tactin Superflow® (IBA GmbH, Goettingen, Alemania) conectada con un sistema ÄXTA-FPLC (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU.). Un volumen del lecho de 10 ml se equilibró con dos volúmenes de columna del tampón W. Después, se aplicó el lisado celular claro que contiene las oxidorreductasas solubles condensadas Strep Tag II y la columna se lavó con cinco volúmenes de columna de tampón W. Para eluir la proteína unida se aplicó en la columna tampón E (tampón W que contiene destiobiotina 2,5 mM). Después de recoger los biocatalizadores puros, la columna de afinidad se regeneró con tampón R (tampón W que contiene HABA 1 mM).

10 **Caracterización de las enzimas aisladas:**

Electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE): El SDS-PAGE se realizó en un gel plano al 14% (p/v) como ha descrito Laemmli [Laemmli, 1970] con 4% (p/v) de gel de apilamiento de poli(acrilamida). Antes de la aplicación, las muestras se diluyeron a 1:1 (v/v= en tampón de carga de muestras (2% [p/v] de SDS, 5% [v/v] de β-mercaptoetanol, 50% [v/v] de glicerina, 20% [v/v] de tampón de recolección a pH 6,8, 0,001% [p/v] de azul bromofenol) y se llevó a ebullición durante 10 min. Las siguientes proteínas de referencia (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU.) con las masas moleculares indicadas se usaron para la medición de la masa molecular de las oxidorreductasas citosólicas. miosina (205 kDa), β-galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), transferrina (80 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), glutamato deshidrogenasa (55 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa) y lisozima (14 kDa).

Cromatografía de tamiz molecular: Para determinar el peso nativo de las aldehído deshidrogenasas se usó una cromatografía Sephacryl 300HR 16/60 (Amersham) con las proteínas de referencia dextrano azul (2 MDa), tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), aldolasa (140 kDa) y ovoalbúmina (43 kDa). La masa molecular nativa para cada proteína se determinó por comparación con la curva estándar generada por los patrones del peso molecular que se aplicaron a una columna de filtración en gel. Las distancias que viajaron cada patrón de peso molecular (Rf) se representaron contra el logaritmo de la masa molecular de los patrones.

Determinación del pH y la temperatura óptimas y la cinética de la enzima: El pH óptimo para las actividades enzimáticas se determinó mediante un procedimiento modificado de Salusjärvi, T. y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 65:306-314 (2004) usando el siguiente sistema tampón (concentración final 50 mM cada uno): Acetato sódico pH 4,5-6,5, fosfato potásico a pH 6,5-8,0, Tris-HCl pH 8,0 - 10. La temperatura óptima para los biocatalizadores se determinó en condiciones de reacción estándar a temperaturas que varían de 20 a 80 °C. La constante de Michaelis (Km) para las proteínas se determinó a partir de la enzima purificada mediante gráficos de Lineweaver-Burk. Los ensayos se realizaron a un pH óptimo para cada enzima y a 30 °C usando el sustrato superior y un sustrato dirigido. La Km para cada sustrato se calculó usando concentraciones de 0,0025 a 10 mM, y la Km de NAD(P)H y de NAD(P) se calculó usando concentraciones de 0,01 a 0,5 mM.

Medición de la actividad enzimática: Las alfa-cetocarboxil reductasas dependientes de NADPH se analizaron mediante un procedimiento de rutina usado para enzimas unidas a NAD(P) registrando la velocidad de disminución del NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) con sustratos a 30°C. La mezcla de reacción (1 ml) para la reducción de los sustratos de alfa-cetocarboxilo contenía sustrato 10 mM, tampón fosfato potásico 40 mM a pH 7,0, NAD(P)H 0,025 mM y la enzima. Las reacciones se indujeron mediante la adición de enzima o sustrato. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol del nucleótido piridina por minuto a 30°C.

Regeneración del cofactor: Un requisito previo para la producción de compuestos α-hidroxi carbonilo es la regeneración de las coenzimas caras y la estabilidad de los catalizadores proteicos. Acoplando dos reacciones enzimáticas dependientes de coenzima, el NADPH se puede regenerar de un modo continuo. Por tanto, en lugar de cantidades estequiométricas solo se requieren cantidades catalíticas de la coenzima. Para este fin, los inventores usaron una reacción enzimática combinada entre las oxidorreductasas dependientes de NADPH que forman compuestos α-hidroxi carbonilo y la aldehído deshidrogenasa GOX1122 (véase Schweiger, P. y col., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13:147-155 (2007)) que produce el cofactor reducido en el curso de la oxidación del acetaldehído. La aldehído deshidrogenasa tiene tasas de recambio muy altas y valores de Km bajos para acetaldehído y NADP y se pudieron producir en cantidades altas (Schweiger, P. y col., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13:147-155 (2007)). La biotransformación se realizó en un procedimiento discontinuo (volumen total 2,5 ml de tampón fosfato potásico 40 mM a un pH de 7). Se añadieron 30 μg de Gox1122 purificada y oxidorreductasas dependientes de NADPH y NADPH 50 μM. La concentración del sustrato al principio era de 20 mM para 2,3-pentanodiona y acetaldehído 20 mM. Los sustratos frescos se añadieron cada 60 minutos (20 mM cada uno).

RMN: Se extrajeron 2,5 ml de bioconversión con dos veces el volumen de d-cloroformo. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se registraron en un espectrómetro DPX 300 (300 MHz) en referencia al patrón interno de CDCl₃. Las muestras químicas analizadas con el software Bruker NMR Suite 2.5 construyeron estructuras del producto final.

Ejemplo 1: Aislamiento y preparación de los biocatalizadores

El aislamiento y la producción de los biocatalizadores Gox0313, Gox0502, Gox0644, Gox0646 Gox1615, Gox2107 y Gox2684, que son capaces de reducir de forma selectiva los compuestos α -cetocarboxilo en compuestos α -hidroxycarboxilo se describe con detalle a continuación. El aislamiento de Gox1122 para la regeneración del cofactor se divulga en Schweiger, P. y col., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13:147-155 (2007).

5 1.1. Amplificación por PCR de los genes *gox0313*, *gox0502*, *gox0644*, *gox0646*, *gox1615* *gox2107* y *gox2684*:

Se construyeron oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción extendidos en 5' *Bsa*I, *Bbs*I o *Bsm*B I que corresponden a *gox0313*, *gox0502*, *gox0644*, *gox0646*, *gox1615* *gox2107* y *gox2684* de *G. oxydans* usando los cebadores de la Tabla 1. Las mezclas de la reacción de amplificación contenían 100 ng de ADN total de *G. oxydans*, 0,5 pmol de cada cebador oligonucleotídico, 200 μ M de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 5 μ l de 10x de tampón de la *Pfu* polimerasa clonada y 2,5 U de *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) en un volumen total de 50 μ l. La mezcla se sometió a amplificación por PCR en un ciclador térmico de ADN (Bio-Rad MyCycler) durante 30 ciclos. Cada ciclo se definió por una etapa de desnaturalización de 45 segundos a 95°C, una etapa de hibridación de 1 minuto a 58 °C y una etapa de polimerización de 2 minutos 30 segundos a 72 °C. Los productos de la PCR se analizaron mediante separación electroforética en un gel de agarosa al 0,8%. Los fragmentos de la PCR se microdializaron con filtros de membrana de 0,025 μ m durante 1 hora.

1.2. Clonación de genes:

El vector pASK5-IBA5 contiene un cola Strep-tag II de ocho aminoácidos en el extremo N que se condensa de un modo preciso con el gen estructural. Los productos de la PCR y el plásmido pASK-IBA5 se sometieron a *Bsa*I o a otra digestión de restricción adecuada (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La unión del vector digerido y el fragmento de PCR se realizó con T4 ligasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.), se transformó en células DH5 α de *E. coli* y se sembraron en placas de selección con LB_{amp}. Los plásmidos que mostraban patrones de digestión adecuados se secuenciaron para confirmar la correcta inserción génica de *gox0313*, *gox0502*, *gox0644*, *gox0646*, *gox1615*, *gox2107* y *gox2684* respectivamente.

1.3. Sobreexpresión y purificación de oxidorreductasas

Los cultivos de siembras enteras de células BL21 de *E. coli*, células DH5 α de *E. coli* que contienen las construcciones plasmídicas de interés se usaron para inocular medio MI 1L. Los cultivos se cultivaron a 37 °C y se indujeron mediante la adición de 200 ng/ml de anhidrotetraciclina a una DO₆₀₀ = 0,4 y se dejó cultivar durante cuatro horas adicionales. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4.500 g a 4 °C. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 15 ml de tampón W (Tris/HCl 100 mM Tris/HCl a pH 8,0, NaCl 150 mM) a 4 °C. A los sedimentos celulares resuspendidos se añadió el conjunto cóctel de proteasas III (10 μ l/l de células) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y ADNasa I (20 U/l de células) (Abgene, Epsom, Reino Unido) y se dejaron incubar en hielo durante diez minutos. Las células resuspendidas se lisaron mediante ultrasonidos a 4 °C. Los lisados se centrifugaron a 24.000 g a 4 °C y se recogió el lisado aclarado. Las cromatografías en columna se llevaron a cabo a 4 °C con una columna de afinidad Strep-Tactin Superflow[®] (IBA GmbH, Goettingen, Alemania). Un volumen de lecho de 10 ml se equilibró con dos volúmenes de columna del tampón W. Los lisados aclarados se centrifugaron a 12.000 g a 4 °C durante 10 minutos antes de la aplicación a la columna. La columna se lavó con cinco volúmenes de columna del tampón W después de que el extracto celular entrara en la columna. Para eluir la proteína unida se aplicó a la columna tampón E (tampón W que contenía destiobiotina 2,5 mM). La elución de las enzimas se produjo entre con una aplicación de 20-30 ml de tampón E.

Las alfa-cetocarboxil reductasas dependientes de NADPH se analizaron mediante un procedimiento de rutina usado para enzimas unidas a NAD(P) registrando la velocidad de disminución del NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) con sustratos a 30°C. La mezcla de reacción (1 ml) para la reducción de los sustratos de alfa-cetocarboxilo contenía sustrato 10 mM, tampón fosfato potásico 40 mM a pH 7,0, NADPH 0,025 mM y la enzima. Las reacciones se indujeron mediante la adición de enzima o sustrato. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol del nucleótido piridina por minuto a 30°C.

Las enzimas nativas Gox0644 y Gox1615 mostraron bandas únicas cuando se aplicaron a una electroforesis PAGE nativa. Los picos correspondían a 66,1 kDa para Gox0644 y 74,5 kDa para Gox1615 (Fig. 2A). Estos datos sugieren que tanto Gox0644 como Gox1615 de *G. oxydans* 621H eran activas como homodímeros. Por el contrario, la Gox0313 nativa reveló una masa molecular de 181,6 kDa, lo que indica que las proteínas existen como homopentámero.

Gox2107 y Gox0502 mostraron pesos moleculares nativos aparentes de 65,2 kDa y 78,2 kDa, respectivamente, en el análisis PAGE nativo (Fig. 2B). Estos datos sugieren que Gox2107 es activa como homotrímero, mientras que Gox0502 es activa como homodímero, que indica que ambas proteínas se pliegan correctamente y están en su estado nativo.

Las enzimas nativas Gox2684 y Gox0646 mostraron bandas únicas cuando se aplicaron a una electroforesis PAGE nativa. Los picos correspondían a 78,4 kDa para Gox2684 y 110 kDa para Gox0646 (Figura 3c). Estos datos sugieren que Gox2684 y Gox0646 de *G. oxydans* 621H son activas como homodímeros y tetrameros, respectivamente, porque las masas de las subunidades únicas son 27,7 kDa (Gox0646) y 39,4 kDa (Gox2684).

5 Las proteínas también se analizaron mediante SDS-PAGE con el fin de verificar las masas moleculares previstas de las subunidades únicas mediante comparación con marcadores de peso molecular. Los resultados se muestran en la Fig. 4 (, calle 1, marcadores de peso molecular de 14 kDa, 21 kDa, 30 kDa, 45 kDa, 55 kDa, 66 kDa, 80 kDa, 97 kDa, 116 kDa y 205 kDa). Gox 1122 (calle 2) = 50,5 kDa, Gox 2107 (calle 3) = 21,9 kDa, Gox0502 (calle 4) = 39,2 kDa, Gox1615 (calle 5) = 37,2 kDa, Gox0313 (calle 6) = 36,5 kDa, Gox0644 (calle 7) = 31,7 kDa, Gox0646 (calle 8) = 27,7 kDa, y Gox2684 (calle 8) = 39,4 kDa. Estos resultados se compararon después con los tamaños previstos derivados de la secuencia de aminoácidos conocida.

Tabla 2: Pesos moleculares finales y composición de la subunidad

Proteína	Masa de la subunidad	Masa nativa determinada ¹	Composición de la subunidad
Gox0313	36,5	181,6	Pentámero
Gox0502	39,2	78,2	Dímero
Gox0644	31,7	66,1	Dímero
Gox0646	27,7	110	Tetrámero
Gox1615	37,2	74,5	Dímero
Gox2107	21,9	65,2	Trímero
Gox2684	39,4	78,4	Dímero
Gox1122	50,5	50,2	Monómero
1) Composición de la subunidad final de cada proteína en su estado nativo.			

10 Los resultados de SDS-PAGE verificaron la pureza de la muestra de proteínas mediante la visualización de una única banda pura en el gel. Los biocatalizadores estaban todos alineados correctamente con los marcadores de peso molecular previsto (Tabla 2).

Ejemplo 2: Caracterización de los biocatalizadores

15 Para cada enzima (Gox0313, Gox0502, Gox0644, Gox0646, Gox1615, Gox2107 y Gox2684 respectivamente), las preparaciones enzimáticas frescas se usaron para validar el espectro del sustrato y la actividad cinética. Cada proteína exhibía actividad con α -cetoaldehídos y/o α -dicetonas (Tabla 3), una clase especial de compuestos orgánicos capaces de la formación quiral mediante reducción regioselectiva y estereoespecífica. Las oxidoreductasas dependientes de NAD(P= purificadas se analizaron a 30 °C mediante un procedimiento de rutina usando para enzimas unidas a NAD(P) registrando la velocidad de disminución de NAD(P)H a 340 nm ($\epsilon = 6,22$ mM/ μ mol·cm) con sustratos capaces de las reacciones de reducción. La mezcla de reacción estándar (1 ml) para las reacciones de reducción de sustratos contenían sustrato 10 mM, tampón fosfato cálcico 40 mM (tampón fosfato K) A pH 7,0, NAD/(P)H 0,05 Mm) y la enzima, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones se indujeron mediante la adición de enzima o sustrato. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol del nucleótido piridina por minuto a 30°C. La medición del contenido proteico se realizó mediante el procedimiento de Bradford in Anal. Biochem. 72:248-254 (1976).

Tabla 3: Resumen de las actividades enzimáticas con α -dicetonas, α -cetoaldehídos y/o α -cetoésteres

Sustrato Gox	0313*	0502*	0644*	0646*	1615*	2107*	2684*
α -dicetonas							
2,3-pentanodiona	35,9		89,3	8,0	6,2		0,6
2,3-hexanodiona	19,6		50,1	8,0	6,5		2,3

(continuación)

Sustrato Gox	0313*	0502*	0644*	0646*	1615*	2107*	2684*
3,4-hexanodiona	19,5	2,0	7,3	2,0	2,0		0,6
1-fenil-1,2-propanodiona	0,2	2,0	75,4	6,0	5,4		
α -cetoaldehídos							
Fenilglioxal	0,5	15,7	66,0		19,1	35,2	2,1
Metilglioxal	10,6		3,4	0,2	19,3		1,4
α -cetoéster							
Piruvato de etilo	0,2		92,8		1,2		
*Actividad en U/mg = U/mg de proteína = $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$							

2.1. Actividad enzimática de Gox0644:

5 Gox0644 usó NADPH en las reacciones de reducción de α -dicetonas, α -cetoaldehídos y/o α -cetoésteres. Las α -dicetonas, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona y 1-fenil-2,3-propanodiona mostraron con la actividad más elevada (Tabla 4). Los α -cetoaldehídos fenilglioxal y metilglioxal y el cetoéster piruvato de etilo también mostraron una actividad alta. Sustratos concretos no reducidos por Gox0644 fueron acetoína, ácido 2-oxobutírico, acetilacetona, acetona y aldehídos simples. Los resultados muestran que la reducción de Gox0644
10 carbonilo no puede alcanzar actividad con β dicetonas y β cetoácidos procedentes de la degradación de los ácidos grasos o con 2-cetoácidos asociados con el catabolismo de aminoácidos. Además, los resultados con reducción u oxidación de acetoína no mostraron actividad. Este resultado muestra que la reacción de las α -dicetonas reducía de forma selectiva únicamente un grupo carbonilo y era irreversible.

Tabla 4: Actividad enzimática de Gox0644

Sustratos	Actividad específica (U/mg)*	Cofactor
Glioxal	1,1	NADPH
Ácido cetogulónico	2,3	NADPH
Glioxalato	1,2	NADPH
Metilglioxal	3,4	NADPH
2,3-butanodiona	60,0	NADPH
2,3-pentanodiona	89,3	NADPH
2,3-hexanodiona	50,1	NADPH
Fenilglioxal	66,0	NADPH
3,4-hexanodiona	7,3	NADPH
Piruvato de etilo	92,8	NADPH

(continuación)

Sustratos	Actividad específica (U/mg)*	Cofactor
1-fenil-1,2-propanodiona	75,4	NADPH
Isatina	16,1	NADPH
Bencilo	14,0	NADPH
Piruvato	1,63	NADPH
*U/mg = $\mu\text{mol/mg min}$		

2.2. Actividad enzimática de Gox1615:

5 Gox1615 reveló actividad con una amplia variedad de sustratos químicos. Como se puede ver en la Tabla 5, Gox1615 usó específicamente NADPH y demostró la actividad más alta con los cetoaldehídos fenilglioxal y metilglioxal, pero también usó dicetonas y aldehídos.

Tabla 5: Actividad enzimática del biocatalizador Gox1615

Sustratos	Actividad específica (U/mg)*	Cofactor
2-oxobutirato	6,5	NADPH
Glioxal	5	NADPH
Metilglioxal	19,3	NADPH
Fenilglioxal	19,1	NADPH
3,4-hexanodiona	2	NADPH
2,3-pentanediona	6,2	NADPH
Piruvato de etilo	1,2	NADPH
Piruvato de isoamilo	4,7	NADPH
2,3-hexanodiona	6,5	NADPH
1-fenil-1,2-propanodiona	5,4	NADPH
2,3-butanodiona	6	NADPH
3-penten-2-ona	0,5	NADPH
3-buten-2-ona	0,7	NADPH
Isatina	2,4	NADPH
Propionaldehído	8,4	NADPH

(continuación)

Sustratos	Actividad específica (U/mg)*	Cofactor
Butiraldehído	14	NADPH
Valeraldehído	15,1	NADPH
Hexanal	10,3	NADPH
Heptanal	15,5	NADPH
Octanal	5,3	NADPH
Nonal	9,3	NADPH
Decanal	10,5	NADPH
Undecilaldehído	7,5	NADPH
Dodecanal	15,6	NADPH
Benzaldehído	12,2	NADPH
Glutaraldehído	13,5	NADPH
Glicolaldehído	4,1	NADPH
DL-gliceraldehído	19	NADPH
Isovaleraldehído	12	NADPH
p-toluilaldehído	2,3	NADPH
m-toluilaldehído	1,5	NADPH
o-toluilaldehído	0,8	NADPH
Fenilacetaldehído	6,5	NADPH
2-metilvaleraldehído	13,4	NADPH
5-metil-3-hexen-2-ona	0,3	NADPH
*U/mg = $\mu\text{mol/mg min}$		

2.3. Actividad enzimática de Gox0313:

- 5 Gox0313 usó una amplia variedad de sustratos químicos en reacciones de reducción y de oxidación con el cofactor NADH/NAD⁺ (Tabla 6). Además, la enzima también usa NADPH como reductor, aunque con velocidades de reacción más lentas. Gox0313 redujo muchos aldehídos, α dicetonas y α -ctoaldehídos. Gox0313 también oxidó un número de alcoholes primarios y dioles, incluyendo etanol y 1,-propanodiol, así como azúcares como glucosa y manosa.

Tabla 6: Actividad enzimática del biocatalizador Gox0313

Reducción del sustrato	Actividad específica (U/mg)*	Cofactor
2,3-butanodiona	28,5	NADH
2,3-pentanodiona	35,9	NADH
2,3-hexanodiona	19,6	NADH
3,4-hexanodiona	19,5	NADH
Metilglioxal	10,6	NADH
Fenilglioxal	0,5	NADH
1-fenil-1,2-propanodiona	0,2	NADH
Piruvato de etilo	0,1	NADH
Piruvato de isoamilo	0,1	NADH
Bencilo	0,1	NADH
Acetoína	10,5	NADH
3-penten-2-ona	1,5	NADH
3-buten-2-ona	1,9	NADH
Propionaldehído	15,0	NADH
Glucosa	4,7	NADH
Manosa	9,7	NADH
Acetaldehídos	61,0	NADH
Butiraldehído	8,5	NADH
Valeraldehído	8,9	NADH
Hexanal	6,0	NADH
Heptanal	8,6	NADH
Octanal	1,5	NADH
Nonal	4,4	NADH
Decanal	18,8	NADH
Undecilaldehído	8,5	NADH
Dodecanal	2,4	NADH

(continuación)

Reducción del sustrato	Actividad específica (U/mg)*	Cofactor
Cinamaldehído	7,0	NADH
Hidrocinamaldehído	32,1	NADH
p-toluoilaldehído	3,3	NADH
DL-gliceraldehído	1,2	NADH
Benzaldehído	9,4	NADH
Glicolaldehído	37,5	NADH
*U/mg = $\mu\text{mol/mg min}$		

2. 4 Actividad enzimática de Gox0502 y Gox2107:

La actividad enzimática de Gox0502 y Gox2107 se resumen en la Tabla 7.

5

Tabla 7: Actividad enzimática del biocatalizador Gox0502 y Gox2107

	Gox0502 (Cofactor NADPH)/ Actividad específica (U/mg)*	Gox2107 (Cofactor NADPH)/ Actividad específica (U/mg)*
1,4-naftoquinona	16,6	217,5
p-benzoquinona	10	180,5
2-metil-1,4-naftoquinona	10	124,1
DDQ	< 0,1	26,5
2-hidroxi-1,4-naftoquinona	0,75	16,04
3-buten-2-ona	21	120
Fenilgloxal	15,7	35,2
2-ciclohexen-1-ona	9,8	3,3
(+)-Carvona	8,0	< 0,1
1-penten-3-ona	6,1	14,0
3-penten-2-ona	3,6	1,9
1-fenil-1,2-propanodiona	2,0	< 0,1
3,4-hexanodiona	2,0	< 0,1
Metilgloxal	1,5	< 0,1

(continuación)

	Gox0502 (Cofactor NADPH)/ Actividad específica (U/mg)*	Gox2107 (Cofactor NADPH)/ Actividad específica (U/mg)*
2,3-hexanodiona	1,0	< 0,1
2,3-butanodiona	0,5	< 0,1
*U/mg = $\mu\text{mol/mg min}$		

Los ensayos enzimáticos indican que ambas enzimas son capaces de reducir las vinilcetonas, quinonas y α -cetoaldehídos en presencia de dinucleótidos de nicotinamida-adenina. El espectro del sustrato de las proteínas se examinó para un análisis profundo de las actividades enzimáticas. Gox2107 mostró especificidad de sustrato por los α -cetoaldehídos (fenilglioxal), las vinilcetonas de cadena corta y las quinonas insustituídas con una preferencia por NADPH (tabla 7), que muestra una disminución de 7,5 veces la actividad con NADH (datos no mostrados). En general, la velocidad de la reacción disminuyó a medida que aumentaba el número de carbonos precedentes al grupo vinil-ceto reactivo. Para las quinonas, la velocidad de reacción generalmente disminuía a medida que aumentaba el número de carbonos sustituidos en el anillo. De acuerdo con esto, Gox2107 redujo de forma óptima la 3-buten-2-ona, la vinilcetona más corta posible y la 1,4-naftoquinona con actividades de 119 $\mu\text{mol/mg min}$ y 217,4 $\mu\text{mol/mg min}$, respectivamente (tabla 7). También se obtuvieron actividades altas con fenilglioxal (un α -cetoaldehído). Gox0502 y Gox2684 exhibieron una especificidad de sustrato similar a Gox2107, aunque Gox0502 y Gox2684 mostraban una estricta preferencia por NADPH (tabla 7). Los sustratos preferidos fueron 3-buten-2-ona, fenilglioxal y 1,4-naftoquinona. Las enzimas Gox0502 y Gox2684 también pudieron reducir las α -dicetonas de un modo selectivo. La producción de butan-2-ona a partir de 3-buten-2-ona se confirmó mediante RMN para ambas proteínas, lo que confirma la reducción de las vinilcetonas en cetonas alifáticas.

2.5 Actividad enzimática de GOX2684:

La actividad enzimática de GOX2684 se resume en la Tabla 7 y es esencialmente la misma que la de Gox0502.

20

Tabla 8: Actividad enzimática de GOX2684

Sustratos	Actividades específicas (U/mg)*	Cofactor
Metilglioxal	1,4	NADPH
Fenilglioxal	2,1	NADPH
2,3-butanodiona	0,5	NADPH
2,3-pentanodiona	0,6	NADPH
2,3-hexanodiona	2,3	NADPH
3,4-hexanodiona	0,6	NADPH
3-penten-2-ona	1,9	NADPH
1,4-naftaloquinona	3,4	NADPH
2-hidroxi-1,4-naftoquinona	0,7	NADPH
2-metil-1,4-naftoquinona	6,8	NADPH
Hidrocinaldehído	1,9	NADPH

(continuación)

Sustratos	Actividades específicas (U/mg)*	Cofactor
Cinamaldehído	0,4	NADPH
3-buten-2-ona	8,8	NADPH

2.6 Actividad enzimática de GOX0646:

La actividad enzimática de GOX0646 se resume en la Tabla 9.

5

Tabla 9: Actividad enzimática de GOX0646

Sustratos	Actividades específicas (U/mg)*	Cofactor
L2,3-hexanodiona	8,0	NADPH
2,3-pentanodiona	8,0	NADPH
2,3-butanodiona	0,8	NADPH
3,4-hexanodiona	2,0	NADPH
1-fenil-1,2-propanodiona	6,0	NADPH
Isatina	0,1	NADPH
Metilglioxal	0,2	NADPH
1,4-naftaloquinona	0,2	NADPH
p-benzoquinona	0,3	NADPH

2.7 Regioselectividad de GOX0644 y GOX1615:

La Tabla 10 muestra el producto de la reducción regioselectiva de Gox0644 y Gox1615 determinado mediante análisis RMN. Ambas redujeron específicamente el grupo 2-cetona de la dicetona para formar el producto 2-hidroxi-3-cetona. Gox0644 también mostró la capacidad para reducir de forma selectiva el grupo 2-cetona de fenilglioxal y conserve el grupo aldehído en la formación de 2-hidroxi-2-fenilacetaldehído.

10

Tabla 10: Sumario de la regioselectividad

Enzima	Sustrato	Producto
Gox0644	2,3-pentanodiona	2-hidroxi-3-pentan-3-ona
Gox0644	2,3-hexanodiona	2-hidroxi-3-hexan-3-ona
Gox1615	Fenilglioxal	2-hidroxi-2-fenilacetaldehído
Gox1615	2,3-pentanodiona	2-hidroxi-pentan-3-ona

2.8 Parámetros cinéticos de las cetocarboxil reductasas

Las constantes de Michaelis se determinaron a partir de enzima purificada mediante gráficos de Lineweaver-Burk. Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para los sustratos se calcularon usando concentraciones de 0,025 a 10 mM. El valor óptimo de pH y las temperaturas para las actividades enzimáticas también se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Resumen de los parámetros cinéticos

Proteína	Sustrato	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	K_m (mM)	Temp, ($^{\circ}\text{C}$)	pH
Gox0313	2,3-pentanodiona	97,0	31	30	7,0
Gox0502	3-buten-2-ona	21,0	0,1	30	7,0
Gox0644	2,3-pentanodiona	79,0	5,6	37	6,8
	Fenilglioxal	93,0	4,7	37	6,8
Gox0646	2,3-pentanodiona	10,0	9,3	32	7,0
Gox1615	2,3-hexanodiona	6,0	3,2	30	6,5
	Metilglioxal	22,0	3,8	30	6,5
Gox2107	3-buten-2-ona	119	3,8	35	6,0
Gox2684	3-buten-2-ona	11,3	0,3	30	7,0
Gox1122	Acetaldehído	196	0,2	70	8,0

5

Ejemplo 3: Descripción de los sistemas de regeneración del cofactor

3.1. Aislamiento:

El genoma de *Gluconobacter oxydans* 621H contiene un gen (*gox1122*) que codifica una supuesta aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD(P) citosólica (aislamiento y caracterización (véase Schweigert, P. y col., J. Mol. Microbiol. & Biotech. 203:1-9 (2007)). El gen se expresó en *Escherichia coli* y la enzima recombinante se purificó y se caracterizó. La proteína Gox1122 nativa exhibió una masa molecular aparente de 50,1 kDa y la masa por subunidad fue de 50,5 kDa, lo que indica una estructura monomérica de la enzima nativa. Los sustratos preferidos fueron acetaldehído y NADP que forma acetato y NADPH. La enzima también oxidó otros aldehídos alifáticos y aromáticos de cadena corta a velocidades menores.

3.2 Desarrollo del sistema de regeneración del cofactor:

Un requisito previo para la producción de compuestos α -hidroxi carbonilo es la regeneración de las coenzimas caras y la estabilidad de los catalizadores proteicos. Acoplando dos reacciones enzimáticas dependientes de coenzima, el NADPH se puede regenerar de un modo continuo. Por tanto, en lugar de cantidades estequiométricas solo se requieren cantidades catalíticas de la coenzima. Para este fin, se usó una reacción enzimática combinada entre las oxidoreductasas dependientes de NADPH que forman compuestos α -hidroxicarbonilo y la aldehído deshidrogenasa GOX1122 que produce el cofactor reducido en el curso de la oxidación del acetaldehído. La aldehído deshidrogenasa tiene tasas de recambio muy altas y valores de K_m bajos para acetaldehído y NADP y se pudieron producir en cantidades altas (Schweiger, P. y col., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13:147-155 (2007)).

Los productos derivados de la reacción de los sustratos α -dicetona y α -cetoaldehído se generaron de acuerdo con el protocolo de regeneración del cofactor. Este procedimiento supera la dependencia de las enzimas del cofactor reducido acoplando las reacciones de sustratos de Gox0502, Gox0644, Gox0646, Gox1615, Gox2107 y Gox2684 a las reacciones de reducción del NADP cofactor en base a la acetaldehído oxidoreductasa Gox1122 usando acetaldehído. Los resultados mostraron que Gox0644 permanecía muy activa, incluso a concentraciones altas (50 mM) de acetaldehído (Tabla 12). Las pruebas de tolerancia del acetaldehído mostraron que a concentraciones altas (100 mM), la actividad de Gox0644 no mostraba una disminución espectacular. En las dos reacciones con fenilglioxal y 2,3-pentanodiona, la actividad de Gox0644 permaneció similar a la de la reacción control que consiste

30

5 en una reacción sin acetaldehído (Tabla 12/13). Gox0644 con fenilglioxal y 100 mM de acetaldehído no mostró una disminución de la actividad superior al 20%. En la reacción con 2,3-pentanodiona se produjo una ligera disminución de aproximadamente el 20% con respecto al control, aunque los niveles de actividad seguían siendo muy altos a 66.8 U/mg. Esta prueba mostró la capacidad de Gox0644 para aguantar concentraciones altas de acetaldehído y permite el uso de Gox0644 en una reacción de regeneración del cofactor en presencia de acetaldehído.

Tabla 12: Tolerancia al acetaldehído de Gox0644 con fenilglioxal

Gox0644 con fenilglioxal	
Concentración de acetaldehído	Actividad de Gox0644
Control	38,5 U/mg
10 mM	29,6 U/mg
30 mM	37,1 U/mg
50 mM	39,3 U/mg
100 mM	31,2 U/mg
	U=μmol/min
* Gox0644 con fenilglioxal demuestra una actividad alta en presencia de concentraciones altas de acetaldehído.	

Tabla 13: Tolerancia al acetaldehído de Gox0644 con 2,3-pentanodiona

Gox0644 con 2,3-pentanodiona	
Concentración de acetaldehído	Actividad de Gox0644
Control	87,6 U/mg
10 mM	90,5 U/mg
30 mM	79,3 U/mg
50 mM	66,8 U/mg
	U=μmol/mg,min
* Gox0644 con 2,3-pentanodiona demuestra una actividad alta en presencia de concentraciones altas de acetaldehído. Este ensayo muestra la tolerancia elevada de la enzima al acetaldehído sin una disminución de la actividad con el sustrato deseado.	

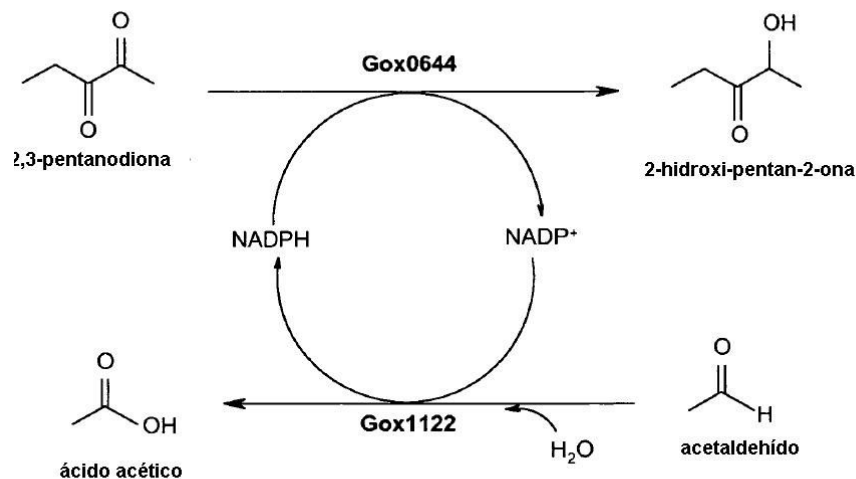
10 **3.3. Sistemas de regeneración del cofactor:**

15 Se llevaron a cabo biotransformaciones con Gox1122 que oxida el acetaldehído en acetato con la reducción concomitante de NADP. Esta reacción se acopló a las reductasas dependientes de NADPH (p. ej., Gox0644 y Gox1615) que reducen los carbonilos para reciclar el cofactor y permitir la adición del cofactor en cantidades catalíticas en lugar de cantidades estequiométricas. Se obtuvieron muestras de las reacciones de biotransformación en varios puntos de tiempo y se comprobó el sustrato restante mediante ensayos enzimáticos ligados a NADP estándar (Schweiger, P. y col., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13:147-155 (2007)). La cantidad del sustrato restante se calculó suponiendo una estequiometría 1:1 de la oxidación/reducción del cofactor en la oxidación/reducción del

correspondiente sustrato.

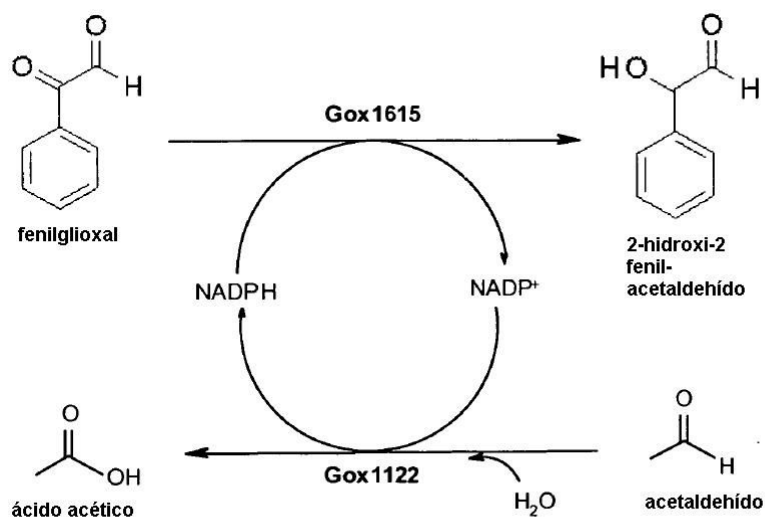
La realización de bioconversión se realizó durante 3 horas para producir cantidades entre 10 y 50 mg de producto según la velocidad de la reacción.

- 5 El sistema de regeneración del cofactor para la proteína Gox644 usó la reacción oxidativa de la proteína Gox1122 que convierte acetaldehído en ácido acético y reducir NADP⁺ en NADPH. El NADPH reducido se oxidó en la reducción de las dicetonas en la hidroxiketona por la proteína Gox644.



- 10 Se establecieron bioconversiones de 5 ml para determinar la regioselectividad con 2 mg de las proteínas Gox0644 y Gox1122, tampón fosfato potásico 40 mM a pH 7,0, NADPH 50 μM. Los sustratos (2,3-pentanodiona 20 mM y acetaldehído) se añadieron cada 30 minutos. La reacción se realizó durante 3 horas para producir cantidades entre 40-60 mg del producto (hidroxi-pentanona). La determinación del producto mediante RMN mostró que Gox0644 reducía específicamente el grupo α-cetona de 2,3-pentanodiona en la correspondiente 2-hidroxi-pentan-3-ona.

- 15 El sistema de regeneración del cofactor para la proteína Gox1615 usó la reacción oxidativa de la proteína Gox1122 que convierte acetaldehído en ácido acético y reducir NADP⁺ en NADPH. El NADPH reducido se oxidó en la reducción de fenilgloxal en 2-hidroxi-2-fenil-acetaldehído por la proteína Gox1615. Se establecieron bioconversiones de 5 ml para determinar la regioselectividad con 2 mg de las proteínas Gox1615 y Gox1122, tampón fosfato potásico 40 mM a pH 7,0, NADPH 50 μM. Los sustratos (fenilgloxal 20 mM y acetaldehído) se añadieron cada 30 minutos. La reacción se realizó durante 3 horas para producir cantidades entre 40-60 mg del producto (2-fenil-2-hidroxialdehído).
20 La determinación del producto mediante RMN mostró que Gox1615 conservaba el grupo aldehído en la formación de 2-hidroxi-2-fenil-acetaldehído.



Listado de secuencias texto libre

SEC ID Nº:	Descripción
1/2	ADN y proteína de Gox0313 de α -cetocarbonil reductasa de <i>G. oxydans</i>
3/4	ADN y proteína de Gox0502 de α -cetocarbonil reductasa de <i>G. oxydans</i>
5/6	ADN y proteína de Gox0644 de α -cetocarbonil reductasa de <i>G. oxydans</i>
7/8	ADN y proteína de Gox0646 de α -cetocarbonil reductasa de <i>G. oxydans</i>
9/10	ADN y proteína de Gox1615 de α -cetocarbonil reductasa de <i>G. oxydans</i>
11/12	ADN y proteína de Gox2107 de α -cetocarbonil reductasa de <i>G. oxydans</i>
13/14	ADN y proteína de Gox2684 de α -cetocarbonil reductasa de <i>G. oxydans</i>
15/16	ADN y proteína de Gox1122 de α -cetocarbonil reductasa de <i>G. oxydans</i>
17-32	Cebador
33	Vector de expresión pASK-IBA5 que tiene Promotor de 37-72 pb Sitio de unión del cebador directo de 57-76 pb, Cola Strep de 160-192 pb, Sitio de clonación múltiple de 193-274 pb, Sitio de unión del cebador inverso de 342-358 pb, Origen f1 de 371-809 pb, Gen de resistencia AmpR de 958-1818 pb y Represor Tet (1828-2451).

Listado de secuencias

5 <110> Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universitaet Bonn

<120> Producción de compuestos de carbonilo alfa-oxifuncionalizados

<130> 072983ep

ES 2 437 615 T3

<160> 33

<170> PatentIn versión 3.3

5

<210> 1

<211> 1032

<212> ADN

<213> Gluconobacter oxydans

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1029)

15 <400> 1

atg gct gat aca atg ctc gcc gcc gtc gtc cgt gaa ttc ggc aag ccg	48
Met Ala Asp Thr Met Leu Ala Ala Val Val Arg Glu Phe Gly Lys Pro	
1 5 10 15	
ctc tcc atc gag cgg cta ccc atc ccg gac atc aag ccc cac cag atc	96
Leu Ser Ile Glu Arg Leu Pro Ile Pro Asp Ile Lys Pro His Gln Ile	
20 25 30	
ctc gtg aag gtc gat acc tgt ggc gtc tgc cac act gac ctg cac gcc	144
Leu Val Lys Val Asp Thr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Ala	
35 40 45	
gcg cgc ggg gac tgg ccg tcc aag ccc aac ccg ccg ttc att ccc ggg	192
Ala Arg Gly Asp Trp Pro Ser Lys Pro Asn Pro Pro Phe Ile Pro Gly	
50 55 60	
cat gaa ggc gtc gga cac atc gtc gcc gtc ggc agt cag gtc ggc gat	240
His Glu Gly Val Gly His Ile Val Ala Val Gly Ser Gln Val Gly Asp	
65 70 75 80	
ttc gtc aag acc ggc gat gtc gtg ggc gtg ccc tgg ctc tac tcc gcc	288
Phe Val Lys Thr Gly Asp Val Val Gly Val Pro Trp Leu Tyr Ser Ala	
85 90 95	
tgc ggt cac tgc gaa cac tgt ctg ggc ggc tgg gaa aca ctc tgc gaa	336
Cys Gly His Cys Glu His Cys Leu Gly Gly Trp Glu Thr Leu Cys Glu	
100 105 110	
aag cag gac gac acc ggc tac acc gtc aat ggc tgc ttc gcc gaa tat	384
Lys Gln Asp Asp Thr Gly Tyr Thr Val Asn Gly Cys Phe Ala Glu Tyr	
115 120 125	
gtc gtg gca gac ccg aac tac gtc gca cac ctg ccc tcg acc atc gac	432
Val Val Ala Asp Pro Asn Tyr Val Ala His Leu Pro Ser Thr Ile Asp	
130 135 140	
ccg ctt cag gcc tcg ccg gtc ctg tgc gcg ggg ctg acg gtc tat aag	480
Pro Leu Gln Ala Ser Pro Val Leu Cys Ala Gly Leu Thr Val Tyr Lys	
145 150 155 160	

ES 2 437 615 T3

ggc ctg aaa atg acg gag gcc cgc ccc ggc cag tgg gtc gca gtc tcg 528
 Gly Leu Lys Met Thr Glu Ala Arg Pro Gly Gln Trp Val Ala Val Ser
 165 170 175

ggc gtc ggc ggt ctc ggc cag atg gcc gtg cag tac gcc gtc gcc atg 576
 Gly Val Gly Gly Leu Gly Gln Met Ala Val Gln Tyr Ala Val Ala Met
 180 185 190

ggc atg aat gtc gtc gcg gtg gac atc gat gac gaa aaa ctc gcc aca 624
 Gly Met Asn Val Val Ala Val Asp Ile Asp Asp Glu Lys Leu Ala Thr
 195 200 205

gcc aaa aag ctc ggc gca tcc ctg acc gtc aac gcc aag gac acg gac 672
 Ala Lys Lys Leu Gly Ala Ser Leu Thr Val Asn Ala Lys Asp Thr Asp
 210 215 220

ccg gcc agg ttc atc cag cag cag atc ggc ggc gca cat ggc gct ctc 720
 Pro Ala Arg Phe Ile Gln Gln Gln Ile Gly Gly Ala His Gly Ala Leu
 225 230 235 240

gtc acc gct gtc gga cgg acg gcg ttt tcg cag gcc atg ggc tat gcc 768
 Val Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Phe Ser Gln Ala Met Gly Tyr Ala
 245 250 255

cgc cgc ggc ggc acc atc gtc ctg aac gga ctg ccg ccc ggc gat ttc 816
 Arg Arg Gly Gly Thr Ile Val Leu Asn Gly Leu Pro Pro Gly Asp Phe
 260 265 270

ccg gtc tcg atc ttc gac atg gtc atg aac ggc acc acc atc cgt ggc 864
 Pro Val Ser Ile Phe Asp Met Val Met Asn Gly Thr Thr Ile Arg Gly
 275 280 285

tcc atc gtc gga aca cgg ctg gac atg atc gag gcc atg gat ttc ttc 912
 Ser Ile Val Gly Thr Arg Leu Asp Met Ile Glu Ala Met Asp Phe Phe
 290 295 300

gcc cgc ggc aag gtc aaa tcc gtc gtc acc ccc gga aaa ctt gaa aac 960
 Ala Arg Gly Lys Val Lys Ser Val Val Thr Pro Gly Lys Leu Glu Asn
 305 310 315 320

atc aat acg atc ttc gac gat ctg cag aat ggt cgc ctc gaa ggc cgg 1008
 Ile Asn Thr Ile Phe Asp Asp Leu Gln Asn Gly Arg Leu Glu Gly Arg
 325 330 335

aca gtg ctc gac ttc cgg tcc tga 1032
 Thr Val Leu Asp Phe Arg Ser
 340

<210> 2

<211> 343

5 <212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 2

Met Ala Asp Thr Met Leu Ala Ala Val Val Arg Glu Phe Gly Lys Pro
 1 5 10 15

Leu Ser Ile Glu Arg Leu Pro Ile Pro Asp Ile Lys Pro His Gln Ile
 20 25 30

10

ES 2 437 615 T3

Leu Val Lys Val Asp Thr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Ala
 35 40 45
 Ala Arg Gly Asp Trp Pro Ser Lys Pro Asn Pro Phe Ile Pro Gly
 50 55 60
 His Glu Gly Val Gly His Ile Val Ala Val Gly Ser Gln Val Gly Asp
 65 70 75 80
 Phe Val Lys Thr Gly Asp Val Val Gly Val Pro Trp Leu Tyr Ser Ala
 85 90 95
 Cys Gly His Cys Glu His Cys Leu Gly Gly Trp Glu Thr Leu Cys Glu
 100 105 110
 Lys Gln Asp Asp Thr Gly Tyr Thr Val Asn Gly Cys Phe Ala Glu Tyr
 115 120 125
 Val Val Ala Asp Pro Asn Tyr Val Ala His Leu Pro Ser Thr Ile Asp
 130 135 140
 Pro Leu Gln Ala Ser Pro Val Leu Cys Ala Gly Leu Thr Val Tyr Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Lys Met Thr Glu Ala Arg Pro Gly Gln Trp Val Ala Val Ser
 165 170 175
 Gly Val Gly Gly Leu Gly Gln Met Ala Val Gln Tyr Ala Val Ala Met
 180 185 190
 Gly Met Asn Val Val Ala Val Asp Ile Asp Asp Glu Lys Leu Ala Thr
 195 200 205
 Ala Lys Lys Leu Gly Ala Ser Leu Thr Val Asn Ala Lys Asp Thr Asp
 210 215 220
 Pro Ala Arg Phe Ile Gln Gln Gln Ile Gly Gly Ala His Gly Ala Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Phe Ser Gln Ala Met Gly Tyr Ala
 245 250 255
 Arg Arg Gly Gly Thr Ile Val Leu Asn Gly Leu Pro Pro Gly Asp Phe
 260 265 270
 Pro Val Ser Ile Phe Asp Met Val Met Asn Gly Thr Thr Ile Arg Gly
 275 280 285

ES 2 437 615 T3

Ser Ile Val Gly Thr Arg Leu Asp Met Ile Glu Ala Met Asp Phe Phe
290 295 300

Ala Arg Gly Lys Val Lys Ser Val Val Thr Pro Gly Lys Leu Glu Asn
305 310 315 320

Ile Asn Thr Ile Phe Asp Asp Leu Gln Asn Gly Arg Leu Glu Gly Arg
325 330 335

Thr Val Leu Asp Phe Arg Ser
340

<210> 3

<211> 1086

5 <212> ADN

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1083)

<400> 3

ES 2 437 615 T3

atg cca acc ctg ttc gat ccc att gat ttc ggt ccc att cac gcg aaa	48
Met Pro Thr Leu Phe Asp Pro Ile Asp Phe Gly Pro Ile His Ala Lys	
1 5 10 15	
aac cgg atc gtg atg tcc ccg ctg acg cgc gga cgt gct gac aag gag	96
Asn Arg Ile Val Met Ser Pro Leu Thr Arg Gly Arg Ala Asp Lys Glu	
20 25 30	
gcc gtt ccg acc ccc atc atg gcg gaa tac tac gcc cag cgc gcc agt	144
Ala Val Pro Thr Pro Ile Met Ala Glu Tyr Tyr Ala Gln Arg Ala Ser	
35 40 45	
gcc ggg ctg atc atc acg gaa gcc acg ggt atc tcc cgc gaa ggt ctg	192
Ala Gly Leu Ile Ile Thr Glu Ala Thr Gly Ile Ser Arg Glu Gly Leu	
50 55 60	
ggc tgg ccg ttc gca ccg gga atc tgg tcc gat gcg cag gtc gaa gcc	240
Gly Trp Pro Phe Ala Pro Gly Ile Trp Ser Asp Ala Gln Val Glu Ala	
65 70 75 80	
tgg aag ccg atc gtg gcc ggt gtg cat gca aag gcc gga aag atc gtc	288
Trp Lys Pro Ile Val Ala Gly Val His Ala Lys Gly Gly Lys Ile Val	
85 90 95	
tgc cag ctc tgg cac atg ggc cgc atg gtc cac tcg tcc gtg acc gga	336
Cys Gln Leu Trp His Met Gly Arg Met Val His Ser Ser Val Thr Gly	
100 105 110	
acg cag ccc gtc tcg tcc tcc gcc acc acg gcc ccc ggc gag gtc cat	384
Thr Gln Pro Val Ser Ser Ser Ala Thr Thr Ala Pro Gly Glu Val His	
115 120 125	
acc tat gaa ggc aag aag ccg ttc gag cag gcc cgc gca atc gat gcc	432
Thr Tyr Glu Gly Lys Lys Pro Phe Glu Gln Ala Arg Ala Ile Asp Ala	

ES 2 437 615 T3

130	135	140		
gcg gat atc agc cgt att ctg aac gac tat gag aac gcc gcc cgc aat Ala Asp Ile Ser Arg Ile Leu Asn Asp Tyr Glu Asn Ala Ala Arg Asn 145 150 155 160				480
gcg atc cgc gcc ggc ttc gac ggg gtg cag atc cac gcc gcc aat ggc Ala Ile Arg Ala Gly Phe Asp Gly Val Gln Ile His Ala Ala Asn Gly 165 170 175				528
tac ctc atc gac gag ttc ctg cga aac ggt acg aat cac cgc aca gat Tyr Leu Ile Asp Glu Phe Leu Arg Asn Gly Thr Asn His Arg Thr Asp 180 185 190				576
gaa tac ggc ggc gtc ccc gaa aac cgc atc cgt ttc ctg aag gaa gtc Glu Tyr Gly Gly Val Pro Glu Asn Arg Ile Arg Phe Leu Lys Glu Val 195 200 205				624
acc gag cgc gtg atc gct gcc atc ggt gcc gac cgc aca ggc gtg cgc Thr Glu Arg Val Ile Ala Ala Ile Gly Ala Asp Arg Thr Gly Val Arg 210 215 220				672
ctg tcc ccc aac ggc gat acg cag ggc tgc atc gac agc gca cct gag Leu Ser Pro Asn Gly Asp Thr Gln Gly Cys Ile Asp Ser Ala Pro Glu 225 230 235 240				720
acg gtc ttt gtc ccg gcg gca aag ctg ctt cag gat ctg ggc gtg gcc Thr Val Phe Val Pro Ala Ala Lys Leu Leu Gln Asp Leu Gly Val Ala 245 250 255				768
tgg ctc gaa ctg cgc gaa ccc ggc ccg aac ggc acc ttc ggc aag acg Trp Leu Glu Leu Arg Glu Pro Gly Pro Asn Gly Thr Phe Gly Lys Thr 260 265 270				816
gac cag ccc aaa ctg tcc ccg cag atc cgc aag gtg ttc ctg cgc ccg Asp Gln Pro Lys Leu Ser Pro Gln Ile Arg Lys Val Phe Leu Arg Pro 275 280 285				864
ctg gtg ctc aat cag gac tat acg ttc gag gca gca cag acc gcg ctg Leu Val Leu Asn Gln Asp Tyr Thr Phe Glu Ala Ala Gln Thr Ala Leu 290 295 300				912
gca gaa ggg aag gct gat gcg atc gcc ttc ggt cgc aag ttc atc tcg Ala Glu Gly Lys Ala Asp Ala Ile Ala Phe Gly Arg Lys Phe Ile Ser 305 310 315 320				960
aac ccc gac ctg ccg gag cgc ttc gcc cgc ggc atc gcc ctg cag ccg Asn Pro Asp Leu Pro Glu Arg Phe Ala Arg Gly Ile Ala Leu Gln Pro 325 330 335				1008
gat gat atg aaa acc tgg tac agt cag ggc ccc gaa gga tac acg gac Asp Asp Met Lys Thr Trp Tyr Ser Gln Gly Pro Glu Gly Tyr Thr Asp 340 345 350				1056
tac ccg tcc gcc acc tcc ggc ccc aac tga Tyr Pro Ser Ala Thr Ser Gly Pro Asn 355 360				1086

<210> 4

<211> 361

5 <212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

ES 2 437 615 T3

<400> 4

Met Pro Thr Leu Phe Asp Pro Ile Asp Phe Gly Pro Ile His Ala Lys
1 5 10 15

Asn Arg Ile Val Met Ser Pro Leu Thr Arg Gly Arg Ala Asp Lys Glu
20 25 30

Ala Val Pro Thr Pro Ile Met Ala Glu Tyr Tyr Ala Gln Arg Ala Ser
35 40 45

Ala Gly Leu Ile Ile Thr Glu Ala Thr Gly Ile Ser Arg Glu Gly Leu
50 55 60

Gly Trp Pro Phe Ala Pro Gly Ile Trp Ser Asp Ala Gln Val Glu Ala
65 70 75 80

Trp Lys Pro Ile Val Ala Gly Val His Ala Lys Gly Gly Lys Ile Val
85 90 95

Cys Gln Leu Trp His Met Gly Arg Met Val His Ser Ser Val Thr Gly
100 105 110

Thr Gln Pro Val Ser Ser Ser Ala Thr Thr Ala Pro Gly Glu Val His
115 120 125

Thr Tyr Glu Gly Lys Lys Pro Phe Glu Gln Ala Arg Ala Ile Asp Ala
130 135 140

Ala Asp Ile Ser Arg Ile Leu Asn Asp Tyr Glu Asn Ala Ala Arg Asn
145 150 155 160

Ala Ile Arg Ala Gly Phe Asp Gly Val Gln Ile His Ala Ala Asn Gly
165 170 175

Tyr Leu Ile Asp Glu Phe Leu Arg Asn Gly Thr Asn His Arg Thr Asp
180 185 190

Glu Tyr Gly Gly Val Pro Glu Asn Arg Ile Arg Phe Leu Lys Glu Val
195 200 205

Thr Glu Arg Val Ile Ala Ala Ile Gly Ala Asp Arg Thr Gly Val Arg
210 215 220

Leu Ser Pro Asn Gly Asp Thr Gln Gly Cys Ile Asp Ser Ala Pro Glu
225 230 235 240

ES 2 437 615 T3

```

Thr Val Phe Val Pro Ala Ala Lys Leu Leu Gln Asp Leu Gly Val Ala
                245                               250                 255

Trp Leu Glu Leu Arg Glu Pro Gly Pro Asn Gly Thr Phe Gly Lys Thr
                260                               265                 270

Asp Gln Pro Lys Leu Ser Pro Gln Ile Arg Lys Val Phe Leu Arg Pro
                275                               280                 285

Leu Val Leu Asn Gln Asp Tyr Thr Phe Glu Ala Ala Gln Thr Ala Leu
                290                               295                 300

Ala Glu Gly Lys Ala Asp Ala Ile Ala Phe Gly Arg Lys Phe Ile Ser
305                               310                               315                 320

Asn Pro Asp Leu Pro Glu Arg Phe Ala Arg Gly Ile Ala Leu Gln Pro
                325                               330                 335

Asp Asp Met Lys Thr Trp Tyr Ser Gln Gly Pro Glu Gly Tyr Thr Asp
                340                               345                 350

Tyr Pro Ser Ala Thr Ser Gly Pro Asn
                355                               360

```

<210> 5

<211> 840

5 <212> ADN

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(837)

<400> 5

ES 2 437 615 T3

atg tcg tca cag gtt cca tcc gcc gag gcc cag acc gtg att tcc ttt	48
Met Ser Ser Gln Val Pro Ser Ala Glu Ala Gln Thr Val Ile Ser Phe	
1 5 10 15	
cat gac ggt cac acc atg ccc cag atc ggg ctg ggc gtg tgg gaa acg	96
His Asp Gly His Thr Met Pro Gln Ile Gly Leu Gly Val Trp Glu Thr	
20 25 30	
cog ccg gat gag acg gcc gag gtc gtg aag gaa gcc gtg aag ctc ggt	144
Pro Pro Asp Glu Thr Ala Glu Val Val Lys Glu Ala Val Lys Leu Gly	
35 40 45	
tac cgg tct gtc gat acg gcg cgt ctg tac aag aac gag gaa ggt gtc	192
Tyr Arg Ser Val Asp Thr Ala Arg Leu Tyr Lys Asn Glu Glu Gly Val	
50 55 60	
ggc aaa ggt ctg gaa gac cat ccg gaa atc ttc ctg acg acc aag ctc	240
Gly Lys Gly Leu Glu Asp His Pro Glu Ile Phe Leu Thr Thr Lys Leu	
65 70 75 80	
tgg aat gac gag cag ggc tat gac agc acc ctg cgg gcg tat gaa gaa	288
Trp Asn Asp Glu Gln Gly Tyr Asp Ser Thr Leu Arg Ala Tyr Glu Glu	
85 90 95	
agc gcg cgc ctg ctg cgt cgt ccg gtg ctg gac ctg tat ctg atc cac	336
Ser Ala Arg Leu Leu Arg Arg Pro Val Leu Asp Leu Tyr Leu Ile His	
100 105 110	
tgg ccg atg ccg gct cag ggg cag tat gtc gag acg tgg aag gca ctc	384
Trp Pro Met Pro Ala Gln Gly Gln Tyr Val Glu Thr Trp Lys Ala Leu	
115 120 125	
gtc gag ctg aag aaa tcc ggt cgt gtg aag tcc atc gcc gtg tcc aat	432
Val Glu Leu Lys Lys Ser Gly Arg Val Lys Ser Ile Gly Val Ser Asn	
130 135 140	
ttc gag tcg gag cat ctg gag cgg atc atg gat gcc acg ggt gtc gtg	480
Phe Glu Ser Glu His Leu Glu Arg Ile Met Asp Ala Thr Gly Val Val	
145 150 155 160	
ccg gtc gtc aac cag atc gag ctg cat ccc gat ttc cag cag cgc gcc	528
Pro Val Val Asn Gln Ile Glu Leu His Pro Asp Phe Gln Gln Arg Ala	
165 170 175	
ctg cgg gaa ttc cac gag aag cac aac atc cgc acc gag tcc tgg cgc	576
Leu Arg Glu Phe His Glu Lys His Asn Ile Arg Thr Glu Ser Trp Arg	
180 185 190	
ccg ctg ggc aag ggg cgc gtc ctg agc gat gag cgg atc ggg aag atc	624
Pro Leu Gly Lys Gly Arg Val Leu Ser Asp Glu Arg Ile Gly Lys Ile	
195 200 205	
gct gaa aag cac agc cgg act ccg gcg cag gtc gtg atc cgc tgg cat	672
Ala Glu Lys His Ser Arg Thr Pro Ala Gln Val Val Ile Arg Trp His	
210 215 220	
ctt cag aat gga ctg atc gtc att ccg aaa tcg gtc aat ccc aag cgt	720
Leu Gln Asn Gly Leu Ile Val Ile Pro Lys Ser Val Asn Pro Lys Arg	
225 230 235 240	
ctg gct gaa aat ctg gat gtg ttc ggc ttc gtg ctg gat gcg gat gac	768
Leu Ala Glu Asn Leu Asp Val Phe Gly Phe Val Leu Asp Ala Asp Asp	
245 250 255	
atg cag gcc atc gaa cag atg gac cgc aag gat ggc cgg atg ggc gct	816
Met Gln Ala Ile Glu Gln Met Asp Arg Lys Asp Gly Arg Met Gly Ala	
260 265 270	
gat ccg aat acg gcg aaa ttc tga	840
Asp Pro Asn Thr Ala Lys Phe	
275	

ES 2 437 615 T3

<210> 6

<211> 279

<212> PRT

5 <213> Gluconobacter oxydans

<400> 6

Met	Ser	Ser	Gln	Val	Pro	Ser	Ala	Glu	Ala	Gln	Thr	Val	Ile	Ser	Phe
1				5					10					15	

ES 2 437 615 T3

His Asp Gly His Thr Met Pro Gln Ile Gly Leu Gly Val Trp Glu Thr
 20 25 30

Pro Pro Asp Glu Thr Ala Glu Val Val Lys Glu Ala Val Lys Leu Gly
 35 40 45

Tyr Arg Ser Val Asp Thr Ala Arg Leu Tyr Lys Asn Glu Glu Gly Val
 50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Asp His Pro Glu Ile Phe Leu Thr Thr Lys Leu
 65 70 75 80

Trp Asn Asp Glu Gln Gly Tyr Asp Ser Thr Leu Arg Ala Tyr Glu Glu
 85 90 95

Ser Ala Arg Leu Leu Arg Arg Pro Val Leu Asp Leu Tyr Leu Ile His
 100 105 110

Trp Pro Met Pro Ala Gln Gly Gln Tyr Val Glu Thr Trp Lys Ala Leu
 115 120 125

Val Glu Leu Lys Lys Ser Gly Arg Val Lys Ser Ile Gly Val Ser Asn
 130 135 140

Phe Glu Ser Glu His Leu Glu Arg Ile Met Asp Ala Thr Gly Val Val
 145 150 155 160

Pro Val Val Asn Gln Ile Glu Leu His Pro Asp Phe Gln Gln Arg Ala
 165 170 175

Leu Arg Glu Phe His Glu Lys His Asn Ile Arg Thr Glu Ser Trp Arg
 180 185 190

Pro Leu Gly Lys Gly Arg Val Leu Ser Asp Glu Arg Ile Gly Lys Ile
 195 200 205

Ala Glu Lys His Ser Arg Thr Pro Ala Gln Val Val Ile Arg Trp His
 210 215 220

Leu Gln Asn Gly Leu Ile Val Ile Pro Lys Ser Val Asn Pro Lys Arg
 225 230 235 240

Leu Ala Glu Asn Leu Asp Val Phe Gly Phe Val Leu Asp Ala Asp Asp
 245 250 255

Met Gln Ala Ile Glu Gln Met Asp Arg Lys Asp Gly Arg Met Gly Ala
 260 265 270

Asp Pro Asn Thr Ala Lys Phe
 275

5 <210> 7
 <211> 795

ES 2 437 615 T3

<212> ADN

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(795)

<400> 7

```

atg ctg aac ctc gat ctg agc ggc cgc acc gcc ctc gtc acc ggc tcg      48
Met Leu Asn Leu Asp Leu Ser Gly Arg Thr Ala Leu Val Thr Gly Ser
1          5          10          15

acc ggc ggg atc ggc ctg gcc atc gcc cgg aag ctg ggc gag gca gga      96
Thr Gly Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Arg Lys Leu Gly Glu Ala Gly
          20          25          30

gcc aca gtc atc atc aac ggc cgc aag cag gaa ggc gtc gat agc gcc      144
Ala Thr Val Ile Ile Asn Gly Arg Lys Gln Glu Gly Val Asp Ser Ala
          35          40          45

ctt gag aag ctg gcc aag gcc atc ccg ggc ggc gcc ttc cgg agt gtc      192
Leu Glu Lys Leu Ala Lys Ala Ile Pro Gly Gly Ala Phe Arg Ser Val
          50          55          60

gtc gcc gat gtc gga acg gcc gaa ggc tgc aag gcg ctc ttt gaa gcc      240
Val Ala Asp Val Gly Thr Ala Glu Gly Cys Lys Ala Leu Phe Glu Ala
65          70          75          80

gaa agc agc gtg gat gtc ctc gtc aac aat gcc ggc atc ttc gga ccg      288
Glu Ser Ser Val Asp Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Phe Gly Pro
          85          90          95

aat gat ttt ttc cag acg acg gat gaa agc tgg gag cac ctg ttc gag      336
Asn Asp Phe Phe Gln Thr Thr Asp Glu Ser Trp Glu His Leu Phe Glu
          100          105          110

gtc aac ctg ttc tcc ggc gtg cgc ctg tcc cgc gcc tat atg ccg ggc      384
Val Asn Leu Phe Ser Gly Val Arg Leu Ser Arg Ala Tyr Met Pro Gly
          115          120          125

atg aag gag cgc aac tgg ggc cgc gtg ctg ttc att gca tca gaa tcg      432
Met Lys Glu Arg Asn Trp Gly Arg Val Leu Phe Ile Ala Ser Glu Ser
          130          135          140

gca ctg aac atc ccg gtc gaa atg gtc gat tac ggc gtc agc aag acc      480
Ala Leu Asn Ile Pro Val Glu Met Val Asp Tyr Gly Val Ser Lys Thr
145          150          155          160

gcc atg ctg ggt ctg gcc cgc ggt ctg gcc aag ctg atg gcg ggc acg      528
Ala Met Leu Gly Leu Ala Arg Gly Leu Ala Lys Leu Met Ala Gly Thr
          165          170          175

aat gtg acg gtg aat tcg gtc cta ccc ggc ccc acc ctg tcc gaa ggt      576
Asn Val Thr Val Asn Ser Val Leu Pro Gly Pro Thr Leu Ser Glu Gly

```

10

ES 2 437 615 T3

	180	185	190	
gtc gag gac atg ctc aag gcc cag aac ccc gac agc acc cgc ccg gtc				624
Val Glu Asp Met Leu Lys Ala Gln Asn Pro Asp Ser Thr Arg Pro Val	195	200	205	
gcg gaa ctg gcg gcg gaa ttc gtg cag aaa cat cgc ccg agc aac atc				672
Ala Glu Leu Ala Ala Glu Phe Val Gln Lys His Arg Pro Ser Asn Ile	210	215	220	
ctg cgc cgc atg gcc acg gtt gat gaa gtg gcc aat ctc gtc gtc tat				720
Leu Arg Arg Met Ala Thr Val Asp Glu Val Ala Asn Leu Val Val Tyr	225	230	235	240
gcc gcc tcg cct ctg gcg tcc gcc aca acg ggc gcg gcc ctg cgc gtc				768
Ala Ala Ser Pro Leu Ala Ser Ala Thr Thr Gly Ala Ala Leu Arg Val	245	250	255	
gat ggc ggc acc gtc gat acc atc tga				795
Asp Gly Gly Thr Val Asp Thr Ile	260			

<210> 8

<211> 264

5 <212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 8

Met	Leu	Asn	Leu	Asp	Leu	Ser	Gly	Arg	Thr	Ala	Leu	Val	Thr	Gly	Ser
1				5					10					15	
Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Leu	Ala	Ile	Ala	Arg	Lys	Leu	Gly	Glu	Ala	Gly
			20					25					30		
Ala	Thr	Val	Ile	Ile	Asn	Gly	Arg	Lys	Gln	Glu	Gly	Val	Asp	Ser	Ala
		35					40					45			
Leu	Glu	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Ile	Pro	Gly	Gly	Ala	Phe	Arg	Ser	Val
	50					55					60				
Val	Ala	Asp	Val	Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	Cys	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Ala
65					70					75				80	
Glu	Ser	Ser	Val	Asp	Val	Leu	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Ile	Phe	Gly	Pro
				85					90					95	
Asn	Asp	Phe	Phe	Gln	Thr	Thr	Asp	Glu	Ser	Trp	Glu	His	Leu	Phe	Glu
			100					105					110		
Val	Asn	Leu	Phe	Ser	Gly	Val	Arg	Leu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Met	Pro	Gly
		115					120					125			
Met	Lys	Glu	Arg	Asn	Trp	Gly	Arg	Val	Leu	Phe	Ile	Ala	Ser	Glu	Ser

10

ES 2 437 615 T3

130 135 140

Ala Leu Asn Ile Pro Val Glu Met Val Asp Tyr Gly Val Ser Lys Thr
145 150 155 160

Ala Met Leu Gly Leu Ala Arg Gly Leu Ala Lys Leu Met Ala Gly Thr
165 170 175

Asn Val Thr Val Asn Ser Val Leu Pro Gly Pro Thr Leu Ser Glu Gly
180 185 190

Val Glu Asp Met Leu Lys Ala Gln Asn Pro Asp Ser Thr Arg Pro Val
195 200 205

Ala Glu Leu Ala Ala Glu Phe Val Gln Lys His Arg Pro Ser Asn Ile
210 215 220

Leu Arg Arg Met Ala Thr Val Asp Glu Val Ala Asn Leu Val Val Tyr
225 230 235 240

Ala Ala Ser Pro Leu Ala Ser Ala Thr Thr Gly Ala Ala Leu Arg Val
245 250 255

Asp Gly Gly Thr Val Asp Thr Ile
260

<210> 9

<211> 999

5 <212> ADN

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(996)

<400> 9

ES 2 437 615 T3

atg	gca	tcc	gac	acc	atc	cgc	atc	ccc	ggc	atc	gac	acg	cct	ctc	tcc	48
Met	Ala	Ser	Asp	Thr	Ile	Arg	Ile	Pro	Gly	Ile	Asp	Thr	Pro	Leu	Ser	
1				5					10					15		
cgc	gtc	gcc	ctc	ggc	acc	tgg	gcc	atc	ggc	ggc	tgg	atg	tgg	ggc	ggc	96
Arg	Val	Ala	Leu	Gly	Thr	Trp	Ala	Ile	Gly	Gly	Trp	Met	Trp	Gly	Gly	
			20					25						30		
ccc	gat	gat	gac	aat	ggc	gtc	cgc	acc	att	cac	gcg	gcc	ctc	gat	gaa	144
Pro	Asp	Asp	Asp	Asn	Gly	Val	Arg	Thr	Ile	His	Ala	Ala	Leu	Asp	Glu	
			35				40					45				

ggc	atc	aac	ctg	atc	gac	acc	gcc	ccg	gtc	tac	ggc	ttc	ggc	cat	tcc	192
Gly	Ile	Asn	Leu	Ile	Asp	Thr	Ala	Pro	Val	Tyr	Gly	Phe	Gly	His	Ser	
	50					55					60					
gag	gaa	atc	gtc	ggc	cgg	gca	ctc	gcc	gag	aag	ccc	aac	aag	gcg	cat	240

ES 2 437 615 T3

Glu	Glu	Ile	Val	Gly	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Lys	Pro	Asn	Lys	Ala	His		
65					70					75					80		
gtc	gcc	acg	aaa	ctc	ggg	ctc	cac	tgg	ggt	ggc	gaa	gac	gaa	aag	aat		288
Val	Ala	Thr	Lys	Leu	Gly	Leu	His	Trp	Val	Gly	Glu	Asp	Glu	Lys	Asn		
			85						90					95			
atg	aag	gtc	ttc	cgg	gac	tcc	cgc	ccg	gcc	cgc	atc	cgc	aag	gaa	gtc		336
Met	Lys	Val	Phe	Arg	Asp	Ser	Arg	Pro	Ala	Arg	Ile	Arg	Lys	Glu	Val		
			100					105					110				
gag	gac	tcg	ctc	cgc	cgt	ctg	cgt	gtg	gag	acg	atc	gat	ctc	gag	cag		384
Glu	Asp	Ser	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Glu	Thr	Ile	Asp	Leu	Glu	Gln		
		115				120						125					
atc	cac	tgg	ccc	gac	gac	aaa	acc	ccg	atc	gac	gag	agc	gcc	cgc	gag		432
Ile	His	Trp	Pro	Asp	Asp	Lys	Thr	Pro	Ile	Asp	Glu	Ser	Ala	Arg	Glu		
	130					135					140						
ctt	cag	aaa	ctc	cat	cag	gac	ggc	aag	atc	cgt	gcc	ctc	ggc	gta	agc		480
Leu	Gln	Lys	Leu	His	Gln	Asp	Gly	Lys	Ile	Arg	Ala	Leu	Gly	Val	Ser		
145					150					155					160		
aac	ttc	tcg	ccg	gag	cag	atg	gac	atc	ttc	cgc	gaa	gtc	gcc	ccg	ctc		528
Asn	Phe	Ser	Pro	Glu	Gln	Met	Asp	Ile	Phe	Arg	Glu	Val	Ala	Pro	Leu		
			165						170					175			
gcc	acg	atc	cag	ccc	ccg	ctg	aac	ctt	ttc	gaa	cgc	acc	atc	gag	aag		576
Ala	Thr	Ile	Gln	Pro	Pro	Leu	Asn	Leu	Phe	Glu	Arg	Thr	Ile	Glu	Lys		
			180				185						190				
gac	atc	ctg	ccc	tac	gcc	gaa	aag	cac	aat	gcc	gtc	ggt	ctc	gct	tac		624
Asp	Ile	Leu	Pro	Tyr	Ala	Glu	Lys	His	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Tyr		
		195					200					205					
ggg	gcc	ctc	tgc	cgc	ggc	ctg	ctg	aca	ggc	aag	atg	aac	cgc	gat	acg		672
Gly	Ala	Leu	Cys	Arg	Gly	Leu	Leu	Thr	Gly	Lys	Met	Asn	Arg	Asp	Thr		
	210				215						220						
acc	ttc	ccg	aag	gat	gac	ctg	cgt	tcg	aac	gat	ccg	aag	ttc	cag	aag		720
Thr	Phe	Pro	Lys	Asp	Asp	Leu	Arg	Ser	Asn	Asp	Pro	Lys	Phe	Gln	Lys		
225					230					235				240			
ccg	aat	ttc	gag	aag	tac	ctc	gca	gcc	atg	gac	gag	ttc	gaa	aag	ctt		768
Pro	Asn	Phe	Glu	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu		
			245						250					255			
gcc	gaa	aag	cgc	ggc	aag	tct	gtg	atg	gcc	ttc	gcg	ggt	cgc	tgg	ggt		816
Ala	Glu	Lys	Arg	Gly	Lys	Ser	Val	Met	Ala	Phe	Ala	Val	Arg	Trp	Val		
			260					265					270				
ctg	gat	cag	ggc	ccg	gta	atc	gcc	ctg	tgg	ggt	gcc	cgc	aag	ccg	ggt		864
Leu	Asp	Gln	Gly	Pro	Val	Ile	Ala	Leu	Trp	Gly	Ala	Arg	Lys	Pro	Gly		
		275					280					285					
cag	gtc	tca	ggc	gta	aag	gac	gtc	ttc	ggc	tgg	tcc	ctg	acc	gac	gaa		912
Gln	Val	Ser	Gly	Val	Lys	Asp	Val	Phe	Gly	Trp	Ser	Leu	Thr	Asp	Glu		
	290					295					300						
gag	aag	aaa	gcc	gtg	gac	gac	att	ctg	gct	agg	cat	gtc	ccc	aat	ccc		960
Glu	Lys	Lys	Ala	Val	Asp	Asp	Ile	Leu	Ala	Arg	His	Val	Pro	Asn	Pro		
305					310					315				320			
atc	gac	ccg	act	ttc	atg	gcg	ccc	ccg	gca	cgg	gac	tga					999
Ile	Asp	Pro	Thr	Phe	Met	Ala	Pro	Pro	Ala	Arg	Asp						
				325					330								

5 <210> 10
 <211> 332

ES 2 437 615 T3

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 10

5

```

Met Ala Ser Asp Thr Ile Arg Ile Pro Gly Ile Asp Thr Pro Leu Ser
1                               5                               10                               15

Arg Val Ala Leu Gly Thr Trp Ala Ile Gly Gly Trp Met Trp Gly Gly
20                               25                               30

Pro Asp Asp Asp Asn Gly Val Arg Thr Ile His Ala Ala Leu Asp Glu
35                               40                               45

Gly Ile Asn Leu Ile Asp Thr Ala Pro Val Tyr Gly Phe Gly His Ser
50                               55                               60

Glu Glu Ile Val Gly Arg Ala Leu Ala Glu Lys Pro Asn Lys Ala His
65                               70                               75                               80

Val Ala Thr Lys Leu Gly Leu His Trp Val Gly Glu Asp Glu Lys Asn
85                               90                               95

Met Lys Val Phe Arg Asp Ser Arg Pro Ala Arg Ile Arg Lys Glu Val
100                              105                              110

Glu Asp Ser Leu Arg Arg Leu Arg Val Glu Thr Ile Asp Leu Glu Gln
115                              120                              125

Ile His Trp Pro Asp Asp Lys Thr Pro Ile Asp Glu Ser Ala Arg Glu
130                              135                              140

Leu Gln Lys Leu His Gln Asp Gly Lys Ile Arg Ala Leu Gly Val Ser
145                              150                              155                              160

Asn Phe Ser Pro Glu Gln Met Asp Ile Phe Arg Glu Val Ala Pro Leu
165                              170                              175

Ala Thr Ile Gln Pro Pro Leu Asn Leu Phe Glu Arg Thr Ile Glu Lys
-----180-----185-----190-----

Asp Ile Leu Pro Tyr Ala Glu Lys His Asn Ala Val Val Leu Ala Tyr
195                              200                              205

```


ES 2 437 615 T3

Gly	Ala	Leu	Cys	Arg	Gly	Leu	Leu	Thr	Gly	Lys	Met	Asn	Arg	Asp	Thr
	210					215					220				
Thr	Phe	Pro	Lys	Asp	Asp	Leu	Arg	Ser	Asn	Asp	Pro	Lys	Phe	Gln	Lys
225					230					235					240
Pro	Asn	Phe	Glu	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Lys	Leu
				245					250					255	
Ala	Glu	Lys	Arg	Gly	Lys	Ser	Val	Met	Ala	Phe	Ala	Val	Arg	Trp	Val
			260					265					270		
Leu	Asp	Gln	Gly	Pro	Val	Ile	Ala	Leu	Trp	Gly	Ala	Arg	Lys	Pro	Gly
		275					280					285			
Gln	Val	Ser	Gly	Val	Lys	Asp	Val	Phe	Gly	Trp	Ser	Leu	Thr	Asp	Glu
	290					295					300				
Glu	Lys	Lys	Ala	Val	Asp	Asp	Ile	Leu	Ala	Arg	His	Val	Pro	Asn	Pro
305					310					315					320
Ile	Asp	Pro	Thr	Phe	Met	Ala	Pro	Pro	Ala	Arg	Asp				
				325					330						

<210> 11

<211> 591

5 <212> ADN

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(588)

<400> 11

ES 2 437 615 T3

```

atg acg aaa att ctt ctc ctt aac ggc ggc aag gtc ttc gcc cat tcc      48
Met Thr Lys Ile Leu Leu Leu Asn Gly Gly Lys Val Phe Ala His Ser
1           5           10           15

cac gga cgg ctg aac gac acg ctt cag gcg ctg gcg gcg gac atc ctg      96
His Gly Arg Leu Asn Asp Thr Leu Gln Ala Leu Ala Ala Asp Ile Leu
           20           25           30

ttc aag aac ggc cat gag atc cgc cag acg aag atc gat gac ggc tat     144
Phe Lys Asn Gly His Glu Ile Arg Gln Thr Lys Ile Asp Asp Gly Tyr
           35           40           45

gac gtg gaa cag gaa gtc gaa agc ttc atc tgg gcc gat ctg atc atc     192
Asp Val Glu Gln Glu Val Glu Ser Phe Ile Trp Ala Asp Leu Ile Ile
50           55           60

tat cag tgc ccg ggc tgg tgg atg ggg ctg ccc tgg atc gtc aag aaa     240
Tyr Gln Cys Pro Gly Trp Trp Met Gly Leu Pro Trp Ile Val Lys Lys
65           70           75           80

tac atc gac gaa gtc atg acg gcc ggt cac ggc aag ctc tat gcc aat     288
Tyr Ile Asp Glu Val Met Thr Ala Gly His Gly Lys Leu Tyr Ala Asn
           85           90           95

gac ggc cgc agc cgg gcc cat ccg gag cgc aaa tat ggc tcg ggc ggt     336
Asp Gly Arg Ser Arg Ala His Pro Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Gly Gly
           100          105          110

ctg gcg cag ggt aag cgc tat atg ctg tca acg acc tgg aat gcg ccg     384
Leu Ala Gln Gly Lys Arg Tyr Met Leu Ser Thr Thr Trp Asn Ala Pro
           115          120          125

gca gag gct ttc acg gac ccg gcc cag ttc ttt gaa ggg cgg ggt atc     432
Ala Glu Ala Phe Thr Asp Pro Ala Gln Phe Phe Glu Gly Arg Gly Ile
           130          135          140

gac ggg gtg tat ttc ccg ttc cac aag gcc cac gag ttc ctg ggc atg     480
Asp Gly Val Tyr Phe Pro Phe His Lys Ala His Glu Phe Leu Gly Met
           145          150          155          160

tcc gcg ctc ccg acc ttc ctt gcg acg gac gtg ata aag gcg ccg aat     528
Ser Ala Leu Pro Thr Phe Leu Ala Thr Asp Val Ile Lys Ala Pro Asn
           165          170          175

gtg gag gca aca ctc gca gcc tac cgc cag cat ctg cag gac gtc atc     576
Val Glu Ala Thr Leu Ala Ala Tyr Arg Gln His Leu Gln Asp Val Ile
           180          185          190

ggt acg gcg tcc tga
Gly Thr Ala Ser
           195

```

<210> 12

5 <211> 196

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 12

ES 2 437 615 T3

Met Thr Lys Ile Leu Leu Leu Asn Gly Gly Lys Val Phe Ala His Ser
 1 5 10 15

His Gly Arg Leu Asn Asp Thr Leu Gln Ala Leu Ala Ala Asp Ile Leu
 20 25 30

Phe Lys Asn Gly His Glu Ile Arg Gln Thr Lys Ile Asp Asp Gly Tyr
 35 40 45

Asp Val Glu Gln Glu Val Glu Ser Phe Ile Trp Ala Asp Leu Ile Ile
 50 55 60

Tyr Gln Cys Pro Gly Trp Trp Met Gly Leu Pro Trp Ile Val Lys Lys
 65 70 75 80

Tyr Ile Asp Glu Val Met Thr Ala Gly His Gly Lys Leu Tyr Ala Asn
 85 90 95

Asp Gly Arg Ser Arg Ala His Pro Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Gly Gly
 100 105 110

Leu Ala Gln Gly Lys Arg Tyr Met Leu Ser Thr Thr Trp Asn Ala Pro
 115 120 125

Ala Glu Ala Phe Thr Asp Pro Ala Gln Phe Phe Glu Gly Arg Gly Ile
 130 135 140

Asp Gly Val Tyr Phe Pro Phe His Lys Ala His Glu Phe Leu Gly Met
 145 150 155 160

Ser Ala Leu Pro Thr Phe Leu Ala Thr Asp Val Ile Lys Ala Pro Asn
 165 170 175

Val Glu Ala Thr Leu Ala Ala Tyr Arg Gln His Leu Gln Asp Val Ile
 180 185 190

Gly Thr Ala Ser
 195

<210> 13

5 <211> 1074

<212> ADN

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

10 <221> CDS

<222> (1) .. (1074)

<400> 13

ES 2 437 615 T3

atg acc agc ctg ttt gag ccg att gaa ctg gga agc att tac gcc aaa		48
Met Thr Ser Leu Phe Glu Pro Ile Glu Leu Gly Ser Ile Tyr Ala Lys		
1 5 10 15		
aac aga att ctc atg gcg ccg ctg aca cgc ggt cgg ggc acc cgt gat		96
Asn Arg Ile Leu Met Ala Pro Leu Thr Arg Gly Arg Gly Thr Arg Asp		
20 25 30		
cat gtg ccc acc ccc atc atg gcc gaa tat tac gcg caa cgg gcc gga		144
His Val Pro Thr Pro Ile Met Ala Glu Tyr Tyr Ala Gln Arg Ala Gly		
35 40 45		
gcc ggt ctg atc atc tca gaa gcg acc ggg atc agc cgc gaa ggt ctt		192
Ala Gly Leu Ile Ile Ser Glu Ala Thr Gly Ile Ser Arg Glu Gly Leu		
50 55 60		
ggc tgg ccg tat gcg ccg gcc ctg tgg tcg cag gaa cag gtg gaa gcc		240
Gly Trp Pro Tyr Ala Pro Gly Leu Trp Ser Gln Glu Gln Val Glu Ala		
65 70 75 80		
tgg aag ccc atc acc gcc gca gtt cac gcc aag gcc gga aag att gtg		288
Trp Lys Pro Ile Thr Ala Ala Val His Ala Lys Gly Gly Lys Ile Val		

ES 2 437 615 T3

	85	90	95	
	gcc cag ctc tgg cat atg ggt cgg atg gtt cat tcc agc gtg acg ggc Ala Gln Leu Trp His Met Gly Arg Met Val His Ser Ser Val Thr Gly 100 105 110			336
	cag caa cct gtg tcc tgc tcg gcg aca aaa gcg cct gaa gcc ctc cat Gln Gln Pro Val Ser Cys Ser Ala Thr Lys Ala Pro Glu Ala Leu His 115 120 125			384
	acg tac gat ggc aag cag gct ccc gaa gtc gcc cgc cct ctc acc aag Thr Tyr Asp Gly Lys Gln Ala Pro Glu Val Ala Arg Pro Leu Thr Lys 130 135 140			432
	gag gac att gcc cgc atc ctg aac gac tac gaa aat gct gct cgc aat Glu Asp Ile Ala Arg Ile Leu Asn Asp Tyr Glu Asn Ala Ala Arg Asn 145 150 155 160			480
	gcc ctt cag gca ggc ttt gac ggt gtg cag att cat gcc gcc aac ggt Ala Leu Gln Ala Gly Phe Asp Gly Val Gln Ile His Ala Ala Asn Gly 165 170 175			528
	tat ctg atc gac gaa ttt ctg cgg gac ggc acc aat cat cgt tcc gac Tyr Leu Ile Asp Glu Phe Leu Arg Asp Gly Thr Asn His Arg Ser Asp 180 185 190			576
	gaa tat ggc ggt tcg ccg gaa aac cgc atc cgc ttc ctg cgt gaa gtc Glu Tyr Gly Gly Ser Pro Glu Asn Arg Ile Arg Phe Leu Arg Glu Val 195 200 205			624
	acc gaa cgc gtg atc gca acg att ggc gcg cac aaa acg tca gta agg Thr Glu Arg Val Ile Ala Thr Ile Gly Ala His Lys Thr Ser Val Arg 210 215 220			672
	ctg tcc ccc aat ggc gat acg gtg ggc tgc atc gac agt cat cca gag Leu Ser Pro Asn Gly Asp Thr Val Gly Cys Ile Asp Ser His Pro Glu 225 230 235 240			720
	cag gtt ttt gtg ccg gcc gca aag ctg ctg aat gac ctc gat atc gct Gln Val Phe Val Pro Ala Ala Lys Leu Leu Asn Asp Leu Asp Ile Ala 245 250 255			768
	ttc ctt gaa ctg cgc gag ccc gga ccg aac ggc acg ttc ggc aag acc Phe Leu Glu Leu Arg Glu Pro Gly Pro Asn Gly Thr Phe Gly Lys Thr 260 265 270			816
	gac cag ccc aag ctg cat ggt ccg atc cgc gaa gtc ttc agg aag ccg Asp Gln Pro Lys Leu His Gly Pro Ile Arg Glu Val Phe Arg Lys Pro 275 280 285			864
	ctg gtt ctg aat cag gac tac aca ccg gaa gaa gcg atc gag aca gtc Leu Val Leu Asn Gln Asp Tyr Thr Arg Glu Glu Ala Ile Glu Thr Val 290 295 300			912
	gct acc ggt gtt gcg gac gcc att tcg ttt ggt ccg cct ttc ctc gcc Ala Thr Gly Val Ala Asp Ala Ile Ser Phe Gly Arg Pro Phe Leu Ala 305 310 315 320			960
	aat ccg gac ctc gtg cgt cgt ctg gaa gac aat ctg ccc cag aac aag Asn Pro Asp Leu Val Arg Arg Leu Glu Asp Asn Leu Pro Gln Asn Lys 325 330 335			1008
	gac gat atc cgc acc tgg tac tcg cag ggt gca gaa ggc tat acg gat Asp Asp Ile Arg Thr Trp Tyr Ser Gln Gly Ala Glu Gly Tyr Thr Asp 340 345 350			1056
	tat ccg ctt gct cgc tga Tyr Pro Leu Ala Arg 355			1074

ES 2 437 615 T3

<211> 357

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

5 <400> 14

Met Thr Ser Leu Phe Glu Pro Ile Glu Leu Gly Ser Ile Tyr Ala Lys
1 5 10 15

Asn Arg Ile Leu Met Ala Pro Leu Thr Arg Gly Arg Gly Thr Arg Asp
20 25 30

His Val Pro Thr Pro Ile Met Ala Glu Tyr Tyr Ala Gln Arg Ala Gly
35 40 45

Ala Gly Leu Ile Ile Ser Glu Ala Thr Gly Ile Ser Arg Glu Gly Leu
50 55 60

Gly Trp Pro Tyr Ala Pro Gly Leu Trp Ser Gln Glu Gln Val Glu Ala
65 70 75 80

Trp Lys Pro Ile Thr Ala Ala Val His Ala Lys Gly Gly Lys Ile Val
85 90 95

Ala Gln Leu Trp His Met Gly Arg Met Val His Ser Ser Val Thr Gly
100 105 110

Gln Gln Pro Val Ser Cys Ser Ala Thr Lys Ala Pro Glu Ala Leu His
115 120 125

Thr Tyr Asp Gly Lys Gln Ala Pro Glu Val Ala Arg Pro Leu Thr Lys
130 135 140

Glu Asp Ile Ala Arg Ile Leu Asn Asp Tyr Glu Asn Ala Ala Arg Asn
145 150 155 160

Ala Leu Gln Ala Gly Phe Asp Gly Val Gln Ile His Ala Ala Asn Gly
165 170 175

Tyr Leu Ile Asp Glu Phe Leu Arg Asp Gly Thr Asn His Arg Ser Asp
180 185 190

ES 2 437 615 T3

```

Glu Tyr Gly Gly Ser Pro Glu Asn Arg Ile Arg Phe Leu Arg Glu Val
      195                               200                       205

Thr Glu Arg Val Ile Ala Thr Ile Gly Ala His Lys Thr Ser Val Arg
  210                               215                       220

Leu Ser Pro Asn Gly Asp Thr Val Gly Cys Ile Asp Ser His Pro Glu
  225                               230                       235                       240

Gln Val Phe Val Pro Ala Ala Lys Leu Leu Asn Asp Leu Asp Ile Ala
      245                               250                       255

Phe Leu Glu Leu Arg Glu Pro Gly Pro Asn Gly Thr Phe Gly Lys Thr
      260                               265                       270

Asp Gln Pro Lys Leu His Gly Pro Ile Arg Glu Val Phe Arg Lys Pro
      275                               280                       285

Leu Val Leu Asn Gln Asp Tyr Thr Arg Glu Glu Ala Ile Glu Thr Val
  290                               295                       300

Ala Thr Gly Val Ala Asp Ala Ile Ser Phe Gly Arg Pro Phe Leu Ala
  305                               310                       315                       320

Asn Pro Asp Leu Val Arg Arg Leu Glu Asp Asn Leu Pro Gln Asn Lys
      325                               330                       335

Asp Asp Ile Arg Thr Trp Tyr Ser Gln Gly Ala Glu Gly Tyr Thr Asp
      340                               345                       350

Tyr Pro Leu Ala Arg
      355

```

<210> 15

<211> 1392

5 <212> ADN

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<221> CDS

10 <222> (1) .. (1389)

<400> 15

ES 2 437 615 T3

atg gct tac gct acg atc aac cct tat acc ggt gag acg ctc aag acc	48
Met Ala Tyr Ala Thr Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Glu Thr Leu Lys Thr	
1-----5-----10-----15	
ttc ccg gaa gca acc gac cag gaa gtc cag acc gcg ctg acc gaa gcc	96
Phe Pro Glu Ala Thr Asp Gln Glu Val Gln Thr Ala Leu Thr Glu Ala	
20-----25-----30	
tat gat gcg ttc aag agc tgg cgt cat acg ccg ttc gcc gag cgc gca	144
Tyr Asp Ala Phe Lys Ser Trp Arg His Thr Pro Phe Ala Glu Arg Ala	
35-----40-----45	
aag atc atg acg gca gcg gcg aac att ctt cgc cgt gat atc gac aag	192
Lys Ile Met Thr Ala Ala Ala Asn Ile Leu Arg Arg Asp Ile Asp Lys	
50-----55-----60	
tat tcc aag ctt ctg acg ctc gag atg ggc aag atc tat gcc gaa gcc	240
Tyr Ser Lys Leu Leu Thr Leu Glu Met Gly Lys Ile Tyr Ala Glu Ala	
65-----70-----75-----80	
aag gca gag acg atc ctg tcc gcc gag atc ttc gaa tat tat gcc aag	288
Lys Ala Glu Thr Ile Leu Ser Ala Glu Ile Phe Glu Tyr Tyr Ala Lys	
85-----90-----95	
aac gcc gaa gaa ctg ctg aaa gcc gag aag ctg ccg gtt gcg gat ccg	336
Asn Ala Glu Glu Leu Leu Lys Ala Glu Lys Leu Pro Val Ala Asp Pro	
100-----105-----110	
aag gaa ggc gag gcc gtc ctg atc cac cag ccg cag ggc att gtg ttc	384
Lys Glu Gly Glu Ala Val Leu Ile His Gln Pro Gln Gly Ile Val Phe	
115-----120-----125	
gcg atc gag ccg tgg aac ttc ccg ttc tac cag atc gcc cgc atc atc	432
Ala Ile Glu Pro Trp Asn Phe Pro Phe Tyr Gln Ile Ala Arg Ile Ile	
130-----135-----140	
gcg ccg cag ctc tcc gcc ggt aac acg gtc att ctc aag cac gcc tcc	480
Ala Pro Gln Leu Ser Ala Gly Asn Thr Val Ile Leu Lys His Ala Ser	
145-----150-----155-----160	
aac gtg ccg cag tgt gct gct gcg ttc gat gac ctg atg aag gaa gcc	528
Asn Val Pro Gln Cys Ala Ala Phe Asp Asp Leu Met Lys Glu Ala	
165-----170-----175	
ggt ctg ccg aag ggt gga ttc cgc aac ctg tat gct gcc cgt cat cac	576
Gly Leu Pro Lys Gly Phe Arg Asn Leu Tyr Ala Ala Arg His His	
180-----185-----190	
acc gag acg atc ctc aag gac ccg cgc gtc tgt ggc gtg gcc ctg acg	624
Thr Glu Thr Ile Leu Lys Asp Pro Arg Val Cys Gly Val Ala Leu Thr	
195-----200-----205	
ggt tcc gaa ggt gct ggc gct gtt gtg gcc ggg att gcg gca cag gcg	672
Gly Ser Glu Gly Ala Gly Ala Val Val Ala Gly Ile Ala Ala Gln Ala	
210-----215-----220	
ctg aag aag tcc acg atg gag ctc ggg ggt tcc gat gcg ttc ctc gtt	720
Leu Lys Lys Ser Thr Met Glu Leu Gly Gly Ser Asp Ala Phe Leu Val	
225-----230-----235-----240	
ctg gac gat gcg gat ctg gaa aag acc gcg aag tgg gct gct ttc ggc	768
Leu Asp Asp Ala Asp Leu Glu Lys Thr Ala Lys Trp Ala Ala Phe Gly	
245-----250-----255	
cgt cac tgg aat gcc ggt cag gtc tgc gtg tcc gca aag cgt ctg atc	816
Arg His Trp Asn Ala Gly Gln Val Cys Val Ser Ala Lys Arg Leu Ile	
260-----265-----270	
gtg gcg gat gcc gtg tat gat cgc ttc gtc gag ctg tac aag gcc gaa	864
Val Ala Asp Ala Val Tyr Asp Arg Phe Val Glu Leu Tyr Lys Ala Glu	
275-----280-----285	

ES 2 437 615 T3

gct gcc aag ctg atc ccg ggt gat ccg atg gac ccg aag acc acg ctg 912
 Val Ala Lys Leu Ile Pro Gly Asp Pro Met Asp Pro Lys Thr Thr Leu
 290 295 300

gct ccg ctg tcc tcg cag aag gct gct gat gat ctg aag gct cag gtc 960
 Ala Pro Leu Ser Ser Gln Lys Ala Ala Asp Asp Leu Lys Ala Gln Val
 305 310 315 320

gag gaa gcc aag aag cac ggt gcc gtc gtc gag gcc att ggt ccg tcc 1008
 Glu Glu Ala Lys Lys His Gly Ala Val Val Glu Ala Ile Gly Pro Ser
 325 330 335

gta ccg gag aag ggt gcc ttc ttc cag ccg ctg ctg atg acc aac ctg 1056
 Val Pro Glu Lys Gly Ala Phe Phe Gln Pro Leu Leu Met Thr Asn Leu
 340 345 350

cac gag aac aat gaa gcc cgt ctg tgg gag ttc ttt ggt ccg gtg acg 1104
 His Glu Asn Asn Glu Ala Arg Leu Trp Glu Phe Phe Gly Pro Val Thr
 355 360 365

cag ctt tat cgt gcc aag gac gat gcg gat gcc atc cgt atc gcc aat 1152
 Gln Leu Tyr Arg Ala Lys Asp Asp Ala Asp Ala Ile Arg Ile Ala Asn
 370 375 380

gac tcg ccg ttc ggt ctg ggt ggt tcg gtc ttc acg aag gac acc cag 1200
 Asp Ser Pro Phe Gly Leu Gly Gly Ser Val Phe Thr Lys Asp Thr Gln
 385 390 395 400

cgt ggc gtg aag gtt gcc gag cag atc tat acg ggc atg gtc tat atc 1248
 Arg Gly Val Lys Val Ala Glu Gln Ile Tyr Thr Gly Met Val Tyr Ile
 405 410 415

aac cat ccg acg atg gtg aag gct gat ctg ccg ttc ggt ggc gtg gcc 1296
 Asn His Pro Thr Met Val Lys Ala Asp Leu Pro Phe Gly Gly Val Ala
 420 425 430

cgt tcg ggt tat ggc cgt gag ctg atc ggt ctg ggt atc aag gaa ttc 1344
 Arg Ser Gly Tyr Gly Arg Glu Leu Ile Gly Leu Gly Ile Lys Glu Phe
 435 440 445

gtc aat cac aag ctg atc gac gtt gtt gat atc gac gcg ccg ttc tga 1392
 Val Asn His Lys Leu Ile Asp Val Val Asp Ile Asp Ala Pro Phe
 450 455 460

<210> 16

<211> 463

5 <212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 16

Met Ala Tyr Ala Thr Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Glu Thr Leu Lys Thr
 1 5 10 15

-- Phe Pro Glu Ala Thr Asp Gln Glu Val Gln Thr Ala Leu Thr Glu Ala
 20 25 30

Tyr Asp Ala Phe Lys Ser Trp Arg His Thr Pro Phe Ala Glu Arg Ala
 35 40 45

10

ES 2 437 615 T3

Lys Ile Met Thr Ala Ala Ala Asn Ile Leu Arg Arg Asp Ile Asp Lys
 50 55 60

Tyr Ser Lys Leu Leu Thr Leu Glu Met Gly Lys Ile Tyr Ala Glu Ala
 65 70 75 80

Lys Ala Glu Thr Ile Leu Ser Ala Glu Ile Phe Glu Tyr Tyr Ala Lys
 85 90 95

Asn Ala Glu Glu Leu Leu Lys Ala Glu Lys Leu Pro Val Ala Asp Pro
 100 105 110

Lys Glu Gly Glu Ala Val Leu Ile His Gln Pro Gln Gly Ile Val Phe
 115 120 125

Ala Ile Glu Pro Trp Asn Phe Pro Phe Tyr Gln Ile Ala Arg Ile Ile
 130 135 140

Ala Pro Gln Leu Ser Ala Gly Asn Thr Val Ile Leu Lys His Ala Ser
 145 150 155 160

Asn Val Pro Gln Cys Ala Ala Ala Phe Asp Asp Leu Met Lys Glu Ala
 165 170 175

Gly Leu Pro Lys Gly Gly Phe Arg Asn Leu Tyr Ala Ala Arg His His
 180 185 190

Thr Glu Thr Ile Leu Lys Asp Pro Arg Val Cys Gly Val Ala Leu Thr
 195 200 205

Gly Ser Glu Gly Ala Gly Ala Val Val Ala Gly Ile Ala Ala Gln Ala
 210 215 220

Leu Lys Lys Ser Thr Met Glu Leu Gly Gly Ser Asp Ala Phe Leu Val
 225 230 235 240

Leu Asp Asp Ala Asp Leu Glu Lys Thr Ala Lys Trp Ala Ala Phe Gly
 245 250 255

Arg His Trp Asn Ala Gly Gln Val Cys Val Ser Ala Lys Arg Leu Ile
 260 265 270

Val Ala Asp Ala Val Tyr Asp Arg Phe Val Glu Leu Tyr Lys Ala Glu
 275 280 285

Val Ala Lys Leu Ile Pro Gly Asp Pro Met Asp Pro Lys Thr Thr Leu

ES 2 437 615 T3

290 295 300

Ala Pro Leu Ser Ser Gln Lys Ala Ala Asp Asp Leu Lys Ala Gln Val
 305 310 315 320

Glu Glu Ala Lys Lys His Gly Ala Val Val Glu Ala Ile Gly Pro Ser
 325 330 335

Val Pro Glu Lys Gly Ala Phe Phe Gln Pro Leu Leu Met Thr Asn Leu
 340 345 350

His Glu Asn Asn Glu Ala Arg Leu Trp Glu Phe Phe Gly Pro Val Thr
 355 360 365

Gln Leu Tyr Arg Ala Lys Asp Asp Ala Asp Ala Ile Arg Ile Ala Asn
 370 375 380

Asp Ser Pro Phe Gly Leu Gly Gly Ser Val Phe Thr Lys Asp Thr Gln
 385 390 395 400

Arg Gly Val Lys Val Ala Glu Gln Ile Tyr Thr Gly Met Val Tyr Ile
 405 410 415

Asn His Pro Thr Met Val Lys Ala Asp Leu Pro Phe Gly Gly Val Ala
 420 425 430

Arg Ser Gly Tyr Gly Arg Glu Leu Ile Gly Leu Gly Ile Lys Glu Phe
 435 440 445

Val Asn His Lys Leu Ile Asp Val Val Asp Ile Asp Ala Pro Phe
 450 455 460

<210> 17

<211> 40

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

10

<400> 17

atggtagaag acaagcgccg ctgatacaat gctcgccgcc 40

15 <210> 18

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> cebador

<400> 18

atggtagaag acaatatcag gaccggaagt cgagcactgt 40

10

<210> 19

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> cebador

<400> 19

20

atggtaggtc tcagcgcccc aaccctgttc gatcccattg 40

<210> 20

<211> 37

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

30

<400> 20

atggtaggtc tcatatcagt tggggccgga ggtggcg 37

35 <210> 21

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

5

<400> 21

atggtaggtc tcagcgctc gtcacaggtt ccatccgcc 39

10 <210> 22

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> cebador

<400> 22

20 atggtaggtc tcatatcaga atttcgccgt attcggatca g 41

<210> 23

<211> 38

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

30 <400> 23

atggtaggtc tcaaatgctg aacctogatc tgagcggc 38

<210> 24

35 <211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 437 615 T3

<220>

<223> cebador

5 <400> 24

atggtaggtc tcagcgctga tggatcgac ggtgccgcc 39

<210> 25

10 <211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 25

atggtaggtc tcagcgccgc atccgacacc atccgcatc 39

20

<210> 26

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> cebador

<400> 26

30

atggtaggtc tcatatcagt cccgtgccgg gggcgc 36

<210> 27

<211> 42

35 <212> ADN

<213> Artificial

ES 2 437 615 T3

<220>

<223> cebador

<400> 27

5

atggtaggtc tcagcgccac gaaaattctt ctcctaacg gc 42

<210> 28

<211> 39

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 28

atggtaggtc tcatacagg acgccgtacc gatgacgctc 39

20 <210> 29

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> cebador

<400> 29

30 atggtaggtc tcagcgccac cagcctgttt gagccgattg 40

<210> 30

<211> 40

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

ES 2 437 615 T3

<223> cebador

<400> 30

5 atggtaggtc tcatatcagc gagcaagcgg ataatccgta 40

<210> 31

<211> 41

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

15 <400> 31

atggtaggtc tcagcgccgc ttacgctacg atcaaccctt a 41

<210> 32

20 <211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> cebador

<400> 32

atggtaggtc tcatatcaga acggcgcgtc gatatcaaca 40

30

<210> 33

<211> 3239

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> vector pASK-IBA5

ES 2 437 615 T3

<400> 33

ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt 60
tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaaat gaatagtctg acaaaaatct 120
agataacgag ggcaaaaaat ggctagctgg agccaccgc agttcgaaa aggcgcgag 180
accgcggtcc cgaattcgag ctcggtacc ggggatccct cgaggtcgac ctgcagggg 240
accatggtct ctgatatcta actaagcttg acctgtgaag tgaaaaatgg cgcacattgt 300
gcgacatttt ttttgtctgc cgtttaccgc tactgctca cggatctoca cgcgccctgt 360
agcggcgcac taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc 420
agcgcctag cgcgcgctcc tttcgctttc ttcccttccct ttctcggccac gttcgcggc 480
tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag tgctttacgg 540
cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga 600
tagacggttt ttcgcccttt gacgttgag tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc 660
caaaactgaa caaactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg 720
ccgatttcg cctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt 780
aacaaaatat taacgcttac aatttcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc 840
cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatagtatc cgctcatgag acaataacc 900
tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaag aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc 960
gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttcctggtt ttgctcacc agaaacgctg 1020
gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat 1080
ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc 1140
acttttaaag ttctgctatg tggcgcggtt ttatccgta ttgacgccgg gcaagagcaa 1200
ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa 1260
aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aacctagat 1320
gataaacctg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct 1380
tttttgaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttggaacc ggagctgaat 1440
gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg 1500
cgcaactat taactggcga actacttact cttagcttccc ggcaacaatt gatagactgg 1560
atggaggcgg ataaagtgtc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggtt 1620
attgctgata aatctggagc cggtagcgt ggtctcgcg gtatcattgc agcactggg 1680
ccagatggtg agccctccc tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg 1740
gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaggaa 1800
ttaatgatgt ctctgttaga taaaagtaaa gtgattaaca gcgcattaga gctgcttaat 1860
gaggctcgaa tcgaaggttt aacaaccgt aaactcggcc agaagctagg tgtagagcag 1920
cctacattgt attggcatgt aaaaaataag cgggctttgc tcgacgcctt agccattgag 1980
atgtagata ggcaccatac tcacttttgc cttttagaag gggaaagctg gcaagatttt 2040
ttacgtaata acgctaaaag ttttagatgt gctttactaa gtcacgcga tggagcaaaa 2100
gtacatttag gtacacggcc tacagaaaa cagtatgaaa ctctcgaaaa tcaattagcc 2160

ES 2 437 615 T3

tttttatgcc aacaaggttt ttcactagag aatgcattat atgcactcag cgcagtgggg 2220
 cattttactt taggttgcgt attggaagat caagagcatc aagtcgctaa agaagaaagg 2280
 gaaacaccta ctactgatag tatgccgcca ttattacgac aagctatcga attatattgat 2340
 caccaaggtg cagagccagc cttcttattc ggcttgaat tgatcatatg cggattagaa 2400
 aaacaactta aatgtgaaag tgggtcttaa aagcagcata acctttttcc gtgatggtaa 2460
 cttcactagt ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaatac 2520
 ccttaacgtg agttttcggt cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 2580
 tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 2640
 ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc 2700
 ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac 2760
 ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctogctctgc taatcctggt accagtggct 2820
 gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat 2880
 aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 2940
 acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa 3000
 gggagaaagg cggacaggta tccggttaagc ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg 3060
 gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga 3120
 cttgagcgtc gatttttggt atgctcgtca gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc 3180
 aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gacccgaca 3239

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción enzimática regio y enantioselectiva de compuestos α -hidroxicarbonilo que comprende hacer reaccionar un compuesto α -cetocarbonilo con una α -cetocarbonilreductasa derivada de *Gluconobacter oxydans*, en el que la α -cetocarbonilreductasa
 - 5 (i) tiene un peso molecular aparente de 20 a 52 kDa y una actividad para reducir selectivamente el resto α -ceto en α -cetoaldehídos y/o α -cetoésteres y/o el resto ceto de una dicetona próxima potadora de la cadena alquilo más corta de la molécula; y
 - 10 (ii) comprende la secuencia de aminoácidos de Gox0313 (SEC ID N°:2), Gox0502 (SEC ID N°:4), Gox0644 (SEC ID N°:6), Gox0646 (SEC ID N°:8) Gox1615 (SEC ID N°:10), Gox2107 (SEC ID N°:12), Gox2684 (SEC ID N°:14), o un mutante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con las reductasas nativas de SEC ID N1:2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 y que tiene la actividad enzimática de la respectiva reductasa nativa de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la reacción se realiza en un ambiente sin células, en el que la α -cetocarbonilreductasa está presente como enzima libre o está presente como lisado celular o como enzima inmovilizada, o la reacción se realiza en presencia de transformantes que producen la α -cetocarbonil reductasa *in-situ*.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto α -cetocarbonilo se selecciona de α -dicetonas, α -cetoácidos, α -cetoésteres, α -cetoaldehídos y compuestos vinílicos/fenílicos de los mismos.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la reacción se realiza en presencia de un cofactor reductor en una cantidad equimolar o catalítica.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en la que el cofactor reductor es NADH o NADPH.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cantidad de α -cetocarbonil reductasa en la mezcla de reacción respecto al compuesto α -cetocarbonilo está en el intervalo de 1 mM a 1 M.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la reacción se realiza en modo discontinuo o en modo continuo.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que
 - 30 (i) la α -cetocarbonil reductasa es Gox0313 (SEC ID N°: 2) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N° 2 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N° 2 y el compuesto cetocarbonilo a reducir es una α -dicetona o un α -cetoaldehído; o
 - 35 (ii) la α -cetocarbonil reductasa es Gox0502 (SEC ID N° 4) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 4 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 4 y el compuesto cetocarbonilo a reducir es una α -dicetona o un α -cetoaldehído; o
 - 40 (iii) la α -cetocarbonil reductasa es Gox0644 (SEC ID N°: 6) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 6 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 6 y el compuesto cetocarbonilo a reducir es una α -dicetona, un α -cetoéster o un α -cetoaldehído; o
 - 45 (iv) la α -cetocarbonil reductasa es Gox0646 (SEC ID N° 8) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 8 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 8 y el compuesto cetocarbonilo a reducir es una α -dicetona o un α -cetoaldehído; o
 - 50 (v) la α -cetocarbonil reductasa es Gox1615 (SEC ID N°: 10) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 10 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 10 y el compuesto cetocarbonilo a reducir es una α -dicetona, un α -cetoéster o un α -cetoaldehído; o
 - (vi) la α -cetocarbonil reductasa es Gox2107 (SEC ID N°: 12) o un mutante de la misma que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 12 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°: 12 y el compuesto cetocarbonilo a reducir es un α -cetoaldehído; o
 - (vii) la α -cetocarbonil reductasa es Gox2684 (SEC ID N°: 14) o un mutante de la misma que tiene al

menos un 80% de identidad de secuencia con las reductasas nativas de SEC ID N°: 14 y que tiene la actividad enzimática de la reductasa nativa de SEC ID N°:14 y el compuesto cetocarbonilo a reducir es una α -dicetona o un α -cetoaldehído o una quinona.

- 5 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el cofactor NADPH reductor se aplica en cantidades catalíticas y se regenera con aldehído y una aldehído deshidrogenasa.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el aldehído es acetaldehído.
11. El procedimiento de la reivindicación 9 o 10, en el que la aldehído deshidrogenasa es una aldehído deshidrogenasa derivada de *Gluconobacter oxydans*.
- 10 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la aldehído deshidrogenasa derivada de *Gluconobacter oxydans* es Gox1122 (SEC ID N°: 16), o un fragmento de la misma que tiene la actividad de la aldehído deshidrogenasa Gox1122, o un mutante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con la aldehído deshidrogenasa nativa de SEC ID N°: 16 y que tiene la actividad de la aldehído deshidrogenasa Gox1122.

Fig.1A

Cebadores	
GOX0644_5f	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCCTCGTCACAGTTCCATCCGCC-3'
GOX0644_5r	5'-ATGGTAGGTCTCATATCAGAATTTGCGCGTATTTCGGATCAG-3'

Sitio de corte Bsal:
 5'-GGTCTC(N1)-3'
 3'-CCAGAG(N5)-5'

ORF Gox0644 (directo) – unión pASK5
 RBS INICIO LIGADOR Marca Strep
 5'-GAGGGCAAAAA ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA Ggc
 3'-CTCCCGTTTTT TAC CGA TCG ACC TCG GTG GGC GTC AAG CTT TTT Ccg
sitio de corte Bsal

INSERTO DEL CEBADOR INSERTO 0644
 gcc TCG TCA CAG GTT CCA TCC GCC....TAT GTC GAG ACG TGG AAG GCA-3'
 cgg AGCAGT GTC CAA GGT AGG CGG...ATA CAG CTC TGC ACC TTC CAT-5'

ORF Gox0644 (inverso) - unión pASK5 :
sitio de corte Bsal
 5'...CTT AAA GCG GCATAAGCG GCATga taT CTA ACT AAG.....-3'
 3'...GAA TTT CGC CGT ATT CGC CGT ACT ATA GAT TGA TTC.....-5'
INSERTO 0644 INSERTO DEL CEBADOR

Fig.1B

Cebadores	
GOX0313_5f	5'-ATGGTAGAAGACAAGCGCCGCTGATACAATGCTCGCCGCC-3'
GOX0313_5r	5'-ATGGTAGAAGACAATATCAGGACCGGAAGTCGAGCACTGT-3'

Sitio de corte BbsI
 5'-GAAGAC(N2)
 3'-CTTCTG(N6)

ORF Gox0313 (directo) – unión pASK5 :
 RBS INICIO LIGADOR Marca Strep
 5'-GAGGGCAAAAA ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA Ggc
 3'-CTCCCGTTTTT TAC CGA TCG ACC TCG GTG GGC GTC AAG CTT TTT Ccg
sitio de corte BbsI

INSERTO DEL CEBADOR INSERTO 0313
 gcc GCT GAT ACA ATG CTC GCC.....CTCGGC CAG ATG GCC GTG CAG-3'
 cgg CGA CTA TGT TAC GAG CGGGAGCCG GTC TAC CGG CAG GTC-5'

ORF Gox0313 (Inv.) – unión pASK5
sitio de corte BbsI
 5'-CAC GAG CTG AAG GCCAGG Tga taT CTA ACT AAG.....-3'
 3'-GTG CTC GAC TTC CGG TCC ACT ATA GAT TGA TTC.....-5'
INSERTO 0313 INSERTO DEL CEBADOR

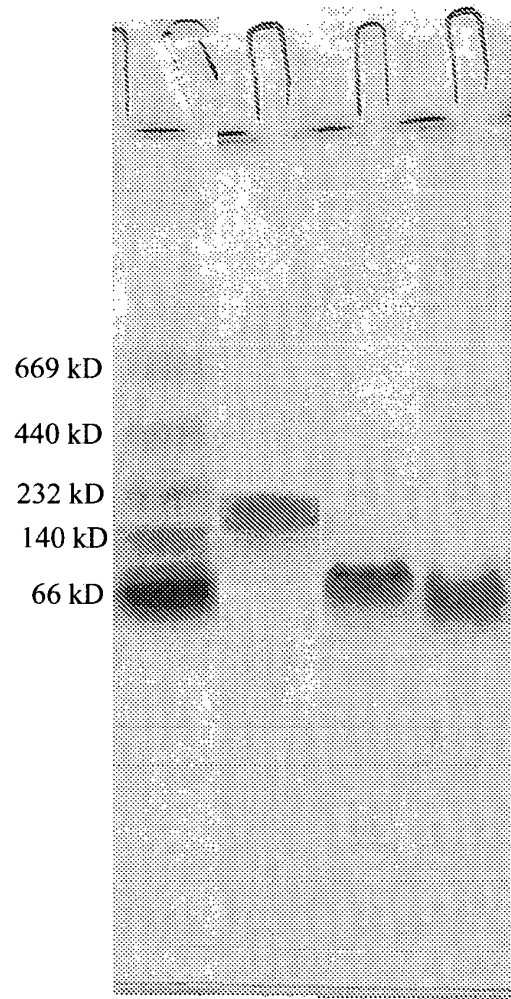


Fig.2A

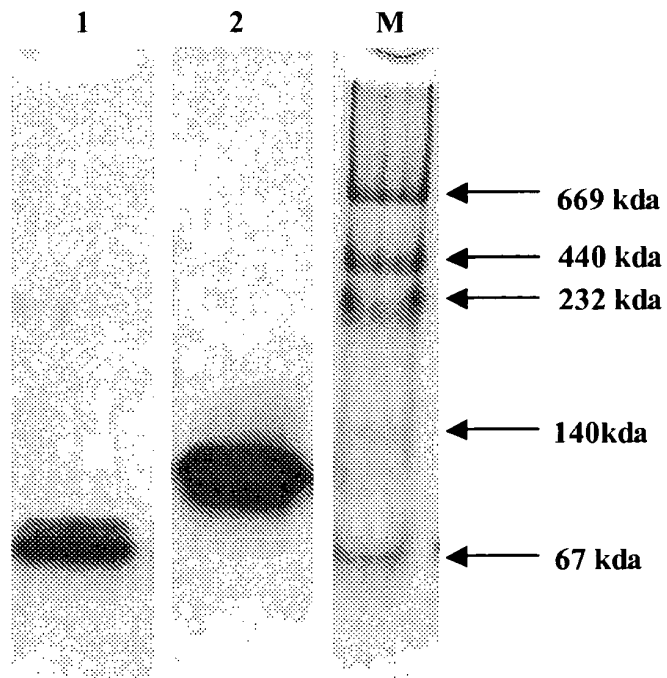


Fig.2B

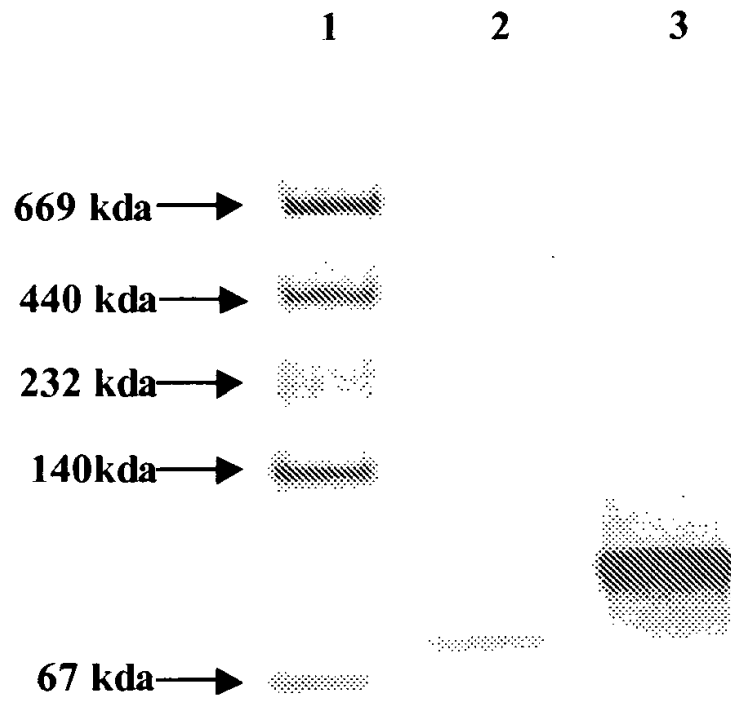


Fig.2C

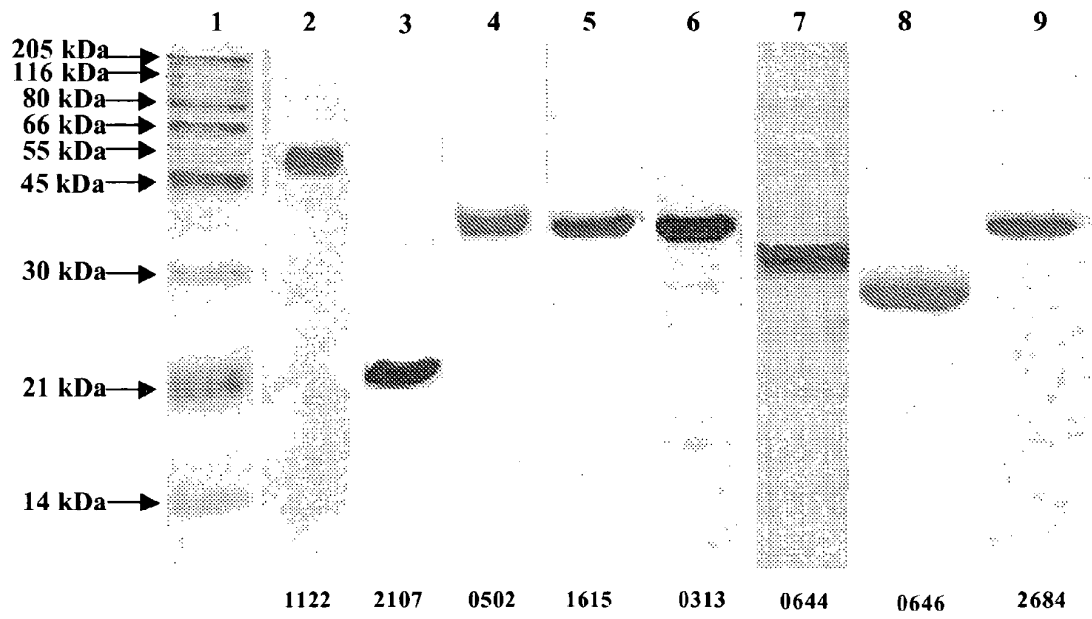


Fig.3