

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 554**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

C07C 35/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2004 E 08019987 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2058390**

54 Título: **Método para producir escilo-inositol**

30 Prioridad:

14.10.2003 JP 2003353490

14.10.2003 JP 2003353491

27.01.2004 JP 2004018128

30.06.2004 JP 2004194088

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

28.05.2013

73 Titular/es:

HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.

(100.0%)
4-20, NIHONBASHI HONGOKU-CHO 4-CHOME

CHUO-KU, TOKYO 103-8341, JP

72 Inventor/es:

YAMAGUCHI, MASANORI;

KITA, YUICHI;

MORI, TETSUYA;

KANBE, KENJI;

TOMODA, AKIHIRO;

TAKAHASHI, ATSUSHI y

ICHIKAWA, WAKAKO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 404 554 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

Método para producir escilo-inositol

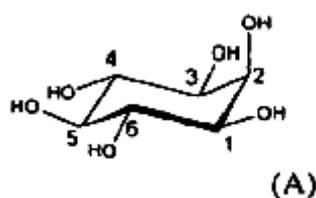
Campo Técnico

5 La presente invención se relaciona con un método para producir eficientemente escilo-inositol a partir de una mezcla líquida que contiene escilo-inositol y azúcares neutros diferentes a escilo-inositol.

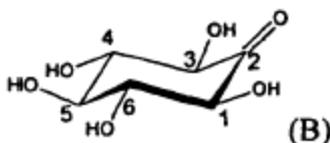
El escilo-inositol se puede utilizar como un agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, como materia para la síntesis de sustancias bioactivas, o como materia prima para la síntesis de compuestos de cristal líquido.

Técnica Anterior

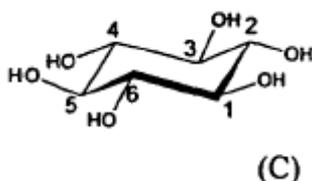
10 El escilo-inositol es una sustancia conocida de origen natural representada por la siguiente fórmula estructural estérica (A).



escilo-inososa es una sustancia conocida representada por la fórmula estructural estérica (B).



15 Adicionalmente, el escilo-inositol es una sustancia conocida representada por la siguiente fórmula estructural estérica (C).



El escilo-inositol es uno de los estereo isómeros del mio-inositol y es una sustancia ampliamente encontrada entre animales y plantas. La escilo-inososa es un compuesto que tiene una estructura en la cual un grupo hidroxilo axial en la segunda posición del mio-inositol se oxida, y existe generalmente como un compuesto natural.

20 El escilo-inositol es una sustancia esperada para aplicaciones tales como un agente terapéutico para enfermedad de Alzheimer (ver Documento no Patente 1), materia prima para la síntesis de sustancias bioactivas (Documento de Patente 1), o una materia prima para la síntesis de compuestos de cristal líquido (Documento de Patente 2).

25 Ejemplos de un método de producir escilo-inososa o escilo-inositol por medio de un procedimiento químico sintético incluye: (I) un método para obtener escilo-inositol al reducir el exahidroxibenceno con nickel Raney (documento de patente 2); (II) un método para obtener escilo-inositol al reducir la escilo-inososa obtenida de un derivado de glucofuranosa a través de una reacción que involucra cinco etapas (documento de patente 3); (III) un método para obtener escilo-inositol utilizando como materia prima cis-trioxa-tris-homobenceno a través de una reacción que involucra cuatro etapas o más (documento de patente 4); y (IV) un método para obtener escilo-inositol que incluye oxidar mio-inositol con catalizador de platino para obtener de esta manera escilo-inososa, y someter la escilo-inososa a esterificación seguida por reducción e hidrólisis (ver Documento de Patente 2).

30

5 Como un método para convertir el mio-inositol en escilo-inositol utilizando un microorganismo, se conoce un método utilizando una bacteria que pertenece al género *Agrobacterium* (Documento de Patente 3). Sin embargo, este método no es aplicable para una producción a escala industrial por el bajo rendimiento del escilo-inositol y la generación de otros productos convertidos. Mientras tanto, una bacteria que pertenece al género *Acetobacter* (ver documento no patente 5) es conocida por actuar sobre el mio-inositol para absorber oxígeno, para oxidar de esta manera el mio-inositol en escilo-inososa. Sin embargo, no ha sido estudiado su mecanismo detallado.

10 La enzima que oxida el mio-inositol en escilo-inososa (lo-inositol-2-deshidrogenasa) se ha reportado en numerosos organismos tales como animales, algas, levaduras y bacterias, y es una enzima que existe ampliamente en la naturaleza. Ejemplos de microorganismo típicos que tienen la enzima incluyen *Aerobacter aerogenes* (ver documento no patente 6), bacteria que pertenece al género *Bacillus* (Documento no Patente 7 y 8; documentos de patente 4-6), y bacterias que pertenecen al género *Pseudomonas* (Documento no Patente 9 y 10).

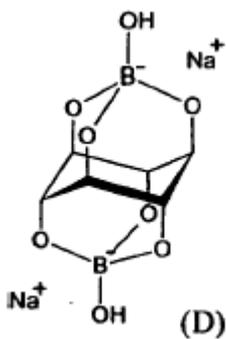
15 Sin embargo, la mio-inositol 2-deshidrogenadas en aquellos reportes son enzimas dependientes- NAD^+ , por lo tanto ellas requieren NAD^+ o NADP^+ para oxidación. Cuando la enzima se somete a una reacción a escala industrial, se debe emplear producción fermentativa con el fin de reciclar aquellas coenzimas, que resultan en la descomposición de parte de substratos. Además, ha habido problema a producción a escala industrial de tal manera que la concertación del substrato se debe mantener baja.

20 Mientras tanto, existe un reporte de la presencia de escilo-inositol deshidrogenasa en cerebro bovino y un tejido graso de cucaracha (Documento no Patente 11). Cuando la escilo-inososa como un substrato se reduce mediante esta enzima con NADPH , tanto el escilo-inositol como el mio-inositol son reportados por ser generados. Sin embargo, la enzima tiene especificidad de substrato baja, y no se utilizó enzima altamente purificada, y otras propiedades son desconocidas, por lo tanto la enzima puede ser un alcohol deshidrogenasa que tiene una especificidad de substrato baja. Por lo tanto, la enzima no se ha descrito en el Handbook of Enzymes (publicada hasta Askura Shoten). Como se describió anteriormente, aunque existen reportes en animales, no se tiene certeza de si estos reportes son ciertos.

25 Adicionalmente, existe un método conocido de producir escilo-inositol al reducir químicamente la escilo-inososa producida mediante oxidación microbiana (Documento de Patente 7). En razón a que la sustancia obtenida mediante reducción química de la escilo-inososa es una mezcla de escilo-inositol y mio-inositol, la mezcla se ha desalinizado y purificado, seguida por la separación de escilo-inositol que tiene baja solubilidad de la solución concentrada mediante cristalización. Así, aquí los métodos han requerido muchas operaciones y así ha habido espacio para mejorar con respecto al rendimiento del escilo-inositol. Bajo tales circunstancias, el desarrollo de un método para producir escilo-inositol purificado de una mezcla de escilo-inositol y mio-inositol que se obtiene mediante la reducción de escilo-inososa, o similar, se ha esperado con el fin de producir escilo-inositol conveniente y eficientemente.

35 Cuando la escilo-inososa se reduce utilizando NaBH_4 en una solución, la solución después de la reacción contiene mio-inositol, escilo-inositol, y una pequeña cantidad de un complejo de escilo-inositol/ácido bórico. Para tal complejo de escilo-inositol/ácido bórico, se ha conocido un método para obtener escilo-inositol que involucra: filtrar el complejo como un precipitado; disolver el precipitado en ácido sulfúrico diluido; agregar a este metanol para someterlo a azeotropía con ácido bórico; remover el ácido bórico; y desalinizar la solución restante utilizando una resina de intercambio de guión (Documento no Patente 12).

El complejo de escilo-inositol/ácido bórico es una sustancia representada por la siguiente fórmula estructural estérica (D).



40 Sin embargo, en el método anteriormente descrito de reducir escilo-inososa utilizando NaBH_4 , la proporción de complejo de escilo-inositol/ácido bórico generada es baja, y el escilo-inositol también se genera en la solución. Por lo tanto, el complejo y los componentes en la solución tenían que ser reparados para obtener de esta manera escilo-inositol de cada uno de aquellos. Adicionalmente, una gran cantidad de disolvente orgánico se ha requerido para obtener escilo-

inositol del complejo, ha habido espacio para mejorar desde el punto de vista económico. Así, ha habido demanda de un método para producir escilo-inositol conveniente y eficientemente, en producción escala industrial.

[Documento de patente 1] Patente US 5, 412,080

[Documento de patente 2] DE 3, 405,663

5 [Documento de patente 3] JP09-140388A

[Documento de patente 4]JP04-126075A

[Documento de patente 5]JP05-192163A

[Documento de patente 6]JP06-007158A

[Documento de patente 7]JP2003-102492A.

10 [Documento no patente 1] The Journal of Biological Chemistry (US), 200, vol. 175, p. 18495-18502

[Documento no patente 2] Journal of the American Chemical Society (US), 1948, vol. 70, p.2931-2935)

[Documento no patente 3] Journal of the American Chemical Society (US), 1968, vol. 90, p.3289-3290

[Documento no patente 4]Angewandte Chemie (Alemania), 1973, vol.85 p. 1110-1111

[Documento no patente 5] The Journal of Biological Chemistry (US), 1948, vol. 174,p.173-188

15 [Documento no patente 6]Archives of Biochemistry and Biophysics (US), 1956, J, Larner tl al., vol.60, p. 352-363

[Documento no patente 7] The Journal of Biological Chemistry (US),1979, vol.254, p.7684-7690

[Documento no patente 8] Microbiology (US), 1994, vol.140, p.2289-2298

[Documento no patente 9] Monatshefte fur Chemine (Alemania), 1969, vol. 100, p.1327-1337

[Documento no patente 10] Journal of Bacteriology (US), 1977, vol. 100, p. 1327-1337

20 [Documento no patente 11] Biochemical and Biophysical Research Communications (US), vol.68, p.1133, 1976

[Documento no patente 12] Journal of Organic Chemistry (US), 1958, vol.23, p. 359-330

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Es un objeto de la presente invención suministrar un método para producir eficientemente escilo-inositol de alta pureza a partir de una mezcla líquida que contiene escilo-onositol y azúcares neutros diferentes al escilo-inositol.

25 Más aún, los inventores de la presente invención han considerado que con el fin de producir el escilo-inositol eficientemente a partir de una mezcla líquida que contiene escilo-inositol y azúcares neutros tales como mio-inositol que se obtiene mediante la reducción de escilo-inososa, es ventajoso formar un complejo de escilo-inositol/ácido bórico. Sobre la base de tal consideración, los inventores de la presente invención han estudiado extensamente un método de
 30 llevar eficientemente solo el escilo-inositol en una mezcla líquida que contiene escilo-inositol y mio-inositol en tal complejo de escilo-inositol/ácido bórico. Como resultado, ellos han encontrado que el complejo de escilo-inositol/ácido bórico que consiste de escilo-inositol, ácido bórico, y un ión metálico tiene una asociación específica y es un complejo que tiene baja solubilidad que es diferente de otros complejos de azúcares neutros. Adicionalmente, los inventores han encontrado que el complejo de escilo-inositol/ácido bórico se forma efectivamente y se precipita al: agregar ácido bórico y una sal metálica en cantidades de dos veces moles o más, preferiblemente dos veces a tres veces más que aquellas
 35 del escilo-inositol disuelto en una mezcla líquida; y mantener la solución en un condición alcalina de pH 8.0 a 11.0, preferiblemente pH 9.0 a 10.0. Bajo tales condiciones, el complejo de escilo-inositol/ácido bórico se forma de una mezcla líquida que contiene escilo-inositol y azúcares neutros tal como mio-inositol. Luego, el complejo se disuelve en un ácido, seguido mediante la purificación utilizando una resina de intercambio de ión o un disolvente orgánico soluble en agua, y de esta manera se produce eficientemente el escilo-inositol.

Así, se ha completado la presente invención.

Esto es, la presente invención suministra lo siguiente.

(1) Un método para producir un escilo-inositol purificado que comprende:

- 5 Una primera etapa de precipitación de un complejo escilo-inositol/ácido bórico agregando ácido bórico y un sal metálica a una mezcla líquida que contiene escilo-inositol y un azúcar neutro diferente a escilo-inositol en una cantidad dos veces o más veces el número de moles de escilo-inositol disuelto en la mezcla líquida, y ajustando el pH de la mezcla líquida a 8.0 hasta 11.0;
- una segunda etapa de separación del complejo a partir de la mezcla líquida;
- una tercera etapa de disolución del complejo separado en ácido para escindirlo en escilo-inositol y ácido bórico; y
- 10 una cuarta etapa para aislar y purificar el escilo-inositol a partir de la solución ácida o suspensión ácida obtenida en la tercera etapa, en donde la sal metálica que se va a agregar es de una o más clases de sales metálicas seleccionadas del grupo consistente de NaCl, NaHCO₃, Na₂CO₃, Na₂SO₄, NaHSO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, borax, KCl, KHCO₃, K₂CO₃, K₂SO₄, KHSO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, K₃PO₄, MgCl₂, MgCO₃, y MgSO₄.
- 15 (2) El método de acuerdo con (1), en donde, en la primera etapa, las cantidades de ácido bórico y sal metálica que van a ser añadidas es no menor de dos veces, y no más de tres veces el número de moles del escilo-inositol disuelto en la mezcla líquida.
- (3) El método de acuerdo con (1), en donde, en la primera etapa, el pH de la mezcla líquida se ajusta de 9.0 a 10.0.
- (4) El método de acuerdo con (1), en donde la mezcla líquida que contiene el escilo-inositol y el azúcar neutro diferente al escilo-inositol es una mezcla líquida que contiene mio-inositol y escilo-inositol obtenido reduciendo la escilo-inososa en una solución que contiene escilo-inososa.
- 20 (5) El método de acuerdo con (1), en donde, en la tercera etapa, la solución obtenida por disolución del complejo en ácido se ajusta a una solución ácida de 0.1 N o superior; y, en la cuarta etapa, la solución ácida se pone en contacto con una resina de intercambio iónico ácida fuerte, y con una resina de intercambio iónico básica fuerte, y con una resina de absorción selectiva de ácido bórico, y luego el escilo-inositol es precipitado desde la solución ácida.
- 25 (6) El método de acuerdo con (1), en donde, en la cuarta etapa, el escilo-inositol es precipitado agregando un solvente orgánico acuoso a la solución ácida o a la suspensión ácida.
- (7) El método de acuerdo con (6), en donde el solvente orgánico acuoso es etanol o metanol; y el etanol se agrega en un volumen de 0.3 a 3 veces mayor, o el metanol se agrega en un volumen de 0.3 a 5 veces mayor, que el de la solución ácida o la suspensión ácida.
- 30 (8) El método de acuerdo con (6), en donde el solvente orgánico acuoso es etanol o metanol; y el etanol se agrega en un volumen de 0.6 a 1.5 veces mayor, o el metanol se agrega en un volumen de 0.9 a 2 veces mayor, que el de la solución ácida o la suspensión ácida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 35 La Fig. 1 muestra una lista esquemática del principio de producción del escilo-inositol mediante combinación de enzimas.

Descripción de las realizaciones preferidas

- 40 Se puede obtener un cristal de escilo-inositol puro mediante otro método de purificación, tal como el descrito posteriormente, que comprende: preparar un complejo de escilo-inositol/ácido bórico al agregar ácido bórico NaCl a la solución que contiene escilo-inositol obtenido mediante cultivo; filtrar y separa el complejo de escilo-inositol/ácido bórico. Permitir que el ácido bórico sea liberado al agregar un ácido; y cristalizar el escilo-inositol al agregar un disolvente orgánico tal como metanol.

Método para producir escilo-inositol de una mezcla líquida que contiene escilo-inositol y azúcares neutros diferentes al escilo-inositol.

La presente invención se relaciona con un método para producir escilo-inositol de una mezcla líquida que contiene escilo-inositol y azúcares neutros diferentes de escilo-inositol.

<4-1>

5 Una realización del método de la presente invención es un método para producir escilo-inositol purificado, que comprende: una primera etapa de formar un complejo de escilo-inositol/ácido bórico al agregar ácido bórico y una sal metálica en una cantidad de dos veces o más aquella del escilo-inositol disuelto en una mezcla líquida que contiene el escilo-inositol y ácido neutro diferente del escilo-inositol y ajustar el pH de la mezcla líquida a 8.0 a 11.0; una segunda etapa de separar el complejo de una mezcla líquida; una tercera etapa de equilibrar el escilo-inositol y el ácido bórico al disolver el complejo separado en un ácido ; y una cuarta etapa de aislar y purificar el escilo-inositol de una solución ácido o una suspensión ácida obtenida de la tercera etapa.

La primera etapa del método de producción es una etapa de formar un complejo de escilo-inositol/ácido bórico al albergar ácido bórico y una sal metálica en una cantidad de dos veces o más que aquella escilo-inositol disuelto en una mezcla líquida que contiene el escilo-inositol y el ácido neutro diferente del escilo-inositol; y ajustar el pH de la mezcla líquida 8.0 a 11.0.

15 Como se utiliza aquí, la "mezcla líquida que contiene el escilo-inositol y los azúcares neutros diferente del escilo-inositol" puede ser una solución o una suspensión. Además, puede ser aquella que contiene además sustancias diferentes "scilo-inositol y el azúcar neutro diferente del escilo-inositol", o puede ser aquella que ya contiene una pequeña cantidad del complejo escilo-inositol/ácido bórico. Preferiblemente, los azúcares neutros a ser contenidos en la mezcla líquida incluyen azúcares neutros tales como: terrosa, pentosa, hexosa y heptosa.

20 Ejemplos de estos incluyen: aldosa tales como glucosa, fructuosa, y la lactosa; cetosa; varios isómeros de inositol; y poli alcoholes tales como glicerol y etilenglicol. Aquí, ejemplos de isómeros de inositol incluyen: mio-inositol. D-quirositol, L-quirositol, epi-inositol, muco-inositol, allo-inositol, cis-inositol, y neo-inositol.

25 De aquellos, puede ser preferiblemente utilizado mio-inositol. En este caso, la "mezcla líquida que contiene el escilo-inositol y los azúcares neutro diferente del escilo-inositol" incluye, por ejemplo, una mezcla líquida que contiene el escilo-inositol y mio-inositol que se obtiene mediante la reducción de escilo-inososa como se describe adelante.

Para la escilo-inososa que va a ser utilizada para la reacción de reducción, por ejemplo, se puede utilizar una obtenida al oxidar mio-inositol utilizando un microorganismo en un medio o una solución (JP-A-2003-102492). La escilo-inososa obtenida mediante oxidación microbiana se puede utilizar al disolver el purificador o un filtrado o cultivo de este. Mientras tanto, se puede utilizar la escilo-inososa preparada al oxidar el mio-inositol utilizando un catalizador de platino.

30 Un agente reductor ha sido utilizado para la reducción de la escilo-inososa en el escilo-inositol no está particularmente limitado en tanto que este sea un agente reductor capaz de reducir la escilo-inososa en escilo-inositol en agua. Ejemplos de estos incluyen borohidruro de sodio, borohidruro de litio, borohidruro de potasio, borohidruro de trimetoxi sodio, y borohidruro de sodio cianado.

35 La reacción de reducción de la escilo-inososa se puede detectar, por ejemplo, al agregar un polvo o una solución de un agente reductor a una solución que contiene escilo-inososa disuelta a una concentración de 20% o menos (p/b). La solución se agita preferiblemente en este momento. El calor se puede generar debido a la acción de reducción, por lo tanto la solución de su reacción se controla preferiblemente por tener una temperatura de 50° C o inferior con el fin de evitar la descomposición de la inososa generada. Adicionalmente, cuando se utiliza un agente reductor tal como borohidruro de sodio, una parte del agente reductor se puede descomponer para generar gas hidrógeno. Por lo tanto, se agrega un agente antiespumante o similar preferiblemente para reducir la formación de espuma del gas hidrógeno.

40 Una mezcla líquida que contiene el escilo-inositol y escilo-inositol obtenido de la reducción de la escilo-inososa, el escilo-inositol inicia cristalizar gradualmente cuando su concentración excede aproximadamente 1.6% (p/b). En general, la reducción del 5% (p/b) de la solución de escilo-inososa genera aproximadamente 3% (p/b) de mio-inositol y aproximadamente 2% (p/b) de escilo-inositol. Sin embargo, cuando la solución se deja a temperatura ambiente durante varias horas, aproximadamente 0.4% de una parte sobre saturada del escilo-inositol comienza a cristalizar. Por lo tanto, cuando la mezcla líquida de escilo-inositol y el mio-inositol obtenida de la reducción de la escilo-inososa se utiliza, la etapa de formar un complejo de escilo-inositol/ácido bórico se sitúa preferiblemente antes de la generación del cristal del escilo-inositol mismo. La etapa de formar el complejo de escilo-inositol ácido bórico se efectúa preferiblemente inmediatamente después de la reacción de reducción de la escilo-inososa.

50 La primera etapa se efectúa al agregar ácido bórico y sales de metal en "mezcla líquida que contiene el escilo-inositol y los azúcares neutro diferente del escilo-inositol" tal como la anteriormente descrita "mezcla líquida que contiene escilo-inositol y mio-inositol" en una cantidad de dos veces o más moles, preferiblemente dos veces o más moles pero tres veces o menos moles mayores que el escilo-inositol disuelto en la mezcla líquida, con respectivamente, y después de

que ellos se han disuelto, ajustando la mezcla líquida para ser alcalina a pH de 8.0 a 11.0., preferiblemente pH de 9.0 a 10.0. El término “dos veces moles” como se utiliza aquí se refiere a un número de moles de dos veces el pH de la solución de reacción se puede ajustar utilizando una base tal como NaOH, KOH, Na₂CO₃ o K₂CO₃.

5 Aquí, ejemplos de sales metálicas a ser agregadas incluyen una o más clases de sales metálicas seleccionadas del grupo que consisten en NaCl, NaHCO₃, Na₂CO₃, Na₂SO₄, NaHSO₄, NaH₂PO₄, NaHPO₄, Na₃PO₄, bórax KCL, KHCO₃, K₂CO₃, K₂SO₄, KHSO₄, KH₂PO₄, K₂PO₄, K₃PO₄, MgCl₂, MgCO₃, y MgSO₄. La cantidad de ácido bórico a ser agregada si la mezcla líquida ya contiene ácido bórico, es de dos veces más moles, preferiblemente dos veces o más pero tres veces o menos moles que el escilo-inositol disuelto

10 La primera etapa se lleva acabo preferiblemente con agitación para disolver eficientemente el ácido bórico y las sales de metal en la mezcla líquida y elaborar la solución homogénea luego del ajuste del pH. La etapa se efectúa preferiblemente a una temperatura que varia de 5°C a 85°C, preferiblemente 15° a 40° C. El tiempo necesario para la etapa no está particularmente limitado en tanto que la cantidad requerida del complejo de escilo-inositol/ácido bórico se forma, sin embargo, 12 a 76 horas son preferibles con el fin de recolectarla con un rendimiento del 90% o mayor.

15 La mayor parte del complejo de escilo-inositol/ácido bórico existe como un precipitado en la mezcla líquida en la zona este tiene una solubilidad de 0.01% (p/b) o menos en agua como se confirmo por medio de RMN. En la segunda etapa, el complejo de escilo-inositol/ácido bórico se separa de la mezcla líquida. Una operación de separación sólida general se puede aplicar a la etapa, por ejemplo, se puede aplicar una operación de filtración u operación separación centrífuga. El escilo-inositol dejado en la mezcla líquida en la cual el complejo de escilo-inositol/ácido bórico se ha separado por medio de la etapa anterior tienen una concentración 0.2% (p/b) o menos. Por lo tanto, la mayor parte del escilo-inositol en la mezcla líquida antes de la iniciación de la reacción se puede recolectar en una forma de complejo de escilo-inositol/ácido bórico. Mientras tanto, los azúcares neutros tal como el mio-inositol existe en un estado disuelto en una solución. Por lo tanto, los azúcares neutros existen en un filtrado luego de una operación de filtración, y así lo azúcares neutros y el escilo-inositol se puede separar mediante la etapa.

25 El complejo de escilo-inositol/ácido bórico separado se puede secar y aislar como a un polvo. Si es necesario, este también se puede aislar como un cristal por medio de recristalización utilizando agua caliente.

Luego, la tercera etapa involucra la disolución del complejo de escilo-inositol/ácido bórico separado en un ácido. La disolución enciende el complejo de escilo-inositol/ácido bórico en escilo-inositol y ácido bórico, y los lones de metal unidos al complejo también se disocian de este en una solución. La clase de un ácido que va ser utilizada para disolución en la etapa no está particularmente limitada en tanto en que este se pueda disolver el complejo, sin embargo un ácido que no forma una sal que tiene una baja solubilidad dependiendo de la clase de ión metálico es deseable. Preferiblemente, los ácidos minerales tales como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico se pueden utilizar y el ácido clorhídrico puede ser utilizado más preferiblemente. En razón a que aquellos ácidos dan cada uno origen a una reacción de neutralización con los lones de metal generados mediante la disolución, este es preferiblemente ajustado de tal manera que una solución que contiene el complejo de escilo-inositol/ácido bórico se vuelve se convierte finalmente en una solución ácida de 0.1 N o mayor. También, para disolver eficientemente el complejo de escilo-inositol/ácido bórico, el complejo es disuelto preferiblemente con un ácido de 1 N o mayor para finalmente hacer una solución ácida de 0.1 N o mayor.

40 La cuarta etapa involucra el aislamiento y la purificación del escilo-inositol de la solución ácida o la suspensión ácida obtenida de la tercera etapa. El método de aislar y purificar el escilo-inositol de la solución ácida no esta particularmente limitado. Sin embargo, por ejemplo, un método que comprende utilizar una resina tal como una resina de intercambio de ión como se describe adelante o un método que utiliza la diferencia el solubilidad, se puede utilizar un disolvente orgánico.

45 Adicionalmente se puede usar un método que comprende la destilación en vacío como un Ester de un alcohol inferior y ácido bórico al agregar un alcohol inferior después de liberar ácido bórico (Journal of Chemistry, vol.23, p.329-330, 1958).

50 De estos métodos, el método de aislar y purificar el escilo-inositol utilizando una resina de intercambio de guión. Se puede efectuar como sigue. En este caso, la solución obtenida de la tercera etapa es preferiblemente una solución ácida de 0.1 N o mayor en la cual el complejo se disuelve completamente en este. También, la solución ácida se prepara preferiblemente al agregar un ácido en una cantidad tal que la proporción del complejo de escilo-inositol/ácido bórico en esta se vuelve 2.5 (p/b) % o menos, con el fin de no precipitar el escilo-inositol libre.

55 Primero, la solución ácida es puesta en contacto con una resina de intercambio de ión ácido fuerte para remover de esta manera los lones de metal. La resina de intercambio de ión de ácido fuerte a ser utilizada no está particularmente limitada en tanto en que esta absorba los iones de metal y un ejemplo de esta incluye una resina de intercambio de ión que tiene un grupo sulfato. Un ejemplo de esta incluye el tipo Duolite C20H⁺ (elaborado por Sumitomo Chemical Co., Ltd.). El contacto se puede efectuar mediante una operación que comprende la visión en forma de tanda de resina de

intercambio de ión de ácido fuerte en una cantidad dada de la solución luego agitada. Sin embargo, es preferible que la solución se pase a través de la resina de intercambio de ión de ácido fuerte cargada en una columna.

5 Luego, la solución de la cual se remueven los iones de metal por medio de la resina de intercambio de ión de ácido fuerte se pone en contacto con la resina de intercambio de ión de base fuerte o una resina absorbente de ácido bórico con el fin de remover el ácido bórico. Aquellas resinas no están particularmente limitadas en tanto que ellas absorban ácido bórico. Un ejemplo de resina de intercambio de ión de base fuerte incluye una resina que tiene un grupo de amonio cuaternario, y un ejemplo de resina que absorbe ácido bórico incluye una resina que tiene un grupo N-metilglucamina. Un ejemplo específico de la resina de intercambio de ión de base fuerte incluye el tipo Duolite A 116 OH⁻ (elaborada por Sumitomo Chemical Co., Ltd.). Un ejemplo específico de resina que absorbe ácido bórico incluye escilo-inositol Duolite ES371N (elaborada por Sumitomo Chemical Co., Ltd.). El contacto se puede efectuar mediante una operación que comprende la edición en forma tándem de una resina de intercambio de ión en una cantidad dada de la solución y luego agitarla. Sin embargo, es preferible que la solución se agregue a la resina de intercambio de ión cargada en una columna.

15 El orden de las resinas con la cual la solución es puesta en contacto no es aleatorio por que el ácido bórico y el escilo-inositol se disocian uno del otro en un estado ácido. Las soluciones son puestas en contacto con la resina de intercambio de ión de ácido fuerte, la resina de intercambio de ión de ácido fuerte, y la resina de absorción de ácido bórico, en este orden.

20 Una solución en la cual los iones de metal y el ácido bórico son removidos al ser puestos en contacto con aquellas resinas contienen solamente escilo-inositol que es un azúcar neutro. Por lo tanto, al concentrar la solución utilizando un método real para precipitar el escilo-inositol, se puede aislar un cristal o polvo del escilo-inositol purificado.

25 Además, en una cuarta etapa, en un caso donde el escilo-inositol se aísla y purifica utilizando la diferencia en solubilidad a un disolvente orgánico, se puede efectuar como sigue. En el método, se obtiene una solución mediante la disolución con el ácido utilizado en la tercera etapa puede ser una solución disuelta o una suspensión porque la operación de purificación que utiliza las resinas de intercambio o similares no se efectúa hasta la adición del disolvente orgánico después de la disolución. En la tercera etapa con el fin de facilitar que el escilo-inositol se precipite después de la disolución, el ácido se agrega preferiblemente en tal cantidad que la proporción del complejo escilo-inositol/ácido bórico 2.5% (p/v) o más, preferiblemente 3.0% a 10% (p/v), más preferiblemente 4.0% a 6.0% (p/v).

30 Primero, un disolvente orgánico soluble en agua se agrega a la solución o suspensión de ácido obtenida para permitir que el escilo-inositol libre o se precipite. El disolvente orgánico al ser utilizado muestra particularmente delimitado en tanto que este sea un disolvente que le permita a un escilo-inositol precipitarse mientras que el ácido bórico se disuelve y las sales de metal que consisten del ácido y la sal se disuelven. Ejemplos de tal disolvente orgánico incluyen etanol y metanol.

35 La cantidad del disolvente orgánico es como sigue: cuando se utiliza etanol, el etanol se agrega preferiblemente en una cantidad de 0.3 a 3 veces más, más preferiblemente 0.6 a 1.5 veces más que la solución ácida. Cuando se utiliza metanol el metanol se agrega preferiblemente en una cantidad de 0.3 a 5 veces más, más preferiblemente 0.9 a dos veces más que aquella de la solución ácida. En particular, el disolvente orgánico se agrega deficientemente en la cantidad anterior cuando la sal de metal a ser utilizada para formar el complejo de escilo-inositol/ácido bórico, es una o más NaCl, NaHCO₃ y Na₂CO₃. Además, se ajusta una mezcla agregada con el disolvente orgánico acuoso preferiblemente para ser una solución ácida de 0.1 N o más.

40 En la cuarta etapa, cuando una mezcla es una solución homogénea, no es necesario efectuar agitación, sino cuando una mezcla es una suspensión, es preferible efectuar agitación. La temperatura de mezclar no está particularmente delimitada en tanto que esta sea una temperatura en la cual solamente el escilo-inositol se precipita, sin embargo una temperatura de -10°C a 50°C es preferible y una temperatura de 4°C a 35°C es más preferible. El tiempo de mezclar es preferiblemente 10 minutos a 24 horas, más preferiblemente 3 a 5 horas.

45 Tal operación permite que solamente el escilo-inositol se precipite. El escilo-inositol precipitado se puede separar de la solución por medio de filtración o una operación de separación sólido-líquido general tal como una separación centrífuga. Así el escilo-inositol obtenido es puro, sin embargo, el escilo-inositol se puede obtener como un cristal por medio de un método tal como re cristalización si es necesario. El escilo-inositol precipitado puede además ser purificado utilizando un intercambio de resina de ión o similar después de ser disuelto en agua, para implementar de esta manera su pureza.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención será descrita específicamente en referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1 (Comparativo)

<Método para producir escilo-inositol (escala pequeña)>

- 3 L de un medio líquido que contiene 10.0% de mio-inositol, 1.0% de extracto de levadura, y 1.0% de sacarosa se ajusta a un pH 7.0 con 1N NaOH, y el medio se dispensa en alícuotas de 100 ml en 30 piezas de recipientes cónicos con volumen de 500 ml, seguido por esterilización utilizando una autoclave. Un ciclo de platino de un cultivo inclinado de una cepa *Aceto bacteria sp. AB 10281 (FERM BP-10119)* inóculo a cada uno de los recipientes cónicos, y el microorganismo se cultiva a 27°C durante 5 días en un agitador rotatorio. Después del cultivo, se agregan 250 ml de agua a uno de los recipientes cónicos, y la mezcla se agita durante 1 hora en un agitador rotatorio para disolver el escilo-inositol cristalino generado en la solución del cultivo. La solución de cultivo se recolecta y centrifuga (8,000 rpm 20 minutos), y el sobrenadante obtenido se definió como una solución sobrenadante de cultivo (10.2 L).
- 10 La solución sobrenadante del cultivo se analiza mediante cromatografía líquida de alto desempeño bajo las siguientes condiciones. El resultado revela que 12.6 mg/ml (129 g, tasa de conversión 43%) de escilo-inositol se genera en la solución sobrenadante de cultivo. En la solución sobrenadante del cultivo, 2.1 mg/ml de escilo-inososa permaneció, mientras que el mio-inositol no se detecta.

Las condiciones de análisis de la cromatografía líquida de alto desempeño son como sigue.

- 15 Columna: Wakosil 5NH₂ (4.6 250 mm)
- Temperatura de Columna: 40°C
- Detector: RI DETECTOR ERC-7515 A (ERMA CR.INC.)
- Volumen de inyección: 5 µl
- Solvente: Acetonitrilo-agua = 4:1
- 20 Tasa de flujo: 2 ml/min
- Tiempo de elución: escilo-inososa; 11.6 minutos
- Mio-inositol; 17.8 minutos
- Escilo-inositol; 18.2 minutos

La tasa de conversión anteriormente descrita de escilo-inositol se calcula mediante la siguiente ecuación.

- 25 $Tasa\ de\ conversi\acute{o}n\ (\%) = \frac{\{(N\acute{u}mero\ de\ moles\ de\ escilo-inositol\ en\ sobrenadante\ de\ cultivo)\}}{\{(N\acute{u}mero\ de\ moles\ de\ mio-inositol\ antes\ de\ cultivo)\}} \times 100$

- Luego, la solución de sobrenadante de cultivo se pasa a través de una columna formada al conectar una columna (diámetro interno 5 cm, longitud 40 cm) rellena por 500 ml de una resina de intercambio de catión de ácido fuerte, Duolite (marca registrada) C-20 (tipo H⁺) (elaborada por Sumitomo Chemical Co., Ltd.) con una columna (diámetro interno 5 cm, longitud 16 cm) rellena con 200 ml de carbón activado, y luego 500 ml de agua intercambiada con ión se pasa a través de la columna para lavarla. La solución de flujo de paso y la solución de lavado se pasaron entonces a través de una columna (diámetro interno 7 cm, longitud 40 cm) rellena con 1,000 ml de una resina de intercambio de anión básica fuerte, Duolite (marca registrada) A116 (tipo OH⁻) (elaborada por Sumitomo Chemical Co., Ltd.), y luego 1,000 ml de agua con intercambio de ión se pasa a través de la columna para lavarla. Se encontró que la solución de flujo pasante obtenida y la solución de lavado de agua incluyen pocas impurezas diferentes del escilo-inositol descrito anteriormente.
- 30
- 35

- La solución obtenida se concentra hasta aproximadamente 700 ml bajo presión reducida, y 3 veces el volumen de etanol se agrega a esta. Luego, a la mezcla se le permite estar a 5°C durante toda la noche y en los cristales incoloros resultantes de escilo-inositol puro se filtraron y secaron, para de esta manera dar un rendimiento de 118 g de escilo-inositol. El rendimiento de recuperación de purificación fue del 92% y la tasa de recuperación total del escilo-inositol proveniente del mio-inositol fue del 39%.
- 40

Ejemplo 2 (Comparativo)

<Método para producir escilo-inositol (gran escala)>

- 5 40 L de medio líquido que contiene 10.0% de mio-inositol, 1.0% de extracto de levadura, y 1.0% de sacarosa se vertieron en un fermentador con jarro de 50-L y el pH se ajusta a 7.0 con 1N NaOH, seguido por la esterilización utilizando una autoclave. 400 ml de *Acetobacter* sp. AB 10281 (FERM BP-10119), que se había cultivado en un medio que tiene la misma composición (recipiente cónico), se inoculo y cultivo a 27°C durante 5 días a una tasa de aeración de un vvm y una agitación de 200 rpm. Después el cultivo, 60 L de agua caliente (aproximadamente 50°C) se agrega a aproximadamente 40 L de la solución de cultivo recolectada, y la mezcla se agita durante 1 hora para disolver el escilo-inositol cristalino que había estado presente en la solución de cultivo. La solución de cultivo se sometió a centrifugación continua (8,000 rpm) para remover las células, y la solución resultante se definió como una solución de la cual el microorganismo cultivado se había removido (aproximadamente 100 L).
- 10 La solución de la cual el microorganismo cultivado se había removido se analiza mediante cromatografía líquida de alto desempeño. El resultado revela que 16.8 mg/ml (1.68 kg, tasa de conversión 42%) de escilo-inositol se genera en la solución de la cual el microorganismo cultivado se había removido. En la solución de la cual el microorganismo cultiva se había removido, 2.9 mg/ml de escilo-inososa permanecieron, mientras que no se detecta mio-inositol. La condición de análisis de la cromatografía líquida de alto desempeño es la misma que aquella del ejemplo 1.
- 15 Luego, 400 g de hidróxido de sodio se agregan a 100 L de la solución obtenida, y la mezcla se calentó con agitación a 98°C durante 1 hora. Posteriormente, 560 g de hidróxido de sodio, 1,340 g de ácido bórico, 1,260 g NaCl se agregaron y se disolvieron mientras que la mezcla estaba caliente. Después se detuvo la agitación, el calor de la solución se libero, y la solución se le permite permanecer hasta que la temperatura alcanzo 23°C (aproximadamente 24 horas).
- 20 Luego, la solución se filtró para aislar los cristales de un complejo de escilo-inositol/ácido bórico formado en el líquido, y los cristales fueron lavados con agua hasta que ellos se volvieron blancos. Los cristales resultantes (aproximadamente 3.9 kg) fueron llevados a otro recipiente, y se agregan a este 5.9 L de agua y 1.95 L de ácido clorhídrico al 37%, seguido por agitación. 30 minutos más tarde, para precipitar el escilo-inositol que fue liberado del ácido bórico mediante tal procedimiento, 9.4 L de metanol se agregaron, y la mezcla se agita adicionalmente durante 1 hora.
- 25 Luego, la solución se filtró para aislar el escilo-inositol/ácido bórico del líquido, y los cristales fueron lavados con 1 L de metanol al 50%. Los cristales de polvo fino resultantes (aproximadamente 1.8 kg) se llevaron a otro recipiente, y se agrega a este 10 L de agua seguido por ebullición con agitación durante 1 hora. Posteriormente, la solución se enfría a 20°C con agitación y luego se filtra, para producir de esta manera cristales finos de escilo-inositol. Después de secar 1.35 kg de cristales incoloros de escilo-inositol puro se obtuvieron. El rendimiento de recuperación fue de 80%, mientras que la tasa de recuperación total de escilo-inositol proveniente de mio- inositol fue de 34%.
- 30 **Ejemplo 3 (Comparativo)**
- Identificación de los microorganismos que producen escilo-inositol basada en la secuencia de nucleótido del 16SrARN
- Las secuencias de nucleótidos de 16SrARN se analizaron para 4 cepas microbianas que consisten de 3 cepas naturales aisladas, AB 10285, AB 10286, y AB 10287, que tienen cada una la capacidad de convertir el mio-inositol en escilo-inositol, y AB10281 obtenido de AB10253, de acuerdo con el método convencional. Más específicamente, se extrajo un ADN genómico de las células cultivadas, y luego los fragmentos de ADN correspondientes se prepararon mediante PCR utilizando cultivadores que fueron diseñados con el fin de amplificar 1.6 kbp de 16SrARN, seguido por análisis de aproximadamente 1.3 kbp de las secuencias (HokkaidoSystem Science Co., Ltd.). Los resultados de las secuencias fueron comprobados contra la base de datos para identificar las especies relacionadas.
- 40 La tabla 2 muestra los resultados comparados, las homologías, y las tasas de conversión en escilo-inositol al cultivar los microorganismos de la misma manera que el ejemplo 1.

Identificación de cepas microbianas mediante análisis de la secuencia de nucleótido

Tabla 2

Nombre de la cepa	Nombre de los microorganismos identificados	Homología	Tasa de conversión
AB10281	<i>Acetobacter cerevisiae</i> , <i>Acetobacter malorum</i>	99.93%	40.0%
AB10285	<i>Acetobacter cerevisiae</i> , <i>Acetobacter malorum</i>	99.78%	4.5%

(continuación)

AB10286	Burkholderia andropogonis	98.12%	2.6%
AB10287	Burkholderia andropogonis	98.04%	1.4%

5 Los resultados revelaron que las 4 cepas microbianas que tiene cada una la habilidad de convertir mio-inositol en escilo-inositol se pueden dividir ampliamente en 2 grupos. Como el primer grupo, AB 10281 y AB 10285 se identificaron como Acetobacter cerevisiae o Acetobacter malorum, mientras que el segundo grupo, AB 10286 y AB 10287, se identificaron como Burkholderia andropogonis.

Ejemplo 4

<Aislamiento de mio-inositol 2-dehidrogenasa independiente de ADN⁺ proveniente de Acetobacter sp. AB10253>

10 3 g de mio-inositol, 1 g de extracto de levadura (FNI205: elaborado por Lallemand BI), y 0.5 g de glucosa se agregan a un recipiente cónico con un volumen de 500 ml y se disolvieron en agua de tal manera que la mezcla tiene un volumen de 100ml, y la solución se ajusta a un pH de 5.0, seguido por esterilización utilizando una autoclave. De acuerdo con tales procedimientos, 4 piezas de los recipientes de medio se prepararon. Un ciclo de platino de Acetobacter sp. AB10253 proveniente de un cultivo inclinado se agrega a cada medio, y el microorganismo se precultiva a 27°C durante 2 días utilizando un agitador rotatorio.

15 Luego, 1.2 kg de mio-inositol, 0.4 kg de extracto de levadura (FNI205: elaborado por Lallemand BI), y 0.2 g de glucosa se agregan a un jarro fermentador de 50 L y se disolvieron en agua de tal manera que la mezcla tiene un volumen de 40 L. la solución se ajusta a un pH de 5.0, seguido por esterilización utilizando una autoclave. Aproximadamente 400 ml de una solución microbiana de Acetobacter sp. AB10253 precultivada se agrega a este, y el microorganismo se cultiva a 27°C durante 3 días a una tasa de aeración de 1wm y una agitación de 200 rpm.

20 Después del cultivo, las células fueron obtenidas como precipitadas utilizando un centrifugador continuo. Las células obtenidas fueron re suspendidas en 2 L de agua, y las células lavadas se obtuvieron mediante centrifugación y se suspendieron en 2 L de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0). Luego, se aplicaron ondas ultrasónicas a la suspensión para romper las células. La solución de lisis de célula se centrifuga para precipitar las células rotas, y las células rotas se obtuvieron como precipitadas. Los precipitados se suspendieron al agregar 500 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0), 0.6% Triton X-100 (elaborado por Kodak), y las enzimas se extrajeron a 15 °C durante 3 horas. Después de eso, la suspensión fue centrifugada, y se tomaron 420 ml del sobrenadante (solución de enzima cruda).

25 420 ml de la solución de enzima cruda se concentraron a 150 ml utilizando un ultra filtro (MW 30,000 corte), y la solución concentrada se pasa a través de una columna Toyopearl de 400 ml-DEAE equilibrada con 20mM de amortiguador Tris (pH 7.0) para absorber proteínas. Luego una solución con un gradiente de concentración lineal de 0 mM a 500 mM de NaCl en 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) que no contiene en su activo (volumen total 1.6 L) se pasa a través de una columna adsorbida con proteínas a una tasa de 10ml/min para eluir las proteínas. En la eluida se fracciona en fracciones de 40 ml. Luego, 600 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) que no contiene surfactante se pasa a una columna de nuevo para lavado, y luego una solución con un gradiente de concentración lineal de 0 mM a 500 mM de NaCl en 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) que contiene 0.1% de Triton X-100 (volumen total 1.6 L) se pasa a través de una columna de una tasa de 10 ml/min para eluir las proteínas. El eluido se fracciona en fracciones de 40 ml.

30 La actividad de la enzima de cada fracción se mide mediante un método estándar: esto es, el cambio en la absorbancia a 600 nm de 1 ml de una solución que contiene 50 µl de la solución de proteína, 100 ml de amortiguador de fosfato (pH 5.0), 5 mg de mio-inositol, y 0.4 mg de 2,4-dicloroindofenol (DCIP oxidado) fue calculado en una tasa de reacción, y la actividad para oxidar 1 µmol de mio-inositol por minuto se definió como una unidad.

35 Los resultados revelaron que la enzima blanco fue eluida en fracciones de solución que contienen 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) que contiene 0.1% de Triton X-100 y 100 a 170 mM de NaCl. Luego, estas fracciones (249 ml) se recolectaron y se concentraron a 30 ml utilizando un ultra filtro (MW 30,000 corte), y 100 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) que contiene 0.1% de triton X-100 se agregan a esta. La solución se concentra adicionalmente a 30 ml, y 70 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) se agrega a la solución concentrada para desalinización.

40 Luego, la solución de enzima así preparada se pasa a través de una columna de 100 ml de hidroxipatita equilibrada con 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) que contiene 0.1% de triton X-100 para adsorber las proteínas. Posteriormente una solución con un gradiente de concentración lineal de 0 mM a 500 mM de amortiguador de fosfato (pH 7.0) en amortiguador Tris (pH 7.0) que contiene 0.1% de triton X-100 (volumen total 400 ml) se pasa a través de la

columna con proteína adsorbida a una tasa de 3 ml/min para eluir las proteínas. El eluado se fracciona en cada una de las fracciones de 10 ml, y se mide la actividad de la enzima de cada fracción.

5 Los resultados revelaron que la enzima blanco se diluye en fracciones en fracciones de solución que contienen 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) que contiene 0.1% de Triton X-100 y 100 a 170 mM de amortiguador de fosfato. A la solución de enzima así obtenida se encontró que contiene escino-inositol 2-dehidrogenasa independiente de ADN⁺ casi pura. Luego, las fracciones (40 ml) se recolectaron y se concentraron en 5 ml utilizando un ultra filtro (MW 30,000 corte), y 100 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) se agrega. La solución se concentra adicionalmente a 5 ml, seguido por desalinización.

10 La solución concentrada así preparada se pasa de nuevo a través de una columna de Toyopearl de 20 ml-DEAE (elaborada por Tosoh Corporation) equilibrada con 20 mM de amortiguado Tris (pH 7.0) que contiene 0.1% Triton X-100 para adsorber proteínas. Luego, una solución con un gradiente de concentración lineal de 50 mM a 250 mM de NaCl en 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) que contiene 0.1% Triton X-100 (volumen total 160 ml) se pasa a través de una columna adsorbida a una tasa de 1 ml/min para eluir las proteínas. El eluado se fracciona en fracciones cada una de 4 ml. Después del fraccionamiento, la actividad de la enzima de cada fracción se midió, y cada fracción que tiene la actividad se sometió a electroforesis SDS.

15 Como resultado, la electroforesis SDS revela las bandas de proteínas que se relacionan con la actividad de la enzima de la enzima blanco. La remoción de las bandas de proteínas derivada de las fracciones que no tienen actividad revelaron que la enzima blanco fue la enzima que contiene al menos pesos moleculares de 76 k Dalton y aproximadamente 46 k Dalton.

20 Mientras tanto, las fracciones que tienen la actividad de enzima tuvieron color rojo, y el patrón de espectro UV revela que las fracciones contenían citocromos C. más aún, el contenido de la proteína blanco y la absorbancia del citocromo se reveló que 1 mol de la enzima blanco contiene un mol de citocromo C.

25 Para medición del pH óptimo, la actividad de enzima se mide mientras cambio un amortiguador y el valor de pH. Como el amortiguador, se utiliza 100 mM de amortiguador de fosfato (pH 3 a 8), 100 mM de amortiguador Tris (pH 7 a 8), y 100 mM de amortiguador de carbonato (pH 8 a 11). Los resultados revelaron que la enzima blanco tiene la actividad máxima a pH 4.5 a 5.5. más aún, al medir la actividad estándar (100 mM de amortiguador de fosfato (pH 5.0)), varios iones de metal pesado (Sn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , y Ni^{2+}) se agregaron, y se reveló que la enzima blanco se inhibió específicamente por el ión Sn^{2+} . La actividad de la enzima se inhibió en la presencia de 1 mM de ión Sn^{2+} a 1% o menos de la actividad de la ausencia de ión Sn^{2+} .

30 Mientras tanto, se confirmó que la enzima blanco es una enzima extraída con Triton X-100 de una fracción de membrana, y que la enzima extraída oxida al mio-inositol en la presencia de DCIP reducido, mientras que no ocurre absorción de oxígeno en la ausencia de DCIP. Los hechos significan que la enzima se acopla al sistema de transporte de electrón de la membrana de célula en un cuerpo vivo para quitar los electrones del mio-inositol para generar el escilo-inositol.

35 La especificidad del sustrato de la enzima blanco se determinó al medir la actividad de la enzima en una solución que contiene varios azúcares en lugar de mio-inositol a una concentración final de 50 mM. Mientras tanto, el valor $-k_m$ se mide al medir la actividad de enzima para cada azúcar al cual esta enzima muestra la actividad que mientras está cambiando la concentración de azúcar. Más aún, la reacción de oxidación los productos de reacción de oxidación fueron analizados mediante HPLC para determinar que sustancias fueron generadas. La medición se efectuó mediante las siguientes condiciones de HPLC: se utiliza una columna de Wacosil 5NH2 ϕ 4.6 x 250 mm (temperatura de columna 40°C) como una columna, 80% de acetonitrilo como una fase móvil (tasa de flujo 2 ml/min), y un detector RI como detector.

40 Como resultado, se encontró que la enzima blanco reacciona con D-qui-ro-inositol (actividad relativa 100%: $K_m = 8.8$ mM), muco-inositol (actividad relativa 68%: $K_m = 14.5$ Mm), y mio-inositol (actividad relativa 53%: $K_m = 20$ mM) para convertirlos a D-qui-ro-1-inososa, L-qui-ro-2-inososa, y silo-inososa, respectivamente. Se encontró que la enzima no reacciona con allo-inositol, escilo-inositol, L-qui-ro-inositol, L-qui-ro-inositol, y glucosa.

Ejemplo 5 (Comparativo)

Conversión de mio-inositol en escilo-inososa mediante mio-inositol 2-deshidrogenasa independiente de NAD⁺.

50 De la misma manera que en ejemplo 4, se efectuó la purificación utilizando un fermentador con jarro de 40 L, y 5ml de una solución de enzima obtenida mediante la purificación y desalinización con una columna de hidroxiapatita de 100 ml se definió como una solución de enzima, que se utiliza en la siguiente reacción de conversión.

30g de mio-inositol (166.7 m mol) y 15 ml de amortiguador de fosfato 1M (pH 5.0) se agregan a un tubo centrífugo de 400 ml, y la mezcla se diluye a 300 ml con agua para disolver el mio-inositol. 1 ml de enzima a 30°C y 8 g de DCIP reducido (sal Na) se agrega gradualmente a la solución con agitación. Después de la desaparición del color azul derivada del DCIP reducido, materia blancas insolubles generadas con la desaparición del color azul (DCIP oxidado) se precipitaron mediante centrifugación, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo microcentrífugo de 400 ml. Luego, la solución se ajusta a un pH de 5.0 con ácido fosfórico 1 N, y 8 g de DCIP reducido (sal de Na) se agrega adicionalmente con agitación. El procedimiento se repite 6 veces para agregar un total de 48 g de DCIP reducido (sal de Na), y al tiempo de la desaparición del color azul se agregaron finalmente 3 g de DCIP reducido (sal de Na). A la mezcla se le permite permanecer durante una hora y se centrifuga y se tomo el sobre nadante. Tales procedimientos produjeron 292 ml de sobrenadante. Los procedimientos tomaron 8 horas.

Luego, el sobrenadante resultante se pasa a través de una columna llena con 100 ml de resina de intercambio de ión de ácido fuerte (duolite C20, tipo H⁺) una tasa de flujo de 5 ml/min, y eluato resultante paso a través de una columna llena con 150 ml de resina de intercambio de ión de base de (Duolite 368S, tipo - OH). Más aun el eluado resultante se pasa a través de una columna llena con 50 ml de carbono activado. El eluado resultante se concentro, para producir de esta manera 26.5 g (148.9 m mol) de polvo blanco (rendimiento 89%). La sustancia se analiza mediante RMN y HPLC, y se encontró que la sustancia contiene 99% de escilo-inositol y 1% de mio-inositol.

Ejemplo 6 (Comparativo)

Selección de acetobacter sp. AB 10253 de mutantes basados en la actividad mio-inositol 2-dehidrogenasa independiente de NAD⁺.

5 ml de un medio líquido (pH 5.0) que contiene 1% de extracto de levadura (fabricado por Difco laboratorios) y 0.5 % de glucosa en un tubo de ensayo se esteriliza, y un ciclo de platino de acetobacter sp. AB 10253 de un cultivo inclinado se agregan a este, seguido mediante agitación del cultivo a 27°C durante 6 horas. 2.5 ml de una solución de cultivo se tomo a un tubo esterilizado y se centrifuga a 3.000 x g para recolectar las células. El sobrenadante se descarta de las células, fueron re suspendidas en 2.5 ml de 200 mM de solución de amortiguador de fosfato (pH 8.0). 2 ml de la suspensión se vertieron en un recipiente esterilizado, y 0.5 ml de expulsión de glucosa 40% y 7.5 ml de amortiguador de fosfato 200 mM (pH 7.0), se agregan y se mezclan. A la mezcla, se agregan 20 µl de etilmetalosulfonato y se expone la agitación de un cultivo a 30°C durante 45 minutos. Después del tratamiento, se lleva 1 ml de la mezcla a un tubo esterilizado y se centrifuga a 3.000 x g para recolectar las células. El sobrenadante se descarta, y las células fueron suspendidas en 2.5 ml de 200 mM de amortiguador de fosfato (pH 7.0), seguido por la centrifugación a 3.000 x g para recolectar las células. El sobrenadante se descarta y las células fueron re suspendidas en 2.5 ml de 200 mM de amortiguador de fosfato (pH 7.0), para producir de esta manera una solución que contienen un microorganismo tratado con mutación.

Luego, el acetobacter sp. AB 10253 es tratado con mutación se inoculo al rociar 0.12 ml de la solución que contiene el microorganismo tratado con mutación sobre medio de agar preparado al solidificar un medio esterilizado (pH 5.0) que contiene 3% de mio-inositol, 1% de extracto de levadura (elaborado por Difco laboratorios), 0.5% de glucosa y 1.5 % de agar en un plato de 9 cm, y el cultivo se efectuó a 27°C durante 2 días. Aquellos procedimientos redujeron el conteo viable a aproximadamente 1.6%. Mientras tanto, se formaron aproximadamente 95 a 125 colonias por disco.

Después del cultivo, sobre las colonias formadas en un plato de 9 cm, se vertieron 10 ml de una solución viscosa lentamente las cuales se habían preparado al esterilizar por filtración una solución que tienen como composición de 100 mM de amortiguador de fosfato, 1% de mio-inositol, y 0.4% de DCIP oxidado y se agrega a este un volumen igual de 1% de solución de agar esterilizada con un autoclave muestras este estuvo caliente, enfriamiento a 36°C con el fin de inhibir la solidificación del agar. En medio de agar que se había sometido a tales tratamientos se enfrió lentamente a 27°C para ser solidificado y puesto en capas sobre las colonias conformadas en un disco de 9cm.

Después del tratamiento el disco se incubó a 27°C y luego se observó que el color azul del DCIP oxidado que se había esparcido todo sobre el medio de agar comenzó gradualmente a volverse transparente solo alrededor de las colonias que dependen del grado de actividad del mio-inositol 2-deshidrogenasa independiente de NAD⁺. En ese momento, las colonias en la posición donde el color se volvió más rápidamente transparente fueron peladas mediante una aguja esterilizada y subcultivadas en un medio fresco. Todas las 2154 colonias se sometieron a una solución primaria, para obtener de esta manera 22 cepas que tienen alta actividad de mio-inositol 2-hidrogenasa independiente de NAD⁺.

Luego, para la selección secundaria, las 22 cepas así obtenidas que formaron las colonias fueron individualmente inoculadas a 5 ml de un medio líquido esterilizado (pH 5.0) que contiene 3% de mio-inositol, 1% de extracto de levadura (fabricada por Difco laboratorios), y 0.5% de glucosa en un tubo de ensayo. La agitación del cultivo se efectuó a 27°C durante 3 días y luego 1 ml de la solución del cultivo se lleva a un tubo de ensayo seguido por centrifugación a 3.000 x g para recolectar las células. El sobrenadante se descarta, y 1 ml de una solución que contiene 10% de mio-inositol, 50mM de amortiguador de fosfato (pH 5.0) se agregaron al tubo de ensayo que contiene las células seguido por la agitación del cultivo a 27°C durante 24 horas. Luego, la centrifugación se efectuó a 16.000 x g y la tasa de conversión del mio-inositol en escilo-inososa en el sobrenadante se mide mediante HPLC. De otra parte, 0.5 ml de la solución del

cultivo (5 ml) se lleva a un tubo esterilizado y se centrifuga a 3.000 x g, y se descarta el sobrenadante. Las células obtenidas como precipitados fueron lavados con agua, y se mide la actividad de mio-inositol 2-deshidrogenasa independiente de NAD⁺.

5 Como resultado, en tres cepas (cepa No. E6-55, H2-68, y B7-14) entre las 22 cepas mutantes, la actividad del mio-inositol 2-hidrogenasa independiente de NAD⁺ se incrementa unas 3 veces o más después de la mutación y la actividad se incrementa 1.6 veces, 2.2 veces y 2.8 veces respectivamente. Mientras tanto, la tasa de conversión del mio-inositol en escilo-inososa se incrementa 1.1- veces, 1.4 veces, 1.5 veces, respectivamente, y la tasa de conversión del mio-inositol en escilo-inososa de las cepas que tienen 1.3 veces o menos de actividad de mio-inositol 2-deshidrogenasa independiente de NAD⁺ fue igual a aquella de los microorganismos antes de mutación. Los resultados revelaron que la
10 selección basada en la actividad de mio-inositol 2-deshidrogenasa independiente de NAD⁺ se correlaciona con el incremento en la tasa de conversión del mio-inositol en escilo-inososa.

Ejemplo 7 (Comparativo)

Producción de escilo-inososa mediante conversión de mio-inositol en escilo-inososa utilizando la cepa mutante (B7-14).

15 10 g de mio-inositol, 1 g de extracto de levadura (FNI1205: fabricado por Lallemand BI), y 0.5 g de glucosa se agregan a un recipiente cónico con un volumen de 500 ml y se disolvieron en agua de tal manera que la mezcla tiene un volumen de 100 ml y la solución se ajusta a un pH de 5.0, seguido por esterilización ocupando un autoclave. De acuerdo con tales procedimientos, 20 recipientes de un medio (que corresponde a 2 L: mio-inositol 200 g (1.11 m mol)) se prepararon. Un ciclo de platino de la cepa mutante (B7-14) de un cultivo inclinado se agregan a cada medio, y la bacteria se cultiva a 27°C durante tres días utilizando un agitador rotatorio.

20 Después del cultivo, la solución del cultivo se centrifuga, y el sobrenadante resultante fue pasado a través de una columna llena con 500 ml de un ácido fuerte de una resina de intercambio de ácido fuerte (Duolite C20, tipo H⁺) a una tasa de flujo de 10 ml/min. El eluado obtenido se pasa a través de una columna llena con 900 ml de resina de intercambio de ión de base débil (Duolite C368S, tipo OH⁻), y el eluado resultante se pasa adicionalmente a través de una columna llena con 50 ml de carbón activado. El eluado resultante se convierte en un centro, para producir de esta
25 manera 162 g (0.91 mol) de polvo blanco (rendimiento 82%). La sustancia se analiza mediante RMN y HPLC, y se encontró que la sustancia contenía 91% de escilo-inososa, 3% de mio-inositol, y 6% de escilo-inositol (escilo-inososa de pureza de 91%).

Ejemplo 8 (Comparativo)

30 La producción de escilo-inositol mediante conversión y reducción química de mio-inositol en escilo-inososa utilizando la cepa mutante (B7-14).

35 10g de mio-inositol 1g de extracto de levadura (FNI1205: fabricado por Lallemand BI), y 0.5 g de glucosa se agregan a un recipiente cónico con un volumen de 500 ml y se disolvieron en agua de tal manera que la mezcla tiene un volumen de 100 ml, y la solución se ajusta a un pH de 5.0, seguido por esterilización utilizando un autoclave. De acuerdo con tales contenidos, 200 recipientes de un medio (que corresponden a 2 L: mio-inositol 200 g (1.11 m mol)) se prepararon. En un ciclo de platino de la cepa mutante (B7-14) de un cultivo inclinado se agregan a cada medio y la bacteria se cultiva a 27°C durante 3 días utilizando un agitador rotatorio.

40 Después del cultivo, la solución de cultivos se centrifuga a 8.000 x g, y aproximadamente 2 L del sobrenadante resultante se ajustaron a un pH de 7.5 con una solución de NaOH 5N. 9.2 g de NaBH₄ se agregan a la solución con agitación para efectuar una reacción de reducción. La temperatura de la solución de reacción se eleva a 37°C mediante el calor de la reacción. 80 minutos más tarde apareció materia insoluble gradualmente, y 1.2 L de agua se agregan a este para disolver casi toda la materia insoluble generada. La solución se filtró para remover la materia insoluble, y el filtrado se pasa a través de una columna llena con 500 ml de una resina de intercambio de ión de ácido fuerte (Duolite C20, tipo H⁺) a una tasa de flujo de 10 ml/min. El eluado resultante se pasa a través de una columna llena con 900 ml de una resina de intercambio de iones de base fuerte (Duolite A 116, tipo OH⁻), y el eluado resultante se pasa a través de
45 una columna llena con 300 ml de carbón activado. El eluado resultante se concentra para producir de esta manera 145 g de polvo blanco. La sustancia se analizó mediante HPLC, y se encontró que la sustancia contenía 36% de escilo-inositol y 64% de mio-inositol.

50 El polvo resultante blanco se suspendió en agua con el fin de tener un resultado de 470 ml, y la suspensión se calienta a 70°C para disolver completamente en mio-inositol. La suspensión se enfrió a 30°C con agitación, y la solución blanca se filtró para recuperar la materia insoluble. La materia insoluble se lavo con una cantidad pequeña de agua y se seco, para rendir de esta manera con 44.2 g de polvo. La sustancia se analiza mediante HPLC, y se encontró que la sustancia contenía 98% de escilo-inositol y 2 % de escilo-inositol. Adicionalmente, 700 ml de agua se agregaron al polvo resultante, y la mezcla se calienta a 85°C para disolverse toda ella. La mezcla fue enfriada a 30°C con agitación, y 700 ml de etanol se agregan a esta. A la mezcla se le permite permanecer durante toda la noche a temperatura ambiente, y

luego los cristales resultantes se recolectaron mediante filtración y se secan, para rendir de esta manera 40.1 g (222.8 m mol) de cristales (rendimiento 20%). Los cristales fueron analizados mediante RMN y HPLC, y se encontró que la sustancia obtenida fue escilo-inositol que tiene una pureza del 99.9% o más.

Ejemplo 9 (Comparativo)

5 Purificación de escilo-inositol deshidrogenasa producida mediante *Acetobacter* sp. AB10281 FERM BP-10119.

3 L de un medio líquido que contiene 10.0% de mio-inositol, 1.0% de extracto de levadura, y 1.0% de sacarosa se ajustaron a un pH de 7.0 con NaOH con 1N, y el medio se dispuso en alícuota de 100 ml en 30 piezas de un recipiente cónico con volumen de 500 ml, seguido por esterilización utilizando una autoclave. Un ciclo de platino de un cultivo inclinado de *acetobacter* sp. AB1028 FERM BP-10119 de inóculo a cada recipiente cónico, y el microorganismo se
10 cultiva a 27°C durante 5 días utilizando un agitador rotatorio (120 RPM). Después el cultivo, 250 ml de agua se agrega a cada recipiente cónico, y la mezcla se agita durante 1 hora utilizando un agitador rotatorio para disolver el escilo-inositol cristalino que había estado presente en la solución del cultivo. La solución del cultivo se recolecta y se centrifuga (8000 rpm, 20 minutos), para de esta manera producir células (peso húmedo 75 g).

15 Las células fueron suspendidas en 300 ml de agua y destruidas mediante onda ultrasónica a 10°C o menos. La solución de lisis indica un pH de 4.8, y la solución se ajusta a un pH de 7.0 con NaOH con 1N. Luego, la solución se centrifuga (16.000 rpm, 20 minutos) para separar el sobrenadante. Luego, se agrega MgSO₄ de tal manera que el sobrenadante contiene 2 mM Mg²⁺ y la solución se cambia a una columna blue-Toyopearl (fabricado por Tosoh corporation: 20 ml). Luego, 50 ml de amortiguador de 20 mM de amortiguador (pH 7.0) y complementado con 2mM de Mg²⁺ se pasa a través de la columna para lavarla. Posteriormente 500 ml de 20 mM de un amortiguador (pH 7.0) complementado con 1 M de
20 KCl se pasó a través de la columna para eluir las proteínas absorbidas. Luego, el eluado se concentra utilizando un ultra filtro (MW 30,000 cortes), y 50 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) se agrega a la solución concentrada seguido por concentración de nuevo, para producir de esta manera una solución concentrada desalinizada. Posteriormente, la solución concentrada desalinizada se carga sobre una columna de DEAE Toyopearl (Tosoh corporation: 20ml), y la elusión se efectuó con una solución con un gradiente de concentración general de 0 mM a 500 mM NaCl en 20 mM de
25 amortiguador Tris (pH 7.0). Luego, el eluado se fracciona fracciones. La actividad de la escilo-inositol deshidrogenasa de cada una de las soluciones fraccionadas se midió, y 3 fracciones, 1 fracción no absorbida (SIDH1), una fracción diluida con 200 mM de NaCl (SIDH2), y una fracción diluida con 300 mM (SIDH3), se encontró que tienen la actividad.

30 La actividad se mide como sigue: 5 µL de una solución de reacción (200 mM de amortiguador Tris (pH 8.0), 2% de NADPH, y 1% de escilo-inososa) y 5 µl de una solución de enzima se mezclaron y se les deja reaccionar a 36°C durante 30 minutos, y luego 500 ml de agua se agregaron inmediatamente, seguido por la medición de la absorbancia a 340 mM. La disminución en la absorbancia a 340 mM se mide con base en el valor blanco de la solución de prueba obtenida al utilizar agua en lugar de la solución de enzima. La solución de enzima, se diluye como se requería.

35 La fracción no absorbida de columna anteriormente descrita se carga adicionalmente sobre una columna CM Toyopearl (Tosoh corporation: 20 ml), y se efectuó la elusión con una solución con un gradiente de concentración lineal de 0 mM a 500 mM de NaCl in 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0). Luego, el eluado se fracciona en fracciones. La actividad de la escilo-inositol deshidrogenasa en cada una de las soluciones se midió, y la fracción no absorbida se encontró que tiene la actividad. La fracción diluida con 200 mM de NaCl y la fracción eluida con 300 mM se desalinizaron separadamente con un ultra filtro de nuevo, y se efectuó la dilución con una solución con un gradiente de concentración lineal de 200 mM de NaCl en 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0). Luego el eluado se fracciona en fracciones y se
40 purifica. Luego, aquellas 3 soluciones de enzima que tienen la actividad de escilo-inositol deshidrogenasa se concentraron separadamente utilizando un ultrafiltro, y las soluciones concentradas se cargaron sobre una columna de filtración de gel (Tohso corporation: 2000 SWXL), respectivamente. Los eluados fueron purificados con 20mM de amortiguador de fosfato (pH 7.0) complementado con 200 mM de NaCl. Las soluciones de enzima así purificadas fueron sometidas a electroforesis de gel SDS, y el gel después de la electroforesis se tiñó con una solución de tinte de azul brillante Coomassie (Rapid CBB KANTO: fabricado por Kanto chemical co., inc.), y luego se decolora. La pureza de las
45 bandas se mide al medir las bandas azules de las proteínas utilizando un densitómetro (elaborado por ATTO corporation), y se encuentra que la pureza de cada fracción fue de 85% o más.

Ejemplo 10 (Comparativo)

50 Purificación de la enzima de la presente invención producida por *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 y el análisis de su N-terminal.

3 L de un medio de caldo LB (1% Bacto-tripton, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7.0) que contienen 0.5% de L-sorbosa se dispersaron en 100 ml de alícuotas en 30 piezas de recipientes Sakaguchi de 500 ml, seguido por esterilización utilizando una autoclave. El ciclo de platino de un cultivo inclinado de *Escherichia coli* K 12 se inóculó a cada recipiente cónico, y el microorganismo se cultiva a 36°C durante un día utilizando un agitador recípro (135 rpm).
55 Después del cultivo, el medio de cultivos se recolecta y se centrifuga (8.000 rpm, 20 minutos), para producir de esta

manera células (de peso 32 g). Las células se re suspendieron en 100 ml de agua y se rompieron mediante ondas ultrasónicas 10°C. La solución de lisis indica pH 6.8, y la solución se ajusta a pH 7.0 con una solución de NaOH de 1N y luego se centrifuga (16000 rpm, 20 minutos) para separar el sobrenadante. Luego se agrega el MgSO₄ de tal manera que el sobrenadante contiene 2 mM Mg²⁺, la solución se carga sobre una columna de Blue-Toyopearl (Tosoh corporation: 20 ml). Luego 50 ml de 20 mM amortiguador Tris (pH 7.0) complementado con 2 mM de Mg²⁺ se pasó a través de la columna para lavarla. Posteriormente, 50 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0) complementado con 1M de KCl se pasa por a través de la columna para eluir las proteínas absorbidas, luego, el eluado se concentra dando un ultra filtro (MW 30.000 cortes), y 50 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0), se agregan a la solución concentrada, seguido por concentración de nuevo, para reducir de esta manera una solución concentrada desalinizada. Luego, la solución concentrada desalinizada se carga sobre una columna de DEAE Toyopearl (Tosoh corporation: 20 ml), y la elusión se detecta con una solución con un gradiente de concentración lineal de 0 mM a 500 mM de NaCl en 20 mM Tris (pH 7.0). El eluado se fracciona en fracciones. La actividad del escilo-inositol deshidrogenasa de cada una de las soluciones fraccionadas se midió, y se encontró que la presión diluida con 300 mM tenía la actividad.

La medición de la actividad se efectuó de la misma manera que en el ejemplo 9 anterior, y la disminución en la absorbancia a 340 mM se mide. La solución de enzima se diluye según se requiera.

La fracción eluida con 300 mM de NaCl se desaliniza utilizando un ultra filtro de nuevo, y el resultante se recarga sobre una columna de DEAE Toyopearl (Tosoh corporation: 20 ml). Luego, la elusión se detecta por una solución por un gradiente de concentración lineal de 250 mM a 350 mM de NaCl en 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0), y la purificación se efectúa, al repetir la operación de fraccionar el eluado 3 veces para remover las proteínas contaminantes. Adicionalmente la solución de enzima que tiene una actividad de escilo-inositol deshidrogenasa se producen utilizando un ultrafiltro, y la solución concentrada se carga sobre una columna de filtración de gel (Tosoh corporation: 2000 SWXL). El eluado se purifica con 20 mM de amortiguador de fosfato (pH 7.0) complementado con 200 mM de NaCl.

La solución de enzima así purificada se sometió a electroforesis de *slab-gel* SDS, y luego el gel se extrae y las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (immobilon PSQ: fabricado por Millipore corporation) que tienen el mismo tamaño que aquella de gel que utiliza semielectroplotter (elaborado por Funakoschi Co., Ltd.). Luego, la membrana PVDF se saca y se tiñe con una solución de tinte azul brillante, (Rapid CBB KANTO: fabricado por Kanto chemical Co., inc.), y luego esta se descolora. La pureza se mide utilizando un densitómetro de la misma manera que el ejemplo 9, y la pureza fue del 40%. Más aún, la porción que corresponde a la proteína blanco se corta para remover las proteínas no deseadas alrededor de la porción, para de esta manera reproducir una enzima de la presente invención que tiene una alta pureza.

Luego, la enzima de la presente invención que tiene una alta pureza que existe sobre la membrana de PVDF se analiza utilizando un analizador de aminoácido N-terminal (Hewlett-packard company). Como resultado, una secuencia de serila- ácido aspartico-asparaginina-isoleucina-arginina se detecta. El ADN que codifica una proteína tiene tal secuencia se investigo de la base de datos sobre la secuencia completa de Escherichia coli (nombre de la base de datos "colibrí"), y el ydgj (o b1624 gen) coincidió. El producto del gen ydgj se había predicho como una de las oxidoreductasas, pero el sustrato y el producto eran desconocidos.

Ejemplo 11 (Comparativo)

Aislamiento y expresión del ADN de la presente invención derivado de Escherichia coli K12 ATCC10798.

Para obtener el gen ydgJ que se asumió que codifica la enzima de la presente invención, primero, el genoma completo de Escherichia coli 12 para ser utilizado como plantillas fue extraído como sigue. Un ciclo de platino de Escherichia coli 12, que había sido cultivado en un medio de cultivo inclinado (1% bacto-tripton, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7.0, 1.5% agar), se inoculo a 100 ml de un medio de un recipiente LB (1% de bacto-tripton, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7.0) y se cultiva aeróbicamente por 8 horas a 36°C, seguido por recolección de células. Al glóbulo de células se agregan 15 ml de solución salina-EDTA (0.15 M de NaCl, 0.1 M de EDTA, pH 8.0) y 50 mg de lizosima, y las células fueron suspendidas, seguidas por reacción a 37°C durante 2 horas. Después del tratamiento 0.5 ml de una solución SDS de 25% se agrega a la solución para lizar completamente las células, y se agregaron 3 ml de fenol a las proteínas desnaturalizadas, seguidas por centrifugación. El sobrenadante se saca y se agregaron 20 ml de 2-propanol a una solución para producir el ADN genómico crudo. El ADN genómico crudo producido se precipita mediante centrifugación, y el sobrenadante se remueve seguido por secado bajo presión reducida. El ADN genómico crudo seco se disolvió adicionalmente en 3 ml de solución T (10 mM Trish-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), luego 0.01 Mg y luego se agrega 0.01 mg de RNasa, seguido por reacción a 36°C durante 2 horas para degradar el ARN. Luego, se agrega 0.01 mg de proteinasa K y a la mezcla se le deja reaccionar a 36°C durante 2 horas para degradar las proteínas. Luego, 1 ml de una solución mezclada de la unión cloro formo (1:1) se agrega y la mezcla se agita lentamente para desnaturalizar la ARNasa y la proteinasa K. la mezcla se separa en dos fases mediante centrifugación, y la capa superior (fase acuosa) se saca y se ajusta a un pH de 5.2 al agregar 0.3 ml de una solución de acetato de sodio 3M. Para la solución se agrega 3 ml de 2-propanol para producir ADN genómico. El ADN genómico obtenido se precipita mediante centrifugación y el sobrenadante se remueve, secado bajo presión reducida. El ADN genómico seco se disuelve en 3 ml de solución T, y el proceso de la operación de agregar 1 ml de una solución mezclada de fenol-cloroformo (1:1) a la operación de disolver

ADN en 3 ml de solución TE se repite de nuevo seguido por centrifugación. De la misma manera que anteriormente, se agrega un volumen igual de 2-propanol al sobrenadante a un pH de 5.2, para preparar de esta manera una solución de ADN genómico de *Escherichia coli* K 12. El ADN genómico así obtenido se utiliza como una solución de ADN plantilla para PCR.

- 5 Un fragmento de *Escherichia coli* K12 y contiene un sitio de unión de ribosoma (RBS) del gen *ydjg* se clona, y se efectuó PCR utilizando cebadores que tienen las siguientes secuencias para expresar el gen, una enzima recombinante.

SEQ ID No. 15: *ydjg*-F 5'-cattcaagcttaatgagaggcaatgacatgagcg-3'

SEQ ID No. 16: *ydjg*-R 5'-tcggaaHcttcatgcaaggcacaajcgc-3'

- 10 Para el PCR, la solución de reacción es Ex taq de Takara Shuzo co., Ltd. se utiliza y una solución que tiene una composición de 5 µl de 10 x Takara amortiguador Ex Taq, 4 µl de una mezcla de dNTP, 30 ng de un ADN plantilla, 1 µl de 10 µl de solución cebadora y 0.5 µl de Takara Ex Taq se prepararon al agregar agua de tal manera que esta tiene un volumen de 50 µl, seguido por capas de 30 µl de aceite mineral. Para la reacción, un ciclo de las 3 etapas: desnaturalización (94°C, 30 segundos), recocido (55°C, 1 minuto) y elongación (72°C, 1 minuto) se repite 35 veces utilizando un amplificador de PCR (ASTECCo., Ltd., PC-700). El PCR anteriormente descrito amplifica un fragmento de ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 1.0 kbp. Después de la reacción, el aceite mineral en capas se extrae con 0.3 ml de hexano, y la capa de hexano se remueve. Este procedimiento se repite 3 veces, seguido por la reducción de la presión durante 1 minuto, para remover de esta manera el aceite mineral. Desde 50 µl de la solución de reacción así obtenida, el fragmento de PCR se purifica utilizando GENECLAN (Bio 101). Específicamente, 300 µl de solución Nai incluida en el kit se agrega y se mezcla, y 10 µl de solución de glóbulos de vidrio se agregan y se mezclan.
- 15 La mezcla se le permite permanecer a 4°C durante 15 minutos y se centrifuga para precipitar los glóbulos de vidrio al que el fragmento de ADN se absorbe, y se remueve el sobrenadante. 500 µl de una solución de lavado nueva incluida en el kit se agregaron adicionalmente para suspender los glóbulos de vidrio, y la mezcla se centrifuga aparte para remover el sobrenadante. La operación de lavado utilizando la solución de lavado nueva se repite 3 veces. Luego, los glóbulos se secan bajo presión reducida, y después del secado, se dejaron 15 µl de agua esterilizada para suspenderlos. La mezcla se calienta a 55°C durante 15 minutos y se centrifuga, para producir de esta manera 12 µl de sobrenadante que contiene el fragmento de ADN.
- 20
- 25

- Una operación de insertar el fragmento de ADN purificado en un vector de expresión se efectuó como sigue. Específicamente, 0.5 µg de un plásmido de expresión (pUC 119: fabricado por Takara Shuzo co., Ltd.), 1 µl de enzimas de restricción Hind III y EcoRI de Tajara Shuzo Co., Ltd., y 2 µl de 10 x K de amortiguador de k, que es una enzima de restricción de Takara Shuzo co., Ltd., se agregan a 10 µl de una solución de fragmento de ADN, y se agrega agua esterilizada de tal manera que la mezcla tenga un volumen de 20 µl, seguido por mezcla. La solución de reacción se le deja reaccionar a 36°C durante 2 horas. Después de la reacción que las enzimas de restricción, el fragmento de ADN y el vector de expresión fueron aisladas con GENECLAN y ligadas uno al otro. Específicamente, 300 µl de la solución de Nai incluida en el kit se agrega y se mezcla en 20 µL de la solución de reacción de la enzima de restricción, y 10 µl de la solución de glóbulos de vidrio se agregan a esta y se mezclan. La mezcla se le permite permanecer a 14°C durante 15 minutos y luego se precipita para centrifugar los glóbulos de vidrio a los cuales el fragmento de ADN y el vector de expresión fueron absorbidos, y se remueve el sobrenadante. Luego, 500 µl de una solución de lavado nueva incluidos en el kit se agregan para suspender los glóbulos de vidrio y la suspensión se centrifuga para el sobrenadante. La operación de lavado utilizando una solución de lavado nueva se repite 3 veces. Luego, los glóbulos de vidrio se secan bajo presión reducida, y después del secado, 15 µl de agua esterilizada se agregan para suspenderlas. La mezcla se calienta a 55°C durante 15 minutos y se centrifuga, para producir 12 µl de sobrenadante que contiene y el vector de expresión. El procedimiento removió los fragmentos de ADN pequeños que tienen un tamaño de aproximadamente 50 bp o menos y fueron generados mediante enzimas de restricción, para producir de esta manera un fragmento de ADN de interés del vector de expresión.
- 30
- 35
- 40

- 45 10 µl de una solución del kit-1 Takara Ligation (Takara Shuzo Co., Ltd.) se agregan a 10 µl de la solución así preparada, y a la mezcla se le deja reaccionar a 164°C durante 1 hora. La solución se utiliza para transformar las células competentes (Takara Shuzo Co., Ltd.: DH5α). Específicamente, 5 µl de la solución de reacción de ligación se agregan a esta y se mezclaron en 60 µl de una solución de célula competente descongelada a 4°C, y dejada a 0°C durante 30 minutos, y luego a 42°C durante 45 segundos y a 0°C durante 2 minutos. 500 µl de una solución SOC (2% bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 20 mM de glucosa, 10 mM de MgSO₄, y 10 mM de MgCl₂) se agregan a esta, seguido por el cultivo de recuperación a 36°C durante 1 hora. 100 µl de la solución de cultivo se aplico a un medio de agar LB (1.5% de bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7.0, 1.5% de agar) que contiene 50 µg/ml de ampicilina, 40 µg/ml X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-Galactosido), y 1 mM de IPTG (tiogalactopiranosido). El cultivo se efectuó a más de 37°C durante 16 horas. El cultivo produjo *Escherichia Coli* transformada durante introducir el plásmido anteriormente descrito como colonias blancas, y fueron seleccionadas las colonias. Las colonias así separadas de la *Escherichia Coli* transformada en un medio de cultivo LB que contiene ampicilina (50 µg/ml). De las células cultivadas de la *Escherichia Coli* transformada, se separa un plásmido de ADN y se purifica utilizando un kit de purificación de plásmido (QIA filter Plasmid Midi Kit, QIAGEN). El ADN del plásmido así
- 50
- 55

obtenido se confirmó que tenía un fragmento de ADN que tenía un tamaño de aproximadamente 1.0 kbp, que corresponde a un gen *ydjg* de interés.

5 Luego, para confirmar la actividad del escilo-inositol deshidrogenasa, las cepas microbianas aisladas como colonias se transfirieron a 100 µl de un medio ofLB (1% de bacto-triptono, 0.5% de extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0) que contienen 50 µg/ml de ampicilina, y ellos se cultivan a 36°C durante 7 horas. 0.3 ml de 200 mM de solución de tiogalactopiranosido se agrega a la solución de cultivo, y las células fueron adicionalmente cultivadas a 36°C durante 3 horas. Después de completar el cultivo, las células fueron recolectadas mediante centrifugación y lavadas con solución salina fisiológica una vez. Luego, las células lavadas fueron suspendidas en 3 ml de 0.6% de solución de Tritón X-100, y las células fueron rotas mediante ondas ultrasónicas a 4°C. La solución se centrifuga, y se sacaron 2.8 ml del sobrenadante (solución de enzima). 1.2 de sulfato de amonio se agregaron al sobrenadante para salinizar las proteínas a 4°C. Las proteínas salinizadas fueron recolectadas mediante centrifugación (15,000 rpm, 20 min), y se remueve el sobrenadante. Los precipitados fueron disueltos en 2.5 ml de 20 mM de amortiguador de Tris (pH 7.0), y la solución se centrifuga (15,000 rpm, 20 min) de nuevo. El sobrenadante se aplicó sobre una columna de Sefadex G-25 (farmacia K.K.: 14 ml) equilibrada con 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0). La elución se efectuó con 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0), y el eluado se desaliniza. Los procedimientos produjeron 3.5 ml de una solución de enzima cruda del producto de gen *ydjg*.

La actividad de la escilo-inositol deshidrogenasa se mide como sigue: 5 µl de solución de reacción (200 mM de amortiguador Tris (pH 8.0), 2% NADPH, y 1% de escilo-inososa) y 5 µl de una solución de enzima se mezclaron y se les deja reaccionar a 36°C durante 30 minutos, y luego 500 µl de agua se agregaron inmediatamente, seguido por la medición de la absorbancia a 340nm. La disminución en la absorbancia a 340 nm se mide con base en un valor blanco para la solución de prueba obtenida al utilizar agua en lugar de solución de enzima. La solución de enzima se diluye como se requería.

Mientras tanto, el producto de la reacción de enzima se mide como sigue: 10 mg de escilo-inososa, 40 mg de NADPH, y 10U de enzima se les deja reaccionar en 1.0 ml de 100 mM de amortiguador Tris (pH 8.0) a 36°C durante 4 horas, y el tratamiento con calor se efectuó a 80°C durante 10 min, seguido por enfriamiento. Luego, 100 µl de una resina de intercambio de catión de base fuerte, 100 ml de una resina de intercambio de anión de ácido fuerte, y 10 µg de un carbón activado, se agregaron, y la mezcla se agita y se centrifuga. Luego, el sobrenadante se diluye 2 veces, y se efectuó la medición mediante HPLC (Shodex Asahipak NH2P-50 4E F 4.6 250 mm: Shodex) utilizando un detector RI bajo la condición de una columna de 40°C y una tasa de flujo de fase móvil de 1.5 ml (80% de acetonitrilo). Como un resultado, el producto de gen *ydjg* se encontró que tiene una actividad alta de escilo-inositol dehidrogenasa, y 100% del producto fue escilo-inositol obtenido mediante reducción, mientras el mio-inositol que es un isómero de este no se detecta. Como resultado, la solución de una enzima recombinante derivada del gen *ydjg* se encontró que tiene una alta actividad de escilo-inositol dehidrogenasa, y el producto del gen fue escilo-inositol dehidrogenasa. Mientras tanto, en el producto obtenido mediante la solución de reacción de escilo-inososa, solamente se detecta escilo-inositol, y se encontró que la enzima reduce estereo específicamente la escilo-inososa en escilo-inositol. Mientras tanto, la secuencia del gen *ydjg* se muestra en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia del amino ácido que corresponde a este se muestra en la SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 12 (Comprativo)

<Aislamiento y expresión del ADN homólogo estimado de homología con el gen *ydjg* de Escherichia Coli, y propiedades de esta>

De la estimación de la estructura tridimensional del gen *ydjg* producto del Escherichia Coli basado en la secuencia de amino ácido, el producto se estimó que pertenece a la familia de las oxidoreductasas glucosa-fructosa. La familia también incluye mio-inositol 2-dehidrogenasa (EC 1.1.1.18), y la secuencia involucrada en una unión de NAD en la secuencia de amino ácido se encontró que tiene alta homología. Más aún, la identificación de la secuencia de amino ácido de un sitio involucrado en el sustrato que según el análisis de estructura de rayos X de la oxidoreductasa de glucosa-fructosa y la investigación de las proteínas que tienen parcialmente la misma secuencia de aminoácido y son homólogas con el producto de gen *ydjg* revelaron que hay proteínas homólogas en muchas bacterias gran-negativas y bacterias gran-positivas.

De aquellas bacterias, los ADN homólogos fueron investigados con base en la homología del gen *ydjg* de Escherichia Coli. Como resultado, el gen *ydjg* de Escherichia Coli se encontró que tiene homología con el gen *Atu4375* y el *Atu3234* en el genoma de *Agrobacterium tumefaciens* C58 ATCC33970, *BG14057* en el genoma del *Bacillus subtilis* 168ATCC23857, *Xcc3438* en el gen de genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913, y el gen *Atu4375* y el gen *Atu3234* el gen en genoma de *Agrobacterium* sp. AB 10121 FERM P-17383 este es conocido como un microorganismo que tiene la capacidad de convertir directamente mio-inositol en escilo-inositol. Por lo tanto, aquellos ADN fueron aislados y expresados.

Para obtener los ADN candidatos anteriormente descritos, los genomas totales de *Agrobacterium tumefaciens* C58 ATCC33970, *Bacillus subtilis* 168 ATCC23857, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913, y *Agrobacterium*

sp. AB10121 FERM P-17383 a ser utilizados como plantillas fueron extraídos como sigue. Para el *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, y *Agrobacterium* sp. AB10121, un ciclo de platino de cada *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, y *Agrobacterium* sp. AB 10121 que habían sido cultivado en el medio de cultivo inclinado LB (1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0, 1.5% de agar) se inocularon en 100 ml de un medio de recipiente LB (1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0) y cultivado aeróbicamente durante 18 horas a 27°C y recolectados. 15 ml de solución salina EDTA (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0) y 50 mg de lisozima se agregan a los glóbulos de célula para suspenderlos, seguidos por reacción a 374°C durante 2 horas. Después del tratamiento, 0.5 ml de una solución al 25% de SDS se agregan a la solución para lisar completamente las células, y se agregaron 3 ml de fenol para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, se centrifuga la solución, y el sobrenadante se saca. se agrega 20 ml de 2-propanol a la solución para producir un ADN genómico crudo. El ADN genómico crudo producido se precipita mediante centrifugación, y el sobrenadante se remueve, seguido por secado bajo presión reducida. Posteriormente, el ADN genómico crudo seco se disolvió adicionalmente en 3 ml de solución TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), y luego 0.01 mg de ARNasa se agrega a este para permitir la reacción a 36°C durante 2 horas para degradar el ARN. Más aún, 0.01 mg de proteinasa K se agrega y se le deja reaccionar a 36°C durante 2 horas para degradar las proteínas. Luego, 1 ml de solución mezclada fenol-cloroformo (1:1) se agrega, y la mezcla se agita lentamente para desnaturalizar la ARNasa y la proteinasa K. La mezcla se separa en dos fases mediante centrifugación, y la capa superior (fase acuosa) se saca y se ajusta a un pH 5.2 al agregar 0.3 ml de una solución de acetato de sodio 3 M. 3 ml de 2-propanol se agregan a la solución para producir ADN genómico. El ADN genómico se obtenido se precipita mediante centrifugación, y el sobrenadante se remueve, seguido por secado bajo presión reducida. El ADN genómico seco se disuelve en 3 ml de Solución TE, y el proceso de la operación de agregar 1 ml de la solución mezclada de fenol-cloroformo (1:1) a la operación de disolver ADN en 3 ml de la solución TE se repite de nuevo, seguido por centrifugación. Luego, de la misma manera que anteriormente, un volumen igual de 2-propanol se agrega al sobrenadante a un pH 5.2, para preparar de esta manera soluciones de ADN genómicos de *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, y *Agrobacterium* sp. AB 10121, respectivamente. Los ADN genómicos así obtenidos fueron utilizados como soluciones de ADN plantillas para PCR.

Un ciclo de platino de *Bacillus subtilis* 168 ATCC23857 que se había cultivado en un medio de cultivo inclinado LB (1% bacto-triptona, un 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0, 1.5% de agar) se inocularon en 100 ml de un medio de recipiente LB (1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0) y se cultiva aeróbicamente a 36°C durante 18 horas. Luego, 1 ml de medio se agregan a 100 ml de medio de frasco LB preparado como anteriormente, y los microorganismos se cultivaron durante 4 horas, seguido por recolección. Después de recolección, se extrajo el genoma total de la misma manera que en el método utilizado para *Agrobacterium*.

Luego, se efectuó PCR utilizando los cebadores que tiene las siguientes secuencias para clonar el gen *Atu4375* y el gen *Atu3234* en el genoma del *Agrobacterium tumefaciens* C58, gen *Atu4375* y gen *Atu3234* en el genoma del *Agrobacterium* sp. AB10121, y el gen *Xcc3438* en el genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (incluyendo todos los RBS), para expresarlos como enzimas recombinantes.

SEQ ID No. 17: *Atu4375*-F 5'-ggcggatccmgaaggtagtcatgtcct-3'

SEQ ID No. 18: *Atu4375*-R 5'-attggaagcttcgaggctgcoacctag-3'

SEQ ID No. 19: *Atu3234*-F 5'-ttggatccmcaggggaaatanatggc-3'

SEQ ID No. 20: *Atu3234*-R 5'-gcccaagcttgtttacagcttcac-3'

SEQ ID No. 23: *Xcc3438*-F 5'-tcggaattcgcgttgcggtgaatcgtttcaatg-3'

SEQ ID No. 24: *Xcc3438*-R 5'-ataagaagcttgctcagtcgctgctgttcctc-3'

Se efectuó PCR utilizando cebadores que tienen la siguientes secuencia para clonar el gen *BG14057* en el genoma de *Bacillus subtilis* 168 (incluyendo RBS) para expresarlo como una enzima recombinante. La "a" en la posición 10 del terminal 5'- es originalmente "t" pero es alterada a "a" para expresión en *Escherichia coli*.

SEQ ID No. 21: *BG14057*-F 5'-aggaattc gatgataacgcgtttaaaggggagaa-3'

SEQ ID No. 22: *BG14057*-R 5'-ttctgcagmagtgctccagcataatggttcg-3'

Para PCR, la solución de reacción Ex taq de Takara Shuzo Co., Ltd. se utilizo, y la solución que tiene una composición de 5 µl de 10 X amortiguado Takara ExTaq, 4 µl de una mezcla dNTP, 30 ng de Un ADN plantilla, 1 µl de 10 µM de solución cebadora, y 0.5 µl de Takara ExTaq se prepara al agregar agua de tal manera que esta tiene un volumen de 50 µl, seguido por capas de 30 µl de aceite mineral. Para la reacción, un ciclo de tres etapas: desnaturalización (94°C, 30

segundos), recocido (52°C, 55°C, o 58°C (Ver Tabla 3), 1 minuto), y elongación (72°C, 1 minuto), se repite 35 veces utilizando amplificador PCR (ASTECH Co., Ltd., PC-700). El PCR anteriormente descrito amplifica un fragmento ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 1.1 kbp.

Genes blancos	Temperatura de recocido
Para el gen Atu4375 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 ATCC33970	55°C
Para el gen Atu4375 de <i>Agrobacterium</i> AB 10121 FERM P-17383	55°C
Para el gen Atu3234 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 ATCC33970	52°C
Para el gen Atu3234 de <i>Agrobacterium</i> AB 10121 FERM P-17383	52°C
Para el gen BG 14057 de <i>Bacillus subtilis</i> 168 ATCC23857	55°C
Para el gen Xcc3438 de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i> ATCC33913	58°C

5 Después de la reacción, el aceite mineral en capas se extrae con 0.3 ml de hexano, y la capa de hexano se remueve. Este procedimiento se repite tres veces, seguido por reducción de la presión durante un minuto, para remover de esta manera el aceite mineral. De 50 µl de una solución de reacción así obtenida, se purificaron Fragmentos de PCR utilizando GENE-CLEAN (Bio101). Específicamente, 300 µl de una solución Nal incluido en el kit se agrega y se mezcla, y 10 µl de solución de glóbulos de vidrio se agregan y se mezclan. La mezcla se permitió permanecer a 4°C durante 15 minutos y se centrifuga para precipitar los glóbulos de vidrio a los cuales se adsorbieron los fragmentos de ADN, y el sobrenadante se remueve. 500 µl de una solución de lavado nueva incluido en el kit se agrega adicionalmente para suspender los glóbulos de vidrio, y la mezcla se centrifuga para remover el sobrenadante. La operación de lavado utilizando una solución de lavado nueva se repite tres veces. Luego, los glóbulos de vidrio se secan bajo presión reducida, y después del secado, se agregan 15 µl de agua esterilizada para suspenderlos. La mezcla se calienta a 55°C durante 15 minutos y se centrifuga, para producir de esta manera 12 µl de un sobrenadante que contiene fragmentos ADN.

20 Una operación de insertar el fragmento de ADN purificado en un vector de expresión se efectúa en cada una de las combinaciones como sigue. Específicamente, 0.5 µg de un plásmido o de expresión (pUC118: elaborado por Takara Shuzo Co.,Ltd.), 1 µl de dos clases de enzimas de restricción de Takara Shuzo Co., Ltd., y 2 µl de 10 X amortiguador K, que es una solución de amortiguador de enzima de restricción de Takara Shuzo Co., Ltd., se agregan a 10 µl de una solución de fragmento de ADN, y se agrega agua esterilizada de tal manera que la mezcla tiene un volumen de 20 µl, seguido por la mezcla. La solución de reacción se le deja reaccionar a 36°C durante 2 horas. Como el gen Atu3234 y la cepa AB10121 contienen el sitio HindIII, el tratamiento con enzimas de restricción no se condujo, y después el aislamiento, se liga a un vector pT7Blue (elaborado por Novagen).

Genes blancos	plásmidos de expresión	Enzimas de restricción utilizadas
Gen Atu4375 de A.tume.C58	pUC118	BamH I, Hind III/K amortiguado
Gen Atu4375 de AB10121	pUC 118	BamH I, Hind III/K amortiguado
Gen Atu3234 de A.tume.C58	pUC 118	BamH I, Hind III/K amortiguado
Gen Atu3234 de AB 10121	pT7Blue	No utilizado
Gen BG14057 de B.sub.168	pUC118	EcoR I, Pst I/H amortiguado
Gen Xcc3438 de X. camp.	pUC118	EcoR I, Hind III/K amortiguado

Después la reacción de las enzimas de restricción, fragmento ADN y vector de expresión fue aislados con GENE-CLEAN y se ligaron una al otro. Específicamente, 300 µl de una solución de Nal incluido en el kit se agregan a 20 µl de la solución de reacción de enzima de restricción y se mezcla, y 10 µl de la solución de glóbulos de vidrio se agrega y se mezcla. La mezcla se deja permanecer a 4°C durante 15 minutos y luego y se centrifuga para precipitado los glóbulos de vidrio a los cuales el fragmento ADN y vector de expresión fueron absorbidos, y el sobrenadante se remueve. Más aún, 500 µl de una solución de lavado nueva incluido en el kit se agregan para suspender los glóbulos de vidrio, y la suspensión se centrifuga para remover el sobrenadante. La operación de lavado utilizando la solución de lavado nueva se repite tres veces. Luego, los glóbulos de vidrio fueron secaron bajo presión reducida, y después del secado, se agregan 15 µl de agua esterilizada para suspenderlos. La mezcla se calienta a 55°C durante 15 minutos y se centrifuga, para producir de esta manera 12 µl de un sobrenadante que contiene un fragmento ADN y vector de expresión. El procedimiento removió los fragmentos de ADN pequeños generados por las enzimas de restricción que tienen tamaños de aproximadamente 50 bp o menos, para producir de esta manera un fragmento ADN de interés y vector de expresión.

10 µl de una solución kit 1 Takara Ligation (Takara Shuzo Co., Ltd.) se agrega a 10 µl de una solución así preparada, y la mezcla se le deja reaccionar a 16°C durante 1 hora. La solución se utiliza para transformar las células competentes (Takara Shuzo Co., Ltd.: DH5a). Específicamente, 5 µl de solución de reacción de ligación se agregan a 60 µl de una solución de célula competente descongelada a 4°C y mezclada, y se dejaron a 0°C 30 minutos, luego a 42°C durante 45 segundos y 0°C durante 2 minutos. 500 µl de una solución SOC (2% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 20 mM glucosa, 10 mM MgSO₄ y 10 mM MgCl₂) se agregan a esta, seguido por cultivo de recuperación a 36°C durante 1 hora. 100 µl de solución de cultivo se aplico a un medio agar LB (1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0, 1.5% de agar) que contiene 50 µg /ml de ampicilina, 40 µg /ml X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-Galactosido), y 1 mM IPTG (tiogalactopiranosido). El cultivo se efectuó adicionalmente a 37°C durante 16 horas. El cultivo produjo *Escherichia coli* transformada al introducir el plásmido anteriormente descrito como colonias blancas, y las colonias se seleccionaron. Las colonias así separadas de *Escherichia coli* transformadas fueron cultivadas en un medio líquido LB que contiene ampicilina (50 µg /ml). De las células cultivadas de la *Escherichia coli* transformada, el ADN del plásmido se separa y purifico utilizando un kit de purificación de plásmido (QIA filter plasmid Midi Kit, QIAGEN). El ADN de plásmido así obtenido se confirmo porque cada uno tenía un fragmento de ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 1.0 a 1.1 kbp, que corresponde al ADN de interés.

Luego, para confirmar la actividad escilo-inositol deshidrogenasa, las cepas microbianas aisladas como colonias se transfirieron a 100 ml de un medio LB (1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0) que contiene 50 µg /ml de ampicilina, y ellas se cultivan a 36°C durante 7 horas. 0.3 ml de 200 mM de solución de tiogalactopiranosida se agrega a la solución de cultivo, y las células fueron además cultivadas a 36°C durante 3 horas. Después completar el cultivo, las células se recolectaron mediante centrifugación y se lavaron con solución salina una vez. Luego, las células lavadas fueron suspendidas en 3 ml de 0.6% de solución Triton X-100, y las células fueron rotas mediante ultrasónica a 4°C. La solución se centrifuga, y se sacaron 2.8 ml de sobrenadante (solución de enzima). 1.2 g de sulfato de amonio se agrega al sobrenadante para salar las proteínas a 4°C. Las proteínas saladas fueron recolectadas mediante centrifugación, y se removió el sobrenadante. Los precipitados fueron disueltos en 2.5 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0), y a la solución se centrifuga de nuevo. Se aplico el sobrenadante sobre una columna de Sephadex G-25 (14 ml) equilibrada con 20 mM de Amortiguador Tris (pH 7.0). La elución se efectuó con 20 mM De solución de amortiguador Tris (pH 7.0), y el eluado se desalinea. Los procedimientos dieron un rendimiento de 3.5 ml de solución de enzima cruda del producto gen ydgJ.

La actividad de la escilo-inositol deshidrogenasa se mide como sigue: 5 µl de una solución de reacción (200 mM de Amortiguador Tris (pH 8.0), 2% de NADPH, y 1% de escilo-inososa) y 5 µl de una solución de enzima se mezclaron para permitirle reacción a 36°C durante 30 minutos, y luego 500 µl de agua se agregaron inmediatamente, seguido por la medición de la absorbencia a 340 nm. La disminución en la absorbencia a 340 nm se mide con base en un valor blanco para una solución de prueba obtenida al utilizar agua en lugar de la solución de enzima. La solución de enzima cómo se requirió.

Mientras tanto, el producto de reacción de enzima se midió como sigue: 10 mg de escilo-inososa, 40 mg de NADPH, y 10U de la enzima se les deja reaccionar en 1.0 ml de 100 mM de Amortiguador Tris (pH 8.0) a 36°C durante 4 horas, y el tratamiento con calor se efectúa a 80°C durante 10 min, seguido por enfriamiento. Luego, 100 µl de una resina de intercambio de catión de base fuerte, 100 µl de una resina de intercambio de anión de ácido fuerte, y 10 mg de carbono activado se agregaron, y la mezcla se agita y se centrifuga. Luego, el sobrenadante se diluye 2-veces, y se efectuó la medición mediante HPLC (Shodex Asahipak NH2P-50 4E F 4.6 250 mm: Shodex) utilizando un detector RI o condiciones de una temperatura de columna de 40°C y una tasa de flujo de fase móvil de 1.5 ml (80% acetonitrilo). Como resultado, el producto del gen *Atu4375* y el producto del gen *Atu3234* de *Agrobacterium tumefaciens* C58, el producto del gen *BG 14057* de *Bacillus subtilis* 168, el producto del gen *Xcc3438* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, y el producto del gen *Atu4375*, y el producto del gen *Atu3234* de la cepa AB 10121 se encontraron que tienen una alta actividad de enzima, y 100% del producto fue escilo-inositol obtenido mediante reducción, mientras que mio-inositol que es un isómero de este no se detecta. Como resultado, las enzimas recombinantes derivadas de los genes anteriormente mencionados se encontró que tiene una alta actividad de escilo-inositol deshidrogenasa, y los productos del gen fueron escilo-inositol deshidrogenasa. Mientras tanto, los productos obtenidos mediante la reacción

de reducción de escilo-inososa, solo se detecta escilo-inositol, y las enzimas se encontró que las enzimas reducen estéreo específicamente la escilo-inososa en escilo-inositol.

5 La secuencia del gen Atu4375 derivado de *Agrobacterium tumefaciens* C58 se muestra en SEQ ID NO: 3, la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 4, La secuencia del gen Atu3234 se muestra en SEQ ID NO: 5, y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 6. Mientras tanto, La secuencia del gen BG14057 derivado de *Bacillus subtilis* 168 se muestra en SEQ ID NO: 7, la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 8, La secuencia del gen Atu4375 derivado de AB10121 se muestra en SEQ ID NO: 9, la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 10, La secuencia del gen Atu3234 se muestra en SEQ ID NO: 11, la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 12, La secuencia del gen Xcc3438 derivado de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* se muestra en SEQ ID NO: 13, y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 14. Mientras tanto, de los resultados del análisis de secuencia de nucleótido de un plásmido incluyendo gen Atu4375 y gen Atu3234 de AB10121 (Hokkaido System Science Co., Ltd.), la homología entre el gen Atu4375 de *Agrobacterium tumefaciens* C58 y gen Atu4375 de AB10121 fue 89% para la secuencia del nucleótido, y 96% para la secuencia del aminoácido, mientras que la homología entre el gen Atu3234 de *Agrobacterium tumefaciens* C58 y gen Atu3234 de AB10121 fue 87% para la secuencia del nucleótido y 95% para la secuencia del aminoácido .

Ejemplo 13 (Comparativo)

<El aislamiento del ADN que codifica SIDH1 que se produce de *Acetobacter* sp. AB10281 FERM BP-10119>

20 De las enzimas purificadas, una solución de enzima que contiene SIDH1 se aplicó sobre una membrana de PVDF (Immobilon PSQ: elaborado por Millipore Corporation), y absorbida a la membrana PVDF. La membrana de PVDF se saco, tino con tinte azul brillante Coomassie (Rapid CBB KANTO: elaborado por KANTO CHEMICAL CO., INC.), decolorada, y secada, seguida por análisis con un analizador de aminoácido N-terminal (elaborado por Hewlett-Packard Development Company). Como resultado, del N-terminal, se identificó una secuencia:

25 Met-Lys-Arg-Lys-Leu-Arg-Ile-Gly-Leu-Ile-Gly-Ser-Gly-Phe-Met-Gly-Arg-Thr-His-Ala-Phe-Gly-Tyr-Se .Luego la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos se predijo, y se construyeron las siguiente dos clases de cebadores.

SEQ ID NO: 29: SIDH1-F1 atgaarcgnaarytncgiatygggytiatygg

SEQ ID NO: 30: SIDH1-F2 ggytatygggygcgnacaygcittyggyta

Luego, con base en las secuencias de nucleótidos de varias escilo-inositol deshidrogenasas obtenidas en los ejemplos 10 a 12, se prepararon los siguientes dos cebadores que incluyen regiones de alto consenso con las secuencias

30 SEQ ID NO: 31: SIDH1-B1 ggyttrcrmmgayracrtgrstrcc

SEQ ID NO: 32: SIDH1-B2 artgwirtgrttggigt

Mientras tanto, como ADN genómico de AB10281 va a ser utilizado como una plantilla, una solución de ADN genómico de AB10281 se prepara utilizando un glóbulo de célula (peso húmedo aproximadamente 400 mg) preparado en Ejemplo 9 de la misma manera que el método de preparar ADN descrito en el Ejemplo 12.

35 Para PCR, La solución de reacción Ex taq de Takara Shuzo Co., Ltd. se utilizó, en la solución que tiene una composición de 5 µl de 10 X amortiguado Takara ExTaq, 4 µl de mezcla dNTP, 30 ng de un ADN plantilla, 1 µl de cada de los 10 µM de las regiones cebadora (SIDH1-F1 y SIDH1-B1), y 0.5 µl de Takara ExTaq se prepararon al agregar agua de tal manera que esta tiene un volumen de 50 µl, seguido por capas 30 µl de aceite mineral. Para la reacción, se utiliza el Amplificador PCR (ASTECCo., Ltd., PC-700), y un ciclo de tres etapas: desnaturalización (94°C, 30 segundos), recocido (50°C, 30 segundos), y elongación (72°C, 1 minuto), se repite 35 veces.

45 La electroforesis revela que el PCR anteriormente descrito amplifica un fragmento ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 0.3 kbp. Más aún, la banda de la posición de 0.3 kbp se excedió del gel, una parte de una solución de gel homogenizado se utiliza como una plantilla (2 µl), y se prepara una solución de reacción que tiene la misma composición que se describió anteriormente excepto que una combinación de los cebadores se cambia a SIDH1-F2 y SIDH1-B2. Para la reacción, se utiliza el amplificador PCR (ASTECCo., Ltd., PC-700), y un ciclo de tres etapas: desnaturalización (94°C, 30 segundos), recocido (46°C, 30 segundos), y elongación (72°C, 1 minuto), se repite 35 veces. La electroforesis revela que el PCR amplifica un fragmento ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 0.25 kbp.

50 El Fragmento ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 0.25 kbp se excedió del gel, y el fragmento de PCR se purifica utilizando GENE-CLEAN (elaborado por Bio101). Específicamente, de la misma manera que el método de

purificación descrito en el Ejemplo 12 excepto que el gel se disuelve en solución NaI, se obtuvieron 12 µl de una solución del Fragmento ADN.

5 Luego, el fragmento de ADN purificado se ligó a un vector pT7Blue. Específicamente, 0.5 µg del vector pT7Blue y 10 µl de una solución de kit-I Takara Ligation (Takara Shuzo Co., Ltd.) se agregan a 10 µl de solución de fragmento de ADN, y la mezcla se le deja reaccionar a 16°C durante 1 hora. La solución se utiliza para transformar las células competentes (DH5α, Takara Shuzo Co., Ltd.). La operación de la transformación y el aislamiento del plásmido de los transformantes se efectuaron de la misma manera que en el Ejemplo 12.

10 El plásmido obtenido se sometió a análisis de secuencias de nucleótidos (Hokkaido System Science Co., Ltd.) utilizando cebadores universales (R-20mero y U-19mero), y aproximadamente un tercio de la región media anterior de la secuencia de nucleótido de un gen que codifica la enzima se revela.

15 Luego, para determinar la longitud completa de la secuencia de nucleótido, el ADN genómico de AB10281 se digirió completamente con una enzima de restricción BamHI, y la solución de Fragmento ADN resultante se purifica utilizando GENE-CLEAN (elaborado por Bio101), seguido por una auto ligación del fragmento. Específicamente, 10 µl de una solución kit-I Takara Ligation (Takara Shuzo Co., Ltd.) se agrega a 10 µl de solución de fragmento del ADN, y la mezcla fue se le deja reaccionar a 16°C durante 1 hora. Después de la reacción, el ADN se purifica utilizando GENE-CLEAN (elaborado por Bio101), y a la solución se utiliza como una solución de plantilla ADN para PCR inverso.

SEQ ID No: 33: SIDH1-INV-F gctcgtcaacgatcctgaaattgat

SEQ ID No: 34: SIDH1-INV-B ttcgctgcagcttcatcggaatat

SEQ ID No: 35: SIDH1-INV3 ccctcaatttccggcggt

20 Para PCR inverso, se utilizó la solución de reacción Ex taq de Takara Shuzo Co., Ltd., y la solución que tiene una composición de 5 µl de 10 X amortiguado Takara ExTaq, 4 µl de mezcla dNTP, 30 ng de un ADN plantilla, 1 µl de cada 10 µM de solución cebadora (una combinación de SIDH1-INV-F y SIDH1-INV-B, o una combinación de SIDH1-INV-F y SIDH1-INV3), y 0.5 µl de Takara ExTaq se prepara al agregar agua de tal manera que esta tiene un volumen de 50 µl, seguido por capas 30 µl de aceite mineral. Para la reacción, se utiliza un amplificador PCR (ASTEC Co., Ltd., PC-700), y un ciclo de tres etapas: desnaturalización (94°C, 30 segundos), recocido (50°C, 1 minuto), y elongación (72°C, 2 minutos), se repite 35 veces. La electroforesis revela que los fragmentos de ADN amplificados con PCR anteriormente descrito tienen tamaños de aproximadamente 2.7 kbp y aproximadamente 1.8 kbp. Luego, las bandas en las posiciones de aproximadamente 2.7 kbp y aproximadamente 1.8 kbp se escindieron del gel, y los fragmentos de PCR se purifica utilizando GENE-CLEAN (elaborado por Bio101), para producir de esta manera 10 µl de Soluciones de fragmento de ADN. Los dos fragmentos de AND resultantes se sometieron a análisis de secuencia de nucleótido (Hokkaido System Science Co., Ltd.) utilizando los cebadores utilizados en PCR para determinar la secuencia de nucleótido completa de los genes que codifica la enzima.

Luego, se efectuó el PCR utilizando los cebadores que tienen las siguientes secuencias para clonar el gen SIDH1 (que incluye un sitio RBS) derivado de la cepa AB10281 para expresarla como una enzima recombinante.

35 SEQ ID No: 36: 281SIDH1-F gctggatcccgccttattgtgaata

SEQ ID No: 37: 281SIDH1-R tatgaattcgttatgccttctcatgctgtcg

40 Para PCR, se utilizó la solución de reacción Ex taq de Takara Shuzo Co., Ltd., y la solución que tiene una composición de 5 µl de 10 X amortiguado Takara ExTaq, 4 µl de mezcla dNTP, 30 ng de un ADN plantilla, 1 µl de cada 10 µM de la solución cebadora, y 0.5 µl de Takara ExTaq se prepararon al agregar agua de tal manera que esta tiene un volumen de 50 µl, seguido por capas 30 µl de aceite mineral. Para la reacción, un ciclo de tres etapas: desnaturalización (94°C, 30 segundos), recocido (55°C, 1 minuto), y elongación (72°C, 1 minuto), se repite 35 veces utilizando amplificador PCR (ASTEC Co., Ltd., PC-700). El PCR anteriormente descrito amplifica un fragmento de ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 1.2 kbp.

45 El fragmento de ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 1.2 kbp se purifica utilizando GENE-CLEAN (elaborado por Bio101), para producir de esta manera 12 µl de una solución de fragmento de ADN. Para un procedimiento para insertar el fragmento de ADN en un vector de expresión, 0.5 µg de un plásmido de expresión (pUC119), 1 µl de enzimas de restricción (BamHI, EcoRI) de Takara Shuzo Co., Ltd., y 2 µl de 10 X amortiguador K para enzimas de restricción de Takara Shuzo Co., Ltd. se agregan a 10 µl de la solución de fragmento de ADN, y se agrega agua esterilizada con el fin de tener un volumen de 20 µl, seguido por la mezcla. La solución de reacción fue se le deja reaccionar a 36°C durante 2 horas.

La recolección del fragmento de ADN de la solución de reacción, purificación, reacción de ligación, y transformación de las células competentes (DH5a, Takara Shuzo Co., Ltd.) se efectuaron de la misma manera que en el Ejemplo 12. Más aún, la expresión de escilo-inositol deshidrogenasa y la medición de la actividad se efectuaron de la misma manera que en el Ejemplo 12, y el producto del gen se identificó como escilo-inositol deshidrogenasa.

- 5 Como resultado, la secuencia de nucleótido de un gen que codifica SIDH1 derivado de La cepa AB10281 mostrada en SEQ ID NO: 27, aunque su secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 28.

Ejemplo 14 (Comparativo)

<Estudio de las propiedades de la enzima de la presente invención, varias clases de escilo-inositol deshidrogenasa>

- 10 El siguiente método se efectuó para estudiar las propiedades enzimáticas del SIDH1, SIDH2, y SIDH3 derivado de cepa AB 10281, que se había obtenido mediante purificación de enzima en el Ejemplo 9; el producto del gen ydgJ derivado de *Escherichia coli*, que se había obtenido de la enzima recombinante en el Ejemplo 11; y los productos de Atu4375 y gen Atu3234 de *Agrobacterium tumefaciens* C58, el producto del gen BG14057 de *Bacillus subtilis* 168, el producto del gen Xcc3438 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, y el producto del gen Atu4375 y el producto del gen Atu3234 de la cepa AB10121, todos los que se había obtenidos as las enzimas recombinantes en el Ejemplo 12, y los resultados se muestran en Tabla 5.

- 15 Tabla 6 muestra la homología en la secuencia del aminoácido. La homología de solamente los aminoácidos común en toda la secuencia fue baja (aproximadamente 5%), pero la homología que incluyen los aminoácidos que tienen propiedades similares fue particularmente alta en NAD o NADP que une los dominios en aproximadamente 30% de La secuencia de N-terminal. Más aún, la secuencia de lisineprolina localizada adelante del centro de la secuencia involucrada en la unión de la nicotinamida, que es un sitio de reacción de oxidoreducción del NAD o NADP, fue altamente conservada. La asparagina en la posición 27 adelante del C-terminal de la secuencia de lisina-prolina y la secuencia ácido aspártico-(3 aminoácidos)-histidina cerca al centro de la secuencia también estuvieron altamente conservadas, de tal manera que ellas se consideran como secuencias importantes involucradas en la unión del sustrato para las estructuras tridimensionales estimadas. En la tabla, las secuencias comunes son representadas con el símbolo "**", y los aminoácidos que tienen propiedades similares son representados por el símbolo ":" o el símbolo ".", y asparagina en la posición 27 hacia el C-terminal de la secuencia de lisina-prolina y la secuencia ácido aspártico-(3 aminoácidos)-histidina cerca al centro de la secuencia es representado por sombreado.

- 20 En la comparación de los pesos moleculares, el peso molecular de la enzima de la presente invención derivado de AB10281 se calcula con base en los resultados de SDS-PAGE utilizando un marcador de peso molecular (preteñido estándar (tipo amplio rango): elaborado por Bio-Rad Laboratories, Inc.), aunque que los pesos moleculares de otras enzimas de la presente invención se estimaron de las longitudes completas de los genes. Como resultado, los pesos moleculares de las enzimas de la presente invención (SIDH1, SIDH2, y SIDH3) derivado de AB10281, que se había obtenido mediante la purificación de enzimas, fueron 46 k Dalton, 42 k Dalton, y 40 k Dalton, respectivamente. Mientras tanto, el peso molecular de la enzima de la presente invención derivado de ydgJ de *Escherichia coli* K-12, que se había obtenidas como enzima recombinante en el Ejemplo 11, fue 38.2 k Dalton; los pesos moleculares de las enzimas de la presente invención derivados del gen Atu4375 y gen Atu3234 de *Agrobacterium tumefaciens* C58, que se había obtenidas como enzimas recombinantes en el Ejemplo 12, fueron 41.3 k Dalton y 42.4 k Dalton, respectivamente; los pesos moleculares de las enzimas de la presente invención derivado del gen BG14057 de *Bacillus subtilis* 168, el gen Xcc3438 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, y gen Atu4375 y gen Atu3234 de AB 10121 fueron 40.1 k Dalton, 38.5 k Dalton, 41.4 k Dalton, y 42.5 k Dalton, respectivamente. Esto es, las enzimas de la presente invención, escilio-inositol deshidrogenasa, se encontraron que tienen un peso molecular de 38 a 46 k Dalton.

- 25 Las propiedades de asociación de las enzimas de la presente invención se determinaron mediante: medición de la actividad de la fracciones obtenidas por fraccionamiento utilizando una columna de filtración de gel (Tosoh Corporation: 2000SWXL); calcular el peso molecular de las correspondientes fracciones de peso molecular; y dividir los valores calculados por los pesos moleculares de la enzima. Los valores resultantes se representaron como enteros. Como resultado, de la enzima de presente invención, escilo-inositol deshidrogenasas, que tiene un peso molecular de 80 k a 110 k Dalton, y se considero que forman dímeros o trímero en las condiciones no desnaturalizadas.

- 30 La selectividad de la coenzima de la enzima de presente invención se determino mediante: mezclar 5 µl de la solución de reacción (200 mM de amortiguador Tris (pH 8.0), 2% de NADPH o NADH, y 1% de escilo-inososa) con 5 µl de una solución de enzima; y permitirle a la mezcla reaccionar a 36°C durante 30 min. Después de la reacción, 500 µl de agua se agregaron inmediatamente a este, y de la absorbencia a 340 nm se mide. Del valor blanco, se prepara una solución de prueba al utiliza agua en lugar de solución de enzima, se mide la disminución en la absorbencia a 340 nm. La solución de enzima cómo se requirió. Los resultados indicaron que escilo-inositol deshidrogenasas de las enzimas de presente invención fueron capaces de utilizar tanto NADPH y NADH como coenzimas, pero tienen la actividad relativa de coenzima como se muestra en Tabla 5. Se revelos que muchas enzimas tienen alta reactividad con NADPH.

5 El pH óptimo de las enzimas de presente invención se determinó al: mezcla 5 µl de la solución (200 mM de amortiguador de fosfato (pH 5.0 a 9.0), 2% de NADPH, y 1% de escilo-inososa) con 5 µl de una solución de enzima; y permitirle la mezcla reaccionar a 36°C durante 30 min. Después de la reacción, 500 µl de agua se agregaron inmediatamente a este, y se mide la absorbencia a 340 nm. El valor blanco de la solución de prueba preparado utilizando agua en lugar de la solución de enzima, se mide la disminución en de la absorbencia a 340 nm. La solución de enzima se diluye según se requiera. Como resultado, las enzimas de presente invención, escilo-inositol deshidrogenasa, se encontró que tiene un pH óptimo como se muestra en Tabla 5. Esto es, las enzimas de presente invención se encontraron que reaccionan en rango amplio de pH 5 a 9. Mientras tanto, también se revela que habían enzimas que tienen una actividad máxima en el lado ácido (aproximadamente pH 6), enzimas que tienen una actividad máxima en la región neutra (aproximadamente pH 6.5 a 7.5), y enzimas que tienen una actividad máxima en el lado alcalino (aproximadamente pH 7.5 a 9).

15 La termoestabilidad de las enzimas de la presente invención se determinó así: se trata una solución de enzima a una temperatura determinada de 10 min; enfriar la solución; mezclar la solución de enzima con 5 µl desde una solución de reacción (200 mM de amortiguador fosfato (pH 5.0 a 9.0), 2% de NADPH, y 1% de escilo-inososa); y permitir en la mezcla reaccionar a 36°C durante 30 min. Posteriormente, 500 µl de agua se agregaron inmediatamente este, y de la absorbencia a 340 nm se mide. Del valor blanco de una solución de prueba preparada al utilizar agua en lugar de la solución de enzima, la disminución en de la absorbencia a 340 nm se mide. La solución de enzima se diluye según se requiera. La actividad de a grupo tratado a 20°C durante 10 min se definió como 100%, y las actividades relativas se compararon. Como resultado, la termoestabilidad de las enzimas de la presente invención, escilo-inositol deshidrogenasa, se encontró que varían dependiendo de las enzimas como muestran en la Tabla 5, y se encontró que la estabilidad varía en el rango de 40 a 60°C dependiendo de las enzimas.

25 Se determinan los efectos de metal pesado en las enzimas de la presente invención: mezclar 5 µl de una solución de reacción (200 mM de amortiguador Tris (pH 8.0), 2% de NADPH, 1% de escilo-inososa, y 2 mM de de metal pesado) con 5 µl de una solución de enzima ; y permitir en la mezcla reaccionar a 36°C durante 30 min. Después de la reacción, 500 µl de agua se agregaron inmediatamente este, y se mide la absorbencia a 340 nm. Del valor blanco de una solución de prueba preparada al utilizar agua en lugar de la solución de enzima, se mide la disminución en de la absorbencia a 340 nm. La solución de enzima se diluye según se requiera. Se utilizaron CaCl₂, CoCl₂, ZnSO₄, MgSO₄, SnCl₂, NiCl₂, y MnSO₄ como sales metálicas. La actividad del grupo sin adición se definió como 100%, y las actividades relativas se compararon. Como resultado, como se muestra en la Tabla 5, las enzimas de la presente invención, escilo-inositol deshidrogenasa, fueron activadas al menos en la presencia del ión Co²⁺ y la mayoría de las enzimas se inhibieron en la presencia del ión Sn²⁺. En contraste, la enzima derivada de Bacillus subtilis 168 se activa en la presencia del Zn²⁺.

35 Los valores Km de las enzimas de la presente invención para escilo-inososa se determinaron por: mezclar 5 µl de una solución de reacción (200 mM de Amortiguador Tris (pH 8.0), 2% de NADPH, y 0.001 a 2.5% de escilo-inososa) con 5 µl de una solución de enzima; y permitir a la mezcla reaccionar a 36°C durante 30 min. Después de la reacción, 500 µl de agua se agregaron inmediatamente a esta, y se mide la absorbencia a 340 nm. A partir del valor negro de una solución de prueba preparada utilizando agua en lugar de la solución de enzima, se mide la disminución en la absorbencia a 340 nm. La solución de enzima se diluye según se requiera. Se calculan los valores Km mediante la gráfica de recíproca. Como un resultado, como se muestra en la Tabla 5, las enzimas de la presente invención, escilo-ionositol deshidrogenasa, se encuentra que tienen valores Km en el rango de 2.6 a 12.6 mM.

40 La especificidad al sustrato de las enzimas de la presente invención se determina al medir la actividad relativa de oxidación con respecto a la reactividad a el escilo-inositol. Los isómeros de inositol incluyen escilo-inositol (SI), mio-inositol (MI), D-qui-ro-inositol (DCI), L-qui-ro-inositol (LCI), epi-inositol (EI), muco-inositol (MUI), alo-inositol (AI), y neoinositol (NI). La Tabla 5 muestra el grupo de isómeros a los cuales la enzima muestra una actividad relativa de no menos de 70%, un grupo de isómeros a los cuales la enzima muestra una actividad relativa de menos de 70% y no menos de 20%, y un grupo de isómeros a los cuales la enzima muestra una actividad relativa de menos de 20%.

45 La especificidad al sustrato se determina al: mezclar 50 µl de una solución de reacción (1% de isómeros de inositol (o 0.4%: solo para neo-inositol), 200 mM de amortiguador Tris (pH 8.0), 0.002% de NADP⁺, 0.002% de diaforasa, y 0.01% de azul de nitrotetrazolio) con 50 µl de una solución de enzima; y medir el incremento en la absorbencia a 545 nm a 25° C cada tres minutos utilizando un lector de microplaca. El índice de reacción se calcula a partir de los incrementos de absorbencia en los tiempos respectivos. Como un resultado, se encuentra que la especificidad del sustrato varía levemente dependiendo de las clases de las enzimas y de la correlación con las estructuras de los isómeros de inositol, también se encuentra que aquellas enzimas tienen por lo menos actividad de escilo-inositol deshidrogenasa y actividad mio-inositol deshidrogenada.

Tabla 5: Lista de propiedades de escilo-ionositol deshidrogenasa

Cepas	E. coli	Acetobacter sp.			Bacillus sub.
Cepa	K12 (ATCC10798)	AB10281 (FERM P-18868)			cepa 168 (ATCC23857)
Nombre del gen o nombre de la enzima	Gen ydgJ	SIDH1	SIDH2	SIDH3	Gen BG14057
Peso molecular k Dalton	38.2k	46k (SDS- PAGE)	42k (SDS- PAGE)	40k (SDS- PAGE)	40.1k
Propiedad de asociación	Dímero	Trímero	Dímero	Dímero	Dímero
Termoestabilidad	Estable a 45° C o menos	Estable a 45° C o menos	Estable a 60° C o menos	Estable a 60° C o menos	Estable a 40° C o menos
Actividad relativa de coenzima	NADPH: NADH =100: 9	NADPH: NADH =100: 112	NADPH: NADH =100: 1	NADPH: NADH =100: 3	NADPH: NADH =100: 52
PH óptimo	pH 7.5-9.0	pH 5.5-6.5	pH 5.5-6.5	pH 5.5-6.5	pH 7.0-8.5
Efectos de metal pesado: activación	Co	Co	Co	Co, Mn	Co, Mn,Zn
Efectos de metal pesado: inhibición fuerte	Sn, Zn	Sn, Zn	Sn, Zn	Sn, Zn	Sn
Producto de reacción de reducción	Solo SIS→SI	Solo SIS→SI	Solo SIS→SI	Solo SIS→SI	Solo SIS→SI
Valores Km para escilo-inososa	3.9 mM	7.6 mM	10.6 mM	12.6 mM	3.5 mM
Actividad relativa específica a sustrato (70% o más)	SI, MI, DCI	SI	SI	SI	SI, MI
Actividad relativa específica a sustrato (20 a 70%)	LCI, EI, Mul	MI	MI	MI	DCI, EI, AI, NI
Actividad relativa específica a sustrato (menos de 20%)	AI, NI	DCI, LCI, EI, Mul, AI, NI	DCI, LCI, EI, Mul, AI, NI	DCI, LCI, EI, Mul, AI, NI	LCI, Mul

(continuación)

Cepa	C58 (ATCC33970)		AB10121 (FERM P-17383)		pv. Campestris (ATCC33913)
Nombre del gen o nombre de la enzima	Gen Atu4375	Gen Atu3234	Gen Atu4375	Gen Atu3234	Gen Xcc3438
K Dalton	41.3k	42.4k	41.4k	42.5k	38.5k
Propiedad de asociación	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero
Termoestabilidad	Estable a 50° C o menos	Estable a 40° C o menos	Estable a 50° C o menos	Estable a 40° C o menos	Estable a 40° C o menos
Actividad relativa de coenzima	NADPH: NADH =100: 9	NADPH: NADH =100: 18	NADPH: NADH =100: 6	NADPH: NADH =100: 20	NADPH: NADH =100: 34
PH óptimo	pH 6.5-8.5	pH 7.0-8.5	pH 6.5-8.5	pH 7.0-8.5	pH 6.5-7.5
Efectos de metal pesado: activación	Co, Mn	Co, Mn, Ca	Co, Mn	Co, Mn, Ca	Co
Efectos de metal pesado: inhibición fuerte	Sn, Zn				
Producto de reacción de reducción	Solo SIS→SI				
Valores Km para escilo-inososa	9.2 mM	2.6 mM	9.8 mM	3.1 mM	9.1 mM
Actividad relativa específica a sustrato (70% o más)	SI, MI, DCI, EI	SI, MI, DCI, EI, LCI	SI, MI, DCI, EI	SI, MI, DCI, EI, LCI	SI, DCI
Actividad relativa específica a sustrato (20 a 70%)	LCI, Mul	Mul	LCI, Mul	Mul	MI
Actividad relativa específica a sustrato (menos de 20%)	AI, NI	AI, NI	AI, NI	AI, NI	EI, LCI, Mul, AI, NI
Abreviaturas SIS: escilo-inososa, SI: escilo-inositol, MI: Mio-inositol, DCI: D-qui-ro-ino-sitol, LCI: L-qui-ro-ino-sitol, LCI: L-qui-ro-ino-sitol, EI: Epi-ino-sitol, Mul: Muco-ino-sitol, AI: Alo-ino-sitol, NI: Neo-ino-sitol					

E. coli. ydgJ	AQLRPGA-----OSTDYFNAILSYPCR-----RVILHGTMLAAAESARYIVH
X. camp. Xcc3438	QRORTQA-----RSDDYFNVVLRYPRL-----RVILHAGSLVADGSLRFVNH
B. sub. BG14057	MAQRENA-----ETVDYFHLTLDYGKL-----QAIIYGGSIYPANGPRYQIH
A. tume. Atu4375	TSFVPCR-----QLDSDANILLRYDSG-----AKGMLNASQI AVGNENALSLRVY
AB10121Atu4375	TSFVPCR-----QLDSDANILLRYESG-----AKGMLNASQI AVGNENALSLRVY
A. tume. Atu3234	HTFVEGR-----RLDONAHVMRFRFKPKGGKOPARGMLNCSQVAVGHEHGLKIRLY
AB10121Atu3234	HTFVEGR-----RLDONAHVMRFRFKPKGGKOPAKGLLNCSQVAVGHEHGLKVRVY
AB10281SIDH1	VTVIKTRPDGKGGTRAVEVDDIGRALLRFENG-----ATGSVEGNIIATGRTHQHDFFEY

* : : :

E. coli. ydgJ	GSRGSYKYGLDPOEERL-----KNGERLP-----QEDWGYDMRD-----GVLTRYEGEERVEETL
X. camp. Xcc3438	GTRGSYLQVADTQEDQL-----RAGRPPG-----TAGRGMPLP-----GTLTRYDDEGRVHTHQ
B. sub. BG14057	GKDSSEIKYGDGGEDAL-----RAGRKPE-----DSSNGADYPEFYGLTTIRGSDIKKTETI
A. tume. Atu4375	GDKGGLLENHHRVPDELWF---TPYGEPKRLITRNGAGAGAAAANRVSRYVPSGHPEGYLEGFA
AB10121Atu4375	GEKGGLLENHHRVPDELWF---TPYGEPKRLITRNGAGAGAAAANRVSRYVPSGHPEGYLEGFA
A. tume. Atu3234	GDKAGLENTQADPNYLWF---TKLGEPKQLITRGGAGAGAAAARVTRIPSGHPEGYLEAFA
AB10121Atu3234	GDKAGLENTQADPNYLWF---TKLGEKQLITRGGAGAGAAAARVTRIPSGHPEGYLEAFA
AB10281SIDH1	GTKGALAFTOORFNELHFFSSTDARGRKGFRRIEAGPEHAPYGLFCVAPGHQLGFND---

* :

E. coli. ydgJ	LT-VPGNYPAYYAAIRDALNGDGENPV-PASQAIGVIELIELGIESAQIRATLCLA-----
X. camp. Xcc3438	PDGVPQDYRHCYAAFRDAMAGTAPPVY-SAADAVRLNELLLELAQRGAALGOVLEGNSS
B. sub. BG14057	PS-VNGSYLTYRKAESIREGAALPV-TAEQINVIRIEAAMESSEKRTIMLEH-----
A. tume. Atu4375	TI-YREAADAIIAKREBETAAGEVIYP-GMEDGLAGLAFIDAAVRSSQ-TSTIIVGIDI---
AB10121Atu4375	TI-YREAADAIIAKREGKAAAGEVIYP-GMEDGLAGLAFIDAAVRSSQ-TSTIINIDI---
A. tume. Atu3234	TI-YTEAHAIEARRTGSALDKAVIYP-TVDDGVKGVAFVTACIESGKNGGIVKLVK---
AB10121Atu3234	TI-YTEAHAIEARRTGSVLDKAVIYP-TVDDGVKGVAFVTACIESGKNGGIVKLVK---
AB10281SIDH1	-----LKAIEVARYLEALAGHPEPFNFRAGLRITLTVETIHASS-KSAATRDVPTDK

. : : : : : : :

E. coli. ydgJ	-----
X. camp. Xcc3438	D-----
B. sub. BG14057	-----
A. tume. Atu4375	-----
AB10121Atu4375	-----
A. tume. Atu3234	-----
AB10121Atu3234	-----
AB10281SIDH1	LOAKSRONEKA

Ejemplo 15 (Comparativo)

Producción de escilo-inositol utilizando una enzima

5 El método de producción de la presente invención requiere de dos clases de enzimas, mio-inositol 2-deshidrogenasa y la enzima de la presente invención. Aquí, se mostrará un ejemplo utilizando una enzima recombinante de mio-inositol 2-

deshidrogenasa que es un producto del gen BG10669 derivado de *Bacillus subtilis* 168 ATCC23857 y un enzima recombinante de la enzima de la presente invención codificada mediante ADN de la presente invención (gen ydgJ derivado de *Escherichia coli* K12: SEQ ID NO:1).

- 5 Primero, para obtener una enzima recombinante de la mio-inositol 2-deshidrogenasa que es un producto del gen BG10669 derivado de *Bacillus subtilis* 168 ATCC23857, se efectuó el siguiente experimento. Se efectuó PCR utilizando cebadores que tienen la siguiente secuencia para clonar el gen BG10669 derivado de *Bacillus subtilis* 168 para expresarla como una enzima recombinante

SEQ ID NO: 25: BG10669-F 5'-ttgggatccgatgagtttacgtattggcgttaattg-3'

SEQ ID NO: 26: BG10669-R 5'-aaactgcagtttagtttgaactgttgaataagattgata-3'

- 10 Para PCR, la solución de reacción Ex taq de Takara Shuzo Co., Ltd. Se utilizo, y la solución que tiene una composición de 5 µl de 10 X amortiguador Takara Ex Taq, 4 µl de la mezcla dNTP, 30 ng de un ADN plantilla, 1 µl de cada 10 µM de solución cebadora, y 0.5 µl de Takara Ex Taq se prepararon al agregar agua de tal manera que esta tiene un volumen de 50 µl, seguido por capas de 30 µl aceite mineral. Para la reacción, un ciclo de tres etapas: desnaturalización (94°C, 30 segundos), recocado (53°C, 1 minuto), y elongación (72°C, 1 minuto), se repito 35 veces utilizando un amplificador de PCR (ASTEC Co., Ltd., PC-700). El PCR se amplifica un fragmento de ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 1.0 kbp. Después de la reacción, el aceite mineral en capas se extrae con 0.3 ml de hexano, y una operación para remover la capa de hexano se repite tres veces, seguido por reducción de presión durante 1 minuto, para remover de esta manera el aceite mineral. De 50 µl de la solución de la reacción si obtenida, se purifica el fragmento de PCR utilizando GENE CLEAN (Bio101). Específicamente, 300 µl de la solución NaI incluida en el kit se agregó y se mezcló, 10 µl de la solución de glóbulos de vidrios se agrega y se mezcla. A la mezcla se le permite permanecer a 4°C durante 15 minutos y se centrifuga para precipitar los glóbulos de vidrio a los cuales se absorbió el fragmento de ADN, y luego el sobrenadante se remueve. 500 µl de la solución de lavado nueva incluida en el kit se agrega además para suspender los glóbulos de vidrio, de la mezcla se centrifuga para remover el sobrenadante. La operación de lavado utilizando la solución de lavado nueva se repite tres ves. Luego, los glóbulos de vidrio se secan bajo presión reducida, en 15 µl de agua esterilizada se agrega para suspenderlas. La mezcla se calienta a 55°C durante 15 minutos y se centrifuga, para producir de esta manera 12 µl de sobrenadante que contiene el fragmento de ADN.

- A una operación de insertar el fragmento de ADN purificado en un vector de de expresión se efectuó como sigue. Específicamente, 0.5 µg de un plasmado de expresión (pUC118: elaborado por Takara Shuzo Co., Ltd.), 1 µl de cada de las enzimas de restricción BamHI PstI de Takara Shuzo Co., Ltd., y 2 µl de 10 X amortiguador K, que es un amortiguador de enzima de restricción de Takara Shuzo Co., Ltd., se agregan a 10 µl de la solución del fragmento de ADN, y se agrega agua esterilizada de tal manera que la mezcla tiene un volumen de 20 µl, seguido por mezcla. La solución de reacción se le deja reaccionar a 36°C durante 2 horas. Después de la reacción de las enzimas de restricción, el fragmento de ADN y el vector de expresión se aislaron con GENE CLEAN y se ligaron uno al otro. Específicamente, 300 µl de la solución de NaI incluida en el kit se agregan a 20 µl de la solución de reacción de enzima de restricción y se mezclaron, y luego 10 µl de la solución de glóbulos de vidrio se agregan y se mezclan. La mezcla se le permite permanecer a 4°C durante 15 minutos luego se centrifuga para precipitar los glóbulos de vidrio a los cuales el fragmento de ADN y el vector de expresión fueron adsorbidos, y se remueve el sobrenadante. Entonces, 500 µl de la solución de lavado nueva incluida en el kit se agrega para suspender los glóbulos de vidrio, y la suspensión se centrifuga para remover el sobrenadante. La operación de lavado utilizando la solución de lavado nueva se repite tres veces. Luego, los glóbulos de vidrio se secan bajo presión reducida, y después del secado, 15 µl de agua esterilizada se agrega para suspenderlos. La mezcla se calienta a 55°C durante 15 minutos y se centrifuga, para producir de esta manera 12 µl del sobrenadante que contiene el fragmento de ADN y el vector de expresión. El procedimiento removió fragmentos de ADN pequeña generados mediante las enzimas de restricción que tienen tamaño de aproximadamente 50 bp o menos, para producir de esta manera un fragmento de ADN de interés y el vector de expresión.

- 45 10 µl de la solución del kit 1 de Takara Ligation (Takara Shuzo Co., Ltd.) se agrega a 10 µl de la solución así preparada, y la mezcla se le deja reaccionar a 16°C durante 1 hora. La solución se utiliza para transformar células competentes (Takara Shuzo Co., Ltd.: DH5α). Específicamente, 5 µl de la solución de reacción de ligación se agregan a 60 µl de la solución de célula competente no congelada a 4°C y mezclada, y se dejo de 30 minutos a 0°C, a 42°C durante 45 segundos y 0°C durante 2 minutos. 500 µl de la solución SOC (2% Bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 20 mM de glucosa, 10 mM de MgSO₄, y 10 mM de MgCl₂) se agregan a esta, seguida por cultivo de recuperación a 36°C durante 1 hora, 100 µl de solución de cultivo se aplico sobre un medio de agar LB (1 % Bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7.0, 1.5% de agar) que contiene 50 µg/ml de ampicilina, 40 µg/ml de X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-Galactosido), y 1 mM IPTG (tiogalactopiranosido). El cultivo se efectuó adicionalmente a 37°C durante 16 horas. El cultivo produjo *Escherichia coli* formado al introducir los plasmados anteriormente descritos como colonias blancas, y se seleccionaron las colonias. Las colonias así separadas de la *Escherichia coli* formadas se cultivaron en un medio líquido LB que contiene ampicilina (50 µg/ml). De las células cultivadas de la *Escherichia coli* transformada, se separa el ADN y el plásmido se purifica y se utiliza un kit de purificación de plásmido (QIA filter Plasmid Midi Kit, QIAGEN). El ADN del plásmido así obtenido se confirmo que tiene

un fragmento de ADSN que tiene un tamaño de aproximadamente 1.0 k bp, que corresponde al gen BG10669 de interés.

5 Luego, para confirmar la actividad del escilo-inositol 2-deshidrogenasa, las células aisladas como colonias se transfirieron a 30 botellas de 100 ml de un medio LB (1% Bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7.0) que contiene 50 µg/ml de ampicilina, y ellas se cultivan a 36°C durante 7 horas. 0.3 ml de 200 mM de solución de tiogalactopiranosido se agrega a cada una de 100ml de solución de cultivo, y las células fueron adicionalmente
10 cultivadas a 36°C durante 3 horas. Después de completar el cultivo, las células fueron recolectadas mediante centrifugación y lavadas con solución salina fisiológica una vez. Luego, las células lavadas fueron suspendidas en 3 ml de 0.6% de Triton de solución de X-100, y las células fueron rotas mediante onda ultrasónica a 4°C. La solución se centrifuga, y se sacaron 84 ml de sobrenadante (solución de enzima). 36 g de sulfato de amonio se agregaron al sobrenadante para salar las proteínas a 4°C. Las proteínas resultantes se recolectaron mediante centrifugación, y se remueve el sobrenadante. Los precipitados se disolvieron en 75 ml de 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0), y la solución se centrifuga de nuevo. El sobrenadante se aplico sobre una columna Sephadex G-25 (Farmacia K.K.) (400ml) equilibrada con 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0), y la elusión se efectuó con 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0).
15 La elusión se efectuó con 20 mM de amortiguador Tris (pH 7.0), y el eluado se desanilizo. Los procedimientos produjeron 105 ml de una solución de enzima cruda del producto del gen BG10669.

La actividad reductora de la mio-inositol 2-deshidrogenasa se mide como se describe adelante. 5 µl de la solución de reacción (200 mM de amortiguador Tris (pH 8.0), 2% de NADH, 1% escilo-inososa) se mezcla con 5 µl de solución de enzima, y la mezcla se le deja reaccionar a 36°C durante 30 min. Inmediatamente después de la reacción, 500 µl de agua se agrega, y se le dio la absorbancia de 340 nm. Del valor blanco de un tubo de ensayo preparado al utilizar agua en lugar de la solución de enzima, se mide la disminución en la absorbancia a 340 nm. La solución de enzima se diluye como según se requería, y la enzima se confirmo por tener una actividad para reducir la escilo-inososa. De otra parte, para medir una actividad oxidación, 50 µl de una solución de reacción (1% mio-inositol o escilo-inositol, 200 mM de amortiguador Tris (pH 8.0), 0.002% de NAD⁺, 0.002% de diaforasa, y 0.01% de azul nitrotetrasolido) se mezclaron con
20 50 µl de una solución de enzima, y el incremento en la absorbancia a 545 nm se mide a 25°C cada tres minutos utilizando un lector de micro placa. La tasa de reacción se calcula de los incrementos en la absorbancia en los respectivos tiempos. Como resultado, la enzima preparada se confirmo por tener una actividad para oxidar el mio-inositol pero que no tiene actividad para oxidar el escilo-inositol.

La solución de enzima mio-inositol 2-deshidrogenasa así preparada y la solución de enzima cruda de escilo-inositol
30 deshidrogenasa preparada en el ejemplo 11 (105 ml de solución de enzima preparada de 3 L de una solución de cultivo (escala de 30 veces)) se utilizaron para efectuar una reacción para convertir el mio-inositol en escilo-inositol. Para preparar una solución de reacción, 200 g de mio-inositol, 70 ml de 5% escilo-inososa, 130 mg de CoCl₂, y 250 mg de MgSO₄·7H₂O se mezclaron, y el volumen se ajustó a 750 ml al agregar agua, seguido por calentar hasta 50°C para disolver el mio-inositol. La solución se activa a 36°C y se ajustó a un pH de 8.0 con una solución acuosa de NaOH 1N, y el volumen se ajustó a 790 ml al agregar agua. 105 ml de solución de enzima cruda de mio-inositol 2-deshidrogenasa, 105 ml de solución de enzima cruda de escilo-inositol deshidrogenasa, 70 mg de NADP⁺ fueron agregados a este a 36°C, y la temperatura de la solución que tiene un volumen de aproximadamente 1L se mantuvo 36°C, seguido por reacción con agitación lenta. La solución de reacción realmente se volvió acida, de tal manera que se ajustó a un pH de 8.0 con NaOH 1N. 42 horas más tarde, los cristales de escilo-inositol fueron generados en la solución de reacción, de tal manera que se obtuvo la solución de reacción blanca. La solución se filtró utilizando un papel de filtro para recolectar escilo-inositol cristalino (peso húmedo 73 g). 3 L de agua se agrega al sólido, y el sólido se disolvió a 50°C. El volumen de la mezcla se ajustó 4.5 L al agregar agua, y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. La solución de reacción se centrifuga (8,000 rpm, 20 minutos) para remover las materias insolubles, el sobrenadante se paso a través de una columna llena con 100 ml de resina de intercambio de catión de base fuerte, una columna llena con 100 ml de resina de intercambio de catión de ácido fuerte, y una columna llena con 50 ml de carbón activado, en este orden, para producir de esta manera cada uno de un eluado. Posteriormente, 500 ml de agua se pasaron a través de cada una de las columnas y se lavaron, para producir de esta manera cada una de las soluciones de lavado. El eluado y la solución de lavado se mezclaron y se concentraron.
40
45

Como resultado de la concentración, los microcristales comenzaron a ser cristalizados en la medida en que el volumen de la solución se volvió más pequeña, la solución se concentra hasta el peso de los contenidos se convirtió en 130 g. la solución concentrada se enfrió a 4°C se le permite permanecer durante toda la noche. Posteriormente, la sustancias de suspensión se filtraron, y los cristales de escilo-inositol sobre papel de filtro se lavaron con una cantidad pequeña de agua, seguido al secarse 105°C durante 3 h. la escilo-inositol resultante fue de cristales blancos (61 g), y el análisis de RMN y los análisis de HPLC revelaron que los cristales no contienen otras impurezas y tienen una pureza del 99% o más. El rendimiento de mio-inositol fue del 31 %. Mientras tanto, la solución de reacción que se había separado mediante filtración podría ser también utilizada, y cuando se disolvieron allí 64 g de mio-inositol, se cristalizó adicionalmente escilo-inositol cristalino.
50
55

Ejemplo 16

Formación de complejo escilo-inositol/ácido bórico y estudio sobre la condición de formación.

ES 2 404 554 T3

100 g de polvo de escilo-inososa se disuelve en 500 ml de agua caliente, y la solución se enfrió a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega agua de tal manera que la solución tiene un volumen de 900 ml. La solución se ajustó a un pH de 7.5 con una solución acuosa de NaOH 5N, y el agua se agrega adicionalmente con el fin de tener un volumen de 1 L.

- 5 5.9 g de polvo de NaBH₄ se agrega gradualmente a la solución durante 15 minutos con agitación para efectuar una reacción de reducción. La temperatura de la solución de reacción se incrementa hasta 38°C debido al calor de la reacción. 30 minutos más tarde, 67.5 g de ácido bórico y 72.2 g de NaCl se disolvieron en la solución de reacción que se había enfriado a 32°C, para preparar de esta manera una solución en la cual se forma el complejo. El pH de la solución fue de 5.9
- 10 Luego, 100 ml de la solución, en la cual se forma el complejo y se ajustó a pH 6.0 con una solución acuosa de NaOH 8N, se suministro en un recipiente plástico de 200 ml con una cubierta, y 100 ml de la solución, en la cual se forma el complejo y se ajustó a pH 7.0 con una solución acuosa de NaOH 8N, se suministro de la misma manera que anteriormente. Adicionalmente, se dispersaron cada uno de los 100 ml de la solución en la cual se forma el complejo y cada uno de los cuales se ajustó a pH 8.0, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 12.0, o 12.8.
- 15 En aquellas soluciones a las que se le ajustó el pH, se inició la formación gradual de precipitados. Los precipitados se separaron mediante filtración cada tercer día, y el filtrado se ajustó a un pH predeterminado con una solución acuosa de NaOH 8N y luego se regresó al recipiente original. Los precipitados resultantes se secaron y luego pesados. Si todo el escilo-inositol generado mediante reducción forma un complejo de escilo-inositol/ácido bórico y se obtienen como precipitados, el peso de los precipitados sería de 61.8 g. por lo tanto, los pesos de los precipitados obtenidos de las respectivas soluciones ajustadas a pH se integraron cada tercer día, los valores obtenidos al dividir los valores integrados por rendimiento teórico (61.8 g) se definieron como las tasas de recuperación de los precipitados del complejo de escilo-inositol/ácido bórico.
- 20

Los valores así obtenidos se muestran adelante.

Las partes grises en la tabla muestran el grupo de prueba de la tasa de recuperación de más del 90%.

25

Tabla 7

pH de tratamiento	Tasa de recuperación del complejo de escilo-inositol/ ácido bórico						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
6	9.4%	17.9%	25.5%	32.4%	38.6%	44.2%	49.2%
7	21.7%	38.4%	51.2%	61.1%	68.7%	74.6%	79.1%
8	42.4%	65.7%	78.6%	85.6%	89.5%	91.6%	92.8%
9	66.9%	86.3%	91.9%	93.6%	93.6%	94.2%	64.2%
9.5	82.9%	92.9%	94.1%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%
10	57.5%	79.9%	88.6%	92.1%	93.4%	93.9%	94.1%
10.5	41.5%	64.7%	77.7%	85.0%	89.0%	91.3%	92.6%
11	36.8%	59.2%	72.8%	81.2%	86.3%	89.4%	91.3%
12	29.2%	49.4%	63.3%	72.9%	79.5%	84.1%	87.2%
12.8	25.4%	44.0%	57.6%	67.5%	74.7%	80.0%	83.8%

Como se muestra en la Tabla 7, el grupo de prueba del tratamiento a pH de 9.5 fue el más adecuado para la formación de precipitación del complejo de escilo-inositol/ácido bórico. Las tasas de recuperación de los grupos de prueba del pH 9.0, pH 9.5, y pH 10.0 alcanzaron una tasa de recuperación del 90% o más en el día 4, y se encontró que la tasa de recuperación se volvió constante del 94% a un si se extendía el periodo de prueba.

- 30 El análisis RMN del filtrado del grupo de prueba de pH 9.5 en el día 7 revela que 5.9% (p/v) mio-inositol de aproximadamente 0.2% (p/v) de mio-inositol permaneció en la solución. Esto es, se encontró que el complejo fue

sacado como precipitado mediante el método de la presente invención en el caso donde la concentración del complejo de escilo-inositol/ácido bórico es de 0.2% (p/v).

Ejemplo 17

5 Método para formar complejo de escilo-inositol/ácido bórico de la mezcla de reducción de escilo-inososa y disolver el complejo, y luego liberar y desalinizar el escilo-inositol utilizando una resina de intercambio

10 g (56 mmol) del polvo de escilo-inososa se disuelve en 50 ml de agua caliente, y la solución se enfrió a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega agua con el fin de tener un volumen de 90 ml. La solución se ajustó a un pH de 7.5 con una solución acuosa de NaOH 5N, y se agrega adicionalmente agua con el fin de tener un volumen de 100 ml.

10 0.59 g de polvo de NaBH₄ se agrega gradualmente a la solución durante 15 minutos con agitación para efectuar una reacción de reducción. La temperatura de la solución de reacción se incrementa hasta 36°C debido al calentamiento de la reacción. 30 minutos más tarde, se disolvieron 6.75 g de ácido bórico y 7.22 g de NaCl en la solución de reacción enfriada a 31°C, para preparar de esta manera una solución en la cual se forma el complejo. Luego, la solución en la cual se forma el complejo se ajustó a un pH de 9.5 con una solución acuosa de NaOH 5N, y la solución se mantuvo a un pH de 9.5 con una solución acuosa de NaOH 5N mediante un aparato "stat" de pH con agitación. 3 días más tarde, los precipitados contenidos en la solución en la cual se forma el complejo se filtraron y se lavaron con una pequeña cantidad de agua, seguido por secado, para producir de esta manera 5.71 g (20.5 mmol) del complejo escilo-inositol/ácido bórico.

20 230 ml de solución de ácido clorhídrico 1.05N se agrega a 5.71 g del complejo resultante de escilo-inositol/ácido bórico, para disolver el complejo de escilo-inositol ácido bórico y de esta manera se obtuvo una solución disuelta. La solución disuelta fue una solución ácida 0.2N. Luego, la solución disuelta se paso a través de una columna llena con 200 ml de resina de intercambio de ión con ácido fuerte (Duolite C20, tipo H+, Sumitomo Chemical Co., Ltd.) a una tasa de flujo de 2 ml/min, y eluado resultante se paso a través de una columna llena con 400 ml de resina de intercambio de ión con base fuerte (Duolite A 116, tipo OH-, Sumitomo Chemical Co., Ltd.). El eluado resultante se concentra, para producir de esta manera 3.52 g (19.5 mmol) de un polvo blanco. El análisis RMN revela que el polvo blanco fue escilo-inositol. Mientras tanto, el rendimiento de escilo-inositol proveniente de la escilo-inososa fue del 35%.

25 Ejemplo 18

Método para formar complejo de escilo-inositol/ácido bórico de la mezcla de reducción de escilo-inososa y disolver el complejo y luego liberar y cristalizar el escilo-inositol mediante precipitación con disolvente orgánico

Como materia prima, 5.71 g (20.5 mmol) de un complejo de escilo-inositol/ácido bórico que se había preparado a partir de 10g (56 mmol) de polvo de escilo-inososa de la misma manera que se utiliza en el ejemplo 17.

30 Se agregaron 5.71 g de un complejo de escilo-inositol/ácido bórico y un recipiente cónico de 100 ml con una cubierta junto con un agitador, de 22.8 ml de una solución de ácido clorhídrico de 1.83N se agrega para preparar una suspensión. Después de completar la agitación durante 1 hora, se agregan 23 ml de metanol a este, y la mezcla se agita adicionalmente. 5 horas más tarde, la suspensión se filtró, y lo sólidos se lavaron con una cantidad pequeña de metanol y se secan, para darle un rendimiento de esta manera de 3.58 g (20.0 mmol) de escilo-inositol crudo.

35 Luego, 3.58 g de escilo-inositol crudo resultante se disolvieron en 230 ml de agua, y 20 ml de resina de intercambio de ión de ácido fuerte (Duolite C20/tipo H+) y 40 ml de una resina de intercambio de ión de base fuerte (Duolite A116/tipo OH+) se agregan a esta, seguidos por agitación. Después de completar la agitación durante 30 minutos, la resina de intercambio de ión se separaron mediante filtración, y el filtrado resultante se concentro, para rendirse de esta manera 3.41 g (18.9 mmol) del polvo blanco. El análisis RMN revela que el polvo blanco fue de escilo-inositol. Mientras tanto, el rendimiento de escilo-inositol proveniente de la escilo-inososa fue del 34%.

Ejemplo 19 (Comparativo)

Método para reducir escilo-inososa, y luego liberar directamente y cristalizar escilo-inositol

45 5 g (28 mmol) de polvo de escilo-inososa se disolvieron en 40 ml de agua caliente, y la solución se enfrió a temperatura ambiente. La solución se ajustó a un pH de 7.5 con una solución acuosa de NaOH 5N y el agua se agrega adicionalmente con el fin de tener un volumen de 45 ml.

50 0.29 g de polvo de NaBH₄ se agrega gradualmente a la solución durante 15 minutos con agitación para efectuar una reacción de reducción. La temperatura de la solución de reacción se incrementa hasta 37°C debido al calentamiento de la reacción. 30 minutos más tarde, la solución de reacción que se había enfriado hasta 30°C se ajustó aun pH de 1.0 con ácido clorhídrico 5N. Posteriormente, se agrega agua con el fin de tener un volumen de 50 ml, para de esta manera preparar una solución ácida 0.1 N. luego, se agregan 25 ml de metanol a la solución con agitación. 10 minutos más

tarde, la solución comenzó gradualmente a volverse opaca, y la suspensión se agita adicionalmente durante 24 horas. 24 horas más tarde, la suspensión se filtró, y el lavado se efectuó con una cantidad pequeña de metanol, seguido por secado, para rendir de esta manera 1.55 g (8.6 mmol) de escilo-inositol crudo.

- 5 Luego, 1.55 g de escilo-inositol crudo resultante se disuelve en 120 ml de agua, y 10 ml de resina de intercambio de ión de ácido fuerte (Duolite C20/tipo H+) 20 ml de una resina de intercambio de ión de base fuerte (Duolite A116/tipo OH-) se agregaron, seguido por agitación. Después de completar la agitación durante 30 minutos, la resina de intercambio de ión se separaron mediante filtración, y el filtrado resultante se concentro, para rendir de esta manera 1.51 g (8.3 mmol) de polvo blanco. Los análisis RMN revelaron que el polvo blanco era escilo-inositol. Mientras tanto, el rendimiento del escilo-inositol proveniente de la escilo-inososa fue del 30%.

10 APLICACIÓN INDUSTRIAL

De acuerdo con la presente invención, el escilo-inositol que se está disponible como un fármaco se puede producir eficientemente. Mientras tanto, el método de producción de la presente invención tiene una ventaja de generar difícilmente isómeros.

- 15 De acuerdo con la presente invención, el complejo de escilo-inositol/ácido bórico se puede formar eficientemente de una mezcla que contiene escilo-inositol y azúcares neutros diferentes de escilo-inositol, y la alta pureza del escilo-inositol se puede obtener eficientemente del complejo resultante de escilo-inositol/ácido bórico mediante una operación fácil.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Hokko CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.

<120> MÉTODO PARA PRODUCIR ESCILO-INOSITOL

- 20 <130> 572-C4204

<150> JP2003-353490

<151> 2003-10-14

<150> JP2003-353491

<151> 2003-10-14

- 25 <150> JP2004-18128

<151> 2004-1-27

<150> JP2004-194088

<151> 2004-6-30

<160> 37

- 30 <170> Patentin version 3.1

<210> 1

<211> 1041

<212> ADN

<213> Escherichia coli

- 35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1041)

ata gac ctg att gtc att cct aca ccc aac gat acc cat ttc ccg tta	240
Ile Asp Leu Ile Val Ile Pro Thr Pro Asn Asp Thr His Phe Pro Leu	
65 70 75 80	
gcc aaa gcg gcg ctt gag gcg ggt aaa cat gtg gtc gtt gat aaa ccc	288
Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ala Gly Lys His Val Val Val Asp Lys Pro	
85 90 95	
ttt acc gtg aca ctg tca caa gcg cga gag ctg gat gcg ctg gca aaa	336
Phe Thr Val Thr Leu Ser Gln Ala Arg Glu Leu Asp Ala Leu Ala Lys	
100 105 110	
agc ctg ggg cgt gtg ctg tct gta ttc cat aac cgt cgc tgg gat agc	384
Ser Leu Gly Arg Val Leu Ser Val Phe His Asn Arg Arg Trp Asp Ser	
115 120 125	
gat ttc ttg acg cta aaa ggt tta ctc gcg gaa ggc gtg ctg ggt gaa	432
Asp Phe Leu Thr Leu Lys Gly Leu Leu Ala Glu Gly Val Leu Gly Glu	
130 135 140	
gtt gct tac ttt gag tct cat ttt gac cgc ttc cgt ccg cag gtg cgc	480
Val Ala Tyr Phe Glu Ser His Phe Asp Arg Phe Arg Pro Gln Val Arg	
145 150 155 160	
gat cgt tgg cgt gaa cag ggc ggc cca ggc agc ggt atc tgg tac gat	528
Asp Arg Trp Arg Glu Gln Gly Gly Pro Gly Ser Gly Ile Trp Tyr Asp	
165 170 175	
tta gca cca cat ctt ctt gat cag gcc att acg ctt ttt ggt tta ccg	576
Leu Ala Pro His Leu Leu Asp Gln Ala Ile Thr Leu Phe Gly Leu Pro	
180 185 190	
gtc agc atg acg gta gat ttg gca cag tta cgg ccc gga gcg cag tcg	624
Val Ser Met Thr Val Asp Leu Ala Gln Leu Arg Pro Gly Ala Gln Ser	
195 200 205	
acc gat tat ttc cac gcc atc ttg tcc tat cca cag cgg cga gtc att	672
Thr Asp Tyr Phe His Ala Ile Leu Ser Tyr Pro Gln Arg Arg Val Ile	
210 215 220	
tta cac ggt acc atg ctg gca gcc gct gag tca gca cgg tat atc gtg	720
Leu His Gly Thr Met Leu Ala Ala Ala Glu Ser Ala Arg Tyr Ile Val	
225 230 235 240	
cat gga tcc cga ggc agt tat gtg aaa tat ggc ctc gat cca cag gaa	768
His Gly Ser Arg Gly Ser Tyr Val Lys Tyr Gly Leu Asp Pro Gln Glu	
245 250 255	
gaa cgt ctg aaa aat ggc gag cgt cta ccg cag gaa gac tgg ggc tac	816
Glu Arg Leu Lys Asn Gly Glu Arg Leu Pro Gln Glu Asp Trp Gly Tyr	
260 265 270	
gat atg cgt gat ggc gta ctt acc cgc gtg gaa ggt gag gaa cgt gtc	864
Asp Met Arg Asp Gly Val Leu Thr Arg Val Glu Gly Glu Glu Arg Val	
275 280 285	
gaa gaa acg ctg ttg acg gtg cct ggg aat tat ccg gct tac tat gcg	912
Glu Glu Thr Leu Leu Thr Val Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr Tyr Ala	
290 295 300	
gct att cgt gat gcg tta aat ggc gat ggt gaa aat ccg gtt ccg gca	960
Ala Ile Arg Asp Ala Leu Asn Gly Asp Gly Glu Asn Pro Val Pro Ala	
305 310 315 320	
agc cag gca atc cag gta atg gag ttg att gag ctg ggc atc gaa tcc	1008
Ser Gln Ala Ile Gln Val Met Glu Leu Ile Glu Leu Gly Ile Glu Ser	
325 330 335	
gcc aaa cat cgc gcg act ttg tgc ctt gca tga	1041
Ala Lys His Arg Ala Thr Leu Cys Leu Ala	
340 345	

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5 <400> 2

```

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

Asp Met Arg Asp Gly Val Leu Thr Arg Val Glu Gly Glu Glu Arg Val
275          280          285
Glu Glu Thr Leu Leu Thr Val Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr Tyr Ala
290          295          300
Ala Ile Arg Asp Ala Leu Asn Gly Asp Gly Glu Asn Pro Val Pro Ala
305          310          315          320
Ser Gln Ala Ile Gln Val Met Glu Leu Ile Glu Leu Gly Ile Glu Ser
325          330          335
Ala Lys His Arg Ala Thr Leu Cys Leu Ala
340          345

```

<210> 3

<211> 1170

<212> ADN

<213> Agrobacterium tumefaciens

5 <220>

<221> CDS

<222> (1).. (1170)

<223>

<400> 3

```

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

```

10

Ala Gly Ile Val Arg Ala Ser Asp Ser Leu Phe Val Leu Thr His Asn 130 135 140	
tac acc ggt tac gcc atg ctg cgg cag atg cgc gag atg atc gct gaa Tyr Thr Gly Tyr Ala Met Leu Arg Gln Met Arg Glu Met Ile Ala Glu 145 150 155 160	480
ggc gcc att ggc aag ctg cgc cat gtc cag gcc gaa tat gcg cag gac Gly Ala Ile Gly Lys Leu Arg His Val Gln Ala Glu Tyr Ala Gln Asp 165 170 175	528
tgg ctg acc gaa gcg gtc gaa aaa acc ggc gca aaa ggt gcg gaa tgg Trp Leu Thr Glu Ala Val Glu Lys Thr Gly Ala Lys Gly Ala Glu Trp 180 185 190	576
cgc acc gac ccc agc cgc tcc ggt gcg ggc gcc gcc atc ggc gat atc Arg Thr Asp Pro Ser Arg Ser Gly Ala Gly Gly Ala Ile Gly Asp Ile 195 200 205	624
ggc act cac gcc ttc aac gct gct gcc ttt gtg acg ggt gaa atc ccc Gly Thr His Ala Phe Asn Ala Ala Ala Phe Val Thr Gly Glu Ile Pro 210 215 220	672
agc agt ctt tat gcg gat ctc acg tcg ttt gtg ccg ggc cgg cag ctg Ser Ser Leu Tyr Ala Asp Leu Thr Ser Phe Val Pro Gly Arg Gln Leu 225 230 235 240	720
gat gac agc gcc aat att ctt ttg cgt tac gac agt ggc gcc aag ggc Asp Asp Ser Ala Asn Ile Leu Leu Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Lys Gly 245 250 255	768
atg ctc tgg gca agc cag atc gcg gtc ggc aat gaa aat gcg ctg tca Met Leu Trp Ala Ser Gln Ile Ala Val Gly Asn Glu Asn Ala Leu Ser 260 265 270	816
ctc cgg gtc tat ggc gac aag ggc ggg ctt gaa tgg cac cac cgg gtg Leu Arg Val Tyr Gly Asp Lys Gly Gly Leu Glu Trp His His Arg Val 275 280 285	864
ccg gac gag ctg tgg ttc acg ccc tat ggc gag ccg aag cgg ctg att Pro Asp Glu Leu Trp Phe Thr Pro Tyr Gly Glu Pro Lys Arg Leu Ile 290 295 300	912
acc cgc aac ggt gcg ggc gcg ggt gcc gct gca aac cgt gtc agt cgt Thr Arg Asn Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Asn Arg Val Ser Arg 305 310 315 320	960
gtg cca tcc ggg cac ccg gag gga tat ctc gag ggt ttt gcg acg att Val Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr Leu Glu Gly Phe Ala Thr Ile 325 330 335	1008
tac cgc gaa gcc gca gac gca atc atc gca aag agg gag gga gaa aca Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Ala Ile Ile Ala Lys Arg Glu Gly Glu Thr 340 345 350	1056
gcc gcc ggg gag gtg att tac ccc ggc atg gag gac ggc ctt gcg ggt Ala Ala Gly Glu Val Ile Tyr Pro Gly Met Glu Asp Gly Leu Ala Gly 355 360 365	1104
ctc gca ttc atc gat gcg gcc gtt cgc tcc agc cag acc tcg acc tgg Leu Ala Phe Ile Asp Ala Ala Val Arg Ser Ser Gln Thr Ser Thr Trp 370 375 380	1152
gtc ggg atc gac atc tag	1170

Val Gly Ile Asp Ile
385

<210> 4

<211> 389

<212> PRT

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 4

Met Ser Ser Ala Thr Lys Lys Phe Asp Ser Arg Arg Ile Arg Leu Gly
 1 5 10 15
 Met Val Gly Gly Gly Gln Gly Ala Phe Ile Gly Ala Val His Arg Ile
 20 25 30
 Ala Ala Arg Leu Asp Asp Arg Tyr Glu Leu Val Ala Gly Ala Leu Ser
 35 40 45
 Ser Asp Pro Ala Arg Ala Ala Ala Ser Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ala
 50 55 60
 Pro Glu Arg Ser Tyr Ala Ser Phe Glu Asp Met Ala Ala Thr Glu Ala
 65 70 75 80
 Gly Arg Glu Asp Gly Ile Glu Ala Val Ala Ile Val Thr Pro Asn His
 85 90 95
 Leu His Phe Ala Pro Ser Lys Ala Phe Leu Glu Ala Gly Ile His Val
 100 105 110
 Ile Cys Asp Lys Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Glu Ala Lys Ala Leu
 115 120 125
 Ala Gly Ile Val Arg Ala Ser Asp Ser Leu Phe Val Leu Thr His Asn
 130 135 140
 Tyr Thr Gly Tyr Ala Met Leu Arg Gln Met Arg Glu Met Ile Ala Glu
 145 150 155 160
 Gly Ala Ile Gly Lys Leu Arg His Val Gln Ala Glu Tyr Ala Gln Asp
 165 170 175
 Trp Leu Thr Glu Ala Val Glu Lys Thr Gly Ala Lys Gly Ala Glu Trp
 180 185 190
 Arg Thr Asp Pro Ser Arg Ser Gly Ala Gly Gly Ala Ile Gly Asp Ile
 195 200 205
 Gly Thr His Ala Phe Asn Ala Ala Ala Phe Val Thr Gly Glu Ile Pro
 210 215 220
 Ser Ser Leu Tyr Ala Asp Leu Thr Ser Phe Val Pro Gly Arg Gln Leu
 225 230 235 240
 Asp Asp Ser Ala Asn Ile Leu Leu Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Lys Gly
 245 250 255
 Met Leu Trp Ala Ser Gln Ile Ala Val Gly Asn Glu Asn Ala Leu Ser
 260 265 270
 Leu Arg Val Tyr Gly Asp Lys Gly Gly Leu Glu Trp His His Arg Val
 275 280 285
 Pro Asp Glu Leu Trp Phe Thr Pro Tyr Gly Glu Pro Lys Arg Leu Ile
 290 295 300

Thr Arg Asn Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Asn Arg Val Ser Arg
 305 310 315 320
 Val Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr Leu Glu Gly Phe Ala Thr Ile
 325 330 335
 Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Ala Ile Ile Ala Lys Arg Glu Gly Glu Thr
 340 345 350
 Ala Ala Gly Glu Val Ile Tyr Pro Gly Met Glu Asp Gly Leu Ala Gly
 355 360 365
 Leu Ala Phe Ile Asp Ala Ala Val Arg Ser Ser Gln Thr Ser Thr Trp
 370 375 380
 Val Gly Ile Asp Ile
 385

<210> 5

<211> 1188

<212> ADN

<213> Agrobacterium tumefaciens

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1188)

<223>

<400> 5

```

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

```

10

115	120	125	
aag ctg aag gac gtg gcc gat aag gcc gat gcg ctg ttc atc ctg acg			432
Lys Leu Lys Asp Val Ala Asp Lys Ala Asp Ala Leu Phe Ile Leu Thr			
130	135	140	
cat aac tac acc ggt tat cca atg gtg cgg cat gcg cgc gag ctg gtg			480
His Asn Tyr Thr Gly Tyr Pro Met Val Arg His Ala Arg Glu Leu Val			
145	150	155	160
gag gcc ggt gca ctc gcc aat atc cgt ctg gtg caa atg gaa tat ccg			528
Glu Ala Gly Ala Leu Gly Asn Ile Arg Leu Val Gln Met Glu Tyr Pro			
165	170	175	
cag gac tgg ctg acg gag gcg gtg gaa cag acc gcc gcg aaa cag gca			576
Gln Asp Trp Leu Thr Glu Ala Val Glu Gln Thr Gly Ala Lys Gln Ala			
180	185	190	
gtc tgg cgt acc gat ccg gcc caa tct gcc gtt gcc ggt tcc acc ggt			624
Val Trp Arg Thr Asp Pro Ala Gln Ser Gly Val Gly Gly Ser Thr Gly			
195	200	205	
gac atc gcc acc cat gcc tat aat ctc gcc tgc ttc att tcc ggt ctc			672
Asp Ile Gly Thr His Ala Tyr Asn Leu Gly Cys Phe Ile Ser Gly Leu			
210	215	220	
gaa gcg gat gag ctg gcg gcg gat gtg cat acc ttc gtc gaa gcc cgt			720
Glu Ala Asp Glu Leu Ala Ala Asp Val His Thr Phe Val Glu Gly Arg			
225	230	235	240
cgg ctc gat gac aat gct cat gtg atg atg gcg ttc aag ccc aag gcc			768
Arg Leu Asp Asp Asn Ala His Val Met Met Arg Phe Lys Pro Lys Gly			
245	250	255	
gcc aag caa ccc gcc agg gcc atg ctc tgg tgc agc cag gtg gca gtc			816
Gly Lys Gln Pro Ala Arg Gly Met Leu Trp Cys Ser Gln Val Ala Val			
260	265	270	
gcc cat gaa aat ggg ctg aag atc gcg ctt tat gcc gac aag gcc ggt			864
Gly His Glu Asn Gly Leu Lys Ile Arg Leu Tyr Gly Asp Lys Ala Gly			
275	280	285	
ctc gaa tgg acg cag gcc gat ccg aat tat ctg tgg ttt acg aag ctc			912
Leu Glu Trp Thr Gln Ala Asp Pro Asn Tyr Leu Trp Phe Thr Lys Leu			
290	295	300	
gcc gaa ccg aag cag ttg atc acc gcg gcc ggg gcc ggg gca ggg gcc			960
Gly Glu Pro Lys Gln Leu Ile Thr Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala			
305	310	315	320
gca gcc gct gcg gtt acc gcg ata ccc tcc gcc cat ccg gaa gga tat			1008
Ala Ala Ala Arg Val Thr Arg Ile Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr			
325	330	335	
ctg gaa gcc ttc gct acc atc tat acc gag gct gcg cat gcc att gag			1056
Leu Glu Ala Phe Ala Thr Ile Tyr Thr Glu Ala Ala His Ala Ile Glu			
340	345	350	
gcg gcg cgc acc ggt tcg gcg ctg gat aag gcg gtc atc tat ccg acg			1104
Ala Arg Arg Thr Gly Ser Ala Leu Asp Lys Ala Val Ile Tyr Pro Thr			
355	360	365	
gtg gat gac gcc gtc aaa ggt gtg gcc ttc gtc acg gcc tgc atc gag			1152
Val Asp Asp Gly Val Lys Gly Val Ala Phe Val Thr Ala Cys Ile Glu			
370	375	380	
tca gcc aag aag aat gcc gcc tgg gtg aag ctg taa			1188
Ser Gly Lys Lys Asn Gly Gly Trp Val Lys Leu			
385	390	395	

<210> 6

<211> 395

<212> PRT

<213> Agrobacterium tumefaciens

5 <400> 6

```

Met Ala Ile Glu Gly Lys Thr Thr Asp Val Ala Asn Lys Arg Ile Arg
1           5           10           15
Leu Gly Met Val Gly Gly Gly Ser Gly Ala Phe Ile Gly Gly Val His
20           25           30
Arg Met Ala Ala Arg Leu Asp Asn Arg Phe Asp Leu Val Ala Gly Ala
35           40           45
Leu Ser Ser Thr Pro Glu Lys Ser Leu Ala Ser Gly Arg Glu Leu Gly
50           55           60
Leu Asp Ser Glu Arg Cys Tyr Gly Ser Phe Glu Glu Met Ala Glu Lys
65           70           75           80
Glu Ala Leu Arg Glu Asp Gly Ile Glu Ala Val Ala Ile Val Thr Pro
85           90           95
Asn His Val His Tyr Pro Ala Ala Lys Ala Phe Leu Glu Arg Gly Ile
100          105          110
His Val Ile Cys Asp Lys Pro Leu Thr Ser Asn Leu Glu Asp Ala Lys
115          120          125
Lys Leu Lys Asp Val Ala Asp Lys Ala Asp Ala Leu Phe Ile Leu Thr
130          135          140
His Asn Tyr Thr Gly Tyr Pro Met Val Arg His Ala Arg Glu Leu Val
145          150          155          160
Glu Ala Gly Ala Leu Gly Asn Ile Arg Leu Val Gln Met Glu Tyr Pro
165          170          175
Gln Asp Trp Leu Thr Glu Ala Val Glu Gln Thr Gly Ala Lys Gln Ala
180          185          190
Val Trp Arg Thr Asp Pro Ala Gln Ser Gly Val Gly Gly Ser Thr Gly
195          200          205
Asp Ile Gly Thr His Ala Tyr Asn Leu Gly Cys Phe Ile Ser Gly Leu
210          215          220
Glu Ala Asp Glu Leu Ala Ala Asp Val His Thr Phe Val Glu Gly Arg
225          230          235          240
Arg Leu Asp Asp Asn Ala His Val Met Met Arg Phe Lys Pro Lys Gly
245          250          255
Gly Lys Gln Pro Ala Arg Gly Met Leu Trp Cys Ser Gln Val Ala Val
260          265          270
Gly His Glu Asn Gly Leu Lys Ile Arg Leu Tyr Gly Asp Lys Ala Gly
275          280          285

```

Leu Glu Trp Thr Gln Ala Asp Pro Asn Tyr Leu Trp Phe Thr Lys Leu
 290 295 300
 Gly Glu Pro Lys Gln Leu Ile Thr Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Arg Val Thr Arg Ile Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr
 325 330 335
 Leu Glu Ala Phe Ala Thr Ile Tyr Thr Glu Ala Ala His Ala Ile Glu
 340 345 350
 Ala Arg Arg Thr Gly Ser Ala Leu Asp Lys Ala Val Ile Tyr Pro Thr
 355 360 365
 Val Asp Asp Gly Val Lys Gly Val Ala Phe Val Thr Ala Cys Ile Glu
 370 375 380
 Ser Gly Lys Lys Asn Gly Gly Trp Val Lys Leu
 385 390 395

<210> 7

<211> 1077

<212> ADN

5 <213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1077)

<223>

10 <400> 7

ttg ata acg ctt tta aag ggg aga aga aaa gtg gat acg atc aag gtt	48
Met Ile Thr Leu Leu Lys Gly Arg Arg Lys Val Asp Thr Ile Lys Val	
1 5 10 15	
gga ata tta gga tac gga ttg tcc ggt tct gtt ttt cac ggg ccg ctg	96
Gly Ile Leu Gly Tyr Gly Leu Ser Gly Ser Val Phe His Gly Pro Leu	
20 25 30	
ctg gat gtt ctg gat gaa tat caa atc agc aaa atc atg aca tca cgg	144
Leu Asp Val Leu Asp Glu Tyr Gln Ile Ser Lys Ile Met Thr Ser Arg	
35 40 45	
aca gaa gaa gtg aaa cgg gat ttt cca gat gct gag gtt gta cat gag	192
Thr Glu Glu Val Lys Arg Asp Phe Pro Asp Ala Glu Val Val His Glu	
50 55 60	
ctt gaa gaa atc aca aat gac cct gcc att gag ctt gtc att gtc acc	240
Leu Glu Glu Ile Thr Asn Asp Pro Ala Ile Glu Leu Val Ile Val Thr	
65 70 75 80	
acc ccg agc ggc ctt cat tac gag cat act atg gca tgc ata cag gcc	288
Thr Pro Ser Gly Leu His Tyr Glu His Thr Met Ala Cys Ile Gln Ala	
85 90 95	
gga aaa cat gtt gtg atg gaa aaa cca atg aca gca acg gcc gaa gag	336
Gly Lys His Val Val Met Glu Lys Pro Met Thr Ala Thr Ala Glu Glu	
100 105 110	

```

ggg gaa aca tta aaa agg gct gcc gat gaa aaa ggc gta tta tta agc      384
Gly Glu Thr Leu Lys Arg Ala Ala Asp Glu Lys Gly Val Leu Leu Ser
      115                      120                      125
gta tat cat aac cga cgc tgg gat aac gat ttt tta acg att aaa aag      432
Val Tyr His Asn Arg Arg Trp Asp Asn Asp Phe Leu Thr Ile Lys Lys
      130                      135                      140
ctg atc tct gag gga tcc ctt gaa gat atc aat aca tat caa gtt tcc      480
Leu Ile Ser Glu Gly Ser Leu Glu Asp Ile Asn Thr Tyr Gln Val Ser
      145                      150                      155                      160
tat aac cgc tac aga cct gaa gtt caa gcg cgg tgg cgg gaa aaa gaa      528
Tyr Asn Arg Tyr Arg Pro Glu Val Gln Ala Arg Trp Arg Glu Lys Glu
      165                      170                      175
ggc act gcc act ggt acg ctg tat gat ctc ggc tcc cac atc ata gac      576
Gly Thr Ala Thr Gly Thr Leu Tyr Asp Leu Gly Ser His Ile Ile Asp
      180                      185                      190
caa acc ctg cat ttg ttt ggg atg cct aaa gcc gtg act gca aac gtg      624
Gln Thr Leu His Leu Phe Gly Met Pro Lys Ala Val Thr Ala Asn Val
      195                      200                      205
atg gcc cag cgg gaa aat gcc gaa acg gtt gac tat ttt cat tta acc      672
Met Ala Gln Arg Glu Asn Ala Glu Thr Val Asp Tyr Phe His Leu Thr
      210                      215                      220
ctg gat tat ggc aag ctt caa gcc att cta tac gga gga tca atc gtt      720
Leu Asp Tyr Gly Lys Leu Gln Ala Ile Leu Tyr Gly Gly Ser Ile Val
      225                      230                      235                      240
ccg gca aac gga cct cgt tat caa atc cat gga aaa gat tct agc ttt      768
Pro Ala Asn Gly Pro Arg Tyr Gln Ile His Gly Lys Asp Ser Ser Phe
      245                      250                      255
atc aaa tat gga att gac gga cag gaa gac gca ctc aga gcg gga aga      816
Ile Lys Tyr Gly Ile Asp Gly Gln Glu Asp Ala Leu Arg Ala Gly Arg
      260                      265                      270
aaa cca gag gat gac agc tgg ggt gcg gat gtt ccg gag ttt tac gga      864
Lys Pro Glu Asp Asp Ser Trp Gly Ala Asp Val Pro Glu Phe Tyr Gly
      275                      280                      285
aag ctt aca acc att cgt ggc tcc gac aaa aaa aca gaa acg att cca      912
Lys Leu Thr Thr Ile Arg Gly Ser Asp Lys Lys Thr Glu Thr Ile Pro
      290                      295                      300
tca gta aat ggc tcc tac ctt act tat tac cgt aaa ata gcg gaa agc      960
Ser Val Asn Gly Ser Tyr Leu Thr Tyr Tyr Arg Lys Ile Ala Glu Ser
      305                      310                      315                      320
ata cga gaa ggt gct gcg ctg cca gtc act gct gag gaa ggt att aat      1008
Ile Arg Glu Gly Ala Ala Leu Pro Val Thr Ala Glu Glu Gly Ile Asn
      325                      330                      335
gtc atc cgc atc att gaa gcc gcg atg gaa agc agt aaa gag aaa cga      1056
Val Ile Arg Ile Ile Glu Ala Ala Met Glu Ser Ser Lys Glu Lys Arg
      340                      345                      350
acc att atg ctg gag cac taa      1077
Thr Ile Met Leu Glu His
      355

```

<210> 8

<211> 358

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 8

Met Ile Thr Leu Leu Lys Gly Arg Arg Lys Val Asp Thr Ile Lys Val
 1 5 10 15
 Gly Ile Leu Gly Tyr Gly Leu Ser Gly Ser Val Phe His Gly Pro Leu
 20 25 30
 Leu Asp Val Leu Asp Glu Tyr Gln Ile Ser Lys Ile Met Thr Ser Arg
 35 40 45
 Thr Glu Glu Val Lys Arg Asp Phe Pro Asp Ala Glu Val Val His Glu
 50 55 60
 Leu Glu Glu Ile Thr Asn Asp Pro Ala Ile Glu Leu Val Ile Val Thr
 65 70 75 80
 Thr Pro Ser Gly Leu His Tyr Glu His Thr Met Ala Cys Ile Gln Ala
 85 90 95
 Gly Lys His Val Val Met Glu Lys Pro Met Thr Ala Thr Ala Glu Glu
 100 105 110
 Gly Glu Thr Leu Lys Arg Ala Ala Asp Glu Lys Gly Val Leu Leu Ser
 115 120 125
 Val Tyr His Asn Arg Arg Trp Asp Asn Asp Phe Leu Thr Ile Lys Lys
 130 135 140
 Leu Ile Ser Glu Gly Ser Leu Glu Asp Ile Asn Thr Tyr Gln Val Ser
 145 150 155 160
 Tyr Asn Arg Tyr Arg Pro Glu Val Gln Ala Arg Trp Arg Glu Lys Glu
 165 170 175
 Gly Thr Ala Thr Gly Thr Leu Tyr Asp Leu Gly Ser His Ile Ile Asp
 180 185 190
 Gln Thr Leu His Leu Phe Gly Met Pro Lys Ala Val Thr Ala Asn Val
 195 200 205
 Met Ala Gln Arg Glu Asn Ala Glu Thr Val Asp Tyr Phe His Leu Thr
 210 215 220
 Leu Asp Tyr Gly Lys Leu Gln Ala Ile Leu Tyr Gly Gly Ser Ile Val
 225 230 235 240
 Pro Ala Asn Gly Pro Arg Tyr Gln Ile His Gly Lys Asp Ser Ser Phe
 245 250 255
 Ile Lys Tyr Gly Ile Asp Gly Gln Glu Asp Ala Leu Arg Ala Gly Arg
 260 265 270
 Lys Pro Glu Asp Asp Ser Trp Gly Ala Asp Val Pro Glu Phe Tyr Gly
 275 280 285
 Lys Leu Thr Thr Ile Arg Gly Ser Asp Lys Lys Thr Glu Thr Ile Pro
 290 295 300
 Ser Val Asn Gly Ser Tyr Leu Thr Tyr Tyr Arg Lys Ile Ala Glu Ser
 305 310 315 320

Ile Arg Glu Gly Ala Ala Leu Pro Val Thr Ala Glu Glu Gly Ile Asn
 325 330 335
 Val Ile Arg Ile Ile Glu Ala Ala Met Glu Ser Ser Lys Glu Lys Arg
 340 345 350
 Thr Ile Met Leu Glu His
 355

<210> 9

5 <211> 1170

<212> ADN

<213> Agrobacterium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1170)

5 <223>

<400> 9

```

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

```

```

145          150          155          160
gga gcc att ggc aag ctg cgc cac gtt cag gcc gaa tat gcc cag gac      528
Gly Ala Ile Gly Lys Leu Arg His Val Gln Ala Glu Tyr Ala Gln Asp
          165          170          175
tgg ctg acc gag gcg gtt gag aag acc ggt gcg aag ggg gcg gaa tgg      576
Trp Leu Thr Glu Ala Val Glu Lys Thr Gly Ala Lys Gly Ala Glu Trp
          180          185          190
cgc acc gat ccc agc cgc tcc ggc gcg ggc ggg gcc atc ggc gat atc      624
Arg Thr Asp Pro Ser Arg Ser Gly Ala Gly Gly Ala Ile Gly Asp Ile
          195          200          205
ggc acc cac gcc ttc aac gct gcc gcc ttc gtt acc ggt gaa atc ccg      672
Gly Thr His Ala Phe Asn Ala Ala Ala Phe Val Thr Gly Glu Ile Pro
          210          215          220
aag agt ctt tat gcc gac ctg acc tct ttc gtg ccg ggc cgg cag ctg      720
Lys Ser Leu Tyr Ala Asp Leu Thr Ser Phe Val Pro Gly Arg Gln Leu
225          230          235          240
gat gac agc gcc aat att ctt ttg cgt tac gaa agc ggc gcc aag ggc      768
Asp Asp Ser Ala Asn Ile Leu Leu Arg Tyr Glu Ser Gly Ala Lys Gly
          245          250          255
atg ctt tgg gca agc cag atc gca gtc ggc aat gaa aac gcg ctg tcg      816
Met Leu Trp Ala Ser Gln Ile Ala Val Gly Asn Glu Asn Ala Leu Ser
          260          265          270
ctg cgg gtc tac ggc gaa aag ggc ggg ctt gaa tgg cac cac cgc gtg      864
Leu Arg Val Tyr Gly Glu Lys Gly Gly Leu Glu Trp His His Arg Val
          275          280          285
ccg gat gag ctg tgg ttc acc cct tac ggc gag ccg aag cgg ctc ata      912
Pro Asp Glu Leu Trp Phe Thr Pro Tyr Gly Glu Pro Lys Arg Leu Ile
          290          295          300
acc cgc aac ggc gca ggc gca gga gcc gcg gcc aac cgt gtc agc cgc      960
Thr Arg Asn Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Asn Arg Val Ser Arg
305          310          315          320
gtg cca tcg ggg cac ccg gaa gga tac ctc gag ggt ttc gcg acg atc      1008
Val Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr Leu Glu Gly Phe Ala Thr Ile
          325          330          335
tac cgc gaa gcc gca gat gca atc att gcc aaa agg gag gga aaa gca      1056
Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Ala Ile Ile Ala Lys Arg Glu Gly Lys Ala
          340          345          350
gcc gcc ggg gag gtg att tac ccc ggc atg gag gac ggc ctt gcg ggt      1104
Ala Ala Gly Glu Val Ile Tyr Pro Gly Met Glu Asp Gly Leu Ala Gly
          355          360          365
ctc gca ttc atc gat gcc gcc gtt cgc tcc agc cag acc tcg acc tgg      1152
Leu Ala Phe Ile Asp Ala Ala Val Arg Ser Ser Gln Thr Ser Thr Trp
          370          375          380
atc aat atc gat atc tag      1170
Ile Asn Ile Asp Ile
385

```

<210> 10

<211> 389

<212> PRT

5 <213> Agrobacterium sp.

<400> 10

Met Ser Ser Ala Pro Lys Lys Phe Asp Ser Arg Arg Ile Arg Leu Gly
 1 5 10 15
 Met Val Gly Gly Gly Gln Gly Ala Phe Ile Gly Ala Val His Arg Ile
 20 25 30
 Ala Ala Arg Leu Asp Asp Arg Tyr Glu Leu Val Ala Gly Ala Leu Ser
 35 40 45
 Ser Asp Pro Ala Arg Ala Ala Ala Ser Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ala
 50 55 60
 Pro Glu Arg Ser Tyr Ala Ser Phe Glu Glu Met Ala Ala Ala Glu Ala
 65 70 75 80
 Gly Arg Asp Asp Gly Ile Glu Ala Val Ala Ile Val Thr Pro Asn His
 85 90 95
 Leu His Phe Ala Pro Ser Lys Ala Phe Leu Glu Ala Gly Ile His Val
 100 105 110
 Ile Cys Asp Lys Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Glu Ala Lys Ala Leu
 115 120 125
 Ala Glu Ile Val Arg Ala Ser Asp Ser Leu Phe Val Leu Thr His Asn
 130 135 140
 Tyr Thr Gly Tyr Ala Met Leu Arg Gln Met Arg Gln Met Val Ala Asp
 145 150 155 160
 Gly Ala Ile Gly Lys Leu Arg His Val Gln Ala Glu Tyr Ala Gln Asp
 165 170 175
 Trp Leu Thr Glu Ala Val Glu Lys Thr Gly Ala Lys Gly Ala Glu Trp
 180 185 190
 Arg Thr Asp Pro Ser Arg Ser Gly Ala Gly Gly Ala Ile Gly Asp Ile
 195 200 205
 Gly Thr His Ala Phe Asn Ala Ala Ala Phe Val Thr Gly Glu Ile Pro
 210 215 220
 Lys Ser Leu Tyr Ala Asp Leu Thr Ser Phe Val Pro Gly Arg Gln Leu
 225 230 235 240
 Asp Asp Ser Ala Asn Ile Leu Leu Arg Tyr Glu Ser Gly Ala Lys Gly
 245 250 255
 Met Leu Trp Ala Ser Gln Ile Ala Val Gly Asn Glu Asn Ala Leu Ser
 260 265 270
 Leu Arg Val Tyr Gly Glu Lys Gly Gly Leu Glu Trp His His Arg Val
 275 280 285
 Pro Asp Glu Leu Trp Phe Thr Pro Tyr Gly Glu Pro Lys Arg Leu Ile
 290 295 300
 Thr Arg Asn Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Asn Arg Val Ser Arg
 305 310 315 320
 Val Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr Leu Glu Gly Phe Ala Thr Ile
 325 330 335

 Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Ala Ile Ile Ala Lys Arg Glu Gly Lys Ala
 340 345 350
 Ala Ala Gly Glu Val Ile Tyr Pro Gly Met Glu Asp Gly Leu Ala Gly
 355 360 365
 Leu Ala Phe Ile Asp Ala Ala Val Arg Ser Ser Gln Thr Ser Thr Trp
 370 375 380
 Ile Asn Ile Asp Ile
 385

<210> 11

<211> 1188

<212> ADN

<213> Agrobacterium sp.

<220>

<221> CDS

5 <222> (1).. (1188)

<223>

<400> 11

```

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

```

cat aat tac acc ggc tat ccg atg gtg cgg cat gca cgg gaa ctg gtg	480
His Asn Tyr Thr Gly Tyr Pro Met Val Arg His Ala Arg Glu Leu Val	
145 150 155 160	
gaa tcg ggc gct ctc ggc acg atc cgt ctg gtg cag atg gag tat ccg	528
Glu Ser Gly Ala Leu Gly Thr Ile Arg Leu Val Gln Met Glu Tyr Pro	
165 170 175	
cag gac tgg ctg gcg gaa ccc atc gag cag acg ggc gcc aaa cag gct	576
Gln Asp Trp Leu Ala Glu Pro Ile Glu Gln Thr Gly Ala Lys Gln Ala	
180 185 190	
gtc tgg cgc acc gac ccg gcc caa tcc ggt gcg ggt ggt tcc aca ggc	624
Val Trp Arg Thr Asp Pro Ala Gln Ser Gly Ala Gly Gly Ser Thr Gly	
195 200 205	
gat atc ggc acg cat gcc tat aat ctc ggc tgc ttc att tcc ggt ctg	672
Asp Ile Gly Thr His Ala Tyr Asn Leu Gly Cys Phe Ile Ser Gly Leu	
210 215 220	
gaa gtc gac gaa ctg gcg gca gat gtg cat acc ttt gtc gaa ggc cgc	720
Glu Val Asp Glu Leu Ala Ala Asp Val His Thr Phe Val Glu Gly Arg	
225 230 235 240	
cgg ctg gac gac aat gcg cat gtg atg ctg cgt ttc aag ccg aag ggt	768
Arg Leu Asp Asp Asn Ala His Val Met Leu Arg Phe Lys Pro Lys Gly	
245 250 255	
ggc aag cag ccg gca aag ggg ctg ctc tgg tgc agc cag gtt gcg gtc	816
Gly Lys Gln Pro Ala Lys Gly Leu Leu Trp Cys Ser Gln Val Ala Val	
260 265 270	
ggc cac gaa aac ggc ctg aaa gtt cgt gtg tat ggt gac aag gcc ggc	864
Gly His Glu Asn Gly Leu Lys Val Arg Val Tyr Gly Asp Lys Ala Gly	
275 280 285	
atc gaa tgg acg cag gcc gac ccg aac tat ctc tgg ttc acg aag ctt	912
Ile Glu Trp Thr Gln Ala Asp Pro Asn Tyr Leu Trp Phe Thr Lys Leu	
290 295 300	
ggc gag ctg aag cag ttg atc acc cgc ggc ggt gcc ggg gca ggg gct	960
Gly Glu Leu Lys Gln Leu Ile Thr Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala	
305 310 315 320	
gcc gca gca cgc gtc acc cgc atc cct tcc ggc cac ccg gaa ggt tat	1008
Ala Ala Ala Arg Val Thr Arg Ile Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr	
325 330 335	
ctc gaa gcc ttc gca acg atc tat acc gag gcg gcg cat gcc atc gaa	1056
Leu Glu Ala Phe Ala Thr Ile Tyr Thr Glu Ala Ala His Ala Ile Glu	
340 345 350	
gcc cgc cgc acc ggc tcg gtg ctc gac aag gcc gtg att tac ccg acc	1104
Ala Arg Arg Thr Gly Ser Val Leu Asp Lys Ala Val Ile Tyr Pro Thr	
355 360 365	
gtc gat gat ggc gta aag ggt gtc gcc ttt gtt acg gcc tgc atc gag	1152
Val Asp Asp Gly Val Lys Gly Val Ala Phe Val Thr Ala Cys Ile Glu	
370 375 380	
tcc ggc aag aag aac ggt gtc tgg gtg aag ctg taa	1188
Ser Gly Lys Lys Asn Gly Val Trp Val Lys Leu	
385 390 395	

<210> 12

<211> 395

<212> PRT

5 <213> Agrobacterium sp.

<400> 12

Met Ala Ile Glu Gly Lys Thr Thr Asp Lys Ala Asn Lys Arg Ile Arg
 1 5 10 15
 Leu Gly Met Val Gly Gly Gly Ser Gly Ala Phe Ile Gly Gly Val His
 20 25 30
 Arg Met Ala Ala Arg Leu Asp Asn Arg Phe Asp Leu Val Ala Gly Ala
 35 40 45
 Leu Ser Ser Thr Pro Glu Lys Ser Leu Ala Ser Gly Arg Glu Leu Gly
 50 55 60
 Leu Asp Pro Glu Arg Cys Tyr Gly Ser Phe Glu Met Ala Glu Lys
 65 70 75 80
 Glu Ala Leu Arg Glu Asp Gly Ile Glu Ala Val Ala Ile Val Thr Pro
 85 90 95
 Asn His Val His Tyr Pro Ala Ala Lys Ala Phe Leu Glu Arg Gly Ile
 100 105 110
 His Val Ile Cys Asp Lys Pro Leu Thr Ser Asn Leu Glu Asp Ala Lys
 115 120 125
 Lys Leu Lys Asp Val Ala Asp Lys Ala Asp Ala Leu Phe Ile Leu Thr
 130 135 140
 His Asn Tyr Thr Gly Tyr Pro Met Val Arg His Ala Arg Glu Leu Val
 145 150 155 160
 Glu Ser Gly Ala Leu Gly Thr Ile Arg Leu Val Gln Met Glu Tyr Pro
 165 170 175
 Gln Asp Trp Leu Ala Glu Pro Ile Glu Gln Thr Gly Ala Lys Gln Ala
 180 185 190
 Val Trp Arg Thr Asp Pro Ala Gln Ser Gly Ala Gly Gly Ser Thr Gly
 195 200 205
 Asp Ile Gly Thr His Ala Tyr Asn Leu Gly Cys Phe Ile Ser Gly Leu
 210 215 220
 Glu Val Asp Glu Leu Ala Ala Asp Val His Thr Phe Val Glu Gly Arg
 225 230 235 240
 Arg Leu Asp Asp Asn Ala His Val Met Leu Arg Phe Lys Pro Lys Gly
 245 250 255
 Gly Lys Gln Pro Ala Lys Gly Leu Leu Trp Cys Ser Gln Val Ala Val
 260 265 270
 Gly His Glu Asn Gly Leu Lys Val Arg Val Tyr Gly Asp Lys Ala Gly
 275 280 285
 Ile Glu Trp Thr Gln Ala Asp Pro Asn Tyr Leu Trp Phe Thr Lys Leu
 290 295 300
 Gly Glu Leu Lys Gln Leu Ile Thr Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 305 310 315 320

 Ala Ala Ala Arg Val Thr Arg Ile Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr
 325 330 335
 Leu Glu Ala Phe Ala Thr Ile Tyr Thr Glu Ala Ala His Ala Ile Glu
 340 345 350
 Ala Arg Arg Thr Gly Ser Val Leu Asp Lys Ala Val Ile Tyr Pro Thr
 355 360 365
 Val Asp Asp Gly Val Lys Gly Val Ala Phe Val Thr Ala Cys Ile Glu
 370 375 380
 Ser Gly Lys Lys Asn Gly Val Trp Val Lys Leu
 385 390 395

<210> 13

ES 2 404 554 T3

<211> 1059

<212> ADN

<213> Xanthomonas campestris pv. campestris

<220>

5 <221> CDS

<222> (1).. (1059)

<223>

<400> 13

```

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

```

Asp Phe Leu Thr Val Arg Arg Leu Ile Glu Asp Gly Gln Leu Gly Glu	
130	135
140	145
gtg gtg gag ttc cat tcg cac ttc gac cgg tat cgc ccg cag gtg cgc	480
Val Val Glu Phe His Ser His Phe Asp Arg Tyr Arg Pro Gln Val Arg	
145	150
155	160
gac cgc tgg cgc gaa agc gat atc ccc gcc gcc ctc tgg tac gac	528
Asp Arg Trp Arg Glu Ser Asp Ile Pro Gly Ala Gly Leu Trp Tyr Asp	
165	170
175	
ctg ggg ccg cat ctg ctg gac cag gcc ttg cag ttg ttc gcc atg ccg	576
Leu Gly Pro His Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Leu Phe Gly Met Pro	
180	185
190	
cag gcc atc agc gca gac ctg cag cgc cag cgc acc cag gcc cgc agc	624
Gln Ala Ile Ser Ala Asp Leu Gln Arg Gln Arg Thr Gln Ala Arg Ser	
195	200
205	
gac gat tac ttc aac gtg gtg ctg cgc tat ccc cgc ttg cgg gtg atc	672
Asp Asp Tyr Phe Asn Val Val Leu Arg Tyr Pro Arg Leu Arg Val Ile	
210	215
220	
ctg cac gcc gcc tcg ctg gtg gcc gac gcc agc ctg cgc ttc gcc gtg	720
Leu His Ala Gly Ser Leu Val Ala Asp Gly Ser Leu Arg Phe Ala Val	
225	230
235	240
cac gcc acg cgc gcc agc tat ctc aag cat gcc gcc gat acg cag gaa	768
His Gly Thr Arg Gly Ser Tyr Leu Lys His Gly Ala Asp Thr Gln Glu	
245	250
255	
gac cag ttg cgt gcc gcc cgc cgg ccc gcc acc gcc gcc tgg gcc atg	816
Asp Gln Leu Arg Ala Gly Arg Arg Pro Gly Thr Ala Gly Trp Gly Met	
260	265
270	
gac cca ttg ccc gcc acg ctc acc cgc gtg gac gac gaa gcc cgt gtg	864
Asp Pro Leu Pro Gly Thr Leu Thr Arg Val Asp Asp Glu Gly Arg Val	
275	280
285	
cac acg cat cag ccc gat gcc gta ccc gcc gac tac cgc cat tgc tat	912
His Thr His Gln Pro Asp Gly Val Pro Gly Asp Tyr Arg His Cys Tyr	
290	295
300	
gcc gcc ttc cgc gac gca atg gcc gcc acc gca ccg cca ccg gtc agt	960
Ala Ala Phe Arg Asp Ala Met Ala Gly Thr Ala Pro Pro Pro Val Ser	
305	310
315	320
gct gcc gac gcc gtg cgg ctg atg gag ctg ctg gag ctg gcc caa cgc	1008
Ala Ala Asp Ala Val Arg Leu Met Glu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Arg	
325	330
335	
ggt gct gcc ctg gcc cag gtg ctc tgg ctg gaa gcc aac agc agc gac	1056
Gly Ala Ala Leu Gly Gln Val Leu Trp Leu Glu Gly Asn Ser Ser Asp	
340	345
350	
tga	1059

<210> 14

<211> 352

<212> PRT

5 <213> Xanthomonas campestris pv. campestris

<400> 14

Met Pro Lys Pro Phe Asn Leu Ala Val Val Gly Tyr Gly Tyr Val Gly
 1 5 10 15
 Arg Thr Phe His Ala Pro Leu Ile Ala Ser Thr Pro Gly Leu Gln Leu
 20 25 30
 His Ser Val Val Ser Ser Lys Pro Gln Gln Pro Gln Ala Asp Phe Arg
 35 40 45
 Glu Val Arg Val Leu Pro Asp Leu Glu Ala Ala Leu Ala Asp Pro Ala
 50 55 60
 Leu Asp Ala Val Val Ile Ala Thr Pro Asn Gln Thr His Ala Pro Met
 65 70 75 80
 Ala Leu Gln Ala Leu Ala Ala Gly Lys His Val Leu Val Asp Lys Pro
 85 90 95
 Phe Ala Leu Asp Ala Ala Gln Ala Arg Thr Val Val Asp Ala Ala Ala
 100 105 110
 Glu Ala Gly Lys Ile Val Ser Val Phe Gln Asn Arg Arg Trp Asp Ala
 115 120 125
 Asp Phe Leu Thr Val Arg Arg Leu Ile Glu Asp Gly Gln Leu Gly Glu
 130 135 140
 Val Val Glu Phe His Ser His Phe Asp Arg Tyr Arg Pro Gln Val Arg
 145 150 155 160
 Asp Arg Trp Arg Glu Ser Asp Ile Pro Gly Ala Gly Leu Trp Tyr Asp
 165 170 175
 Leu Gly Pro His Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Leu Phe Gly Met Pro
 180 185 190
 Gln Ala Ile Ser Ala Asp Leu Gln Arg Gln Arg Thr Gln Ala Arg Ser
 195 200 205
 Asp Asp Tyr Phe Asn Val Val Leu Arg Tyr Pro Arg Leu Arg Val Ile
 210 215 220
 Leu His Ala Gly Ser Leu Val Ala Asp Gly Ser Leu Arg Phe Ala Val
 225 230 235 240
 His Gly Thr Arg Gly Ser Tyr Leu Lys His Gly Ala Asp Thr Gln Glu
 245 250 255
 Asp Gln Leu Arg Ala Gly Arg Arg Pro Gly Thr Ala Gly Trp Gly Met
 260 265 270
 Asp Pro Leu Pro Gly Thr Leu Thr Arg Val Asp Asp Glu Gly Arg Val
 275 280 285
 His Thr His Gln Pro Asp Gly Val Pro Gly Asp Tyr Arg His Cys Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Phe Arg Asp Ala Met Ala Gly Thr Ala Pro Pro Pro Val Ser
 305 310 315 320
 Ala Ala Asp Ala Val Arg Leu Met Glu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Arg
 325 330 335
 Gly Ala Ala Leu Gly Gln Val Leu Trp Leu Glu Gly Asn Ser Ser Asp
 340 345 350

<210> 15

<211> 34

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 15

cattcaagct taatgagagg caatgacatg agcg 34

<210> 16

<211> 31

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 16

10 tcggaattct tcatgcaagg cacaaagtcg c 31

<210> 17

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> cebador

<400> 17

ggcggatcct ttgaaagga tagtcatgct ct 32

<210> 18

20 <211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

25 <400> 18

attggaagct tcgattggct gcgacctag 29

<210> 19

<211> 30

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> cebador
<400> 19
ttgggatcct ttcaggggaa atattatggc 30
<210> 20
5 <211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
10 <400> 20
gccgcaagct tgttttacag cttcac 26
<210> 21
<211> 34
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 21
aggaattcga tgataacgct tttaaagggg agaa 34
20 <210> 22
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
25 <223> cebador
<400> 22
tttctgcagt ttagtgctcc agcataatgg ttcg 34
<210> 23
<211> 34
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 23

tcggaattcg cgttgcggtg aatcgtttc aatg 34

5 <210> 24

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> cebador

<400> 24

ataagaagct tgctcagtcg ctgctgttgc cttc 34

<210> 25

<211> 35

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 25

20 ttgggatccg atgagtttac gtattggcgt aattg 35

<210> 26

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> cebador

<400> 26

aaactgcagt tagtttgaa ctgttgtaa agattgata 39

<210> 27

30 <211> 1179

<212> ADN

<213> Acetobacter sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1179)

5 <223>

<400> 27

```

atg acc aaa cgt aaa ttg cgc att ggc ctg att ggc agt ggg ttc atg      48
Met Thr Lys Arg Lys Leu Arg Ile Gly Leu Ile Gly Ser Gly Phe Met
1          5          10          15
ggg cgc acc cac gcc ttt ggc tat tca acc gcg tcc cgt gtg ttt gat      96
Gly Arg Thr His Ala Phe Gly Tyr Ser Thr Ala Ser Arg Val Phe Asp
          20          25          30
ctt ccg ttt cag ccg gag ctg acg tgc ctg gct gat att tcc gat gaa      144
Leu Pro Phe Gln Pro Glu Leu Thr Cys Leu Ala Asp Ile Ser Asp Glu
          35          40          45
gct gca gcg aag gcg gcg gat gct ctg gga ttt gcc cgt tcc acc agt      192
Ala Ala Ala Lys Ala Ala Asp Ala Leu Gly Phe Ala Arg Ser Thr Ser
          50          55          60
gac tgg cgt acg ctc gtc aac gat cct gaa att gat gtg gtg aat atc      240
Asp Trp Arg Thr Leu Val Asn Asp Pro Glu Ile Asp Val Val Asn Ile
65          70          75          80
acg gcg cct aat gcc ttt cat aaa gaa atg gcg tta gca gcg att gct      288
Thr Ala Pro Asn Ala Phe His Lys Glu Met Ala Leu Ala Ala Ile Ala
          85          90          95
gcg ggc aag cat gtc tat tgt gaa aag ccc ctt gcg cca ctt gca gcc      336
Ala Gly Lys His Val Tyr Cys Glu Lys Pro Leu Ala Pro Leu Ala Ala
          100          105          110
gat gct cgc gaa atg gca gaa gcg gct gag gca aag ggc gta aaa aca      384
Asp Ala Arg Glu Met Ala Glu Ala Ala Glu Ala Lys Gly Val Lys Thr
          115          120          125
cag gtt ggc ttc aac tac ctg tgc aac ccc atg ctg gca ctg gcc cga      432
Gln Val Gly Phe Asn Tyr Leu Cys Asn Pro Met Leu Ala Leu Ala Arg
          130          135          140
gat atg att gca gca ggg gag ctg ggg gaa atc aga ggg tac cgt ggc      480
Asp Met Ile Ala Ala Gly Glu Leu Gly Glu Ile Arg Gly Tyr Arg Gly
145          150          155          160
ctg cat gcg gaa gat tat atg gcg gac gcc tcg tct ccc ttt acg ttc      528
Leu His Ala Glu Asp Tyr Met Ala Asp Ala Ser Ser Pro Phe Thr Phe
          165          170          175
cgt ctt gac cca gcg gga ggc ggc gca ctt gct gat att ggg agt cac      576
Arg Leu Asp Pro Ala Gly Gly Gly Ala Leu Ala Asp Ile Gly Ser His
          180          185          190

```

gcc ctt gca acg gct gaa ttt ctt atg ggg cct gcc gca ggc gct atc 624
 Ala Leu Ala Thr Ala Glu Phe Leu Met Gly Pro Ala Ala Gly Ala Ile
 195 200 205
 acg cag gtg atg ggg gat tgt gtg acg gtc atc aag acg cgg ccg gat 672
 Thr Gln Val Met Gly Asp Cys Val Thr Val Ile Lys Thr Arg Pro Asp
 210 215 220
 ggt aag ggg gga acg cgg gct gta gaa gtg gac gat att ggc cgc gcg 720
 Gly Lys Gly Gly Thr Arg Ala Val Glu Val Asp Asp Ile Gly Arg Ala
 225 230 235 240
 ctt ctg cgc ttt gag aat ggg gcg acg gga tcg gtt gag gga aac tgg 768
 Leu Leu Arg Phe Glu Asn Gly Ala Thr Gly Ser Val Glu Gly Asn Trp
 245 250 255
 att gct acc ggc cgc acc atg cag cat gac ttt gag gta tac ggc aca 816
 Ile Ala Thr Gly Arg Thr Met Gln His Asp Phe Glu Val Tyr Gly Thr
 260 265 270
 aaa ggt gca ctt gcc ttt act cag caa cga ttt aac gag ttg cat ttc 864
 Lys Gly Ala Leu Ala Phe Thr Gln Gln Arg Phe Asn Glu Leu His Phe
 275 280 285
 ttc tca agc acc gat gca cgc ggc cgc aaa ggg ttc cgg cgt att gaa 912
 Phe Ser Ser Thr Asp Ala Arg Gly Arg Lys Gly Phe Arg Arg Ile Glu
 290 295 300
 gcg gga cca gag cat gcg ccc tat ggc ctg ttc tgc gtg gca ccg ggg 960
 Ala Gly Pro Glu His Ala Pro Tyr Gly Leu Phe Cys Val Ala Pro Gly
 305 310 315 320
 cac cag ctg ggt ttt aat gac ctc aag gcg ata gaa gtt gca cgg tat 1008
 His Gln Leu Gly Phe Asn Asp Leu Lys Ala Ile Glu Val Ala Arg Tyr
 325 330 335
 ctg gag gcg ctg gct ggc cat cac cct gaa ccc ttc aat ttc cgg gcg 1056
 Leu Glu Ala Leu Ala Gly His His Pro Glu Pro Phe Asn Phe Arg Ala
 340 345 350
 ggt ctg cgt atc cag aca ctg gtg gaa act att cac gct tca agc aag 1104
 Gly Leu Arg Ile Gln Thr Leu Val Glu Thr Ile His Ala Ser Ser Lys
 355 360 365
 tcg gct gcc tgg cgg gat gtg ccg acg gac aaa gtg aag ctt cag gcg 1152
 Ser Ala Ala Trp Arg Asp Val Pro Thr Asp Lys Val Lys Leu Gln Ala
 370 375 380
 aaa tcc cga cag cat gag aag gca taa 1179
 Lys Ser Arg Gln His Glu Lys Ala
 385 390

<210> 28

<211> 392

<212> PRT

5 <213> Acetobacter sp.

<400> 28

Met Thr Lys Arg Lys Leu Arg Ile Gly Leu Ile Gly Ser Gly Phe Met
 1 5 10 15
 Gly Arg Thr His Ala Phe Gly Tyr Ser Thr Ala Ser Arg Val Phe Asp
 20 25 30
 Leu Pro Phe Gln Pro Glu Leu Thr Cys Leu Ala Asp Ile Ser Asp Glu
 35 40 45
 Ala Ala Ala Lys Ala Ala Asp Ala Leu Gly Phe Ala Arg Ser Thr Ser
 50 55 60
 Asp Trp Arg Thr Leu Val Asn Asp Pro Glu Ile Asp Val Val Asn Ile
 65 70 75 80
 Thr Ala Pro Asn Ala Phe His Lys Glu Met Ala Leu Ala Ala Ile Ala
 85 90 95
 Ala Gly Lys His Val Tyr Cys Glu Lys Pro Leu Ala Pro Leu Ala Ala
 100 105 110
 Asp Ala Arg Glu Met Ala Glu Ala Ala Glu Ala Lys Gly Val Lys Thr
 115 120 125
 Gln Val Gly Phe Asn Tyr Leu Cys Asn Pro Met Leu Ala Leu Ala Arg
 130 135 140
 Asp Met Ile Ala Ala Gly Glu Leu Gly Glu Ile Arg Gly Tyr Arg Gly
 145 150 155 160
 Leu His Ala Glu Asp Tyr Met Ala Asp Ala Ser Ser Pro Phe Thr Phe
 165 170 175
 Arg Leu Asp Pro Ala Gly Gly Gly Ala Leu Ala Asp Ile Gly Ser His
 180 185 190
 Ala Leu Ala Thr Ala Glu Phe Leu Met Gly Pro Ala Ala Gly Ala Ile
 195 200 205
 Thr Gln Val Met Gly Asp Cys Val Thr Val Ile Lys Thr Arg Pro Asp
 210 215 220
 Gly Lys Gly Gly Thr Arg Ala Val Glu Val Asp Asp Ile Gly Arg Ala
 225 230 235 240
 Leu Leu Arg Phe Glu Asn Gly Ala Thr Gly Ser Val Glu Gly Asn Trp
 245 250 255
 Ile Ala Thr Gly Arg Thr Met Gln His Asp Phe Glu Val Tyr Gly Thr
 260 265 270
 Lys Gly Ala Leu Ala Phe Thr Gln Gln Arg Phe Asn Glu Leu His Phe
 275 280 285
 Phe Ser Ser Thr Asp Ala Arg Gly Arg Lys Gly Phe Arg Arg Ile Glu
 290 295 300
 Ala Gly Pro Glu His Ala Pro Tyr Gly Leu Phe Cys Val Ala Pro Gly
 305 310 315 320
 His Gln Leu Gly Phe Asn Asp Leu Lys Ala Ile Glu Val Ala Arg Tyr
 325 330 335
 Leu Glu Ala Leu Ala Gly His His Pro Glu Pro Phe Asn Phe Arg Ala
 340 345 350
 Gly Leu Arg Ile Gln Thr Leu Val Glu Thr Ile His Ala Ser Ser Lys
 355 360 365
 Ser Ala Ala Trp Arg Asp Val Pro Thr Asp Lys Val Lys Leu Gln Ala
 370 375 380
 Lys Ser Arg Gln His Glu Lys Ala

385

390

<210> 29

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> cebador

<220>

<221> misc_feature

<222> (9), (15)

<223> n=a. t. g o c

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (18), (27)

<223> n=inosina

<400> 29

15 atgaarcgna arytncgnat yggyytnaty gg 32

<210> 30

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> cebador

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)

25 <223> n=a, t, g o c

<220>

<221> misc_feature

<222> (18), (24)

<223> n=inosina

30 <400> 30

ggyttyatgg gycgnacnca ygcnttyggy ta 32

<210> 31

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 31

ggyttrtcrm mgayracrtg rstrcc 26

<210> 32

10 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (7), (17)

<223> n=inosina

<400> 32

20 artgwrnrtg rttggngt 19

<210> 33

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> cebador

<400> 33

gctcgtcaac gatcctgaaa ttgat 25

<210> 34

30 <211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 34

5 ttcgctgcag cttcatcgga aatat 25

<210> 35

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> cebador

<400> 35

cccttcaatt tccgggcggg t 21

<210> 36

15 <211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

20 <400> 36

gctggatccc gccctattg tgaata 26

<210> 37

<211> 31

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 37

tatgaattcg ttatgccttc tcatgctgtc g 31

30

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un escilo-inositol purificado que comprende:
 - 5 una primera etapa de precipitación de un complejo escilo-inositol/ácido bórico agregando ácido bórico y un sal metálica a una mezcla líquida que contiene escilo-inositol y un azúcar neutro diferente a escilo-inositol en una cantidad dos veces o más veces el número de moles de escilo-inositol disuelto en la mezcla líquida, y ajustando el pH de la mezcla líquida a 8.0 hasta 11.0;
 - una segunda etapa de separación del complejo a partir de la mezcla líquida;
 - una tercera etapa de disolución del complejo separado en ácido para escindirlo en escilo-inositol y ácido bórico; y
 - 10 una cuarta etapa para aislar y purificar el escilo-inositol a partir de la solución ácida o suspensión ácida obtenida en la tercera etapa, en donde la sal metálica que se va a gregar es de una o más clases de sales metálicas seleccionadas del grupo consistente de NaCl, NaHCO₃, Na₂CO₃, Na₂SO₄, NaHSO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, borax, KCl, KHCO₃, K₂CO₃, K₂SO₄, KHSO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, K₃PO₄, MgCl₂, MgCO₃, y MgSO₄.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, en la primera etapa, las cantidades de ácido bórico y sal metálica que van a ser añadidas es no menor de dos veces, y no más de tres veces el número de moles del escilo-
15 inositol disuelto en la mezcla líquida.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, en la primera etapa, el pH de la mezcla líquida se ajusta de 9.0 a 10.0.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mezcla líquida que contiene el escilo-inositol y el azúcar neutro diferente al escilo-inositol es una mezcla líquida que contiene mio-inositol y escilo-inositol obtenido reduciendo la
20 escilo-inososa en una solución que contiene escilo-inososa.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, en la tercera etapa, la solución obtenida por disolución del complejo en ácido se ajusta a una solución ácida de 0.1 N o superior; y, en la cuarta etapa, la solución ácida se pone en contacto con una resina de intercambio iónico ácida fuerte, y con una resina de intercambio iónico básica fuerte, y con una resina de absorción selectiva de ácido bórico, y luego el escilo-inositol es precipitado desde la solución ácida.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, en la cuarta etapa, el escilo-inositol es precipitado agregando un solvente orgánico acuoso a la solución ácida o a la suspensión ácida.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el solvente orgánico acuoso es etanol o metanol; y el etanol se agrega en un volumen de 0.3 a 3 veces mayor, o el metanol se agrega en un volumen de 0.3 a 5 veces mayor, que el de la solución ácida o la suspensión ácida.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el solvente orgánico acuoso es etanol o metanol, y el etanol se agrega en un volumen 0.6 a 1.5 veces mayor, o el metanol se agrega en un volumen 0.9 a 2 veces mayor, que el de la solución ácida o la suspensión ácida.

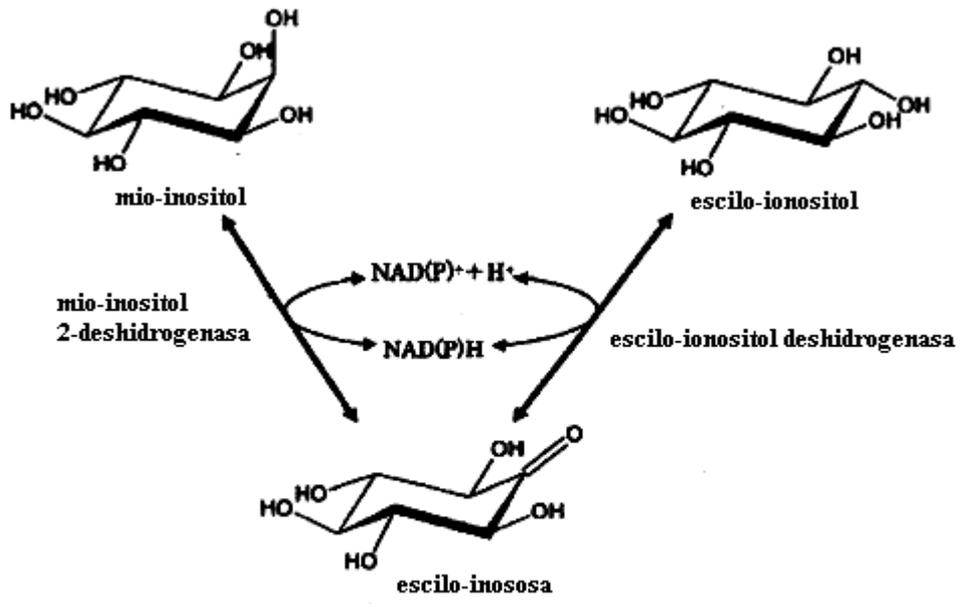


Figura 1