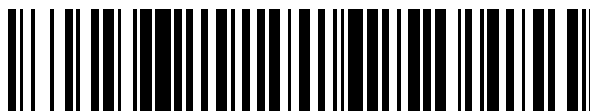


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 294**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/53** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 9/04** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12P 17/04** (2006.01)  
**C12P 7/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2004 E 04738146 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1664303**

54 Título: **Producción microbiana de ácido L-ascórbico**

30 Prioridad:

**14.08.2003 EP 03017677**

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

**30.08.2013**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
HET OVERLOON 1  
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**BERRY, ALAN;  
LEE, CONNIE;  
MAYER, ANNE FRANÇOISE y  
SHINJOH, MASAKO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 421 294 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Producción microbiana de ácido L-ascórbico

La presente invención se refiere a polinucleótidos derivados de polinucleótidos que codifican una enzima que convierte L-sorbose directamente en ácido L-ascórbico. La enzima L-sorbose deshidrogenasa (en lo siguiente: SNDHai) produce ácido L-ascórbico (vitamina C) directamente de L-sorbose. La L-sorbose deshidrogenasa (SNDHai) se derivó de bacterias que pertenecen al género *Gluconobacter* y *Acetobacter*. La presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de ácido L-ascórbico con rendimiento elevado. El ácido L-ascórbico se usa ampliamente en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética.

Durante los últimos 70 años, el ácido L-ascórbico (vitamina C) se ha producido industrialmente a partir de D-glucosa mediante el método de Reichstein bien conocido. Todas las etapas en este procedimiento son químicas excepto una (la conversión de D-sorbitol en L-sorbose), que se lleva a cabo mediante transformación microbiana. Desde su implementación inicial para la producción industrial de ácido L-ascórbico, se han usado varias modificaciones químicas y técnicas para mejorar la eficiencia del método de Reichstein. Desarrollos recientes de la producción de vitamina C se resumen en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5ª Edición, Vol. A27 (1996), p. 547ff. Recientemente se han llevado a cabo diferentes etapas de producción de vitamina C con la ayuda de microorganismos o enzimas aisladas de ellos.

Los métodos actuales de producción para ácido L-ascórbico tienen algunas características indeseables tales como un consumo elevado de energía y uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos e inorgánicos. Por lo tanto, durante las pasadas décadas, se han investigado otros enfoques para fabricar ácido L-ascórbico usando conversiones microbianas, que serían más económicas así como más ecológicas. La producción directa de ácido L-ascórbico se ha dado a conocer en varios microorganismos.

La producción de ácido 2-ceto-L-gulónico (2-KGA), un precursor de ácido L-ascórbico, usando un plásmido que posee los genes que codifican L-sorbose deshidrogenasa (SDH) y L-sorbose deshidrogenasa (SNDH), se ha descrito por Saito et al. (Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, nº 2, 1997, 454-460). Los genes correspondientes se han aislado de la cepa *Gluconobacter oxydans* T-100. Se describe la conversión de L-sorbose en 2-KGA. Lee y Pan (Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23, 1999, 106-111) describen un método de cribado para L-sorbose y L-sorbose deshidrogenasa para la producción de 2-KGA. En el documento WO 03/016508 se describe un procedimiento para producir 2-ceto-L-gulonato de sodio a partir de sorbitol y recuperar ácido 2-ceto-L-gulónico. La generación de cepas mutantes de *Gluconobacter melanogenus* a fin de incrementar la productividad de 2-KGA de tales cepas se ha descrito por Sugisawa et al. (Agricultural and Biological Chemistry, Vol. 54, nº 5, 1990, 1201-1209). Sin embargo, todas estas referencias no hablan sobre la conversión directa de L-sorbose en ácido L-ascórbico. Además, el 2-KGA así producido se ha convertido además mediante un procedimiento químico en ácido L-ascórbico.

Se han descrito las secuencias parciales de un polinucleótido según SEC ID NO:1 (véase, por ejemplo, el número de acceso EMBL AE009265 o el documento WO 97/04101), sin embargo, dirigido a diferentes secuencias nucleotídicas con actividades distintas de aquella de la L-sorbose deshidrogenasa de la presente invención. Nuevamente, ambas referencias no dicen nada sobre la conversión directa de L-sorbose en ácido L-ascórbico.

Las enzimas capaces de catalizar tanto la reacción de L-sorbose a 2-KGA así como a ácido L-ascórbico se han descrito en los documentos WO 03/104445, WO 04/029269, WO 03/089634 o WO 04/029235. Sin embargo, estas enzimas tienen diferente especificidad de sustrato, diferentes secuencias y/o se aíslan de un microorganismo diferente, tal como, por ejemplo, *Ketogulonigenium vulgare* DSM 4025. Además, el rendimiento en la producción de ácido L-ascórbico fue bastante bajo.

La conversión directa de un sustrato en ácido L-ascórbico mediante la actividad catalítica de una enzima, es decir, L-gulonon-gamma-lactona deshidrogenasa, se ha descrito por Sugisawa et al. (Biosci. Biotech. Biochem., 59 (2), 1995, 190-196). Sin embargo, esta enzima necesita como sustrato L-gulonon-gamma-lactona, y no puede catalizar la conversión de L-sorbose en ácido L-ascórbico.

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que la conversión directa de L-sorbose en ácido L-ascórbico se puede llevar a cabo usando la L-sorbose deshidrogenasa (en lo sucesivo denominada SNDHai) aislada de *G. oxydans* N44-1 o enzimas que son ortólogos de la misma que se originan a partir de bacterias del ácido acético que pertenecen a los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*. Se aisló un gen responsable de esta reacción, y se determinó la secuencia. La enzima sorbose deshidrogenasa codificada por este gen convierte L-sorbose en ácido L-ascórbico. Esta enzima es diferente de las enzimas SNDH conocidas. Ácido L-ascórbico o vitamina C, como se usa aquí de forma intercambiable, puede ser cualquier forma química de ácido L-ascórbico encontrada en disoluciones acuosas, tal como por ejemplo sin disociar, en su forma de ácido libre, o disociada como un anión. La forma salina solubilizada de ácido L-ascórbico se puede caracterizar como el anión en presencia de cualquier tipo de cationes encontrados habitualmente en sobrenadantes de fermentación, tales como por ejemplo potasio, sodio, amonio, o calcio. También pueden estar incluidos cristales aislados de la forma de ácido libre de ácido L-ascórbico.

Por otro lado, los cristales aislados de una forma salina de ácido L-ascórbico se denominan mediante su nombre salino correspondiente, es *decir*, ascorbato de sodio, ascorbato de potasio, ascorbato de calcio y similares.

La conversión de L-sorbozona en vitamina C significa que la conversión del sustrato que da como resultado la vitamina C se lleva a cabo mediante SNDH, es *decir*, el sustrato se puede convertir directamente en vitamina C.

5 Un vector de clonación puede ser, por ejemplo, cualquier ADN plasmídico o fágico u otra secuencia de ADN que sea capaz de replicarse de forma autónoma en una célula hospedante, y que se caracteriza por un o un número pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los cuales se pueden cortar tales secuencias de ADN de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, y en los que se puede ajustar un fragmento de ADN a fin de provocar su replicación. El vector de clonación puede contener además, por ejemplo, un marcador adecuado para uso en la identificación de células transformadas con el vector de clonación. Tales marcadores pueden proporcionar, por ejemplo, resistencia a antibióticos, tales como, por ejemplo, tetraciclina o ampicilina.

15 Un vector de expresión puede ser cualquier vector que sea capaz de potenciar la expresión de un gen que se ha clonado en él, después de, por ejemplo, la transformación en un hospedante. El gen clonado se coloca habitualmente bajo el control de (es *decir*, se enlaza operablemente a) ciertas secuencias de control tales como, por ejemplo, secuencias promotoras. Las secuencias promotoras pueden ser constitutivas o inducibles.

20 Una molécula de ácido nucleico puede incluir ADN y ARN. Cualquier forma, tal como, por ejemplo, ácido nucleico bicatenario, monocatenario, y sus nucleósidos, puede ser útil como molécula de ácido nucleico. También se incluyen híbridos, tales como, por ejemplo, híbridos de ADN-ARN, híbridos de ADN-ARN-proteína, híbridos de ARN-proteína, e híbridos de ADN-proteína. Un polinucleótido puede consistir en varias bases, habitualmente al menos 20 bases nucleotídicas.

25 El término "homología" designa la similitud de dos secuencias polinucleotídicas. A fin de determinar la homología, las secuencias polinucleotídicas se colocan de tal manera que se puedan comparar áreas similares. Si es necesario, se pueden sustituir nucleótidos en ciertas posiciones mediante una posición en blanco, a fin de mejorar la similitud. Las comparaciones de homología se pueden llevar a cabo, por ejemplo, manualmente o mediante el uso de programas de ordenador que están comercialmente disponibles. Preferiblemente, el programa se ejecuta en condiciones estándar, a fin de obtener la homología máxima. El grado de homología o similitud entre dos secuencias nucleotídicas se da en "% de homología".

30 Una mutación puede ser, por ejemplo, un único cambio, inserción o supresión de pares de bases en la secuencia nucleotídica de interés, o un suceso genético tal como una inserción de un elemento genético como por ejemplo un transposón.

35 La generación de una mutación en el ADN, es *decir*, mutagénesis, se puede llevar a cabo de diferentes maneras, tal como, por ejemplo, aleatoriamente, es *decir*, mutagénesis al azar, en el que el sitio exacto de mutación no es predecible, produciéndose en cualquier parte en el cromosoma o cromosomas del microorganismo o en el plásmido o plásmidos endógenos. La mutación también se puede generar, por ejemplo, como resultado de daño físico provocado por agentes tales como, por ejemplo, radiación, tratamiento químico, o inserción de un elemento genético.

40 Como promotor, se puede usar cualquier secuencia de ADN que esté situada próxima al codón de partida de un gen respectivo y que inicia la transcripción de uno o más genes adyacentes. En general, el promotor puede estar situado en la región 5' de un gen respectivo. El promotor puede ser un promotor inducible o constitutivo. En el caso de un promotor inducible, la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. En caso de un promotor constitutivo, la tasa de transcripción no está regulada, por ejemplo, mediante un agente inductor.

45 El término "identidad" y "% de identidad" se refiere a la comparación de dos secuencias de aminoácidos usando un programa de análisis de secuencias, como por ejemplo se ejemplifica más abajo. "% idéntico" se refiere al porcentaje de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos objeto que se han emparejado a aminoácidos idénticos en la secuencia de aminoácidos comparada. Si ambas secuencias de aminoácidos que se comparan no difieren en ninguno de sus aminoácidos, son idénticas o tienen una identidad del 100%.

50 En una realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado derivable de una molécula polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene actividad de L-sorbozona deshidrogenasa, que comprende una secuencia nucleotídica parcial de SEC ID NO:1 de al menos 20 nucleótidos consecutivos. De este modo, la presente invención proporciona una molécula polinucleotídica aislada derivada de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de L-sorbozona deshidrogenasa, que comprende una secuencia nucleotídica parcial de al menos 20 nucleótidos consecutivos de SEC ID NO:1. El polinucleótido aislado comprende preferiblemente una secuencia nucleotídica parcial de al menos 50, y más preferiblemente de al menos 100 nucleótidos consecutivos de SEC ID NO:1. Es muy preferido un polinucleótido aislado que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID NO:1. Una realización aún más preferida es un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOS: 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 26. El polinucleótido aislado puede derivar de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de L-sorbozona deshidrogenasa. SEC ID

NO: 1 representa la secuencia nucleotídica completa de SNDHai, que se aisló del microorganismo *Gluconobacter oxydans* N44-1. Parte de tal secuencia se puede usar para diferentes fines. Por ejemplo, se pueden usar polinucleótidos cortos como cebadores para, *por ejemplo*, la amplificación de polinucleótidos adecuados aislados de otros organismos. Un polinucleótido corto puede estar en el intervalo de alrededor de 10 a alrededor de 100 pares de bases (pb), preferentemente alrededor de 14 a alrededor de 50, y preferiblemente alrededor de 17 a alrededor de 30 pb. Los ejemplos de tales secuencias polinucleotídicas cortas se representan mediante SEC ID NOs:5, 6, 7, 8, 9, 10, 23 ó 24. Los polinucleótidos más largos pueden codificar polipéptidos que tienen actividad enzimática. Por ejemplo, el SNDHai tiene un dominio transmembránico que puede no usarse para la actividad enzimática. Si partes del polinucleótido que codifica el área enzimáticamente activa de la proteína se expresan sin el dominio transmembránico, tal polipéptido puede tener actividad enzimática suficiente.

La molécula polinucleotídica aislada deriva habitualmente de una secuencia polinucleotídica más larga que codifica también un polipéptido que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa. Tales polinucleótidos se pueden aislar, por ejemplo, de bacterias. Preferiblemente se aíslan de bacterias que pertenecen a los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*, incluyendo, pero sin limitarse a, *G. oxydans*, *G. frateurii*, *G. cerinus* y *A. acetii*. Cuando tales polinucleótidos derivan de secuencias polinucleotídicas más largas, es posible determinar la homología entre tal secuencia polinucleotídica y SEC ID NO:1. En tal caso, preferiblemente se selecciona un área que tiene al menos 100 nucleótidos consecutivos, y el tramo correspondiente del otro polinucleótido se puede comparar con aquella. Cuando la secuencia polinucleotídica y el tramo correspondiente derivable de SEC ID NO:1 tiene, por ejemplo, 60 nucleótidos que son idénticos al comparar 100 nucleótidos consecutivos, entonces la homología es 60%. De este modo, en una realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado según la presente invención en el que la secuencia nucleotídica parcial deriva de una secuencia polinucleotídica que tiene una homología de al menos 60% con SEC ID NO:1, cuando se comparan al menos 100 nucleótidos consecutivos. Preferiblemente, las secuencias polinucleotídicas parciales de la presente invención tienen una homología de al menos 80%, y más preferiblemente de al menos 90% con SEC ID NO:1. Para la determinación de la homología, se pueden usar, por ejemplo, tramos de al menos 100, preferiblemente tramos de al menos 300, y más preferiblemente tramos de al menos 500 nucleótidos consecutivos.

La presente invención proporciona nuevas secuencias polinucleotídicas que codifican L-sorbose deshidrogenasa de un microorganismo que pertenece a bacterias de ácido acético, incluyendo los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*, para producir ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose. El mencionado polinucleótido codifica preferiblemente un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2 o un polipéptido derivado o derivable de dicho polipéptido mediante, por ejemplo, sustitución, supresión, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2, que retiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa para producir ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose. Se incluyen además secuencias polinucleotídicas que codifican secuencias polipeptídicas parciales de un polipéptido que retiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa para producir ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose, tal como, por ejemplo, polipéptidos representados mediante SEC ID NOs:12, 14, 16, 18, 20, 22, y 27.

Los polipéptidos de la presente invención comprenden preferiblemente secuencias de aminoácidos parciales de al menos 25 aminoácidos consecutivos seleccionadas de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos descritos en la presente solicitud. La persona experta en la técnica está al tanto del hecho de que ciertos tramos en polipéptidos son esenciales para la actividad biológica. Sin embargo, hay otras áreas en las que se pueden insertar, suprimir o sustituir aminoácidos por otros aminoácidos, preferiblemente tales aminoácidos que son similares a los aminoácidos a sustituir.

Esta invención se refiere además a moléculas de ADN recombinante y/o vectores de expresión que comprenden un polinucleótido de la presente invención, especialmente aquel que funciona en una célula hospedante adecuada.

Como célula hospedante, se puede usar cualquier célula que sirva como receptor de molécula o moléculas de ácidos nucleotídicos extrañas, tales como, por ejemplo, una célula que posea un vector de expresión replicable o vector de clonación, o una célula que se manipule genéticamente mediante ingeniería por técnicas bien conocidas para que contenga un gen o genes deseados en su cromosoma o cromosomas o en el genoma. La célula hospedante puede ser de origen procarionta o eucariota, tal como, por ejemplo, células bacterianas, células de animales, incluyendo células humanas, células fúngicas, incluyendo células de levaduras, y células vegetales. Preferiblemente, la célula hospedante pertenece a bacterias que pueden expresar la L-sorbose deshidrogenasa como forma activa *in vivo*, más preferiblemente bacterias de los géneros *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, tales como *P. putida*, o *Escherichia*, tal como *E. coli*.

De este modo, es un aspecto de la presente invención proporcionar una célula hospedante como se describe anteriormente, que comprende tal vector de expresión o que comprende tal nucleótido que tiene el polinucleótido integrado en su ADN cromosómico. Tal célula hospedante se denomina entonces una célula hospedante recombinante u organismo recombinante.

Esta invención se refiere además a un procedimiento para producir un polipéptido de L-sorbose deshidrogenasa recombinante codificado por un polinucleótido de esta invención. Tal procedimiento incluye, por ejemplo, el cultivo de cualquiera de los organismos recombinantes de esta invención como se describe específicamente antes. En

consecuencia, parte de esta invención es el polipéptido de L-sorbozona deshidrogenasa recombinante producido mediante este procedimiento. Tal L-sorbozona deshidrogenasa recombinante se puede usar, por ejemplo, como una enzima soluble en cualquier procedimiento estándar usado para reacciones enzimáticas y conocido por la persona experta, se puede reciclar mediante uso de dispositivos tales como módulos de membrana o reactores de membrana, o se puede inmovilizar sobre un soporte sólido para reacción enzimática en fase sólida.

Otro aspecto de esta invención es un procedimiento para producir ácido L-ascórbico, que comprende convertir un sustrato en ácido L-ascórbico con la ayuda del polipéptido de L-sorbozona deshidrogenasa recombinante codificado por un polinucleótido de esta invención. El uso de una L-sorbozona deshidrogenasa (SNDHai) aislada de un microorganismo que produce tal enzima de forma natural, *es decir*, de forma no recombinante, en la que la SNDHai aislada es codificada por un polinucleótido de esta invención, también están incluido por la presente invención.

Como sustrato, se puede usar una fuente de carbono que se pueda convertir en ácido L-ascórbico mediante la SNDHai como se codifica mediante un polinucleótido de la presente invención. Los sustratos preferidos se seleccionan de L-sorbozona, D-sorbitol, y L-sorbozona.

En una realización de esta invención, el procedimiento para producir ácido L-ascórbico comprende convertir L-sorbozona o D-sorbitol en ácido L-ascórbico en una célula hospedante que tiene la capacidad para convertir L-sorbozona en L-sorbozona, o para convertir D-sorbitol en L-sorbozona.

En otra realización, el procedimiento para la producción de ácido L-ascórbico comprende convertir L-sorbozona en ácido L-ascórbico con la ayuda de la SNDHai recombinante codificada por un polinucleótido de esta invención. La L-sorbozona deshidrogenasa (SNDHai) aislada de un microorganismo que produce tal enzima de forma natural, *es decir*, de forma no recombinante, en la que la SNDHai aislada es codificada por un polinucleótido de esta invención, también se puede usar para tal procedimiento.

La invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican la enzima (L-sorbozona deshidrogenasa SNDHai, o sus partes). Los métodos y técnicas diseñados para la manipulación de moléculas de ácidos nucleicos aisladas son bien conocidos en la técnica. Los métodos para el aislamiento, purificación y clonación de moléculas de ácidos nucleicos, así como los métodos y técnicas que describen el uso de hospedantes eucariotas y procariontes y la expresión de ácidos nucleicos y de proteínas en ellos, son bien conocidos por la persona experta.

Los derivados funcionales de polipéptidos de la presente invención también pueden ser parte de la presente invención, y se definen en base a las secuencias de aminoácidos de la presente invención mediante adición, inserción, supresión y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos de tales secuencias, en los que tales derivados todavía tienen preferiblemente la actividad de L-sorbozona deshidrogenasa medida mediante un ensayo conocido en la técnica o descrito específicamente aquí. Tales derivados funcionales se pueden obtener mediante síntesis peptídica química conocida en la técnica, o mediante técnicas recombinantes en base a las secuencias de ADN como se describe aquí mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Se conocen intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos que no alteran generalmente la actividad de tales moléculas.

En realizaciones particulares de la presente invención, las sustituciones conservativas de interés se producen según lo siguiente: como sustituciones ejemplares, son razonables Ala por Val/Leu/Ile, Arg por Lys/Gln/Asn, Asn por Gln/His/Lys/Arg, Asp por Glu, Cys por Ser, Gln por Asn, Glu por Asp, Gly por Pro/Ala, His por Asn/Gln/Lys/Arg, Ile por Leu/Val/Met/Ala/Phe/norLeu, Lys por Arg/Gln/Asn, Met por Leu/Phe/Ile, Phe por Leu/Val/Ile/Ala/Tyr, Pro por Ala, Ser por Thr, Thr por Ser, Trp por Tyr/Phe, Tyr por Trp/Phe/Thr/Ser, y Val por Ile/Leu/Met/Phe/Ala/norLeu. Como ejemplos preferidos, son razonables Ala por Val, Arg por Lys, Asn por Gln, Asp por Glu, Cys por Ser, Gln por Asn, Glu por Asp, Gly por Ala, His por Arg, Ile por Leu, Leu por Ile, Lys por Arg, Met por Leu, Phe por Leu, Pro por Ala, Ser por Thr, Thr por Ser, Trp por Tyr, Tyr por Phe, and Val por Leu. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados sustituciones ejemplares descritas anteriormente, y se seleccionan los productos.

Excepto que se indique de otro modo, todas las secuencias nucleotídicas determinadas mediante secuenciación de una molécula de ADN aquí se determinaron usando un secuenciador de ADN automatizado (tal como el modelo de analizador genético de Applied Biosystems PRISM 310). Por lo tanto, como se sabe en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada mediante este enfoque automatizado, cualquier secuencia nucleotídica determinada aquí puede contener algunos errores. Las secuencias nucleotídicas determinadas mediante automatización son típicamente al menos alrededor de 90% homólogas, más típicamente al menos alrededor de 95% a al menos alrededor de 99,9% homólogas de la secuencia nucleotídica real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real se puede determinar de forma más precisa mediante otros enfoques, incluyendo métodos de secuenciación de ADN manuales bien conocidos en la técnica. Como se sabe en la técnica, una única inserción o supresión en una secuencia nucleotídica determinada, en comparación con la secuencia real, provocará un desplazamiento del marco en la traducción de la secuencia nucleotídica, de forma que la secuencia de aminoácidos predicha codificada por una secuencia nucleotídica determinada será completamente diferente de la secuencia de aminoácidos realmente codificada por la molécula de ADN secuenciada, comenzando en el punto de tal inserción o supresión.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene la actividad de L-sorbose deshidrogenasa como se describe en el listado de secuencias como SEC ID NO:2, así como las hebras complementarias, o a aquellos que incluyen estas secuencias, secuencias o fragmentos de ADN de los mismos, y secuencias de ADN, que se hibridan en condiciones estándar con tales secuencias pero que codifican polipéptidos que tienen exactamente la misma secuencia de aminoácidos.

Otro modo de describir la similitud de las secuencias polinucleotídicas es determinar si tales secuencias se hibridan o no. Esto depende de las condiciones seleccionadas para la hibridación.

Condiciones estándar para la hibridación significa en este contexto tales condiciones que se usan generalmente por una persona experta en la técnica para detectar señales de hibridación específicas, o preferiblemente las denominadas "condiciones de hibridación restrictivas" usadas por una persona experta en la técnica. De este modo, como se usa aquí, la expresión "condiciones de hibridación restrictivas" significa que la hibridación se producirá si hay alrededor de 95%, y preferiblemente al menos 97% de homología entre las secuencias. Las condiciones de hibridación restrictivas son, *por ejemplo*, incubación de 2 h a 4 días a 42°C usando una sonda de ADN marcada con digoxigenina (DIG) (preparada usando un sistema de marcaje con DIG; Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Alemania) en una disolución tal como disolución DigEasyHyb (Roche Diagnostics GmbH) con o sin 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, o una disolución que comprende formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), dodecilsulfato de sodio al 0,02%, N-lauroilsarcosina al 0,1%, y reactivo de bloqueo al 2% (Roche Diagnostics GmbH), seguido del lavado dos veces de los filtros durante 5 a 15 minutos en 2 x SSC y SDS al 0,1% a temperatura ambiente, y después un lavado de dos veces durante 15-30 minutos en 0,5 x SSC y SDS al 0,1% o 0,1 x SSC y SDS al 0,1% a 65-68°C.

En un aspecto, el gen que codifica L-sorbose deshidrogenasa, la molécula de ácido nucleico que contiene dicho gen, el vector de expresión y el organismo recombinante usado en la presente invención se pueden obtener mediante las siguientes etapas:

(1) mutagénesis transposónica como se describe más abajo en las cepas que pertenecen al género *Gluconobacter* o *Acetobacter*, cepas que producen ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose, para obtener colonias que expresan resistencia a antibióticos codificada por el transposón usado;

(2) selección de mutantes no productores de ácido L-ascórbico en el cribado con L-sorbose como sustrato;

(3) aislamiento de ADN cromosómico de los mutantes;

(4) clonación del fragmento de ADN que contiene el transposón procedente del ADN cromosómico mediante hibridación de colonias, en placa, o Southern, clonación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), etc.;

(5) determinación de la secuencia nucleotídica del fragmento de ADN que contiene la inserción transposónica;

(6) clonación del fragmento de ADN procedente de la cepa progenitora que produce ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose;

(7) construcción del vector de expresión en el que el gen que codifica L-sorbose deshidrogenasa se puede expresar eficientemente;

(8) construcción de organismos recombinantes que poseen el gen que codifica L-sorbose deshidrogenasa mediante un método apropiado para introducir ADN en una célula hospedante, *por ejemplo* transformación, transducción, transferencia conyugal y/o electroporación, célula hospedante la cual se convierte de ese modo en un organismo recombinante de esta invención.

La mutagénesis transposónica es conocida como una herramienta potente para el análisis genético (P. Gerhardt et al., "Methods for General and Molecular Bacteriology" Capítulo 17, Transposon Mutagenesis; American Society for Microbiology).

Se conoce en la técnica una variedad de transposones, tales como Tn3, Tn5, Tn7, Tn9, Tn10, fago Mu y similares. Entre ellos, se sabe que Tn5 tiene casi ninguna especificidad de inserción, y su tamaño es relativamente pequeño. Con el fin de usarlo en la mutagénesis aleatoria en la práctica de la presente invención, se prefiere Tn5. También es útil para la presente invención una variedad de derivados de Tn5, denominados Mini-Tn5s, que consisten en 19 pb de las repeticiones invertidas de Tn5 requeridas para la transposición acoplados a resistencia a antibióticos u otros genes marcadores seleccionables. Tales Mini-Tn5s se insertan en un vector suicida, además de la Tn5 transposasa (tnp), para construir un sistema de mutagénesis de Tn5 suicida eficiente.

La mutagénesis al azar con transposón implica la introducción de un transposón en una célula bacteriana diana vía, *por ejemplo*, transformación, transducción, emparejamiento conyugal o electroporación usando vectores suicida plasmídicos o fágicos. Los mutantes resultantes se pueden cribar con la ayuda del marcador portado por el

transposón. La transposición del transposón en el genoma de la bacteria receptora se puede detectar después de que el vector usado se haya perdido por segregación.

Para la introducción de transposones en microorganismos del género *Gluconobacter* o *Acetobacter*, habitualmente se usan los denominados vectores suicida que incluyen, por ejemplo, un derivado del fago P1 y plásmidos de intervalo estrecho de hospedantes, tales como un derivado de pBR325 que posee un origen de replicación ColE1. Los vectores del fago P1 y los vectores plasmídicos se pueden transferir mediante infección y mediante transformación, emparejamiento conyugal o electroporación, respectivamente, en las células receptoras en las que estos vectores carecen preferiblemente de los orígenes apropiados de receptores. La elección del vector suicida y del transposón a usar depende de criterios que incluyen, por ejemplo, la sensibilidad del fago, la resistencia intrínseca a antibióticos de la célula receptora, la disponibilidad de un sistema de transferencia génica que incluye transformación, transferencia conyugal, electroporación, o infección para introducir el vector que posee el transposón en *E. coli*.

Uno de los vectores preferibles para uso en la presente invención es, por ejemplo, el fago P1 (ATCC25404), que inyecta su ADN en un microorganismo que pertenece al género *Gluconobacter* o *Acetobacter*; sin embargo, este ADN será incapaz de replicarse y se perderá mediante segregación. Tal fago P1 que posee Tn5 (P1::Tn5) se puede usar en forma de lisados de fagos que se pueden preparar lisando *E. coli* que posee P1::Tn5 según procedimientos conocidos (véase, *por ejemplo*, "Methods for General and Molecular Bacteriology" Capítulo 17, Transposon Mutagenesis; American Society for Microbiology o la patente US 5082785, 1992).

Para confirmar que el mutante deficiente porta realmente el transposón, se pueden llevar a cabo métodos tales como, por ejemplo, hibridación de colonias o hibridación Southern, con fragmentos de ADN marcados que contienen el transposón usado como la sonda mediante métodos estándar (Molecular cloning, a laboratory manual segunda edición, Maniatis T., et al., 1989).

Tal mutante se aisló como se describe en el Ejemplo 5 de la presente invención. El mutante transposónico puede ser útil para identificar además el gen diana que codifica L-sorbose deshidrogenasa y para determinar la secuencia nucleotídica de la región etiquetada con el transposón.

El fragmento de ADN que contiene una inserción transposónica se puede clonar en cualquiera de los vectores de clonación de *E. coli*, preferiblemente pUC18, pUC19, pBluescript II KS+ (Stratagene Europe) y sus familiares, seleccionando transformantes que muestran ambos fenotipos de marcadores de selección del vector y del transposón. Las secuencias nucleotídicas adyacentes al transposón se pueden determinar mediante métodos de secuenciación conocidos en la técnica.

Como alternativa, cuando dicho polipéptido de L-sorbose deshidrogenasa se purifica a partir de la cepa que produce ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose, el gen deseado se puede clonar en vectores plasmídicos o fágicos a partir de un ADN cromosómico total mediante los siguientes métodos ilustrativos:

(i) Las secuencias de aminoácidos parciales se pueden determinar a partir de las proteínas purificadas o sus fragmentos peptídicos mediante métodos tales como, por ejemplo, desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI). Tal proteína completa o fragmentos peptídicos se pueden preparar mediante el aislamiento de tal proteína completa o mediante tratamiento con peptidasas a partir del gel tras electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). La proteína así obtenida o sus fragmentos también se pueden aplicar a un secuenciador proteico tal como el secuenciador en fase gaseosa automático de Applied Biosystems 470A. Las secuencias de aminoácidos se pueden utilizar para diseñar y preparar sondas oligonucleotídicas y/o cebadores con sintetizador de ADN, tal como, por ejemplo, el secuenciador de ADN automático de Applied Biosystems 381A. Las sondas se pueden usar para aislar clones que poseen el gen diana a partir de una librería génica de la cepa que porta el gen diana por medio de, por ejemplo, hibridación Southern, hibridación de colonias o hibridación en placa.

(ii) Alternativamente además, con el fin de seleccionar clones que expresan la proteína diana a partir de la librería génica, se pueden aplicar métodos inmunológicos con, por ejemplo, un anticuerpo preparado contra la proteína diana.

(iii) El fragmento de ADN del gen diana se puede amplificar a partir del ADN cromosómico total mediante por ejemplo PCR con un conjunto de cebadores, es decir, dos oligonucleótidos sintetizados según las secuencias de aminoácidos determinadas como antes. Entonces se puede aislar a partir de la librería génica construida, *por ejemplo*, en *E. coli*, mediante por ejemplo hibridación Southern, de colonias, o en placa, con el producto de la PCR obtenido como antes como sonda, un clon que posee el gen completo.

Las secuencias de ADN que se pueden obtener mediante PCR usando cebadores diseñados en base a las secuencias de ADN descritas allí por métodos conocidos en la técnica también son un objeto de la presente invención. El anticuerpo mencionado anteriormente se puede preparar, por ejemplo, con las proteínas de L-sorbose deshidrogenasa purificadas, las proteínas de L-sorbose deshidrogenasa recombinantes purificadas, tales como, por ejemplo, L-sorbose deshidrogenasa etiquetada con His expresada en *E. coli*, o su fragmento

peptídico, como antígeno. Como antígeno para la preparación de un anticuerpo, se puede usar una secuencia polipeptídica deducida a partir de una secuencia nucleotídica de la L-sorbozona deshidrogenasa.

Una vez que se obtiene un clon que posee el gen deseado, la secuencia nucleotídica del gen diana se puede determinar mediante un método bien conocido.

5 Para expresar eficientemente la secuencia génica/nucleotídica deseada, se pueden usar diversos promotores; *por ejemplo*, el promotor original del gen, promotores de genes con resistencia a antibióticos tales como, por ejemplo, el gen de Tn5 resistente a canamicina, el gen de pBR322 resistente a ampicilina, y beta-galactosidasa de promotor de *E. coli* (*lac*), *trp*-, *tac*-, *trc*, promotores del fago lambda, y cualquier promotor que pueda ser funcional en la célula hospedante. Para este fin, la célula hospedante se puede seleccionar de un grupo que consiste en células bacterianas, células animales, incluyendo células humanas, células fúngicas, incluyendo células de levadura, y células vegetales. Preferiblemente, la célula hospedante pertenece a bacterias que pueden expresar la L-sorbozona deshidrogenasa como una forma activa *in vivo*, en particular bacterias de los géneros *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* y *Escherichia*.

15 Para la expresión, se pueden usar con los promotores descritos anteriormente otros elementos reguladores, tales como por ejemplo una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) (*por ejemplo*, AGGAGG, etc., incluyendo secuencias naturales y sintéticas operables en la célula hospedante) y un terminador transcripcional (estructura de repetición invertida que incluye cualquier secuencia natural y sintética) que son operables en la célula hospedante (en la que se introducirá la secuencia codificante para proporcionar una célula recombinante de esta invención).

20 En la clonación del ADN bicatenario, se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de vectores hospedantes/de clonación. Los vectores preferidos para la expresión del gen de la presente invención, *es decir*, el gen SNDHai, en *E. coli* se pueden seleccionar de cualesquiera vectores usados por ejemplo en *E. coli*, tales como por ejemplo los vectores pQE, que pueden expresar proteínas recombinantes etiquetadas con His (QIAGEN AG Suiza), pBR322 o sus derivados incluyendo por ejemplo pUC18 y pBluescript II (Stratagene Cloning Systems, Calif., USA), pACYC177 y pACYC184 y sus derivados, y un vector derivado de un plásmido de un intervalo amplio de hospedantes, tal como RK2 y RSF1010. Un vector preferido para la expresión de la secuencia nucleotídica de la presente invención en bacterias, incluyendo *Gluconobacter*, *Acetobacter*, y *Pseudomonas*, se selecciona de cualesquiera vectores que se pueden replicar en *Gluconobacter*, *Acetobacter*, o *Pseudomonas*, así como en un organismo de clonación preferido tal como *E. coli*. El vector preferido es un vector de amplio intervalo de hospedantes, tal como, por ejemplo, un vector cosmídico como pVK100 y sus derivados, y RSF1010. El número de copias y la estabilidad del vector se deberían de considerar con cuidado para la expresión estable y eficiente del gen clonado, y también para el cultivo eficiente de la célula hospedante que posee el gen clonado. Las moléculas de ácido nucleico que contienen, por ejemplo, elementos transposables tales como Tn5 también se pueden usar como un vector para introducir el gen deseado en el hospedante preferido, especialmente en un cromosoma. Las moléculas de ácido nucleico que contienen cualesquiera ADN aislados del hospedante preferido junto con el gen SNDHai de la presente invención también pueden ser útiles para introducir este gen en la célula hospedante preferida, especialmente en un cromosoma. Tales moléculas de ácido nucleico se pueden transferir al hospedante preferido aplicando cualquiera de los métodos convencionales, *por ejemplo* transformación, transducción, emparejamiento conyugal o electroporación, que son bien conocidos en la técnica, considerando la naturaleza de la célula hospedante y la molécula de ácido nucleico.

40 Las secuencias génicas/nucleotídicas de L-sorbozona deshidrogenasa proporcionadas en esta invención se pueden ligar en un vector adecuado que contiene una región reguladora, tal como por ejemplo un promotor, un sitio de unión ribosómico, y un terminador transcripcional operable en la célula hospedante descrito anteriormente, con un método bien conocido en la técnica para producir un vector de expresión.

45 Para construir un microorganismo recombinante que posee un vector de expresión, se pueden usar diversos métodos de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, transformación, transducción, emparejamiento conyugal, y electroporación. El método para construir una célula recombinante se puede seleccionar de los métodos bien conocidos en el campo de la biología molecular. Por ejemplo, se pueden usar sistemas de transformación convencionales para *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, o *Escherichia*. También se puede usar un sistema de transducción para *E. coli*. El sistema de emparejamiento conyugal se puede usar ampliamente en bacterias grampositivas y gramnegativas, incluyendo, por ejemplo, *E. coli*, *P. putida*, y *Gluconobacter*. Un ejemplo de emparejamiento conyugal se describe en el documento WO 89/06.688. La conjugación se puede producir, por ejemplo, en medio líquido o sobre una superficie sólida. Los ejemplos para un receptor para la producción de SNDHai incluyen, por ejemplo, microorganismos de *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, o *Escherichia*. Al receptor para el emparejamiento conyugal, se puede añadir un marcador selectivo; por ejemplo, habitualmente se selecciona resistencia frente a ácido nalidíxico o rifampicina. También se puede usar resistencia natural; por ejemplo, para muchas *Gluconobacters* es útil la resistencia contra polimixina B.

60 La presente invención proporciona L-sorbozona deshidrogenasa (SNDHai) recombinante. Se puede incrementar el rendimiento de producción de la enzima L-sorbozona deshidrogenasa introduciendo el gen de L-sorbozona deshidrogenasa proporcionado por la presente invención en células hospedantes descritas anteriormente. En un aspecto, las proteínas de L-sorbozona deshidrogenasa se producen en una célula hospedante seleccionada de un



grupo que consiste en *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, o *Escherichia* usando el gen de L-sorbose deshidrogenasa de la presente invención.

El microorganismo que es capaz de expresar SNDHai como se codifica mediante una secuencia polinucleotídica de la presente invención se puede cultivar en un medio acuoso suplementado con nutrientes apropiados en condiciones aerobias. El cultivo se puede realizar en modo discontinuo, discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo. El período de cultivo puede variar dependiendo, por ejemplo, del hospedante usado para la expresión del polipéptido diana, del pH, de la temperatura y del medio nutriente a usar, y es preferiblemente alrededor de 1 a alrededor de 10 días cuando se lleva a cabo en modo discontinuo o discontinuo alimentado. El cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, a un pH de alrededor de 4,0 a alrededor de 9,0, preferiblemente alrededor de 5,0 a alrededor de 8,0. El intervalo preferido de temperatura para llevar a cabo el cultivo es de alrededor de 13°C a alrededor de 36°C, preferiblemente de alrededor de 18°C a alrededor de 33°C. Habitualmente, el medio de cultivo puede contener nutrientes tales como fuentes de carbono asimilables, *por ejemplo*, glicerol, D-manitol, D-sorbitol, L-sorbose, eritritol, ribitol, xilitol, arabitol, inositol, dulcitol, D-ribosa, D-fructosa, D-glucosa, y sacarosa, preferiblemente D-sorbitol, D-manitol, y glicerol; y fuentes de nitrógeno digeribles tales como sustancias orgánicas, *por ejemplo*, peptona, extracto de levadura, levadura de panadería, urea, aminoácidos, y licor de maceración del maíz. También se pueden usar diversas sustancias inorgánicas como fuentes de nitrógeno, *por ejemplo* nitratos y sales amónicas. Además, el medio de cultivo puede contener habitualmente sales inorgánicas, *por ejemplo* sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, fosfato de potasio, y carbonato de calcio.

Se entiende que el procedimiento para la producción de vitamina C a partir del sustrato usando un hospedante que comprende la SNDHai codificada por un polinucleótido de la presente invención se lleva a cabo con células en crecimiento, *es decir*, velocidades específicas de crecimiento de las células que son por ejemplo al menos 0,02 h<sup>-1</sup>.

Una realización de la presente invención es el uso de SNDHai aislada codificada por una secuencia nucleotídica como se describe aquí para la producción de vitamina C. Para el aislamiento y purificación de SNDHai a partir del microorganismo tras el cultivo, las células del microorganismo se pueden cosechar del caldo de cultivo líquido, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración. Las células cosechadas se pueden lavar, por ejemplo, con agua, disolución salina fisiológica o una disolución de tampón que tiene un pH apropiado. Las células lavadas se pueden suspender en una disolución de tampón apropiada y se pueden destruir por medio de, por ejemplo, un homogeneizador, un aparato de ultrasonidos, una prensa francesa, o mediante tratamiento con lisozima y similar para dar una disolución de células disgregadas. La L-sorbose deshidrogenasa se puede aislar y purificar a partir del extracto libre de células o a partir de las células disgregadas, preferiblemente a partir de la fracción de membrana mediante métodos estándar tales como, por ejemplo, ultracentrifugación, solubilización diferencial usando detergentes apropiados, precipitación mediante sales u otros agentes adecuados, diálisis, cromatografías de intercambio iónico, cromatografías con hidroxipatita, cromatografías hidrófobas, cromatografías de exclusión molecular, cromatografías de afinidad, o cristalización. Cuando la L-sorbose deshidrogenasa recombinante se produce como polipéptido etiquetado, tal como por ejemplo aquel etiquetado con His, se puede purificar con resinas de afinidad tales como, por ejemplo, una resina de afinidad de níquel. La purificación de L-sorbose deshidrogenasa se puede monitorizar fotométricamente usando, por ejemplo, aceptores de electrones artificiales, tales como cloruro de nitroazultetrazolio (NBT) y metosulfato de fenazina, 2,6-diclorofenol indofenol (DCIP), ferricianuro o citocromo c.

La producción de ácido L-ascórbico con la ayuda de la SNDHai como se describe aquí se proporciona mediante la presente invención. La fuente de la SNDHai no es crítica. Este procedimiento se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, microorganismos capaces de expresar de forma natural la enzima SNDHai activa, SNDHai codificada por una secuencia nucleotídica de la presente invención que se aísla de dichos microorganismos, organismos recombinantes como se describe anteriormente que poseen el gen de SNDHai de la presente invención, o usando la SNDHai nativa y/o recombinante en forma de una fracción de membrana, enzima soluble o inmovilizada que actúa como biocatalizador para convertir L-sorbose en ácido L-ascórbico como se describe más abajo. El método descrito anteriormente para el aislamiento y purificación de SNDHai se puede usar tanto para la SNDHai nativa como recombinante.

Los organismos recombinantes usados para la producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose se pueden cultivar como se describe anteriormente. Preferiblemente, el organismo recombinante se selecciona del grupo que consiste en *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, y *Escherichia* que posee el gen de L-sorbose deshidrogenasa de la presente invención. El microorganismo recombinante se puede cultivar en las mismas condiciones como se describe anteriormente. Si el organismo recombinante que se usa para la producción de ácido L-ascórbico no es capaz de convertir ninguna de las fuentes de carbono descritas anteriormente en L-sorbose, entonces se ha de añadir L-sorbose al medio a usar como precursor para la producción de ácido L-ascórbico. El período de reacción puede variar dependiendo del pH, de la temperatura y de la mezcla de reacción a usar, y es preferiblemente alrededor de 1 a alrededor de 10 días cuando se lleva a cabo en modo discontinuo o discontinuo alimentado.

En una realización, la SNDHai de la presente invención, ya sea recombinante o nativa, *es decir*, enzima no recombinante aislada, se purifica del medio de cultivo como se describe anteriormente y se usa en forma de enzima soluble o inmovilizada como biocatalizador para convertir L-sorbose en ácido L-ascórbico en cualquier modo de

procedimiento conocido por la persona experta, tal como modo discontinuo, discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo. La L-sorbose deshidrogenasa purificada se puede usar, por ejemplo, como tal en forma soluble, retenida en la vasija de reacción por medio de dispositivos de membrana, o como enzima inmovilizada en cualquier fase sólida tal como, por ejemplo, matrices porosas o poliméricas. Por ejemplo, la enzima se puede unir directamente a una membrana, gránulos, o similar de una resina que tiene uno o más grupos funcionales, o se puede unir a la resina a través de compuestos formadores de puentes que tienen uno o más grupos funcionales, por ejemplo glutaraldehído. La reacción que usa enzima purificada en forma soluble, retenida o inmovilizada puede tener lugar, por ejemplo, en medio acuoso que contiene L-sorbose u otros nutrientes apropiados en condiciones aerobias. El medio de reacción puede contener, por ejemplo, sales inorgánicas, por ejemplo sulfato de magnesio, fosfato de potasio y carbonato de calcio. La reacción se puede llevar a cabo a un pH de alrededor de 4,0 a alrededor de 9,0, preferiblemente alrededor de 5,0 a alrededor de 8,0. El intervalo preferido de temperatura para llevar a cabo la reacción es de alrededor de 13°C a alrededor de 36°C, preferiblemente de alrededor de 18°C a alrededor de 33°C.

Los microorganismos que se pueden usar para la presente invención pueden estar públicamente disponibles de diferentes fuentes, por ejemplo Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Alemania, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA el 12 de mayo de 2003, o Culture Collection Division, NITE Biological Resource Center, 2-5-8, Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón (antiguamente: Institute for Fermentation, Osaka (IFO), 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón). Los ejemplos de bacterias preferidas depositadas en IFO son, por ejemplo, *Gluconobacter oxydans* (antiguamente conocida como *G. melanogenus*) IFO 3293, *Gluconobacter oxydans* (antiguamente conocida como *G. melanogenus*) IFO 3292, *Gluconobacter oxydans* (antiguamente conocida como *G. rubiginosus*) IFO 3244, *Gluconobacter frateurii* (antiguamente conocida como *G. industrius*) IFO 3260, *Gluconobacter cerinus* IFO 3266, *Gluconobacter oxydans* IFO 3287, y *Acetobacter aceti subsp. orleanus* IFO 3259, que se depositaron todas el 5 de abril de 1954; *Acetobacter aceti subsp. xylinum* IFO 13693 depositada el 22 de octubre de 1975, y *Acetobacter aceti subsp. xylinum* IFO 13773 depositada el 08 de diciembre de 1977. La cepa *Acetobacter sp.* ATCC 15164, que es también un ejemplo de bacteria preferida, se depositó en ATCC. La cepa *Gluconobacter oxydans* (antiguamente conocida como *G. melanogenus*) N44-1 como otro ejemplo de bacteria preferida es un derivado de la cepa IFO 3293, y se describe en Sugisawa et al., Agric. Biol. Chem. 54:1201-1209, 1990.

Se entiende que los microorganismos mencionados anteriormente también incluyen sinónimos o basónimos de tales especies que tienen las mismas propiedades fisiológicas, como se define por el International Code of Nomenclature of Prokaryotes.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de ácido L-ascórbico (vitamina C) con rendimiento elevado usando células en reposo de un microorganismo capaz de convertir fuentes de carbono dadas en vitamina C.

La producción directa de ácido L-ascórbico se ha dado a conocer en varios microorganismos, usando diferentes métodos de cultivo. Sin embargo, la desventaja de tales procedimientos es el bajo rendimiento de vitamina C producida debido a la inestabilidad del producto. Usando, por ejemplo, microorganismos que se sabe que son tanto capaces de producir ácido 2-ceto-L-gulónico (2-KGA) como vitamina C, el rendimiento de vitamina C producida microbiológicamente está limitado adicionalmente por la producción relativamente elevada de 2-KGA, que se sintetiza más fácilmente por dicho microorganismo, conduciendo, por ejemplo, a relaciones entre la concentración de vitamina C y 2-KGA que son menores que 0,1. De este modo, es un objeto de la presente invención mejorar la producción microbiológica de vitamina C para obtener mayores rendimientos que con los procedimientos descritos en la técnica anterior.

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que un procedimiento que usa células en reposo de un microorganismo capaz de llevar a cabo la conversión directa de un sustrato en vitamina C conduce a mayores rendimientos de vitamina C.

En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de vitamina C que comprende convertir un sustrato en vitamina C en un medio que comprende células en reposo de un microorganismo.

Como sustrato para el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, se puede usar una fuente de carbono que se puede convertir en ácido L-ascórbico y que es fácilmente obtenible a partir de la ruta de metabolización de D-glucosa o D-sorbitol, tal como, por ejemplo, D-glucosa, D-sorbitol, L-sorbose, L-sorbose, 2-ceto-L-gulonato, D-gluconato, 2-ceto-D-gluconato o 2,5-diceto-gluconato. Otro sustrato posible puede ser galactosa. Preferiblemente, el sustrato se selecciona de, por ejemplo, D-glucosa, D-sorbitol, L-sorbose o L-sorbose, más preferiblemente de D-glucosa, D-sorbitol o L-sorbose, y muy preferiblemente de D-sorbitol o L-sorbose. El término "sustrato" y "sustrato de producción", en relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, se usa aquí de forma intercambiable.

La conversión del sustrato en vitamina C en relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo significa que la conversión del sustrato que da como resultado vitamina C se lleva a cabo mediante

el microorganismo, *es decir*, el sustrato se puede convertir directamente en vitamina C. Dicho microorganismo se cultiva en condiciones que permiten tal conversión a partir del sustrato como se define anteriormente.

Un medio como se usa aquí para el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo puede ser cualquier medio adecuado para la producción de vitamina C. Típicamente, el medio es un medio acuoso que comprende, por ejemplo, sales, sustrato o sustratos, y un cierto pH. El medio en el que el sustrato se convierte en vitamina C se denomina también como el medio de producción.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, se puede usar cualquier microorganismo capaz de llevar a cabo la conversión del sustrato en vitamina C, tal como, por ejemplo, levadura, algas o bacterias, ya sea cepas de tipo salvaje, cepas mutantes derivadas mediante mutagénesis clásica y métodos de selección, o como cepas recombinantes. Los ejemplos de tal levadura pueden ser, *por ejemplo*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Scyzosaccharomyces*, o *Kluyveromyces*. Un ejemplo de tales algas puede ser, *por ejemplo*, *Chlorella*. Los ejemplos de tales bacterias pueden ser, *por ejemplo*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Ketogulonicigenium*, *Pantoea*, *Cryptococcus*, *Pseudomonas*, tal como, *por ejemplo*, *Pseudomonas putida*, y *Escherichia*, tal como, *por ejemplo*, *Escherichia coli*. Se prefieren *Gluconobacter* o *Acetobacter aceti*, tal como por ejemplo *G. oxydans*, *G. cerinus*, *G. frateurii*, *A. aceti subsp. xylinum* o *A. aceti subsp. orleanus*.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, los microorganismos que se pueden usar para la presente invención pueden estar públicamente disponibles de diferentes fuentes, *por ejemplo* Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Alemania, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA el 12 de mayo de 2003, o Culture Collection Division, NITE Biological Resource Center, 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón (antiguamente: Institute for Fermentation, Osaka (IFO), 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón). Los ejemplos de bacterias preferidas depositadas en IFO son, por ejemplo, *Gluconobacter oxydans* (antiguamente conocida como *G. melanogenus*) IFO 3293, *Gluconobacter oxydans* (antiguamente conocida como *G. melanogenus*) IFO 3292, *Gluconobacter oxydans* (antiguamente conocida como *G. rubiginosus*) IFO 3244, *Gluconobacter frateurii* (antiguamente conocida como *G. industrius*) IFO 3260, *Gluconobacter cerinus* IFO 3266, *Gluconobacter oxydans* IFO 3287, y *Acetobacter aceti subsp. orleanus* IFO 3259, que se depositaron todas el 5 de abril de 1954; *Acetobacter aceti subsp. xylinum* IFO 13693 depositada el 22 de octubre de 1975, y *Acetobacter aceti subsp. xylinum* IFO 13773 depositada el 08 de diciembre de 1977. La cepa *Acetobacter sp.* ATCC 15164, que es también un ejemplo de una bacteria preferida, se depositó en ATCC. La cepa *Gluconobacter oxydans* (antiguamente conocida como *G. melanogenus*) N44-1, como otro ejemplo de bacteria preferida, es un derivado de la cepa IFO 3293, y se describe en Sugisawa et al., Agric. Biol. Chem. 54:1201-1209, 1990.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, se entiende que los microorganismos mencionados anteriormente también incluyen sinónimos o basónimos de tales especies que tienen las mismas propiedades fisiológicas, como se define por el International Code of Nomenclature of Prokaryotes. La nomenclatura de los microorganismos como se usa aquí es aquella oficialmente aceptada (en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad) por el International Committee on Systematics of Prokaryotes y la Bacteriology and Applied Microbiology Division of the International Union of Microbiological Societies, y publicada por su vehículo de publicación oficial International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM). Se hace referencia particular a Urbance et al., IJSEM (2001) vol. 51:1059-1070, con una notificación correctiva en IJSEM (2001) vol. 51:1231-1233, que describe la reclasificación taxonómica de *G. oxydans* DSM 4025 como *Ketogulonicigenium vulgare*.

Como se usa aquí, células en reposo se refiere a células de un microorganismo que son por ejemplo viables pero que no crecen activamente, o que crecen a tasas de crecimiento específicas bajas [ $\mu$ ], por ejemplo tasas de crecimiento que son menores que  $0,02 \text{ h}^{-1}$ , preferiblemente menores que  $0,01 \text{ h}^{-1}$ . Se afirma que las células que muestran las tasas de crecimiento anteriores están en un "modo de célula en reposo".

El procedimiento de la presente invención como antes, que usa células en reposo de un microorganismo, se puede llevar a cabo en diferentes etapas o fases: preferiblemente, el microorganismo se cultiva en una primera etapa (también denominada como etapa (a) o fase de crecimiento) en condiciones que permiten el crecimiento. Esta fase se termina cambiando las condiciones, de manera que la tasa de crecimiento del microorganismo se reduce, conduciendo a células en reposo, también denominada como etapa (b), seguido de la producción de vitamina C a partir del sustrato usando las células en reposo de (b), también denominada como fase de producción.

La fase de crecimiento y de producción como se lleva a cabo en el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo se puede llevar a cabo en la misma vasija, *es decir*, solamente una vasija, o en dos o más vasijas diferentes, con una etapa de separación celular opcional entre las dos fases. La vitamina C producida se puede recuperar de las células por cualquier medio adecuado. Recuperar significa, por ejemplo, que la vitamina C se puede separar del medio de producción. Opcionalmente, la vitamina C así producida se puede procesar adicionalmente.

Para los fines de la presente invención que se refiere al procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, las expresiones “fase de crecimiento”, “etapa de crecimiento”, “etapa de crecimiento” y “período de crecimiento” se usan aquí de forma intercambiable. Lo mismo se aplica para las expresiones “fase de producción”, “etapa de producción”, “período de producción”.

5 Una manera de llevar a cabo el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo de la presente invención puede ser un procedimiento en el que el microorganismo se hace crecer en una primera vasija, la denominada vasija de crecimiento, como fuente para las células de reposo, y al menos parte de las células se transfieren a una segunda vasija, la denominada vasija de producción. Las condiciones en la vasija de producción pueden ser tales que las células transferidas desde la vasija de crecimiento se convierten en células en reposo como se define anteriormente. La vitamina C se produce en la segunda vasija y se recupera de ella.

10 En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, en un aspecto, la etapa de crecimiento se puede llevar a cabo en un medio acuoso, es decir, el medio de crecimiento, suplementado con nutrientes apropiados para crecer en condiciones aerobias. El cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, en modo discontinuo, discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo. El período de cultivo puede variar dependiendo del tipo de células, del pH, de la temperatura y del medio nutriente a usar, y puede ser por ejemplo alrededor de 10 h a alrededor de 10 días, preferiblemente alrededor de 1 a alrededor de 10 días, más preferiblemente alrededor de 1 a alrededor de 5 días cuando se lleva a cabo en modo discontinuo o discontinuo alimentado, dependiendo del microorganismo. Si las células se hacen crecer en modo continuo, el tiempo de permanencia puede ser por ejemplo de alrededor de 2 a alrededor de 100 h, preferiblemente de alrededor de 2 a alrededor de 50 h, dependiendo del microorganismo. Si el microorganismo se selecciona de bacterias, el cultivo se puede realizar, por ejemplo, a un pH de alrededor de 3,0 a alrededor de 9,0, preferiblemente alrededor de 4,0 a alrededor de 9,0, más preferiblemente alrededor de 4,0 a alrededor de 8,0, incluso más preferiblemente alrededor de 5,0 a alrededor de 8,0. Si se usan algas o levadura, el cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, a un pH por debajo de alrededor de 7,0, preferiblemente por debajo de alrededor de 6,0, más preferiblemente por debajo de alrededor de 5,5, y lo más preferible por debajo de alrededor de 5,0. Un intervalo adecuado de temperatura para llevar a cabo el cultivo usando bacterias puede ser, por ejemplo, de alrededor de 13°C a alrededor de 40°C, preferiblemente de alrededor de 18°C a alrededor de 37°C, más preferiblemente de alrededor de 13°C a alrededor de 36°C, y lo más preferible de alrededor de 18°C a alrededor de 33°C. Si se usan algas o levadura, un intervalo adecuado de temperatura para llevar a cabo el cultivo puede ser, por ejemplo, de alrededor de 15°C a alrededor de 40°C, preferiblemente de alrededor de 20°C a alrededor de 45°C, más preferiblemente de alrededor de 25°C a alrededor de 40°C, incluso más preferiblemente de alrededor de 25°C a alrededor de 38°C, y lo más preferible de alrededor de 30°C a alrededor de 38°C. El medio de cultivo para el crecimiento puede contener habitualmente nutrientes tales como fuentes de carbono asimilables, *por ejemplo* glicerol, D-manitol, D-sorbitol, L-sorbosa, eritritol, ribitol, xilitol, arabitól, inositol, dulcitol, D-ribosa, D-fructosa, D-glucosa, y sacarosa, preferiblemente L-sorbosa, D-glucosa, D-sorbitol, D-manitol, y glicerol; y fuentes de nitrógeno digeribles tales como sustancias orgánicas, *por ejemplo*, peptona, extracto de levadura, y aminoácidos. Los medios pueden tener urea o no y/o licor de maceración del maíz y/o levadura de panadería. También se pueden usar como fuentes de nitrógeno diversas sustancias inorgánicas, *por ejemplo* nitratos y sales amónicas. Además, el medio de crecimiento puede contener habitualmente sales inorgánicas, *por ejemplo* sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, fosfato de potasio, y carbonato de calcio.

40 En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, en la fase de crecimiento, las tasas de crecimiento específicas son, por ejemplo, al menos 0,02 h<sup>-1</sup>. Para células que crecen en modo discontinuo, discontinuo alimentado o semicontinuo, la tasa de crecimiento depende de, por ejemplo, la composición del medio de crecimiento, del pH, de la temperatura, y similar. En general, las tasas de crecimiento pueden estar, por ejemplo, en un intervalo de alrededor de 0,05 a alrededor de 0,2 h<sup>-1</sup>, preferiblemente de alrededor de 0,06 a alrededor de 0,15 h<sup>-1</sup>, y muy preferiblemente de alrededor de 0,07 a alrededor de 0,13 h<sup>-1</sup>.

En otro aspecto del procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, las células en reposo se pueden proporcionar mediante cultivo del microorganismo respectivo en placas de agar, que sirven así como vasija de crecimiento, usando esencialmente las mismas condiciones, *por ejemplo* período de cultivo, pH, temperatura, medio nutriente como se describe anteriormente, con la adición de agar.

50 Con relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, si la fase de crecimiento y de producción se llevan a cabo en dos vasijas separadas, entonces las células procedentes de la fase de crecimiento se pueden cosechar o concentrar y se pueden transferir a una segunda vasija, la denominada vasija de producción. Esta vasija puede contener un medio acuoso suplementado con cualquier sustrato de producción aplicable que se puede convertir en ácido L-ascórbico por las células. Las células de la vasija de crecimiento se pueden cosechar o concentrar mediante cualquier operación adecuada, tal como, por ejemplo, centrifugación, ultrafiltración o microfiltración de flujo cruzado de membrana, filtración, decantación, floculación. Las células así obtenidas también se pueden transferir a la vasija de producción en forma del caldo original procedente de la vasija de crecimiento, sin ser cosechadas, concentradas o lavadas, es decir, en forma de una suspensión celular. En una realización preferida, las células se transfieren desde la vasija de crecimiento a la vasija de producción en forma de una suspensión celular sin ninguna etapa de lavado o de aislamiento entremedias.

De este modo, en una realización preferida del procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, la etapa (a) y (c) del procedimiento de la presente invención como se describe anteriormente no están separadas por ninguna etapa de lavado y/o de separación.

5 En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, si la fase de crecimiento y de producción se llevan a cabo en la misma vasija, las células se pueden hacer crecer en condiciones apropiadas hasta la densidad celular deseada, seguido de la sustitución del medio de crecimiento por el medio de producción que contiene el sustrato de producción. Tal sustitución puede ser, por ejemplo, la alimentación de medio de producción a la vasija al mismo tiempo y velocidad que la retirada o cosecha del sobrenadante de la vasija. Para mantener las células en reposo en la vasija, se pueden usar operaciones para reciclar o retener las células, tales como, por ejemplo, etapas de reciclaje celular. Tales etapas de reciclaje, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, métodos que usan centrifugadoras, filtros, microfiltración de flujo cruzado de membrana de etapas de ultrafiltración, reactores de membrana, floculación, o inmovilización celular en matrices porosas, no porosas o poliméricas apropiadas. Después de una fase de transición, la vasija se lleva a las condiciones del procedimiento en las que las células están en un modo de células en reposo como se define anteriormente, y el sustrato de producción se convierte eficientemente en vitamina C.

10 El medio acuoso en la vasija de producción como se usa para la etapa de producción en relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, en lo sucesivo denominado medio de producción, puede contener sólo el sustrato o sustratos de producción a convertir en ácido L-ascórbico, o puede contener por ejemplo sales inorgánicas adicionales, *por ejemplo* cloruro de sodio, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, fosfato de potasio, fosfato de calcio, y carbonato de calcio. El medio de producción también puede contener fuentes de nitrógeno digeribles, tales como, por ejemplo, sustancias orgánicas, *por ejemplo*, peptona, extracto de levadura, urea, aminoácidos y licor de maceración de maíz, y sustancias inorgánicas, *por ejemplo* amoníaco, sulfato de amonio, y nitrato de sodio, a concentraciones tales que las células se mantienen en un modo de célula en reposo como se define anteriormente. El medio puede contener o no urea y/o licor de maceración de maíz y/o levadura de panadería. La etapa de producción se puede llevar a cabo, por ejemplo, en modo discontinuo, discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo. En caso de modo discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo, tanto las células procedentes de la vasija de crecimiento como el medio de producción se pueden alimentar continua o intermitentemente a la vasija de producción a tasas de alimentación apropiadas. Como alternativa, se puede alimentar continua o intermitentemente sólo el medio de producción a la vasija de producción, mientras que las células que provienen de la vasija de crecimiento se transfieren de una sola vez a la vasija de producción. Las células que proceden de la vasija de crecimiento se pueden usar como una suspensión celular en la vasija de producción, o se pueden usar, por ejemplo, como células floculadas o inmovilizadas, en cualquier fase sólida, tales como matrices porosas o poliméricas. El período de producción, definido como el período transcurrido entre la entrada del sustrato a la vasija de producción y la cosecha del sobrenadante que contiene vitamina C, la denominada corriente de cosecha, puede variar dependiendo de, por ejemplo, el tipo y concentración de células, pH, temperatura y medio nutriente a usar, y es preferiblemente alrededor de 2 a alrededor de 100 h. El pH y la temperatura pueden ser diferentes del pH y la temperatura de la etapa de crecimiento, pero son esencialmente los mismos que para la etapa de crecimiento.

15 En una realización preferida del procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, la etapa de producción se lleva a cabo en modo continuo, queriendo decir que se alimenta continua o intermitentemente a la vasija de producción una primera corriente de alimentación que contiene las células procedentes de la vasija de crecimiento y una segunda corriente de alimentación que contiene el sustrato. La primera corriente puede contener sólo las células aisladas/separadas del medio de crecimiento, o puede contener una suspensión celular, que procede directamente de la etapa de crecimiento, es *decir*, células suspendidas en medio de crecimiento, sin ninguna etapa intermedia de separación, lavado y/o aislamiento celular. La segunda corriente de alimentación como se define aquí puede incluir todas las otras corrientes de alimentación necesarias para la operación de la etapa de producción, *por ejemplo* el medio de producción que comprende el sustrato en forma de una o varias corrientes diferentes, agua para dilución, y base para el control del pH.

20 En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, cuando ambas corrientes se alimentan de forma continua, la relación de la tasa de alimentación de la primera corriente a la tasa de alimentación de la segunda corriente puede variar entre alrededor de 0,01 y alrededor de 10, preferiblemente entre alrededor de 0,01 y alrededor de 5, lo más preferible entre alrededor de 0,02 y alrededor de 2. Esta relación depende de la concentración de células y sustrato en la corriente primera y segunda, respectivamente.

25 Otra forma de llevar a cabo el procedimiento como antes que usa células en reposo de un microorganismo de la presente invención puede ser un procedimiento que usa una cierta densidad celular de células en reposo en la vasija de producción. La densidad celular se mide como unidades de absorbancia (densidad óptica) a 600 nm mediante métodos conocidos por la persona experta. En una realización preferida, la densidad celular en la etapa de producción es al menos alrededor de 10, más preferiblemente entre alrededor de 10 y alrededor de 200, incluso más preferiblemente entre alrededor de 15 y alrededor de 200, incluso más preferiblemente entre alrededor de 15 y alrededor de 120, y lo más preferible entre alrededor de 20 y alrededor de 120.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, a fin de mantener las células en la vasija de producción a la densidad celular deseada durante la fase de producción como se lleva a cabo, por ejemplo en modo continuo o semicontinuo, se puede usar cualquier medio conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, reciclaje celular mediante centrifugación, filtración, ultrafiltración o microfiltración de flujo cruzado de membrana, decantación, floculación, retención celular en la vasija mediante dispositivos de membrana, o inmovilización celular. Además, en el caso en el que la etapa de producción se lleve a cabo en modo continuo o semicontinuo y las células se alimenten continua o intermitentemente desde la vasija de crecimiento, la densidad celular en la vasija de producción se puede mantener a un nivel constante, por ejemplo, cosechando una cantidad de células desde la vasija de producción que corresponde a la cantidad de células que se alimenta desde la vasija de crecimiento.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, la vitamina C producida contenida en la denominada corriente de cosecha se recupera/cosecha a partir de la vasija de producción. La corriente de cosecha puede incluir, por ejemplo, disolución acuosa libre de células o que contiene células, que procede de la vasija de producción, que contiene vitamina C como resultado de la conversión del sustrato de producción por las células en reposo en la vasija de producción. Las células todavía presentes en la corriente de cosecha se pueden separar de la vitamina C mediante cualesquiera operaciones conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, filtración, centrifugación, decantación, ultrafiltración o microfiltración de flujo cruzado de membrana, ultrafiltración o microfiltración de flujo tangencial, o filtración de extremo muerto. Después de esta operación de separación celular, la corriente de cosecha está esencialmente libre de células.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, en un aspecto, el procedimiento de la presente invención conduce a rendimientos de vitamina C que son al menos alrededor de 1,8 g/l, preferiblemente al menos alrededor de 2,5 g/l, más preferiblemente al menos alrededor de 4,0 g/l, y lo más preferible al menos alrededor de 5,7 g/l. En una realización, el rendimiento de vitamina C producida por el procedimiento de la presente invención está en el intervalo de alrededor de 1,8 a alrededor de 600 g/l. El rendimiento de vitamina C se refiere a la concentración de vitamina C en la corriente de cosecha que sale directamente de la vasija de producción, es decir el sobrenadante libre de células que comprende la vitamina C.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, en una realización de la presente invención, la vitamina C se produce mediante el procedimiento como se describe anteriormente usando células en reposo de microorganismos recombinantes, tales como por ejemplo bacterias recombinantes. Preferiblemente, las bacterias recombinantes se seleccionan de bacterias que pueden expresar la L-sorbose deshidrogenasa como una forma activa *in vivo*, en particular bacterias de los géneros *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* y *Escherichia*, muy preferiblemente de *Gluconobacter*, *Acetobacter* o *E. coli*. Incluso más preferidos son, por ejemplo, *G. oxydans* y *E. coli*, y el más preferido se selecciona del grupo que consiste en *G. oxydans* N44-1, *G. oxydans* IFO 3293 y *G. oxydans* IFO 3244. Un microorganismo recombinante puede ser cualquier microorganismo que se manipule mediante ingeniería genética por técnicas bien conocidas para que contenga uno o más genes deseados en su cromosoma o en un plásmido introducido en dicho microorganismo, que conduce, por ejemplo, a una sobreexpresión de dicho gen o genes. El gen o genes deseados que se introducen en dicho microorganismo pueden codificar por ejemplo una enzima implicada en la conversión de un sustrato en vitamina C. En una realización preferida, el gen deseado codifica una L-sorbose deshidrogenasa, que cataliza la conversión de L-sorbose en vitamina C. Una L-sorbose deshidrogenasa preferida como se usa en la presente invención es, por ejemplo, la L-sorbose deshidrogenasa (SNDHai) de *G. oxydans* N44-1 (Sugisawa et al., Agric. Biol. Chem. 54: 1201-1209, 1990) como se representa mediante SEC ID NO:2, la secuencia nucleotídica que codifica dicha SNDHai está representada por SEC ID NO:1. Para los fines de la presente invención, también se pueden usar derivados funcionales de dicha SNDHai. Se entiende que las secuencias nucleotídicas que tienen una homología de al menos 80%, preferiblemente de al menos 90%, en comparación con SEC ID NO:1, y que codifican enzimas capaces de catalizar la conversión de L-sorbose en vitamina C, también son parte de la presente invención.

El microorganismo recombinante, tal como por ejemplo *G. oxydans* N44-1, puede comprender varias copias de SNDHai clonada en un plásmido adecuado o integrada en su cromosoma. Las copias plasmídicas que pueden ser adecuadas para la presente invención están, por ejemplo, en el intervalo de alrededor de 2 a alrededor de 15, preferiblemente en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 10 por microorganismo transformado. El número de copias plasmídicas se puede determinar, por ejemplo, mediante comparación de la intensidad de la banda respectiva visible en SDS-PAGE.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, cuando se usan microorganismos recombinantes para el procedimiento de la presente invención, la etapa de crecimiento y de producción pueden ser esencialmente las mismas como se describen anteriormente. Si se usa un microorganismo recombinante que comprende SNDHai, tal como por ejemplo *G. oxydans* N44-1 recombinante con una dosis mayor de SNDHai, el medio de crecimiento puede contener, por ejemplo, D-sorbitol, L-sorbose, glicerol o D-glucosa, ya sea solos o sus mezclas, una o más fuentes de nitrógeno adecuadas y sales. El medio de producción puede contener, por ejemplo, D-sorbitol y/o L-sorbose y sales. La cosecha de la vitamina C se puede llevar a cabo como se describe esencialmente aquí.

En un aspecto adicional, el procedimiento de la presente invención se puede combinar con otras etapas de separación y/o purificación de la vitamina C producida a partir de otros componentes contenidos en la corriente de cosecha, es decir, las denominadas etapas del procesamiento aguas abajo. Estas etapas pueden incluir cualquier medio conocido por una persona experta, tal como, por ejemplo, concentración, cristalización, precipitación, adsorción, intercambio iónico, electrodiálisis, electrodiálisis con membranas bipolares y/u ósmosis inversa. La vitamina C se puede purificar adicionalmente como la forma de ácido libre o cualquiera de sus formas salinas conocidas por medio de operaciones tales como, por ejemplo, tratamiento con carbón activado, intercambio iónico, adsorción y elución, concentración, cristalización, filtración y secado. Específicamente, una primera separación de la vitamina C de los otros componentes en la corriente de cosecha se puede llevar a cabo mediante cualquier combinación o repetición adecuada de, por ejemplo, los siguientes métodos: electrodiálisis de dos o tres compartimentos, electrodiálisis con membranas bipolares, ósmosis inversa o adsorción sobre, por ejemplo, resinas de intercambio iónico o resinas no iónicas. Si la forma resultante de la vitamina C es una sal de ácido L-ascórbico, la conversión de la forma salina en la forma de ácido libre se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante electrodiálisis con membranas bipolares, intercambio iónico, técnicas cromatográficas de lecho móvil simulado, y similares. También se puede usar la combinación de las mencionadas etapas, *por ejemplo* electrodiálisis y electrodiálisis con membranas bipolares, en una sola etapa, así como la combinación de las mencionadas etapas, *por ejemplo* varias etapas de intercambio iónico usando métodos cromatográficos de lecho móvil simulado. Cualquiera de estos procedimientos solos o en combinación constituyen un medio conveniente para aislar y purificar el producto, es decir la vitamina C. El producto así obtenido se puede aislar adicionalmente de una manera tal como, *por ejemplo*, mediante concentración, cristalización, precipitación, lavado y secado de los cristales, y/o se puede purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante tratamiento con carbón activado, intercambio iónico y/o recristalización.

En una realización preferida, la vitamina C se purifica a partir de la corriente de cosecha mediante una serie de etapas de procesamiento aguas abajo como se describen anteriormente sin que se haya transferido a una disolución no acuosa en algún momento de este procesamiento, es decir, todas las etapas se llevan a cabo en un entorno acuoso. Tal procedimiento de procesamiento aguas abajo preferido puede incluir, por ejemplo, la concentración de la corriente de cosecha que proviene de la vasija de producción por medio de electrodiálisis de dos o tres compartimentos, la conversión de la vitamina C en su forma salina presente en la disolución concentrada en su forma ácida por medio de electrodiálisis con membranas bipolares y/o intercambio iónico, la purificación mediante métodos tales como por ejemplo el tratamiento con carbón activado, intercambio iónico o resinas no iónicas, seguido de una etapa de concentración adicional y cristalización. Estos cristales se pueden separar, lavar y secar. Si es necesario, los cristales se pueden volver a solubilizar nuevamente en agua, se pueden tratar con carbón activado y/o resinas de intercambio iónico, y se pueden recristalizar. Estos cristales se pueden separar entonces, lavar y secar.

Los siguientes Ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención, y no están destinados a limitar la invención de ninguna manera.

### 35 **Ejemplo 1: Producción de ácido L-ascórbico con SNDHai purificada**

#### 1. Purificación de SNDHai:

Se suspendieron células de un microorganismo capaz de producir SNDHai, cultivadas mediante fermentación discontinua alimentada (para el cultivo, véase el Ejemplo 3) en 25 ml de tampón de fosfato (20 mM, pH 7,0) que contiene MgCl<sub>2</sub>, 2 mM, ditiotreitól (DTT), 1 mM, y 2-3 comprimidos inhibidores de proteasas libres de EDTA (Roche Diagnostics GmbH). La suspensión celular se trató tres veces con una celda de presión francesa. Subsiguientemente, se añadieron 25 ml de tampón de fosfato (20 mM, pH 7,0) que contiene MgCl<sub>2</sub> 2mM y NaCl 1 M, y la suspensión se ultracentrifugó (30.000 rpm, 60 min., 4°C). El pelete que contiene la fracción de membrana se lavó con tampón de fosfato (20 mM, pH 7,0) que contiene MgCl<sub>2</sub> 2 mM y NaCl 500 mM, y después se suspendió en una cantidad apropiada de tampón de fosfato (20 mM, pH 7,0) que contiene MgCl<sub>2</sub> 2 mM. Entonces se añadió N-octilglucósido (Fluka) a una concentración final de 2% (p/v), y la suspensión se incubó durante 90 min. con agitación suave en hielo. Tras centrifugar (20.000 rpm, 60 min., 4°C), se recogió el sobrenadante rojizo transparente y se añadió polietilenglicol 6000 (Fluka) a una concentración final de 15% (p/v). Tras incubar durante 60 min. a 4°C con agitación suave seguido de centrifugación (10.000 rpm, 30 min., 4°C), el pelete se disolvió en tampón Tris-HCl (20 mM, pH 7,6) que contiene MgCl<sub>2</sub> 2 mM y lauroilsulfobetaína (Fluka) al 0,5% (p/v). Tras agitar suavemente a 4°C toda la noche, la disolución se centrifugó (20.000 rpm, 30 min., 4°C). El sobrenadante se recogió y se purificó adicionalmente como sigue.

Las siguientes etapas de purificación se realizaron a 4°C en un sistema ÄKTA Explorer 10 S (Amersham Biosciences) con el software UNICORN 3.1. Los caudales típicos para la cromatografía de intercambio iónico estuvieron en el intervalo de 1-2 ml/min. La elución de la proteína se monitorizó a 280 nm, y se determinaron las fracciones activas para SNDHai usando el ensayo fotométrico estándar en todas las etapas de la purificación (véase más abajo), o el ensayo de producto con las fracciones purificadas.

El sobrenadante transparente IV se desaló en porciones de 2,5 ml en una columna de filtración en gel Sephadex G 25 (volumen vacío: 2,5 ml) usando tampón de Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) que contiene MgCl<sub>2</sub> 2 mM y lauroilsulfobetaína al 0,5% (p/v).

Las fracciones positivas a SNDHai se reunieron, y se colocó una alícuota (aproximadamente 10 ml) sobre una columna de intercambio aniónico fuerte (*por ejemplo* Mono-Q HR, Amersham Biosciences, volumen de la columna: 8 ml) que se había equilibrado antes del uso con tampón A1 (Tris 10 mM, BisTris 10 mM, MES 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, laurilsulfobetaina al 0,5%, pH 7,6). Las proteínas que no se unen se eluyeron con tampón A1 al 100% y, después de 4 volúmenes de columna, se aplicó un gradiente de pH lineal en 6 volúmenes de columna hasta tampón B1 al 100% (Tris 10 mM, BisTris 10 mM, MES 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, y laurilsulfobetaina al 0,5%, pH 4,7), seguido de 8 volúmenes de columna de tampón B1 al 100%. SNDHai eluyó a un valor de pH de aproximadamente 6,5, que es muy próximo al valor de pI de 6,52 calculado a partir de la secuencia de aminoácidos. Las fracciones activas se reunieron, se diluyeron con la misma cantidad de tampón de HEPES (50 mM, pH 8,0) que contiene MgCl<sub>2</sub> 2mM y lauroilsulfobetaina al 0,5% (volumen final:15-20 ml), y se aplicó a otra columna de intercambio aniónico fuerte (*por ejemplo* Mono-Q HR, Amersham Biosciences, volumen de la columna: 1 ml) que se había equilibrado con tampón A2 (HEPES 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, lauroilsulfobetaina al 0,5%, pH 7,6). Las proteínas que no se unen se eluyeron con tampón A2 al 100% y, tras 4 volúmenes de columna, se aplicó un gradiente salino lineal en 20 volúmenes de columna a tampón B2 al 40% (HEPES, 15 mM, MgCl<sub>2</sub>, 2 mM, LiCl, 1 M, y lauroilsulfobetaina al 0,5%, pH 7,6), seguido de un gradiente por etapas hasta tampón B2 al 100%. SNDHai eluyó a alrededor de LiCl 150 mM. Las fracciones activas mostraron una única banda a aproximadamente 85 kDa en electroforesis en gel con SDS.

## 2. Ensayo fotométrico para SNDHai

La mezcla de reacción para la medida fotométrica de la actividad de SNDHai consistió en cloruro de nitroazul tetrazolio (NBT) 0,196 mM, metosulfato de fenazina (PMS) 0,137 mM, L-sorbose 20,4 mM, y disolución enzimática en un volumen final de 1,0 ml de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5. La reacción se inició con la adición de enzima, y la actividad enzimática se midió en una cubeta con un recorrido de luz de 1 cm como la velocidad de reducción inicial de NBT a 570 nm (T = 25°C). Una unidad de la actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μM de NBT por minuto. El coeficiente de extinción de NBT a pH 7,5 se tomó como 100 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Se usaron dos tipos de cubetas de referencia para la determinación de la actividad: una contenía los componentes mencionados anteriormente excepto L-sorbose, y la otra contenía todos los componentes excepto la disolución enzimática.

## 3. Ensayo de producto para SNDHai.

Las fracciones que contienen SNDHai pura (véase anteriormente) se analizaron directamente para determinar la producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose con un ensayo de la siguiente composición (volumen total 0,5 ml): 0,14 mg/ml de SNDHai purificada y desalada, tampón de fosfato 50 mM (pH 6,5), seroalbúmina bovina (BSA) 8 mg/ml, L-sorbose 100 mM, PMS 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, PQQ-K<sub>2</sub> 50 μM. El ensayo se llevó a cabo en tubos de reacción apropiados a 25°C con agitación suficiente (900 rpm en un agitador de mesa de laboratorio) con exclusión de la luz.

Las muestras se analizaron mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC) usando un sistema de HPLC Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Wilmington, USA) con una columna LiChrospher-100-RP18 (125 x 4,6 mm) (Merck, Darmstadt, Alemania) unida a una columna Aminex-HPX-78H (300 x 7,8 mm) (Biorad, Reinach, Suiza). La fase móvil fue ácido sulfúrico 0,004 M, y el caudal fue 0,6 ml/min. Se registraron dos señales usando un detector de UV (longitud de onda 254 nm) en combinación con un detector de índice de refracción. Además, la identificación del ácido L-ascórbico se realizó usando una columna amino (YMC-Pack Polyamine-II, YMC, Inc., Kyoto, Japón) con detección de UV a 254 nm. La fase móvil fue NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM y acetonitrilo (40:60). Las productividades volumétricas iniciales típicas de ácido L-ascórbico en estas condiciones fueron 0,5-1,0 g/l/h. De este modo, después de un tiempo de reacción de 1 h, la concentración de ácido L-ascórbico en el sobrenadante fue 300 a 930 mg/l.

### **Ejemplo 2: Producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose y D-sorbitol en fermentaciones en tubo y en matraz**

Se usaron células de *G. oxydans* N44-1 para inocular 4 ml de medio líquido No. 3BD, y se cultivaron en un tubo (diámetro de 18 mm) a 30°C durante 3 días con agitación a 220 rpm. Al final del período de incubación se acumularon 20 mg/l de ácido L-ascórbico.

Se cultivaron (por triplicado) células de la cepa N44-1 en 50 ml de medio No. 5 que contiene D-sorbitol 100 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura (Difco) 15 g/l, 2,5 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, y 15 g/l de CaCO<sub>3</sub> en un matraz de agitación con deflectores de 500 ml a 30°C con agitación a 200 rpm. Después de 72 h de cultivo, las cantidades de ácido L-ascórbico medidas mediante HPLC en los tres matraces fueron 400, 500 y 680 mg/l.

### **Ejemplo 3: Producción de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol en fermentación discontinua alimentada**

Se hicieron crecer células de *G. oxydans* N44-1 en 200 ml de medio No. 5 que contiene D-sorbitol 100 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 g/l y CaCO<sub>3</sub> 15 g/l en un matraz de agitación con deflectores de 2 l a 30°C con agitación a 180 rpm. Después de 48 h, se usaron 150 ml de este cultivo para inocular un biorreactor de 10 l (B. Braun ED10, Melsungen, Alemania) previamente preparado con 5,3 l de medio que contiene D-sorbitol 20 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Fluka BioChemika, Buchs,



Suiza) y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,5 g/l y equipado con sensores de temperatura, de pH y de oxígeno disuelto, y bucles de control. La temperatura se controló a 30°C, el pH se controló a 6,0 añadiendo una disolución de amoníaco al 28%, el caudal de aire fue 4,5 l/min., y el oxígeno disuelto se controló a 30% mediante una cascada con velocidad de agitación (mínimo 300 rpm). Después de un tiempo de procesamiento de 6 h, se alimentó disolución de sorbitol 500 g/l a un caudal de 25 g/h durante un período de 44 h. Después de un tiempo de procesamiento de 96 h, quedó alrededor de 1% de sustrato en el sobrenadante, y se había producido 950 mg/l de ácido L-ascórbico.

#### **Ejemplo 4: Producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbozona o L-sorbosa con una fracción de membrana celular**

Se cultivaron células de *G. oxydans* N44-1 en 100 ml de medio líquido No. 3BD en un matraz de agitación con deflectores de 500 ml, a 30°C con agitación a 220 rpm durante 3 días. El cultivo resultante se centrifugó a 500 rpm para eliminar  $\text{CaCO}_3$ . El sobrenadante de esta etapa se centrifugó entonces a 5.000 rpm para peletizar las células. Las células recogidas se suspendieron en 3 ml de tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 7,0), y las células se disgregaron mediante dos pasadas a través de una celda de presión francesa (SIM-AMINCO Spetronic Instruments, USA) a 900 psi. El homogenado resultante se centrifugó primero a 5.000 rpm para eliminar el desecho celular. Después, el sobrenadante se diluyó hasta una concentración final de proteína de 3 mg de proteína/ml. Esta muestra diluida se denominó extracto libre de células (CFE). El CFE se centrifugó a 100.000 x g durante 60 min. El sobrenadante se descartó, y el pelete se recogió como la fracción de membrana.

La reacción (200  $\mu\text{l}$ ) con la fracción de membrana (100  $\mu\text{l}$ ) se llevó a cabo en tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 7,0), a 30°C con agitación a 220 rpm durante 15 h. Los sustratos ensayados fueron L-sorbozona (concentración final 1%) y L-sorbosa (concentración final 2%). La concentración final de proteína usada en la reacción fue 1,5 mg/ml. Al final del período de incubación, se había producido 680 mg/l y 10 mg/l de ácido L-ascórbico a partir de 1% de L-sorbozona y 2% de L-sorbosa, respectivamente.

#### **Ejemplo 5: Aislamiento del gen de SNDHai a partir de *Gluconobacter oxydans* N44-1**

##### 1. Mutagénesis de Tn5

El plásmido pSUP2021, un vector "suicida" que contiene Tn5 (Simon R. et al. 1983. BIO/TECHNOLOGY 1: 784-791), se transfirió desde *E. coli* HB101 a *G. oxydans* N44-1 mediante un método de emparejamiento conyugal según lo siguiente. Se cultivó *G. oxydans* N44-1 en un tubo de ensayo que contiene 5 ml de medio líquido MB a 30°C toda la noche. *E. coli* HB101 que posee el plásmido auxiliar pRK2013 (D. H. Figurski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1648-1652, 1979) y *E. coli* HB101 que posee el plásmido pSUP2021, se cultivaron en tubos de ensayo que contienen 5 ml de medio LB con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de canamicina a 37°C toda la noche. A partir de los cultivos durante toda la noche, las células de *G. oxydans* N44-1, *E. coli* HB101 (pRK2013), y *E. coli* HB101 (pSUP2021) se recogieron separadamente mediante centrifugación y se suspendieron hasta el volumen original en medio MB. Después, estas suspensiones celulares se mezclaron en volúmenes iguales, y la mezcla se extendió en una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  encima de una placa de agar MB. Tras cultivar a 27°C durante un día, las células se separaron por raspado de la membrana, y se prepararon diluciones en el caldo MB. Las células diluidas se extendieron entonces sobre medio de agar MB que contiene 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de polimixina B y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de canamicina (medio MPK). La polimixina B selecciona frente a las cepas donantes y auxiliares de *E. coli*, mientras que la canamicina selecciona aquellas células de *G. oxydans* que se han transformado con el plásmido pSUP2021 (es decir, los transconjugantes). Se obtuvo alrededor de 30.000 transconjugantes.

##### 2. Cribado para no productores de ácido L-ascórbico.

En total, se transfirieron 3.760 transconjugantes con mondadientes estériles sobre placas de rejilla con MPK, y se hicieron crecer a 27°C durante 3 días. Para ensayar la producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbozona, las células de cada transconjugante se recogieron de la placa de rejilla con un mondadientes estéril y se suspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de una mezcla de reacción de células en reposo que contiene L-sorbozona al 0,5%, NaCl al 0,3%, y  $\text{CaCO}_3$  al 1% en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las placas de microtitulación se incubaron a 30°C durante un día, sin agitación. Se analizó un microlitro de cada una de las mezclas de reacción resultantes para determinar la formación de ácido L-ascórbico usando tiras de ensayo para ácido ascórbico y el instrumento RQFlex2 (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania). La cepa de control positivo fue *G. oxydans* N44-1, que se hizo crecer en condiciones idénticas. Mediante este método, se identificó el mutante no productor de ácido L-ascórbico N44-1-6A9. Entonces se llevó a cabo el análisis de hibridación por transferencia Southern para confirmar la presencia de Tn5 en el ADN cromosómico del mutante N44-1-6A9. Se digirieron 2  $\mu\text{g}$  de ADN cromosómico aislado del mutante con *Apal*, *Clal*, *EcoRI*, *EcoRV*, *KpnI*, *StuI*, *BamHI*, *Sall*, o *HindIII*, y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 0,8%). El gel se trató entonces con HCl 0,25 N durante 15 min., seguido de NaOH 0,5 N durante 30 min. El ADN se transfirió a una membrana de nailon con un sistema de transferencia descendente rápido TurboBlotter (Schleicher & Schuell GmbH, Alemania). La sonda se preparó con el kit de marcaje de PCR-DIG (Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Alemania) usando los cebadores Tn2419 (SEC ID NO:3) y Tn3125R (SEC ID NO:4), con el plásmido pSUP2021 como molde. Se obtuvo un producto de la PCR de 707 pb.

Las condiciones de hibridación usadas fueron las siguientes: la hibridación se realizó en condiciones de hibridación restrictivas, *por ejemplo* incubación de 2 horas a 4 días a 42°C usando una sonda de ADN marcada con digoxigenina (DIG) (preparada usando un sistema de marcaje con DIG; Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Alemania) en disolución DigEasyHyb (Roche Diagnostics) con 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, seguido del lavado de los filtros durante 15 min. (dos veces) en 2 x SSC y 0,1% de SDS a temperatura ambiente, y después del lavado durante 15 min. (dos veces) en 0,5 x SSC y 0,1% de SDS, o 0,1 x SSC y 0,1% de SDS a 65°C.

Tras la etapa de hibridación, se llevó a cabo la detección de la hibridación con conjugado anti-DIG-AP (Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Alemania) y sustrato ECF (Amersham Biosciences Uppsala, Suecia) usando el instrumento STORM (Amersham Biosciences). Todas las operaciones se realizaron según las instrucciones de los proveedores.

Usando los métodos descritos anteriormente, se confirmó la presencia de Tn5 en el cromosoma del mutante N44-1-6A9.

3. Clonación de un fragmento de ADN interrumpido por Tn5, y secuenciación de las regiones adyacentes.

Basándose en los resultados de las digestiones con las enzimas de restricción descritas en la sección 2 anterior, *Apal*, *Clal*, *EcoRI*, y *EcoRV* se seleccionaron como las enzimas que generaron fragmentos de ADN que tienen más de 1 kb de ADN cromosómico de flaqueo en ambos lados de la inserción de Tn5. La digestión doble del ADN del mutante N44-1-6A9 con *Sall* (que corta aproximadamente en la mitad de Tn5) y *Apal* dio dos fragmentos (6,2 y 3,8 kb) que se hibridaron a la sonda de 707 pb descrita anteriormente.

El ADN cromosómico del mutante de Tn5 *G. oxydans* N44-1-6A9 se preparó y digirió con *Apal*. Los fragmentos de ADN con el tamaño de 9 a 12 kb se aislaron en gel de agarosa y se ligaron con el vector de clonación pBluescript II KS+ (Stratagene, Suiza), previamente digerido con *Apal*. La mezcla de ligación se usó entonces para transformar células de *E. coli* competentes, seleccionando en placas de L-agar que contienen 50 µg/ml de canamicina y 100 µg/ml de ampicilina. Para un transformante, el plásmido se extrajo, y se secuenciaron las regiones clonadas que flanquean a la inserción de Tn5. La secuencia nucleotídica del único marco de lectura abierto (interrumpido por la inserción de Tn5) se ensambló después de eliminar una duplicación de 9 pb que se sabe que se produce durante el suceso de transposición de Tn5. La secuencia nucleotídica del marco de lectura abierto completo, denominada en lo sucesivo como el gen de SNDHai de *Gluconobacter oxydans* N44-1, consistió en 2367 pb, y se da como SEC ID NO:1. La secuencia de aminoácidos correspondiente, deducida a partir de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO:1, se da aquí como SEC ID NO:2.

La secuencia nucleotídica del gen de SNDHai (SEC ID NO:1) se sometió a una búsqueda Blast 2 (versión 2 de BLAST del National Center for Biotechnology Information [NCBI] descrito en Altschul et al. (Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997)) en la base de datos PRO SW-SwissProt (edición completa más actualizaciones incrementales). Las condiciones usadas fueron el alineamiento con saltos y la filtración de la secuencia de interrogación para la región de complejidad baja.

Usando los programas MOTIFS, se identificaron fácilmente secuencias signatura de quinoproteínas deshidrogenasas bacterianas, indicando que SNDHai tiene las características de una enzima dependiente de PQQ.

### **Ejemplo 6: Análisis de transferencia Southern de las bacterias productoras de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose**

Se preparó ADN cromosómico a partir de células de *Gluconobacter oxydans* IFO 3293, IFO 3292, IFO 3244, IFO 3287, *Gluconobacter frateurii* IFO 3260 e IFO 3265, *Gluconobacter cerinus* IFO 3266 e IFO 3269, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanus* IFO 3259, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO 13693 e IFO 13773, *Acetobacter* sp. ATCC 15164, y *Escherichia coli* K-12. Las cepas IFO 13693 e IFO 13773 se hicieron crecer a 27°C durante 3 días en medio No. 350 que contiene 5 g/l de bactopectona (Difco), 5 g/l de extracto de levadura (Difco), 5 g/l de glucosa, 5 g/l de manitol, 1 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 ml/l de etanol, y 15 g/l de agar. Todas las otras cepas de *Acetobacter* y todas las cepas de *Gluconobacter* se hicieron crecer a 27°C durante 3 días en medio de agar con caldo de manitol (MB) que contiene 25 g/l de manitol, 5 g/l de extracto de levadura (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA), 3 g/l de bactopectona (Difco), y 18 g/l de agar (Difco). *E. coli* K-12 se hizo crecer en medio de agar con Caldo de Luria. Las preparaciones del ADN cromosómico se usaron para la hibridación por transferencia Southern en condiciones restrictivas como se describe en el Ejemplo 5. Las preparaciones del ADN cromosómico se digirieron con *Clal* (cuando se analiza la región del dominio N) o *EcoRI* (cuando se analiza la región del dominio C), y se separó 1 µg de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 1%). El gel se trató con HCl 0,25 N durante 15 min. y después NaOH 0,5 N durante 30 min., y después se transfirió sobre una membrana de nailon con Vacuum Blotter Modelo 785 (BIO-RAD Laboratories AG, Suiza) según las instrucciones del proveedor. Las sondas se prepararon con el kit de marcaje de PCR-DIG (Roche Diagnostics) usando los conjuntos de cebadores como se describen en la Tabla 2. El producto de la PCR P1 corresponde a la región de SNDHai designada como el dominio N (posible región transmembránica), mientras que el producto de la PCR P2 corresponde a la región de SNDHai designada como el dominio C (posible región de deshidrogenasa primaria).

Tabla 2. Cebadores usados para la PCR para generar sondas marcadas para hibridaciones Southern

Conjunto de cebadores	SEC ID nºs de cebadores	Producto de la PCR	Tamaño esperado del producto de la PCR (pb)
SNDH1F y SNDH420R	5 y 6	P1	420
SNDH501F y SNDH2364R	7 y 8	P2	1864
SNDH501F y SNDH1530R	7 y 9	P3	1030
SNDH1391F y SNDH2364R	10 y 8	P4	974

La Tabla 2 muestra los resultados de los experimentos de hibridación por transferencia Southern. En la hibridación con la sonda P1 (dominio N), se observaron bandas positivas claras para *G. oxydans* IFO 3293, IFO 3292, IFO 3244, IFO 3287 y *A. sp.* ATCC 15164. En la hibridación con la sonda P2 (dominio C), se observaron bandas positivas claras para las cepas IFO 3293, IFO 3292, IFO 3244, IFO 3287 y *A. sp.* ATCC 15164, mientras que se observó una banda débil para las cepas IFO 3260, IFO 3265, IFO 3266, IFO 3269 e IFO 13773. La cepa de control, *E. coli* K-12, no mostró señales detectables para ningún dominio.

Tabla 3. Detección de las señales de hibridación en diferentes cepas obtenidas mediante hibridación por transferencia Southern con sondas para los dominios N y C de SNDHai (sondas P1 y P2)

Cepa	P1	P2
<i>G. oxydans</i> IFO 3293	+	+
<i>G. oxydans</i> IFO 3292	+	+
<i>G. oxydans</i> IFO 3244	+	+
<i>G. frateurii</i> IFO 3260	nd	tr
<i>G. frateurii</i> IFO 3265	nd	tr
<i>G. cerinus</i> IFO 3266	nd	tr
<i>G. oxydans</i> IFO 3269	nd	tr
<i>G. oxydans</i> IFO 3287	+	+
<i>A. aceti subespecie Orleanus</i> IFO 3259	nd	nd
<i>A. aceti subespecie Xylinum</i> IFO 13693	nd	nd
<i>A. aceti subespecie Xylinum</i> IFO 13773	nd	tr
<i>Acetobacter sp.</i> ATCC 15164	+	+
<i>E. coli</i> K-12	nd	nd

Tr, trazas; nd, no detectado. Las sondas P1 y P2 se sintetizaron (como productos de la PCR marcados con DIG) con los conjuntos de cebadores especificados en la Tabla 2.

#### Ejemplo 7: Amplificación mediante PCR y secuenciación de ortólogos del gen de SNDHai de *Gluconobacter oxydans* N44-1

Se usaron preparaciones de ADN cromosómico (preparadas como se describe en el Ejemplo 6) como moldes para PCR con los cuatro conjuntos de cebadores mostrados en la Tabla 2. Se usaron cinco a 100 ng de ADN cromosómico por reacción (volumen total, 50 µl). Excepto que se especifique de otro modo, se usó el sistema de PCR Expand High Fidelity PCR (Roche Diagnostics). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Incubación a 94°C durante 2 min.; 30 ciclos de (i) etapa de desnaturalización a 94°C durante 15 s, (ii) etapa de recombinación a 60°C durante 30 s, (iii) etapa de síntesis a 72°C durante 45 a 120 s (los tiempos para la etapa de síntesis para los conjuntos de cebadores P1, P2, P3 y P4 fueron 45 s, 120 s, 90 s, y 90 s, respectivamente); alargamiento a 72°C durante 7 min.

Las muestras de las reacciones de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y las bandas se visualizaron con un transiluminador después de teñir con bromuro de etidio. Los resultados de las reacciones de la PCR se resumen en la Tabla 4.

5 Tabla 4. Detección de los productos de la PCR P1, P2, P3 y P4 en diferentes cepas obtenidas con los conjuntos de cebadores de la Tabla 2 (productos visualizados vía electroforesis en gel de agarosa)

Cepa	P1	P2	P3	P4
<i>G. oxydans</i> IFO 3293	+	+*	nt	+
<i>G. oxydans</i> IFO 3292	+	nd	nd	+
<i>G. oxydans</i> IFO 3244	+	+	+	+
<i>G. frateurii</i> IFO 3260	nd	nd	nd	nd
<i>G. cerinus</i> IFO 3266	nd	nd	nd	nd
<i>G. oxydans</i> IFO 3287	+	+	nd	+
<i>A. aceti</i> subespecie <i>Orleanus</i> IFO 3259	nd	nd	nd	nd
<i>A. aceti</i> subespecie <i>Xylinum</i> IFO 13693	nd	nd	nd	nd
<i>A. aceti</i> subespecie <i>Xylinum</i> IFO 13773	nd	nd	nd	nd
<i>Acetobacter</i> sp. ATCC 15164	+	+	nd	nd
<i>E. coli</i> K-12	nd	nd	nt	nd

+, detectado; nd, no detectado; nt, no ensayado. \*Esta PCR se llevó a cabo con el sistema de PCR rico en GC (Roche Diagnostics), con el mismo ciclo de reacción que el que se usó para el sistema Expand High Fidelity PCR.

10 Cuando se observaron bandas de PCR claras en el gel de agarosa (Tabla 4), los productos de la PCR se usaron directamente para la secuenciación nucleotídica usando métodos estándar. Las secuencias nucleotídicas obtenidas para los diferentes productos de la PCR, y las secuencias de aminoácidos correspondientes de los péptidos codificados, se compararon con la secuencia de longitud completa del gen de SNDHai y de la proteína de *G. oxydans* N44-1.

Ortólogo de SNDHai de *Gluconobacter oxydans* IFO 3292

15 El producto de la PCR (alrededor de 1 kb), obtenido al amplificar con los cebadores SNDH1391F (SEC ID NO:10) y SNDH2364R (SEC ID NO:8) y ADN cromosómico de *G. oxydans* IFO 3292 como molde, se usó para la secuenciación con el cebador SNDH1391F (SEC ID NO:10). La secuencia nucleotídica determinada de 771 pb (SEC ID NO:11) mostró una homología del 98,7% (761/771) con los nucleótidos 1431-2201 de la secuencia de SNDHai procedente de *G. oxydans* N44-1 (SEC ID NO:1). La secuencia de aminoácidos deducida de 256 aminoácidos (SEC ID NO:12) mostró un 100% de identidad con los aminoácidos 478-733 de la secuencia de aminoácidos de SNDH procedente de *G. oxydans* N44-1 (SEC ID NO:2).

20 Ortólogo de SNDHai de *Gluconobacter oxydans* IFO 3287

25 El producto de la PCR (alrededor de 0,4 kb), obtenido al amplificar con los cebadores SNDH1F (SEC ID NO:5) y SNDH420R (SEC ID NO:6) y el ADN cromosómico de *G. oxydans* IFO 3287 como molde, se usó para la secuenciación con el cebador SNDH420R (SEC ID NO:6). La secuencia nucleotídica determinada de 350 pb (SEC ID NO:13) mostró una homología del 97,4% (341/350) con los nucleótidos 31-380 de SEC ID NO:1. La secuencia de aminoácidos deducida de 116 restos (SEC ID NO:14) mostró una identidad del 100% con los aminoácidos 11-126 de SEC ID NO:2.

30 El producto de la PCR (alrededor de 1,9 kb), obtenido al amplificar con los cebadores SNDH501F (SEC ID NO:7) y SNDH2364R (SEC ID NO:8), se usó para la secuenciación con el cebador SNDH501F (SEC ID NO:7). La secuencia nucleotídica determinada de 808 pb (SEC ID NO:15) mostró una homología del 98,0% (745/808) con los nucleótidos 578-1385 de SEC ID NO:1. La secuencia de aminoácidos deducida de 268 restos (SEC ID NO:16) mostró una identidad del 100% con los aminoácidos 194-461 de SEC ID NO:2.

El producto de la PCR (alrededor de 1 kb), obtenido al amplificar con los cebadores SNDH1391F (SEC ID NO:10) y SNDH2364R (SEC ID NO:8), se usó para la secuenciación con el cebador SNDH1391F (SEC ID NO:10). La

secuencia nucleotídica determinada de 800 pb (SEC ID NO:17) mostró una homología del 98,8% (790/800) con los nucleótidos 1469-2268 de SEC ID NO:1. La secuencia de aminoácidos deducida de 266 restos (SEC ID NO:18) mostró una identidad del 100% con los aminoácidos 491-756 de SEC ID NO:2.

Ortólogo de SNDHai de *Acetobacter* sp. ATCC 15164

5 El producto de la PCR (alrededor de 0,4 kb), obtenido al amplificar con los cebadores SNDH1F (SEC ID NO:5) y SNDH420R (SEC ID NO:6) y ADN cromosómico de *A. sp.* ATCC 15164 como molde, se usó para la secuenciación con el cebador SNDH420R (SEC ID NO:6). La secuencia nucleotídica determinada de 360 pb (SEC ID NO:19) mostró una homología del 97,8% (352/360) con los nucleótidos 31-390 de SEC ID NO:1. La secuencia de aminoácidos deducida de 120 restos (SEC ID NO:20) mostró una identidad del 100% con los aminoácidos 11-130 de SEC ID NO:2.

10 El producto de la PCR (alrededor de 1,9 kb), obtenido al amplificar con los cebadores SNDH501F (SEC ID NO:7) y SNDH2364R (SEC ID NO:8), se usó para la secuenciación con el cebador SNDH501F (SEC ID NO:7). La secuencia nucleotídica determinada de 760 pb (SEC ID NO:21) mostró una homología del 98,0% (745/760) con los nucleótidos 563-1322 de SEC ID NO:1. La secuencia de aminoácidos deducida de 252 restos (SEC ID NO:22) mostró una identidad del 100% con los aminoácidos 189-440 de SEC ID NO:2.

15 Ortólogo de SNDHai de *Gluconobacter oxydans* IFO 3244

20 Se determinó la secuencia nucleotídica completa del gen del ortólogo de SNDHai de *G. oxydans* IFO 3244 usando los productos de la PCR obtenidos con el ADN cromosómico de *G. oxydans* IFO 3244 como molde y los siguientes conjuntos de cebadores: SNDH1F (SEC ID NO:5) y SNDH420R (SEC ID NO:6); SNDH501F (SEC ID NO:7) y SNDH1530R (SEC ID NO:9); SNDH1391F (SEC ID NO:10) y SNDH2364R (SEC ID NO:8); SNDH382 (SEC ID NO:23) y SNDH1530R (SEC ID NO:9); SNDH1F (SEC ID NO:5) y SNDH689R (SEC ID NO:24). Se usó ADN cromosómico digerido con *Bgl*II y *Bam*HI y ligado para dos PCRs más, con los siguientes conjuntos de cebadores: SNDH420R (SEC ID NO:6) y SNDH501F (SEC ID NO:7) y SNDH1530R (SEC ID NO:9) y IS-50.3 (SEC ID NO:25). La secuencia nucleotídica completa (SEC ID NO:26) mostró una homología del 98,4% con la secuencia nucleotídica de SNDHai de *G. oxydans* N44-1 (SEC ID NO:1). La secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID NO:27) mostró una identidad del 100% con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2.

#### **Ejemplo 8: Producción incrementada de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose a al incrementar la dosis del gen de SNDHai**

30 El gen de SNDHai con las regiones de flanqueo en dirección 5' y en dirección 3' se amplificó mediante PCR con ADN cromosómico de la cepa N44-1 como molde y el conjunto de cebadores N1 (SEC ID NO:28) y N2 (SEC ID NO:29).

35 La PCR se llevó a cabo con el sistema de PCR rico en GC (Roche Diagnostics), según las instrucciones del proveedor. El fragmento de ADN amplificado se insertó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El plásmido resultante se digirió entonces con *Hind*III y *Xho*I. El fragmento de *Hind*III-*Xho*I, que incluye el gen de SNDHai se ligó al vector pVK100 (disponible de la American Type Culture Collection, número de catálogo ATCC 37156), previamente tratado con *Hind*III y *Xho*I. La mezcla de ligación se usó para transformar *E. coli* TG1. El plásmido deseado, denominado pVK-P-SNDHai-T, se aisló de *E. coli*, y se introdujo en la cepa N44-1 de *G. oxydans* mediante electroporación usando métodos estándar (Electrocell manipulator ECM600, BTX Inc., San Diego, CA, USA).

40 Las células de las cepas N44-1 y N44-1 de *G. oxydans*, que poseen el plásmido pVK-P-SNDHai-T se cultivaron en 50 ml de medio No. 5 que contiene 100 g/l de D-sorbitol, 0,5 g/l de glicerol, 15 g/l de extracto de levadura (Difco), 2,5 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, y 15 g/l de CaCO<sub>3</sub> en un matraz de agitación con deflectores de 500 ml, a 30°C con agitación a 200 rpm. Después de 48 h de cultivo, las cantidades de ácido L-ascórbico medidas en el sobrenadante mediante HPLC en los dos matraces fueron 110 mg/l y 200 mg/l, respectivamente.

#### **Ejemplo 9: Producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose usando células en reposo que se hacen crecer en medio de agar con caldo de manitol**

45 Para la producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose, se usaron las cepas 3293, 3292, 3244, 3260, 3266, 3287, 3259, 13693, y 13773 de IFO así como *Acetobacter* sp. ATCC 15164 y *Gluconobacter oxydans* N44-1, un derivado de la cepa IFO 3293.

50 Las cepas IFO 13693 e IFO 13773 se hicieron crecer a 27°C durante 3 días en medio No. 350 que contiene 5 g/l de bactopectona (Difco), 5 g/l de extracto de levadura (Difco), 5 g/l de glucosa, 5 g/l de manitol, 1 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 ml/l de etanol, y 15 g/l de agar. Todas las otras cepas de *Acetobacter* y todas las cepas de *Gluconobacter* se hicieron crecer a 27°C durante 3 días en medio de agar con caldo de manitol (MB) que contiene 25 g/l de manitol, 5 g/l de extracto de levadura (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA), 3 g/l de bactopectona (Difco), y 18 g/l de agar (Difco).

55

Las células se rasparon de las placas de agar, se suspendieron en agua destilada y se usaron para reacciones con células en reposo llevadas a cabo a 30°C durante 20 h en tubos de 5 ml con agitación a 230 rpm. Las mezclas de reacción (0,5 ml) contenían 1% de L-sorbose, 0,3% de NaCl, 1% de CaCO<sub>3</sub> y células a una concentración de 10 unidades de absorbancia a 600 nanómetros (OD<sub>600</sub>). Al final del período de incubación, las mezclas de reacción se analizaron mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC) usando un sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, USA) con una columna LiChrospher-100-RP18 (125 x 4,6 mm) (Merck, Darmstadt, Alemania) unida a una columna Aminex-HPX-78H (300 x 7,8 mm) (Biorad, Reinach, Suiza). La fase móvil fue ácido sulfúrico 0,004 M, y el caudal fue 0,6 ml/min. Se registraron dos señales usando un detector de UV (longitud de onda 254 nm) en combinación con un detector del índice de refracción. Además, la identificación del ácido L-ascórbico se realizó usando una columna amino (YMC-Pack Polyamine-II, YMC, Inc., Kyoto, Japón) con detección de UV a 254 nm. La fase móvil fue NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM y acetonitrilo (40:60).

Para identificar el ácido L-ascórbico, se usó un sistema de HPLC-espectrometría de masas (MS) Agilent Serie 1100. El MS funcionó en modo de ion positivo usando la interfaz de electropulverización. La separación se llevó a cabo usando una columna LUNA-C8 (2) (100 x 4,6 mm) (Phenomenex, Torrance, USA). La fase móvil fue una mezcla de ácido fórmico al 0,1% y metanol (96:4). El ácido L-ascórbico eluyó con un tiempo de retención de 3,1 minutos. La identidad del ácido L-ascórbico se confirmó mediante el tiempo de retención y la masa molecular del compuesto.

Para excluir la presencia de ácido D-isoascórbico, se realizó adicionalmente la identificación del ácido L-ascórbico mediante tiempo de retención usando una columna amino (YMC-Pack Polyamine-II, YMC, Inc., Kyoto, Japón) con detección de UV a 254 nm. La fase móvil fue NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM y acetonitrilo (40:60).

Las cepas de *Gluconobacter* y *Acetobacter* produjeron ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose

Cepa	Ácido L-ascórbico (mg/l)
<i>G. oxydans</i> IFO 3293	1740
<i>G. oxydans</i> N44-1	570
<i>G. oxydans</i> IFO 3292	410
<i>G. oxydans</i> IFO 3244	1280
<i>G. frateurii</i> IFO 3260	50
<i>G. cerinus</i> IFO 3266	140
<i>G. oxydans</i> IFO 3287	60
<i>A. aceti</i> subespecie <i>Orleanus</i> IFO 3259	30
<i>A. aceti</i> subespecie <i>Xylinum</i> IFO 13693	40
<i>A. aceti</i> subespecie <i>Xylinum</i> IFO 13693	120
<i>Acetobacter</i> sp. ATCC 15164	310
Blanco	No detectado
Blanco; la reacción se llevó a cabo en la mezcla de reacción sin células.	

#### 25 Ejemplo 10: Producción de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol, L-sorbose o L-sorbose usando células en reposo que se hacen crecer en medio de agar 3BD

Se hicieron crecer células de *G. oxydans* N44-1 a 27°C durante 3 días en medio de agar No. 3BD que contiene 70 g/l de L-sorbose, 0,5 g/l de glicerol, 7,5 g/l de extracto de levadura (Difco), 2,5 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 g/l de CaCO<sub>3</sub> y 18 g/l de agar (Difco). Las reacciones con células en reposo (1 ml de mezcla de reacción en tubo de 10 ml) se llevaron a cabo con 2% de D-sorbitol, 2% de L-sorbose, o 1% de L-sorbose a 30°C durante 24 h como se describe en el Ejemplo 9. La cepa N44-1 produjo 280, 400 y 1780 mg/l de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol, L-sorbose, y L-sorbose, respectivamente.

Se llevaron a cabo otras reacciones (0,5 ml de mezcla de reacción en tubo de 10 ml) con células N44-1 que se

hicieron crecer en medio de agar No. 3BD en mezclas de reacción que contienen 2% de D-sorbitol, 2% de L-sorbosa, o 2% de L-sorbosona durante 2 días como se describe en el Ejemplo 9. La cepa N44-1 produjo 1,8, 2,0 y 5,1 g/l de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, y L-sorbosona, respectivamente.

5 Se llevó a cabo una reacción usando células de *G. oxydans* IFO 3293 con 2% de L-sorbosona como se describe anteriormente. La cepa IFO 3293 produjo 5,7 g/l de ácido L-ascórbico en 2 días.

**Ejemplo 11: Producción de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol usando células en reposo que se hacen crecer en medio líquido**

10 Se hicieron crecer células de *G. oxydans* N44-1 en 200 ml de medio No. 5 que contiene 100 g/l de D-sorbitol, 0,5 g/l de glicerol, 15 g/l de extracto de levadura (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), 2,5 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y 15 g/l de  $CaCO_3$  en un matraz de agitación con deflectores de 2-1 a 30°C con agitación a 180 rpm. Después de 24 h, el cultivo se centrifugó a 3220 g (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemania), las células se resuspendieron en disolución de NaCl al 0,9%, se centrifugaron nuevamente a 3220 g, y el pelete celular se usó para inocular un matraz de agitación de 500 ml con deflectores que contiene 50 ml de medio de crecimiento completo (100 g/l de D-sorbitol, 0,5 g/l de glicerol, 15 g/l de extracto de levadura, 2,5 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15 g/l de  $CaCO_3$ ) y otro matraz de agitación de 500 ml con deflectores que contiene 50 ml de medio de producción (100 g/l de D-sorbitol, 3 g/l de NaCl, 10 g/l de  $CaCO_3$ ). La densidad celular inicial, medida como densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ), en ambos matraces fue 10. Ambos matraces se incubaron a 30°C con agitación a 180 rpm. Después de 48 h, la suspensión celular en medio de crecimiento y en medio de producción había acumulado 1,06 y 1,18 g/l de ácido L-ascórbico, respectivamente. No se observó crecimiento adicional en medio completo durante el tiempo del período de incubación.

20 **Ejemplo 12: Producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbosona o D-sorbitol mediante células en reposo de microorganismos recombinantes con una mayor dosis del gen de SNDHai**

El gen de SNDHai de *G. oxydans* N44-1 (SEC ID NO:1) con regiones de flaqueo en dirección 5' y en dirección 3' se amplificó mediante PCR con ADN cromosómico de la cepa N44-1 como molde y el conjunto de cebadores N1 (SEC ID NO:28) y N2 (SEC ID NO:29).

25 La PCR se llevó a cabo con el sistema de PCR rico en GC (Roche Diagnostics GmbH), según las instrucciones del proveedor. El fragmento de ADN amplificado se insertó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El plásmido resultante se digirió entonces con *Hind*III y *Xho*I. El fragmento de *Hind*III-*Xho*I, que incluye el gen de SNDHai se ligó al vector pVK100 (disponible de la American Type Culture Collection, número de catálogo ATCC 37156), previamente tratado con *Hind*III y *Xho*I. La mezcla de ligación se usó para transformar *E. coli* TG1. El plásmido deseado, denominado pVK-P-SNDHai-T, se aisló en *E. coli*, y se introdujo en la cepa N44-1 de *G. oxydans* mediante electroporación usando métodos estándar (Electrocell manipulator ECM600, BTX Inc., San Diego, CA, USA).

35 Tres transformantes independientes, denominados clon N44-1(pVK-P-SNDHai-T) número 1, 2 y 3, junto con la cepa progenitora *G. oxydans* N44-1, se hicieron crecer cada uno en medios de agar No. 3BD y de agar MB. Las células se rasparon de las placas y se usaron para las reacciones con células en reposo (1% de L-sorbosona como sustrato), como se describe en el Ejemplo 9. Después del crecimiento en agar No. 3BD, en el ensayo de células en reposo, la cepa N44-1 produjo 2,5 g/l de ácido L-ascórbico, mientras que los clones 1, 2 y 3 de las cepas N44-1(pVK-P-SNDHai-T) produjeron 4,2, 4,1 y 4,2 g/l de ácido L-ascórbico, respectivamente. Después de crecer en agar MB, en el ensayo de células en reposo, la cepa N44-1 produjo 0,12 g/l de ácido L-ascórbico, mientras que las cepas N44-1(pVK-P-SNDHai-T) clones 1, 2 y 3 produjeron 1,8, 2,5 y 0,94 g/l de ácido L-ascórbico, respectivamente.

45 Se llevó a cabo otra reacción usando células de *G. oxydans* N44-1 y el clon 2 (véase anteriormente) cultivado en 50 ml de medio No. 5 (100 g/l de D-sorbitol, 0,5 g/l de glicerol, 15 g/l de extracto de levadura, 2,5 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15 g/l de  $CaCO_3$ ) en matraces de agitación con deflectores de 500 ml por duplicado a 30°C con agitación a 220 rpm durante 3 días. De un matraz para cada cepa, el caldo resultante se centrifugó a 500 rpm para eliminar  $CaCO_3$ . El sobrenadante de esta etapa se centrifugó entonces a 5.000 rpm para peletizar las células. Las células recolectadas se resuspendieron en 10 ml de disolución de NaCl al 0,9%, y se centrifugaron nuevamente a 5.000 rpm para peletizar las células. Las células recolectadas se resuspendieron en agua y se usaron para inocular 1 ml de medio de producción (20 g/l de D-sorbitol, 3 g/l de NaCl, 10 g/l de  $CaCO_3$ ) en tubo de reacción de 10 ml a una densidad final de células en reposo que corresponde a 5 unidades OD a 600 nm. Después de un tiempo de reacción de 20 h a 30°C y 220 rpm, el sobrenadante cosechado del matraz de producción contenía 360 y 760 mg/l de ácido L-ascórbico, respectivamente para las cepas N44-1 y N44-1 que sobreexpresan SNDHai. Por el contrario, después de 72 h, el sobrenadante cosechado del medio de crecimiento que queda contenía 0 y 440 mg/l de ácido L-ascórbico, respectivamente.

**Ejemplo 13: Producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbosona en células en reposo de *E. coli***

55 El gen de SNDHai sin el codón de parada, denominado SNDHai-1, que corresponda a los nucleótidos 1-2364 de SEC ID NO:1, se amplificó a partir de ADN cromosómico de la cepa N44-1 mediante PCR (Roche High Fidelity kit) usando el par de cebadores SNDHai-Nde (SEC ID NO:30) y SNDHaiHis-X (SEC ID NO:31).

El ADN amplificado se clonó en pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para obtener pCR2.1-TOPOSNDHai-1, cuya secuencia de SNDHai se confirmó que era correcta mediante secuenciación nucleotídica. Después, el gen de SNDHai-1 se cortó con *NdeI* y *XhoI* y se ligó entre los sitios *NdeI* y *XhoI* de pET-21b(+)

5

(Novagen, Madison, WI, USA) para producir pET21b-SNDHaiHis; Se añadió 6xHis al término C de SNDHai. El pET21b-SNDHaiHis se introdujo en *E. coli* BL21 (DE3).

Se inocularon cinco ml de un cultivo durante toda la noche de *E. coli* BL21 (DE3)/pET21b-SNDHaiHis en LB con carbenicilina 50 µg/ml en 200 ml del mismo medio. Las células se cultivaron a 230 rpm a 37°C durante 2 h, después se indujeron con IPTG 1 mM, y se continuó cultivándolas a 230 rpm a 25°C durante 3 h. El cultivo resultante se centrifugó y se lavó dos veces con disolución salina, y el pelete celular se resuspendió en 2 ml de agua. Las células

10

se usaron para la reacción de células en reposo con la mezcla de reacción (500 µl en tubo de 5 ml) que contiene células a OD600 = 10, monohidrato de de sorbosona al1%, PQQ 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 0,3% de NaCl, y 1% de CaCO<sub>3</sub>, llevado a cabo a 30°C durante 15 h. Se produjeron 0,14 g/l de ácido L-ascórbico tras la incubación durante 15 h. Cuando la reacción con células en reposo se llevó a cabo con PQQ 1 µM (las otras condiciones fueron las mismas que las descritas anteriormente), se produjeron 0,05 g/l de ácido L-ascórbico tras la incubación durante 3 h.

15

#### **Ejemplo 14: Producción de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol mediante células en reposo de microorganismos recombinantes con una mayor dosis de gen de SNDHai**

Células de *G. oxydans* N44-1 que sobreexpresan SNDHai se hicieron crecer en 50 ml de medio No. 5 que contiene 100 g/l de D-sorbitol, 0,5 g/l de glicerol, 15 g/l de extracto de levadura (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), 2,5 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 15 g/l de CaCO<sub>3</sub> en un matraz de agitación con deflectores de 500 ml, a 30°C con agitación a 180 rpm durante 48 h. La suspensión celular resultante se usó para inocular un biorreactor de 2 l, denominado vasija de crecimiento (Biostat-MD, B. Braun Melsungen, Melsungen, Alemania) que contiene 1,25 l de medio compuesto de 100 g/l de D-sorbitol, 15 g/l de extracto de levadura (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), 2,5 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,3 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,12 g/l de CaSO<sub>4</sub>. Las células se cultivaron a 30°C, velocidad de aireación 1 l/min., el pH se controló a 5,7 con una disolución al 25% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, el oxígeno disuelto se controló hasta 10% de saturación variando la velocidad de agitación. Después de 24 h, la densidad celular medida como unidades de absorción a 600 nm es 20. En este punto de tiempo, se alimentó una disolución de alimentación que contiene 100 g/l de D-sorbitol, 15 g/l de extracto de levadura (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), 2,5 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,3 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,12 g/l de CaSO<sub>4</sub> en la vasija de crecimiento a un caudal de 125 ml/h, y el caldo se cosechó continuamente a una velocidad de cosecha de 125 ml/h. Por este medio, el volumen en la vasija de crecimiento se mantiene constante a 1,25 l. Otros parámetros del procedimiento siguen controlados como se menciona anteriormente.

20

25

30

Este caldo se alimenta continuamente a un caudal de 125 ml/h en un segundo reactor, denominado vasija de producción, lleno de 5 l medio de producción que contiene 100 g/l de D-sorbitol, 0,3 g/l de NaCl y 0,12 g/l de CaSO<sub>4</sub>, y la temperatura se mantiene a 30°C, el pH a 7,0 controlando con una disolución al 20% de NaOH. La velocidad de aireación se mantiene constante a 10 l/min., y el oxígeno disuelto se controla a 20% variando la velocidad del agitador. El medio de producción con la misma composición también se alimenta continuamente a la vasija de producción a un caudal de 375 ml/h. El volumen de la vasija se mantiene constante a 5 l cosechando de forma continua el sobrenadante a un caudal de 500 ml/h, que resulta como una corriente de filtrado procedente de un módulo de ultrafiltración de flujo cruzado con un tamaño de poros de 500 kDa (UFP-500-E-9A, Amersham Biosciences), a través del cual la suspensión celular, cosechada de la vasija de producción, se bombea a 50 l/h usando un bomba Masterflex. El caudal de retentado se bombea nuevamente a la vasija. Una vez que la densidad celular en la vasija de producción alcanza 100 unidades de absorción a 600 nm, se comienza a cosechar las células a partir de la corriente celular concentrada que fluye nuevamente a la vasija de producción a un caudal de 25 ml/h, a fin de mantener constante la densidad celular en la vasija de producción.

35

40

La corriente de cosecha del sobrenadante libre de células contiene 4 g/l de ácido L-ascórbico, y se alimenta continuamente a un caudal de 500 ml/h en una vasija recolectora con una camisa doble a 30°C (Ecoline Re112, Lauda, Lauda-Koenigshofen, Alemania). Esta vasija alimenta continuamente sobrenadante al compartimento del diluado de una unidad de electrodiálisis de dos compartimentos (apilamiento que contiene 10 pares de celdas con membranas de intercambio catiónico CMX-S y membranas de intercambio aniónico ASM, área total de membrana 0,2 m<sup>2</sup>, de Eurodia Industries, Wissous, Francia) a un caudal de 180 l/h, y se bombea fuera de la vasija una corriente constante para mantener constante su volumen a 2 l. Otra vasija con camisa doble que contiene agua inicialmente desionizada a 30°C se alimenta continuamente con agua desionizada reciente a un caudal de 62,5 ml/h, bombea constantemente disolución acuosa al compartimento de concentrado de la unidad de electrodiálisis a un caudal de 200 l/h, y se bombea fuera de la vasija una corriente de cosecha constante. Las disoluciones de alimentación se bombean al apilamiento de electrodiálisis usando bombas peristálticas (7518-00, Masterflex, USA), y la recirculación de las disoluciones a través de cada compartimento de electrodiálisis se realiza con ayuda de bombas giratorias (MD-20, IWAK, Tokyo, Japón). Durante todo el proceso, se aplican 14 V al apilamiento de electrodiálisis (fuente de energía FuMATech TS001/5, St. Ingbert, Alemania). La concentración de ácido L-ascórbico en la corriente de cosecha es 16 g/l.

45

50

55

#### **Ejemplo 15: Purificación de ácido L-ascórbico producido mediante una reacción con células en reposo vía etapas de procesamiento aguas abajo**

60



5 La corriente de cosecha del Ejemplo 14 que contiene 16 g/l de ácido L-ascórbico se alimenta a una resina quelante (Amberlite IRC 748, Rohm and Haas, Filadelfia, PA, USA) para eliminar cationes divalentes de la corriente. Entonces se recoge en una vasija enfriada (vasija de alimentación), y cuando se han recogido 10 l, se procesan en modo discontinuo a través de una unidad de electrodiálisis con membrana bipolar (apilamiento que contiene 7 membranas Neosepta BP1/CMB, área total de la membrana 0,14 m<sup>2</sup> de Eurodia Industries, Wissous, Francia). Esta disolución se bombea a 200 l/h a través del compartimento de alimentación de la unidad de electrodiálisis, y se recicla a la vasija de alimentación. Otra vasija enfriada (vasija de concentrado) que contiene inicialmente 5 l de una disolución de NaOH 2 g/l se bombea a 100 l/h a través del compartimento de concentrado de la unidad de electrodiálisis con membrana bipolar. Aplicando un voltaje máximo de 25 V y una corriente eléctrica máxima de 20 A, los cationes sodio del compartimento de alimentación se transfieren al compartimento de concentrado, y de este modo la forma sódica del ácido L-ascórbico presente en la corriente de alimentación se convierte en la forma de ácido libre correspondiente. Después de alcanzar un rendimiento de conversión de 90%, el procedimiento se detiene. En la vasija de concentrado, se recogen 6 l de disolución que contiene NaOH 7,5 g/l en la vasija de diluato, 9 l de disolución que contiene alrededor de 16 g/l de ácido L-ascórbico en su forma de ácido libre y 1,6 g/l de ácido L-ascórbico en su forma salina de sodio se procesan adicionalmente a través de una resina de intercambio catiónico (Amberlite FPC 21 H, Rohm and Haas, Filadelfia, PA, USA), a fin de incrementar el rendimiento de conversión de la sal sódica en la forma de ácido libre hasta alrededor de 99%. Como alternativa, la disolución 10 l que contiene 16 g/l de ácido L-ascórbico en su forma de sal de sodio que procede de la etapa de electrodiálisis se trata directamente mediante resina de intercambio catiónico, convirtiéndose a la forma de ácido libre con un rendimiento de 99%. La corriente de ácido L-ascórbico en forma del ácido libre, obtenida mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, se procesa entonces adicionalmente mediante una secuencia de las siguientes etapas: intercambio aniónico, tratamiento con carbón activado, concentración, cristalización, filtración de los cristales, y secado. La pureza final de los cristales obtenidos es 98%, y el rendimiento obtenido con las etapas del procesamiento aguas abajo combinadas es 80%.

#### 25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> Producción microbiana de ácido L-ascórbico

<130> WO 21864

<150> EP 03017677.0

30 <151> 14/08/2003

<160> 31

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2367

35 <212> ADN

<213> *Gluconobacter oxydans* N44-1

<400> 1

ES 2 421 294 T3

atgaacagcg gcccccgcac gctctccatg atcatcggga ttctgggcgc cctcatggcc 60  
 gccttcctga tcatcgaagg cctccacctc atcatcctcg gcggctcgtg gttctacacc 120  
 ctgcgccgga tcgcgctggc ggccagcagc gtctacatga tccgtcgcga catcctctcg 180  
 acatggatcg ccctgggcct gcttgtggca acagccctgt ggtcgctcgc cgaagtcggc 240  
 accagcttct ggcccagctt ctcccgcctg atcgtgttcc tgtgcgctcgc cctgatcgcg 300  
 actctcatgg cgccctggct cagcggcccc ggccggcgct acttcaccgc ccccgtcaca 360  
 ggcgccacat ccggcgccct cggcgcgac atcgtggctt tccctgcgcg catgttccgg 420  
 gtccaccoga ccatcgcccc gcaggacacc acccaccgcg aggaaaccgc gtccaccgcc 480  
 gactccgacc agccaggcca tgactggccc gcctatggcc gcacggcttc cggcacgcgc 540  
 tacgccagct tcacgcagat caaccgcgac aatgtcagca agctccgcgt cgctggacc 600  
 taccgcaccg gcgacatggc gctgaacggc gccgagttcc agggcaccgc catcaagatc 660  
 ggcgacacgg ttatatctg ctaccgcac aacatcgtct cggcccttga cccggacacc 720  
 ggcacggaaa agtggagtt cgacccccac gcccagacga aagtctggca gcgctgccgc 780  
 ggcgtcggct actggcatga cagcacggcc acggacgcca acgcgccctg cgcctcgcgc 840  
 atcgtcctca ccacgatcga cgcccgcctc atcaccatcg acgcccgtac cggccaggcc 900  
 tgcacggatt tcggaacgaa cggcaacgtc aatctcctga ccggcctcgg cccgacagct 960  
 cccggtcgt actaccgcac cgccgcccc ctctgtggcg gtgacatcgt ggtcgtcggc 1020  
 ggccgcatcg ccgataacga gcgcaccggc gagccctccg gcgtcgtccg cggctatgat 1080  
 gtccgcaccg gcgcacaggt ctgggcctgg gacgccacca acccgcatcg cggcaccaca 1140

ES 2 421 294 T3

cctctggccg aaggcgagat ctaccccgcc gaaacccccca acatgtgggg caccgccage 1200  
 tacgaccoga aactcaacct cgtcttcttc ccgctcggca accagacccc cgatttctgg 1260  
 ggcggcgacc gcagcaaggc ctacagacgaa tacaacgacg ccttcgtcgc cgtggacgcc 1320  
 aagaccggcg acgaacgctg gcacttccgc accgcccaacc acgacctcgt ggactacgat 1380  
 gccacggccc agcccatcct ctatgacatt ccggacggcc atggcggcac ccgcccggcg 1440  
 atcatcgcca tgaccaagcg cggccagatc ttcgtgctcg accgccgca cggcaccocg 1500  
 atcgtccctg tggaaatgcg caaagtcccg caggacggcg caccggaaca ccagtacctc 1560  
 gccccgaac agccctatte cgcctctcc atcggaacag agcgctgaa acccagcgac 1620  
 atgtgggggtg gtacgatctt cgaccagctc ctgtgccgca tccagttcgc ctctaccgc 1680  
 tatgaaggcg agttcacccc cgtcaacgag aaacaggcca ccatcatcta tccgggctat 1740  
 tacggcggca tcaactgggg cggcggcgcc gtggatgaaa gcaccggaac gctgctggtc 1800  
 aacgacatcc gcatggcca gtggggcaag ttcatgaagc aggaagaagc ccgtcgcagc 1860  
 ggcttcaaac ccagctcgga aggcaatat tccgaacaga aaggcacccc ctggggcgtc 1920  
 gtccgctcga tgttcttctc ccccgccggt ctcccctgcg tgaaaccgcc ctatggcacg 1980  
 atgaaogcca tcgacctgcg cagcggcaag gtcaaatgga gcatgccgct tggcacgatc 2040  
 caggacatgc cggtcacgg catggtccca ggccctcgca tcccgctcgg aatgccgacc 2100  
 atgagcggcc cgtcggccac ccataccggc ctgggtgttct tctccggcac gctcgacaac 2160  
 tatgtccgcg cgtcaacac cgacaccggc gaagtctct ggaaagcccg tctcccgcgc 2220  
 gcctcacagc ccgctccgat gagctacatg tcgacaaga ccggcaaaca gtacatcgtc 2280  
 gtcacgcag gcggcctgac ccgctccggc gtcgacaaaa accgcggcga ctacgtcatc 2340  
 gcctaogccc tgccctccga agaataa 2367

<210> 2

<211> 788

<212> PRT

5 <213> *Gluconobacter oxydans* N44-1

<400> 2

ES 2 421 294 T3

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

Ala Leu Met Ala Ala Phe Leu Ile Ile Glu Gly Leu His Leu Ile Ile  
20 25 30

Leu Gly Gly Ser Trp Phe Tyr Thr Leu Ala Gly Ile Ala Leu Ala Ala

ES 2 421 294 T3

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

ES 2 421 294 T3

Ala Asn Ala Pro Cys Ala Ser Arg Ile Val Leu Thr Thr Ile Asp Ala  
 275 280 285

Arg Leu Ile Thr Ile Asp Ala Arg Thr Gly Gln Ala Cys Thr Asp Phe  
 290 295 300

Gly Thr Asn Gly Asn Val Asn Leu Leu Thr Gly Leu Gly Pro Thr Ala  
 305 310 315 320

Pro Gly Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Ala Pro Leu Val Ala Gly Asp Ile  
 325 330 335

Val Val Val Gly Gly Arg Ile Ala Asp Asn Glu Arg Thr Gly Glu Pro  
 340 345 350

Ser Gly Val Val Arg Gly Tyr Asp Val Arg Thr Gly Ala Gln Val Trp  
 355 360 365

Ala Trp Asp Ala Thr Asn Pro His Arg Gly Thr Thr Pro Leu Ala Glu  
 370 375 380

Gly Glu Ile Tyr Pro Ala Glu Thr Pro Asn Met Trp Gly Thr Ala Ser  
 385 390 395 400

Tyr Asp Pro Lys Leu Asn Leu Val Phe Phe Pro Leu Gly Asn Gln Thr  
 405 410 415

Pro Asp Phe Trp Gly Gly Asp Arg Ser Lys Ala Ser Asp Glu Tyr Asn  
 420 425 430

Asp Ala Phe Val Ala Val Asp Ala Lys Thr Gly Asp Glu Arg Trp His  
 435 440 445

Phe Arg Thr Ala Asn His Asp Leu Val Asp Tyr Asp Ala Thr Ala Gln  
 450 455 460

Pro Ile Leu Tyr Asp Ile Pro Asp Gly His Gly Gly Thr Arg Pro Ala  
 465 470 475 480

Ile Ile Ala Met Thr Lys Arg Gly Gln Ile Phe Val Leu Asp Arg Arg  
 485 490 495

Asp Gly Thr Pro Ile Val Pro Val Glu Met Arg Lys Val Pro Gln Asp  
 500 505 510

ES 2 421 294 T3

Gly Ala Pro Glu His Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Gln Pro Tyr Ser Ala  
515 520 525

Leu Ser Ile Gly Thr Glu Arg Leu Lys Pro Ser Asp Met Trp Gly Gly  
530 535 540

Thr Ile Phe Asp Gln Leu Leu Cys Arg Ile Gln Phe Ala Ser Tyr Arg  
545 550 555 560

Tyr Glu Gly Glu Phe Thr Pro Val Asn Glu Lys Gln Ala Thr Ile Ile  
565 570 575

Tyr Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Ile Asn Trp Gly Gly Gly Ala Val Asp  
580 585 590

Glu Ser Thr Gly Thr Leu Leu Val Asn Asp Ile Arg Met Ala Gln Trp  
595 600 605

Gly Lys Phe Met Lys Gln Glu Glu Ala Arg Arg Ser Gly Phe Lys Pro  
610 615 620

Ser Ser Glu Gly Glu Tyr Ser Glu Gln Lys Gly Thr Pro Trp Gly Val  
625 630 635 640

Val Arg Ser Met Phe Phe Ser Pro Ala Gly Leu Pro Cys Val Lys Pro  
645 650 655

Pro Tyr Gly Thr Met Asn Ala Ile Asp Leu Arg Ser Gly Lys Val Lys  
660 665 670

Trp Ser Met Pro Leu Gly Thr Ile Gln Asp Met Pro Val His Gly Met  
675 680 685

Val Pro Gly Leu Ala Ile Pro Leu Gly Met Pro Thr Met Ser Gly Pro  
690 695 700

Leu Ala Thr His Thr Gly Leu Val Phe Phe Ser Gly Thr Leu Asp Asn  
705 710 715 720

Tyr Val Arg Ala Leu Asn Thr Asp Thr Gly Glu Val Val Trp Lys Ala  
725 730 735

Arg Leu Pro Val Ala Ser Gln Ala Ala Pro Met Ser Tyr Met Ser Asp  
740 745 750

ES 2 421 294 T3

Lys Thr Gly Lys Gln Tyr Ile Val Val Thr Ala Gly Gly Leu Thr Arg  
755 760 765

Ser Gly Val Asp Lys Asn Arg Gly Asp Tyr Val Ile Ala Tyr Ala Leu  
770 775 780

Pro Ser Glu Glu  
785

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 3

cgcttctat gaaaggttg 20

10 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 4

agcggatgga gatcgggcgg 20

<210> 5

<211> 30

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5

25 atgaacagcg gccccgcac gctctccatg 30

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>



<223> Cebador  
 <400> 6  
 ccggaacatg ccggcgagga aagccacgat 30  
 <210> 7  
 5 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 10 <400> 7  
 tgactggccc gcctatggcc gcacggcttc 30  
 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 8  
 ttctcggag ggcagggcgt aggcatgac 30  
 20 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador  
 <400> 9  
 cgggactttg cgcatcca cagggacgat 30  
 <210> 10  
 <211> 30  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 10  
 35 agcccatcct ctatgacatt ccggacggcc 30  
 <210> 11  
 <211> 771

ES 2 421 294 T3

<212> ADN

<213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3292

<400> 11

```
ccgcccggcg atcatcgcca tgaccaagcg cggccagatc ttcgtgctcg accgcccgga      60
      cggcaccccc atcgtccccc tggaaatgcg caaagtcccc caggacggcg caccggaaca      120
      ccagtacctc gccccgaac agccctatc cgccctctcc atcggaacag agcgcctgaa      180
      acccagcgat atgtggggcg gcaogatctt cgaccagctc ctgtgccgca tccagtctgc      240
      ctctaccgc tatgaaggcg agttcacccc cgtcaacgag aagcaggcca ccatcatcta      300
      tccgggctat tacggcggca tcaactgggg cggcggcgcc gtggatgaaa gcaccggaac      360
      gctgctggtc aacgacatcc gcatggccca gtggggcaag ttcatagaagc aagaagaagc      420
      ccgccgcagc ggcttcaaac ccagctcgga aggcgaatat tccgaacaga aaggcacccc      480
      ctggggcgtc gtcgcctega tgttcttctc ccccgccggt ctccctgcg tgaaaaccgoc      540
      ctatggcacg atgaacgcca tcgacctgcg cagcggcaag gtcaaatagga gcatgcccgt      600
      tggcacgac caggacatgc cggtcacgg catggtcccc ggctcgcca tcccgtcgg      660
      aatgccgacc atgagcggcc cgctggccac ccataccggc ctggtcttct tctccggcac      720
      gctcgacaac tatgtccgcg cgctcaaac cgacaccggc gaagtcgtct g              771
```

5

<210> 12

<211> 256

<212> PRT

<213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3292

10 <400> 12

ES 2 421 294 T3

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

ES 2 421 294 T3

Ala Val Asp Glu Ser Thr Gly Thr Leu Leu Val Asn Asp Ile Arg Met  
 115 120 125

Ala Gln Trp Gly Lys Phe Met Lys Gln Glu Glu Ala Arg Arg Ser Gly  
 130 135 140

Phe Lys Pro Ser Ser Glu Gly Glu Tyr Ser Glu Gln Lys Gly Thr Pro  
 145 150 155 160

Trp Gly Val Val Arg Ser Met Phe Phe Ser Pro Ala Gly Leu Pro Cys  
 165 170 175

Val Lys Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asn Ala Ile Asp Leu Arg Ser Gly  
 180 185 190

Lys Val Lys Trp Ser Met Pro Leu Gly Thr Ile Gln Asp Met Pro Val  
 195 200 205

His Gly Met Val Pro Gly Leu Ala Ile Pro Leu Gly Met Pro Thr Met  
 210 215 220

Ser Gly Pro Leu Ala Thr His Thr Gly Leu Val Phe Phe Ser Gly Thr  
 225 230 235 240

Leu Asp Asn Tyr Val Arg Ala Leu Asn Thr Asp Thr Gly Glu Val Val  
 245 250 255

<210> 13

<211> 350

<212> ADN

5 <213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3287

<220>

<221> característica diversa

<222> (123)..(123)

<223> nes a o c o g o t

10 <400> 13

ES 2 421 294 T3

atcatcggga ttctggggcgc cctcatggcc gccttcctga tcatcgaagg cctccacctc 60  
atcatcctcg gcggctcatg gttttacacc ctgcgccgca tcgcgctggc agccagcagc 120  
gntacatga tccgtcgcaa catcctctcg acatggatcg cctcggcct gcttgtggca 180  
acagccctgt ggtcgctcgc cgaagtcggc accagcttct ggcccagctt ctcccgcctg 240  
atcgtatttc tgtgcgctgc cctgatcgcg acctcatgg cgccctggct cagcggcccc 300  
ggccggcgct acttcaccgc ccccgtcaca ggcgccacct ccggcgcct 350

<210> 14

<211> 116

<212> PRT

5 <213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3287

<400> 14

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

<210> 15

<211> 808

10 <212> ADN

<213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3287

ES 2 421 294 T3

<400> 15

gcaagctccg cgtcgcctgg acctaccgca ctggcgacat ggcgctgaac ggggccgagt	60
tccagggcac ccccatcaag atcggcgaca cggctatat ctgctcgccg cacaacatcg	120
tctcggccct cgaccccgat accggcacgg aaaagtggaa gttcgacccc caccgccaga	180
cgaaagtctg gcagcgctgc cgcggcgctc gctactggca tgacagcacg gccacggacg	240
ccaacgcgcc ctgcgctctg cgcctcgtcc tcaccacgat cgacgccgcg ctcatcacca	300
tgcagccccg caccggccag gcctgcacgg atttcggaac gaacggcaac gtcaatctcc	360
tgaccggcct cggcccgaca gccccgggtt cctactaccg gaccgcccgc cccctcgtgg	420
ccggtgacat cgtggctcgc gggggccgca tcgccgataa cgagcgcacc ggcgaaccct	480
ccggcgtcgt ccgcggctat gaogtccgca ccggcgcgca ggtctgggccc tgggacgcca	540
ccaacccgca tcgcggcacc acaccgctgg ccgaaggcga gatctatccc gccgaaaccc	600
ccaacatgtg gggcaccgcc agctacgacc cgaagctcaa cctcgtcttc ttcccgtcgc	660
gcaaccagac ccccgatttc tggggcggcg accgcagcaa ggcttctgat gaatacaacg	720
acgccttcgt cgccgtggac gccaaagacc gcgacgaacg ctggcacttc cgcaccgcca	780
accacgacct cgtggactac gatgccac	808

<210> 16

5 <211> 268

<212> PRT

<213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3287

<400> 16

ES 2 421 294 T3

Lys Leu Arg Val Ala Trp Thr Tyr Arg Thr Gly Asp Met Ala Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Glu Phe Gln Gly Thr Pro Ile Lys Ile Gly Asp Thr Val Tyr  
 20 25 30  
 Ile Cys Ser Pro His Asn Ile Val Ser Ala Leu Asp Pro Asp Thr Gly  
 35 40 45  
 Thr Glu Lys Trp Lys Phe Asp Pro His Ala Gln Thr Lys Val Trp Gln  
 50 55 60  
 Arg Cys Arg Gly Val Gly Tyr Trp His Asp Ser Thr Ala Thr Asp Ala  
 65 70 75 80  
 Asn Ala Pro Cys Ala Ser Arg Ile Val Leu Thr Thr Ile Asp Ala Arg  
 85 90 95  
 Leu Ile Thr Ile Asp Ala Arg Thr Gly Gln Ala Cys Thr Asp Phe Gly  
 100 105 110  
 Thr Asn Gly Asn Val Asn Leu Leu Thr Gly Leu Gly Pro Thr Ala Pro  
 115 120 125  
 Gly Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Ala Pro Leu Val Ala Gly Asp Ile Val  
 130 135 140

ES 2 421 294 T3

Val Val Gly Gly Arg Ile Ala Asp Asn Glu Arg Thr Gly Glu Pro Ser  
 145 150 155 160

Gly Val Val Arg Gly Tyr Asp Val Arg Thr Gly Ala Gln Val Trp Ala  
 165 170 175

Trp Asp Ala Thr Asn Pro His Arg Gly Thr Thr Pro Leu Ala Glu Gly  
 180 185 190

Glu Ile Tyr Pro Ala Glu Thr Pro Asn Met Trp Gly Thr Ala Ser Tyr  
 195 200 205

Asp Pro Lys Leu Asn Leu Val Phe Phe Pro Leu Gly Asn Gln Thr Pro  
 210 215 220

Asp Phe Trp Gly Gly Asp Arg Ser Lys Ala Ser Asp Glu Tyr Asn Asp  
 225 230 235 240

Ala Phe Val Ala Val Asp Ala Lys Thr Gly Asp Glu Arg Trp His Phe  
 245 250 255

Arg Thr Ala Asn His Asp Leu Val Asp Tyr Asp Ala  
 260 265

<210> 17

<211> 800

<212> ADN

5 <213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3287

<400> 17

tcttcgtgct cgaccgccgc gacggcacc cgatcgtccc cgtggaaatg cgcaaagtcc 60

cgcaggacgg cgcaccggaa caccagtacc tcgccccoga acagccctat tccgccctet 120

ccatcggaac agagcgctg aaaccagcg atatgtgggg tggtagatt ttcgaccagc 180

tcctgtgccg catccagttc gcctcctacc gctatgaagg cgagttcacc cccgtcaacg 240

agaaacaggc caccatcatc tatecgggct attacggcgg catcaactgg ggcggcggcg 300

ccgtggatga aagcaccgga acgctgctgg tcaacgacat ccgcatggcc cagtggggca 360

agttcatgaa gcaggaagaa gcccgtcgca gcggcttcaa acccagctcg gaaggcgaat 420

attccgaaca gaaaggcacc ccctggggcg tcgtccgctc gatgttcttc tccccgccg 480

gtctccccctg cgtaaaaccg ccctatggca cgatgaacgc catcgacctg cgcagcggca 540

aggtgaaatg gagcatgccg cttggcaoga tccaggacat gccggtccac ggcattggtcc 600



ES 2 421 294 T3

caggcctcgc catcccgcctc ggaatgccaa ccatgagcgg cccgctggcc acccataaccg 660  
 gcttggtctt cttctccggc acgctcgaca actacgtccg cgcgctcaac accgacaccg 720  
 gcgaggtcgt ctggaaagcc cgtctccccg tcgcctcaca ggccgctccg atgagctaca 780  
 tgtccgacaa gaccggcaaa 800

<210> 18

<211> 266

<212> PRT

5 <213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3287

<400> 18

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

Arg Lys Val Pro Gln Asp Gly Ala Pro Glu His Gln Tyr Leu Ala Pro  
 20 25 30

Glu Gln Pro Tyr Ser Ala Leu Ser Ile Gly Thr Glu Arg Leu Lys Pro  
 35 40 45

Ser Asp Met Trp Gly Gly Thr Ile Phe Asp Gln Leu Leu Cys Arg Ile  
 50 55 60

Gln Phe Ala Ser Tyr Arg Tyr Glu Gly Glu Phe Thr Pro Val Asn Glu  
 65 70 75 80

Lys Gln Ala Thr Ile Ile Tyr Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Ile Asn Trp  
 85 90 95

Gly Gly Gly Ala Val Asp Glu Ser Thr Gly Thr Leu Leu Val Asn Asp  
 100 105 110

Ile Arg Met Ala Gln Trp Gly Lys Phe Met Lys Gln Glu Glu Ala Arg  
 115 120 125

Arg Ser Gly Phe Lys Pro Ser Ser Glu Gly Glu Tyr Ser Glu Gln Lys  
 130 135 140

Gly Thr Pro Trp Gly Val Val Arg Ser Met Phe Phe Ser Pro Ala Gly  
 145 150 155 160

Leu Pro Cys Val Lys Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asn Ala Ile Asp Leu  
 165 170 175

ES 2 421 294 T3

Arg Ser Gly Lys Val Lys Trp Ser Met Pro Leu Gly Thr Ile Gln Asp  
 180 185 190

Met Pro Val His Gly Met Val Pro Gly Leu Ala Ile Pro Leu Gly Met  
 195 200 205

Pro Thr Met Ser Gly Pro Leu Ala Thr His Thr Gly Leu Val Phe Phe  
 210 215 220

Ser Gly Thr Leu Asp Asn Tyr Val Arg Ala Leu Asn Thr Asp Thr Gly  
 225 230 235 240

Glu Val Val Trp Lys Ala Arg Leu Pro Val Ala Ser Gln Ala Ala Pro  
 245 250 255

Met Ser Tyr Met Ser Asp Lys Thr Gly Lys  
 260 265

<210> 19

<211> 360

<212> ADN

5 <213> *Acetobacter* sp. ATCC 15164

<220>

<221> característica diversa

<222> (123)..(123)

<223> nes a o c o g o t

10 <400> 19

atcatcggga ttctgggagc cctcatggcc gccttctga tcatcgaagg cctccacctc 60  
 atcatcctcg gcggctcgtg gttttacacc ctgcgggca tcgcgctggc ggccagcagc 120  
 gtntacatga tccgtcgcaa catcctctcg acatggatcg ccctcggcct gcttgtagca 180  
 acagccctgt ggtcgctcgc cgaagtcggc accagcttct ggcccagctt ctcccgcctg 240  
 atcgtgttcc tgtgcgctgc cctgatcgcg actctcatgg cgccctggct cagcggcccc 300  
 ggccggcgct acttcaccgc ccccgtcaca ggggccacct ccggcgcaact cggcgccatc 360

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

15 <213> *Acetobacter* sp. ATCC 15164

<400> 20

ES 2 421 294 T3

Ile Ile Gly Ile Leu Gly Ala Leu Met Ala Ala Phe Leu Ile Ile Glu  
 1                    5                    10                    15

Gly Leu His Leu Ile Ile Leu Gly Gly Ser Trp Phe Tyr Thr Leu Ala  
                   20                    25                    30

Gly Ile Ala Leu Ala Ala Ser Ser Val Tyr Met Ile Arg Arg Asn Ile  
                   35                    40                    45

Leu Ser Thr Trp Ile Ala Leu Gly Leu Leu Val Ala Thr Ala Leu Trp  
                   50                    55                    60

Ser Leu Ala Glu Val Gly Thr Ser Phe Trp Pro Ser Phe Ser Arg Leu  
                   65                    70                    75                    80

Ile Val Phe Leu Cys Val Ala Leu Ile Ala Thr Leu Met Ala Pro Trp  
                   85                    90                    95

Leu Ser Gly Pro Gly Arg Arg Tyr Phe Thr Arg Pro Val Thr Gly Ala  
                   100                    105                    110

Thr Ser Gly Ala Leu Gly Ala Ile  
                   115                    120

<210> 21

<211> 760

5 <212> ADN

<213> *Acetobacter* sp. ATCC 15164

<400> 21

ES 2 421 294 T3

accgcgacaa	tgtcagcaag	ctccgcgtcg	cctggaccta	cgcacccggc	gacatggcgc	60
tgaacggcgc	cgaattccag	ggcaccceca	tcaagatcgg	cgatacggtc	tatatctgct	120
caccccacaa	catcgtctcg	gccctcgacc	ccgacaccgg	cacggaaaag	tggaagttcg	180
acccccacgc	ccagacgaaa	gtctggcagc	gctgccgcgg	cgtcggctac	tggcatgaca	240
gcacagccac	ggacgccaac	gcgccctgcg	cctcgcgcat	cgtcctcacc	acgatcgacg	300
ccgcctcat	caccatcgac	gcccgcaccg	gccaggcctg	caoggatttc	ggaacgaacg	360
gcaacgtcaa	tctcctgacc	ggcctcggcc	cgacagcccc	cggtcctac	taccgcaccg	420
ccgccccct	cgtggcgggt	gacatcgtgg	tcgtcggcgg	ccgcatcgcc	gataacgagc	480
gcacaggoga	gccttcggc	gtcgtccgcg	gctacgacgt	ccgcacccgc	gcacaggtct	540
gggcctggga	cgccaccaac	ccgcatcgcg	gcaccacacc	actggccgaa	ggcgagatct	600
accccgccga	aacccccaac	atgtggggca	ccgccagcta	cgacccgaaa	ctcaacctcg	660
tcttttccc	gctcggcaac	cagacccccg	atttctgggg	cggcgaccgc	agcaaggcct	720
cggatgaata	caacgacgcc	ttcgtcgcgg	tggacgccaa			760

<210> 22

<211> 252

5 <212> PRT

<213> *Acetobacter* sp. ATCC 15164

<400> 22

ES 2 421 294 T3

Arg Asp Asn Val Ser Lys Leu Arg Val Ala Trp Thr Tyr Arg Thr Gly  
 1 5 10 15

Asp Met Ala Leu Asn Gly Ala Glu Phe Gln Gly Thr Pro Ile Lys Ile  
 20 25 30

Gly Asp Thr Val Tyr Ile Cys Ser Pro His Asn Ile Val Ser Ala Leu  
 35 40 45

Asp Pro Asp Thr Gly Thr Glu Lys Trp Lys Phe Asp Pro His Ala Gln  
 50 55 60

Thr Lys Val Trp Gln Arg Cys Arg Gly Val Gly Tyr Trp His Asp Ser  
 65 70 75 80

Thr Ala Thr Asp Ala Asn Ala Pro Cys Ala Ser Arg Ile Val Leu Thr  
 85 90 95

Thr Ile Asp Ala Arg Leu Ile Thr Ile Asp Ala Arg Thr Gly Gln Ala  
 100 105 110

Cys Thr Asp Phe Gly Thr Asn Gly Asn Val Asn Leu Leu Thr Gly Leu  
 115 120 125

Gly Pro Thr Ala Pro Gly Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Ala Pro Leu Val  
 130 135 140

Ala Gly Asp Ile Val Val Val Gly Gly Arg Ile Ala Asp Asn Glu Arg  
 145 150 155 160

Thr Gly Glu Pro Ser Gly Val Val Arg Gly Tyr Asp Val Arg Thr Gly  
 165 170 175

Ala Gln Val Trp Ala Trp Asp Ala Thr Asn Pro His Arg Gly Thr Thr  
 180 185 190

ES 2 421 294 T3

Pro Leu Ala Glu Gly Glu Ile Tyr Pro Ala Glu Thr Pro Asn Met Trp  
 195 200 205

Gly Thr Ala Ser Tyr Asp Pro Lys Leu Asn Leu Val Phe Phe Pro Leu  
 210 215 220

Gly Asn Gln Thr Pro Asp Phe Trp Gly Gly Asp Arg Ser Lys Ala Ser  
 225 230 235 240

Asp Glu Tyr Asn Asp Ala Phe Val Ala Val Asp Ala  
 245 250

<210> 23

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 23

ggcgcgatca tcgtggctt 20

10 <210> 24

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 24

gggtcaaggg ccgagacgat gtt 23

<210> 25

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 25

25 gcacgctcga caactatgct 20

<210> 26

<211> 2367

<212> ADN

<213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3244

<400> 26

ES 2 421 294 T3

atgaacagcg gccccgcac gctotccatg atcatcggga ttctggggcg cctcatggcc 60  
 gccttcctga tcatcgaagg cctccacctc atcatcctcg gcggctcgtg gttctacacc 120  
 ctgcgccgca tcgcgctggc ggccagcagc gtctacatga tccgtcgcga catcctctcg 180  
 acatggatcg ccctcggcct gctttagca acagccctgt ggtegcctcg cgaagtcggc 240  
 accagcttct ggcccagctt ctcccgcctg atcgtgttcc tgtgcgtcgc cctgatcgcg 300  
 actctcatgg cgccctggct cagcggcccc ggccggcgct acttcaaccg ccccgtcaca 360  
 ggggccacct ccggcgcact cggcgccatc atcgtggctt tctcgcocgg catgttccgg 420  
 gtccaccoga ccatcgcccc gcaggacacc accaccgcg aggaaaccgc gtccaccgcc 480  
 gactccgacc agccccggca tgactggccc gcctatggcc gcacagcttc cggcacgcgc 540  
 tacgccagct tcacacagat caaccgcgac aatgtcagca agctccgcgt cgctggacc 600  
 taccgcaccg gcgacatggc gctgaacggc gccgaattcc agggcacccc catcaagatc 660  
 ggcgatacgg tctatatctg ctaccccac aacatcgtct cggccctoga ccccgacacc 720  
 ggcacggaaa agtggaagt tgcacccccac gccagacga aagtctggca gcgctgccgc 780  
 ggcgtcggct actggcatga cagcacagcc acggacgcca acgcgcctg cgctcgcgc 840  
 atcgtcctca ccacgatcga cgcgcctc atcaccatcg acgcccgcac cggccaggcc 900  
 tgcacggatt tcggaacgaa cggcaacgtc aatctcctga ccggcctcgg cccgacagcc 960  
 cccggctcct actaccogac cgcgccccc ctctgtggcg gtgacatcgt ggtcgtcggc 1020  
 ggccgcacatg ccgataacga gcgcacaggc gagccttccg gcgtcgtccg cggctacgac 1080  
 gtccgcaccg gcgcacaggt ctgggcctgg gacgccacca acccgcacatg cggcaccaca 1140  
 ccactggccg aaggcgagat ctaccccgcc gaaacccca acatgtgggg caccgccagc 1200  
 tacgaccoga aactcaacct cgtcttcttc ccgctcggca accagacccc cgatttctgg 1260  
 ggcggcgacc gcagcaaggc ctccgatgaa tacaacgacg ccttcgtcgc cgtggacgcc 1320  
 aaaaccggcg acgaacgctg gcacttccgc accgccaacc acgatctcgt ggactacgat 1380  
 gccacggccc agcccatcct ctacgacatt ccggacggcc atggcggcac ccgcccggcg 1440  
 atcatcgcca tgaccaagcg cggccagatc ttcgtgctcg accgcgcga cggcaccocg 1500  
 atcgtccccg tggaaatgcg caaagtcccc caggacggcg caccggaaca ccagtacctc 1560  
 gccccgaac agccctattc cgccctctcc atcggaacag agcgcctgaa acccagcgat 1620  
 atgtggggcg gcacgatctt cgaccagctc ctgtgcgcga tccagtctgc ctctaccgc 1680  
 tatgaaggcg agttcaccoc cgtcaacgag aagcaggcca ccatcatcta tccgggctat 1740  
 tacggcggca tcaactgggg cggcggcgcc gtggatgaaa gcaccggaac gctgctggtc 1800



ES 2 421 294 T3

aacgacatcc gcatggccca gtggggcaag ttcataaagc aagaagaagc ccgcccagc 1860  
 ggcttcaaac ccagctcggg aggcgaatat tccgaacaga aaggcaccac ctggggcgtc 1920  
 gtccgctcga tgttcttctc ccccgccggt ctcccctgcg tgaaccgccc ctatggcacg 1980  
 atgaacgcca tcgacctgcg cagcggcaag gtcaaatgga gcatgccgct tggcacgata 2040  
 caggacatgc cgggccacgg catgggtcccc ggcctcgcca tcccgctcgg aatgccgacc 2100  
 atgagcggcc cgctggccac ccataccggc ctgggtcttct tctccggcac gctcgacaac 2160  
 tatgtccgcg cgctcaacac cgacacgggc gaagtctgtt ggaaagcccg tctccccgct 2220  
 gcctcacagg ccgctccgat gagctacatg tccgacaaga ccggcaaaca gtacatcgtc 2280  
 gtcaccgcag gcggcctgac ccgctccggc gtcgacaaaa accgcggcga ctacgtcctc 2340  
 gcctacgccc tgcctccga agaataa 2367

<210> 27

<211> 788

<212> PRT

5 <213> *Gluconobacter oxydans* IFO 3244

<400> 27

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

Ala Leu Met Ala Ala Phe Leu Ile Ile Glu Gly Leu His Leu Ile Ile  
 20 25 30

Leu Gly Gly Ser Trp Phe Tyr Thr Leu Ala Gly Ile Ala Leu Ala Ala  
 35 40 45

Ser Ser Val Tyr Met Ile Arg Arg Asn Ile Leu Ser Thr Trp Ile Ala  
 50 55 60

Leu Gly Leu Leu Val Ala Thr Ala Leu Trp Ser Leu Ala Glu Val Gly  
 65 70 75 80

Thr Ser Phe Trp Pro Ser Phe Ser Arg Leu Ile Val Phe Leu Cys Val  
 85 90 95

Ala Leu Ile Ala Thr Leu Met Ala Pro Trp Leu Ser Gly Pro Gly Arg  
 100 105 110

Arg Tyr Phe Thr Arg Pro Val Thr Gly Ala Thr Ser Gly Ala Leu Gly  
 115 120 125

ES 2 421 294 T3

Ala Ile Ile Val Ala Phe Leu Ala Gly Met Phe Arg Val His Pro Thr  
130 135 140

Ile Ala Pro Gln Asp Thr Thr His Pro Gln Glu Thr Ala Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Asp Ser Asp Gln Pro Gly His Asp Trp Pro Ala Tyr Gly Arg Thr Ala  
165 170 175

Ser Gly Thr Arg Tyr Ala Ser Phe Thr Gln Ile Asn Arg Asp Asn Val  
180 185 190

Ser Lys Leu Arg Val Ala Trp Thr Tyr Arg Thr Gly Asp Met Ala Leu  
195 200 205

Asn Gly Ala Glu Phe Gln Gly Thr Pro Ile Lys Ile Gly Asp Thr Val  
210 215 220

Tyr Ile Cys Ser Pro His Asn Ile Val Ser Ala Leu Asp Pro Asp Thr  
225 230 235 240

Gly Thr Glu Lys Trp Lys Phe Asp Pro His Ala Gln Thr Lys Val Trp  
245 250 255

Gln Arg Cys Arg Gly Val Gly Tyr Trp His Asp Ser Thr Ala Thr Asp  
260 265 270

Ala Asn Ala Pro Cys Ala Ser Arg Ile Val Leu Thr Thr Ile Asp Ala  
275 280 285

Arg Leu Ile Thr Ile Asp Ala Arg Thr Gly Gln Ala Cys Thr Asp Phe  
290 295 300

Gly Thr Asn Gly Asn Val Asn Leu Leu Thr Gly Leu Gly Pro Thr Ala  
305 310 315 320

Pro Gly Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Ala Pro Leu Val Ala Gly Asp Ile  
325 330 335

Val Val Val Gly Gly Arg Ile Ala Asp Asn Glu Arg Thr Gly Glu Pro  
340 345 350

Ser Gly Val Val Arg Gly Tyr Asp Val Arg Thr Gly Ala Gln Val Trp

ES 2 421 294 T3

355		360		365											
Ala	Trp	Asp	Ala	Thr	Asn	Pro	His	Arg	Gly	Thr	Thr	Pro	Leu	Ala	Glu
	370					375						380			
Gly	Glu	Ile	Tyr	Pro	Ala	Glu	Thr	Pro	Asn	Met	Trp	Gly	Thr	Ala	Ser
385					390					395					400
Tyr	Asp	Pro	Lys	Leu	Asn	Leu	Val	Phe	Phe	Pro	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr
				405					410					415	
Pro	Asp	Phe	Trp	Gly	Gly	Asp	Arg	Ser	Lys	Ala	Ser	Asp	Glu	Tyr	Asn
			420					425					430		
Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Val	Asp	Ala	Lys	Thr	Gly	Asp	Glu	Arg	Trp	His
		435					440					445			
Phe	Arg	Thr	Ala	Asn	His	Asp	Leu	Val	Asp	Tyr	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln
	450					455					460				
Pro	Ile	Leu	Tyr	Asp	Ile	Pro	Asp	Gly	His	Gly	Gly	Thr	Arg	Pro	Ala
465					470					475					480
Ile	Ile	Ala	Met	Thr	Lys	Arg	Gly	Gln	Ile	Phe	Val	Leu	Asp	Arg	Arg
				485					490					495	
Asp	Gly	Thr	Pro	Ile	Val	Pro	Val	Glu	Met	Arg	Lys	Val	Pro	Gln	Asp
			500					505					510		
Gly	Ala	Pro	Glu	His	Gln	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Gln	Pro	Tyr	Ser	Ala
		515					520					525			
Leu	Ser	Ile	Gly	Thr	Glu	Arg	Leu	Lys	Pro	Ser	Asp	Met	Trp	Gly	Gly
	530					535					540				
Thr	Ile	Phe	Asp	Gln	Leu	Leu	Cys	Arg	Ile	Gln	Phe	Ala	Ser	Tyr	Arg
545					550					555					560
Tyr	Glu	Gly	Glu	Phe	Thr	Pro	Val	Asn	Glu	Lys	Gln	Ala	Thr	Ile	Ile
				565					570					575	
Tyr	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ile	Asn	Trp	Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Asp
			580					585					590		

ES 2 421 294 T3

Glu Ser Thr Gly Thr Leu Leu Val Asn Asp Ile Arg Met Ala Gln Trp  
595 600 605

Gly Lys Phe Met Lys Gln Glu Glu Ala Arg Arg Ser Gly Phe Lys Pro  
610 615 620

Ser Ser Glu Gly Glu Tyr Ser Glu Gln Lys Gly Thr Pro Trp Gly Val  
625 630 635 640

Val Arg Ser Met Phe Phe Ser Pro Ala Gly Leu Pro Cys Val Lys Pro  
645 650 655

Pro Tyr Gly Thr Met Asn Ala Ile Asp Leu Arg Ser Gly Lys Val Lys  
660 665 670

Trp Ser Met Pro Leu Gly Thr Ile Gln Asp Met Pro Val His Gly Met  
675 680 685

Val Pro Gly Leu Ala Ile Pro Leu Gly Met Pro Thr Met Ser Gly Pro  
690 695 700

Leu Ala Thr His Thr Gly Leu Val Phe Phe Ser Gly Thr Leu Asp Asn  
705 710 715 720

Tyr Val Arg Ala Leu Asn Thr Asp Thr Gly Glu Val Val Trp Lys Ala  
725 730 735

Arg Leu Pro Val Ala Ser Gln Ala Ala Pro Met Ser Tyr Met Ser Asp  
740 745 750

Lys Thr Gly Lys Gln Tyr Ile Val Val Thr Ala Gly Gly Leu Thr Arg  
755 760 765

Ser Gly Val Asp Lys Asn Arg Gly Asp Tyr Val Ile Ala Tyr Ala Leu  
770 775 780

Pro Ser Glu Glu  
785

<210> 28

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 28  
 ccgaattcag gccgaacagc agcagggtcac 30  
 <210> 29  
 <211> 30  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 29  
 10 gtcctgggt acctcgggtg aggtcatgaa 30  
 <210> 30  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 30  
 aagtcatatg aacagcggcc cccgcacgct 30  
 <210> 31  
 20 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 25 <400> 31  
 atctcgagtt ctcggaggg cagggcgtag 30

## REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa capaz de convertir directamente L-sorbose en ácido L-ascórbico, seleccionándose dicho polinucleótido del grupo que consiste en:

- 5 (a) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos según SEC ID NO:2, 12, 14, 16, 18, 20, 22, ó 27;
- (b) polinucleótidos que comprenden la secuencia nucleotídica según SEC ID NO:1, 11, 13, 15, 17, 19, 21, ó 26;
- 10 (c) polinucleótidos cuya hebra complementaria se hibrida en condiciones restrictivas a un polinucleótido como se define en uno cualquiera de (a) a (b); y
- (d) polinucleótidos que comparten al menos 80% de homología con un polinucleótido como se define en uno cualquiera de (a) a (b), con lo que se comparan al menos 100 nucleótidos consecutivos

o la hebra complementaria de un polinucleótido que codifica un polipéptido según SEC ID NO:2 y que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa.

15 2. Un polipéptido codificado por un polinucleótido según la reivindicación 1 y que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa capaz de convertir directamente L-sorbose en ácido L-ascórbico.

3. Un microorganismo que posee un vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1, y en el que dicho polinucleótido está sobreexpresado.

20 4. El microorganismo según la reivindicación 3, en el que el microorganismo es una bacteria de un género seleccionado del grupo que consiste en *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* y *Escherichia*.

5. Un procedimiento para la producción de ácido L-ascórbico a partir de un sustrato seleccionado del grupo que consiste en D-sorbitol, L-sorbose y L-sorbose, que comprende:

- 25 (a) propagar el microorganismo según la reivindicación 3 ó 4 que codifica el polipéptido según la reivindicación 2 en un medio de cultivo apropiado para convertir directamente L-sorbose en ácido L-ascórbico, y
- (b) recuperar y separar ácido L-ascórbico de dicho medio de cultivo.

6. Un procedimiento para la producción de ácido L-ascórbico a partir de un sustrato seleccionado del grupo que consiste en D-sorbitol, L-sorbose y L-sorbose, que comprende:

- 30 (a) propagar un microorganismo que codifica el polipéptido según la reivindicación 2 que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa en un medio de cultivo apropiado,
- (b) aislar y purificar dicha L-sorbose deshidrogenasa,
- (c) incubar el sustrato en presencia de dicha L-sorbose deshidrogenasa de (b) para convertir directamente L-sorbose en ácido L-ascórbico, y
- (d) recuperar y separar ácido L-ascórbico a partir de la mezcla de reacción.

35 7. Un procedimiento para la producción de L-sorbose deshidrogenasa según la reivindicación 2, en el que un microorganismo que codifica el polipéptido según la reivindicación 2 se propaga en un medio de cultivo apropiado, las células se disgregan y se aísla la L-sorbose deshidrogenasa.

8. El procedimiento para la producción de ácido L-ascórbico según la reivindicación 5 ó 6 usando células en reposo de dicho microorganismo, en el que el rendimiento de ácido L-ascórbico producido es al menos 1,8 g/l.

40 9. El procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, que comprende las etapas de:

- (a) cultivar el microorganismo según la reivindicación 3 ó 4 en condiciones que permiten el crecimiento,
- (b) cambiar las condiciones de manera que se reduce la velocidad de crecimiento de dicho microorganismo conduciendo a células en reposo; y
- (c) producir ácido L-ascórbico a partir del sustrato usando las células en reposo de (b).

45 en el que la etapa (a) y (c) no están separadas por ninguna etapa de lavado ni de aislamiento.

10. El procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que la densidad de las células en reposo en el medio de producción, medida como OD a 600 nm, es al menos 10.
- 5 11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que usa un microorganismo capaz de producir tanto ácido L-ascórbico como ácido 2-ceto-L-gulónico a partir de un sustrato, y en el que la relación entre la concentración de ácido L-ascórbico y 2-KGA es mayor que 0,1.
12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende además aislar ácido L-ascórbico del medio y opcionalmente una o más etapas de purificación.
13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que todas las etapas de purificación se llevan a cabo en un entorno acuoso.
- 10 14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 u 8 a 13, que comprende además la separación de ácido L-ascórbico a partir de los componentes en el medio usando electrodiálisis.
15. Uso de un polipéptido según la reivindicación 2, o un microorganismo según la reivindicación 3 ó 4, para la producción de ácido L-ascórbico directamente a partir de L-sorbose.