



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 015**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/02** (2006.01)  
**C12P 7/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04000120 .8**  
96 Fecha de presentación : **07.01.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1437401**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Oxidorreductasa.**

30 Prioridad: **09.01.2003 DE 103 00 335**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.05.2011**

73 Titular/es: **IEP GmbH**  
**Rheingaustrasse 190-196**  
**65203 Wiesbaden, DE**

72 Inventor/es: **Bobkova, Maria;**  
**Gupta, Antje y**  
**Zimmer, Anke**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 358 015 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

## Oxidorreductasa

- 5 La presente invención se refiere a una oxidorreductasa, a una secuencia de ADN aislada de la oxidorreductasa, a una proteína de fusión basada en la oxidorreductasa y a un procedimiento para la obtención enantioselectiva de ésteres de S-2-hidroxiácido.
- Los 2-hidroxiácidos y sus ésteres representan unidades estructurales básicas de síntesis quirales importantes a partir de los cuales pueden obtenerse una serie de compuestos obteniendo la quiralidad en el átomo C2, por ejemplo
- 10 epóxidos, ésteres alquílicos, ésteres hidracinílicos, alfa-N-alcoxi-aminoésteres o alfa-aminoésteres.
- Hasta la fecha numerosos trabajos de investigación se han dedicado al desarrollo de métodos para preparar 2-hidroxiácidos enantioméricamente puros y sus ésteres, habiéndose considerado diferentes planteamientos químicos y biocatalíticos. Hasta la fecha aún no se ha logrado desarrollar procedimientos que satisfagan los requisitos de producción a nivel industrial. Especialmente en la producción de 2-hidroxiácidos y sus ésteres parece
- 15 ser superior la introducción catalizada por enzimas del centro quiral de la síntesis mediante catalizadores químicos.
- En el caso de los procedimientos catalizados por enzimas existen momentáneamente tres procedimientos diferentes. Una manera es la síntesis catalizada por oxinitrilasa de cianohidrinas quirales y su posterior hidrólisis, a menudo también catalizada por enzimas (Biotransformations in Organic Chemistry, A Textbook. 4ª edición, Springer (2000), K. Faber; Cyanhydrininformation). El inconveniente de este procedimiento es el uso del HCN tóxico.
- 20 Un procedimiento adicional es la resolución de racematos de ésteres de 2-hidroxiácido con ayuda de lipasas, por ejemplo de *Pseudomonas fluorescens* (J. Org. Chem. 55, 812-815 (1991), Kinetic Resolution of 2-substituted Esters catalysed by a Lipase Ex. *Pseudomonas fluorescens*, Kalaritis, P. et al.). El inconveniente de este método es el rendimiento teórico de tan sólo el 50%.
- Un procedimiento adicional es la síntesis de 2-hidroxiácidos quirales y sus ésteres mediante la reducción de
- 25 2-oxoácidos proquirales o sus ésteres. Se conocen las transformaciones con células de levadura completas o células de *Proteus vulgaris* o *Proteus mirabilis* o procedimientos con enzimas aisladas. En el caso de las transformaciones con células de levadura completas se atribuyó la actividad enzimática reductora en los 2-oxoácidos a las enzimas lactato deshidrogenasa o malato deshidrogenasa (Ramesh N. Patel Stereoselective Biocatalyse, NY (2000), 14. Stereoselective Synthesis of Chiral Compounds Using Whole-Cell Biocatalysis, Paola D'Arrigo, Giuseppe Pedrocchi-Fantoni y Stefano Servi), mientras que en las reducciones realizadas con *Proteus* se cree que es responsable de la reacción una proteína hierro-azufre dependiente de molibdeno de membrana (Eur J Biochem (1994); 222(3):1025-32, The (2R)-hydroxycarboxylate-viologen-oxidoreductase from *Proteus vulgaris* is a molybdenum-containing iron-sulphur protein, Trautwein T, Krauss F, Lottspeich F, Simon H.).
- 30 En procedimientos conocidos para la reducción de ésteres de 2-oxoácido se utilizan las enzimas aisladas (D/L)-lactato deshidrogenasa (documento US 5.686.275), (D/L)-dihidroxiisocaproato deshidrogenasa (documento US 6.033.882) o D-mandelato deshidrogenasa (Appl Environ Microbiol 2002 Feb; 68(2):947-51, Two forms of NAD-dependent D-mandelate dehydrogenase in *Enterococcus faecalis* IAM 10071. Tamura Y. et al 10), que también pueden clonarse, sobreexpresarse y obtenerse comercialmente. Estas enzimas son dependientes de NADH y no transforman los ésteres de 2-oxoácido. Además se conoce que las enzimas que reducen los 2-oxoácidos o sus
- 40 ésteres, no transforman alcoholes secundarios.
- Además se conocen procedimientos, en los que la coenzima NAD se regenera con formiato deshidrogenasa, por ejemplo a partir de *Candida boidinii* o también de manera recombinante a partir de *Pseudomonas fluorescens* (Biotechnology, Biotransformations I (Rehm y Reed) 9. Alcohol Dehydrogenases-Characteristics, Design of Reaction Conditions J. Peters, WILEY-VCH-Verlag, (1998)). A modo de ejemplo se menciona en este caso el procedimiento
- 45 para la producción enzimática de ácido R-2-hidroxi-4-fenilbutírico con ayuda de D-lactato deshidrogenasa de *Staphylococcus epidermidis* (Industrial Biotransformations, Liese, K. Seelbach, C.Wandrey, WILEY-VCH-Verlag, (2000)). El inconveniente de la regeneración de coenzima con formiato deshidrogenasa es la reducida actividad específica de la formiato deshidrogenasa (de 4 a 10 U/mg) y los elevados costes para la producción de la enzima. Por esto, desde el punto de vista económico, es necesario usar la enzima varias veces, lo que da como resultado un control del proceso en comparación esencialmente más complicado y por consiguiente más caro.
- 50 El objetivo de la invención es remediar mediante una oxidorreductasa los inconvenientes mencionados de los procedimientos del estado de la técnica.
- Este objetivo se soluciona según la invención mediante una oxidorreductasa, que reduce ésteres de 2-oxoácido en presencia de NADPH y agua para dar los correspondientes ésteres de S-2-hidroxiácido, y caracterizada porque
- 55 presenta más de un 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 y una actividad específica de más de 1 µmol por mg, con respecto a la transformación de 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo en S-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo.
- La invención se refiere entre otras cosas a oxidorreductasas, que pueden obtenerse por ejemplo a partir de *Lactobacillus* (*L.*) *reuteri*, *L. kefirii*, *L. kandleri*, *L. parabuchneri*, *L. cellobiosus* o *L. fermentum*.
- 60 La invención se refiere además a la oxidorreductasa de *Lactobacillus reuteri*, que presenta la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 18, tal como se describe en el protocolo de secuencias adjunto.
- Se prefieren oxidorreductasas que presentan del 80% al 99,5%, especialmente del 90% al 99,5%, de manera especialmente preferible del 99% al 99,5% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. La

medición de la actividad específica de la oxidoreductasa según la SEQ ID NO: 18 o sus derivados o análogos tiene lugar con el sistema de prueba descrito en el ejemplo 2.

La invención se refiere además a una oxidoreductasa, caracterizada porque presenta de 1 a 50 aminoácidos más o de 1 a 50 aminoácidos menos que la oxidoreductasa con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18. Se prefieren oxidoreductasas en las que hay de 1 a 25 aminoácidos, especialmente de 2 a 20 aminoácidos, preferiblemente de 3 a 10 aminoácidos más o menos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

La invención se refiere además a una oxidoreductasa que se caracteriza porque presenta la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y está modificada una, dos, tres, cuatro o cinco veces por un polímero soluble en agua. Un ejemplo de un polímero soluble en agua es polietilenglicol. La unión del polietilenglicol tiene lugar preferiblemente en el extremo N-terminal de la oxidoreductasa según la SEQ ID NO: 18. La oxidoreductasa según la SEQ ID NO: 18 también puede estar unida a un cuerpo sólido tal como polietileno, poliestireno, polisacárido, celulosa o derivado de celulosa.

La invención se refiere además a una proteína de fusión que se caracteriza porque representa la oxidoreductasa con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18, y porque la oxidoreductasa está unida con un polipéptido adicional en el extremo N-terminal o carboxiterminal con un enlace peptídico. Las proteínas de fusión pueden separarse por ejemplo más fácilmente de otras proteínas o se expresan en las células en mayores cantidades.

La invención se refiere además a un anticuerpo, que se une específicamente a la oxidoreductasa según la SEQ ID NO: 18. La producción de estos anticuerpos tiene lugar según métodos conocidos mediante inmunización de mamíferos adecuados tales como el caballo, el ratón, la rata o el cerdo, y la obtención posterior de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales.

La invención se refiere también a una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica para la oxidoreductasa según la SEQ ID NO: 18.

La invención se refiere además a una secuencia de ácido desoxirribonucleico aislada (secuencia de ADN) de la oxidoreductasa, que cataliza la reducción de ésteres de 2-oxoácido en presencia de NADPH y agua para dar los correspondientes ésteres de S-2-hidroxiácido, seleccionándose la secuencia de ADN del grupo que consiste en

- a) SEQ ID NO: 19 o su hebra complementaria,
- b) una secuencia de ADN, que se hibrida con la secuencia de ADN según a) o su hebra complementaria, teniendo lugar la hibridación en condiciones rigurosas, y
- c) una secuencia de ADN, que debido a la degeneración del código genético codifica para una proteína, que se codifica mediante una o varias de las secuencias de ADN según a) o b).

La hibridación se describe por ejemplo por Sambrook y Russel en *Molecular Cloning a laboratory Manual*, tomo 1, capítulo 1, protocolo 30-32.

La invención se refiere además a una secuencia de ADN aislada que se caracteriza porque presenta más de un 70% de identidad con la secuencia de ADN SEQ ID NO: 19 o su hebra complementaria y codifica para una proteína, que presenta una actividad específica de más de 1  $\mu\text{mol}$  por mg, con respecto a la transformación de 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo en S-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo. Se prefieren secuencias de ADN que presentan del 80% al 99,5%, especialmente del 90% al 99,5%, preferiblemente del 99% al 99,5% de identidad con la secuencia de ADN SEQ ID NO: 19.

La invención se refiere además a un vector de clonación, que contiene una o varias de las secuencias de ADN o de ácido nucleico mencionadas anteriormente. La invención se refiere además a un vector de expresión, que se encuentra en una célula bacteriana, de levadura, de insecto, vegetal o de mamífero y contiene una o varias de las secuencias de ADN o de ácido nucleico mencionadas anteriormente, y está unido de manera adecuada con una secuencia de control de expresión.

La invención se refiere además a una célula huésped, que es una célula bacteriana, de levadura, de insecto, vegetal o de mamífero y transformada o transfectada con uno de los vectores de expresión mencionados anteriormente.

Las identidades de las secuencias de ADN o la secuencia de aminoácidos mencionadas anteriormente se calculan sumando el número de los aminoácidos o bases de ácido nucleico que son idénticos con secuencias parciales de las respectivas proteínas o secuencias de ADN, dividido entre el número total de los aminoácidos o bases de ácido nucleico y multiplicado por cien.

Vectores de clonación adecuados son por ejemplo ppCR-Script, pCMV-Script, pBluescript (Stratagene), el vector de clonación pDrive (Qiagen), pS Blue, pET Blue, los vectores pET LIC (Novagen) así como los vectores de clonación TA-PCR (Invitrogen).

Vectores de expresión adecuados son por ejemplo pKK223-3, pTrc99a, pUC, pTZ, pSK, pBluescript, pGEM, pQE, pET, PHUB, pPLc, pKC30, pRM1/pRM9, pTrxFus, pAS1, pGEX, pMAL, pTrx).

Secuencias de control de expresión adecuadas son por ejemplo promotor trp-lac (tac), promotor trp-lac (trc), promotor lac, promotor T7, promotor  $\lambda$ pL.

La oxidoreductasa de *Lactobacillus reuteri* es un homodímero con un peso molecular determinado en gel de SDS de desde 30 hasta 35 kDa y con un peso molecular determinado con cromatografía de permeación en gel de desde 60 hasta 65 kDa. El óptimo de temperatura se encuentra en el intervalo de desde 55 °C hasta 60 °C y tiene un óptimo de pH de desde 6,5 hasta 7,0. La oxidoreductasa de *Lactobacillus reuteri* presenta una buena estabilidad frente a la temperatura y al pH y es estable en el intervalo de pH de desde 4,5 hasta 8,5 y en el intervalo de temperatura de desde 15 °C hasta 50 °C durante al menos 5 horas y muestra además una estabilidad elevada en disolventes orgánicos.

La enzima puede aislarse especialmente a partir de microorganismos del género *Lactobacillus* y puede detectarse en una prueba espectrofotométrica a través de la disminución de NADPH a 340 nm en presencia de un sustrato correspondiente, por ejemplo ácido etil-2-oxo-4-fenilbutírico o ácido etil-2-oxovaleriánico.

La oxidorreductasa según la invención de *Lactobacillus reuteri* se clonó y pudo sobreexpresarse en *Escherichia (E.) coli* con actividades de desde 10.000 U/g hasta 30.000 U/g de peso húmedo de *E. coli*. La enzima es por consiguiente barata y está disponible en grandes cantidades. En las bases de datos no se encontró ninguna secuencia relacionada, sólo pudo suponerse una relación lejana con enzimas del grupo de las hidroxiacil-CoA deshidrogenasas.

En el caso de un procedimiento para la obtención de la oxidorreductasa a partir de *Lactobacillus reuteri*, se expresa el ADN, que codifica para la oxidorreductasa de *Lactobacillus reuteri*, en un microorganismo procarionta o eucariota adecuado. Preferiblemente se transforma y expresa la oxidorreductasa de *Lactobacillus reuteri* en una cepa de *Escherichia coli*, especialmente en células de *Escherichia coli* BL21 star (DE3) (Invitrogen, n.º de catálogo C6010-03, derivada de *E. coli* BL21, con una copia cromosómica del gen de ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor lacUV5, sin ompT y Lon-proteasa, BI21 star tiene una mutación en RNaseE (rne131).

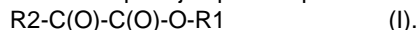
La oxidorreductasa de *Lactobacillus reuteri* puede obtenerse por ejemplo, cultivando células recombinantes de *Escherichia coli*, induciendo la expresión de la oxidorreductasa y abriéndose posteriormente tras aproximadamente de 10 a 18 horas (h) las células mediante tratamiento por ultrasonidos o mediante molienda en húmedo con perlas de vidrio en un molino de bolas (Retsch, 10 min., 24 Hz). El extracto celular obtenido o bien puede usarse directamente o bien puede purificarse adicionalmente. Para ello el extracto celular por ejemplo se centrifuga y el sobrenadante obtenido se somete a una cromatografía de interacción hidrófoba, por ejemplo una cromatografía de interacción hidrófoba en Butylsepharose Fast Flow (Pharmacia) y una permeación en gel posterior (Superdex 200 HR, Pharmacia).

La invención se refiere además a un procedimiento para la obtención enantioselectiva de éster de S-2-hidroxiácido, que se caracteriza porque se reduce un éster de 2-oxoácido en presencia de oxidorreductasa, NADPH y agua para dar el correspondiente éster de S-2-hidroxiácido y se aísla el éster de S-2-hidroxiácido formado.

El procedimiento según la invención presenta una vida útil elevada, una pureza enantiomérica de más del 94% de los ésteres de S-2-hidroxiácido quirales producidos y un rendimiento elevado con respecto a la cantidad utilizada del éster de 2-oxoácido.

Por el término "NADPH" se entiende nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido. Por el término "NADP" se entiende nicotinamida adenin dinucleótido fosfato.

Por el término "éster de 2-oxoácido" se entienden por ejemplo compuestos de fórmula I



R1 representa

1. -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquilo es lineal o ramificado,
2. -alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquenilo es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos, tres o cuatro dobles enlaces,
3. -alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquinilo es lineal o ramificado y dado el caso contiene uno, dos, tres o cuatro triples enlaces,
4. -arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
5. -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
6. -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>), que está no sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro, o
7. -cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>),

R2 representa

1. -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquilo es lineal o ramificado,
2. -alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquenilo es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos, tres o cuatro dobles enlaces,
3. -alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquinilo es lineal o ramificado y dado el caso contiene uno, dos, tres o cuatro triples enlaces,
4. -arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
5. -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
6. -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>), que está no sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro, o
7. -cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>),

estando los restos mencionados anteriormente en 1. a 7. no sustituidos o de mono a trisustituidos independientemente entre sí con

- a) -OH,
- b) halógeno, tal como flúor, cloro, bromo o yodo,
- c) -NO<sub>2</sub>,
- d) -C(O)-O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquilo es lineal o ramificado y está no sustituido o de mono a trisustituidos con halógeno, hidroxilo, amino o nitro, o
- e) -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>), que está no sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro.

Por el término “ésteres de S-2-hidroxiácido” deben entenderse compuestos de fórmula II



estando el grupo -OH en configuración S con respecto al átomo de carbono, al que está unido y R1 y R2 tienen el mismo significado que en la fórmula I.

5 Por el término arilo se entienden restos de carbono aromáticos con de 6 a 14 átomos de carbono en el anillo. Restos -arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) son por ejemplo fenilo, naftilo, por ejemplo 1-naftilo, 2-naftilo, bifenililo, por ejemplo 2-bifenililo, 3-bifenililo y 4-bifenililo, antrilo o fluorenilo. Los restos bifenililo, restos naftilo y especialmente restos fenilo son restos arilo preferidos. Por el término “halógeno” se entiende un elemento de la serie flúor, cloro, bromo o yodo. Por el término “-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)” se entiende un resto de hidrocarburo, cuya cadena carbonada es lineal o ramificada y  
10 contiene de 1 a 20 átomos de carbono por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonenilo o decanilo.

Por el término “-cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)” se entienden restos de hidrocarburo cíclicos tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

15 El término “-heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>)” representa un anillo heterocíclico de 5 a 14 miembros monocíclico o bicíclico, que está parcialmente saturado o completamente saturado. Ejemplos de heteroátomos son N, O y S. Ejemplos de los términos -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>) son restos, que se derivan de pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, tetrazol, 1,2,3,5-oxatiadiazol-2-óxido, triazolona, oxadiazolona, isoxazolona, oxadiazolidindiona, triazoles, que están sustituidos con F, -CN, -CF<sub>3</sub> o -C(O)-O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), 3-hidroxi-pirrol-2,4-diona, 5-oxo-1,2,4-tiadiazoles, piridina, pirazina, pirimidina, indol, isoindol, indazol, ftalazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinazolona, cinolina, carbolina y derivados benzocondensados, ciclopenta, ciclohexa o cicloheptacondensados de  
20 estos heterociclos. Se prefieren especialmente los restos 2- o 3-pirrolilo, fenilpirrolilo tal como 4- o 5-fenil-2-pirrolilo, 2-furilo, 2-tienilo, 4-imidazolilo, metilimidazolilo, por ejemplo 1-metil-2-, -4- o -5-imidazolilo, 1,3-tiazol-2-ilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-, 3- o 4-piridil-N-óxido, 2-pirazinilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo, 2-, 3- o 5-indolilo, 2-indolilo sustituido, por ejemplo 1-metil-, 5-metil-, 5-metoxi-, 5-benciloxi-, 5-cloro- o 4,5-dimetil-2-indolilo, 1-bencil-2- o -3-indolilo, 4,5,6,7-tetrahidro-2-indolilo, ciclohepta[b]-5-pirrolilo, 2-, 3- o 4-quinolilo, 1-, 3- o 4-isoquinolilo, 1-oxo-1,2-dihidro-3-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 2-benzofuranilo, 2-benzotienilo, 2-benzoxazolilo o benzotiazolilo o dihidropiridinilo, pirrolidinilo, por ejemplo 2- o 3-(N-metilpirrolidinilo), piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidrotienilo o benzodioxolanilo.

30 Compuestos preferidos de fórmula I son por ejemplo 2-oxovalerato de etilo, 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo, piruvato de etilo, fenilgloxilato de etilo, ácido etil-2-oxo-3-fenilpropiónico, 8-cloro-6-oxooctanoato de etilo, 2-oxobutirato de etilo, 2-oxohexanoato de etilo, fenilgloxilato de metilo, 2-oxovalerato de metilo, piruvato de metilo, 2-oxo-4-fenilbutirato de metilo, ácido metil-2-oxo-3-fenilpropiónico, 8-cloro-6-oxooctanoato de metilo, 2-oxobutirato de metilo o 2-oxohexanoato de metilo.

35 Los ésteres de S-2-hidroxiácido formados de manera correspondiente son por ejemplo S-2-hidroxi-valerato de etilo, S-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo, L-lactato de etilo o S-mandelato de etilo.

Oxidorreductasas adecuadas proceden por ejemplo de *Lactobacillus reuteri*. La oxidorreductasa puede utilizarse en el procedimiento según la invención o bien completamente purificada o bien parcialmente purificada o usarse contenida en células. Las células utilizadas pueden estar presentes a este respecto de manera nativa, permeabilizadas o lisadas. Preferiblemente se utiliza la oxidorreductasa clonada según la SEQ ID NO: 18.

40 La actividad volumétrica de la oxidorreductasa utilizada asciende a desde 250 Unidades/ml (U/ml) hasta 20000 U/ml, de manera preferible aproximadamente 4000 U/ml. Por cada kg de compuesto de fórmula I que ha de transformarse se utilizan de 5000 a 250000 U de oxidorreductasa, de manera preferible aproximadamente de 10000 U a 50000 U. La unidad enzimática 1 U corresponde a este respecto a la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de 2-oxo-fenilbutirato de etilo en S-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo por cada minuto (min.).

45 La invención se refiere además a un procedimiento para la obtención enantioselectiva de éster de S-2-hidroxiácido, que se caracteriza porque

- a) se reduce un éster de 2-oxoácido en presencia de oxidorreductasa, NADPH y agua para dar el correspondiente éster de S-2-hidroxiácido,
- b) se reduce el NADP formado mediante la oxidorreductasa con una deshidrogenasa y un cosustrato simultáneamente para dar NADPH, y
- c) se aísla el éster de S-2-hidroxiácido quiral formado.

50 Deshidrogenasas adecuadas son por ejemplo alcohol deshidrogenasas de *Thermoanaerobium brockii*, *Lactobacillus kefir* o *Lactobacillus brevis*, necesitando estas enzimas NADPH como coenzima (documentos DE 19 610 984, EP 0 456 107, WO 97/32012).

55 Cosustratos adecuados para la alcohol deshidrogenasa utilizada son alcoholes tales como etanol, 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol o 2-octanol.

Además la reducción de NADP puede realizarse también con las enzimas conocidas usadas para la regeneración de NADPH, por ejemplo con glucosa deshidrogenasa o formiato deshidrogenasa dependiente de NADPH (Tishkov *et al.*, J. Biotechnol. Bioeng. [1999] 64, 187-193, Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific formate dehydrogenase).

60 El cosustrato adecuado al procedimiento según la invención es, en caso de usar glucosa deshidrogenasa, glucosa. Cosustratos adecuados de la formiato deshidrogenasa son por ejemplo sales del ácido fórmico tales como formiato de amonio, formiato de sodio o formiato de calcio.

Preferiblemente se utiliza la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus minor* (documento DE 101 19274). La alcohol deshidrogenasa puede utilizarse en el procedimiento según la invención o bien completamente purificada o bien parcialmente purificada o pueden usarse células completas, que contienen la alcohol deshidrogenasa. Las células utilizadas pueden estar presentes a este respecto de manera nativa, permeabilizada o lisada. Por cada kg de compuesto de fórmula I que ha de transformarse se utilizan de 10.000 U a 200.000 U de alcohol deshidrogenasa, de manera preferible aproximadamente de 25.000 U a 100.000 U. La unidad enzimática 1 U corresponde a este respecto a la cantidad de enzima necesaria para transformar 1  $\mu\text{mol}$  del cosustrato (por ejemplo 2-propanol) por cada minuto (min.).

Al agua se le añade preferiblemente un tampón, por ejemplo tampón fosfato de potasio, tampón Tris/HCl o tampón trietanolamina con un valor de pH de desde 5 hasta 10, preferiblemente un valor de pH de desde 6 hasta 9. La concentración de tampón asciende a desde 10 mM hasta 150 mM, preferiblemente desde 90 mM hasta 110 mM, especialmente 100 mM. El tampón puede contener adicionalmente además iones para la estabilización o activación de ambas enzimas, por ejemplo iones magnesio para la estabilización de la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus minor*.

La temperatura asciende en los procedimientos según la invención por ejemplo a desde aproximadamente 10 °C hasta 60 °C, preferiblemente desde 30 °C hasta 55 °C.

Según una forma de realización preferida del procedimiento se realizan las reacciones en presencia de un disolvente orgánico.

Los disolventes orgánicos preferidos son por ejemplo dietil éter, terc-butilmetil éter, diisopropil éter, dibutil éter, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano.

La mezcla básica de reacción consiste, en el caso de utilizar disolventes adicionales, en una fase acuosa y una fase orgánica. La fase orgánica está formada por un disolvente adecuado en el que está disuelto el sustrato o por el propio sustrato insoluble en agua. La fase orgánica asciende a este respecto a desde aproximadamente el 5% hasta el 80% del volumen de reacción total, preferiblemente desde el 10% hasta el 40%.

El agua forma en el sistema de dos fases según la invención una primera fase líquida y el disolvente orgánico, forma la segunda fase líquida. Dado el caso puede estar presente además una fase líquida adicional o sólida, que se genera por ejemplo por alcohol deshidrogenasa y/o oxidorreductasa no disuelta completamente o por el compuesto de fórmula I. Sin embargo, se prefieren dos fases líquidas sin fase sólida. Las dos fases líquidas se mezclan preferiblemente de manera mecánica, para que se generen grandes superficies entre las dos fases líquidas.

La concentración del cofactor NADPH con respecto a la fase acuosa asciende a desde 0,001 mM hasta 0,1 mM, especialmente desde 0,005 mM hasta 0,02 mM.

Preferiblemente en el procedimiento según la invención se utiliza además un estabilizador adicional de la alcohol deshidrogenasa. Estabilizadores adecuados son por ejemplo glicerina, sorbitol o dimetilsulfóxido (DMSO).

Los compuestos de fórmula I se utilizan en el procedimiento según la invención en una cantidad de desde el 10% hasta el 60% con respecto al volumen total, preferiblemente desde el 15% hasta el 50%, especialmente desde el 20% hasta el 40%.

La cantidad del cosustrato para la regeneración de NADP para dar NADPH tal como isopropanol asciende a desde aproximadamente el 5% hasta el 50% con respecto al volumen total, preferiblemente desde el 10% hasta el 30%, especialmente desde el 15% hasta el 25%.

El procedimiento según la invención se realiza por ejemplo en un recipiente de reacción cerrado de vidrio o metal. Para ello se pasan los componentes individualmente al recipiente de reacción y se agitan bajo una atmósfera de por ejemplo nitrógeno o aire. Según el sustrato y el compuesto de fórmula I utilizado el tiempo de reacción asciende a desde 1 hora hasta 48 horas, especialmente desde 2 horas hasta 24 horas.

A continuación se prepara la mezcla de reacción. Para ello se separa la fase acuosa, se filtra la fase orgánica. La fase acuosa puede extraerse dado el caso una vez más y tal como la fase orgánica seguir preparándose. Después se elimina mediante evaporación dado el caso el disolvente de la fase orgánica transparente. Se obtiene así por ejemplo el producto S-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo con una pureza enantiomérica de más del 94% y que está esencialmente libre del reactivo 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo. El rendimiento global del procedimiento asciende, tras la destilación del producto, a desde el 50% hasta el 95% con respecto a la cantidad de reactivo utilizada.

La invención se explica mediante los siguientes ejemplos:

#### Ejemplo 1 Examen de oxidorreductasas para la reducción de ésteres de 2-oxoácido en cepas del género *Lactobacillus*

Para el examen se cultivaron diferentes cepas del género *Lactobacillus* en el siguiente medio (datos en cada caso en g/l): glucosa (20), extracto de levadura (5), extracto de carne (10), hidrogenocitrato de diamonio (2), acetato de sodio (5), sulfato de magnesio (0,2), sulfato de manganeso (0,05), hidrogenofosfato de dipotasio (2). Se esterilizó el medio a 121 °C y se cultivaron las cepas del género *Lactobacillus* (en lo sucesivo abreviado como L.) sin regulación del pH adicional o alimentación de oxígeno.

A continuación se resuspendieron 125 mg de células con 800  $\mu\text{l}$  de tampón de disgregación (trietanolamina (TEA) 100 mM, pH 7,0), se mezclaron con 1 g de perlas de vidrio y se disgregaron durante 10 min. a 4 °C en el molino de bolas (Retsch). El sobrenadante obtenido tras 2 minutos (min.) de centrifugación a 12000 revoluciones por minuto (rpm) se utilizó en el examen de actividad y para determinar el exceso enantiomérico. Como sustratos se utilizaron 2-oxopentanoato de etilo y 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo.

Mezcla básica para el examen de actividad:

860 µl de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH = 7,0 MgCl<sub>2</sub> 1 mM  
 20 µl de NADPH/NADH (10 mM)  
 20 µl de lisado  
 100 µl de sustrato (100 mM)

Se observó la reacción 1 min. a 340 nm.

5 Mezcla básica para la determinación del valor de ee

20 µl de lisado  
 100 µl de NADH/NADPH (50 mM)  
 60 µl de sustrato (2-oxo-4-fenilbutirato de etilo 100 mM)

Se extrajeron con cloroformo las mezclas básicas para la determinación del ee tras 24 horas (h) y se analizó por medio de CG el exceso enantiomérico.

El exceso enantiomérico se calcula tal como sigue:

10  $ee(\%) = ((R\text{-alcohol} - S\text{-alcohol}) / (R\text{-alcohol} + S\text{-alcohol})) \times 100.$

Tabla 1.

N.º DSMZ	Nombre	Actividad de 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo en U/g de células del organismo huésped			Actividad de 2-oxopentanoato de etilo en U/g de células del organismo huésped	
		NADH	NADPH	Valor ee	NADH	NADPH
20011	<i>L. casei</i>	0	0	---	0	0
20019	<i>L. curvatus</i> var. <i>Curvatus</i>	0	0	---	0	0
20184	<i>L. farciminis</i>	0	0	---	0	0
20243	<i>L. gasserii</i>	0	0	---	0	0
20249	<i>L. alimentarius</i>	0	0	---	0	0
20494	<i>L. sakei</i>	0	0	---	0	0
20555	<i>L. salivarius</i> var. <i>Salivarius</i>	0	0	---	0	0
20557	<i>L. jensenii</i>	0	0	---	0	
20074	<i>L. delbrueckii</i> var. <i>Delbrueckii</i>	0	0	---	0	0
20001	<i>L. coryniformis</i> var. <i>Caryniformis</i>	0	0	---	0	0
20190	<i>L. halotolerans</i>	0	0	---	0	0
20016	<i>L. reuteri</i>	0	12,3	94% de S	0	21,1
20003	<i>L. bif fermentans</i>	0	0	---	0	0
	<i>L. kefirii</i>	0	2,5	26% de S	0	7,7
4864	<i>L. oris</i>	0	0	---	0	0
20515	<i>L. collinoides</i>	2,6	3,4	26% de R	2,5	7,7
20014	<i>L. minor</i>	0	0	---	0	0
20593	<i>L. kandleri</i>	3,6	3,6	32% de S	4,3	12,8
5705	<i>L. parabuchneri</i>	0	5,1	38% de S	0	11,3
20349	<i>L. fructosus</i>	0	0	---	0	0
20055	<i>L. cellobiosus</i>	0	12,3	92% de S	0	13,3
20015	<i>L. reuteri</i>	0	12	96,6% de S	0	26
20049	<i>L. fermentum</i>	0	7,7	82% de S	0	6,8
20052	<i>L. fermentum</i>	0	0	---	0	0

15 DSMZ representa la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig.

A partir de la tabla 1 se deduce que en el género *Lactobacillus* varias especies presentan una oxidoreductasa dependiente de NADPH con 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo o 2-oxopentanoato de etilo como sustrato.

Definición de las unidades enzimáticas: 1 U corresponde a la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 µmol de sustrato por min.

20 Ejemplo 2: Aislamiento de una oxidoreductasa dependiente de NADPH de *Lactobacillus reuteri*  
 Para aislar una oxidoreductasa dependiente de NADPH de *Lactobacillus reuteri* se cultivó el organismo tal como se describió en el ejemplo 1. Tras alcanzar la fase estacionaria se recogieron las células y se separaron del medio por

medio de centrifugación. La liberación de la enzima tuvo lugar mediante molienda en húmedo por medio de perlas de vidrio, pero también podría haberse conseguido con otros métodos de disgregación. Para ello se suspendieron 20 g de *L. reuteri* con 80 ml de tampón de disgregación (trietanolamina 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM pH =7,0) y tras la adición de 80 ml de perlas de vidrio tuvo lugar la disgregación celular por medio del molino de bolas (Retsch, 10 min., 24 Hz).

Se ajustó entonces el producto bruto obtenido tras la centrifugación mediante la adición de 242 mg de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una concentración final de sulfato de amonio al 50% y se agitó durante 1 h a 4 °C. A continuación se eliminó el sedimento por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min. y se siguió purificando el sobrenadante obtenido por medio de FPLC. Se purificó la enzima con cromatografía de interacción hidrófoba en Butylsepharose Fast Flow (Pharmacia) y a continuación con permeación en gel (Superdex 200 HR, Pharmacia). Para ello se aplicó el sobrenadante tras la precipitación del sulfato de amonio directamente sobre una columna de Butylsepharose FF equilibrada con TEA 100 mM pH = 7,0 y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se eluyó con un gradiente de sal lineal decreciente. A este respecto se eluyó la enzima con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0 M. Se purificaron las fracciones activas y se concentraron por medio de ultrafiltración (límite de exclusión 10 kDa) hasta un volumen adecuado. Se determina la actividad enzimática de la oxidoreductasa en el sistema de prueba según el ejemplo 1, (mezcla básica para el examen de actividad) y la determinación de la cantidad de proteína tuvo lugar según Lowry *et al.* Journal of Biological Chemistry, 193 (1951): 265-275 o Peterson *et al.*, Analytical Biochemistry, 100 (1979): 201-220). El cociente de actividad enzimática entre cantidad de proteína da como resultado la actividad específica, correspondiendo la transformación de 1 μmol por min. a 1 unidad (U).

A continuación se purificó adicionalmente la preparación de enzima bruta por medio de permeación en gel (TEA 100 mM pH = 7,0, NaCl 0,15 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM) y simultáneamente se determinó el peso molecular de la enzima nativa. Se usaron como patrones de peso molecular catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), albúmina (69,8kDa) y ovoalbúmina (49,4 kDa).

## Tabla de purificación

Tabla 2

Etapa de purificación	Volumen [ml]	Actividad [U/ml]	Actividad total [U]	Actividad específica [U/mg]	Rendimiento
Extracto bruto	20	9,3	186	0,25	100%
Precipitación de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	5,4	109	0,83	57%
Butylsepharose	1	20	20	54	10%
Permeación en gel	0,1	20	2	120	1,1%

El peso molecular determinado por medio de permeación en gel de la proteína en estado nativo asciende a 60 ± 5 kDa.

Ejemplo 3: Determinación de la secuencia N-terminal y determinación de un péptido interno tras digestión en gel

Se separó la preparación enzimática tras la permeación en gel en gel de dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS) y se pasó a una membrana de polivinilideno difluoruro (membrana de PVDF).

Se sometió la banda llamativa a aproximadamente de 30 a 35 kDa a una secuenciación N-terminal por medio de Edman-Abbau (Procise 492 (PE-Biosystems)). Se obtuvo la siguiente secuencia N-terminal:

SEQ ID NO: 1

M K N I M I A G A G V L G S Q

Se redujo la banda de SDS-PAGE de la misma proteína con ditioneitol, se sometió a carboximetilación y se digirió con endoproteinasa Lys-C. Se separaron los péptidos obtenidos a través de una columna de HPLC capilar de 300 μm x 150 mm (Vydac RP18, LC Packings). Se recogieron manualmente 25 fracciones y se comprobaron por medio de MALDI EM (Voyager-DE STR (PE-Biosystems)) para determinar la secuenciación de péptidos adecuados. Se secuenció la fracción 12 con MH<sup>+</sup> = 1491,8 por medio de Edman-Abbau automático y proporcionó la siguiente secuencia:

SEQ ID NO: 2

S D Y E R D L H L T D K

Ejemplo 4: Clonación de la enzima

4.1 Clonación de un fragmento génico específico de *L. reuteri* con ayuda de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Se extrajo el ADN cromosómico de las células de *Lactobacillus reuteri* según el método descrito en "Molecular cloning" de Manniatis y Sambrook. El ADN genómico resultante sirvió como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa directa (PCR) con cebadores degenerados. A este respecto se derivaron los cebadores en 5' degenerados de la secuencia de aminoácidos N-terminal (SEQ ID NO: 1) y los cebadores en 3' de la secuencia de



aminoácidos de un péptido interno (SEQ ID NO: 2) incluyendo el código genético universal (SEQ ID NO: 3, 4, 5 y 6). A continuación se enumeran constructos de cebadores

N = A, T, C o G; Y = T o C; R = A o G

5

Se produjeron los cebadores según procedimientos conocidos.

5'-Oligo 3:

ATGAARAAYATYATGATYGCHGGCGC

10

5'-Oligo 4:

ATGAARAAYATYATGATYGCHGGTGC

3'-Oligo 5:

RTGHARATCMCGTTCRТАATC

3'-Oligo 6:

15

RTGHARATCMCGTTCRTAGTC

Se realizó la amplificación en tampón de PCR [Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 1 mM, 30 pmol por cada cebador y 2,5 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). Tras una activación de la polimerasa AmpliTaq Gold (10 min., 94 °C) y 35 ciclos siguientes de PCR (94 °C, 60 s; 53 °C, 45 s; 72 °C, 60 s) se enfrió la reacción hasta 4°C y se aplicó toda la mezcla básica de PCR sobre un gel de agarosa al 1% para su análisis.

20

#### 4.2 Subclonación del producto de amplificación de PCR

Se ligó un fragmento específico identificado de 200 pb del gen (S)-ADH de *L. reuteri* tras la purificación en gel (kit de extracción de agarosa Qiaex) en el vector de clonación TA pCR 2.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Tras la transformación de 2 µl de la mezcla básica de ligación en células Top 10F' de *E. coli* se examinaron los ADN de las colonias generadas para determinar la presencia del plásmido pCR2.1 con fragmento de PCR de 200 pb integrado. Para ello se realizó un análisis de restricción con endonucleasa Eco RI. A continuación se secuenciaron clones positivos con los siguientes cebadores:

30

M13 rev: 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3' y

M13 uni: 5' TGTAACGACGGCCAGT 3'

con ayuda del secuenciador de ADN ABI.

El análisis de secuencias del fragmento génico de 159 pb de longitud (SEQ ID NO: 7) mostró un marco de lectura abierto de 53 aminoácidos, en el que podían encontrarse de nuevo también los dos fragmentos de secuencia del extremo N-terminal y del péptido interno.

35

#### 4.3 Clonación del segmento génico de longitud completa que codifica para (S)-ADH de *L. reuteri*

Basándose en la secuencia de nucleótidos del fragmento génico de 159 pb de longitud del ejemplo 4.2. se construyeron pares de cebadores específicos para una reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR) con la PCR anidada siguiente (SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11). A este respecto los cebadores 8 y 9 son complementarios al extremo 3' del fragmento génico hallado, y los cebadores 10 y 11 son complementarios a la región en la proximidad del extremo 5'.

45

Oligo 8:

ATCCGGCTTTAATGTCAGCGT

Oligo 9:

CGACGGATTAAGGCGCTGAAAAG

50

Oligo 10:

CTACCTAATACGCCAGCACCAG

Oligo 11:

GCCAGCACCAGCAATCAT

Se digirió el ADN cromosómico de células de *L. reuteri* con endonucleasa Eco RI y se utilizó la religación con ligasa de T4. Los fragmentos de ADN cromosómico circulares resultantes sirvieron como matriz para la iPCR. Se realizaron ciclos de amplificación posteriores de una reacción en cadena de la polimerasa en un tampón de PCR (véase el ejemplo 2), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, con en cada caso 30 pmol de los cebadores 8 y 10, 25 ng del producto de religación como molde y 2,5 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems):

60

Ciclo 1: 94 °C, 10 min.

Ciclo 2 x 30: 94 °C, 1 min.

Ciclo 3: 57 °C, 45 s  
72 °C, 1 min.  
72 °C, 7 min.  
4 °C, ∞

5 A continuación se intensificó la señal de PCR mediante una PCR anidada. La concentración de MgCl<sub>2</sub> óptima se encontraba en esta reacción a 2 mM y 2 µl de la primera iPCR como molde. Mediante una PCR de gradiente se determinó el óptimo de temperatura para el par de cebadores 9 y 11 a 57 °C. Eran necesarios ciclos de amplificación posteriores con ADN polimerasa AmpliTaq Gold, para poder detectar un producto de PCR específico de 1200 pb de longitud:

Ciclo 1: 95 °C, 10 min.  
Ciclo 2 x 40: 95 °C, 45 s  
57 °C, 1 min.  
72 °C, 90 s  
Ciclo 3: 72 °C, 7 min.  
4 °C, ∞

10 Se purificó la banda específica con una longitud de 1200 pb a través de un gel de agarosa al 1% por medio del kit de extracción de gel Qiaex (Qiagen, Hilden, Alemania) y se utilizó en una reacción de ligación con el vector de clonación TA-PCR pCR2.1 (Invitrogen).

15 Tras la transformación de 2 µl de la mezcla básica de ligación en células Top 10F' de *E. coli* se examinaron los ADN de plásmido de las colonias resistentes a ampicilina generadas para determinar la presencia del plásmido pCR2.1 con fragmento de PCR de 1200 pb integrado. Para ello se realizó un análisis de restricción con endonucleasa Eco RI. A continuación se secuenciaron clones positivos con los cebadores M13 rev y M13 uni tal como se describió en el punto 4.2.

20 El análisis de secuencias del fragmento de ADN de 1241 pb de longitud (SEQ ID NO: 12) mostró en la zona 5'-terminal un marco de lectura abierto de 148 aminoácidos. La secuencia de los primeros 15 aminoácidos N-terminales coincidía con la secuencia de aminoácidos C-terminal SEQ ID NO: 7 del punto 4.2. El análisis de la secuencia C-terminal del fragmento de ADN de 1241 pb de longitud mostró segmentos de ADN reguladores intercalados en el extremo N-terminal del gen (S)-ADH de *L. reuteri*.

25 Basándose en la secuencia del fragmento de ADN de 1241 pb de longitud, cuya zona N-terminal (447 pb) representa una sección génica adicional de la oxidoreductasa de *L. reuteri*, se construyeron cebadores específicos para una reacción en cadena de la polimerasa inversa adicional (iPCR) con PCR anidada posterior (SEQ ID NO: 13 y 14). Los cebadores 13 y 14 son complementarios a la prolongación en 3' del fragmento génico hallado.

30 Oligo 13:  
CCAGAGGTGATTGAAGAAGCTAC  
Oligo 14:  
CCGGAAATAAAGATGGTT

35 Se digirió el ADN cromosómico de células de *L. reuteri* con endonucleasa Afl III y se utilizó para la religación con ligasa de T4. Los fragmentos de ADN cromosómico circulares resultantes sirvieron como matriz para la iPCR. Se realizaron ciclos de amplificación posteriores de una reacción en cadena de la polimerasa en un tampón de PCR (véase el ejemplo 4.1), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, con en cada caso 30 pmol de los cebadores 7a/9a, 25 ng del producto de religación como molde y 2,5 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems):

Ciclo 1: 94 °C, 10 min.  
Ciclo 2 x 30: 95 °C, 1 min.  
56 °C, 45 s  
72 °C, 1:45 min.  
Ciclo 3: 72 °C, 7 min.  
4 °C, ∞

40 A continuación se intensificó la señal de PCR mediante una PCR anidada. La concentración de MgCl<sub>2</sub> óptima se encontraba en esta reacción a 2 mM y se usaron 2 µl de la primera iPCR como molde para la PCR anidada. Eran necesarios ciclos de amplificación posteriores con ADN polimerasa AmpliTaq Gold, para poder detectar un producto de PCR específico de 950 pb de longitud:

Ciclo 1: 94 °C, 10 min.  
Ciclo 2 x 40: 94 °C, 45 s  
56 °C, 1 min.

Ciclo 3: 72 °C, 1:45 min.  
72 °C, 7 min.  
4 °C, ∞

Se purificó una banda específica con una longitud de 950 pb a través de un gel de agarosa al 1% por medio del kit de extracción de gel Qiaex (Qiagen) y se utilizó en una reacción de ligación con el vector de clonación TA-PCR pCR2.1 (Invitrogen).

5 Tras la transformación de 2 µl de la mezcla básica de ligación en células Top 10F' de *E. coli* se examinaron los ADN de plásmido de las colonias resistentes a ampicilina generadas para determinar la presencia del plásmido pCR2.1 con fragmento de PCR de 950 pb integrado. Para ello se realizó un análisis de restricción con endonucleasa Eco RI. A continuación se secuenciaron clones positivos con los cebadores M13 rev y M13 uni tal como se describió en el punto 4.2.

10 El fragmento de ADN insertado en el vector pCR2.1 era de 822 pb de longitud y tenía en el extremo N-terminal un marco de lectura abierto de 126 aminoácidos, que finalizaba con el codón de terminación y un lazo de terminación (SEQ ID NO: 15). El péptido en 5' de 12 aminoácidos coincidía con el extremo C-terminal de la secuencia SEQ ID NO: 12. Por consiguiente el fragmento de ADN generado mediante iPCR de 822 pb obtuvo el extremo C-terminal del segmento génico que codifica para una oxidoreductasa de *L. reuteri*.

15 4.4 Síntesis del gen completo de una oxidoreductasa de *L. reuteri* por medio de PCR  
Basándose en las secuencias SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 15 se construyeron cebadores específicos para una clonación posterior del gen de longitud completa en un sistema de expresión adecuado. A este respecto se modificó el cebador en 5' con una secuencia de reconocimiento para Nde I y el cebador en 3' con una secuencia de reconocimiento para Hind III (SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17)

Oligo 16:  
GCGGAATTCCATATGAAGAATATCATGATTGCT  
Oligo 17:  
25 CCCAAGCTTAATGCTTCAGAAAATCTGG

30 El ADN genómico de las células de *L. reuteri* sirvió como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa. Se amplificó en un tampón de PCR [Tris-HCl 10 mM, (pH 8,0); KCl 50 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM; mezcla de dNTP 1 mM; en cada caso 30 pmol de cebador y 2,5 U de ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen)] con 300 ng de molde y con los siguientes ciclos de temperatura:

Ciclo 1: 94 °C, 2 min.  
Ciclo 2 x 30: 94 °C, 15 s  
58 °C, 30 s  
68 °C, 75 s  
Ciclo 3: 68 °C, 7 min.  
4 °C, ∞

35 Se digirió el producto de PCR resultante tras la purificación a través de un gel de agarosa al 1% con Nde I y Hind III y se ligó en la estructura principal tratada con las mismas endonucleasas del vector pET21a (Novogene, Madison, EE.UU.). Tras la transformación de 2 µl de la mezcla básica de ligación en células Top 10 F' de *E. coli* se comprobaron los ADN de plásmido de las colonias resistentes a ampicilina por medio de un análisis de restricción con endonucleasas Nde I y Hind III para determinar la exactitud de la ligación realizada. Se secuenció el constructo de expresión pET21-reut#10. El gen de oxidoreductasa de *Lactobacillus reuteri* tiene un marco de lectura abierto de en total 882 pb (SEQ ID NO: 19) lo que corresponde a una proteína de 294 aminoácidos (SEQ ID NO: 18).

40 4.5 Producción de (S)-ADH recombinante en *E. coli*  
Se transformaron células StarBL21 (De3) de *Escherichia coli* competentes (Invitrogen) con el producto de expresión que contiene el gen de la oxidoreductasa pET21-reut#10. Se cultivó la cepa en medio LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%) con ampicilina (50 µg/ml), hasta que se alcanzó una densidad óptica medida a 500 nm de 0,5. Se indujo la expresión de la oxidoreductasa mediante la adición de isopropiltiogalactósido (IPTG) en una concentración final de 1 mM. Tras 8 horas de inducción a 25°C y 220 rpm se recogieron las células y se congelaron a -20°C.

50 Para los ensayos siguientes para la caracterización bioquímica se mezclaron 100 mg de células con 600 µl de tampón de disgregación y 600 µl de perlas de vidrio y se disgregaron durante 10 min. por medio de un molino de bolas. Después se utilizó el lisado obtenido, diluido para las correspondientes mediciones. A este respecto el lisado tenía una actividad con 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo de desde 2000 hasta 4000 U/ml. Por tanto pudo expresarse la enzima con actividades de desde 10000 U/g hasta 30000 U/g de peso húmedo de *E. coli*. La enzima es por consiguiente barata y está disponible en grandes cantidades.

Ejemplo 5: Caracterización de la oxidoreductasa recombinante de *L. reuteri*

5.1 Óptimo de pH

Producción de los siguientes tampones de medición, todos 50 mM, y con MgCl<sub>2</sub> 1 mM con diferentes valores de pH

5 Tabla 3

Valor de pH	Sistema de tampones	Valor de pH	Sistema de tampones
4	Acetato de Na/ácido acético	7,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
4,5	Acetato de Na/ácido acético	8	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5	Acetato de Na/ácido acético	8,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9	Glicina/NaOH
6	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,5	Glicina/NaOH
6,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	Glicina/NaOH
7	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11	Glicina/NaOH

Dilución de la enzima según sea necesario (1:20)

Mezcla básica de medición (30 °C):

- 870 µl de tampón de medición con pH variable
- 20 µl de NADPH 10 mM (8,6 mg/ml H<sub>2</sub>O)
- 10 µl de enzima diluida
- 2-3 min. de incubación
- + 100 µl de disolución de sustrato (2-oxo-4-fenilbutirato de etilo 100 mM)

10 Para determinar el óptimo de pH se determinó la reacción enzimática en el respectivo tampón expuesto en la tabla 3. A este respecto pudo determinarse para la enzima según la invención un óptimo de pH de entre 6,5 y 7. En el intervalo de pH de desde 4,5 hasta 8 la enzima tiene un 80% de su actividad máxima, a valores de pH inferiores a 4,0 y superiores a 8,5 la actividad disminuye entonces rápidamente.

15 5.2 Estabilidad frente al pH

Se estudió la dependencia de la actividad de la enzima en caso de almacenamiento en tampones con diferentes valores de pH en el intervalo de pH de 4 a 11. Para ello se prepararon diferentes tampones (50 mM) en el intervalo de pH de 4 a 11 y se diluyó 1:200 en los mismos la enzima sobreexpresada en el ejemplo 4 y se incubó durante 30, 60 y 300 min. Todos los tampones contenían MgCl<sub>2</sub> 1 mM. A continuación se utilizaron de éstos 10 µl en la prueba de actividad normal. El valor de partida es a este respecto el valor de medición que se obtiene directamente tras la dilución de la enzima en tampón fosfato de calcio 50 mM pH = 7,0. Este valor correspondía en las condiciones predefinidas a una modificación de la extinción de 0,70 /min. y se estableció como valor del 100% y se compararon todos los valores de medición posteriores con este valor.

25 A este respecto se estableció que la oxidoreductasa recombinante de *L. reuteri* es estable en el intervalo de pH de desde 4,5 hasta 8,0 y puede incubarse durante al menos 5 h sin pérdida de actividad. En el caso de los valores de pH de 4,0 y 9,0 se estableció tras 5 h una actividad residual del 50% o del 40%. Los valores de pH superiores a 9,5 conducen a una desactivación inmediata de la enzima.

30 5.3 Óptimo de temperatura

Para determinar la temperatura de prueba óptima se midió la actividad enzimática en el intervalo de temperatura de desde 15 °C hasta 70 °C en la mezcla básica de medición convencional. Tal como puede observarse a partir de la tabla 5, la enzima tiene su actividad máxima a 55 °C, a continuación la actividad disminuye rápidamente.

Tabla 4

Temperatura (°C)	Actividad en U/ml de enzima no diluida	Temperatura (°C)	Actividad en U/ml de enzima no diluida
15	385	45	2900
20	745	50	3200
25	1090	55	3800
30	1350	60	617
35	1860	65	180
40	2500	70	90

35 5.4 Estabilidad frente a la temperatura

De manera análoga a como se describió en el punto 5.2, se determinó la estabilidad frente a la temperatura para el intervalo de desde 15 °C hasta 70 °C. Para ello se incubó en cada caso una dilución 1:200 de la enzima purificada durante 60 min. y 180 min. a la respectiva temperatura y a continuación se midió a 30 °C con la mezcla básica de

prueba anterior. También se recurrió en este caso como valor de partida al valor de medición, que se obtiene directamente tras la dilución de la enzima en tampón fosfato de calcio 50 mM pH = 7,0. También en este caso se estableció este valor como valor del 100%.

5 La enzima es a este respecto completamente estable en un intervalo de temperatura de desde 15 °C hasta 50 °C y no muestra tras 3 h de incubación ninguna pérdida de actividad. A 55 °C tan sólo tras 30 min. ya no puede detectarse ninguna actividad enzimática.

#### 5.5 Espectro de sustratos/exceso enantiomérico

10 Se determinó el espectro de sustratos de la oxidoreductasa según la invención mediante la medición de la actividad enzimática con una serie de cetonas, oxoácidos así como sus ésteres. Para ello se usó la mezcla básica de medición convencional (ejemplo 5.1) con diferentes sustratos. Se estableció la actividad con 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo como el 100% y se compararon todos los demás sustratos con la misma. La enzima no mostró ninguna actividad deshidrogenasa dependiente de NADP con respecto a (R) o (S)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo, (R) o (S)-4-cloro-3-hidroxibutirato o (D) o (L)-lactato de etilo.

15 Para la determinación del valor de ee se realizaron para los sustratos seleccionados la siguiente mezcla básica de reacción.

100 µl de NADPH (50 mM)

60 µl de sustrato (100 mM)

y de 1 a 2 unidades de oxidoreductasa.

20 Se extrajeron las mezclas básicas para la determinación del ee tras 24 h con cloroformo y se analizó por medio de CG el exceso enantiomérico del alcohol resultante.

Tabla 5.

Sustrato	Actividad relativa %	Estereoselectividad	Sustrato	Actividad relativa %	Estereoselectividad
Cetonas			Éster de 3-oxoácido		
1-Fenil-2-propanona	3	nd	4-Cloroacetoacetato de etilo	16	56% de R
2-Cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ona	0	nd	Acetoacetato de metilo	0,3	78% de S
Acetofenona	0	nd	Ácido etil-8-cloro-6-oxooctanoico	190	94% de R
Caprilofenona	0	nd	Ácido dimetil-3-oxo-1,8-octanodioico	42	Racemato al 50%
2-Octanona	1	Racemato al 50%	3-Oxovaleriato de etilo	1,3	nd
3-Octanona	4	nd			
Acetona	0	nd			
Ésteres de 2-oxoácido			2-Oxoácidos		
2-Oxovaleriato de etilo	190	nd	Ácido 2-oxovaleriánico	0	nd
2-Oxo-4-fenilbutirato de etilo	100	98% de S	Ácido 2-oxo-3-fenilpropiónico	0,5	nd
Piruvato de etilo	2	99% de S	Ácido 2-oxobutírico	0	nd
Fenilglioxilato de etilo	2				
Oxidación					
R-2-Hidroxi-4-fenilbutirato	0	nd	2-propanol	0	nd
S-2-Hidroxi-4-fenilbutirato	0	nd	D-Lactato de etilo	0	nd
S-4-Cloro-3-hidroxibutirato	0	nd	L-Lactato de etilo	0	nd
R-4-Cloro-3-	0	nd			

hidroxiacetato					
----------------	--	--	--	--	--

5 Tal como puede observarse a partir de la tabla 5 de la oxidorreductasa recombinante de *Lactobacillus reuteri* se reducen especialmente ésteres de 2-oxoácido de manera estereoselectiva para dar los correspondientes ésteres de 2-hidroxiácido. No se aceptaron como sustratos los correspondientes 2-oxoácidos, de la misma manera prácticamente no se redujeron las metilcetonas. Los ésteres de 3-oxoácido se reducen parcialmente, pero en la mayoría de los casos no de manera estereoselectiva.

5.6 Estabilidad frente a disolventes

10 Para estudiar la estabilidad enzimática en caso de contacto con disolventes orgánicos se diluyó 1:400 la oxidorreductasa de *L. reuteri* con las mezclas de disolventes indicadas (en caso de disolventes orgánicos miscibles con agua) y se incubó a temperatura ambiente. A continuación se utilizaron 10 µl de la disolución enzimática en la mezcla básica de prueba convencional. También en este caso se estableció el valor de partida tras la dilución en el tampón (tampón fosfato de potasio 100 mM, pH = 7,0, MgCl<sub>2</sub> 1 mM) como el 100% y se compararon todos los demás valores con éste. En el caso de los disolventes orgánicos no miscibles con agua, la dilución tuvo lugar igualmente en tampón fosfato de potasio, se añadió el mismo volumen de disolvente orgánico a la mezcla básica y se incubó la mezcla básica a temperatura ambiente en una termomezcladora a rpm = 170. La medición de la actividad tuvo lugar a partir de la fase acuosa.

Tabla 6.

Actividad	8 h	24 h	Actividad	8 h	24 h
Tampón fosfato de potasio 100 mM pH =7 MgCl <sub>2</sub> 1 mM	72%	70%	Acetato de etilo	0	0
Isopropanol al 5%	77%	77%	Acetato de butilo	74%	12%
Isopropanol al 10%	86%	85%	Dietil éter	32%	20%
Isopropanol al 20%	100%	100%	MTBE	90%	81%
Isopropanol al 30%	0%	0	Diisopropil éter	94%	77%
EtOH al 5%	64%	65%	Cloroformo	6%	0%
EtOH al 10%	68%	70%	Hexano	115%	100%
EtOH al 20%	83%	80%	Heptano	113%	100%
EtOH al 30%	77%	75%	Ciclohexano	113%	100%
DSMO al 10%	80%	80%			
DSMO al 20%	79%	80%			

20 Tal como puede observarse a partir de la tabla 6 la oxidorreductasa de *L. reuteri* muestra una estabilidad sorprendentemente buena con respecto a disolventes orgánicos. Además la enzima, en disolventes orgánicos miscibles con agua, así como inmiscibles con agua, incluso se estabiliza en comparación con la incubación en tampón puro.

5.7 Determinación de K<sub>m</sub> y v<sub>máx</sub> para NADPH y 2-oxopentanoato de etilo

Para determinar los valores de K<sub>m</sub> y v<sub>máx</sub> de NADPH y 2-oxopentanoato de etilo se seleccionaron las siguientes mezclas básicas:

30 A. Variación del NADPH/concentración de sustrato constante

- 970 µl de disolución de 2-oxopentanoato de etilo en tampón fosfato de potasio pH =7,0
- 20 µl de NADPH (concentraciones de 200-5 µM de concentración final)
- 10 µl de disolución enzimática (1:300)

B. Variación de la concentración de sustrato/NADPH constante

- 970 µl de disolución de 2-oxopentanoato de etilo en tampón fosfato de potasio pH =7,0 (concentraciones de desde 10 hasta 0,1 mM)
- 20 µl de NADPH (0,2 mM de concentración final)
- 10 µl de disolución enzimática (1:300)

	K <sub>m</sub>	V <sub>máx</sub>	
NADPH	0,004 ± 0,0018 mM	3080 U/ml	18500 U/g de peso húmedo de <i>E. coli</i>
2-Oxopentanoato de etilo	0,18 ± 0,07 mM	3080 U/ml	18500 U/g de peso húmedo de <i>E. coli</i>

Como disolución enzimática se utilizó el lisado obtenido a partir de 0,1 g de células de *E. coli* recombinantes (600 µl) diluido 1:300.

5.8 Transformaciones preparativas de 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo

5 A. Regeneración de coenzima con alcohol deshidrogenasa secundaria de *Thermoanaerobium brockii*

10 Para una mezcla básica preparativa se incubó una mezcla de 4 ml de tampón fosfato de potasio 100 mM, pH =7,0, 2 ml de isopropanol, 4 ml de 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo, 0,064 mg de NADP, 1000 unidades de oxidoreductasa de *L. reuteri* y 10 mg de ADH de *Thermoanaerobium brockii* (Fluka, aproximadamente 100 U con respecto a la oxidación de 2-propanol) durante 24 h a temperatura ambiente con mezclado permanente. Tras 24 h el sustrato 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo se había transformado completamente en 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo. A este respecto se formó el correspondiente S-alcohol en un 97%.

15 B. Regeneración de coenzima con alcohol deshidrogenasa secundaria (KRED 1004, Biocatalytics Inc, Pasadena)

20 Para una mezcla básica preparativa se incubó una mezcla de 4 ml de tampón fosfato de potasio 100 mM, pH =7,0, 2 ml de isopropanol, 4 ml de 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo, 0,064 mg de NADP, 1000 unidades de oxidoreductasa de *L. reuteri* y 1 mg de KRED 1004 (Biocatalytics Inc, Pasadena) durante 2 h a temperatura ambiente con mezclado permanente. Tras 2 h el sustrato 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo se había transformado completamente en 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo. A este respecto se formó el correspondiente S-alcohol en un 98%.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Juelich Enzyme Products GmbH
- <120> Oxidorreductasa de *Lactobacillus reuteri*
- 5 <130> (TH)4061
- <160> 19
- 10 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- 15 <213> *Lactobacillus reuteri*
- <400> 1
- Met Lys Asn Ile Met Ile Ala Gly Ala Gly Val Leu Gly Ser Gln  
 1 5 10 15
- 20 <210> 2
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> *Lactobacillus reuteri*
- 25 <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(12)
- <223>
- 30 <400> 2
- Ser Asp Tyr Glu Arg Asp Leu His Leu Thr Asp Lys  
 1 5 10
- <210> 3
- <211> 26
- 35 <212> ADN
- <213> artificial
- <400> 3
- atgaaraaya tyatgatygc hggcgc** . . . . . 26
- 40 <210> 4
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> artificial
- 45 <400> 4
- atgaaraaya tyatgatygc hggcgc** 26
- <210> 5
- 50 <211> 21
- <212> ADN
- <213> artificial
- <400> 5
- 55 **rtgharatcm cgttcrtaat c** 21



	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<400> 6	
	<b>rtgharatcm cgttcrtagt c</b>	<b>21</b>
	<210> 7	
10	<211> 159	
	<212> ADN	
	<213> <i>Lactobacillus reuteri</i>	
	<400> 7	
	<b>atgaagaata tcatgattgc tggtgctggc gtattagta gtcagattgc atatcaaacg</b>	<b>60</b>
	<b>gctttatccg gctttaatgt cagcgtatat aatcaccata tgataccgc tgagcgacgg</b>	<b>120</b>
	<b>attaaggcgc tgaaaagtga ttacgaacgt gattacat</b>	<b>159</b>
15		
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> artificial	
	<400> 8	
	<b>atccggcttt aatgtcagcg t</b>	<b>21</b>
25	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<400> 9	
	<b>cgacggatta aggcgctgaa aag</b>	<b>23</b>
	<210> 10	
	<211> 22	
35	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<400> 10	
	<b>ctacctaata cgccagcacc ag</b>	<b>22</b>
40		
	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<400> 11	
	<b>gccagacca gcaatcat</b>	<b>18</b>
	<210> 12	
50	<211> 1257	
	<212> ADN	
	<213> <i>Lactobacillus reuteri</i>	
	<400> 12	

cgacggatta aggcgctgaa aagtgattat gaacgtgact tgcattgac tgataaggaa 60  
 ttcaacagg gccttaataa tattaagtg attactgatg atgttgcgac cgcggtaaa 120  
 gatgctgatt taatgattga agcattacca gaatcgttag agttaaagga gcagttttac 180  
 gaagagggtt cagaattagc ccctgaaaa acaatcttg cttagcaactc ctctacattt 240  
 atccctagcc aactagctcc ttatactgat cggccagaaa aatttctaa tatgcacttt 300  
 gctaaccaa tttggaaatt taatgtggtc gaaattatgg gcacctcca aacaagtcca 360  
 gaggtgattg aagaagctac aaagtttgc cgggaaataa agatggtcc tgttaccct 420  
 aataaagaac aacacggta tattctgaat tcatggtgaa tcaggaatgc ctggtatga 480  
 cttggtgac gattatgga agcctctga taagactgct gttgaagcac tcatgacgc 540  
 aatcatggct gaagatgaag tcatcttgg tccaactggt tcatacacta acattgcatt 600  
 actcttagc gaataccag aagtaaagag tcacattaag caaatcgtt cgatgggtg 660  
 ttacttctt ggcgtaaca tgaccagtgt agctgaatt aacgtctca ctgatccgga 720  
 tgctgctaag attatgata atgcccgtgt tccaattgta actgttggat tggatgtac 780  
 cttaaaggcg ctcttaactg cggatacgtg tgaaaaactt gtagtctta ataagactgg 840  
 tgaaatgcta catggattaa tcacgacta taatgatggt agtgatcaag ggcgtccaat 900  
 gcacgatgtt aatactatct tctacctct tcatccagaa gcatttacta cgaaggacat 960  
 gtgggtgat gttcaaacag acggtccagc aatcgggtct actgttggg acattcgcgc 1020  
 tgcttaccat gatggcaaga ccaacgcaa agtttgtta gatattgatg ctgaatactt 1080  
 caataagtg ttctagaag aagtaagcaa aatgaaataa gatactaaga gctgagagtt 1140  
 tgctttcggc tcttttatt actttctagt gtaagcgtt cacgatataa tagtaatagt 1200  
 taaagtaagg aggaaatacc aatgaagaa tataatgatt gctggtgctg gcaagcc 1257

5 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <400> 13  
**ccagaggatga ttgaagaagc tac 23**

15 <210> 14  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<400> 14  
**ccgggaaata aagatggtt 19**

	<210> 15	
	<211> 822	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Lactobacillus reuteri</i>	
	<400> 15	
	ccgggaaata aagatggctc ctgtatcct taataaagaa caacacggtt atattctgaa	60
	ttccctttg attccgttac ttgatctgg tcttagtta tgggctaaag gagttgctga	120
	tccagcgatg attgataagg attggatgat ttcgacaggt gcaccaatgg gaccattgg	180
	tatttagat atggttgggt tacggacagc agcgcaaadc gaacggaatg cctatgccca	240
	gactaaggat gaaagtcata aggaaattgc cgataagatg gaacagatga ttcaagaagg	300
	gcacgaagga aaagaatcgg gacaaggatt ttataattat ccgaatccag cctcatgga	360
	tccagatttt ctgaagcatt aagattaagt attgaaaacg ttaggaaagg gagcaagata	420
	agagtcgctc gtgactgta tctcactccc ttatttgcg ctccaatttt cacgtaatcc	480
	ggttgaaca atggcaaaat tacggtacag tagtagagaa cgtgaaacaa aaaatgttc	540
	acgaaaggag acctaataaa tgaatcctga acaattcaa caagcattag ctgatcatgg	600
	tattaccta tcagcagaac aaatgcaaca attgctgac tattaccaat tattagtga	660
	aactaatgaa catgggtgggt tgatgtcaa cagacggtcc agcatcgggtg ctactgtggt	720
	gacattcgcg ctgctacat gatggcagac caacgcaaag ttgtagat atgatgctga	780
	atattcaat aagtggttct taaagaagta gcaaatgaat ag	822
10	<210> 16	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<400> 16	
	<b>gcggaattcc atatgaagaa tatcatgatt gct</b>	<b>33</b>
20	<210> 17	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<400> 17	
	<b>cccaagctta atgcttcaga aaatctgg</b>	<b>28</b>
30	<210> 18	
	<211> 294	
	<212> PRT	
	<213> <i>Lactobacillus reuteri</i>	
	<400> 18	

ES 2 358 015 T3

Met Lys Asn Ile Met Ile Ala Gly Ala Gly Val Leu Gly Ser Gln Ile  
1 5 10 15

Ala Tyr Gln Thr Ala Leu Ser Gly Phe Asn Val Ser Val Tyr Asn His  
20 25 30

His Ile Asp Thr Ala Glu Arg Arg Ile Lys Ala Leu Lys Ser Asp Tyr  
35 40 45

Glu Arg Asp Leu His Leu Thr Asp Lys Glu Phe Gln Gln Gly Leu Asn  
50 55 60

Asn Ile Lys Val Ile Thr Asp Asp Val Ala Thr Ala Val Lys Asp Ala  
65 70 75 80

Asp Leu Met Ile Glu Ala Leu Pro Glu Ser Leu Glu Leu Lys Glu Gln  
85 90 95

Phe Tyr Glu Glu Val Ser Glu Leu Ala Pro Glu Lys Thr Ile Phe Ala  
100 105 110

Ser Asn Ser Ser Thr Phe Ile Pro Ser Gln Leu Ala Pro Tyr Thr Asp  
115 120 125

Arg Pro Glu Lys Phe Leu Asn Met His Phe Ala Asn Gln Ile Trp Lys  
130 135 140

Phe Asn Val Val Glu Ile Met Gly Thr Ser Gln Thr Ser Pro Glu Val  
145 150 155 160

Ile Glu Glu Ala Thr Lys Phe Ala Arg Glu Ile Lys Met Val Pro Val  
165 170 175

Ile Leu Asn Lys Glu Gln His Gly Tyr Ile Leu Asn Ser Leu Leu Ile  
180 185 190

Pro Leu Leu Ala Ser Gly Leu Ser Leu Trp Ala Lys Gly Val Ala Asp  
195 200 205

Pro Ala Met Ile Asp Lys Asp Trp Met Ile Ser Thr Gly Ala Pro Met  
210 215 220

Gly Pro Phe Gly Ile Leu Asp Met Val Gly Leu Arg Thr Ala Ala Gln  
225 230 235 240

ES 2 358 015 T3

Ile Glu Arg Asn Ala Tyr Ala Gln Thr Lys Asp Glu Ser His Lys Glu  
 245 250 255

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

Glu Ser Gly Gln Gly Phe Tyr Asn Tyr Pro Asn Pro Ala Phe Met Asp  
 275 280 285

Pro Asp Phe Leu Lys His  
 290

<210> 19

<211> 885

5 <212> ADN

<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 19

atgaagaata tcatgattgc tggctgtggc gtattaggta gtcagattgc atatcaaacg 60  
 gctttatccg gctttaatgt cagcgtatat aatcaccata ttgataccgc tgagcgacgg 120  
 attaaggcgc tgaaaagtga ttatgaacgt gactgcatt tgactgataa ggaatttcaa 180  
 cagggcctta ataatttaa agtgattact gatgatgtg cgaccgagg taaagatgct 240  
 gatttaatga ttgaagcatt accagaatcg ttagagftaa aggagcagtt ttacgaagag 300  
 gttcagaat tagccctga aaaaacaatc ttgctagca actcctctac atttatccct 360  
 agccaactag ctccctatgc tgatcgcca gaaaaattc ttaatgca ctttgctaac 420  
 caaatttga aatttaatgt ggtcgaaatt atggcacct cccaacaag tccagagggtg 480  
 attgaagaag ctacaaagtt tgcccgggaa ataaagatgg ttctgttat ccttaataaa 540  
 gaacaacacg gttatattct gaattccctt ttgattccgt tacttgcac tggcttagt 600  
 ttatgggcta aaggagttgc tgatccagcg atgattgata aggattggat gatttcgaca 660  
 ggtgcaccaa tgggaccatt tggatattta gatatgggtg gtttacggac agcagcgcaa 720  
 atcgaacgga atgcctatgc ccagactaag gatgaaagtc ataaggaaat tgccgataag 780  
 atggaacaga tgattcaaga agggcacgaa ggaaaagaat cgggacaagg atttataat 840  
 tatccgaatc cagcctcat ggatccagat ttctgaagc attaa 885

10

## REIVINDICACIONES

1. Oxidorreductasa, que reduce ésteres de 2-oxoácido en presencia de NADPH y agua para dar los correspondientes ésteres de S-2-hidroxiácido, caracterizada porque presenta más de un 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 y una actividad específica de más de 1  $\mu\text{mol}$  por mg, con respecto a la transformación de 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo en S-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo.
2. Oxidorreductasa según la reivindicación 1, caracterizada porque presenta del 80% al 99,5%, especialmente del 90% al 99,5%, de manera especialmente preferible del 99% al 99,5% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18.
3. Oxidorreductasa según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18.
4. Oxidorreductasa según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque puede obtenerse a partir de *Lactobacillus (L.) reuteri*, *L. kefir*, *L. kandleri*, *L. parabuchneri*, *L. cellobiosus* o *L. fermentum*.
5. Oxidorreductasa según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque presenta de 1 a 50 aminoácidos más o de 1 a 50 aminoácidos menos que la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18.
6. Oxidorreductasa según la reivindicación 5, caracterizada porque presenta de 1 a 25 aminoácidos, especialmente de 2 a 20 aminoácidos, preferiblemente de 3 a 10 aminoácidos más o menos que la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18.
7. Oxidorreductasa según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 y está modificada una, dos, tres, cuatro o cinco veces por un polímero soluble en agua.
8. Oxidorreductasa según la reivindicación 7, caracterizada porque el polímero soluble en agua es polietilenglicol.
9. Proteína de fusión, caracterizada porque representa la oxidoreductasa con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 y porque la oxidoreductasa está unida con un polipéptido adicional en el extremo N-terminal o carboxiterminal a través de un enlace peptídico.
10. Anticuerpo, caracterizado porque se une específicamente a la oxidoreductasa según la SEQ ID NO: 18.
11. Secuencia de ácido nucleico aislada, que codifica para la oxidoreductasa según la SEQ ID NO: 18.
12. Secuencia de ADN aislada de una oxidoreductasa según una de las reivindicaciones 1 a 9, seleccionándose la secuencia de ADN del grupo que consiste en
  - a) SEQ ID NO: 19 o su hebra complementaria,
  - b) una secuencia de ADN, que se hibrida con la SEQ ID NO: 19 o su hebra complementaria en condiciones rigurosas, y
  - c) una secuencia de ADN, que debido a la degeneración del código genético codifica para una proteína, que también se codifica mediante una o varias de las secuencias de ADN según a) o b).
13. Secuencia de ADN aislada, caracterizada porque presenta más de un 70% de identidad con la secuencia de ADN SEQ ID NO: 19 o su hebra complementaria y codifica para una proteína, que presenta una actividad específica de más de 1  $\mu\text{mol}$  por mg, con respecto a la transformación de 2-oxo-4-fenilbutirato de etilo en S-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo.
14. Secuencia de ADN aislada según la reivindicación 13, caracterizada porque presenta del 80% al 99,5%, especialmente del 90% al 99,5%, preferiblemente del 99% al 99,5% de identidad con la secuencia de ADN SEQ ID NO: 19.
15. Vector de clonación, caracterizado porque presenta una o varias de las secuencias de ADN según las reivindicaciones 11 a 14.
16. Vector de expresión, caracterizado porque presenta una o varias de las secuencias de ADN según las reivindicaciones 11 a 14 y está unido de manera adecuada con una secuencia de control de expresión.
17. Célula huésped, que es una célula bacteriana, de levadura, de insecto, vegetal o de mamífero y transformada o transfectada con un vector de expresión según la reivindicación 16.
18. Procedimiento para la obtención enantioselectiva de éster de S-2-hidroxiácido, caracterizado porque se reduce un éster de 2-oxoácido en presencia de una oxidoreductasa según una de las reivindicaciones 1 a 9, NADPH y agua para dar el correspondiente éster de S-2-hidroxiácido y se aísla el éster de S-2-hidroxiácido formado.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque como éster de 2-oxoácido se utiliza un compuesto de fórmula I,
 
$$\text{R2-C(O)-C(O)-O-R1} \quad (\text{I})$$
 en la que R1 representa
  1. -alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ ), en el que el alquilo es lineal o ramificado,
  2. -alqueno ( $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ ), en el que el alqueno es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos, tres o cuatro dobles enlaces,
  3. -alquino ( $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ ), en el que el alquino es lineal o ramificado y dado el caso contiene uno, dos, tres o cuatro triples enlaces,
  4. -arilo ( $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ ),
  5. -alquil ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ )-arilo ( $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ ),

6. -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>), que está no sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro, o
7. -cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) y
- R2 representa
- 5 1. -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquilo es lineal o ramificado,
2. -alquenilo (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquenilo es lineal o ramificado y según la longitud de cadena contiene uno, dos, tres o cuatro dobles enlaces,
3. -alquinilo (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquinilo es lineal o ramificado y dado el caso contiene uno, dos, tres o cuatro triples enlaces,
- 10 4. -arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
5. -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>),
6. -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>), que está no sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro, o
7. -cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>),
- 15 estando los restos mencionados anteriormente en 1. a 7. no sustituidos o de mono a trisustituidos independientemente entre sí con
- a) -OH,
- b) halógeno, tal como flúor, cloro, bromo o yodo,
- c) -NO<sub>2</sub>,
- 20 d) -C(O)-O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), en el que el alquilo es lineal o ramificado y está no sustituido o de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro, o
- e) -heterociclo (C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>), que está no sustituido o está de mono a trisustituido con halógeno, hidroxilo, amino o nitro.
20. Procedimiento para la obtención enantioselectiva de éster de S-2-hidroxiácido, caracterizado porque
- 25 a) se reduce un éster de 2-oxoácido en presencia de una oxidorreductasa según una de las reivindicaciones 1 a 9, NADPH y agua para dar el correspondiente éster de S-2-hidroxiácido,
- b) se reduce el NADP formado mediante la oxidorreductasa con una deshidrogenasa y un cosustrato simultáneamente para dar NADPH, y
- c) se aísla el éster de S-2-hidroxiácido quirál formado.
- 30 21. Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado porque como éster de 2-oxoácido se utiliza un compuesto de fórmula I según la reivindicación 19.
22. Procedimiento según la reivindicación 20 ó 21, caracterizado porque como deshidrogenasa se utiliza la alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobium Brockii*, *Lactobacillus kefir* o *Lactobacillus brevis* y como cosustrato se usa etanol, 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol o 2-octanol.
- 35 23. Procedimiento según la reivindicación 20 ó 21, caracterizado porque como deshidrogenasa se utiliza la glucosa deshidrogenasa y como cosustrato se utiliza glucosa o se utilizan la formiato deshidrogenasa dependiente de NADPH y como cosustrato una sal del ácido fórmico tal como formiato de amonio, formiato de sodio o formiato de calcio.
- 40 24. Procedimiento según una de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizado porque las reacciones se realizan en presencia de un disolvente orgánico.
25. Procedimiento según la reivindicación 24, caracterizado porque como disolvente orgánico se utiliza dietil éter, terc-butilmetil éter, diisopropil éter, dibutil éter, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano.
26. Procedimiento según la reivindicación 24 ó 25, caracterizado porque la fase orgánica asciende a del 5% al 80% del volumen de reacción total, preferiblemente del 10% al 40%.
- 45