

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 167**

51 Int. Cl.:

C12P 7/02 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2006 E 11189703 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2428574**

54 Título: **Oxidorreductasas para la reducción estereoselectiva de compuestos cetónicos**

30 Prioridad:

27.07.2005 AT 12612005

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

04.12.2014

73 Titular/es:

**CAMBREX IEP GMBH (100.0%)
Rheingastrasse 190-196
65203 Wiesbaden , DE**

72 Inventor/es:

**TSCHENTSCHER, ANTJE;
GUPTA, ANTJE y
DUPONT, MARIA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 524 167 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

Oxidorreductasas para la reducción estereoselectiva de compuestos cetónicos

La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de un compuesto cetónico para dar el correspondiente compuesto de hidroxilo quiral, en el que el compuesto cetónico se reduce con una oxidorreductasa. La invención se refiere además a nuevas oxidorreductasas para su uso en la reducción enantioselectiva de compuestos cetónicos para dar compuestos de hidroxilo quirales.

Los compuestos de hidroxilo ópticamente activos son módulos quirales valiosos con amplia aplicación para la síntesis de compuestos farmacológicamente activos, sustancias aromáticas, feromonas, compuestos agroquímicos e inhibidores de enzimas. A este respecto se registra en particular en el sector farmacéutico una necesidad creciente de compuestos quirales y por consiguiente tecnologías de síntesis quirales, dado que en el futuro ya apenas se usarán como fármacos los compuestos racémicos.

La reducción asimétrica de compuestos cetónicos proquirales es un sector de la catálisis estereoselectiva, en el que la biocatálisis representa una tecnología de competencia eficiente con respecto a la catálisis química. La hidrogenación asimétrica química requiere el uso de catalizadores de metales pesados con alto grado de toxicidad y contaminantes, de condiciones de reacción extremas y por consiguiente que requieren mucha energía así como grandes cantidades de disolventes orgánicos. Además, estos procedimientos están caracterizados con frecuencia por reacciones secundarias y excesos enantioméricos insuficientes.

Las reducciones de compuestos cetónicos proquirales para dar compuestos de hidroxilo y a la inversa se producen en la naturaleza en numerosas rutas bioquímicas, tanto en el metabolismo primario como en el metabolismo secundario, en cualquier organismo y se catalizan por distintos tipos de alcoholdehidrogenasas secundarias y oxidorreductasas. Por regla general, estas enzimas dependen de cofactores.

La factibilidad principal del uso de biocatalizadores para la reducción de compuestos cetónicos proquirales para dar compuestos de hidroxilo quirales se demostró en el pasado de manera repetida por medio de sistemas de modelo, trabajándose tanto con oxidorreductasas aisladas como con distintos sistemas de biotransformación de células completas. A este respecto resultó ventajoso el planteamiento biocatalítico esencialmente con respecto a las condiciones de reacción suaves, productos secundarios ausentes y excesos enantioméricos obtenibles con frecuencia esencialmente mejores. El uso de enzimas aisladas es ventajoso en comparación con procedimientos con células completas con respecto al exceso enantiomérico obtenible, la producción de productos de degradación y secundarios como también con respecto al aislamiento del producto. Además no es posible el uso de procesos de células completas en cualquier empresa química, dado que para ello son necesarios un equipamiento especial y conocimientos técnicos.

Recientemente pudo mostrarse que el uso de oxidorreductasas aisladas en sistemas de dos fases acuoso/orgánicos con disolventes orgánicos es posible de manera sumamente eficaz, económica y también en altas concentraciones (> 5%). En los sistemas descritos, a este respecto el compuesto cetónico que va a reducirse, en la mayoría de los casos poco soluble en agua forma junto con el disolvente orgánico la fase orgánica. Parcialmente puede prescindirse también del propio disolvente orgánico, entonces la fase orgánica se forma por el compuesto cetónico que va a reducirse (documentos DE 10119274, DE 10327454.4, DE 103 37 401.9, DE 103 00 335.5). La regeneración de coenzimas se realiza a este respecto mediante la oxidación simultánea de alcoholes secundarios, usándose en la mayoría de los casos el 2-propanol miscible con agua, económico.

Son ejemplos de oxidorreductasas y deshidrogenasas R- y S-específicas adecuadas de alta enantioselectividad:

carbonilreductasa de *Candida parapsilosis* (CPCR) (documentos US 5.523.223 y US 5.763.236, (Enzyme Microb Technol. 1993 Nov;15(11):950-8)) y *Pichia capsulata* (documento DE10327454.4). Carbonilreductasa de *Rhodococcus erythropolis* (RECR) (documento US 5.523.223), *Nocardia fusca* (Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (10) (1999), páginas 1721-1729), (Appl Microbiol Biotechnol. Sep de 2003; 62(4):380-6. Epub 26 de abril de 2003), y *Rhodococcus ruber* (J Org Chem. 24 de enero de 2003; 68(2):402-6.).

Alcoholdehidrogenasas secundarias R-específicas de organismos del género *Lactobacillus* (*Lactobacillus kefir* (documento US5200335), *Lactobacillus brevis* (documento DE 19610984 A1) (Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. diciembre de 2000; 56 Pt12:1696-8), *Lactobacillus minor* (documento DE10119274) o *Pseudomonas* (documento US 05385833) (Appl Microbiol Biotechnol. agosto de 2002; 59(4-5):483-7. Epub 26 de junio de 2002, J. Org. Chem. 1992, 57, 1532)

Sin embargo, las enzimas conocidas actualmente no son ni remotamente suficientes para aprovechar todo el potencial comercial de reducciones estereoselectivas de compuestos cetónicos. Esto puede basarse por un lado en que las enzimas individuales disponen de propiedades muy distintas con respecto al espectro de sustrato, grados óptimos de pH así como estabildades frente a temperatura y disolventes, que con frecuencia se complementan mutuamente. Por tanto, incluso enzimas homólogas proporcionalmente similares pueden presentar con respecto a un determinado sustrato un comportamiento de reacción completamente distinto. Por otro lado ni muchos menos todas las enzimas descritas están clonadas ni pueden sobre-expresarse en cantidad suficiente, lo que significa que

estas enzimas no están a disposición para una aplicación industrial. Por tanto es necesario para el aprovechamiento lo más amplio posible del potencial sintético de la hidrogenación asimétrica enzimática, disponer de una cartera lo más amplia posible de distintas oxidorreductasas accesibles industrialmente que además sean adecuadas para una aplicación en sistemas de dos fases acuoso/orgánicos con disolventes orgánicos.

5 El objeto de la presente invención son ahora una serie de nuevas oxidorreductasas enantioselectivas, R- y S-específicas que se caracterizan por buena estabilidad en sistemas de dos fases acuoso/orgánicos así como por buena capacidad de expresión en *Escherichia coli* (>500 unidades/g de biomasa húmeda de *E. coli*), así como un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de un compuesto cetónico para dar el correspondiente compuesto de hidroxilo quiral.

10 Las oxidorreductasas de acuerdo con la invención están caracterizadas porque presentan una secuencia de aminoácidos, en la que al menos el 75 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º 4.

15 El polipéptido que corresponde a SEC ID N.º 4 puede obtenerse a partir de bacterias del grupo *Leuconostoc*, en particular a partir de *Leuconostoc carnosum* DSMZ 5576. Es objeto de la invención además una secuencia de ácido nucleico SEC ID N.º 12, que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º 4. El polipéptido es adecuado especialmente para la reducción de 2-octanona para dar R-2-octanol y para la oxidación de R-2-octanol. También es muy adecuado para la reducción de éster de 4-haloacetato para dar ésteres de ácido S-4-halo-3-hidroxibutírico.

20 La oxidorreductasa de *Leuconostoc carnosum* es un homodímero con un peso molecular determinado en gel SDS de 276 2 kDa. El grado óptimo de pH para la reacción de reducción se encuentra para esta oxidorreductasa en el intervalo de 5,0 a 6,0 y el grado óptimo de pH para la reacción de oxidación se encuentra en el intervalo de 6,0-9,0. La oxidorreductasa de *Leuconostoc carnosum* presenta una buena estabilidad frente a la temperatura, pH y disolventes y muestra en el intervalo de pH de 4,5 a 10 así como a temperaturas de hasta 35 °C también en tiempos de incubación de varias horas una pérdida de actividad sólo baja.

25 La invención se refiere además a proteínas de fusión que están caracterizadas porque representan oxidorreductasas con la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º 4, o sus homólogos, que están unidas peptídicamente con otro polipéptido en el extremo N terminal o carboxilo terminal. Las proteínas de fusión pueden separarse por ejemplo más fácilmente de otras proteínas o pueden expresarse de manera recombinante en cantidades mayores.

30 La invención se refiere además a anticuerpos que se unen específicamente a las oxidorreductasas de acuerdo con SEC ID N.º 4, o sus homólogos. La preparación de estos anticuerpos se realiza de acuerdo con procedimientos conocidos mediante inmunización de mamíferos adecuados y posterior obtención de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales.

35 Ciertas comparaciones de secuencias de aminoácidos pueden realizarse por ejemplo en la Internet en bancos de datos de proteína tales como por ejemplo SWISS-PROT, PIR así como en bancos de datos de ADN tales como por ejemplo EMBL, GenBank etc usando el programa FASTA o el programa BLAST.

40 El alineamiento óptimo se determina a este respecto con ayuda del algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.* 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 2264-2268). Como matriz de puntuación para el cálculo de la analogía de secuencia se tomó como base la matriz PAM30. (Dayhoff; M.O., Schwarz, R.M., Orcutt, B.C. 1978. "A model of evolutionary change in Proteins in "Atlas of Protein Sequence and structure" 5(3) M.O. Dayhoff (ed) 345-352, National Biomedical Research foundation).

La invención se refiere además a fragmentos de proteínas que están caracterizados porque representan fragmentos de la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º 4, con un número de más de 18 aminoácidos por fragmento.

45 Es objeto de la invención además una carbonildeshidrogenasa microbiana que contiene en el extremo N terminal la secuencia de aminoácidos MTDRLKNKVA (SEC ID N.º 43) y/o en el extremo C terminal la secuencia de aminoácidos AEFVVDGGYLAQ (SEC ID N.º 44) y/o una de las secuencias parciales internas VVITGRRAN (SEC ID N.º 45), GGASIINMS (SEC ID N.º 46), TQTPMGHI (SEC ID N.º 47) o GYIKTPLVDG (SEC ID N.º 48).

50 La invención se refiere además a un vector de clonación que contiene una o varias secuencias de ácido nucleico que codifican las carbonilreductasas de acuerdo con SEC ID N.º 4, o sus homólogos. La invención comprende además un vector de clonación de este tipo que contiene adicionalmente a la carbonilreductasa una enzima adecuada para la regeneración del NAD(P), tal como por ejemplo formiatodeshidrogenasas, alcoholdehidrogenasas o glucosadeshidrogenasa.

55 La invención se refiere además a un vector de expresión que se encuentra en una célula bacteriana, de insecto, vegetal o de mamífero y contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica las carbonilreductasas de acuerdo con SEC ID N.º 4, o sus homólogos y está unida de manera adecuada con una secuencia control de expresión. La invención se refiere además a una célula huésped recombinante que es una célula bacteriana, de levadura, de insecto, vegetal o de mamífero y se transformó o se transfectó con un vector de expresión de este tipo así como a

un procedimiento de preparación para la obtención de una carbonilreductasa que se basa en el cultivo de una célula huésped recombinante de este tipo.

5 Ciertos vectores de clonación adecuados son por ejemplo ppCR-Script, pCMV-Script, pBluescript (Stratagene), pDrive cloning Vector (Quiagen, Hilden, Alemania), pS Blue, pET Blue, vectores pET LIC (Novagen, Madison, EE.UU.) así como vectores de clonación de TA-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

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

Ciertas secuencias control de expresión adecuadas son por ejemplo promotor trp-lac (tac), promotor trp-lac (trc), promotor lac, promotor T7 o promotor λ L.

10 Las oxidorreductasas de acuerdo con SEC ID N.º 4, o sus homólogos pueden obtenerse de modo que se cultivan las células E. coli recombinantes mencionadas anteriormente, se induce la expresión de la correspondiente oxidorreductasa y a continuación tras aproximadamente de 10 a 18 horas (h) se rompen las células mediante tratamiento con ultrasonidos, mediante molienda en húmedo con perlas de vidrio en un molino de bolas (Retsch, GmbH, Haan Alemania 10 min, 24 Hz) o por medio de homogeneizador de alta presión. El extracto de células
15 obtenido puede usarse o bien directamente o puede purificarse posteriormente. Para ello, por ejemplo, se centrifuga el extracto de células y el sobrenadante obtenido se somete a una cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose Fast Flow® (Pharmacia).

20 La invención se refiere además a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de un compuesto cetónico para dar el correspondiente compuesto de hidroxilo quiral, en el que el compuesto cetónico se reduce en presencia de un co-factor con una oxidorreductasa, caracterizado porque se usa una oxidorreductasa que presenta una secuencia de aminoácidos en la que al menos el 75 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º 4.

Otra forma de realización preferente del procedimiento de acuerdo con la invención consiste en que el compuesto cetónico presenta la fórmula general I

25
$$R_1-C(O)-R_2 \quad (I),$$

en la que R1 representa uno de los restos

- 1) alquilo (C₁-C₂₀), en el que alquilo es de cadena lineal o ramificada,
- 2) alquenilo (C₂-C₂₀), en el que alquenilo es de cadena lineal o ramificada y eventualmente contiene hasta cuatro
30 dobles enlaces,
- 3) alquinilo (C₂-C₂₀), en el que alquinilo es de cadena lineal o ramificada y eventualmente contiene hasta cuatro triples enlaces,
- 4) arilo (C₆-C₁₄),
- 5) alquil-(C₁-C₈)-arilo (C₆-C₁₄),
- 6) heterociclo (C₅-C₁₄), que está no sustituido o sustituido una, dos o tres veces con -OH, halógeno, -NO₂ y/o -
35 NH₂, o
- 7) cicloalquilo (C₃-C₇),
estando los restos mencionados anteriormente en 1) a 7) no sustituidos o independientemente entre sí están sustituidos una, dos o tres veces con -OH, halógeno, -NO₂ y/o -NH₂,
y R₂ representa uno de los restos
- 8) alquilo (C₁-C₆), en el que alquilo es de cadena lineal o ramificada,
- 9) alquenilo (C₂-C₆), en el que alquenilo es de cadena lineal o ramificada y eventualmente contiene hasta tres
40 dobles enlaces,
- 10) alquinilo (C₂-C₆), en el que alquinilo es de cadena lineal o ramificada y eventualmente contiene dos triples enlaces, o
- 45 11) alquil-(C₁-C₁₀)-C(O)-O-alquilo (C₁-C₆), en el que alquilo es lineal o ramificado y está no sustituido o está sustituido una, dos o tres veces con -OH, halógeno, -NO₂ y/o -NH₂,
estando los restos mencionados anteriormente en 8) a 11) no sustituidos o independientemente entre sí están sustituidos una, dos o tres veces con -OH, halógeno, -NO₂ y/o -NH₂.

50 La invención se refiere además a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de un compuesto cetónico para dar el correspondiente compuesto de hidroxilo quiral, en el que el compuesto cetónico se reduce en presencia de un co-factor con una oxidorreductasa, que se caracteriza porque se usa una oxidorreductasa para la que

- (a) codifica la secuencia de ácido nucleico SEC ID N.º 12, o para la que
- (b) codifica una secuencia de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia de ácido
55 nucleico mencionada en (a) en condiciones altamente riguosas.

Por el término arilo se entiende restos de hidrocarburo aromáticos con 6 a 14 átomos de carbono en el anillo. Los

restos arilo (C₆-C₁₄) son por ejemplo fenilo, naftilo, por ejemplo 1-naftilo, 2-naftilo, bifenililo, por ejemplo 2-bifenililo, 3-bifenililo y 4-bifenililo, antrilo o fluorenilo. Los restos bifenililo, restos naftilo y en particular restos fenilo son restos arilo preferentes. Por el término "halógeno" se entiende un elemento de la serie flúor, cloro, bromo o yodo. Por el término "alquilo (C₁-C₂₀)" se entiende un resto de hidrocarburo, cuya cadena de carbono es lineal o ramificada y contiene de 1 a 20 átomos de carbono por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonenilo o decanilo. Por el término "alquilo C₀" se entiende un enlace covalente.

Por el término "cicloalquilo (C₃-C₇)" se entiende restos de hidrocarburo cíclicos tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

El término "heterociclo (C₅-C₁₄)" representa un anillo heterocíclico de 5 miembros a 14 miembros monocíclico o bicíclico, que está parcialmente saturado o completamente saturado. Son ejemplos de heteroátomos N, O y S. Son ejemplos de los términos heterociclo (C₅-C₁₄) restos que se derivan de pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, tetrazol, 2-óxidos de 1,2,3,5-oxatiadiazol, triazolonas, oxadiazolonas, isoxazolonas, oxadiazolidindionas, triazoles, que están sustituidos con F, -CN, -CF₃ o -C(O)-O-alquilo (C₁-C₄), 3-hidroxi-pirro-2,4-dionas, 5-oxo-1,2,4-tiadiazoles, piridina, pirazina, pirimidina, indol, isoindol, indazol, ftalazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinazolina, cinnolina, carbolina y derivados benzocondensados, derivados ciclopentacondensados, ciclohexacondensados o cicloheptacondensados de estos heterociclos. En particular se prefieren los restos 2- o 3-pirrolilo, fenilpirrolilo tal como 4- o 5-fenil-2-pirrolilo, 2-furilo, 2-tienilo, 4-imidazolilo, metil-imidazolilo, por ejemplo 1-metil-2-, -4- o -5-imidazolilo, 1,3-tiazol-2-ilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, N-óxido de 2-, 3- o 4-piridilo, 2-pirazinilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo, 2-, 3- o 5-indolilo, 2-indolilo sustituido, por ejemplo 1-metil-, 5-metil-, 5-metoxi-, 5-benciloxi-, 5-cloro- o 4,5-dimetil-2-indolilo, 1-bencil-2- o -3-indolilo, 4,5,6,7-tetrahidro-2-indolilo, ciclohepta[b]-5-pirrolilo, 2-, 3- o 4-quinolilo, 1-, 3- o 4-isoquinolilo, 1-oxo-1,2-dihidro-3-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 2-benzofuranilo, 2-benzo-tienilo, 2-benzoxazolilo o benzotiazolilo o dihidropiridinilo, pirrolidinilo, por ejemplo 2- o 3-(N-metilpirrolidinilo), piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidrotienilo o benzodioxolanilo.

Los compuestos preferentes de fórmula I son por ejemplo 4-cloroacetoacetato de etilo, acetoacetato de metilo, ácido etil-8-cloro-6-oxooctanoico, 3-oxovaleriato de etilo, 4-hidroxi-2-butanona, 2-oxovaleriato de etilo, ácido etil-2-oxo-4-fenilbutírico, piruvato de etilo, fenilgloxilato de etilo, 1-fenil-2-propanona, 2-cloro-1-(3-clorofenil)etan-1-ona, acetofenona, 2-octanona, 3-octanona, 2-butanona, 1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etan-1-onas, 2,5-hexanodiona, 1,4-dicloro-2-butanona, acetoxiacetona, cloruro de fenacilo, 4-bromoacetoacetato de etilo, 1,1-dicloroacetona, 1,1,3-tricloroacetona o 1-cloroacetona.

Las oxidorreductasas pueden usarse en el procedimiento de acuerdo con la invención o bien de manera completamente purificada o de manera parcialmente purificada o pueden realizarse con células que contienen las oxidorreductasas de acuerdo con la invención. Las células usadas pueden encontrarse a este respecto de manera nativa, permeabilizada o lisada. Preferentemente se usan las oxidorreductasas clonadas de acuerdo con SEC ID N.º 4, o sus homólogos.

Por cada kg de compuesto de fórmula I que va a reaccionar se usan de 5000 a 10 millones de U de oxidorreductasa. (abierto hacia arriba) La unidad enzimática 1 U corresponde a este respecto a la cantidad de enzima que se requiere para hacer reaccionar 1 µmol del compuesto de fórmula I por minuto (min).

La propia reducción enzimática se desarrolla en condiciones suaves, de modo que los alcoholes generados no reaccionen posteriormente. Los procedimientos de acuerdo con la invención presentan un alto tiempo de permanencia y una pureza enantiomérica de por regla general más del 95 % de los alcoholes quirales preparados y un alto rendimiento con respecto a la cantidad usada de compuestos cetónicos.

El compuesto de carbonilo se usa en el procedimiento de acuerdo con la invención en una cantidad del 3 % al 50 % con respecto al volumen total, preferentemente del 5 % al 40 %, en particular del 10 % - 30 %.

Una forma de realización preferente de la invención está caracterizada además porque el NAD o NADP formado en la reducción se reduce continuamente con un cosustrato para dar NADH o NADPH.

Como cosustrato se usan a este respecto preferentemente alcoholes primarios y secundarios, tales como etanol, 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-heptanol, 2-octanol o ciclohexanol.

Estos cosustratos se hacen reaccionar con ayuda de una oxidorreductasa y NAD o NADP para dar los correspondientes aldehídos o cetonas y NADH o NADPH. Debido a ello se produce la regeneración del NADH o NADPH. La proporción del cosustrato para la regeneración asciende a este respecto a del 5 % al 95 % en volumen, con respecto al volumen total.

Para la regeneración del cofactor puede añadirse adicionalmente una alcoholdehidrogenasa. Las alcoholdehidrogenasas dependientes de NADH adecuadas pueden obtenerse por ejemplo de levadura de panadería, de *Candida boidinii*, *Candida parapsilosis* o *Pichia capsulata*. Las alcoholdehidrogenasas dependientes de NADPH adecuadas se producen además en *Lactobacillus brevis* (documento DE 196 10 984 A1), *Lactobacillus minor* (documento DE 101 19 274), *Pseudomonas* (US 5.385.833) o en *Thermoanaerobium brockii*. Los cosustratos adecuados para estas alcoholdehidrogenasas son los alcoholes secundarios ya mencionados tales como etanol, 2-

propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-octanol o ciclohexanol.

Además puede realizarse la regeneración del cofactor por ejemplo también por medio de formiato-deshidrogenasa dependiente de NAD o NADP (Tishkov *et al.*, J. Biotechnol. Bioeng. 64, 187-193, Pilot-scale production and isolation of recombinant NAD and NADP specific Formate dehydrogenase). Los cosustratos adecuados de la formiato-deshidrogenasa son por ejemplo sales del ácido fórmico tales como formiato de amonio, formiato de sodio o formiato de calcio. Preferentemente se realizan los procedimientos de acuerdo con la invención sin embargo sin una deshidrogenasa adicional de este tipo, es decir no tiene lugar una regeneración de coenzima acoplada al sustrato.

La parte acuosa de la mezcla de reacción, en la que se desarrolla la reducción enzimática, contiene preferentemente un tampón, por ejemplo tampón fosfato de potasio, Tris/HCl o trietanolamina, con un valor de pH de 5 a 10, preferentemente un valor de pH de 6 a 9. El tampón puede contener adicionalmente aún iones para la estabilización o activación de las enzimas, por ejemplo iones zinc o iones magnesio.

La temperatura asciende durante la realización de los procedimientos de acuerdo con la invención convenientemente a de aproximadamente 10 °C a 70 °C, preferentemente de 20 °C a 40 °C.

En otra forma de realización preferente de los procedimientos de acuerdo con la invención se realiza la reacción enzimática en presencia de un disolvente orgánico no miscible con agua o miscible con agua sólo de manera limitada. Este disolvente es por ejemplo un dialquil(C₁-C₆)éter simétrico o asimétrico, un alcano de cadena lineal o ramificada o cicloalcano o un alcohol secundario insoluble en agua, que a la vez representa el cosustrato. Los disolventes orgánicos preferentes son por ejemplo dietiléter, terc-butilmetiléter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de butilo, heptano, hexano, 2-octanol, 2-heptanol, 4-metil-2-pentanol o ciclohexano. El disolvente puede servir a este respecto también simultáneamente como cosustrato para la regeneración del cofactor.

La mezcla de reacción, en caso del uso de disolventes insolubles en agua o cosustratos, está compuesta de una fase acuosa y de una fase orgánica. El sustrato se distribuye de manera correspondiente a su solubilidad entre la fase orgánica y la acuosa. La fase orgánica tiene generalmente una proporción del 5 % al 95 %, preferentemente del 10 % al 90 % con respecto al volumen de reacción total. Las dos fases líquidas se mezclan preferentemente de manera mecánica, de modo que se genera entre las mismas una gran superficie. También en esta forma de realización puede reducirse el NAD o NADP formado en la reducción enzimática con un cosustrato, tal como se ha descrito, de nuevo para dar NADH o NADPH.

La concentración del cofactor NADH o NADPH en la fase acuosa asciende generalmente a de 0,001 mM a 1 mM, en particular de 0,01 mM a 0,1 mM.

En los procedimientos de acuerdo con la invención puede usarse aún un estabilizador de la oxidoreductasa/deshidrogenasa. Los estabilizadores adecuados son por ejemplo glicerina, sorbitol, 1,4-DL-ditiotreitól (DTT) o dimetilsulfóxido (DMSO).

El procedimiento de acuerdo con la invención se realiza por ejemplo en un recipiente de reacción cerrado de vidrio o metal. Para ello se transfieren los componentes individualmente al recipiente de reacción y se agitan bajo una atmósfera de por ejemplo nitrógeno o aire. El tiempo de reacción asciende a de 1 hora a 48 horas, en particular de 2 horas a 24 horas.

A continuación se procesa la mezcla de reacción. Para ello se separa la fase acuosa, se filtra la fase orgánica. La fase acuosa puede extraerse eventualmente otra vez y como la fase orgánica puede procesarse posteriormente. Después se evapora eventualmente el disolvente de la fase orgánica filtrada.

La invención se refiere además a un procedimiento para la obtención de compuesto de hidroxilo quiral de fórmula II,



en la que R¹ y R² se definen como anteriormente, que se caracteriza porque

- a) se incuba una mezcla que contiene el compuesto racémico de fórmula II en presencia de una de las oxidoreductasas de acuerdo con la invención de acuerdo con SEC ID N.º 4, o sus homólogos, NAD(P) y agua, convirtiéndose un enantiómero de compuesto de hidroxilo de fórmula II en el compuesto cetónico correspondiente y NAD(P)H, y
- b) se aísla el enantiómero que queda del compuesto de hidroxilo de fórmula II.

En caso del uso de las carbonilreductasas de acuerdo con SEC ID N.º 4 se obtienen a este respecto preferentemente los correspondientes compuestos de S-hidroxilo quirales.

Las condiciones de reacción son esencialmente las mismas que en el procedimiento mencionado anteriormente para la reducción enantioespecífica del compuesto cetónico de fórmula I. Sin embargo, en lugar de una reducción enantioselectiva del compuesto cetónico de fórmula I, de la mezcla racémica del compuesto de fórmula II se oxida únicamente un enantiómero del compuesto de hidroxilo de fórmula II de manera enantioselectiva para dar el correspondiente compuesto cetónico. Debido a ello permanece el enantiómero opuesto del compuesto de hidroxilo

de fórmula II y puede aislarse. Además, en el procedimiento se usa en lugar de los alcoholes usados como cosustratos tales como etanol, 2-propanol (isopropanol), 2-butanol, 2-pentanol o 2-octanol, sus correspondientes cetonas tales como acetona para la regeneración del NAD. Por ejemplo se hace reaccionar la acetona y NAD(P)H con la oxidorreductasa de acuerdo con la invención o una deshidrogenasa adicional para dar NAD e isopropanol.

5 Las formas de realización preferentes de la invención se explican aún en más detalle con los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1:

Cultivo de organismos y selección según la actividad carbonilreductasa

10 La cepa *Leuconostoc carnosum* DSMZ 5576 se cultivó en el siguiente medio: glucosa (20), extracto de levadura (5), extracto de carne (10), hidrogenocitrato de di-amonio (2), acetato de sodio (5), sulfato de magnesio (0,2), sulfato de manganeso (0,05), hidrogenofosfato de di-potasio (2). El medio se esterilizó a 121 °C y el organismo se cultivó a 30 °C sin regulación de pH posterior o alimentación de oxígeno. La cepa *Microbacterium spec.* DSMZ 20028 se cultivó en un medio de extracto de levadura (3) y tripticasa de harina de soja (30) a 30 °C y 160 revoluciones por minuto (rpm).

15 A continuación se resuspendieron 125 mg de células con 800 µl de tampón de disgregación (trietanolamina (TEA) 100 mM, pH = 7,0), se mezclaron con 1 g de perlas de vidrio y se trataron durante 10 minutos (min) a 4 °C en el molino de bolas (Retsch). El sobrenadante (lisado) obtenido tras centrifugación de 2 min a 12000 rpm se usó en la siguiente selección de actividad y para la determinación del exceso enantiomérico (valor ee). Como sustratos se usaron distintas cetonas, tales como 2-butanonas, 2-octanona, 4-cloroacetoacetato de etilo, acetofenona o ácido de etil-2-oxo-4-fenilbutírico.

20 Mezcla de reacción para la selección de actividad:

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

25 La reacción se siguió durante 1 min a 340 nm.

Mezcla de reacción para la determinación del valor ee:

20 µl	lisado
100 µl	NADH o NADPH (50 mM)
60 µl	sustrato (100 mM)

30 Las mezclas de reacción para la determinación del ee se extrajeron tras 24 horas (h) por ejemplo con cloroformo y por medio de cromatografía de gases (CG) se determinó el exceso enantiomérico. El exceso enantiomérico se calcula tal como sigue:

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

Tabla 1

N.º de DSMZ	Microorganismo	Actividad en U/g de células de organismos huésped			
		2-Butanona		2-Octanona	
		NADH	NADPH	NADH	NADPH
5576	<i>Leuconostoc carnosum</i>	-----	77	-----	77

35 DSMZ representa la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellculturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig. Definición de las unidades de enzima: 1 U corresponde a la cantidad de enzima que se requiere para hacer reaccionar 1 µmol de sustrato por min.

Ejemplo 2:

40 *Aislamiento y purificación de oxidorreductasas microbianas dependientes de NAD(P)H*

Para el aislamiento de las oxidorreductasas microbianas dependientes de NAD(P)H se cultivaron los microorganismos tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Tras alcanzar la fase estacionaria se recogieron las

células y mediante centrifugación se separaron del medio. La liberación de enzimas se realizó mediante molienda en húmedo por medio de perlas de vidrio, sin embargo puede conseguirse también mediante otros procedimientos de disgregación. Para ello se suspendieron por ejemplo 100 g de masa húmeda de células con 400 ml de tampón de disgregación (trietanolamina 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH =7,0) y se homogeneizaron por medio de una prensa francesa.

El extracto bruto obtenido tras la centrifugación (7000 rpm) se purificó posteriormente entonces por medio de FPLC (*fast protein liquid chromatography*, cromatografía de líquidos rápida de proteínas).

Todas las oxidorreductasas de acuerdo con la invención pudieron purificarse mediante combinaciones distintas de cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo en Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) o Uno Q (Biorad, Múnich, Alemania), de cromatografía de interacción hidrófoba, por ejemplo en Octylsepharose Fast Flow o Butylsepharose Fast Flow (Pharmacia), cromatografía en cerámica-hidroxiapatita y permeación en gel.

Ejemplo 3:

Determinación de la secuencia N terminal de una oxidorreductasa de acuerdo con la invención

Las preparaciones de enzima de acuerdo con el ejemplo 2 se separaron tras la permeación en gel en el gel de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 % y se transfirieron sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (membrana PVDF). La banda llamativa se sometió a una secuenciación en el extremo N terminal por medio de degradación de Edman (Procise 492 (PE-Biosystems)).

Ejemplo 4:

Estrategia de clonación general de una alcoholdehidrogenasa enantioselectiva aislada de levaduras

Se extrae ADN cromosómico de acuerdo con el procedimiento descrito en "Molecular cloning" de Manniatis & Sambrook. El ácido nucleico resultante sirve como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores degenerados. A este respecto se derivan cebadores en 5' de la secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º 66; 72; 80) y los cebadores en 3' de la secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º 67; 73; 81) con inclusión del código genético específico para el organismo (SEC ID N.º 68; 69; 74; 75; 82; 83).

La amplificación se realiza en tampón de PCR [Tris-HCl 67 mM (pH 8,3), $(NH_4)_2SO_4$ 16 mM, $MgCl_2$ 115 mM, Tween 20 al 0,01 %], mezcla de desoxi-nucleotidotri-fosfato (dNTPs) 0,2 mM, 40 pmol por cebador y 2,5 U de polimerasa BioTherm Star (Genecraft, Lüdingshausen, Alemania)]. Tras una activación de la polimerasa BioTherm Star (8 min 95 °C) y 45-50 ciclos posteriores de una PCR Touch-Down se enfría la reacción hasta 4 °C y toda la mezcla de reacción de PCR se aplica en un gel de agarosa al 1 % para su análisis.

El fragmento específico que resulta de la reacción en cadena de la polimerasa se liga en el vector de clonación TA pCR2.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se secuencia con los cebadores M13 rev (SEC ID N.º 65) y M13 uni (SEC ID N.º 128) con ayuda del secuenciador de ADN ABI.

Las zonas de extremo 5' y 3' terminales de la secuencia génica codificante se determinan con ayuda del procedimiento RACE (*rapid amplification of cDNA ends*, amplificación rápida de extremos de ADNc). Basándose en la secuencia de ácido nucleico del fragmento específico se construyen oligonucleótidos para 3'-RACE y 5'-RACE. Como matriz para la síntesis de la primera cadena de ADNc con ayuda del sistema 3'-RACE (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) sirve ARN total preparado a partir de las células. Sigue una amplificación y una reamplificación del ADNc específico con ayuda de oligonucleótidos 3'-RACE (SEC ID N.º 76; 77; 84; 85). A continuación se aplica la mezcla de reacción para su análisis en un gel de agarosa al 1 %. El fragmento específico, que lleva la información de secuencia flanqueante en 3' ausente, se liga de manera aislada en un vector de clonación TA pCR2.1 y se secuencia.

Las secuencias codificantes y no codificantes en extremo 5' terminal se determinan con ayuda del sistema 5'-RACE (Invitrogen). Para ello se acumula con ayuda de oligo dT-celulosa (NEB, Beverly, EE.UU.) ARNm a partir del ARN total obtenido previamente y se aplica en la síntesis de la primera cadena de ADNc con los oligonucleótidos específicos del gen (SEC ID N.º 70; 71; 78; 79; 86; 87). La amplificación y reamplificación posteriores del ADNc específico da como resultado un fragmento que se liga para el análisis en un vector de clonación TA pCR2.1 (Invitrogen). El plásmido que contiene el fragmento se analiza con ayuda de un secuenciador de ADN ABI. Por consiguiente se obtiene la información de secuencia ausente sobre el extremo en 5' del gen.

Basándose en la secuencia que codifica el gen de longitud completa se construyen cebadores específicos para una clonación posterior de este segmento de ADN en un sistema de expresión adecuado. Para ello se modifican por ejemplo el cebador en 5' con una secuencia de reconocimiento para Nde I, o con una secuencia de reconocimiento para Sph I, o para BamHI y cebador en 3' con una secuencia de reconocimiento para Hind III (SEC ID N.º 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96).

El ADN cromosómico sirve como matriz en la siguiente PCR. El segmento de ADN que codifica la respectiva

oxidorreductasa se amplifica con ayuda de polimerasa *Platinum pfx* (Invitrogen). El producto de PCR resultante se trata tras la purificación a través de un gel agarosa al 1 % con correspondientes ADN endonucleasas y se liga en la estructura principal del vector pET21a (Novagen, Madison, EE.UU.), o la estructura principal del vector pQE70 (Qiagen, Hilden, Alemania) tratada con las mismas endonucleasas.

- 5 El constructo de expresión producido se lleva a la secuenciación en cepa de expresión BL21 Star (Invitrogen), o RB791 (*E. coli* genetic stock, Yale, EE.UU.).

Ejemplo 5:

Estrategia de clonación general de una oxidorreductasa enantioselectiva aislada de bacterias

10 Se extrae ADN cromosómico de acuerdo con el procedimiento descrito en "Molecular cloning" de Manniatis & Sambrook. El ácido nucleico resultante sirve como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores degenerados. A este respecto se derivan cebadores en 5' de la secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º 104; 112) y los cebadores en 3' de la secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º 105; 113) con inclusión del código genético específico para el organismo (SEC ID N.º 106; 107; 114; 115).

15 La amplificación se realiza en tampón de PCR [Tris-HCl 67 mM (pH 8,3), (NH₄)₂SO₄ 16 mM, MgCl₂ 115 mM, Tween 20 al 0,01 %], mezcla de desoxi-nucleotidotrifosfato (dNTPs) 0,2 mM, 40 pmol por cebador y 2,5 U de polimerasa BioTherm Star (Genecraft, Lüdingshausen, Alemania)]. Tras una activación de la polimerasa BioTherm Star (8 min 95 °C) y 45-50 ciclos posteriores de una PCR Touch-Down se enfría la reacción hasta 4 °C y toda la mezcla de reacción de PCR se aplica en un gel de agarosa al 1 % para su análisis.

20 El fragmento específico que resulta de la reacción en cadena de la polimerasa se liga en el vector de clonación TA pCR2.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y se secuencia con los cebadores M13 rev (SEC ID N.º 65) y M13 uni (SEC ID N.º 128) con ayuda del secuenciador de ADN ABI.

25 Las zonas flanqueantes en 5' y 3' de la secuencia génica codificante se determinan con ayuda del procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR). Basándose en la secuencia de ácido nucleico del fragmento interno específico se construyen oligonucleótidos de SEC ID N.º 100; 101; 102; 103; 108; 109; 110; 111; 116; 117; 118; 119. El ADN genómico se digiere con ayuda de una endonucleasa de restricción y se usa en una religación, de modo que circularizan segmentos de ADN más pequeños. Esta mezcla de religación se usa entonces como matriz para una iPCR y cebadores de SEC ID N.º 100; 102; 108; 110; 116; 118. La señal de PCR se refuerza mediante PCR anidada posterior con cebadores de SEC ID N.º 101; 103; 109; 109; 111; 117; 119. El fragmento específico resultante se liga tras la elución del gel de agarosa al 1 % en el vector pCR2.1 (Invitrogen).

30 Por consiguiente, el análisis de secuenciación del vector pCR2.1 que contiene el fragmento proporciona la información de secuencia ausente sobre zonas codificantes en 3' y 5' del gen de alcoholdehidrogenasa / reductasa.

Proteína	Leuconostoc carnosum
Péptidos secuenciados	NIEETTYEDWK(SEC ID N.º 97)
Cebador para PCR Touch-Down	GACAGAWMGWTTNAARGGW AARGTHGC (SEC ID N.º 98) GCBGTRTAWCCNCCRTCDAC DACRAAYTC (SEC ID N.º 99)
Cebador para iPCR	CTAAGCCAATACCAAGTGTA CCA (SEC ID N.º 100) GAACAAATCGTGCTACTGATT CATCAC (SEC ID N.º 101) GAAGAAGCCCAATCACAAAG AACTC (SEC ID N.º 102) GGCAGTCTATTTAGCTAGTGA AG (SEC ID N.º 103)

35 Basándose en la secuencia que codifica el gen de longitud completa (SEC ID N.º 12) se construyen cebadores específicos para una clonación posterior de este segmento de ADN en un sistema de expresión adecuado. A este respecto se modifican cebador en 5' con una secuencia de reconocimiento para Nde I, o con una secuencia de reconocimiento para Sph I, o para BamHI y cebador en 3' con una secuencia de reconocimiento para Hind III (SEC ID N.º 120; 121; 122; 123; 124; 125; 126; 127).

40 La amplificación del ADN de longitud completa que codifica la proteína a partir del ADN genómico con restricción y ligación posterior en el vector de expresión se realiza tal como se ha descrito en el ejemplo 3. La cepa de expresión BL21Star (Invitrogen), o RB791 (*E. coli* genetic stock, Yale, EE.UU.) se transforma con el constructo de expresión producido.

Ejemplo 6:*Expresión de alcoholdehidrogenasas / reductasas recombinantes en E. coli*

Las cepas de *Escherichia coli* transformadas con el constructo de expresión BL21 Star (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), o RB791 (*E. coli* genetic stock, Yale, EE.UU.) se cultivaron en 200 ml de medio LB (1 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl) con ampicilina (50 µg / ml), o carbenicilina (50 µg / ml), hasta que se consiguió una densidad óptica medida a 550 nm de 0,5. La expresión de proteína recombinante se indujo mediante adición de isopropiltiogalactósido (IPTG) en una concentración de 0,1 mM. Tras inducción durante 8 horas, o tras inducción durante 16 horas a 25 °C y 220 rpm se recogieron las células y se congelaron a -20 °C. Para la prueba de actividad se mezclaron 10 mg de células con 500 µl de tampón TEA 100 mM pH 7,0 y 500 µl de perlas de vidrio y se trataron durante 10 min por medio de un molino de bolas. El lisado obtenido se usó entonces de manera diluida para las mediciones correspondientes. La prueba de actividad se compone tal como sigue: 870 µl de tampón TEA 100 mM pH 7,0, 160 µg de NAD(P)H, 10 µl de lisado celular diluido. La reacción se inició con la adición de 100 µl de una disolución de sustrato 100 mM a la mezcla de reacción.

	vector de expresión	cepa de expresión	sustrato	Actividad U / g
SEC ID N.º 4	pET21a	BL21 Star	CLAE	8300 U/g

Ejemplo 7:*Caracterización de las oxidorreductasas recombinantes*7a: grado óptimo de pH

Se prepararon los tampones mencionados en la tabla 4. La concentración de los respectivos componentes de tampón ascendía respectivamente a 50 mM.

Tabla 4

Valor de pH	Sistema tampón	Valor de pH	Sistema tampón
4	acetato de Na/ácido acético	7,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
4,5	acetato de Na/ácido acético	8	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
5	acetato de Na/ácido acético	8,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄
5,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	9	Glicina/NaOH
6	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	9,5	Glicina/NaOH
6,5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	10	Glicina/NaOH
7	KH ₂ PO ₄ /K ₂ PO ₄	11	Glicina/NaOH

Reducción del grado de óptimo de pH de la mezcla de reacción de medición (30 °C):

870 µl de los sistemas tampón mencionados respectivamente en la tabla 3
 20 µl NAD(P)H 10 mM
 10 µl enzima diluida

Se incubó durante aproximadamente de 2 a 3 min, después se realizó la adición de

100 µl de disolución de sustrato (100 mM)

Como sustrato se usaron, dependiendo de la oxidorreductasa, 2-butanona o 2-octanona. La reacción se siguió durante 1 min a 340 nm. Para la determinación del grado óptimo de pH se determinó la reacción enzimática en el respectivo tampón mencionado en la tabla 4. Para la determinación del grado óptimo de pH para la reacción de oxidación se usó como cofactor NAD(P) y como sustrato 2-propanol o 2-octanol.

En la tabla 5 están agrupados los resultados para las oxidorreductasas de acuerdo con la invención.

Tabla 5:

N.º de DSMZ	microorganismo	grado óptimo de pH de reducción	grado óptimo de pH de oxidación
5576	<i>Leuconostoc carnosum</i>	5,0-6	6,5-9,5

7b: estabilidad frente a pH

5 La determinación de la actividad de las oxidorreductasas recombinantes se sometió a estudio mediante almacenamiento en los sistemas tampón mencionados en la tabla 4. Para ello se fijaron los distintos tampones (50 mM) en el intervalo de pH de 4 a 11 y las oxidorreductasas preparadas de acuerdo con el ejemplo 4 se diluyeron con esto. Tras incubación durante 30, 60 y 120 min se extrajeron de la mezcla de reacción 10 µl y se usaron en la prueba de la actividad de acuerdo con el ejemplo 1.

10 El valor de partida es a este respecto el valor de medición, que se obtuvo directamente tras la dilución (1:20) de la enzima en tampón fosfato de potasio 50 mM pH = 7,0. Este valor correspondía en las condiciones predeterminadas a una modificación de la extinción de aproximadamente 0,70 /min y se estableció como el valor del 100 % y todos los valores de medición siguientes se establecieron con respecto a este valor en proporción.

En la tabla 6 están agrupados los intervalos de pH para las oxidorreductasas de acuerdo con la invención, presentando la enzima, con incubación durante 120 min, no menos del 50 % de la actividad de partida.

Tabla 6:

N.º de DSMZ	Microorganismo	Estabilidad frente a intervalo de pH
5576	<i>Leuconostoc carnosum</i>	4,5-9,5

15

7c: grado óptimo de temperatura

Para la determinación de la temperatura de prueba óptima se midió la actividad enzimática para las oxidorreductasas de acuerdo con la invención en el intervalo de temperatura de 15 °C a 70 °C en la mezcla de reacción de medición patrón.

20 Los grados óptimos de temperatura determinados están resumidos en la tabla 7:

Tabla 7

N.º de DSMZ	Microorganismo	Grado óptimo de T
5576	<i>Leuconostoc carnosum</i>	60 °C

7d: estabilidad frente a la temperatura

25 De manera análoga tal como se ha descrito en el ejemplo 5c se determinó la estabilidad frente a la temperatura para el intervalo de 15 °C a 70 °C. Para ello se incubó respectivamente una dilución de las oxidorreductasas de acuerdo con la invención durante 60 min y 180 min a la respectiva temperatura y a continuación a 30 °C se midió con la mezcla de reacción de prueba anterior. En la tabla 8 están agrupados los intervalos de temperatura para las oxidorreductasas de acuerdo con la invención, presentando las enzimas con incubación durante 120 min no menos del 50 % de la actividad de partida.

30

Tabla 8

N.º de DSMZ	Microorganismo	Estabilidad frente a la temperatura
5576	<i>Leuconostoc carnosum</i>	15-35 °C

7e: espectro de sustrato

35 El espectro de sustrato de las oxidorreductasas de acuerdo con la invención se determinó mediante medición de la actividad enzimática para la reducción y oxidación con una serie de cetonas y alcoholes. Para ello se usó la mezcla de reacción de medición patrón de acuerdo con el ejemplo 1 con distintos sustratos.

La actividad con acetoacetato de metilo se fijó para todas las enzimas igual al 100 % y todos los otros sustratos se fijaron en proporción con respecto a ésta.

Tabla 9: reducción de los espectros de sustrato

Sustrato	<i>Leuconostoc carnosum</i> SEC ID N.º 4
1-Fenil-2-propanona	13 %
Cloruro de fenacilo	37 %
Acetofenona	28 %
Acetonaftona	n.d.
Butirofenona	0 %
2-Octanona	28 %
3-Octanona	18 %
2-Butanona	36 %
2-Oxovaleriato de etilo	25 %
Ácido etil-2-oxo-4-fenilbutírico	10 %
Piruvato de etilo	122 %
Fenilglioxilato de etilo	4 %
4-Cloroacetoacetato de etilo	80 %
Acetoacetato de metilo	100 %
3-Oxovaleriato de etilo	30 %
Acetona	28 %

5 7f: estabilidad en el sistema de dos fases acuoso/orgánico

La estabilidad de las oxidorreductasas novedosas en sistemas de dos fases acuoso/orgánicos se sometió a estudio diluyendo los lisados obtenidos en el ejemplo 6 (de expresión recombinante) en un tampón acuoso adecuado para la respectiva oxidorreductasa (aproximadamente 10 unidades/ml de tampón). A la oxidorreductasa diluida en el tampón se añadió entonces el mismo volumen de un disolvente orgánico, no miscible con agua y la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente con mezclado constante (termomezclador con 170 rpm). Tras incubación durante 24 h se extrajeron respectivamente de la fase acuosa 10 µl y se usaron para la determinación de la actividad enzimática en la mezcla de reacción de prueba patrón (tampón fosfato de potasio (KPP) 100 mM, pH = 7,0, NAD(P)H 0,2 mM, sustrato 10 mM). También en este caso se fijó el valor de partida directamente tras dilución en el tampón igual al 100 % y todos los otros valores se fijaron en proporción con respecto a éste.

15 Tabla 9: actividad enzimática tras incubación durante 24 h en el sistema de dos fases acuoso-orgánico

Sistema	Tampón	Acetato de butilo	Dietiléter	MTBE	Diisopropiléter	Heptano	Ciclohexano
<i>Leuconostoc carnosum</i> SEC ID N.º 4	100 %	80-100 %	80-100 %	80-100 %	80-100 %	80-100 %	80-100 %
MTBE = metil-terc-butiléter							

Tabla 10: oxidación de espectros de sustrato

Sustrato	Leuconostoc carnosum SEC ID N.º 4
S-2-Octanol	0 %
R-2-Octanol	100 %
S-2-Butanol	56 %
R-2-Butanol	178 %
S-Fenil-2-propanol	0 %
R-Fenil-2-propanol	6 %
(S)-4-cloro-3-hidroxi-butirato de etilo	0 %
(R)-4-cloro-3-hidroxi-butirato de etilo	0 %
2-Propanol	67 %
Ciclohexanol	n.d.

Ejemplo 8: reacciones preparativasSíntesis de ácido etil-(S)-4-cloro-3-hidroxi-butírico con oxidorreductasa de *Leuconostoc carnosum*

- 5 Para la reacción se incubó una mezcla de 8 ml de tampón (TEA 100 mM, pH = 7, MgCl₂ 1 mM), 24 ml de isopropanol, 8 ml de 4-cloroacetoacetato de etilo, 2 mg de NADP y 6,7 kU (= 6 ml) de oxidorreductasa recombinante de *Leuconostoc carnosum* DSMZ 5576 durante 24 h a temperatura ambiente con mezclado constante. Tras 24 h se redujo más del 99 % del 4-cloroacetoacetato de etilo usado para dar ácido etil-(S)-4-cloro-3-hidroxi-butírico. La mezcla de reacción se procesó eliminando en primer lugar el 2-propanol por medio de un rotavapor. La mezcla de reacción se extrajo a continuación con acetato de etilo, se eliminó el disolvente por medio de un rotavapor y se obtuvo el producto bruto. El producto bruto obtenido de esta manera (S)-4-cloro-3-hidroxi-butirato de etilo presentaba un exceso enantiomérico de > 99,5 %.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> IEP GmbH
- 15 <120> Oxidorreductasas para la reducción estereoselectiva de compuestos cetónicos
- <130> I 11029B
- <140> A 1261/2005
- <141> 27-07-2005
- <160> 130
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 282
- <212> PRT
- <213> *Rhodotorula mucilaginosa*
- 25 <400> 1

ES 2 524 167 T3

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

Gly Ala Ser Gly Ile Gly Leu Glu Ser Ala Leu Val Phe Ala Gly Glu
 20 25 30

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

Ala Val Glu Ile Ile Lys Thr Gln Val Gln Asp Ala Pro Lys Ala Ile
 50 55 60

Ala Val Lys Cys Asp Val Ser Lys Glu Asp Asp Ile Lys Asn Leu Val
 65 70 75 80

Ala Thr Ala Val Glu Thr Phe Gly Arg Leu Asp Val Met Phe Asn Asn
 85 90 95

Ala Gly Ile Met His Pro Glu Asp Asp Asn Ala Leu Asn Thr Ser Glu
 100 105 110

Arg Ile Trp Asp Leu Thr Met Asn Ile Asn Val Lys Gly Val Trp Trp
 115 120 125

Gly Cys Lys Tyr Ala Ile Asp Ala Met Arg Lys Asn Pro Gly Gly Ser
 130 135 140

Lys Gly Ser Ile Ile Asn Thr Ala Ser Phe Val Ala Ile Leu Gly Ala
 145 150 155 160

Ala Thr Pro Gln Ile Ala Tyr Thr Ala Ser Lys Gly Ala Val Leu Ala
 165 170 175

ES 2 524 167 T3

Met Thr Arg Glu Leu Ala Met Val His Ala Arg Glu Gly Ile Arg Ile
 180 185 190

Asn Ser Leu Cys Pro Gly Pro Leu Lys Thr Glu Leu Leu Met Lys Phe
 195 200 205

Leu Asp Thr Pro Glu Lys Lys Glu Arg Arg Met Val His Ile Pro Met
 210 215 220

Gly Arg Phe Gly Glu Ala Val Glu Gln Ala Arg Ala Ala Ala Phe Leu
 225 230 235 240

Ala Ser Asp Asp Ser Ser Phe Ile Thr Gly Thr Asp Phe Lys Val Asp
 245 250 255

Gly Gly Ile Ser Ser Cys Tyr Val Thr Pro Glu Gly Glu Gln Ala Leu
 260 265 270

Ala Ala Pro Ser Asn Leu Ala Pro Lys Ala
 275 280

<210> 2
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> *Pichia farinosa*
 <400> 2

5

Met Ala Tyr Asn Phe Thr Asn Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Ile
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Leu Ala Thr Val Glu Lys Phe Ala Lys Leu Gly Ala
 20 25 30

Lys Val Val Ile Gly Asp Ile Gln Lys Glu Glu Tyr Lys Glu Ala Ala
 35 40 45

Phe Thr Asn Leu Lys Asn Lys Gly Ile Asn Leu Asp Gln Leu Thr Tyr
 50 55 60

Val His Thr Asp Val Thr Ala Asn Ser Ala Asn Glu Asn Leu Leu Lys
 65 70 75 80

Thr Ala Ile Ser Ser Phe Gly Gly Val Asp Phe Val Val Ala Asn Ser
 85 90 95

Gly Ile Ala Lys Asp Gln Arg Ser Glu Glu Met Thr Tyr Glu Asp Phe
 100 105 110

ES 2 524 167 T3

Lys Lys Ile Ile Asp Val Asn Leu Asn Gly Val Phe Ser Leu Asp Lys
 115 120 125

Leu Ala Ile Asp Tyr Trp Leu Lys Asn Lys Lys Lys Gly Ser Ile Val
 130 135 140

Asn Thr Gly Ser Ile Leu Ser Phe Val Gly Thr Pro Gly Leu Ser His
 145 150 155 160

Tyr Cys Ala Ser Lys Gly Gly Val Lys Leu Leu Thr Gln Thr Leu Ala
 165 170 175

Leu Glu Gln Ala Lys Asn Gly Ile Arg Val Asn Cys Ile Asn Pro Gly
 180 185 190

Tyr Ile Arg Thr Pro Leu Leu Glu Phe Leu Pro Lys Asp Lys Tyr Asp
 195 200 205

Ala Leu Val Asp Leu His Pro Met Gly Arg Leu Gly Glu Pro Glu Glu
 210 215 220

Ile Ala Asn Ala Ile Ala Phe Leu Val Ser Asp Glu Ala Ser Phe Ile
 225 230 235 240

Thr Gly Thr Thr Leu Leu Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
 245 250

<210> 3
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> *Pichia stipitis*
 <400> 3

5

Met Ser Ile Pro Ala Thr Gln Tyr Gly Phe Val Phe Thr Lys Lys Asp
 1 5 10 15

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

Gln Val Leu Leu Lys Val Asp Ala Val Gly Leu Cys His Ser Asp Leu
 35 40 45

His Ala Ile Tyr Asp Gly Phe Asp Phe Gly Asp Asn Tyr Val Met Gly
 50 55 60

His Glu Ile Ala Gly Thr Ile Val Lys Lys Gly Ala Met Val Asp Phe
 65 70 75 80

Trp Asp Leu Asn Thr Arg Val Ala Cys Phe Gly Pro Asn Ser Cys Gly
 85 90 95

ES 2 524 167 T3

His Cys Gln Leu Cys Arg Thr Gly Phe Glu Asn Asp Cys Ile Asn Val
 100 105 110
 Val Asn Gly Trp Phe Gly Leu Gly Lys Asn Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr
 115 120 125
 Leu Leu Val Glu Lys Pro Arg Asn Leu Val Ala Ile Pro Asp Asn Val
 130 135 140
 Glu Leu Ser Asp Ala Ala Ala Ile Thr Asp Ala Leu Leu Thr Pro Tyr
 145 150 155 160
 His Ala Met Arg Leu Ala Gly Val Arg Ser Gly Thr Lys Leu Leu Gln
 165 170 175
 Ile Gly Ala Gly Gly Leu Gly Val Asn Gly Ile Gln Ile Ala Lys Ala
 180 185 190
 Phe Gly Ala Gln Val Thr Val Ile Asp Lys Lys Pro Glu Ala Val Asp
 195 200 205
 Val Ala Lys Ser Leu Gly Ala Asp Glu Val Tyr Ser Ala Leu Pro Glu
 210 215 220
 Ser Thr Ser Pro Gly Ser Phe Asp Val Ala Ile Asp Tyr Val Ser Thr
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Phe Asp Thr Cys Gln Lys Tyr Val Arg Ser Lys Gly Asn
 245 250 255
 Ile Val Pro Val Gly Leu Ala Ala Pro Arg Ile Ser Phe Asn Leu Gly
 260 265 270
 Asp Leu Ala Leu Arg Glu Ile Asn Val Leu Gly Ser Phe Trp Gly Thr
 275 280 285
 Ser Ser Asp Leu Lys Glu Cys Phe Asp Leu Val Ser Lys Gly Lys Val
 290 295 300
 Lys Pro Lys Val Thr Val Ala Pro Leu Lys Gln Leu Pro Glu Tyr Ile
 305 310 315 320
 Val Lys Leu Gln Asn Ser Ala Tyr Glu Gly Arg Val Val Phe Lys Pro
 325 330 335

<210> 4
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> *Leuconostoc carnosum*
 <400> 4

5

ES 2 524 167 T3

Met Thr Asp Arg Leu Lys Asn Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Leu Gly Ile Gly Leu Ala Met Ala Gln Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30

Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asn Val Gly Ala Glu Ala Leu
 35 40 45

Lys Thr Ile Gly Asp Glu Ser Val Ala Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60

Ser Asp Glu Lys Gly Trp Ile Asp Leu Phe Glu Asn Thr Ile Lys Trp
 65 70 75 80

Phe Gly His Val Asp Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Val Ala Ile Ala
 85 90 95

Lys Asn Ile Glu Glu Thr Thr Tyr Glu Asp Trp Lys Phe Leu Gln Ser
 100 105 110

Ile Asn Ser Asp Gly Val Phe Leu Gly Thr Lys Tyr Gly Met Gln Tyr
 115 120 125

Met Lys Asn Gln Ala Gly Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140

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

Gly Gly Val Arg Ile Leu Ser Lys Ser Ala Ala Leu His Ala Ala Leu
 165 170 175

Asn Asp Tyr Asn Leu Arg Val Asn Thr Ile His Pro Gly Tyr Ile Lys
 180 185 190

Thr Pro Leu Val Asp Gly Ile Asp Gly Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gln
 195 200 205

Arg Thr Gln Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220

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

Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Leu Ala Gln
 245 250

<210> 5
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium* sp.

ES 2 524 167 T3

<400> 5

Met Lys Ala Leu Gln Tyr Thr Lys Ile Gly Ser His Pro Glu Val Val
1 5 10 15

Glu Ile Glu Lys Pro Ser Pro Gly Pro Gly Gln Val Leu Leu Lys Val
20 25 30

Thr Ala Ala Gly Val Cys His Ser Asp Glu Phe Val Met Ser Leu Ser
35 40 45

Glu Glu Gln Tyr Thr Ala Ala Gly Tyr Pro Leu Pro Leu Thr Leu Gly
50 55 60

His Glu Gly Ala Gly Ile Val Glu Glu Leu Gly Glu Gly Val Glu His
65 70 75 80

Leu Ser Val Gly Asp Ala Val Ala Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly
85 90 95

Arg Cys Arg Asn Cys Ala Gln Gly Lys Glu Asn Tyr Cys Thr Asn Ala
100 105 110

Gln Ala Glu Gly Ile Met Pro Pro Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Met
115 120 125

Ala Glu Tyr Met Ile Val Asp Ser Ala Arg His Leu Val Pro Leu Gly
130 135 140

Asp Leu Asp Pro Val Gln Asn Val Ser Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr
145 150 155 160

Pro Tyr His Ala Val Lys Thr Ser Leu Pro Lys Leu Gly Ala Gly Thr
165 170 175

Thr Ala Val Val Ile Gly Thr Gly Gly Leu Gly His Val Ala Ile Gln
180 185 190

Ile Leu Arg Ala Val Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu Asp Val Asn
195 200 205

Asp Glu Lys Leu Ala Leu Ala Lys Glu Val Gly Ala His His Thr Val
210 215 220

ES 2 524 167 T3

Met Ser Asp Gly Gly Ala Val Asp Ala Ile Arg Arg Leu Thr Asp Gly
 225 230 235 240

Leu Gly Ala Asn Ala Val Phe Asp Phe Val Gly Ala Asp Pro Thr Ile
 245 250 255

Ala Thr Ala Ile Gly Ala Ala Ala Leu Asp Ala Asp Ile Thr Ile Val
 260 265 270

Gly Ile Gly Gly Gly Thr Ala His Val Gly Phe Gly Thr Val Ala Tyr
 275 280 285

Asp Ala Ala Leu Arg Ile Pro Tyr Trp Gly Ser Arg Ser Glu Leu Ile
 290 295 300

Glu Val Leu Asp Leu Ala Arg Ser Gly Gln Val Gly Val Glu Ile Gln
 305 310 315 320

Arg Tyr Ser Leu Asp Asp Gly Pro Lys Ala Tyr Glu Ala Leu Ala Ala
 325 330 335

Gly Thr Val Arg Gly Arg Ala Val Ile Val Pro
 340 345

5

- <210> 6
- <211> 347
- <212> PRT
- <213> *Gordona rubropertinctus*
- <400> 6

ES 2 524 167 T3

Met Lys Ala Ile Gln Ile Ile Gln Pro Gly Lys Pro Pro Glu Leu Arg
 1 5 10 15

Glu Val Glu Lys Pro Thr Pro Arg Pro Gly Gln Val Leu Leu Lys Val
 20 25 30

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

Glu Glu Gly Phe Pro Tyr Pro Leu Pro Met Thr Leu Gly His Glu Gly
 50 55 60

Ala Gly Val Val Ala Glu Val Gly Thr Gly Val Thr Gly Ile Ser Glu
 65 70 75 80

Gly Thr Ser Val Ala Val Tyr Gly Ala Trp Gly Cys Gly Val Cys His
 85 90 95

Phe Cys Ala Arg Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Ser Arg Ala Gly Glu Leu
 100 105 110

ES 2 524 167 T3

Gly Ile Thr Pro Pro Gly Leu Gly Asn Pro Gly Ala Met Ala Glu Tyr
 115 120 125

Leu Leu Val Asp Asp Ala Arg His Leu Val Pro Leu Gly Asp Leu Asp
 130 135 140

Pro Val Ala Ala Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His
 145 150 155 160

Ala Ile Lys Pro Ser Leu Pro Lys Leu Val Gly Gly Thr Thr Ala Val
 165 170 175

Val Ile Gly Ala Gly Gly Leu Gly His Val Gly Ile Gln Leu Leu Arg
 180 185 190

His Leu Thr Pro Ser Arg Val Ile Ala Leu Asp Val Ser Asp Asp Lys
 195 200 205

Leu Ala Phe Ala Arg Glu Val Gly Ala His Glu Val Val Leu Ser Asp
 210 215 220

Ala Asp Ala Val Ala Asn Val Arg Lys Ile Thr Gly Asn Asp Gly Ala
 225 230 235 240

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

Met Gly Val Val Gly Thr Met Gly Asp Val Val Ile Val Gly Ile Gly
 260 265 270

Asp Met Val Ala Thr Ala Lys Val Gly Phe Phe Thr Gln Pro Tyr Glu
 275 280 285

Val Ser Val Arg Ala Pro Tyr Trp Gly Ala Arg Asp Glu Leu Ile Glu
 290 295 300

Val Leu Asp Leu Ala Arg Asp Gly Val Leu Glu Val Ala Val Glu Arg
 305 310 315 320

Phe Ser Leu Asp Asp Gly Val Glu Ala Tyr Arg Arg Leu Ala Ala Asn
 325 330 335

Asp Leu Arg Gly Arg Ala Val Val Val Pro Asp
 340 345

<210> 7
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> *Pichia trehalophila*
 <400> 7

5

ES 2 524 167 T3

Met Cys Thr Ser Gln Ser Gly Tyr Val Tyr His Ser Gly Arg Pro Leu
1 5 10 15

Leu Thr Lys Glu Glu Leu Ser Ile Pro Glu Pro Lys Gly Ser Glu Ile
20 25 30

Val Leu Lys Val Arg Ala Ala Gly Leu Cys Ser Ser Asp Val His Val
35 40 45

Leu Asn Ser Ser Leu Pro Leu Thr Tyr Pro Asn Ser Phe Ala Met Gly
50 55 60

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

Asp Lys Tyr Ser Ile Gly Asp Gly Tyr Ala Val His Gly Leu Asn Ser
85 90 95

Cys Gly Asp Cys Ser Phe Cys Lys Val Gly Ser Gln Asn Leu Cys Thr
100 105 110

Asp Asn Asn Ser Thr Trp Tyr Gly Leu Gly Lys Asn Gly Gly Tyr Glu
115 120 125

Gln Tyr Val Leu Val Lys Ser Val His Asp Leu Ile Lys Ile Pro Glu
130 135 140

Gly Val Ser Phe Ser Glu Ala Ala Val Ala Ser Asp Ala Val Leu Thr
145 150 155 160

Pro Tyr His Ala Ile Ser Thr Cys Asn Leu Lys Ala Thr Ser Lys Val
165 170 175

Leu Val Ile Gly Cys Gly Gly Leu Gly Thr Cys Ala Leu Gln Ile Ile
180 185 190

Lys Leu Tyr Ser Ala Tyr Val Val Cys Val Asp Ser Lys Ala Glu Leu
195 200 205

Glu Glu Leu Ala Lys Glu Tyr Gly Ala Asp Glu Phe Tyr Thr Asp Leu
210 215 220

Ser Lys Ser Ser Val Pro Lys Met Ser Phe Asp Cys Val Phe Asp Phe
225 230 235 240

ES 2 524 167 T3

Val Ala Ile Gln Pro Thr Phe Thr Ile Ser Gln Asn Tyr Val Lys Ser
245 250 255

Gly Gly Ile Ile Lys Pro Val Gly Leu Gly Ala Pro Ser Leu Thr Phe
260 265 270

Ser Leu Leu Asp Leu Gly Cys Arg Asp Val Lys Ile Ile Gly Ser Phe
275 280 285

Trp Gly Thr Gln Ala Glu Gln Lys Asp Cys Met Glu Leu Ile Gln Arg
290 295 300

Gly Leu Val Lys Pro Leu Ile Thr Ser Phe Thr Phe Asp Glu Phe Pro
305 310 315 320

Gln Ala Tyr Glu Leu Leu Ser Thr Gly Lys Ser Lys Gly Arg Leu Val
325 330 335

Ile Ser Gln

- <210> 8
- <211> 254
- <212> PRT
- <213> *Candida nemodendra*
- <400> 8

5

ES 2 524 167 T3

Met Gly Tyr Asn Leu Ile Asn Lys Val Ala Val Val Thr Gly Gly Cys
1 5 10 15

Ser Gly Ile Gly Leu Ala Val Thr Lys Lys Tyr Leu Glu Leu Gly Ala
20 25 30

Lys Val Val Ile Gly Asp Val Ser Thr Lys Glu Lys Phe Asn Glu Val
35 40 45

Ser Ser Glu Leu Lys Val Ala Gly Leu Asn Val Asn Asn Leu Asn Phe
50 55 60

Val Ser Ala Asp Ser Ser Lys Glu Asp Asp Asn Lys Arg Leu Val Asp
65 70 75 80

Glu Ala Ile Lys Asn Phe Gly Gly Leu Asp Ile Val Cys Ala Asn Ala
85 90 95

Gly Ile Gly Ser Met Ile Pro Phe His Glu Met Thr Phe Glu Ala Trp
100 105 110

Arg Lys Leu Leu Ala Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Leu Leu Asp Arg
115 120 125

Phe Ala Ile Asp Tyr Trp Leu Lys Asn Ser Lys Pro Gly Val Ile Val
130 135 140

Asn Met Gly Ser Ile His Ser Phe Val Ala Ala Pro Gly Leu Ala His
145 150 155 160

Tyr Ser Ala Ser Lys Gly Gly Val Lys Leu Leu Thr Glu Ala Leu Ala
165 170 175

Leu Glu Tyr Ser Ser Lys Gly Ile Arg Val Asn Ser Val Asn Pro Ala
180 185 190

Tyr Ile Gln Thr Ser Leu Leu Glu Phe Leu Pro Glu Asp Lys Met Asn
195 200 205

Ala Leu Lys Ala Val His Pro Ile Gly Arg Leu Gly Lys Pro Glu Glu
210 215 220

Val Ala Asn Ala Val Ala Phe Leu Ser Ser Asp Glu Ala Thr Phe Ile
225 230 235 240

His Gly Thr Ser Leu Leu Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
245 250

ES 2 524 167 T3

<210> 9
 <211> 849
 <212> ADN
 <213> *Rhodotorula mucilaginosa*

5 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(849)
 <400> 9

```

atgcctgcca ctctccgect cgacaagaag gttgccatca tcaccggagg agcatccggg      60
atcggcctcg agtcggccct cgtctttgcc ggagaaggcg cccacgtcgt cgtcgccgac      120
atcaacgtcg aagctgccaa ccgcgccgctc gagatcatca agaccaggt tcaggacgcc      180
ccaaggcga tcgccgtcaa gtgcgacgtc tccaaggagg acgacatcaa gaacctcgtc      240
gcgactgctg tcgaaacttt tggcaggctc gatgtcatgt tcaacaacgc cggcatcatg      300
caccgccgagg acgacaatgc gctcaacacc tcggagcgca tctgggacct gaccatgaac      360
attaacgtca agggagtctg gtggggctgc aagtaocgga tcgacgccat gcgcaagaac      420
ccgggcggca gcaaggggag catcatcaac acggcttcgt tcgtcgccat cctcggagcg      480
gcgacgcctc agatcgcata caccgcttcg aagggtgccg tcttgccat gactcgcgag      540
ctcgccatgg ttcacgcgcg cgaagggatc cgaatcaact cgctctgcc cggtcgcgctc      600

aagacagagc tcctgatgaa gttcctcgac acgccggaga agaaggagcg ccggatggtg      660
cacatcccga tgggtcgctt cggtgaggcg gttgagcagg ctcgcgcggc cgcgttcctc      720
gctagcgacg acagcagctt catcaccgga actgacttca aggtcgacgg cggtatcagc      780
tcgtgctacg tcacgccgga gggcgagcag gccctcgcg cgccgtccaa cttggctccc      840
aaggcgtag                                     849
  
```

10 <210> 10
 <211> 765
 <212> ADN
 <213> *Pichia farinosa*

15 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(765)
 <400> 10

ES 2 524 167 T3

```

atggcctata acttcaactaa caaagtcgct atcattacag gaggaatttc cggattgggt      60
ttagctacag tcgagaaatt cgctaagttg ggtgctaaag tcgtcatagg agacattcaa      120
aaagaagaat ataaagaagc tgcttttaca aatttgaaga acaaaggaat taatcttgat      180
caattgacgt atgtccacac ggacgtcacc gcaaattcgg caaatgagaa ccttttaaag      240
actgctataa gctcctttgg tggcgttgac tttgtcgtag caaactctgg aatagcaaaa      300
gatcaacggt ctgaagagat gacttatgaa gatttcaaga aaataatcga tgtcaactta      360
aacggtgttt tttccttgga taagctagca attgattatt ggttaaaaaa taagaaaaag      420
ggctctattg tcaacacggg atctattctt tcatttgttg gtacccccgg gttatcacat      480
tattgtgcgt caaaggggtg agtgaagtta ttgacacaaa ccttggctct cgaacaggct      540
aagaatggca taagagtgaa ttgtataaat cctgggtata taagaacacc tttattagag      600
tttttgcta aggacaagta tgacgcttta gtggatcttc atccaatggg tagattaggt      660
gaacctgagg aaattgcca tgccattgca ttcctcgtct ctgacgaagc gagcttcata      720
actggtacta ctctactcgt tgatggagga tatacagccc agtaa                          765

```

5 <210> 11
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> *Pichia stipitis*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1011)

10 <400> 11

```

atgtctattc ctgctacaca atatggtttc gtcttcacca aaaaggacgg tttaaaaatt      60
cgcgagaaca tgctgttct cgaacccaag gctgaccaag tcttgcttaa agtcgacgca      120
gtaggattgt gtcactctga ccttcatgcc atctacgacg gcttcgactt tggtgacaat      180

```

ES 2 524 167 T3

```

tacgttatgg gccacgaaat cgccggcacc attgtcaaga agggagccat ggtcgacttt 240
tgggacctaa acacccgtgt tgcctgtttt ggtccaaact cctgtggcca ttgtcaactt 300
tgtcgtactg gttttgaaaa tgattgtatc aatgtcgtca acggctgggt tggattaggt 360
aaaaacggag gctaccagca atatttgttg gttgaaaagc ctcgtaattt ggttgctatt 420
ccagacaacg tcgagctgtc cgatgcagct gccattaccg acgctttggt gaccccctac 480
catgccatga gattagctgg tgtagatca ggcacgaagc tcttgcaaat tgggtgctgga 540
ggattgggag taaatggtat tcagattgct aaagcatttg gagctcaagt cactgttatc 600
gacaaaaagc ccgaggctgt agacgtcgtc aagagcctag gcgcagatga agtatattct 660
gcacttcctg aatcaaccag tccgggaagt ttcgatgttg ctatcgacta cgtttctact 720
caaggcactt tcgacacttg tcaaaagtac gtcagatcta agggtaatat tgttcccgtt 780
ggattggccg ctccaagaat ttcgtttaac ttgggagatt tggcccttag agaaattaat 840
gtccttggtg gcttctgggg tacatcatcc gacttgaagg aatgtttcga tttggtcagc 900
aagggcaaag tcaaacctaa ggtgactgtt gctccattga agcaattgcc tgaatacatt 960
gtcaagttac agaattcggc ctacgaaggt agagtcgtgt tcaagccatg a 1011

```

```

5 <210> 12
  <211> 759
  <212> ADN
  <213> Leuconostoc carnosum

  <220>
  <221> gen
  <222> (1)..(759)

10 <400> 12

```

ES 2 524 167 T3

```

atgacagatc ggtaaagaa taaagttgct attatcactg gtggtacact tggattggc      60
ttagcaatgg ctcaaaagtt tgtagaagaa ggcgctaaag ttgtcattac tgggcgtcgt    120
gctaattgtg gtgcagaagc gctaaagaca attggtgatg aatcagtagc acgatttgtt    180
caacatgatg catctgatga aaaaggctgg attgatttat ttgaaaatac gattaaatgg    240
tttggatcatg tcgatacggg tgtcaataat gccggtggtg caattgctaa aaacattgaa    300
gagacaacat atgaagactg gaaatTTTTG caatcaatca actctgatgg cgTTTTctta    360
ggaactaagt acggtatgca atatatgaaa aaccaagctg gtggtgcctc aattattaat    420
atgtcatcta ttgaaggatt tgttgggtgat cctaacttag ctgcttataa tcattcaaaa    480
ggtggtgtcc gcattttgag taagtcagct gctactacatg cagcattgaa tgactataac    540
ttacgtgtca acacgattca cccaggatat atcaaaacac cattggttga tggattgat     600
ggtgcagaag aagcccaatc acaaagaact caaacaccta tgggacatat tggatgaacct    660
aatgatattg catatatggc agtctattta gctagtgaag aatcaaagtt tgcaacaggt    720

gctgaattcg ttgttgatgg cggctatttg gcacaataa                               759

```

- <210> 13
- <211> 1044
- 5 <212> ADN
- <213> *Microbacterium* sp.
- <220>
- <221> gen
- <222> (1)..(1044)
- 10 <400> 13

ES 2 524 167 T3

```

atgaaggcac tccagtacac gaagatcgga tcccaccccg aagtcgtcga gatcgagaag      60
ccctcgccgg gtcccgggca ggtactgctc aaagtcaccg ccgccggcgt ctgccactcg      120
gacgagttcg tgatgagcct cagcgaggag cagtacaccg ctgccggcta ccccctgccg      180
ctcaccctcg ggcacgaagg cgccggcatc gtcgaggagc tcggcgaagg tgtcgagcac      240
ctgagcgtcg gagacgccgt cgccgtctac ggcccctggg gttgcccggc ctgccgcaac      300
tgccgcgagg gcaaggagaa ctactgcacg aacgcccagg cggaggggat catgcctccc      360
ggtctcgggg ctcccggctc aatggcggag tacatgatcg tcgacagcgc gcgacacctc      420
gttccgctcg gcgacctcga ccccgtgcag aacgtttcct tgacggatgc cggcctgacc      480
ccgtaccacg cggccaagac gtcacttccg aagctgggcg ccggaacgac ggcggtcgtg      540
atcggcaccg ggggtctcgg acacgtcgcg attcagatcc tcggggcggg gtcggcccgcg      600
accgtgatcg cgttgacgt caacgacgag aaactcgcgc tggccaagga ggtcggcgcc      660
catcacaccg tcatgagcga cggcggcgcc gtcgacgcga ttccgccggct caccgacggt      720
ctgggcgcga acgccgtctt cgacttcgct ggtgcccggc cgacgatcgc gacggcgata      780
ggagcagccg cgctcgacgc agacatcacg atcgtcggca tcggcggcgg aacggctcac      840
gtcggtttcg gcaccgtcgc ttatgacgcg gcgcttcgca tcccgtattg gggtcgcgc      900
agcgaactga tcgaggtgct cgacctcgcg cgctcagggc aggtgggagt cgagatccag      960
cgctactcac tcgacgacgg cccgaaggcg tacgaggcgc tcgcccgggg cacggctccgc     1020
ggccgcgccg tcatcgtccc ctga                                             1044

```

<210> 14
 <211> 1044
 <212> ADN
 <213> *Gordona rubropertinctus*

5

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1044)
 <400> 14

```

atgaaggcca ttcagatcat ccagccgggc aaaccgcccg agctgcgcga ggtcgagaaa      60
cccacgccgc gtcccgggca ggtggtgctg aaggtgacgg cagccggcgc ctgccattcg      120

```

10

ES 2 524 167 T3

gacgacttcg tcctcaacct gcccgaggaa ggattcccct atcccctgcc gatgacgctc 180
 ggccacgaag gggccggcgt ggtcgccgag gtcggtaccg gcgtcaccgg catctccgag 240
 ggcacctcgg tggccgtgta cggagcctgg ggttgcggcg tctgtcaact ctgcgcccgc 300
 ggcctggaga actactgcag ccgagccggc gaactcggca tcaccccacc gggctctcggc 360
 aaccgggcg cgatggccga gtacctgctc gtggacgacg cacggcatct ggtgccgctc 420
 ggtgacctcg acccggtggt tgcagtcca ctcaccgatg ccggcctcac gccctaccac 480
 gcgatcaaac cctcgcttcc gaagctggtc ggcggcacca cggcagtggc catcggagcc 540
 ggtggtctcg ggcattgctg gatccaactg cttcgccacc tgaccccgtc ccgggtgatc 600
 gctctcgacg tgagcgacga caagctcgcg ttcgcgcgcg aggtcggggc tcacgaggtg 660
 gtgctctccg acgccgatgc cgtcgcgaaac gtccgcaaga tcaccggcaa cgatggtgcg 720
 accgccgtct tcgacttctg cgggctgcaa cccacgctcg acatcgcgat gggcgtcgtc 780
 gggaccatgg gtgacgtggt gatcgtgggc atcggtgaca tggtcgccac ggcgaaggtc 840
 ggcttcttca cccagcccta cgaggtgctg gtacgcgcgc cgtactgggg ggcgcgcgac 900
 gaactcatcg aggtgctgga tctcgcacgc gatgggggtt tcgaggtggc ggtcgaacga 960
 ttctcactcg atgacggcgt cgaggcctac cggcgactgg ccgccaatga ccttcgaggg 1020
 cgagcagtcg tgggtgcctga ctga 1044

<210> 15
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Pichia trehalophila*

5

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1020)

<400> 15

atgtgtactt ctcaatctgg ctacgtttat cattctggta gaccactttt aactaaagaa 60
 gaactttcaa ttcccgaacc aaaaggctct gaaattgttc taaaagttcg tgcagctggt 120
 ttatgttcat cagatgttca tgttctaacc agcagtttac cattgactta cccaaacagt 180
 tttgctatgg gtcataaat tgccggtgaa atttataagc ttggtccaaa cgttgacgct 240
 gataaatatt caattggaga tggatatgca gttcatgggt tgaactcctg tgggtgattgt 300
 tccttctgta aggttggtag tcaaaacctg tgtaccgata acaattcaac ttggtacggt 360
 ttaggtaaga atgggtggtta tgaacagtac gttttagtta aaagtgttca tgacttaatt 420
 aaaattccag aaggtggttag tttctcagag gccgcagttg cttcagatgc tgttttaact 480
 ccatatcatg ctatcagcac ctgtaacttg aaggcaactt ccaaagtttt agttattggt 540
 tgtggtgggt taggtacctg tgctttacaa atcatcaaat tgtacagtgc atatgttgtc 600

10

ES 2 524 167 T3

tgtgttgact ccaaagcaga attagaagaa cttgctaaag aatatggcgc tgatgaattc 660
 tacaccgatt tatcaaaatc cagcgttccc aaaatgtcat ttgatttgtt ttttgatttt 720
 gttgccattc agccaacttt caccatttct caaaattacg tcaagagcgg tggatcatc 780
 aaacctgttg gcttaggtgc tcctagotta acatttagtt tattggactt aggtttaga 840
 gacgttaaga tcattggctc tttctggggg acacaagctg aacaaaaaga ctgtatggaa 900
 ctaattcaaa gaggttttagt caagccatta attacaagtt tcacttttga tgaatttcct 960
 caagcttatg aattgttgc gactgggaaa tccaagggtg gattggttat cagtcaatag 1020

5 <210> 16
 <211> 765
 <212> ADN
 <213> *Candida nemodendra*
 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(765)
 <400> 16

atggggtaca acttaatcaa caaagttgca gtcgtcacag gaggctgctc cggaattggt 60
 ctcgcagtga ccaaaaaata tcttgaactg ggagcaaaag tggcatagg agatgtatcc 120
 actaaagaga agtttaacga ggtatcctcg gaactcaaag ttgcaggcct aatgtaaac 180
 aatttaaact ttgtttcagc agacagtagc aaagaagacg acaacaaacg tttagttgac 240
 gaagcaatca agaactttgg tggctttgat attgtgtgtg ctaatgccgg tatcggtagc 300
 atgattccat tccatgaaat gacatttgaa gcatggagaa agttactcgc agtaaactt 360
 gatgggtgtg tcttgctaga cagattcgca attgattact ggtaaagaa tagcaaacct 420
 ggtgttatcg tcaacatggg ttcaatccac tctttcgtcg ctgctccagg attagcacat 480
 tactctgctt ccaagggagg tgtcaaaacta ttgaccgaag ctcttgetct agagtactcg 540
 tccaagggtg ttagagtaaa ttctgtgaat cctgcatata ttcaaactc attgctagaa 600
 ttccttccag aagacaaaat gaatgccttg aaggcgggtgc accctattgg ccgtttaggt 660
 aaaccagaag aagtagccaa tgctgtcgca ttcctcagtt ccgatgaagc aacctcata 720
 catggtactt ctcttctagt tgatggaggt tacaccgctc aataa 765

10
 15 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Rhodotorula mucilaginosa*
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(9)
 <400> 17

ES 2 524 167 T3

Met Pro Ala Thr Leu Arg Leu Asp Lys
1 5

5 <210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> *Rhodotorula mucilaginosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(13)

10 <400> 18

Gln Ala Leu Ala Ala Pro Ser Asn Leu Ala Pro Lys Ala
1 5 10

15 <210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> *Rhodotorula mucilaginosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(10)

20 <400> 19

Val Glu Ile Ile Lys Thr Gln Val Gln Asp
1 5 10

25 <210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> *Rhodotorula mucilaginosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)

30 <400> 20

Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Ala Ser Gly Ile Gly Leu
1 5 10

35 <210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> *Rhodotorula mucilaginosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(8)

40 <400> 21

Ser Cys Tyr Val Thr Pro Glu Gly

1

5

5 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Rhodotorula mucilaginosa*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(8)

10 <400> 22

Thr Asp Phe Lys Val Asp Gly Gly
 1 5

15 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Rhodotorula mucilaginosa*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)

20 <400> 23

Val Met Phe Asn Asn Ala Gly Ile Met His
 1 5 10

25 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Rhodotorula mucilaginosa*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)

30 <400> 24

Val His Ala Arg Glu Gly Ile Arg Ile Asn
 1 5 10

35 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Pichia farinosa*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)

40 <400> 25

ES 2 524 167 T3

Met Ala Tyr Asn Phe Thr Asn Lys Val Ala
1 5 10

5 <210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> *Pichia farinosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(12)

10 <400> 26

Thr Thr Leu Leu Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
1 5 10

15 <210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> *Pichia farinosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)

20 <400> 27

Glu Tyr Lys Glu Ala Ala Phe Thr Asn
1 5

25 <210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> *Pichia farinosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(16)

30 <400> 28

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

35 <210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> *Pichia farinosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)

40 <400> 29

Asp Val Asn Leu Asn Gly Val Phe Ser
1 5

ES 2 524 167 T3

5 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> *Pichia farinosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)

<400> 30

10 His Tyr Cys Ala Ser Lys Gly Gly Val
1 5

15 <210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> *Pichia farinosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(8)

<400> 31

20 Asn Cys Ile Asn Pro Gly Tyr Ile
1 5

25 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> *Pichia farinosa*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)

<400> 32

30 Leu His Pro Met Gly Arg Leu Gly Glu
1 5

35 <210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> *Pichia stipitis*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(11)

<400> 33

40 Met Ser Ile Pro Ala Thr Gln Tyr Gly Phe Val
1 5 10

<210> 34
<211> 11

ES 2 524 167 T3

Leu Leu Thr Pro Tyr His Ala Met
1 5

5 <210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> *Pichia stipitis*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)
<400> 39

Leu Val Ser Lys Gly Lys Val Lys Pro
1 5

10 <210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> *Pichia stipitis*

15 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)
<400> 40

Gly Ala Gly Gly Leu Gly Val Asn Gly
1 5

20 <210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> *Pichia stipitis*

25 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(10)
<400> 41

Ile Gln Ile Ala Lys Ala Phe Gly Ala Thr
1 5 10

30 <210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> *Pichia stipitis*

35 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(8)
<400> 42

Leu Gly Ser Phe Trp Gly Thr Ser
1 5

40 <210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> *Leuconostoc carnosum*

<220>

ES 2 524 167 T3

<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(10)

<400> 43

Met Thr Asp Arg Leu Lys Asn Lys Val Ala
1 5 10

5 <210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> *Leuconostoc carnosum*

10 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(12)

<400> 44

Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Leu Ala Gln
1 5 10

15 <210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> *Leuconostoc carnosum*

20 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)

<400> 45

Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asn
1 5

25 <210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> *Leuconostoc carnosum*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(9)

30 <400> 46

Gly Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser
1 5

35 <210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> *Leuconostoc carnosum*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(8)

<400> 47

Thr Gln Thr Pro Met Gly His Ile
1 5

40 <210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> *Leuconostoc carnosum*

ES 2 524 167 T3

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)

<400> 48

5 Gly Tyr Ile Lys Thr Pro Leu Val Asp Gly
 1 5 10

<210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium sp.*

10

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(11)

<400> 49

15 Met Lys Ala Leu Gln Tyr Thr Lys Ile Gly Ser
 1 5 10

<210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium sp.*

20

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(14)

<400> 50

25 Leu Ala Ala Gly Thr Val Arg Gly Arg Ala Val Ile Val Pro
 1 5 10

<210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium sp.*

30

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(12)

<400> 51

Cys His Ser Asp Glu Phe Val Met Ser Leu Ser Glu
 1 5 10

35

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium sp.*

40

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)

<400> 52

Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Arg Cys
 1 5 10

ES 2 524 167 T3

5 <210> 53
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium sp.*

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(13)
 <400> 53

10 Val Ser Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His Ala
 1 5 10

<210> 54
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium sp.*

15 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(12)
 <400> 54

Leu Arg Ala Val Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu
 1 5 10

20 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium sp.*

25 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(9)
 <400> 55

Asp Phe Val Gly Ala Asp Pro Thr Ile
 1 5

30 <210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Gordona rubropertinctus*

35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(8)
 <400> 56

Met Lys Ala Ile Gln Ile Ile Gln
 1 5

40 <210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Gordona rubropertinctus*

ES 2 524 167 T3

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)

<400> 57

5 Asp Leu Arg Gly Arg Ala Val Val Val Pro
 1 5 10

<210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Gordona rubropertinctus*

10

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(9)

<400> 58

15 Thr Ala Ala Gly Ala Cys His Ser Asp
 1 5

<210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Gordona rubropertinctus*

20

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(11)

<400> 59

25 Thr Pro Tyr His Ala Ile Lys Pro Ser Leu Pro
 1 5 10

<210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Gordona rubropertinctus*

30

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(8)

<400> 60

35 Asp Phe Val Gly Leu Gln Pro Thr
 1 5

<210> 61
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Gordona rubropertinctus*

40

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(8)

<400> 61

ES 2 524 167 T3

Val Tyr Gly Ala Trp Gly Cys Gly
1 5

5 <210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> *Gordona rubropertinctus*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(8)

10 <400> 62

Asp Asp Ala Arg His Leu Val Pro
1 5

15 <210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> *Gordona rubropertinctus*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(8)

20 <400> 63

Met Thr Leu Gly His Glu Gly Ala
1 5

25 <210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> *Gordona rubropertinctus*

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)

30 <400> 64

Gly Gly Leu Gly His Val Gly Ile Gln Leu Leu Arg His Leu
1 5 10

35 <210> 65
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> constructo sintético

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)

<400> 65
caggaaacag ctatgacc 18

ES 2 524 167 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)

5 <400> 70
 ctccgaggtg ttgagcgcat tg 22

<210> 71
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)

15 <400> 71
 gacgaggttc ttgatgctgt cctcc 25

<210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Pichia farinosa*

20 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(12)

<400> 72

Leu Leu Thr Gln Thr Leu Ala Leu Glu Gln Ala Lys
 1 5 10

25 <210> 73
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Pichia farinosa*

30 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(14)

<400> 73

Tyr Asn Phe Thr Asn Lys Val Ala Ile Ile Thr Gly Gly Ile
 1 5 10

35 <210> 74
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n e s a , c , g , o t

<400> 74
 ytytcyaan gcyaadgtyt g 21

	<210> 75	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> constructo sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(25)	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> n e s a, c, g, o t	
15	<400> 75	
	chaayaargt ngchathaty achgg	25
	<210> 76	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> constructo sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(25)	
25	<400> 76	
	caacgttctg aagagatgac ttatg	25
	<210> 77	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> constructo sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
35	<400> 77	
	ggtggagtga agttattgac	20
	<210> 78	
	<211> 23	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> constructo sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(23)	
45	<400> 78	
	gccattctta gcctgttcga gag	23
	<210> 79	
	<211> 25	
	<212> ADN	
50	<213> Artificial	

ES 2 524 167 T3

<220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)

5 <400> 79
 gtcactctt cagaacgttg atctt 25

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Pichia stipitis*

10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)

15 <400> 80

Ala Asp Gln Val Leu Leu Lys
 1 5

<210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Pichia stipitis*

20 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(11)

<400> 81

Ile Ser Phe Asn Leu Gly Asp Leu Ala Leu Arg
 1 5 10

25 <210> 82
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g, o t

40 <400> 82
 gcygaycarg tnttrtraa r 21

<210> 83
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature

	<222> (1)..(21)	
	<400> 83 ctyaargcya artcdccyaa r	21
5	<210> 84 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> constructo sintético	
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(20)	
	<400> 84 ctaccatgcc atgagattag	20
15	<210> 85 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> constructo sintético	
20	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(20)	
	<400> 85 gctgtagacg tcgctaagag	20
25	<210> 86 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> constructo sintético	
30	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(20)	
	<400> 86 gattctcaag gctaagtcac	20
35	<210> 87 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> constructo sintético	
40	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(20)	
	<400> 87 gatctaacac cagctaact	20
45	<210> 88 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
50		

<220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)

5 <400> 88
 ccaaaggagc ttatagcagt ct 22

<210> 89
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (29)

15 <400> 89
 gggaaattcc atagcctgc cactctccg 29

<210> 90
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(33)

25 <400> 90
 cggaagcctt attacgcctt gggagccaag ttg 33

30 <210> 91
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(32)

40 <400> 91
 ggaaattcca tatggcctat aactcacta ac 32

<210> 92
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(33)

50 <400> 92
 cactgcatgc tgatggccta taactcact aac 33

<210> 93
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)

10

<400> 93
 cgcaagctta ttactgggct gtatcctc 30

<210> 94
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(33)

20

<400> 94
 ggaaattcca tatgatgct attcctgcta cac 33

<210> 95
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(31)

30

<400> 95
 cactgcatgc gaatgctat tctgctaca c 31

35

<210> 96
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> constructo sintético

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)

<400> 96
 cccaagctta tcatggttg aacacgactc tac 33

45

<210> 97
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Leuconostoc carnosum*

50

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)

ES 2 524 167 T3

<400> 97

Ile Glu Glu Thr Thr Tyr Glu Asp Trp Lys
1 5 10

5 <210> 98
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> constructo sintético

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 98
gacagavvmgw ttnaarggwa argthgc 27

20 <210> 99
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> constructo sintético

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (29)

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 99
gcbgtrtawc cncrctdac dacraaytc 29

35 <210> 100
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> constructo sintético

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)

<400> 100
ctaagccaat accaagtga cca 23

45 <210> 101
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> constructo sintético

50 <220>

ES 2 524 167 T3

<221> misc_feature
 <222> (1)..(27)

 <400> 101
 gaacaaatcg tgctactgat tcatcac 27

 5 <210> 102
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> constructo sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)

 <400> 102
 15 gaagaagccc aatcacaag aactc 25

 <210> 103
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> constructo sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)

 <400> 103
 25 ggcagtctat ttagctagtg aag 23

 <210> 104
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> *Microbacterium sp.*

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(14)

 <400> 104

 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Microbacterium sp.*

 40 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(11)

 <400> 105

 Ala Tyr Glu Ala Leu Ala Ala Gly Thr Val Val
 1 5 10

 <210> 106
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

 <400> 106
 ctscartaca cvaagatcgg 20

 10 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> constructo sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

 20 <400> 107
 gcbgcsagbg cytcrtabgc 20

 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> constructo sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

 30 <400> 108
 tcctcgctga ggctcatcac 20

 <210> 109
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)

 40 <400> 109
 gcttctcgat ctgcagcact tc 22

 <210> 110
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)

ES 2 524 167 T3

<400> 110
 gcgcagcgaa ctgatcgag 19

 <210> 111
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)

 <400> 111
 gatccagcgc tactcactcg ac 22

 <210> 112
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Gordona rubropertinctus*

 <220>
 20 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)

 <400> 112

 Met Lys Ala Ile Gln Ile Ile Gln Pro Gly
 1 5 10

 <210> 113
 25 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Gordona rubropertinctus*

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(13)

 30 <400> 113

 Val Gly Phe Phe Thr Gln Pro Tyr Glu Val Ser Val Arg
 1 5 10

 <210> 114
 <211> 26
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (26)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> n es a, c, g, o t

 45 <400> 114
 atgaargcna tycaratyat ycarcc 26

 <210> 115
 <211> 22
 <212> ADN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> constructo sintético	
5	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(22)	
10	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> n es a, c, g, o t	
15	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(14) <223> n es a, c, g, o t	
	<400> 115 cytcrtangg ytgngraar aa	22
20	<210> 116 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> constructo sintético	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(21)	
	<400> 116 gaggacgaag tcgtccgaat g	21
30	<210> 117 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> constructo sintético	
35	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(21)	
	<400> 117 gccgtcacct tcagcaacac c	21
40	<210> 118 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> constructo sintético	
45	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(21)	
	<400> 118 ctcgacgtga gcgacgacaa g	21
50	<210> 119 <211> 21	

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

 <400> 119
 gcaagatcac cggcaacgat g 21

 10 <210> 120
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> constructo sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(37)

 20 <400> 120
 catatggcta gcatgacaga tcggtaaag aataaag 37

 <210> 121
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> constructo sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)

 30 <400> 121
 gcgcgatcc atgacagatc ggtaaagaa taaag 35

 <210> 122
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)

 40 <400> 122
 cccaagcttc ttattgtgcc aaatagccg 29

 <210> 123
 <211> 31
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> constructo sintético

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1)..(31)

	<400> 123 ggaaattcca tatgaaggca ctccagtaca c	31
5	<210> 124 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> constructo sintético	
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(32)	
	<400> 124 cactgcatgc tgatgaaggc actccagtac ac	32
15	<210> 125 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> constructo sintético	
20	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(28)	
	<400> 125 ccaagctta acgtcagggg acgatgac	28
25	<210> 126 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> constructo sintético	
30	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(33)	
35	<400> 126 cactgcatgc gaatgaaggc cattcagatc atc	33
	<210> 127 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> constructo sintético	
40	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(33)	
45	<400> 127 ccaagctta ttagtcaggc accacgactg ctc	33
	<210> 128 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial <220>	
50		

ES 2 524 167 T3

<223> constructo sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(18)

5 <400> 128
tgtaaacga cggccagt 18

<210> 129

<211> 336

<212> PRT

10 <213> *Lodderomyces elongisporus*

<400> 129

Met Ser Ile Pro Thr Thr Gln Tyr Gly Phe Val Tyr Asn Lys Ser Ser
1 5 10 15

Gly Leu Thr Leu Asn Lys Ser Ile Pro Val Ala Ser Ala Gly Val Gly
20 25 30

ES 2 524 167 T3

Gln Leu Leu Met Lys Val Asp Ser Val Gly Leu Cys His Ser Asp Leu
 35 40 45

His Val Ile Tyr Glu Gly Leu Asp Cys Gly Asp Asn Tyr Val Met Gly
 50 55 60

His Glu Ile Ala Gly Thr Val Val Asp Val Gly Pro Glu Val Asp Arg
 65 70 75 80

Trp Asn Val Gly Asp Arg Val Ala Ala Val Gly Pro Asn Gly Cys Gly
 85 90 95

Gly Cys Arg Ala Cys Arg Asp Gly Ile Glu Asn Val Cys Lys His Ser
 100 105 110

Phe Gly Asn Trp Tyr Gly Leu Gly Ser Asp Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr
 115 120 125

Leu Leu Val Gln Lys Pro Arg Asn Leu Val Lys Ile Pro Asp Asn Val
 130 135 140

Pro Ser Asp Val Ala Ala Ala Ser Thr Asp Ala Val Leu Thr Pro Tyr
 145 150 155 160

His Ala Ile Lys Met Ala Gly Val Gly Pro Thr Ser Lys Val Leu Ile
 165 170 175

Val Gly Ala Gly Gly Leu Gly Cys Asn Ala Val Gln Val Ala Lys Ala
 180 185 190

Phe Gly Ala His Val Thr Ile Leu Asp Lys Lys Glu Arg Ala Arg Ala
 195 200 205

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

Ser Thr Glu Pro Gly Ser Phe Asp Ala Cys Leu Asp Phe Val Ser Val
 225 230 235 240

Gln Ala Thr Phe Gly Ile Cys Gln Lys Phe Cys Ala Pro Lys Gly Cys
 245 250 255

Ile Ile Pro Ala Gly Leu Gly Ala Pro Lys Leu Thr Leu Asp Leu Ala
 260 265 270

Asp Leu Asp Leu Arg Glu Ile Arg Ile Leu Gly Thr Phe Trp Gly Thr
 275 280 285

ES 2 524 167 T3

Ala Thr Asp Leu Glu Glu Val Phe Asp Leu Val Gly Lys Gly Leu Val
 290 295 300

Lys Pro Met Val Arg Ala Ala Lys Leu Glu Glu Leu Pro Asp Tyr Ile
 305 310 315 320

Glu Lys Leu Arg Lys Asn Glu Tyr Glu Gly Arg Ile Val Phe Asn Pro
 325 330 335

5 <210> 130
 <211> 1012
 <212> ADN
 <213> *Lodderomyces elongisporus*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1011)

10 <400> 130

```

atgtcaattc caactaccca atatggtttt gtttacaata agtcgtctgg cttaacattg      60
aacaagagta tacctgttgc ctcggcaggt gtgggtcaat tgcttatgaa ggttgactct      120
gttgattgt gccactcgga cctccatgtg atttacgaag gtttgattg tggtgataac      180
tatgtcatgg gccatgagat tgccgggtacc gtggttgatg ttggtccaga ggttgataga      240
tggaatggtg gtgatagagt tgccgctgtg ggtccaaatg gttgtggtgg ttgcagagcc      300
tgtcgcgacg gaattgaaaa tgtatgtaaa cactcttttg gtaattggta tggcttgggc      360
tcagatggcg gataccaaca atatttgctt gtgcaaaaac cacgcaattt ggtaagatt      420
cctgacaatg ttccttcgga tgtagctgca gcctcgactg acgctgtatt gacaccatac      480
cacgcaatca agatggctgg tgtggggcca acatcaaagg tgctcattgt tggcgtggt      540
ggcttgggct gcaatgccgt gcaagttgcc aaggcatttg gtgctcatgt cactattttg      600
gacaagaagg aacgcgcgcg cgctgaagct gtcaagtttg gtgccgacgt tgcttatgag      660
agcttaccac tgagcaccga gccaggctca tttgatgcat gtttgattt tgtttctgtg      720
caagcaacgt ttggcatttg ccaaaagttt tgtgcaccaa aaggttgcat catccccgcg      780
gggctcggtg caccaaagtt gacgcttgat ttggcagatt tggatttgcg cgaaattcgt      840
athttgggta ctttttgggg aaccgcgacc gatttgagg aggtgttga cttggttgga      900
aagggacttg ttaagcccat ggtgcgtgca gccaaagttg aggaattgcc agactatatt      960
gaaaagttga gaaagaatga atatgaaggt agaattgtct ttaatccata ag      1012
    
```

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de un compuesto cetónico para dar el correspondiente compuesto de hidroxilo quiral, en el que el compuesto cetónico se reduce en presencia de un co-factor con una oxidorreductasa, **caracterizado porque**
- 5 se usa una oxidorreductasa que se selecciona del grupo que está constituido por las oxidorreductasas para las que
- (a) codifica la secuencia de ácido nucleico SEC ID N.º: 12, o
- (b) codifica una secuencia de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia de ácido nucleico mencionada en (a) en condiciones altamente rigurosas.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el compuesto cetónico presenta la
- 10 fórmula general I
- $$R_1-C(O)-R_2 \quad (I),$$
- en la que R1 representa uno de los restos
- 1) alquilo (C₁-C₂₀), en el que alquilo es de cadena lineal o ramificada,
- 2) alquenilo (C₂-C₂₀), en el que alquenilo es de cadena lineal o ramificada y eventualmente contiene hasta cuatro
- 15 dobles enlaces,
- 3) alquinilo (C₂-C₂₀), en el que alquinilo es de cadena lineal o ramificada y eventualmente contiene hasta cuatro triples enlaces,
- 4) arilo (C₆-C₁₄),
- 5) alquil-(C₁-C₈)-arilo (C₆-C₁₄),
- 20 6) heterociclo (C₅-C₁₄), que está no sustituido o sustituido una, dos o tres veces con -OH, halógeno, -NO₂ y/o -NH₂, o
- 7) cicloalquilo (C₃-C₇),
- estando los restos mencionados anteriormente en 1) a 7) no sustituidos o independientemente entre sí están
- sustituidos una, dos o tres veces con -OH, halógeno, -NO₂ y/o -NH₂,
- 25 y R₂ representa uno de los restos
- 8) alquilo (C₁-C₆), en el que alquilo es de cadena lineal o ramificada,
- 9) alquenilo (C₂-C₆), en el que alquenilo es de cadena lineal o ramificada y eventualmente contiene hasta tres
- dobles enlaces,
- 10) alquinilo (C₂-C₆), en el que alquinilo es de cadena lineal o ramificada y eventualmente contiene dos triples
- 30 enlaces, o
- 11) alquil-(C₁-C₁₀)-C(O)-O-alquilo (C₁-C₆), en el que alquilo es lineal o ramificado y está no sustituido o está
- sustituido una, dos o tres veces con -OH, halógeno, -NO₂ y/o -NH₂,
- estando los restos mencionados anteriormente en 8) a 11) no sustituidos o independientemente entre sí están
- sustituidos una, dos o tres veces con -OH, halógeno, -NO₂ y/o -NH₂.
- 35 3. Vector de clonación, que contiene una o varias secuencias de ácido nucleico que codifican la oxidorreductasa de acuerdo con SEC ID N.º: 4.
4. Vector de expresión, que se encuentra en una célula bacteriana, de insecto, vegetal o de mamífero *in vitro* y contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica la oxidorreductasa de acuerdo con SEC ID N.º: 4 y está unida con una secuencia control de expresión.
- 40 5. Célula huésped recombinante que es una célula bacteriana, de insecto, vegetal o de mamífero y se transformó o se transfectó con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Oxidorreductasa para su uso en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** se codifica por la secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que está constituido por SEC ID N.º: 12 y una secuencia de ácido nucleico cuya cadena complementaria se hibrida con la secuencia SEC ID N.º: 12 en
- 45 condiciones altamente rigurosas.
7. Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de un compuesto cetónico para dar el correspondiente compuesto de hidroxilo quiral, en el que el compuesto cetónico se reduce con una oxidorreductasa en presencia de un co-factor, **caracterizado porque** se usa una oxidorreductasa que presenta una secuencia de aminoácidos en la que al menos el 75 % de los aminoácidos son idénticos a los aminoácidos de la secuencia de
- 50 aminoácidos SEC ID N.º: 4.