

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 561**

51 Int. Cl.:

C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2013 PCT/EP2013/054817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13135601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013 E 13712707 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2825661**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de terpeno-nitrilos a partir de terpeno-oximas usando una aldoxima deshidratasa**

30 Prioridad:

13.03.2012 EP 12159265

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

25.10.2016

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**PIATESI, ANDREA;
SIEGEL, WOLFGANG y
BALDENIUS, KAI-UWE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 587 561 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

Procedimiento para la preparación de terpeno-nitrilos a partir de terpeno-oximas usando una aldoxima deshidratasa

La presente invención se refiere a procedimientos novedosos para la preparación biocatalítica de nitrilos a partir de oximas usando oxima-deshidratasas, tal como para la preparación de citralnitrilo, neralnitrilo, geranialnitrilo o citronelilnitrilo a partir de citraloxima, neraloxima, geranialoxima o citronelaloxima. Igualmente se divulgan oxima-deshidratasas que pueden usarse para ello, secuencias de nucleótidos para ello así como microorganismos o constructos de expresión que comprenden éstas.

Antecedentes de la invención

Los terpenos son compuestos orgánicos que se derivan de la estructura principal de isopreno y se producen en la naturaleza en particular como sustancias contenidas secundarias de organismos, en particular como sustancias vegetales secundarias. Los terpenos son con frecuencia sustancias de olor o de sabor y pueden obtenerse por ejemplo a partir de aceites esenciales de origen vegetal. De manera correspondiente se usan terpenos y derivados de terpenos como sustancias contenidas para productos en el sector de la cosmética, del cuidado corporal o para productos de limpieza, por ejemplo como sustancias olorosas o aromáticas mezcladas, perfumes, lociones corporales, geles de ducha, jabones, agentes de lavado o agentes de limpieza. Dependiendo del compuesto usado pueden generarse notas de olor múltiples, por ejemplo fragancias aromáticas, frescas, cítricas o floridas de los correspondientes productos.

Los correspondientes productos de partida que se ofrecen por la industria química para el mezclado para obtener los correspondientes productos son con frecuencia nitrilos de los terpenos o derivados de terpenos. Ejemplos de esto son geranilnitrilo, que presenta un olor intenso fresco y cítrico, o citronelilnitrilo, que huele a rosas.

Los correspondientes nitrilos o bien se aíslan como productos naturales o se sintetizan químicamente a partir de precursores adecuados. Así describe el documento WO 2006/106141 de la parte solicitante la preparación de nitrilos saturados a partir de nitrilos insaturados como precursores. El documento EP 0 491 127 describe la adición de nitrilos insaturados a hexenoles con obtención de nitrilos modificados. En ambos casos se usan compuestos de partida que comprenden ya el grupo nitrilo. Son deseables de manera correspondiente a esto procedimientos con los que puedan usarse también precursores diferentes de nitrilos. El documento DE 3139358 describe un procedimiento para la generación de sustancias aromáticas mediante reacción química de oximas para dar los correspondientes nitrilos. En el contexto de este procedimiento se requieren para la deshidratación necesaria condiciones de reacción extremas, en particular reactivos de deshidratación corrosivos y temperaturas de ebullición.

KATO, Y. y ASANO, Y describen en Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69, 11, 2254-2257 un procedimiento para la preparación de alquilo(C₃-C₆)-nitrilos saturados, en el que se hace reaccionar las correspondientes alquil(C₃-C₆)-oximas saturadas en presencia de la fenilacetaldoxima deshidratasa de *Gibberella zeae*.

Xie, S.X. *et al.* describen en Biochemistry, 2003, 42, 41, 12056-12066 un procedimiento para la preparación de alquilo(C₃-C₆)-nitrilos saturados, en el que se hace reaccionar las correspondientes alquil(C₃-C₆)-oximas saturadas en presencia de la aldoxima alifática deshidratasa de la cepa A-4 de *Rhodococcus globerulus*.

Pedras M.S.C. *et al.* describen en Phytochemistry, 2010, 71, 17-18, 1952-1962, la indolacetaldoxima deshidratasa de *Sclerotinia sclerotiorum*.

El documento WO 2010/044031 A1 describe un procedimiento para la preparación del acrilnitrilo C₁₁ insaturado metilcitronelalitrilo a partir de metilcitronelaloxima mediante síntesis química.

Existe por consiguiente una necesidad de procedimientos alternativos para la preparación de nitrilos a partir de oximas, en particular procedimientos que discurren en condiciones de reacción más suaves. Además existe una necesidad de agentes de reacción adecuados para la realización de un procedimiento de este tipo.

Sumario de la invención

El primer objetivo anteriormente mencionado de acuerdo con la invención mediante un procedimiento biocatalítico para la preparación de nitrilos en el que se hace reaccionar

- a) una oxima, seleccionada entre citraloxima, neraloxima, geranialoxima, citronelaloxima y análogos parcial o completamente hidrogenados de las mismas, encontrándose el compuesto en forma estereoisoméricamente pura o como mezcla de estereoisómeros, en presencia de una aldoxima alifática deshidratasa (EC 4.99.1.5) o de una fenilacetaldoxima deshidratasa (PAOx) (EC 4.99.1.7) para dar nitrilo, encontrándose el nitrilo en forma estereoisoméricamente pura o como mezcla de estereoisómeros y
- b) eventualmente el producto de reacción se purifica adicionalmente a continuación.

El segundo objetivo mencionado anteriormente pudo solucionarse mediante la facilitación de secuencias de ácido nucleico definidas en el presente documento, que codifican para proteínas que pueden usarse en el contexto del

procedimiento de acuerdo con la invención.

Descripción de las figuras

La **figura 1** muestra esquemáticamente la reacción de citronelaloxima para dar citronelilnitrilo.

La **figura 2A**: cromatograma CG de E/Z-citronelaloxima antes de la reacción biocatalítica con PAOx (RT: 7,816 & 8,018 min).

La **figura 2B**: cromatograma CG de E/Z-citronelaloxima durante la reacción biocatalítica con PAOx (tiempo: 18 h). Citronelilnitrilo puede detectarse como producto de la reacción (RT: 6,765 min).

La **figura 2C**: cromatograma CG de citronelilnitrilo, que se formó durante la reacción biocatalítica con PAOx (tiempo: 90 h). E/Z-citronelaloxima se hizo reaccionar completamente para dar nitrilo.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones generales

Las “aldoxima-deshidratatas” en el sentido de la presente invención son generalmente enzimas o mutantes enzimáticos, que catalizan la separación de agua de oximas de fórmula general $R^1R^2C=N-OH$, en la que R^1 representa un resto orgánico discrecional y R^2 representa hidrógeno. El término de las aldoxima-deshidratatas comprende otras aldoxima-deshidratatas específicas más precisas, tal como por ejemplo aldoxima alifática-deshidratasa (EC 4.99.1.5, de acuerdo con la nomenclatura EC del “Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology”), o fenilacetaldoxima-deshidratasa (PAOx) (EC 4.99.1.7).

Debido a la reversibilidad de reacciones enzimáticas se refiere la presente invención a las reacciones enzimáticas descritas en el presente documento en ambas direcciones de reacción.

Los “mutantes funcionales” de una aldoxima-deshidratasa comprenden los “equivalentes funcionales” definidos a continuación de tales enzimas.

El término “procedimiento biocatalítico” se refiere a cualquier procedimiento realizado en presencia de actividad catalítica de una “aldoxima-deshidratasa” de acuerdo con la invención o de una enzima con “actividad aldoxima-deshidratasa”, es decir el procedimiento en presencia de enzima bruta, o purificada, disuelta, dispersada o inmovilizada, o en presencia de células microbianas enteras, que presentan o expresan actividad enzimática de este tipo. Los procedimientos biocatalíticos comprenden por consiguiente procedimientos enzimáticos como también microbianos.

El término “estereoisoméricamente puro” significa que uno de varios estereoisómeros posibles de un compuesto mencionado en el contexto de la invención con al menos un centro de asimetría se encuentra en alto “exceso enantiomérico” o alta “pureza enantiomérica”, tal como por ejemplo al menos el 90 % de ee, en particular al menos el 95 % de ee, o al menos el 98 % de ee, o al menos el 99 % de ee. El valor de ee% se calcula según la siguiente fórmula:

$$ee\% = \frac{[X_A - X_B]}{[X_A + X_B]} * 100,$$

en la que X_A y X_B representan la fracción molar de los enantiómeros A o B.

Por una “actividad aldoxima-deshidratasa”, que se determinó con un “sustrato de referencia en condiciones estándar”, ha de entenderse por ejemplo una actividad enzimática que describe la formación de un producto de nitrilo a partir de un sustrato de oxima. Las condiciones estándares son por ejemplo concentraciones de sustrato de 10 mM a 0,2 M, en particular de 15 a 100 mM, tal como por ejemplo de aproximadamente 20 a 25 mM; a pH 4 a 8, y a temperaturas de por ejemplo 15 a 30 o de 20 a 25 °C. La determinación puede realizarse a este respecto con células recombinantes que expresan aldoxima-deshidratasa, células solubilizadas que expresan aldoxima-deshidratasa, fracciones de las mismas o enzima aldoxima-deshidratasa enriquecida o purificada. En particular es el sustrato de referencia citronelaloxima, o un racemato de citronelaloxima, tal como se describe en más detalle también en los ejemplos. Un ensayo estándar específico para la detección de la actividad aldoxima-deshidratasa se ha descrito por ejemplo por Kato, Y. *et al.* en *Biochemistry* 2000, 39, 800-809. Según esto contiene una mezcla de reacción estándar tampón fosfato de potasio 50 mMol, pH 7,0, FMN 125 nMol, enzima 2,5 μMol. La reacción se detiene tras 10 min mediante adición de 500 μl de H_3PO_4 0,5 M, el residuo obtenido mediante centrifugación (18.000 g, 10 min) se analiza entonces para determinar el producto formado.

Los “terpenos” son hidrocarburos que están constituidos por unidades de isopreno (unidades C5), en particular terpenos no cíclicos, tales como por ejemplo escualeno, cuyo número de carbono es divisible por 5.

Los “terpenoides” son sustancias que se derivan de terpenos, en particular terpenos no cíclicos, por ejemplo mediante inserción adicional de átomos de C y/o heteroátomos, tales como por ejemplo citronelal.

Los compuestos “similares a terpeno” en el sentido de la presente invención comprenden en particular aquellos compuestos que se encuentran en la fórmula estructural general (IV), tal como se define a continuación.

Generalmente están comprendidos conjuntamente de acuerdo con la invención todas las formas isoméricas de los compuestos descritos en el presente documento, tal como isómeros constitucionales y en particular estereoisómeros y mezclas de los mismos, tal como por ejemplo isómeros ópticos o isómeros geométricos, tales como isómeros E y Z, así como combinaciones de los mismos. Si están presentes varios centros de asimetría en una molécula, entonces comprende la invención todas las combinaciones de distintas conformaciones de estos centros de asimetría, tales como por ejemplo pares de enantiómeros.

Siempre que no se hagan indicaciones diferentes se aplican las definiciones químicas generales siguientes en el presente documento:

Los restos de hidrocarburos alifáticos comprenden restos que se derivan de compuestos de carbono acíclicos o cíclicos, saturados o insaturados con excepción de compuestos aromáticos. Los restos de hidrocarburos alifáticos comprenden en particular restos alquilo de cadena lineal o ramificado y restos alqueno de cadena lineal o ramificados. Los ejemplos no limitantes se enumeran a continuación:

Alquilo así como todas las partes alquilo en restos derivados de los mismos, tales como por ejemplo hidroxialquilo: restos de hidrocarburos saturados, de cadena lineal o ramificados una vez o varias veces, tales como por ejemplo ramificados 1, 2, 3 ó 4 veces, con 1 a 4, de 1 a 6, de 1 a 8, de 1 a 10 o de 4 a 10 átomos de carbono, por ejemplo

- alquilo C₁-C₁₀ o alquilo C₁-C₆ o alquilo C₄-C₁₀: tal como metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo y 1,1-dimetiletilo como representantes a modo de ejemplo de alquilo C₁-C₄; así como pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-di-metilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo y 1-etil-2-metilpropilo, tal como en particular los significados que pueden deducirse de la tabla 4 de R, tal como por ejemplo hexilo
- Hidroxi-alquilo C₁-C₁₀, tal como por ejemplo hidroxi-alquilo C₁-C₆, o hidroxi-alquilo C₁-C₄, o hidroxi-alquilo C₄-C₁₀: tal como por ejemplo hidroximetilo, 1- o 2-hidroxietilo, 1-, 2- o 3-hidroxipropilo, 1-hidroximetiletilo, 1-, 2-, 3- o 4-hidroxibutilo, 1-hidroximetilpropilo y 2-hidroximetilpropilo u otros análogos sustituidos con hidroxilo de los restos alquilo mencionados anteriormente, tales como en particular los significados que pueden deducirse de la tabla 4 de R, tal como por ejemplo 6-hidroxi-6-metil-hept-1-ilo.
- alqueno representa restos de hidrocarburos monoinsaturados o poliinsaturados, en particular monoinsaturados o diinsaturados, de cadena lineal o ramificados una vez o varias veces, tal como por ejemplo ramificados 1, 2, 3 ó 4 veces con 2 a 4, de 2 a 6, de 2 a 8, de 2 a 10, de 4 a 10, de 2 a 20 o de 4 a 20 átomos de carbono y un enlace doble en una posición discrecional, o 2 enlaces dobles no acumulados, conjugados o en particular no conjugados, por ejemplo alqueno C₂-C₆ tal como etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-metiletenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-metil-1-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-metil-2-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-metil-1-butenilo, 2-metil-1-butenilo, 3-metil-1-butenilo, 1-metil-2-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-metil-3-butenilo, 2-metil-3-butenilo, 3-metil-3-butenilo, 1,1-dimetil-2-propenilo, 1,2-dimetil-1-propenilo, 1,2-dimetil-2-propenilo, 1-etil-1-propenilo, 1-etil-2-propenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 5-hexenilo, 1-metil-1-pentenilo, 2-metil-1-pentenilo, 3-metil-1-pentenilo, 4-metil-1-pentenilo, 1-metil-2-pentenilo, 2-metil-2-pentenilo, 3-metil-2-pentenilo, 4-metil-2-pentenilo, 1-metil-3-pentenilo, 2-metil-3-pentenilo, 3-metil-3-pentenilo, 4-metil-3-pentenilo, 1-metil-4-pentenilo, 2-metil-4-pentenilo, 3-metil-4-pentenilo, 4-metil-4-pentenilo, 1,1-dimetil-2-butenilo, 1,1-dimetil-3-butenilo, 1,2-dimetil-1-butenilo, 1,2-dimetil-2-butenilo, 1,2-dimetil-3-butenilo, 1,3-dimetil-1-butenilo, 1,3-dimetil-2-butenilo, 1,3-dimetil-3-butenilo, 2,2-dimetil-3-butenilo, 2,3-dimetil-1-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, 2,3-dimetil-3-butenilo, 3,3-dimetil-1-butenilo, 3,3-dimetil-2-butenilo, 1-etil-1-butenilo, 1-etil-2-butenilo, 1-etil-3-butenilo, 2-etil-1-butenilo, 2-etil-2-butenilo, 2-etil-3-butenilo, 1,1,2-trimetil-2-propenilo, 1-etil-1-metil-2-propenilo, 1-etil-2-metil-1-propenilo y 1-etil-2-metil-2-propenilo, tal como en particular los significados que pueden deducirse de la tabla 4 de R, tal como 2,6-dimetil-hepta-1,5-dien-1-ilo, 2,6-dimetil-hept-5-en-1-ilo, 2,6-dimetil-octa-1,5-dien-1-ilo, octa-1,5-dien-1-ilo, 1,5-dimetil-hexa-4-en-1-ilo, 1,5,9-trimetil-non-8-en-1-ilo.

“Oxo” representa por ejemplo un resto que forma junto con el átomo de C al que está unido un grupo ceto (C=O). De manera correspondiente a esto, por ejemplo restos derivados de los restos de hidrocarburos mencionados anteriormente son aquéllos que portan uno o varios grupos ceto.

“Metileno” (=CH₂) representa por ejemplo un resto que forma junto con el átomo de C al que está unido un resto vinilo (-CH=CH₂).

B. Configuraciones especiales de la invención

La presente invención se refiere en particular a las siguientes formas de realización especiales:

1. Procedimiento biocatalítico para la preparación de nitrilos en el que se hace reaccionar una oxima, seleccionada entre citraloxima, neraloxima, geranialoxima,

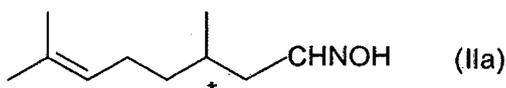
citronelaloxima y análogos parcial o completamente hidrogenados de las mismas, tal como por ejemplo 6,7-dihidrocitroneliloxima, encontrándose el compuesto en forma estereoisoméricamente pura o como mezcla de estereoisómeros,

5 en presencia de una aldoxima alifática deshidratasa (E.C. 4.99.1.5) o una fenilacetaldoxima deshidratasa (PAOx) (EC 4.99.1.7), tal como por ejemplo de una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 1 y 4 a 27, o presenta una secuencia de aminoácidos idéntica a una de estas secuencias en al menos el 60 %, tal como por ejemplo al menos el 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %; en particular una fenilacetaldoxima deshidratasa (PAOx) (EC 4.99.1.7), en particular una enzima que comprende
10 SEQ ID NO: 1 o presenta una secuencia de aminoácidos a ésta en al menos el 60 %, tal como por ejemplo al menos el 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %; para dar el nitrilo, encontrándose el nitrilo en forma estereoisoméricamente pura o como mezcla de estereoisómeros, y b) eventualmente el producto de reacción se purifica adicionalmente a continuación.

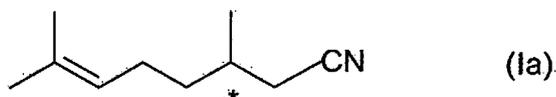
2. Procedimiento según la forma de realización 1, en el que la PAOx es una enzima de *Rhodococcus* sp, *Gibberella zeae* o en particular *Bacillus* sp.

15 3. Procedimiento según una de las formas de realización mencionadas anteriormente, en el que la PAOx presenta una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos idéntica a ésta en al menos el 60 %, tal como por ejemplo al menos el 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %; o en el que hasta el 25 %, tal como por ejemplo hasta el 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % de los restos de aminoácidos están modificados en comparación con SEQ ID NO: 1 mediante adición, delección,
20 inserción, sustitución, inversión o una combinación de esto, y que presenta aún al menos el 50 %, tal como por ejemplo al menos el 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de la actividad enzimática de SEQ ID NO: 1.

4. Procedimiento según una de las formas de realización mencionadas anteriormente, en el que se hace reaccionar citronelaloxima de fórmula Ia



25 para dar citronelilnitrilo de fórmula Ia



en el que se usa el compuesto de fórmula IIa, en forma estereoisoméricamente pura o como mezcla de estereoisómeros, tal como en particular como mezcla R/S y/o E/Z, en particular una mezcla R/S y E/Z.

30 5. Procedimiento según una de las formas de realización mencionadas anteriormente, en el que la reacción se realiza enzimáticamente, en presencia de PAOx, una mezcla de proteínas que contiene PAOx, o en presencia de un microorganismo recombinante, que expresa funcionalmente PAOx, de un homogeneizado celular derivado del mismo que contiene PAOx o de una fracción del mismo que contiene PAOx.

35 6. Procedimiento según una de las formas de realización mencionadas anteriormente, en el que PAOx o el microorganismo que expresa funcionalmente PAOx se encuentra en la mezcla de reacción libre o en forma inmovilizada.

7. Procedimiento según una de las formas de realización 5 y 6, en el que el microorganismo recombinante es una cepa bacteriana que expresa funcionalmente PAOx, en particular cepa de *E. coli*.

40 8. Procedimiento según la forma de realización 7, en el que el microorganismo recombinante porta un constructo de expresión que presenta la secuencia de nucleótidos de PAOx codificante, eventualmente adaptada al uso de codones del microorganismo.

9. Procedimiento según una de las formas de realización 5 a 8, en el que el microorganismo expresa adicionalmente al menos una chaperona que fomenta la expresión funcional (en particular plegamiento correcto) de la PAOx.

45 10. Procedimiento según la forma de realización 9, en el que el microorganismo recombinante es una cepa bacteriana, que expresa adicionalmente a PAOx una o varias chaperonas seleccionadas entre GroEL y GroES.

11. Procedimiento según una de las formas de realización anteriores, en el que se realiza la reacción en sustrato en particular puro, es decir sin adición adicional de aditivos habituales, tales como agua o tampón, como medio de reacción, usándose en este caso en particular células enteras que expresan la enzima deshidratasa.

Además se divulgan las siguientes secuencias de nucleótidos, constructos de expresión y microorganismos recombinantes:

12. Secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o 3, que codifica para PAOx, estando adaptada la secuencia de nucleótidos al uso de codones del microorganismo *Escherichia coli*.

5 13. Constructo de expresión de acuerdo con la definición en una de las formas de realización 8 a 11 o que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se divulga en 12.

14. Microorganismo recombinante de acuerdo con la definición en una de las formas de realización mencionadas anteriormente 5 a 11, o que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como se divulga en 12., o un constructo de expresión, tal como se divulga en 13.

10 C. Otras configuraciones de la invención

1. Proteínas/mutantes enzimáticos

La presente invención no está limitada a las enzimas divulgadas concretamente en el presente documento con actividad aldoxima-deshidratasa, sino que se extiende más bien también a equivalentes funcionales de las mismas.

15 Los "equivalentes funcionales" o análogos de las enzimas divulgadas concretamente y mutantes enzimáticos son en el contexto de la presente invención polipéptidos distintos de éstos, que tienen además la actividad biológica deseada, actividad aldoxima-deshidratasa.

20 Así se entiende por ejemplo por "equivalentes funcionales" enzimas y mutantes que presentan en un ensayo usado para determinar la "actividad aldoxima-deshidratasa" en el sentido de la invención (es decir con un sustrato de referencia en condiciones estándares) una actividad más alta o más baja en al menos el 1 %, en particular en al menos de aproximadamente el 5 % al 10 %, tal como por ejemplo al menos el 10 % o al menos el 20 %, tal como por ejemplo al menos el 50 % o el 75 % o el 90 % de una enzima, que comprende una secuencia de aminoácidos definida de manera concreta en el presente documento (por ejemplo de un mutante, derivado de SEQ ID NO: 1 o derivado de una de las secuencias de acuerdo con SEQ ID NO: 4 a 27).

25 Las indicaciones de actividad para equivalentes funcionales se refieren en el presente documento, cuando no se indica lo contrario, a determinaciones de la actividad, realizadas por medio de un sustrato de referencia en condiciones estándares, tal como se define en el presente documento.

30 La "actividad aldoxima-deshidratasa" en el sentido de la invención puede detectarse con ayuda de distintos ensayos conocidos. Sin limitarse a esto, puede mencionarse un ensayo usando un sustrato de referencia, tal como por ejemplo citronelaloxima o racemato de citronelaloxima, en condiciones estándares, tal como se ha descrito anteriormente (véase también Kato *et al*, Biochemistry, 2000, 39, 800-809; descrito para PAOx; y de manera análoga puede aplicarse o adaptarse a otras aldoxima-deshidratasa) y tal como se explica en la parte experimental.

35 Los equivalentes funcionales son estables además por ejemplo entre pH 4 y 11 y tienen ventajosamente un valor de pH óptimo en un intervalo de pH 5 a 10, tal como en particular de 6,5 a 9,5 o de 7 a 8 o por ejemplo a 7,5, así como un valor óptimo de la temperatura en el intervalo de 15 °C a 80 °C o de 20 °C a 70 °C, tal como por ejemplo de aproximadamente 30 a 60 °C o de aproximadamente 35 a 45 °C, tal como aproximadamente a 40 °C.

40 Los "equivalentes funcionales" comprenden los mutantes que pueden obtenerse mediante una o varias, tal como por ejemplo de 1 a 50, de 2 a 30, de 2 a 15, de 4 a 12 o de 5 a 10 "mutaciones adicionales", tal como adiciones, sustituciones, deleciones y/o inversiones de aminoácidos, pudiendo aparecer las mencionadas modificaciones en cualquier posición de secuencia, en tanto que éstas conduzcan a un mutante con el perfil de propiedades de acuerdo con la invención. La equivalencia funcional se da en particular también cuando el patrón de reactividad entre el mutante y el polipéptido no modificado coinciden cualitativamente, es decir se hacen reaccionar por ejemplo sustratos iguales con distinta velocidad.

Las "mutaciones adicionales" de este tipo pueden realizarse a este respecto en cualquier posición discrecional de la respectiva secuencia de aminoácidos.

45 Ejemplos no limitativos de sustituciones de aminoácidos adecuadas están resumidos en la siguiente tabla:

Resto originario	Ejemplos de la sustitución
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro

(continuación)

Resto originario	Ejemplos de la sustitución
His	Asn ; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg ; Gln ; Glu
Met	Leu ; Ile
Phe	Met ; Leu ; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp ; Phe
Val	Ile; Leu

Los "equivalentes funcionales" en el sentido mencionado anteriormente son también "precursores" de los polipéptidos descritos así como "derivados funcionales" y "sales" de los polipéptidos.

- 5 Los "precursores" son a este respecto precursores naturales o sintéticos de los polipéptidos con o sin la actividad biológica deseada.

10 Por la expresión "sales" se entiende tanto sales de grupos carboxilo como sales de adición de ácido de grupos amino de las moléculas de proteína de acuerdo con la invención. Las sales de grupos carboxilo pueden prepararse de manera en sí conocida y comprenden sales inorgánicas, tales como por ejemplo sales de sodio, de calcio, de amonio, de hierro y de cinc, así como sales con bases orgánicas, tal como por ejemplo aminas, tales como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina y similares. Las sales de adición de ácido, tales como por ejemplo sales con ácidos minerales, tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, tal como ácidos acético y ácido oxálico son igualmente objeto de la invención.

15 Los "derivados funcionales" de polipéptidos de acuerdo con la invención pueden prepararse en grupos laterales de aminoácidos funcionales o en sus extremos N-terminal o C-terminal igualmente con ayuda de técnicas conocidas. Los derivados de este tipo comprenden por ejemplo ésteres alifáticos de grupos ácido carboxílico, amidas de grupos ácido carboxílico, que pueden obtenerse mediante reacción con amoníaco o con una amina primaria o secundaria; derivados de N-acilo de grupos amino libres, preparados mediante reacción con grupos acilo; o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres, preparados mediante reacción con grupos acilo.

20 Los "equivalentes funcionales" comprenden naturalmente también polipéptidos que son accesibles por otros organismos, así como variantes que se producen de manera natural. Por ejemplo pueden determinarse mediante comparación de secuencias zonas de regiones de secuencia homólogas y en cumplimiento con las especificaciones concretas de la invención pueden determinarse enzimas equivalentes.

25 Los "equivalentes funcionales" comprenden igualmente fragmentos, preferentemente dominios individuales o motivos de secuencia, de los polipéptidos de acuerdo con la invención, que presentan por ejemplo la función biológica deseada.

30 Los "equivalentes funcionales" son además proteínas de fusión, que presentan una de las secuencias de polipéptido mencionadas anteriormente o equivalentes funcionales derivados de la misma y al menos otra secuencia heteróloga, funcionalmente distinta de la misma en enlace funcional N- o C-terminal (es decir sin alteración funcional esencial recíproca de las partes de proteína de fusión). Ejemplos no limitativos de secuencias heterólogas de este tipo son por ejemplo péptidos señal, anclaje de histidina o enzimas.

35 Los "equivalentes funcionales" comprendidos conjuntamente de acuerdo con la invención son homólogos a las proteínas divulgadas de manera concreta. Éstos tienen al menos el 60 %, preferentemente al menos el 75 % en particular al menos el 85 %, tal como por ejemplo el 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %, de homología (o identidad) con respecto a una de las secuencias de aminoácidos divulgadas de manera concreta, calculada según el algoritmo de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448. Una homología o identidad porcentual de un polipéptido homólogo de acuerdo con la invención significa en particular identidad porcentual de los restos de aminoácido con respecto a la longitud total de una de las secuencias de aminoácidos descritas de manera concreta en el presente documento.

40 Los valores de identidad porcentuales pueden determinarse también por medio de alineamiento BLAST, algoritmo blastp (BLAST proteína-proteína), o mediante uso de los ajustes de Clustal indicados a continuación.

En el caso de una posible glicosilación de proteínas comprenden los "equivalentes funcionales" de acuerdo con la invención proteínas del tipo designadas anteriormente en forma desglucosilada o glicosilada así como formas modificadas que pueden obtenerse mediante modificación del patrón de glicosilación.

45

Los homólogos de las proteínas o polipéptidos pueden generarse mediante mutagénesis, por ejemplo mediante mutación puntual, alargamiento o acortamiento de la proteína.

5 Los homólogos de las proteínas pueden identificarse mediante muestreo de bancos combinatorios de mutantes, tal como por ejemplo mutantes de acortamiento. Por ejemplo puede generarse un banco variegado de variantes de proteínas mediante mutagénesis combinatoria en el plano de ácido nucleico, tal como por ejemplo mediante ligamiento enzimático de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Existe una pluralidad de procedimientos que pueden usarse para la preparación de bancos de homólogos potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede realizarse en un dispositivo automático de síntesis de ADN y el gen sintético puede ligarse entonces en un vector de expresión adecuado. El uso de un conjunto de genes degenerado permite la facilitación de todas las secuencias en una mezcla, que codifican el conjunto deseado de posibles secuencias de proteínas. El experto conoce procedimientos para la síntesis de oligonucleótidos degenerados (por ejemplo Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura *et al.* (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura *et al.*, (1984) Science 198:1056; Ike *et al.* (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

15 En el estado de la técnica se conocen varias técnicas para el muestreo de productos génicos de bancos combinatorios, que se han preparado mediante mutaciones puntuales o acortamientos, y para el muestreo de bancos de ADNc para determinar productos génicos con una propiedad seleccionada. Estas técnicas pueden adaptarse al muestreo rápido de los bancos de genes que se han generado mediante mutagénesis combinatoria. Las técnicas usadas con la mayor frecuencia para el muestreo de grandes bancos de genes, que están sujetos a un análisis con alto rendimiento, comprenden la clonación del banco de genes en vectores de expresión que pueden replicarse, la transformación de las células adecuadas con el banco de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en condiciones, bajo las cuales la detección de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen, cuyo producto se detectó. La mutagénesis de conjunto recursivo (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en los bancos, puede usarse en combinación con el ensayo de muestreo para identificar homólogos (Arkin y Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

2. Ácidos nucleicos y constructos.

2.1 Ácidos nucleicos

30 Se divulgan también secuencias de ácido nucleico, que codifican para una enzima tal como la descrita anteriormente o un mutante anteriormente descrito de la misma con actividad aldoxima-deshidratasa.

Igualmente se divulgan ácidos nucleicos con un determinado grado de identidad a las secuencias concretas descritas en el presente documento.

35 Por "identidad" entre dos ácidos nucleicos se entiende la identidad de los nucleótidos por en cada caso toda la longitud del ácido nucleico, en particular la identidad que se calcula mediante comparación con ayuda del software Vector NTI Suite 7.1 de la empresa Informax (EE.UU.) usando el procedimiento Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. abril de 1989;5(2):151-1) con ajuste de los siguiente parámetros:

Parámetros de alineamiento múltiple:

penalización por apertura de huecos	10
penalización por extensión de huecos	10
intervalo de penalización por separación de huecos	8
penalización por separación de huecos	off
% de identidad de retraso de alineamiento	40
huecos específicos de residuos	off
hueco de residuo hidrófilo	off
ponderación de transición	0

40 Parámetro de alineamiento de pares:

algoritmo FAST	on
tamaño K-tuple	1
penalización por huecos	3
tamaño de ventana	5
número de las mejores diagonales	5

Como alternativa a esto puede determinarse la identidad también según Chenna, Ramu, Sugawara, Hideaki, Koike, Tadashi, Lopez, Rodrigo, Gibson, Toby J, Higgins, Desmond G, Thompson, Julie D. Multiple sequence alignment

with the Clustal series of programs. (2003) *Nucleic Acids Res* 31 (13):3497-500, de acuerdo con la dirección de internet: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html#> y con los siguientes parámetros:

Penalización por apertura de huecos de ADN	15.0
penalización por extensión de huecos de ADN	6.66
matriz de ADN	identidad
penalización por apertura de huecos de proteína	10.0
penalización por extensión de huecos de proteína	0.2
matriz de proteína	Gonnet
Proteína/ADN ENDGAP	-1
Proteína/ADN GAPDIST	4

5 Todas las secuencias de ácido nucleico (secuencias de ARN y ADN de cadena sencilla y doble, tal como por ejemplo ADNc y ARNm) mencionadas en el presente documento pueden prepararse de manera en sí conocida mediante síntesis química a partir de los módulos de nucleótidos, tal como por ejemplo mediante condensación de fragmentos de módulos de ácido nucleico individuales, solapantes, complementarios de la doble hélice. La síntesis química de oligonucleótidos puede realizarse por ejemplo, de manera conocida, según el procedimiento de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press New York, páginas 898-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el relleno de huecos con ayuda del fragmento Klenow de la ADN-polimerasa y reacciones de ligamiento así como procedimientos de clonación generales se describen en Sambrook *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

10 Se divulgan también secuencias de ácido nucleico (secuencias de ARN y ADN de cadena sencilla y doble, tal como por ejemplo ADNc y ARNm), que codifican para uno de los polipéptidos mencionados anteriormente y sus equivalentes funcionales, que son accesibles por ejemplo usando análogos de nucleótidos sintéticos.

15 Se divulgan tanto moléculas de ácido nucleico aisladas, que codifican para polipéptidos o proteínas o fragmentos biológicamente activos de los mismos, como también fragmentos de ácido nucleico que pueden usarse por ejemplo para su uso como sondas de hibridación o cebadores para la identificación o amplificación de ácidos nucleicos codificantes divulgados en cuestión.

20 Las moléculas de ácido nucleico pueden contener además secuencias no traducidas por el extremo en 3' y/o en 5' de la región génica codificante.

Se divulgan además las moléculas de ácido nucleico, o un fragmento de las mismas, complementarias a las secuencias de nucleótidos descritas de manera concreta.

25 Las secuencias de nucleótidos posibilitan la generación de sondas y cebadores que pueden usarse para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas en otros tipos de célula y organismos. Tales sondas o cebadores comprenden habitualmente una región de secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones "rigurosas" (véase a continuación) con al menos aproximadamente 12, preferentemente al menos aproximadamente 25, tal como por ejemplo aproximadamente 40, 50 ó 75 nucleótidos consecutivos de una cadena sentido de una secuencia de ácido nucleico divulgada en cuestión o de una correspondiente cadena antisentido.

30 Una molécula de ácido nucleico "aislada" se separa de otras moléculas de ácido nucleico, que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y puede estar además esencialmente libre de otro material celular o medio de cultivo, cuando ésta se prepara mediante técnicas recombinantes, o puede estar libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando ésta se sintetiza químicamente.

35 Una molécula de ácido nucleico divulgada en cuestión puede aislarse por medio de técnicas convencionales de biología molecular y la información de secuencia facilitada. Por ejemplo puede aislarse ADNc de un banco de ADNc adecuado, usándose una de las secuencias completas divulgadas de manera concreta o un fragmento de la misma como sonda de hibridación y técnicas de hibridación convencionales (tal como se describe por ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además puede aislarse una molécula de ácido nucleico, que comprende una de las secuencias divulgadas o un fragmento de la misma, mediante reacción en cadena de la polimerasa, usándose los cebadores de oligonucleótidos que se crearon basándose en esta secuencia. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector adecuado y puede caracterizarse mediante análisis de secuencia de ADN. Los oligonucleótidos pueden prepararse además mediante procedimientos de síntesis convencionales, por ejemplo con un aparato de síntesis de ADN automático.

45 Las secuencias de ácido nucleico divulgadas en cuestión o derivados de las mismas, los homólogos o partes de estas secuencias, pueden aislarse por ejemplo con procedimientos de hibridación habituales o la técnica de PCR de otras bacterias, por ejemplo por medio de bancos genómicos o de ADNc. Estas secuencias de ADN hibridan en condiciones estándares con las secuencias divulgadas en cuestión.

Por "hibridar" se entiende la capacidad de un polinucleótido u oligonucleótido de unirse a una secuencia casi complementaria en condiciones estándares, mientras que en estas condiciones no tienen lugar uniones inespecíficas entre componentes no complementarios. Para ello pueden ser complementarias las secuencias en un 90-100 %. La propiedad de secuencias complementarias de poder unirse específicamente una con otra, se aprovecha por ejemplo en la técnica de inmunotransferencia de tipo Northern o de tipo Southern o en caso de unión de cebadores en PCR o RT-PCR.

Para la hibridación se usan ventajosamente oligonucleótidos cortos de las regiones conservadas. Pueden usarse sin embargo también fragmentos más largos de los ácidos nucleicos divulgados en cuestión o las secuencias completas para la hibridación. Dependiendo del ácido nucleico usado (oligonucleótido, fragmento más largo o secuencia completa) o dependiendo de qué tipo de ácido nucleico ADN o ARN se use para la hibridación, varían estas condiciones estándares. Así se encuentran por ejemplo las temperaturas de fusión para híbridos de ADN:ADN aproximadamente 10 °C más bajas que la misma longitud de híbridos de ADN:ARN.

Por condiciones estándares ha de entenderse por ejemplo dependiendo del ácido nucleico temperaturas entre 42 y 58 °C en una solución acuosa de tampón con una concentración entre 0,1 y 5 x SSC (1 X SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7,2) o adicionalmente en presencia de formamida al 50 % tal como por ejemplo 42 °C en 5 x SSC, formamida al 50 %. Ventajosamente se encuentran las condiciones de hibridación para híbridos de ADN:ADN en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 20 °C y 45 °C, preferentemente entre aproximadamente 30 °C y 45 °C. Para híbridos de ADN:ARN se encuentran las condiciones de hibridación ventajosamente en 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 30 °C y 55 °C, preferentemente entre aproximadamente 45 °C y 55 °C. Estas temperaturas indicadas para la hibridación son valores de temperatura de fusión calculados a modo de ejemplo para un ácido nucleico con una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y un contenido en G + C del 50 % en ausencia de formamida. Las condiciones experimentales para la hibridación de ADN están descritas en libros de texto pertinentes de genética, tal como por ejemplo Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, y pueden calcularse según fórmulas conocidas por el experto por ejemplo dependiendo de la longitud de los ácidos nucleicos, del tipo de los híbridos o el contenido en G + C. el experto puede sacar información adicional con respecto a la hibridación de los siguientes libros de texto: Ausubel *et al.* (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

La "hibridación" puede realizarse en particular en condiciones rigurosas. Tales condiciones de hibridación están descritas por ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., en: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57 o en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

Por condiciones de hibridación "rigurosas" se entiende en particular: la incubación a 42 °C durante la noche en una solución que está compuesta del 50 % de formamida, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato de tri-sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10 % de sulfato de dextrano y 20 g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, cortado, seguido de una etapa de lavado del filtro con 0,1x SSC a 65 °C.

Se divulgan también derivados de las secuencias de ácido nucleico que pueden derivarse o divulgadas de manera concreta.

Así pueden derivarse otras secuencias de ácido nucleico divulgadas en cuestión, que codifican para aldoxima-deshidratasa, por ejemplo de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y diferenciarse de las mismas mediante adición, sustitución, inserción o delección de nucleótidos individuales o varios nucleótidos, sin embargo pueden codificar además para polipéptidos con el perfil de propiedades deseado.

Están comprendidas también aquellas secuencias de ácido nucleico que comprenden las denominadas mutaciones silenciosas o están modificadas de manera correspondiente al uso de codones de un organismo originario o huésped especial, en comparación con una secuencia mencionada de manera concreta, tal como por ejemplo SEQ ID NO: 3, que está optimizada partiendo de SEQ ID NO: 2 con respecto al uso de codones de *E. coli*, al igual que las variantes de la misma que se producen de manera natural, tal como por ejemplo variantes de empalme o variantes de alelo.

Se divulgan igualmente mediante secuencias que pueden obtenerse mediante sustituciones de nucleótidos conservadoras (es decir el respectivo aminoácido se sustituye por un aminoácido de igual carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

Se divulgan también las moléculas derivadas mediante polimorfismo de secuencias de los ácidos nucleicos divulgados de manera concreta. Estos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población debido a la variación natural. Estas variaciones naturales provocan habitualmente una varianza del 1 al 5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen.

Por derivados de las secuencias de ácido nucleico divulgadas, que codifican para aldoxima-deshidratasa, derivadas de la secuencia SEQ ID NO: 3 o de una de las secuencias codificantes con respecto a SEQ ID NO: 1, ha de

entenderse por ejemplo variantes de alelo que presentan al menos un 60 % de homología en el plano de aminoácidos derivados, preferentemente al menos un 80 % de homología, de manera muy especialmente preferente al menos un 90 % de homología por toda la región de secuencia (con respecto a la homología en el plano de aminoácidos se remite a las realizaciones mencionadas anteriormente con respecto a los polipéptidos). Por zonas parciales de las secuencias pueden encontrarse las homologías ventajosamente más altas.

Adicionalmente ha de entenderse por derivados también homólogos de las secuencias de ácido nucleico divulgadas, por ejemplo homólogos fúngicos o bacterianos, secuencias acortadas, ARN o ADN de cadena sencilla de la secuencia de ADN codificante y no codificante.

Además ha de entenderse por derivados por ejemplo fusiones con promotores. Los promotores, que están conectados previamente a las secuencias de nucleótidos indicadas, pueden estar modificados mediante al menos un intercambio de nucleótidos, al menos una inserción, inversión y/o delección, sin que se vea alterada sin embargo la funcionalidad o actividad de los promotores. Además puede elevarse la actividad de los promotores mediante modificación de su secuencia o pueden intercambiarse completamente los promotores por promotores más eficaces también de organismos de otra especie.

15 2.2 Generación de mutantes funcionales

El experto conoce además procedimientos para la generación de mutantes funcionales de las enzimas.

Dependiendo de la técnica usada puede introducir el experto mutaciones completamente casuales o también más dirigidas en genes o también regiones de ácido nucleico no codificantes (que son importantes por ejemplo para la regulación de la expresión) y a continuación puede crear bancos de genes. Los procedimientos de biología molecular necesarios para ello los conoce el experto y están descritos por ejemplo en Sambrook y Russell, Molecular Cloning. 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

Los procedimientos para la modificación de genes y por consiguiente para la modificación de las proteínas codificadas por éstos son familiares desde hace tiempo para el experto, tal como por ejemplo

- la mutagénesis específica del sitio, en la que se intercambian de manera dirigida nucleótidos individuales o varios nucleótidos de un gen (Trower MK (ed.) 1996; In vitro mutagenesis protocols. Humana Press, New Jersey),
- la mutagénesis por saturación, en la que en cualquier sitio discrecional de un gen puede intercambiarse o añadirse un codón para un aminoácido discrecional (Kegler-Ebo DM, Docktor CM, DiMaio D (1994) Nucleic Acids Res 22:1593; Baretino D, Feigenbutz M, Valcárel R, Stunnenberg HG (1994) Nucleic Acids Res 22:541; Barik S (1995) Mol Biotechnol 3:1),
- la reacción en cadena de la polimerasa susceptible a errores (error-prone PCR), en la que se mutan secuencias de nucleótidos mediante ADN-polimerasas que actúan de manera errónea (Eckert KA, Kunkel TA (1990) Nucleic Acids Res 18:3739),
- el procedimiento SeSaM (*Sequence Saturation Method*, procedimiento de saturación de secuencias), en el que se impiden intercambios preferentes mediante la polimerasa (Schenk *et al.*, Biospektrum, vol. 3, 2006, 277-279),
- el pasaje de genes en cepas mutadoras, en los que por ejemplo debido a los mecanismos de reparación de ADN defectuosos se produce una elevada tasa de mutación de secuencias de nucleótidos (Greener A, Callahan M, Jerpseth B (1996) An efficient random mutagenesis technique using an E.coli mutator strain. En: Trower MK (ed.) In vitro mutagenesis protocols. Humana Press, New Jersey) o
- la transposición de ADN, en la que una combinación de genes muy relacionados se forma y se digiere y los residuos se usan como moldes para una reacción en cadena de la polimerasa, en la que se generan mediante separación repetida de las cadenas y nueva aproximación por último genes de mosaico de longitud completa (Stemmer WPC (1994) Nature 370:389; Stemmer WPC (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:10747).

Usando la denominada evolución dirigida ("*directed evolution*"; descrita entre otros en Reetz MT y Jaeger K-E (1999), Topics Curr Chem 200:31; Zhao H, Moore JC, Volkov AA, Arnold FH (1999), Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution, en: Demain AL, Davies JE (ed.) Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology) puede generar el experto mutantes funcionales también de manera dirigida y también a gran escala. A este respecto se generan en una primera etapa en primer lugar bancos de genes de las respectivas proteínas, pudiéndose usar por ejemplo los procedimientos indicados anteriormente. Los bancos de genes se expresan de manera adecuada, por ejemplo mediante bacterias o mediante sistemas de presentación en fagos.

Los respectivos genes de organismos huéspedes, que expresan mutantes funcionales con propiedades que corresponden en gran parte a las propiedades deseadas, pueden someterse a otra ronda de mutación. Las etapas de la mutación y de la selección o del muestreo pueden repetirse de manera iterativa hasta que los mutantes funcionales existentes presenten las propiedades deseadas en medida suficiente. Mediante este modo de funcionamiento iterativo puede realizarse gradualmente un número limitado de mutaciones, tal como por ejemplo 1, 2, 3, 4 ó 5 mutaciones y puede valorarse con respecto su influencia sobre la respectiva propiedad de enzima y seleccionarse. El mutante seleccionado puede someterse entonces de igual manera a otra etapa de mutación. Debido a ello puede reducirse significativamente el número de los mutantes individuales que van a someterse a

estudio.

Los resultados proporcionan también información importante con respecto a la estructura y la secuencia de las respectivas enzimas, que es necesaria para generar de manera dirigida otras enzimas con propiedades modificadas deseadas. En particular pueden definirse los denominados “*hot spots*”, es decir fragmentos de secuencia que son potencialmente adecuados para modificar una propiedad de enzima a través de la introducción de mutaciones dirigidas.

Igualmente puede deducirse la información con respecto a las posiciones de secuencias de aminoácidos de en qué región pueden realizarse mutaciones que debían tener probablemente poca influencia sobre la actividad enzimática y pueden designarse como posibles “mutaciones silenciosas”.

2.3 Constructos

Se divulgan además constructos de expresión, en particular recombinantes, que contienen bajo el control genético de secuencias de ácido nucleico reguladoras una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido; así como vectores, en particular recombinantes, que comprenden al menos uno de estos constructos de expresión.

Por una “unidad de expresión” se entiende un ácido nucleico con actividad de expresión que comprende un promotor, tal como se define en el presente documento y tras el enlace funcional con un ácido nucleico que va a expresarse o un gen regula la expresión, o sea la transcripción y la traducción de este ácido nucleico o de este gen. Se habla por tanto también en este contexto de una “secuencia de ácido nucleico reguladora”. De manera adicional al promotor pueden estar contenidos otros elementos reguladores, tales como por ejemplo potenciadores.

Por un “casete de expresión” o “constructo de expresión” se entiende una unidad de expresión que está enlazada funcionalmente con el ácido nucleico que va a expresarse o el gen que va a expresarse. A diferencia de una unidad de expresión, un casete de expresión comprende por consiguiente no sólo secuencias de ácido nucleico que regulan la transcripción y la traducción, sino también las secuencias de ácido nucleico que deben expresarse como proteína como consecuencia de la transcripción y traducción.

Los términos “expresión” o “sobreexpresión” describen en el contexto de la invención la producción o el aumento de la actividad intracelular de una o varias enzimas en un microorganismo, que se codifican mediante el correspondiente ADN. Para ello puede introducirse por ejemplo un gen en un organismo, puede sustituirse un gen existente por otro gen, puede elevarse el número de copias del gen o de los genes, puede usarse un promotor fuerte o puede usarse un gen que codifica para una correspondiente enzima con una alta actividad y pueden combinarse eventualmente estas medidas.

Preferentemente comprenden tales constructos en el sentido de 5' de la respectiva secuencia codificante un promotor y en el sentido de 3' una secuencia terminadora así como eventualmente otros elementos reguladores habituales, y concretamente en cada caso de manera enlazada operativamente con la secuencia codificante.

Por un “promotor”, un “ácido nucleico con actividad promotor” o una “secuencia promotor” se entiende un ácido nucleico que, en enlace funcional con un ácido nucleico que va a transcribirse, regula la transcripción de este ácido nucleico.

Por un enlace “funcional” u “operativo” se entiende en este contexto por ejemplo la disposición secuencial de uno de los ácidos nucleicos con actividad promotor y una secuencia de ácido nucleico que va a transcribirse y eventualmente otros elementos reguladores, tales como por ejemplo secuencias de ácido nucleico, que garantizan la transcripción de ácidos nucleicos, así como por ejemplo un terminador; de manera que cada uno de los elementos reguladores puede cumplir su función en la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. Para ello no es forzosamente necesario un enlace directo en el sentido químico. Las secuencias control genéticas, tal como por ejemplo secuencias de potenciador, pueden ejercer su función también desde posiciones más alejadas o incluso desde otras moléculas de ADN en la secuencia diana. Se prefieren disposiciones en las que la secuencia de ácido nucleico que va a transcribirse se posiciona detrás (es decir en el extremo de 3') de la secuencia promotor, de modo que ambas secuencias están unidas entre sí de manera covalente. A este respecto, la distancia entre la secuencia promotor y la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse de manera transgénica puede ser más baja de 200 pares de bases o puede ser inferior a 100 pares de bases o inferior a 50 pares de bases.

Además de los promotores y el terminador pueden mencionarse como ejemplos de otros elementos reguladores secuencias de selección como diana, potenciador, señales de poliadenilación, marcadores seleccionables, señales de amplificación, orígenes de replicación y similares. Secuencias reguladoras adecuadas están descritas por ejemplo en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Los constructos de ácido nucleico divulgados en cuestión comprenden en particular una secuencia codificante para un mutante de aldoxima-deshidratasa, en particular una SEQ ID NO: 3 derivada de la secuencia de ácido nucleico que codifica para una PAOx de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y adaptada al uso de codones de *E. coli* o derivados y homólogos de la misma, así como las secuencias de ácido nucleico que pueden derivarse de la misma, que se

enlazaron operativa o funcionalmente con una o varias señales de regulación ventajosamente para el control, por ejemplo aumento, de la expresión génica.

5 De manera adicional a estas secuencias de regulación puede estar presente aún la regulación natural de estas secuencias delante de los propios genes estructurales y puede haberse modificado eventualmente de manera genética, de modo que se desconectó la regulación natural y aumentó la expresión de los genes. El constructo de ácido nucleico puede estar construido sin embargo de manera sencilla, es decir no se insertaron señales de regulación adicionales delante de la secuencia codificante y no se separó el promotor natural con su regulación. En lugar de esto se muta la secuencia de regulación natural de modo que ya no se realiza ninguna regulación y aumenta la expresión génica.

10 Un constructo de ácido nucleico preferente contiene ventajosamente también una o varias de las ya mencionadas secuencias de "potenciador", enlazadas funcionalmente con el promotor, que permite una expresión elevada de la secuencia de ácido nucleico. También en el extremo de 3' de las secuencias de ADN pueden insertarse secuencias ventajosas adicionales, tal como otros elementos reguladores o terminadores. Los ácidos nucleicos divulgados en cuestión pueden estar contenidos en una o varias copias en el constructo. En el constructo pueden estar contenidos
15 aún otros marcadores, tales como genes de complementación de auxotrofías o resistencias a antibióticos, eventualmente para la selección para determinar el constructo.

Ejemplos de secuencias de regulación adecuadas están contenidas en los promotores tales como promotor *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpplac*, *lacI^q*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara*, *rhaP* (*rhaP_{BAD}*)*SP6*, *lambda-P_R* o en el promotor *lambda-P_L*, que se usan ventajosamente en bacterias Gram negativas. Otras secuencias de regulación ventajosas están
20 contenidas por ejemplo en los promotores Gram positivos *amy* y *SPO2*, en los promotores de levadura u hongos *ADC1*, *MFalpha*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH*. Pueden usarse también promotores sintéticos para la regulación.

El constructo de ácido nucleico se inserta para la expresión en un organismo huésped ventajosamente en un vector, tal como por ejemplo un plásmido o un fago, que permite una expresión óptima de los genes en el huésped. Por
25 vectores ha de extenderse aparte de plásmidos y fagos también todos los otros vectores conocidos por el experto, o sea por ejemplo virus, tales como *SV40*, *CMV*, *baculovirus* y *adenovirus*, transposones, elementos *IS*, fásmidos, cósmidos y ADN lineal o circular. Estos vectores pueden replicarse de manera autónoma en el organismo huésped o pueden replicarse de manera cromosómica.

Plásmidos adecuados son por ejemplo en *E. coli* *pLG338*, *pACYC184*, *pBR322*, *pUC18*, *pUC19*, *pKC30*, *pRep4*,
30 *pHS1*, *pKK223-3*, *pDHE19.2*, *pHS2*, *pPlc236*, *pMBL24*, *pLG200*, *pUR290*, *pIN-III113-B1*, *Agt11* o *pBdCl*, en *Streptomyces* *pIJ101*, *pIJ364*, *pIJ702* o *pIJ361*, en *Bacillus* *pUB110*, *pC194* o *pBD214*, en *Corynebacterium* *pSA77* o *pAJ667*, en hongos *pALS1*, *pIL2* o *pBB116*, en levaduras *2alphaM*, *pAG-1*, *YE6*, *YE13* o *pEMBLYe23* o en plantas *pLGV23*, *pGHlac+*, *pBIN19*, *pAK2004* o *pDH51*. Los plásmidos mencionados representan una selección pequeña de los posibles plásmidos. Otros plásmidos se conocen bien por el experto y pueden deducirse por ejemplo del *Buch*
35 *Cloning Vectors* (Eds. Pouwels P. H. *et al.* Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

En otra forma de realización del vector puede introducirse el vector que contiene el constructo de ácido nucleico o el ácido nucleico también ventajosamente en forma de un ADN lineal en los microorganismos y a través de la recombinación heteróloga u homóloga puede integrarse en el genoma del organismo huésped. Este ADN lineal puede estar constituido por un vector linealizado, tal como un plásmido, o sólo por el constructo de ácido nucleico el
40 ácido nucleico.

Para una expresión óptima de genes heterólogos en organismos es ventajoso modificar las secuencias de ácido nucleico de manera correspondiente al "uso de codones" específico usado en el organismo. El "uso de codones" puede determinarse fácilmente por medio de valoraciones informáticas de otros genes conocidos del respectivo organismo.

45 La preparación de un casete de expresión divulgado en cuestión se realiza mediante fusión de un promotor adecuado con una secuencia de nucleótidos codificante adecuada así como una señal de terminador o de poliadenilación. Para ello se usan técnicas de recombinación y clonación habituales, tal como se describen por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como en T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987).
50

El constructo de ácido nucleico o constructo génico recombinante se inserta para la expresión en un organismo huésped adecuado ventajosamente en un vector específico del huésped que permite una expresión óptima de los genes en el huésped. Los vectores los conoce bien el experto y puede deducirse por ejemplo de "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. *et al.*, ed., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985).
55

3. Microorganismos

Dependiendo del contexto puede entenderse por el término “microorganismo” el microorganismo de tipo natural o un microorganismo recombinante, modificado genéticamente o ambos.

5 Con ayuda de los vectores divulgados en cuestión pueden prepararse microorganismos recombinantes que están transformados, por ejemplo, con al menos un vector divulgado en cuestión y pueden usarse para la producción de los polipéptidos. Ventajosamente se introducen los constructos recombinantes descritos anteriormente en un sistema huésped adecuado y se expresan. A este respecto se usan preferentemente procedimientos de clonación y transfección habituales conocidos por el experto, tales como por ejemplo co-precipitación, fusión de protoplastos, electroporación, transfección retroviral y similares, para llevar a expresión los ácidos nucleicos mencionados en el respectivo sistema de expresión. Se describen sistemas adecuados por ejemplo en Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel *et al.*, ed., Wiley Interscience, New York 1997, o Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

15 Como organismos huéspedes recombinantes para el ácido nucleico divulgado o el constructo de ácido nucleico se tienen en cuenta principalmente todos los organismos procariontes o eucariontes. Ventajosamente se usan como organismos huéspedes microorganismos tales como bacterias, hongos o levaduras. Ventajosamente se usan bacterias Gram positivas o Gram negativas, preferentemente bacterias de las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomycetaceae o Nocardiaceae, de manera especialmente preferente bacterias de los géneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Burkholderia*, *Salmonella*, *Agrobacterium*, *Clostridium* o *Rhodococcus*. Se prefiere muy especialmente el género y la especie *Escherichia coli*. Otras bacterias ventajosas pueden encontrarse además en el grupo de las alfa-proteobacterias, beta-proteobacterias o gamma-proteobacterias.

25 El organismo huésped o los organismos huéspedes contienen a este respecto ventajosamente al menos una de las secuencias de ácido nucleico, constructos de ácido nucleico o vectores divulgados en el presente documento, que codifican para una enzima con actividad feniletanol deshidrogenasa de acuerdo con la definición mencionada anteriormente.

30 Los organismos usados en el procedimiento de acuerdo con la invención se cultivan o se hacen crecer dependiendo del microorganismo huésped de manera conocida para el experto. Los microorganismos se cultivan por regla general en un medio líquido que contiene una fuente de carbono en la mayoría de los casos en forma de azúcares, una fuente de nitrógeno en la mayoría de los casos en forma de fuentes de nitrógeno orgánicas tal como extracto de levadura o sales tales como sulfato de amonio, oligoelementos tales como sales de hierro, manganeso, magnesio y eventualmente vitaminas, a temperaturas entre 0 °C y 100 °C, preferentemente entre 10 °C y 60 °C con gasificación de oxígeno. A este respecto puede mantenerse el pH del líquido nutriente en un valor fijo, es decir durante el cultivo puede regularse o no. El cultivo puede realizarse de manera “discontinua”, “semi-continua” o de manera continua. Los nutrientes pueden disponerse al inicio de la fermentación o pueden alimentarse posteriormente de manera semi-continua o continua.

4. Preparación recombinante de enzimas

40 Se divulgan adicionalmente procedimientos para la preparación recombinante de los polipéptidos o fragmentos funcionales, biológicamente activos de los mismos, en los que se cultiva un microorganismo productor de polipéptidos, eventualmente se induce la expresión de los polipéptidos y éstos se aíslan del cultivo. Los polipéptidos pueden producirse así también a escala técnica, en caso de que se desee esto.

45 Los microorganismos preparados pueden cultivarse de manera continua o discontinua en el procedimiento *batch* (cultivo por lotes) o en el procedimiento *fed batch* (procedimiento de lote alimentado) o procedimiento *repeated fed batch* (procedimiento de lote alimentado repetitivo). Un resumen sobre los procedimientos de cultivo conocidos puede encontrarse en el libro de texto de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

50 El medio de cultivo que va a usarse ha de cumplir de manera adecuada las exigencias de las respectivas cepas. Ciertas descripciones de medios de cultivo de distintos microorganismos están contenidas en el manual “Manual of Methods für General Bacteriology” de la Sociedad Americana de Bacteriología (Washington D. C., EE.UU., 1981).

Estos medios que pueden usarse comprenden habitualmente una o varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/u oligoelementos.

55 Las fuentes de carbono preferentes son azúcares, tales como mono-, di- o polisacáridos. Son fuentes de carbono muy buenas por ejemplo glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. Pueden proporcionarse azúcares también a través de compuestos complejos, tales como melazas, u otros productos secundarios del refinado de azúcar, a los medios. Puede ser también ventajoso añadir mezclas de distintas fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas tales como

por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos tales como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico o ácido linoleico, alcoholes tales como por ejemplo glicerol, metanol o etanol y ácidos orgánicos tales como por ejemplo ácido acético o ácido láctico.

5 Las fuentes de nitrógeno son habitualmente compuestos de nitrógeno orgánicos o inorgánicos o materiales que contienen estos compuestos. Las fuentes de nitrógeno a modo de ejemplo comprenden gas amoníaco o sales de amonio, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes de nitrógeno complejas, tales como agua de remojo de maíz, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno pueden usarse individualmente o como mezcla.

10 Los compuestos de sal inorgánicos que pueden estar contenidos en los medios, comprenden las sales de cloruro, fosfóricas o de sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, cinc, cobre y hierro.

Como fuente de azufre pueden usarse compuestos que contienen azufre inorgánicos tales como por ejemplo sulfatos, sulfitos, ditionitas, tetracionatos, tiosulfatos, sulfuros sin embargo también compuestos de azufre orgánicos, tales como mercaptanos y tioles.

15 Como fuente de fósforo pueden usarse ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato de dipotasio o las correspondientes sales que contienen sodio.

Pueden añadirse agentes formadores de quelato al medio para mantener en solución los iones metálicos. Los agentes formadores de quelato especialmente adecuados comprenden dihidroxifenoles, tales como catecol o protocatecuato, o ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico.

20 Los medios de fermentación usados contienen habitualmente también otros factores de crecimiento, tales como vitaminas o agentes favorecedores del crecimiento, a los que pertenecen por ejemplo biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y sales proceden con frecuencia de componentes de medios complejos, tales como extracto de levadura, melazas, agua de remojo de maíz y similares. Al medio de cultivo pueden añadirse además precursores adecuados. La composición exacta de los
25 compuestos de medios depende mucho del respectivo experimento y se decide individualmente para cada caso específico. La información sobre la optimización de medios puede obtenerse del libro de texto "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (ed. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) pág. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Los medios de crecimientos pueden adquirirse también por proveedores comerciales, tales como Standard 1 (Merck) o BHI (*Brain heart infusion*, DIFCO) y similares.

30 Todos los componentes de medios se esterilizan, o bien mediante calor (20 min con 150 kPa y 121 °C) o mediante filtración estéril. Los componentes pueden esterilizarse o bien conjuntamente o en caso necesario por separado. Todos los componentes de medios pueden estar presentes al inicio del cultivo o pueden añadirse de manera optativa continuamente o por cargas.

35 La temperatura del cultivo se encuentra normalmente entre 15 °C y 45 °C, preferentemente a de 25 °C a 40 °C y puede mantenerse constante o puede modificarse durante el experimento. El valor de pH del medio debía encontrarse en el intervalo de 5 a 8,5, preferentemente en 7,0. El valor de pH para el cultivo puede controlarse durante el cultivo mediante adición de compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o agua de amoníaco o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control del desarrollo de espuma pueden usarse agentes antiespumantes, tales como por ejemplo ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para el mantenimiento de la estabilidad de plásmidos pueden añadirse al medio sustancias
40 adecuadas que actúan selectivamente, tales como por ejemplo antibióticos. Para mantener las condiciones aeróbicas se introduce oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, tales como por ejemplo aire ambiente, en el cultivo. La temperatura del cultivo se encuentra normalmente a de 20 °C a 45 °C. El cultivo se continúa tanto tiempo hasta que se haya formado un máximo del producto deseado. Este objetivo se consigue normalmente en el
45 intervalo de 10 horas a 160 horas.

El caldo de fermentación se procesa posteriormente a continuación. Dependiendo del requerimiento puede separarse la biomasa total o parcialmente mediante procedimientos de separación, tales como por ejemplo centrifugación, filtración, decantación o una combinación de estos procedimientos, del caldo de fermentación o puede dejarse en el mismo completamente.

50 Las células pueden solubilizarse también, en el caso de que los polipéptidos no se secreten en el medio de cultivo, y puede obtenerse del lisado el producto según procedimientos de aislamiento de proteínas conocidos. Las células pueden solubilizarse opcionalmente mediante ultrasonidos de alta frecuencia, mediante alta presión, tal como por ejemplo en una célula de presión francesa, mediante osmólisis, mediante acción de detergentes, enzimas líticas o disolventes orgánicos, mediante homogeneizadores o mediante combinación de varios de los procedimientos
55 expuestos.

Una purificación de los polipéptidos puede conseguirse con procedimientos cromatográficos conocidos, tal como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), tal como cromatografía en Q-Sepharose, cromatografía de

intercambio iónico y cromatografía hidrófoba, así como con otros procedimientos habituales tales como ultrafiltración, cristalización, precipitación salina, diálisis y electroforesis en gel nativa. Se describen procedimientos adecuados por ejemplo en Cooper, T. G., *Biochemische Arbeitsmethoden*, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York o en Scopes, R., *Protein Purification*, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

5 Puede ser ventajoso para el aislamiento de la proteína recombinante usar sistemas de vector u oligonucleótidos, que alargan el ADNc en determinadas secuencias de nucleótidos y con ello codifican para polipéptidos o proteínas de fusión modificadas, que sirven por ejemplo para una purificación más sencilla. Las modificaciones adecuadas de este tipo son por ejemplo las denominadas "etiquetas" que actúan como anclas, tal como por ejemplo la modificación conocida como ancla de hexa-histidina o epítomos que pueden reconocerse como antígenos por anticuerpos
10 (descrito por ejemplo en Harlow, E. and Lane, D., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Estas anclas pueden servir para el anclaje de las proteínas en un soporte sólido, tal como por ejemplo una matriz polimérica, que puede introducirse por ejemplo en una columna de cromatografía, o puede usarse en una placa de microtitulación o en otro soporte.

15 Al mismo tiempo pueden usarse estas anclas también para el reconocimiento de las proteínas. Para el reconocimiento de las proteínas pueden usarse además marcadores habituales, tales como colorantes fluorescentes, marcadores enzimáticos, que tras la reacción con un sustrato forman un producto de reacción detectable, o marcadores radiactivos, solos o en combinación con las anclas para la derivatización de las proteínas.

5. Inmovilización de enzimas

20 Las enzimas pueden usarse en los procedimientos descritos en el presente documento de manera libre o inmovilizada. Por una enzima inmovilizada se entiende una enzima que está fijada en un soporte inerte. Se conocen materiales de soporte adecuados así como las enzimas inmovilizadas en los mismos por el documento EP-A-1149849, EP-A-1 069 183 y el documento DE-OS 100193773 así como por las citas bibliográficas citadas en los mismos. A la divulgación de estos documentos se hace referencia con respecto a esto en su totalidad. A los materiales de soporte adecuados pertenecen por ejemplo arcilla, minerales de arcilla, tales como caolinita, tierra de diatomeas, perlita, dióxido de silicio, óxido de aluminio, carbonato de sodio, carbonato calcio, polvo de celulosa,
25 materiales intercambiadores de aniones, polímeros sintéticos, tales como poliestireno, resinas acrílicas, resinas de fenol-formaldehído, poliuretanos y poliolefinas, tales como polietileno y polipropileno. Los materiales de soporte se usan para la preparación de las enzimas soportadas habitualmente en forma finamente dividida, en forma de partículas, prefiriéndose formas porosas. El tamaño de partícula del material de soporte asciende habitualmente a no más de 5 mm, en particular no más de 2 mm (línea de tamiz). De manera análoga, con el uso de la deshidrogenasa como catalizador de célula entera puede seleccionarse una forma libre o inmovilizada. Los materiales de soporte son por ejemplo alginato de Ca y carragenano. Las enzimas como también células pueden reticularse también directamente con glutaraldehído (reticulación para dar CLEA). Se describen los correspondientes procedimientos de inmovilización y adicionales por ejemplo en J. Lalonde y A. Margolin "Immobilization of Enzymes" en K. Drauz y H.
30 Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* 2002, vol. III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim. Información adicional con respecto a las biotransformaciones y biorreactores para la realización de procedimientos de acuerdo con la invención se encuentra por ejemplo también en Rehm *et al* (Ed) *Biotechnology*, 2ª edición, vol. 3, capítulo 17, VCH, Weinheim.

6. Preparación biocatalítica de nitrilos

40 El procedimiento biocatalítico de acuerdo con la invención para la preparación de nitrilos a partir de las correspondientes oximas se realiza en presencia de una aldoxima alifática deshidratasa (4.99.1.5) o de una fenilacetaldoxima deshidratasa (PAOx) (EC 4.99.1.7). Ejemplos de tales enzimas comprenden al menos una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 ó 4 a 27, o una secuencia de aminoácidos idéntica a ésta en al menos el 60 %, tal como por ejemplo al menos el 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o el
45 99 %; o estando modificado hasta el 25 %, tal como por ejemplo hasta el 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o el 1 % de los restos de aminoácidos en comparación con una de las secuencias de acuerdo con SEQ ID NO: 1 ó 4 a 27 mediante adición, delección, inserción, sustitución, inversión o una combinación de esto, y que presenta aún al menos el 50 %, tal como por ejemplo al menos el 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o el 95 % de la actividad enzimática de SEQ ID NO: 1.

50 En particular se realiza el procedimiento de acuerdo con la invención en presencia de una enzima, presentando la enzima con la secuencia de proteínas de acuerdo con SEQ ID NO: 1. En particular está codificada la enzima por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o un equivalente funcional de la misma, en particular un equivalente funcional de acuerdo con SEQ ID NO: 3, que representa una secuencia de ácido nucleico con codones optimizados para la expresión en un microorganismo *E. coli*. A este respecto es la secuencia de ácido nucleico en particular parte constituyente de un constructo génico o vector. Tales constructos génicos o vectores se describen en detalle en la solicitud internacional PCT/EP2010/057696 en las páginas 16 a 20, a lo que se hace referencia expresa en el presente documento.

La célula huésped que contiene un constructo génico o un vector, en el que está contenidas la secuencia de ácido nucleico, que codifica la enzima con la actividad deseada, se designa también como organismo transgénico. La

preparación de tales organismos transgénicos se conoce en principio y se discute por ejemplo en la solicitud internacional PCT/EP2010/057696 en la página 20.

Como organismos transgénicos se seleccionan preferentemente células del grupo constituido por bacterias, cianobacterias, hongos y levaduras. Preferentemente se selecciona la célula de hongos del género *Pichia* o bacterias de los géneros *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Zymomonas*, *Rhodobacter*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Lactobacillus* o *Lactococcus*. De manera especialmente preferente se selecciona la célula de bacterias de las especies *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia glumae*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* o *Zymomonas mobilis*.

Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la invención que está caracterizado porque la enzima con la actividad de una aldoxima alifática deshidratasa (EC 4.99.1.5) o de una fenilacetaldoxima deshidratasa (en el presente documento designada también como PAOx) (EC 4.99.1.7) está codificada por un gen que se aisló de un microorganismo seleccionado entre *Zymomonas mobilis*, *metilococcus capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Frankia* spec, *Streptomyces coelicolor*, *Acetobacter pasteurianus* así como *Absidia* sp., tal como por ejemplo *A. corymbifera*; *Agrobacterium* sp., tal como por ejemplo *A. radiobacter*, *Alcaligenes* sp., tal como por ejemplo *A. faecalis*; *Arthrobacter* sp., tal como por ejemplo *A. crystallopoietes* o *A. ramosus*; *Aspergillus* sp., tal como por ejemplo *A. amstelodami*, *A. cellulosae*; *A. candidus* o *A. pulverulentus*; *Aureobacterium* sp., tal como por ejemplo *A. testaceum*; *Aureobasidium* sp., tal como por ejemplo *A. pullulans*; *Bacillus* sp., tal como por ejemplo *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. sp. OxB-1* o *B. subtilis*; *Botryotinia* sp., tal como por ejemplo *Botryotinia fuckeliana*; *Brevibacterium* sp., tal como por ejemplo *B. butanicum*; *Cellulomonas* sp., tal como por ejemplo *C. firmi*; *Coprinus* Sp., tal como por ejemplo *C. phlyctidosporus*; *Corynebacterium* sp, tal como por ejemplo *C. paurometabolum* o *C. rathavi*; *Cunninghamella* sp., tal como por ejemplo *C. echinulata* var. *Elegans*; *Flammulina* sp., tal como por ejemplo *F. sp. cepa* TPU 4675 o *F. velutipes*; *Flavobacterium* sp., tal como por ejemplo *F. aquatile*, *F. lutescens*, *F. rigense* o *F. suaveolens*; *Fusarium* sp., tal como por ejemplo *F. culmorum*, *F. oxysporum* f. sp. *Nicotianae* o *F. solani* var. *martii*; *Giberella* sp., tal como por ejemplo *Gibberella fujikuroi* o *Gibberella zeae*; *Keratinomyces* sp., tal como por ejemplo *K. ajelloi*; *Klebsiella* sp., tal como por ejemplo *K. pneumoniae*; *Leptosphaeria* sp., tal como por ejemplo *Leptosphaeria maculans*; *Micrococcus* sp.; tal como por ejemplo *M. luteus* o *M. ureae*; *Mortierella* sp., tal como por ejemplo *M. isabellina*; *M. ramanniana* var. *Angulispora* o *M. sp. TPU 4801*; *Mucor* sp., tal como por ejemplo *M. fragilis*; *Neosartorya* sp. tal como por ejemplo *N. fisheri*; *Nocardia* sp., tal como por ejemplo *N. asteroides*; *Phycomyces* sp., tal como por ejemplo *P. nitens*; *Proteus* sp., tal como por ejemplo *P. vulgaris*; *Pseudomonas* sp., tal como por ejemplo *Pseudomonas chioraphis* o *P. fluorescens*; *Pycnoporus* sp., tal como por ejemplo *P. coccineus*; *Rhizoctonia* sp., tal como por ejemplo *Rhizoctonia solani*; *Rhizopus*, tal como por ejemplo *R. nigricans* o *R. oryzae*; *Rhodococcus* sp., tal como por ejemplo *R. erythropolis* o *R. rhodochrous*; *Schizophyllum* sp., tal como por ejemplo *S. commune* o *S. sp. cepa* TPU 4435; *Sclerotinia* sp., tal como por ejemplo *Sclerotinia sclerotiorum*; *Talaromyces* sp., tal como por ejemplo *T. flavus*; *Serratia* sp., tal como por ejemplo *S. marcescens*; *Stenotrophomonas* sp., tal como por ejemplo *S. maltophilia*; *Xanthomonas* sp., tal como por ejemplo *X. flavus*. De manera especialmente preferente se aíslan los respectivos genes, en particular el gen para PAOx, de *Rhodococcus* sp., *Gibberella zeae* o en particular *Bacillus* sp.

Ejemplos de acetaldoxima alifática-deshidratasas, que pueden usarse de manera adecuada en el contexto de un procedimiento de acuerdo con la invención o cuyas secuencias son adecuadas como punto de partida para la generación de equivalentes funcionales, están mostrados en la siguiente tabla 1. Los números de acceso se refieren a los bancos de datos conocidos en la técnica REFSEQ y UNIPROT, pudiendo acceder el experto a las entradas de secuencia identificadas a través de los números de acceso por medio de servicios basados en internet, sin más también a otros bancos de datos tal como por ejemplo GeneBank o SwissProt.

Tabla 1:

SEQ ID NO:	número de acceso	descripción	n.º EC	organismo
4	YP_947647 (NCIB)	aldoxima-deshidratasa	4.99.1.5	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1
5	Q6FBU3	aldoxima-deshidratasa;	4.99.1.5	<i>Acinetobacter</i> sp. cepa ADP1

Ejemplos de fenilacetaldoxima-deshidratasas, que pueden usarse de manera adecuada en el contexto de un procedimiento de acuerdo con la invención o cuyas secuencias son adecuadas como punto de partida para la generación de equivalentes funcionales, están mostrados

dos en la siguiente tabla 2:

Tabla 2:

SEQ ID NO:	número de acceso	descripción	n.º EC	organismo
6	F0QD95_ACIAP	fenilacetaldoxima-deshidratasa	4.99.1.7	<i>Acidovorax avenae</i> -cepa ATCC 19860 DSM 7227 JCM 20985 NCPPB 1011
7	YP_003097901	fenilacetaldoxima-deshidratasa	4.99.1.7	<i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827
8	YP_001240697	supuesta fenilacetaldoxima-deshidratasa	4.99.1.7	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1
9	ZP_02891657	fenilacetaldoxima-deshidratasa	4.99.1.7	<i>Burkholderia ambifaria</i> IOP40-10
10	YP_001816246	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6].	4.99.1.7	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6
11	YP_001776877	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3].	4.99.1.7	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3
12	YP_004119277	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Pantoea</i> sp. At-9b].	4.99.1.7	<i>Pantoea</i> sp. At-9b
13	ZP_07774756	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Pseudomonas fluorescens</i> WH6].	4.99.1.7	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WH6
14	ZP_07774757	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Pseudomonas fluorescens</i> WH6].	4.99.1.7	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WH6
15	YP_001268042	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Pseudomonas putida</i> F1].	4.99.1.7	<i>Pseudomonas putida</i> F1
16	E4RFH2_PSEPB	fenilacetaldoxima-deshidratasa	4.99.1.7	<i>Pseudomonas putida</i> cepa BIRD-1
17	YP_001758607	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908].	4.99.1.7	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908
18	YP_001261493	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1].	4.99.1.7	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1
19	YP_004155682	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Variovorax paradoxus</i> EPS].	4.99.1.7	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS
20	YP_002942593	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Variovorax paradoxus</i> S110].	4.99.1.7	<i>Variovorax paradoxus</i> S110
21	YP_002944432	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Variovorax paradoxus</i> S110].	4.99.1.7	<i>Variovorax paradoxus</i> S110
22	YP_001416464	fenilacetaldoxima-deshidratasa [<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2].	4.99.1.7	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2

Un ejemplo de una indolacetaldoxim-deshidratasa, cuya secuencia es adecuada como punto de partida para la generación de equivalentes funcionales, se muestra en la siguiente tabla 3:

Tabla 3:

SEQ NO:	ID	número de acceso	descripción	n.º EC	organismo
28		049342	Indolacetaldoxima-deshidratasa; EC 4.99.1.6;	4.99.1.6	<i>Arabidopsis thaliana</i>

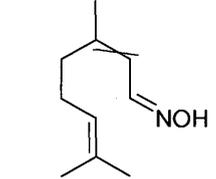
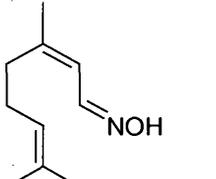
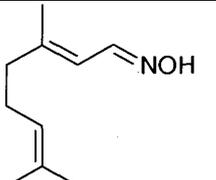
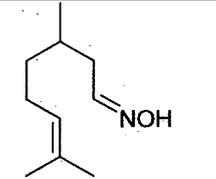
5 De acuerdo con otra forma de realización presenta la enzima una secuencia de aminoácidos que se deriva de una de las aldoxima-deshidratasas mencionadas en las tablas 1 a 3 como secuencia de partida y en comparación a la respectiva secuencia de partida presenta una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 60 %, tal como por ejemplo al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. Una forma de realización especialmente preferente del procedimiento prevé como enzima una PAOx de acuerdo con SEQ ID NO: 1 (Kato, Y. *et al.*, Biochemistry (2000), 39, 800-809 y Xie, S.-X. *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem. (2001), 65(12), 2666-2672) o una PAOx con una secuencia de aminoácidos idéntica a SEQ ID NO: 1 al menos en un 60 %, tal como por ejemplo al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %.

15 Se hace reaccionar una oxima de fórmula II



en la que n representa 1 y la oxima se selecciona entre compuestos de la siguiente tabla 4, que se diferencian mediante distintos restos R enlazados con el grupo oxima:

Tabla 4:

	R-[C=N-OH] _n (II) n = 1	Nombre
1		citraloxima (3,7-dimetil-octa-2,6-dienaloxima)
2		neraloxima
3		geranialoxima
10		citronelaloxima

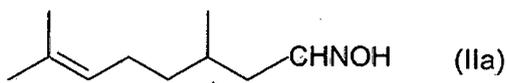
20

El resto R puede seleccionarse adicionalmente de análogos de los compuestos 1 - 3 y 10 de la tabla 4, estando hidrogenado el resto R. La oxima se selecciona entre el compuesto 1 (citraloxima), compuesto 2 (neraloxima), compuesto 3 (geranialoxima) y compuesto 10 (citronelaloxima) y análogos de los mismos parcial o completamente

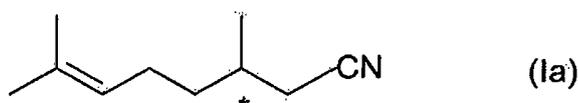
hidrogenados. Un ejemplo de un compuesto con resto R hidrogenado es el compuesto 10 (citronelaloxima) en forma hidrogenada (o sea 6,7-dihidrocitroneliloxima, que en el contexto del procedimiento de acuerdo con la invención se hace reaccionar para dar 6,7-dihidrocitronelilnitrilo).

5 En el procedimiento divulgado pueden encontrarse simultáneamente dos o varias de estas oximas, de modo que se produce una mezcla de productos de los correspondientes nitrilos. Sin embargo preferentemente se usa de manera exacta una oxima.

De acuerdo con una forma de realización especial del procedimiento de acuerdo con la invención se hace reaccionar citronelaloxima de fórmula IIa



10 para dar citronelilnitrilo de fórmula Ia



usándose el compuesto de fórmula IIa, en forma estereoisoméricamente pura o como mezcla de estereoisómeros, tal como en particular como mezcla R/S-E/Z.

15 Una reacción de acuerdo con la invención en presencia de una aldoxima alifática-deshidratasa (EC 4.99.1.5) o de una fenilacetaldoxima-deshidratasa (PAOx) (EC 4.99.1.7) puede realizarse en particular de la siguiente manera:

- a) reacción en presencia de la aldoxima-deshidratasa
 - b) reacción en presencia de una mezcla de proteínas que contiene la aldoxima-deshidratasa
 - c) reacción en presencia de un microorganismo recombinante, que expresa funcionalmente la aldoxima-deshidratasa, de un homogeneizado celular derivado del mismo que contiene aldoxima-deshidratasa o de una fracción que contiene aldoxima-deshidratasa del mismo.
- 20 Preferentemente, en el caso de la aldoxima-deshidratasa se trata de PAOx, eventualmente junto con otras aldoxima-deshidratatas. En la expresión en microorganismos recombinantes se consiguen sorprendentemente altos rendimientos, por ejemplo rendimientos superiores al 70 % hasta rendimientos esencialmente cuantitativos, con respecto al sustrato usado. Las reacciones pueden realizarse a este respecto entre otras cosas también a
- 25 bajas temperaturas, por ejemplo a 15 °C-60 °C, preferentemente 25 °C - 45 °C, tal como a temperaturas de aproximadamente 30 °C.

En el caso de la reacción en presencia de la aldoxima-deshidratasa puede tratarse por ejemplo de

- i. polipéptido libre, eventualmente purificado o parcialmente purificado
 - ii. polipéptido inmovilizado y/o
 - iii. polipéptido aislado de células.
- 30

En el caso de una reacción de acuerdo con la opción mencionada anteriormente c) en presencia de microorganismos que expresan funcionalmente una aldoxima-deshidratasa, se trata de células enteras que pueden encontrarse en cualquier fase discrecional de un cultivo celular, por ejemplo en reposo o en crecimiento, y contienen al menos un polipéptido de aldoxima-deshidratasa.

35 En formas de realización preferentes es la aldoxima-deshidratasa una PAOx, o una mezcla de aldoxima-deshidratasa comprende junto a otras aldoxima-deshidratatas una PAOx.

En el contexto de un procedimiento de acuerdo con la invención puede generarse la enzima con la actividad aldoxima-deshidratasa en particular por un microorganismo que sobreproduce la enzima. El microorganismo puede seleccionarse a este respecto en particular del grupo de los microorganismos constituidos por los géneros

40 Leptosphaeria, tal como por ejemplo *Leptosphaeria maculans*; Rhizoctonia, tal como por ejemplo *Rhizoctonia solani*; Sclerotinia, tal como por ejemplo *Sclerotinia sclerotiorum*; Botryotinia, tal como por ejemplo *Botryotinia fuckeliana*; Pseudomonas, tal como por ejemplo *Pseudomonas chloraphis*; Rhodococcus; Gibberella, tal como por ejemplo *Gibberella fujikuroi* o *Gibberella zeae*; Escherichia, Pichia, Aspergillus, Trichoderma o Bacillus, tal como *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*; así como *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. La tabla 6 incluye una lista con

45 otros microorganismos adecuados, representando ejemplos adecuados también los géneros subyacentes a las especies mencionadas allí. Como alternativa puede aislarse una aldoxima-deshidratasa también de plantas como organismos de sobreexpresión y puede usarse en el sentido de las opciones indicadas anteriormente i) o ii) en el contexto de un procedimiento de acuerdo con la invención. Como plantas de sobreexpresión se tienen en cuenta por

50 ejemplo *Musa* (en particular *M. acuminata banana*) y *Arabidopsis* (en particular *A. thaliana*). Los microorganismos o plantas de sobreexpresión pueden determinarse a este respecto por el experto de manera conocida en la técnica

mediante muestreo de representantes de sobreexpresión. Como alternativa puede provocarse una sobreexpresión mediante amplificación de ingeniería genética de la expresión de un gen que se produce de manera natural en los microorganismos o plantas, que expresa una aldoxima-deshidratasa, por ejemplo mediante uso de promotores más fuertes para el aumento de la transcripción.

- 5 De acuerdo con una forma de realización especial se realiza una reacción de la oxima en presencia de un microorganismo, siendo el microorganismo una cepa bacteriana que expresa funcionalmente la aldoxima-deshidratasa, preferentemente PAOx. La cepa bacteriana puede seleccionarse por ejemplo entre *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia glumae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* o *Zymomonas mobilis*. De acuerdo con formas de realización especiales es la cepa bacteriana una cepa de *E. coli*. El microorganismo es en particular un microorganismo recombinante, en el que se ha introducido un gen heterólogo de la oxima-deshidratasa, en particular un gen para PAOx.

10 En un perfeccionamiento especial, el microorganismo porta a este respecto un constructo de expresión, que presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica para la aldoxima-deshidratasa. La secuencia de ácido nucleico puede estar adaptada a este respecto parcial o completamente al uso de codones del microorganismo. Una adaptación completa existe cuando todos los codones de todos los aminoácidos están modificados de modo que se realice una traducción óptima en el microorganismo previsto, siempre que no existiera en todo caso ya un codón óptimo. Puede basarse en una adaptación parcial cuando no son óptimos los codones de todo los aminoácidos, sino sólo aminoácidos seleccionados, o cuando no están optimizados todos los codones existentes dentro de la secuencia de ácido nucleico en cada caso de un aminoácido.

- 15 De acuerdo con otra forma de realización preferente del procedimiento de acuerdo con la invención expresa el microorganismo al menos una chaperona que favorece la expresión funcional de la aldoxima-deshidratasa, que puede ser en particular PAOx. La expresión funcional puede favorecerse en particular debido a que la chaperona favorece el correcto plegamiento de la oxima-deshidratasa expresada, en particular durante la o a continuación de la traducción. Mediante la expresión de chaperonas puede aumentar ventajosamente la proporción de aldoxima-deshidratasa funcional en el microorganismo y la conversión de oxima en nitrilo.

20 En el contexto del procedimiento de acuerdo con la invención puede preverse en particular que el microorganismo exprese una o varias chaperonas, que se seleccionan entre GroEL y GroES. El experto conoce otras chaperonas que se dividen en cinco grandes familias, concretamente la familia Hsp100/Clp, la familia Hsp90, la familia Hsp70 (con por ejemplo DnaK, DNAJ, Hsc62, Hsc56, y GrpE como representantes en *E. coli*), la familia Hsp60/GroEL (con la ya mencionada GroEL) y la familia de las proteínas de choque térmico pequeñas (Hsp20). Las chaperonas pueden seleccionarse igualmente de estas familias de proteínas. Igualmente pueden formarse combinaciones, por ejemplo del complejo DnaK/DnaJ/GrpE, del complejo GroEL/ES y factor desencadenante, tal como se describen por ejemplo en O'Donnell y Lis, MIT 7.88 Research Paper, 2006. La o las chaperonas pueden expresarse de manera endógena en el microorganismo usado, o pueden expresarse parcial o totalmente mediante secuencias de ácido nucleico introducidas adicionalmente en el microorganismo. Estas secuencias de ácido nucleico pueden introducirse en el genoma del microorganismo, por ejemplo en un cromosoma bacteriano o de manera extracromosómica pueden encontrarse en constructos de expresión. Si se realiza una expresión de una aldoxima-deshidratasa por un constructo de expresión extracromosómico, por ejemplo ya que un gen heterólogo de la oxima-deshidratasa debe expresarse en un microorganismo o ya que la expresión de un gen cromosómico debe complementarse mediante la expresión adicional de un gen extracromosómico de la aldoxima-deshidratasa, entonces pueden encontrarse el gen de aldoxima-deshidratasa y el gen de chaperona en un constructo de expresión común o en constructos de expresión separados.

Una forma de realización preferente del procedimiento de acuerdo con la invención comprende al menos las siguientes etapas a), b) y d):

- 45 a) aislar un microorganismo que produce una enzima con actividad aldoxima-deshidratasa a partir de una fuente natural o prepararlo de manera recombinante,
b) reproducir este microorganismo,
c) aislar eventualmente del microorganismo la enzima con actividad aldoxima-deshidratasa o preparar una fracción de proteína que contiene esta enzima y
50 d) transferir el microorganismo de acuerdo con la etapa b) o la enzima de acuerdo con la etapa c) a un medio que contiene la oxima.

En el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a contacto y/o se incuba el sustrato, tal como por ejemplo citronelaloxima, con la enzima que tiene la actividad de la aldoxima-deshidratasa en un medio de modo que se realice una conversión del sustrato, tal como por ejemplo de citronelaloxima, en citronalalnitrito, en presencia de la enzima. Preferentemente, en el caso del medio se trata de un medio de reacción acuoso.

55 El valor de pH del medio de reacción acuoso, en el que se realiza preferentemente el procedimiento de acuerdo con la invención, se mantiene a este respecto ventajosamente entre pH 4 y 12, preferentemente entre pH 4,5 y 9, de manera especialmente preferente entre pH 5 y 8.

- En el caso de los medios de reacción acuosos se trata preferentemente de soluciones tamponadas, que presentan por regla general un valor de pH de preferentemente de 5 a 8. Como tampón puede usarse un tampón citrato, fosfato, TRIS (tris(hidroximetil)-aminometano) o MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico). Además puede contener el medio de reacción aún otros aditivos, tal como por ejemplo detergentes (por ejemplo taurodesoxicolato), FMN, iones tales como iones metálicos (por ejemplo Fe^{2+} y Sn^{2+}) o aniones tales como SO_3^{2-} , así como azida sódica. Ciertas composiciones detalladas de mezclas de reacción adecuadas pueden encontrarse también en las siguientes fuentes bibliográficas: Kato, Y. *et al.*, *Biochemistry* (2000), 39, 800-809 y Xie, S.-X. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2001), 65(12), 2666-2672.
- El sustrato, tal como por ejemplo citronelaloxima, se usa preferentemente en una concentración de 2 - 200 mM, de manera especialmente preferente de 5 - 25 mM en la reacción enzimática y puede alimentarse de manera continua o discontinua. La reacción puede realizarse sin embargo también con aldoxima pura (por ejemplo citronelaloxima) en presencia del organismo huésped que expresa sólo la enzima, tal como que expresa la PAOx (por ejemplo *E. coli*), tal como se describe en el ejemplo 2.
- La conversión enzimática de oxima en nitrilo se realiza por regla general a una temperatura de reacción por debajo de la temperatura de desactivación de la enzima usada y por encima de $-10\text{ }^\circ\text{C}$. Preferentemente se realiza el procedimiento de acuerdo con la invención a una temperatura entre $0\text{ }^\circ\text{C}$ y $95\text{ }^\circ\text{C}$, de manera especialmente preferente a una temperatura entre $15\text{ }^\circ\text{C}$ y $60\text{ }^\circ\text{C}$, en particular entre $20\text{ }^\circ\text{C}$ y $40\text{ }^\circ\text{C}$, por ejemplo a aproximadamente de $25\text{ }^\circ\text{C}$ a $30\text{ }^\circ\text{C}$.
- Se prefiere especialmente un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que la reacción de oxima para dar nitrilo se realiza a una temperatura en el intervalo de $20\text{ }^\circ\text{C}$ a $40\text{ }^\circ\text{C}$ y/o a un valor de pH en el intervalo de 4 a 10, preferentemente a pH 8.
- Además de estos sistemas acuosos monofásicos se usan en otra variante de la invención también sistemas bifásicos. A este respecto además de una fase acuosa se usan como segunda fase medios de reacción orgánicos, no miscibles con agua. Debido a ello se acumula los productos de reacción en la fase orgánica. Tras la reacción puede separarse el producto, tal como por ejemplo citralnitrilo, neralnitrilo, geranialnitrilo o citronelalnitrilo, en la fase orgánica fácilmente de la fase acuosa que contiene el biocatalizador.
- Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la invención, caracterizado porque la preparación de los nitrilos citralnitrilo, neralnitrilo, geranialnitrilo o citronelalnitrilo, se realiza en sistemas acuosos monofásicos o en sistemas bifásicos.
- El producto de reacción, tal como por ejemplo citralnitrilo, neralnitrilo, geranialnitrilo o citronelalnitrilo, puede extraerse con disolventes orgánicos y eventualmente puede destilarse para la purificación.
- Los disolventes orgánicos adecuados son por ejemplo hidrocarburos alifáticos, preferentemente con 5 a 8 átomos de carbono, tales como pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, heptano, octano o ciclooctano, hidrocarburos alifáticos halogenados, preferentemente con uno o dos átomos de carbono, tal como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano o tetracloroetano, hidrocarburos aromáticos, tales como benceno, tolueno, los xilenos, clorobenceno o diclorobenceno, éteres o alcoholes alifáticos acíclicos y cíclicos, preferentemente con 4 a 8 átomos de carbono, tal como etanol, isopropanol, dietiléter, metil-terc-butiléter, etil-terc-butiléter, dipropiléter, diisopropiléter, dibutiléter, tetrahidrofurano o ésteres tales como acetato de etilo o acetato de n-butilo o cetonas tales como metilisobutilcetona o dioxano o mezclas de los mismos. De manera especialmente preferente se usan el heptano, metil-terc-butiléter, diisopropiléter, tetrahidrofurano, acetato de etilo.
- Las aldoxima-deshidratasa usadas de acuerdo con la invención pueden usarse en el procedimiento de acuerdo con la invención como enzima libre o inmovilizada, tal como se ha descrito ya anteriormente.
- Para el procedimiento de acuerdo con la invención pueden usarse células en reposo o en crecimiento, libres o inmovilizadas, que contienen ácidos nucleicos que codifican para la aldoxima-deshidratasa, constructos de ácido nucleico o vectores. Pueden usarse también células solubilizadas, tal como lisados de células u homogeneizados de células. Por células solubilizadas ha de entenderse por ejemplo células que se han vuelto permeables por medio de un tratamiento por ejemplo con disolventes, o células que se rompieron por medio de un tratamiento enzimático, por medio de un tratamiento mecánico (por ejemplo prensa francesa o ultrasonidos) o por medio de otro procedimiento. Los extractos brutos así obtenidos son adecuados ventajosamente para el procedimiento de acuerdo con la invención. Pueden usarse también enzimas purificadas o parcialmente purificadas para el procedimiento.
- Si se usan para el procedimiento de acuerdo con la invención organismos o enzimas libres, entonces se separan éstos antes de la extracción de manera conveniente, por ejemplo a través de una filtración o centrifugación.
- El procedimiento de acuerdo con la invención puede hacerse funcionar de manera discontinua, semi-continua o continua.

Parte experimental

Siempre que no se hagan indicaciones especiales en los siguientes ejemplos, se aplican las siguientes indicaciones generales.

A. Indicaciones generales

- 5 Todos los materiales y microorganismos usados son productos que pueden obtenerse en el comercio o en colecciones de cepas.

En tanto que no se indique lo contrario, se realiza la clonación y la expresión de proteínas recombinantes según procedimientos convencionales, tal como se describe por ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

10

a) Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Todos los experimentos se realizaron con *E. coli*. Para la expresión de PAOx se usó *E. coli* TG10, un derivado de TG1 sin ramnosa-isomerasa.

b) Cromatografía de gases

- 15 **Aparato de medición:** Agilent 6890 N

Columna: Optima 5 Accent longitud = 30 m, $\varnothing_{\text{interno}} = 0,25$ mm, $\varnothing_{\text{externo}} = 0,4$ mm, espesor de película 0,25 μm empresa Macherey&Nagel # 725820.30

Flujo: 1,0 ml/min a 13,5 PSI (a temperatura de horno 80 °C)

División: 1:50, Splitflow: 50 ml/min, purga de septum 3 ml/min (a temperatura de horno 80 °C)

20

Gas portador: helio

Inyector: con división/sin división con Split Liner siltec-deactivated (Restec # 20713-214.5)

Temperatura de inyector: 280 °C

Volumen de inyección: 1 μl

Detector: FID con 300 ml/min de aire, 30 ml/min de hidrógeno y 30 ml/min de gas de reposición (helio)

25

Temperatura de detector: 320 °C

Programa de temperatura:

Inicio:	60 °C
tiempo de permanencia 1:	0 min
rampa de temperatura 1:	15 °C/min
temperatura final 1:	320 °C
tiempo de permanencia 2:	5 min
tiempo de elución total:	22,3 min

Evaluación: Empower-2-Software según % de superficie

B. Ejemplos

- 30 **Ejemplo 1: Expresión de PAOx en *E. coli*** (no de acuerdo con la invención)

En el presente ejemplo se optimizó el uso de codones por el gen de la fenilacetaldoxima-deshidratasa (PAOx) de *Bacillus* sp. cepa OxB-1 para la expresión en *E. coli*. La nueva secuencia de ADN se sintetizó y se clonó en pDHE, un vector de expresión inducible por ramnosa. Las chaperonas GroEL/S que son necesarias para una producción de PAOx soluble se clonaron en vectores pAgro o pHSG inducibles por IPTG. La expresión de PAOx se realizó en *E. coli* TG10, un derivado de TG1 sin ramnosa-isomerasa. Las células TG10 que contenían pAgro y pHSG(TG10+) se transformaron con pDHE-PAOx y se cultivaron en 2xYT durante 5 h a 37 °C en presencia de ampicilina (pDHE), espectinomina (pAgro) y cloranfenicol (pHSG). Se transfirieron 5 ml de este cultivo a 500 ml del mismo medio que contenía IPTG 100 μM y 0,5 g/l de ramnosa. La inducción se realizó a 30 °C durante un espacio de tiempo de aproximadamente 18 h. Las células se recogieron mediante centrifugación y se usaron como catalizadores en la conversión de citronelaloxima en citronelilnitrilo. Eventualmente se almacenaron las células hasta su uso a -20 °C.

40

Ejemplo 2: Conversión de citronelaloxima en citronelilnitrilo mediante PAOx

La conversión enzimática de citronelaloxima en el correspondiente nitrilo se realizó de la siguiente manera: se mezclaron 50 ml de R/S-E/Z citronelaloxima racémica con 12,5 g de *E. coli* TG10, que expresaba fenilacetaldoxima-

5 deshidratasa (PAOx). La mezcla de reacción se incubó con agitación a 30 °C. Las muestras de la mezcla de
 10 reacción (0,1 ml) se tomaron tras 18 h y 90 h y se mezclaron con 0,5 ml de n-heptano. La fase orgánica se analizó a
 través de cromatografía de gases (CG). El análisis de CG se realizó en un Agilent 6890 N (columna: Optima 5
 Accent, Macherey & Nagel; velocidad de flujo: 1 ml/min a 13,5 PSI, temperatura de inyección 280 °C; temperatura de
 detección 320 °C; detector: FID; tiempo de retención de citronelaloxima: 7,816 min & 8,018 min; tiempo de retención
 de citronelilnitrilo: 6,765 min). Tras 90 h se había convertido la R/S-E/Z citronelaloxima racémica cuantitativamente
 en el correspondiente nitrilo. La reacción realizada a este respecto se muestra en la figura 1. Los correspondientes
 cromatogramas de gases se muestran antes, durante y tras la conversión en la figura 2A, figura 2B y figura 2C. En la
 tabla 5 se muestra un desarrollo temporal aproximado de la reacción, en la que se indica la proporción porcentual de
 las superficies pico de los cromatogramas de gases.

Tabla 5

Tiempo [h]	Citronelaloxima	Citronelalitrilo
0	100,00	0,00
18	50,03	49,97
90	0,03	99,97

Tabla 6 - indicaciones de secuencia:

SEQ ID NO	Fuente	Especie	Observación	
1	<i>Bacillus s. OxB-1</i>	AS	PAOx	
2	<i>Bacillus s. OxB-1</i>	NS	PAOx	ADN de tipo natural para SEQ ID NO: 1
3	sintética	NS	PAOx	SEQ ID NO: 1 optimizada con respecto a codones para <i>E. coli</i>
4	<i>Arthrobacter aureescens</i> TC1	AS	Aldoxima alifática-deshidratasa	
5	<i>Acinetobacter sp. cepa</i> ADP1	AS	Aldoxima alifática-deshidratasa	
6	<i>Acidovorax avenae</i> (ATCC 19860)	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
7	<i>Actinosynnema mirum</i> (DSM 43827)	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
8	<i>Bradyrhizobium sp. BTAi1</i>	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
9	<i>Burkholderia ambifaria</i> IOP40-10	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
10	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
11	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
12	<i>Pantoea sp. At-9b</i>	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
13	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WH6	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WH6	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
15	<i>Pseudomonas putida</i> F1	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
16	<i>Pseudomonas putida</i> cepa BIRD-1	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	

(continuación)

SEQ ID NO	Fuente	Especie	Observación	
17	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
18	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
19	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
20	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
21	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
22	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
23	<i>Gibberella zeae</i>	AS	fenilacetaldoxima-deshidratasa	
24	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	AS	Aldoxima alifática-deshidratasa	
25	<i>Pseudomonas</i> sp. K-9	AS	Aldoxima alifática-deshidratasa	
26	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	AS	Aldoxima alifática-deshidratasa	
27	<i>Rhodococcus globerulus</i>	AS	Aldoxima alifática-deshidratasa	
28	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AS	Indolacetaldoxima-deshidratasa	
NS: ácido nucleico; AS: aminoácido				

5 Sigue una lista de secuencias útiles de acuerdo con la tabla 6, que pueden usarse (con excepción de SEQ ID NO: 28) directamente para un procedimiento de acuerdo con la invención o sirven como secuencias de partida, eventualmente también en forma de secuencias de ácido nucleico codificantes, para la generación de equivalentes funcionales que pueden usarse entonces en un procedimiento de acuerdo con la invención. Los números de acceso remiten a bancos de datos conocidos en la técnica, por ejemplo NCBI (National Center for Biotechnology Information), GeneBank, o SwissProt.

SEQ ID NO: 1; números de acceso: BAA90461; P82604 (UniProtKB/Swiss-Prot)

MKNMPENHNPQANAWTAEFPPEMSYVVFQIQIGIQSKSLDHAAEHLGMMKKSFDLRTGP
KHVDRALHQGADGYQDSIFLAYWDEPETFKSWVADPEVQKWWSGKKIDENSPIGYWSEVTTI
PIDHFETLHSGENYDNGVSHFVPIKHTEVHEYWGAMRDRMPVSASSDLESPLGLQLPEPIVRE
SFGKRLKVTAPDNICLIRTAQNWSKCGSGERETYIGLVEPTLIKANTFLRENASETGCISSKLVY
EQTHDGEIVDKSCVIGYYLSMGLERWTHDHPTHKAIYGTIFYEMLKRHDFKTELALWHEVSVL
QSKDIELIYVNCHPSTGFLPFFEVTEIQEPLLKSPSVRIQ

10

SEQ ID NO: 2; número de acceso: AB028892 (NCBI)

ttgaaaaatgcccggaaaatcacaatccacaagcgaatgacctggactgccgaattcctcctgaaatgagctatgtagtatt
gcgagattgggattcaaagcaagtcttggatcacgcagcggaaacatttgggaatgatgaaaagagttcgttggcagcaggc
cccaaacatgtggatcgagccttgcacaaaggagccgatggataccaagattccatcttttagcctactgggatgagcctgaaacatt
aaatcatgggtgcgatcctgaagtacaaaagtggtgctgggtaaaaaatcgatgaaaatagccaatcgggtattggagtgag
glaacgaccattccgattgatcacttggactctcattccggagaaaattacgataatggggttcacacttgtaccgatcaagcatalac
agaagtccatgaatattggggagcaatgcgcgaccgatccgggtgtctgccagtagtattggaaagccccctggcctcaattac
cggaaaccttgcgggagcttctggaaaacggctaaaagtcacggcgccggataatattgcttgattcgaaccgctcaaaattgg
tctaatgtgtagcgggaaagggaaacgtatataggactagtgaaccgaccctcataaaagcgaatacgttctctgtaaaaat
gctagtgaacaggctgtatfagttcaaaattagctatgaacagaccatgacggcgaatagtagataaatcatgtgtcatcggata
ttatctcctcattgggcatctgaacgctggacgcatgatcatccaacacataaagcgatctacggaacctttatgagatgttgaag
gcatgatttaagaccgaacttcttatggcacgaggttccggctcaatccaagatacgagcttatctatgtcaactgccatccga
gactggattctcattcttgaagtacagaaatcaagagccttactgaaaagccctagcgtcaggatccagtga

SEQ ID NO: 3;

atgaaaaacatgccagaaaaccacaaccgcaggcctaacgcctggactgcagaattcccgccagagatgtcttaccgttgc
ttcgcgcagattggcatccagtctaaaagcctggatcatgcagccgaacatctggcatgatgaaaaatcttgcacctccgactgg
tccaaaacacgttgatcgcgactgcaccagggtgctgatggctatcaggactctatctctggcctactgggacgaaccagaaacc
ttcaaaagctgggtgcagaccagaagtgagaaatgggtggagcggtaaaaaatcgatgaaaacagcccgatcggctattggct
tgaggttaccactatcccgaftgaccacttcgagaccctgcactctgggtgagaactatgacaacggcgttcccactcgtgccatcaa
acataccgaagtcacgaatactggggtgctatgctgtatcgtatccgggtgtctcttccgatctgaaagcccgtgggtctcca
gctgccagaaaccgatcgtcgtgagagcttggtaaaccctgaaagttaccgctccagacaacatctgcctgatctgtaaccgcacag
aactggtccaaatgtggttctgtgaaacgcgaaacctacattggcctggtcgaaccgactctgatcaaagcgaacacctcctgctg
aaaacgctctgagaccggttgattagctctaaactggttacgagcagaccatgatggcgaatcgtagataaatcctgtgtaac
ggctactatctgcatctggaacgctggactcacgaccaccaactcacaagcgatttacggcagcttctacgaaatgct
gaaacgctcagactttaaaccggaactggcgtgtggcacgaagtaagcgttctcagctctaaagacatcgagctgatctatgtcaac
tgccaccatccacgggtttctgccgttcttgaagtaccgaaatccaggaaccactgctgaaatccccatccgtgctattcagtga

5

SEQ ID NO: 4, números de acceso: NCBI: YP_947647.1, GenBank: ABM07831.1

MAPDPSRQDPAIESSIPRHFTVKRTRPKRAGAGYAPPYPSYSVRFAEGVSNLVCAFLGV
QSRAPLSHEAKVASAGMWELCANEDGPMREHAVHTDEQGFNDQVIIAYWDDVDAYGRWFK
KHRDALIGAGLEPSDYGRWIEAVTPEARGFETLYSSNTFPEGAARMATGGFTGEIQEHGYWGS
MRDRLPIAQTDALPVGDPVPRNPGIVRVEPHDNLAVIRSGQDWSLCCDAERASYFSHVEPQ
LKAGMDFLTTEGASIGCYANRYMTSSDNGNVLEQSFGLSFWHSLEDMERWAESHPTHVAIF
RSAMTFLQANAGARLRLSHEVAVVSRDQQYYEYNNCHAGTGMLGARRPLGTATPGTRI

SEQ ID NO: 5; número de acceso: NCBI: YP_046290.1; GenBank: CAG68468.1

MESAIKHLKCPRTLRRIHDEYEPFAMWVARADESLQQVVMAYFGVQFKSEQKAIAL
KAMQHIVQSFLDNGPQNHDITHHTDNQYENYIVVGYWRDPGAYCRWFRSTEVSHWWDS
ERLNDGIGYFREIVIPRADQFETLYAFKEDLPVGVAVMDDISDDIQEHGYWGSARERFPISQTD
RMLANGELHIISGDPEKGGRLVQGHDNITLIRSGQDWNADKERELYFNEMLPSLQAGMDF
LRDEGQALGCYSNRVFRNVDIDGNLLDIAYDIGYWRSLDKLERWAESHPTHLRIFTFFKVVVTG
LQNLRLYHEVSVSDAKNQVFEYINCHPQTGMMRDAQMT

10

SEQ ID NO: 6; número de acceso: F0QD95_ACIAP (UniProtKB/TrEMBL)

MESAIPPRLQCPRSLSRVADDYQPPFPMWVARPQADLQQVVMAYFGIQYQGEAQKPR
ALAVLREWVAAFGAPDGPLRHDLTHHIDAQGYDNLIAVGYWRDPEAHRRWMQAPAQAGWW
NAPERLQEGLGYFREVSAPRAEQFETLYAFQDALPGVGGVMESTSGDIQEHGYWGSMDRFR
PASQVDRMQARGTLLIAEGDPAHGGRVVRGHDNIALIRSGQDWMEAEAEERRLYLEDIEPTL
HAGMDFLRDQGAAVGCYSNRYVHNIDLDGRRLDQSYNIGHWRSVDLLERWAESHPTHLRIFG
TFFKVAAGLSKLRLYHEVSVSDAASQHFYIQCHPATGMMRDARLQAPA

SEQ ID NO: 7; número de acceso: YP_003097901.1 (NCBI)

MSSLPLDDRATAHRPEGYDPRGGPGHEVRWSDDVTHLVVARFGVQTDDSAAGVKAIAR
VLELAAGESGPALVERVSDDDSEMAVCPYWPDEAHRAWASGPVRDWWASLPVDGPIGHW
HETSVPVEQFETLYSAEFAAGPSRFAGTGPTNLHDYDNSTLDRMPATAHRDLRQERAEPTT
DLPPGESPRGRRVRLAEPSPSGLCWIRTAQEWSIAPDDQLASYRDGVEPAYRTAIAHLQDNPH
DTGCL SARLVGNLDANGARAAGAEAVVWVRGIGDLLRWAHDHKTHQDILNGFWEHVIKFGP
GTRVRLWHEVHVLPEGALTAEYVNCHPGTGLLQTPWG

5

SEQ ID NO: 8; número de acceso: YP_001240697 (NCBI)

MESAIPPHLITTRCRHRRVDDDYKPPYPSFVARHGADVSRVVMAYFGVQYRAETPAAAS
TADFMVLVSRADGPSHWDLAHYVDQAGFANDVFVAYWDDVRFDSWFEPARAAWTGPAGAE
GGGRFIEVLRPAVERYETLFSGLRPEGIAVIAEGMSGEVLEHAYWGGMRDRIPLSQTSEMRS
LGKPTLVQDGPRLRVIAQDNLCMIRSGQDWSDTDAAERMYLDDVEPVLREGMDFLRDQGLS
IGCYANRYMRLRGADGALTEKSYGQSWWQSLSALERWAESHPTHVRIFGAAMKYLSSLGPA
RLRLYHEVTVAADAEQFFEYRGCHAKTGMLAAAG

SEQ ID NO: 9; número de acceso: ZP_02891657 (NCBI)

MESAIDKHLVCPRTLSSRVADDYQPPFPMYVARASEDLSQVVMGYFGVQYRGADQRSA
ALAALRRIVADFDAPDGPNGHDLTQHTDNQGYDNLIAVGYWRDPDAYARWIASPAVAEWWS
DARLADGIGYFREIVAPRAEQFETLYAFTADFPVGVGAIMDGVSGEIEEHGYWGSMDRFRPISQT
DWMHADGELRIVAGDPARGGRVVLAHDNIALIRSGQDWRAAQDDERRLYLDEIEPTLRSGM
EFLRDNGVDVGCYSNRYVRSIDLGNLLDESYNIGHWRS�DRLERWAESHPTHLRIFVTFFRV
VTGLSKLRLYHEVSVFADAKHQVYEVNCHPNTGMMRDAVAR

10

SEQ ID NO: 10; números de acceso: ACB68693 (GenBank), YP_001816246 (NCBI)

MESAIDKHLVCPRTLSSRVADDYQPPFPMYVARAAEDLSQVVMGYFGVQYRGADKRSV
ALAALRRIVADFDAPDGPNGHDLTQHTDNQGYDNLIAVGYWRDPDAYARWIASPAVAEWWS
DARLADGIGYFREIVAPRAEQFETLYAFTNDFPVGVGSIMDGVSGEIEEHGYWGSMDRFRPISQT
DWMHADGELRIVAGDPARGGRVVLAHDNIALIRSGQDWRAAEDDERRLYLDEIEPTLRSGME
FLRDNGVDVGCYSNRYVRSIDLGNLLDESYNIGHWRS�DRLERWAESHPTHLRIFVTFFRV
TGLSKLRLYHEVSVFADAKHQVYEVNCHPTTGMMRDAAAR

SEQ ID NO: 11; número de acceso: YP_001776877 (NCBI)

MESAIDKHLICPRTLSSRVADDYQPPFPMYVARAAEDLSQVVMGYFGVQYSGADKRAAA
MAALRRIVADFGGQDGPNNFDLTQHTDDEGYENLIAVGYWRDPAAYARWIASPALVEWWASD
ARLADGIGYFREIVAPRAEQFETLYAFTSDFPVGVGAIMDGVSGEIEEHGYWGSMDRFRPISQTD
WMNANGELRIVDGPARGGRVVLAHDNIALIRSGQDWRAAESDERRLYLEEIEPTLRSGMEF

LRDNGKDVGCYSNRYVRSIDL DGNVLDESYNIGHWRS LDRLERWAESHPTHLRIFVTFFRVVT
GLSKLRLYHEVSVF DAKHQVYEVNCHPRTGLMRDAVAIAR

SEQ ID NO: 12, número de acceso: YP_004119277 (NCBI)

MESAIDTHLKPRTL SRRVHDDYQPPFPMFAGRADASLTQVVMAYLGVQFREEQRAAAI
TAMQHIVRSFSLDNGPGNH DVTFHTDNQGGFN FIVVGYWRDPAAYCRWLHQPAITGWWSSD
DRLRDGLGYFREIIAPRAEQFETLYAFKEALPGVGAVMDNLSGEIQEHGYWGSVRDRIPASQT
DWLQPDGELRIISGDPAAGGRV VVQGH DNITLIRSGQDWMDADEQERALYFTEMLPPLQAGM
DFLRDEGQTLGCYSNRFVRNVDIDGNVLDIAYDIGFWRS LDRLERWAESHPTHLRIFVTFFRVV
AGLQKLRLYHEVSVSDARFQTFEYINCHPQTGMLRDAVR

SEQ ID NO: 13, número de acceso: ZP_07774756 (NCBI)

MKPTTELQVVAGDPAKGGRRVVMGHDNLT LIRSGQDWADAEADERSLYLDEILPTLQDG
MDFLRDNGQPLGCYSNRFVRNIDLDGNFLDVSYNIGHWRSVEKLERWAESHPTHLRIFVTFFR
VAAGLKKLRLYHEVSVSDAKSQLFEYINCHPHTGMLRDAQAATA

5

SEQ ID NO: 14:, número de acceso: ZP_07774757 (NCBI)

MESAIDTHLKPRTL SRRVPDEYQPPFPMWVARADEQLEQVVMAYLGVQYRGEAQREA
ALQAMRHIVGSFSLADGPQTHDLTHHTDSSGFDNLIVVGYWKDPGAHCRWLRSAPVNDWWA
SQDRLSDGLGYFREISAPRAEQFETLYAFQDNLPVGAVMDATSGEIENTVTGARCATASPS
RQTG

SEQ ID NO: 15; número de acceso: YP_001268042 (NCBI)

MESAIDKHLVCPRTL SRRVPDDYQPPFPMWVGRADEQLTQVVMAYLGVQYRGDQGRE
RALQAMREILGSFSLTDGPLTHDLTHHTDSSGYDNLMIVGYWKDAGAYCRWLRSPEVDGWW
SSPQRLNDGLGYYREITAPRAEQFETLYAFQNDLPVGAIMDNTSGEIEEHGYWGS MRDRFPV
SQT DWMNPNGELRVVAGDPAKGGRRVVVLGHDNIALIRSGQDWATAEAAERSLYLDEILPTLQD
GMDFLRDNGQPLGCYSNRFVRNIDADGNLLDMSYNIGHWRSLEKLERWAESHPTHLRIFVTFF
RVAAGLEKLRLYHEVSVSDASSQVFEYINCHPHTGMLRDAKVSSN

10

SEQ ID NO. 16, número de acceso: E4RFH2_PSEP B (UniProtKB/TrEMBL)

MESAIDKHL MCPRTL SRRVPDDYQPPFPMWVGRADEQLTQVVMAYLGVQYRGDSQRE
RALQAMREILGSFSLSDGPLTHDLTHHTDSSGYDNLMIVGYWKDTGAYCRWSRSPEVDGWW
SSPQRLNDGLGYYREITAPRAEQFETLYAFQSDLPVGAIMDNTSGEIEEHGYWGS MRDRFPV
SQT DWMNPNGELRVVAGDPAKGGRRVVVIGHDNIALIRSGQDWAAAEEAERSLYLDEILPTLQD
GMDFLRDNGQPLGCYSNRFVRNIDADGNVL DMSYNIGHWRSLEKLERWAESHPTHLRIFVTFF
RVAAGLEKLRLYHEVSVSDASSQVFEYINCHPHTGMLRDAKVSSN

SEQ ID NO: 17, número de acceso: YP_001758607 (NCBI)

MMNNMPKNWTPPAPAWTSLWKTDEENLVCGLFAIQGQHSAPLDDWAKKAFTGEFSPK
LLEQGMFTDKAGITNYLYIAYWFASDYKTWWQQAANSWWASPLLEGDISVWREVFTMPHQ
RFETLHSSENAHAARLSPSLEGPMMEHGYSGAARDRIPCSSSQDIKNDNSIWEHLQVNVENK
SNRIKLSPPKNMCMVIRSGQDWITHCEEDEKEYLTVNHVTVLKKGMDYLSNPNVKT HCASMRFIT
KTDGNWCSVEQTFGLGYGNDIYAFENWAKSHPTHIAIFDRFMGMVEKYNVDLKLQLWHEVTLI
PEQDCEFEYINCHGQTGLLCYINI

15

SEQ ID NO: 18, número de acceso: YP_001261493 (NCBI)

MDSSITPHLACPRSRPRRIADDYAPPYPAWSARIDPAIGQVVMASYGVQGREGSDVAAA
LAHVRALRATLDADVRHVDLARYVDEAGYDTLVLPQYWTDPEAFRRWEARADVAALLAAETGL
GHFREILTPTVERLETLYSTEDEMEGLGRALERSSPPVQEHAYWGSARDRFPIAQTDALEPAG
QLGFAADGAGRVTVRGHDNIAIRSGQDWGPTGGEERRLYLAEIEPVL RAGMDFLRDRGGEC
GCYLNRYMRIVDMDGAPQEKSFGWSYWRSLGDMENWSEAHPSHLAIFGTFMRIVQQLNFDLK
LRLWHEVYVTPDQQLYDYNCHPDTGFLKQMPR

SEQ ID NO: 19, número de acceso: YP_004155682 (NCIB)

MESAI AEHLKCPRTRHRRVEDDYTPPYVWSARAPTSVTQVTMGYFGVQSRGPEMQG
RACAALMKIARDFALPDGPGHHDLAHYVDADGFDNMVAIAYWHDAAAFARWSATPAIDAWWR
SDERLNEGLGYFREIASPRVEHFETMFNTPDREFEGIVVMGELSGELQEHGYWGSMDRIPLS
QTDALSPSGTRAVVAGTPAPGQVRVRIAGHENIAMIRSGQEWADTTGQERTLYLEDMEPVLREG
MDFLRDQGLGIGCYSNRYMHHLDAKGAPLQKSFGLSYWRSLADMERWAESHPTHVAIFGSFM
RYVQALNFQLQLRVYHEVSVLKADEQSYEYINCRARSGLMNGLAVT

5 SEQ ID NO: 20, número de acceso YP_002942593 (NCBI)

MESRDADARALLARVANTFAGVGGPASLGRGVATGAGGERSDIFYAYWNSSAEYASWL
TTPRVASLWTDALLRGPGLWRESMIIPVERNETNYSNDAAYDGIAQIDKEMRKTDVHGYYG
SARERIPASAHDTMPSAAPDFMGRPAASMETLGRFRITLPGNTCVIRSFQDWSQAQAAEVD
WYLGNEVPVLRVGLDYLNGNRTEAKCYGMRYIREYDISGAIDLNRSTFGYFESLQTLERWTH
THPTHLDIFRAAISMVQRFQGEVAVKLGHEVSVLPEGMLSAEYVNCARSTGFLPWFHED

SEQ ID NO: 21, número de acceso: YP_002944432

MESAI AEHLKCPRTRHRRVEDDYAPPYPAWSARAPGAVRQVVMGYFGVQSRGAGMQG
RACAALMKIAAGFALPDGPGHHDFAHHVDAAGCDNMVAIAYWNDPAAHARWCTAPEVDAAWW
RSDERLADGLGYFREIVAPRAEHFETMFNTPDRLGEGVVMGGVSGELQEHGYWGSMDRIPI
LSQTDAMAPSGTRAVIAGAPAPGQVRVRIAGHENIAMIRSGQEWADTTGQERALYLGEMEPVLR
EGMDFLRDQGLHIGCYSNRYMQHLDAKGAPLEKSFGLSFWHSLADMERWAESHPTHVAIFGS
FMRYVQALNFQLQLRVYHEVSVLKADEQSYEYINCHAGSGLMNGLGEV

SEQ ID NO: 22, número de acceso: YP_001416464

MVFHVEYPRIVPERRPPGHEPAAPRFSRWEQPVGLVVCAYFGLQGQDLAWDEQKAFF
DRLQTSFGTDGPVAHEIMRMHDETGA V NAILVAYWLDATAHARWERNSPFMAWFRD PARLEG
TRGVWRETMHVPYDRHETIYSTPSYVIGLARTPGATRVPI TTNGYFGAMRDRMPVSAIDTLESP
LGAMPPRRAPDSHGRRLTAAFPLNLISIRSGQYWEGAGNEQTADYIDNLQPKLMRGM AHLSSH
PEQTGTLRLRIMTNLDAEGRPRAETSVHGYFLSMAHLEEWSRSHETHLDIYRHAIAMNRLYKEK
REVFTWHEVFALLPGAHA EYANCHGGTGLLPYFADA

10

SEQ ID NO: 23; número de acceso: Q2WG72 (NCBI, SwissProt)

MLRSRFPASHHFTVSVFGCQYHSEAPSVEKTELIGRFDKLIDSAAIHVEHLEQNDVPSKIW
MSYWESPQKFKQWWEKDDTASF WASLPDDAGFWRETFSLPATRAMYEGTGKDAYGFGHCG
SLIPLTTKTGYWGAYRSRMTPDFEGDTFSSPIPTYADQSV PADKIRPGRVRITDFPDNLCMVVE
GQHYADMGEREREYWNENFDGLTKQWVTNVV TAGHEQGMVIARACHGFAGEKKLGATNGP
VNGIFPGLDYVHQAQILIWQDISKMEHIGRYDQTHVKLRRDFMKAYGPGGEMEGD LLLWVDL
GILKKEIDA EYVGCYESTGFLKLDKGQFFKVESTAGSKLPSFFDEPIESKPIEW

SEQ ID NO: 24, número de acceso: Q7WSJ4 (NCBI, SwissProt)

MESAIDTHLKCPRTLSRRVPEEYQPPFPMWVARADEQLQQVVMGYLGVQYRGEAQR
 AALQAMRHIVSSFSLPDGPQTHDLTHHTDSSGFDNLMVVGWYKDPAAHCRWLRSAPVNDWW
 TSQDRLGEGLGYFREISAPRAEQFETLYAFQDNLPVGVAVMDSTSGEIEEHGYWGSMDRFP
 SQTDWMKPTNELQVWAGDPAKGGRRVIMGHDNIALIRSGQDWADAEAEERSLYLDEILPTLQD
 GMDFLRDNGQPLGCYSNRFVRNIDLDGNFLDVSYNIGHWRSLEKLERWAESHPTHLRIFVTF
 RVAAGLKKLRLYHEVSVSDAKSQVFYINCHPHTGMLRDAVVAPT

SEQ ID NO: 25, número de acceso: Q4W7T3 (NCBI, SwissProt)

MESAIDTHLKCPRTLSRRVPDEYQPPFAMWVARADEHLEQVVMAYFGVQYRGEAQR
 AALQAMRHIVESFSLADGPQTHDLTHHTDNSGFDNLIVVGWYKDPAAHCRWLRSAPVNAWWA
 SEDRLNDGLGYFREISAPRAEQFETLYAFQDNLPVGVAVMDRISGEIEEHGYWGSMDRFP
 QTDWMKPTSELQVIAGDPAKGGRRVVVLGHGNTLIRSGQDWADAEAEERSLYLDEILPTLQD
 MDFLRDNGQPLGCYSNRFVRNIDLDGNFLDVSYNIGHWRSVEKLERWTESHPHTHLRIFVTF
 VAAGLKKLRLYHEVSVSDAKSQIFGYINCHPQTGMLRDAQVSPA

5

SEQ ID NO: 26, número de acceso: Q76K71 (NCBI, SwissProt)

MESAIGEHLQCPRTLRRVPDTPPPFPMWVGRADDALQQVVMGYLGVQFRDEDQRP
 AALQAMRDIVAGFDLPDGAHHDLTHHIDNQGYNLIVVGWYKDVSSQHRWSTSTPIASWWE
 SEDRLSDGLGFFREIVAPRAEQFETLYAFQEDLPVGVAVMDGISGEINEHGYWGSMDRFP
 QTDWMQASGELRVIAGDPAVGGRRVVRGHDNIALIRSGQDWADAEADERSLYLDEILPTLQ
 MDFLRDNGPAVGCYSNRFVRNIDLDGNFLDLSYNIGHWASLDQLERWSESHPTHLRIFTTFFR
 AAGLSKLRLYHEVSVFDAADQLYEYINCHPGTGMLRDAVTIAEH

SEQ ID NO: 27, número de acceso: Q76EV4 (NCBI, SwissProt)

MESAIGEHLQCPRTLRRVPDTPPPFPMWVGRADDTLHQVVMGYLGVQFRGEDQRPA
 ALRAMRDIVAGFDLPDGAHHDLTHHIDNQGYNLIVVGWYKDVSSQHRWSTSTPPVSSWWE
 EDRLSDGLGFFREIVAPRAEQFETLYAFQDDLPGVAVMDGVSGEINEHGYWGSMDRFP
 QTDWMQASGELRVVAGDPAVGGRRVVRGHDNIALIRSGQDWADAEADERSLYLDEILPTLQ
 GMDFLRDNGPAVGCYSNRFVRNIDLDGNFLDLSYNIGHWASLDQLERWSESHPTHLRIFTTFFR
 VAAGLSKLRLYHEVSVFDAADQLYEYINCHPGTGMLRDAVITAIEH

10 SEQ ID NO: 28, número de acceso: 049342 (NCBI, SwissProt)

MEMILSISLCLTTLITLLLLRRFLKRTATKVNLPSPWRLPVIGNLHQLSLHPRSLRSLSLR
 YGPLMLLHFGRVPILVSSGEEAAQEVKTHDHKAFANRPRSKAVHGLMNGGRDVFAPYGEYW
 RQMKSVCILNLTNKMVESFEKVREDEVNAMIIEKLEKASSSSSENLSLSELFITLPSDVTSRVALG
 RKHSEDETARDLKKRVRQIMELLGEPFIGEYVPILAWIDGIRGFNNKIKEVSRGFSDLMDKVVQE
 HLEASNDKADFVDILLSIEKDKNSGFQVQRNDIKFMILDMFIGGTSTTSTLLEWTMTLIRSPKSM
 KKLQDEIRSTIRPHGSYIKEKEVENMKYLKAVIKEVLRHLHPSLPMILPRLLSEVVKVGYNIAAGT
 EVIINAWAIQRDTAIWGPDAEEFKPERHLDSGLDYHGKLNLYIPFGSGRRICPGINLALGLAEVT
 VANLVGRFDWRVEAGPNGDQPDLTEAIGIDVCRKFPLIAFPSSVV

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF SE

15 <120> Procedimiento para la preparación biocatalítica de nitrilos a partir de oximas y oxima-deshidratadas que pueden usarse en el mismo

<130> M/52415

ES 2 587 561 T3

<160> 28

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 351

5 <212> PRT

<213> *Bacillus* sp. OxB-1

<400> 1

Met Lys Asn Met Pro Glu Asn His Asn Pro Gln Ala Asn Ala Trp Thr
1 5 10 15

Ala Glu Phe Pro Pro Glu Met Ser Tyr Val Val Phe Ala Gln Ile Gly
20 25 30

Ile Gln Ser Lys Ser Leu Asp His Ala Ala Glu His Leu Gly Met Met
35 40 45

Lys Lys Ser Phe Asp Leu Arg Thr Gly Pro Lys His Val Asp Arg Ala
50 55 60

Leu His Gln Gly Ala Asp Gly Tyr Gln Asp Ser Ile Phe Leu Ala Tyr
65 70 75 80

Trp Asp Glu Pro Glu Thr Phe Lys Ser Trp Val Ala Asp Pro Glu Val
85 90 95

Gln Lys Trp Trp Ser Gly Lys Lys Ile Asp Glu Asn Ser Pro Ile Gly
100 105 110

Tyr Trp Ser Glu Val Thr Thr Ile Pro Ile Asp His Phe Glu Thr Leu
115 120 125

His Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Asn Gly Val Ser His Phe Val Pro Ile
130 135 140

Lys His Thr Glu Val His Glu Tyr Trp Gly Ala Met Arg Asp Arg Met
145 150 155 160

Pro Val Ser Ala Ser Ser Asp Leu Glu Ser Pro Leu Gly Leu Gln Leu
165 170 175

ES 2 587 561 T3

Pro Glu Pro Ile Val Arg Glu Ser Phe Gly Lys Arg Leu Lys Val Thr
 180 185 190

Ala Pro Asp Asn Ile Cys Leu Ile Arg Thr Ala Gln Asn Trp Ser Lys
 195 200 205

Cys Gly Ser Gly Glu Arg Glu Thr Tyr Ile Gly Leu Val Glu Pro Thr
 210 215 220

Leu Ile Lys Ala Asn Thr Phe Leu Arg Glu Asn Ala Ser Glu Thr Gly
 225 230 235 240

Cys Ile Ser Ser Lys Leu Val Tyr Glu Gln Thr His Asp Gly Glu Ile
 245 250 255

Val Asp Lys Ser Cys Val Ile Gly Tyr Tyr Leu Ser Met Gly His Leu
 260 265 270

Glu Arg Trp Thr His Asp His Pro Thr His Lys Ala Ile Tyr Gly Thr
 275 280 285

Phe Tyr Glu Met Leu Lys Arg His Asp Phe Lys Thr Glu Leu Ala Leu
 290 295 300

Trp His Glu Val Ser Val Leu Gln Ser Lys Asp Ile Glu Leu Ile Tyr
 305 310 315 320

Val Asn Cys His Pro Ser Thr Gly Phe Leu Pro Phe Phe Glu Val Thr
 325 330 335

Glu Ile Gln Glu Pro Leu Leu Lys Ser Pro Ser Val Arg Ile Gln
 340 345 350

<210> 2

<211> 1056

<212> ADN

5 <213> *Bacillus* sp. OxB-1

<400> 2

ES 2 587 561 T3

```

ttgaaaaata tgccggaaaa tcacaatcca caagcgaatg cctggactgc cgaatttcct      60
cctgaaatga gctatgtagt atttgocgag attgggattc aaagcaagtc tttggatcac      120
gcagcggaac atttgggaat gatgaaaaag agtttcgatt tgccggacagg ccccaaacat      180
gtggatcgag ccttgcacatc aggagccgat ggataccaag attccatctt tttagcctac      240
tgggatgagc ctgaaacatt taaatcatgg gttgocggatc ctgaagtaca aaagtgggtgg      300
tcgggtaaaa aaatcgatga aaatagtcca atcgggtatt ggagtgaggt aacgaccatt      360
ccgattgatc actttgagac tcttcattcc ggagaaaatt acgataatgg ggtttcacac      420
tttgtaccga tcaagcatac agaagtccat gaatattggg gagcaatgcg cgaccgcatg      480
ccggtgtctg ccagtagtga tttggaaagc ccccttggcc ttcaattacc ggaaccatt      540
gtccgggagt ctttcggaaa acggctaaaa gtcacggcgc cggataatat ttgcttgatt      600
cgaaccgctc aaaattggtc taaatgtggt agcggggaaa gggaaacgta tataggacta      660
gtggaaccga ccctcataaa agcgaatacg tttcttcgtg aaaatgctag tgaaacaggc      720
tgtattagtt caaaattagt ctatgaacag acccatgacg gcgaaatagt agataaatca      780
tgtgtcatcg gatattatct ctccatgggg catcttgaac gctggacgca tgatcatcca      840
acacataaag cgatctacgg aaccttttat gagatggtga aaaggcatga ttttaagacc      900
gaacttgctt tatggcacga ggtttcgggtg cttcaatcca aagatatcga gcttatctat      960
gtcaactgcc atccgagtac tggatttctt ccattctttg aagtgacaga aattcaagag     1020
cctttactga aaagccctag cgtcaggatc cagtga                                  1056

```

<210> 3
 <211> 1056
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> secuencia de ADN que codifica para seq ID NO: 1, optimizada en codones para *E. coli*

<400> 3

ES 2 587 561 T3

```

atgaaaaaca tgccagaaaa ccacaacccg caggctaacg cctggactgc agaattcccg      60
ccagagatgt cttacgttgt cttcgcgcag attggcatcc agtctaaaag cctggatcat      120
gcagccgaac atctgggcat gatgaaaaaa tctttcgacc tccgtactgg tccaaaacac      180
gttgatcgcg cactgcacca ggggtgctgat ggctatcagg actctatctt cctggcctac      240
tgggacgaac cagaaacctt caaaagctgg gttgcagacc cagaagtgca gaaatggtgg      300
agcggtaaaa aaatcgatga aaacagcccg atcggctatt ggtctgaggt taccactatc      360
ccgattgacc acttcgagac cctgcactct ggtgagaact atgacaacgg cgtttcccac      420
ttcgtgccga tcaaacatac cgaagtgcac gaatactggg gtgctatgcg tgatcgtatg      480
ccggtgtctg cttcttccga tctggaaagc ccgctgggtc tccagctgcc agaaccgatc      540
gtacgtgaga gctttggtaa acgcctgaaa gttaccgctc cagacaacat ctgcctgatt      600
cgtaccgcac agaactggtc caaatgtggt tctggtgaac gcgaaaccta cattggcctg      660
gtcgaaccga ctctgatcaa agcgaacacc ttctgcgtg aaaacgcgtc tgagaccggt      720
tgcattagct ctaaactggt ttacgagcag acccatgatg gcgaaatcgt agataaatcc      780
tgtgtaatcg gctactatct gtccatgggt catctggaac gctggactca cgaccaccca      840
actcaciaag cgatttacgg cacgttctac gaaatgctga aacgtcacga ctttaaaacg      900
gaactggcgc tgtggcacga agtaagcgtt ctgcagtcta aagacatcga gctgatctat      960
gtcaactgcc acccatccac gggttttctg ccgttctttg aagtgaccga aatccaggaa     1020
ccactgctga aatccccatc cgtgcgtatt cagtga                                1056

```

<210> 4

<211> 366

5 <212> PRT

<213> *Arthrobacter aurescens*

<400> 4

ES 2 587 561 T3

Met Ala Pro Asp Pro Ser Arg Gln Asp Pro Ala Ile Glu Ser Ser Ile
 1 5 10 15

Pro Arg His Phe Thr Val Lys Arg Thr Arg Pro Lys Arg Ala Gly Ala
 20 25 30

Gly Tyr Ala Pro Pro Tyr Pro Ser Tyr Ser Val Arg Phe Ala Glu Gly
 35 40 45

Val Ser Asn Leu Val Cys Ala Phe Leu Gly Val Gln Ser Arg Ala Pro
 50 55 60

Leu Ser His Glu Ala Lys Val Ala Ser Ala Gly Met Trp Glu Leu Cys
 65 70 75 80

Ala Asn Glu Asp Gly Pro Met Ser Arg Glu His Ala Val His Thr Asp
 85 90 95

Glu Gln Gly Phe Asp Asn Gln Val Ile Ile Ala Tyr Trp Asp Asp Val
 100 105 110

Asp Ala Tyr Gly Arg Trp Phe Lys Lys His Arg Asp Ala Leu Ile Gly
 115 120 125

Ala Gly Leu Glu Pro Ser Asp Tyr Gly Arg Trp Ile Glu Ala Val Thr
 130 135 140

Pro Glu Ala Arg Gly Phe Glu Thr Leu Tyr Ser Ser Asn Thr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Gly Ala Ala Arg Met Ala Thr Gly Gly Phe Thr Gly Glu Ile Gln
 165 170 175

Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg Asp Arg Leu Pro Ile Ala Gln
 180 185 190

ES 2 587 561 T3

Thr Asp Ala Leu Glu Pro Val Gly Asp Pro Val Val Pro Arg Asn Pro
 195 200 205

Gly Ile Val Arg Val Glu Pro His Asp Asn Leu Ala Val Ile Arg Ser
 210 215 220

Gly Gln Asp Trp Ser Leu Cys Asp Asp Ala Glu Arg Ala Ser Tyr Phe
 225 230 235 240

Ser His Val Glu Pro Gln Leu Lys Ala Gly Met Asp Phe Leu Thr Thr
 245 250 255

Glu Gly Ala Ser Ile Gly Cys Tyr Ala Asn Arg Tyr Met Thr Ser Ser
 260 265 270

Asp Gly Asn Gly Asn Val Leu Glu Gln Ser Phe Gly Leu Ser Phe Trp
 275 280 285

His Ser Leu Glu Asp Met Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His
 290 295 300

Val Ala Ile Phe Arg Ser Ala Met Thr Phe Leu Gln Ala Asn Ala Gly
 305 310 315 320

Ala Arg Leu Arg Leu Ser His Glu Val Ala Val Val Ser Arg Asp Gln
 325 330 335

Gln Tyr Tyr Glu Tyr Asn Asn Cys His Ala Gly Thr Gly Met Leu Gly
 340 345 350

Ala Arg Arg Pro Leu Gly Thr Ala Thr Pro Gly Thr Arg Ile
 355 360 365

<210> 5

<211> 352

<212> PRT

5 <213> *Acinetobacter* sp. cepa ADP1

<400> 5

ES 2 587 561 T3

Met Glu Ser Ala Ile Asp Lys His Leu Lys Cys Pro Arg Thr Leu Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ile His Asp Glu Tyr Glu Pro Pro Phe Ala Met Trp Val Ala
20 25 30

Arg Ala Asp Glu Ser Leu Gln Gln Val Val Met Ala Tyr Phe Gly Val
35 40 45

ES 2 587 561 T3

Gln Phe Lys Ser Glu Gln Lys Ala Ile Ala Leu Lys Ala Met Gln His
 50 55 60

Ile Val Gln Ser Phe Ser Leu Asp Asn Gly Pro Gln Asn His Asp Ile
 65 70 75 80

Thr His His Thr Asp Asn Gln Gly Tyr Glu Asn Tyr Ile Val Val Gly
 85 90 95

Tyr Trp Arg Asp Pro Gly Ala Tyr Cys Arg Trp Phe Arg Ser Thr Glu
 100 105 110

Val Ser His Trp Trp Asp Ser Asp Glu Arg Leu Asn Asp Gly Ile Gly
 115 120 125

Tyr Phe Arg Glu Ile Val Ile Pro Arg Ala Asp Gln Phe Glu Thr Leu
 130 135 140

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

Ile Ser Asp Asp Ile Gln Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Ala Arg Glu
 165 170 175

Arg Phe Pro Ile Ser Gln Thr Asp Arg Met Leu Ala Asn Gly Glu Leu
 180 185 190

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

Gly His Asp Asn Ile Thr Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Val Asn
 210 215 220

Ala Asp Glu Lys Glu Arg Glu Leu Tyr Phe Asn Glu Met Leu Pro Ser
 225 230 235 240

Leu Gln Ala Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Glu Gly Gln Ala Leu Gly
 245 250 255

Cys Tyr Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn Val Asp Ile Asp Gly Asn Leu
 260 265 270

Leu Asp Ile Ala Tyr Asp Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Trp Arg Ser Leu
 275 280 285

Asp Lys Leu Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile
 290 295 300

ES 2 587 561 T3

Phe Thr Thr Phe Phe Lys Val Val Thr Gly Leu Gln Asn Leu Arg Leu
305 310 315 320

Tyr His Glu Val Ser Val Ser Asp Ala Lys Asn Gln Val Phe Glu Tyr
325 330 335

Ile Asn Cys His Pro Gln Thr Gly Met Met Arg Asp Ala Gln Met Thr
340 345 350

<210> 6

<211> 353

<212> PRT

5 <213> *Acidovorax avanae*

<400> 6

Met Glu Ser Ala Ile Pro Pro Arg Leu Gln Cys Pro Arg Ser Leu Ser
1 5 10 15

Arg Arg Val Ala Asp Asp Tyr Gln Pro Pro Phe Pro Met Trp Val Ala
20 25 30

Arg Pro Gln Ala Asp Leu Gln Gln Val Val Met Ala Tyr Phe Gly Ile
35 40 45

Gln Tyr Gln Gly Glu Ala Gln Lys Pro Arg Ala Leu Ala Val Leu Arg
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Phe Gly Ala Pro Asp Gly Pro Leu Arg His Asp
65 70 75 80

Leu Thr His His Ile Asp Ala Gln Gly Tyr Asp Asn Leu Ile Ala Val
85 90 95

Gly Tyr Trp Arg Asp Pro Glu Ala His Arg Arg Trp Met Gln Ala Pro
100 105 110

Ala Gln Ala Gly Trp Trp Asn Ala Pro Glu Arg Leu Gln Glu Gly Leu
115 120 125

Gly Tyr Phe Arg Glu Val Ser Ala Pro Arg Ala Glu Gln Phe Glu Thr
130 135 140

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

Ser Thr Ser Gly Asp Ile Gln Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
165 170 175

ES 2 587 561 T3

Asp Arg Phe Pro Ala Ser Gln Val Asp Arg Met Gln Ala Arg Gly Thr
 180 185 190

Leu Leu Ile Ala Glu Gly Asp Pro Ala His Gly Gly Arg Val Val Val
 195 200 205

Arg Gly His Asp Asn Ile Ala Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Met
 210 215 220

Glu Ala Glu Ala Glu Glu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asp Ile Glu Pro
 225 230 235 240

Thr Leu His Ala Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Gln Gly Ala Ala Val
 245 250 255

Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Tyr Val His Asn Ile Asp Leu Asp Gly Arg
 260 265 270

Arg Leu Asp Gln Ser Tyr Asn Ile Gly His Trp Arg Ser Val Asp Leu
 275 280 285

Leu Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Gly
 290 295 300

Thr Phe Phe Lys Val Ala Ala Gly Leu Ser Lys Leu Arg Leu Tyr His
 305 310 315 320

Glu Val Ser Val Ser Asp Ala Ala Ser Gln His Phe Glu Tyr Ile Gln
 325 330 335

Cys His Pro Ala Thr Gly Met Met Arg Asp Ala Arg Leu Gln Ala Pro
 340 345 350

Ala

<210> 7

<211> 343

<212> PRT

5 <213> *Actinosynnema mirum*

<400> 7

Met Ser Ser Leu Pro Leu Asp Asp Arg Ala Thr Ala His Arg Pro Glu
 1 5 10 15

Gly Tyr Asp Pro Arg Gly Gly Pro Gly His Glu Val Arg Trp Ser Asp
 20 25 30

ES 2 587 561 T3

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

ES 2 587 561 T3

His Gln Asp Ile Leu Asn Gly Phe Trp Glu His Val Ile Ala Lys Phe
 290 295 300

Gly Pro Gly Thr Arg Val Arg Leu Trp His Glu Val His Val Leu Pro
 305 310 315 320

Glu Gly Ala Leu Thr Ala Glu Tyr Val Asn Cys His Pro Gly Thr Gly
 325 330 335

Leu Leu Gln Thr Trp Pro Gly
 340

<210> 8

<211> 340

<212> PRT

5 <213> *Bradyrhizobium* sp. BTAi1

<400> 8

Met Glu Ser Ala Ile Pro Pro His Leu Ile Thr Thr Arg Cys Arg His
 1 5 10 15

Arg Arg Val Asp Asp Asp Tyr Lys Pro Pro Tyr Pro Ser Phe Val Ala
 20 25 30

Arg His Gly Ala Asp Val Ser Arg Val Val Met Ala Tyr Phe Gly Val
 35 40 45

Gln Tyr Arg Ala Glu Thr Pro Ala Ala Ala Ser Thr Ala Asp Phe Met
 50 55 60

Val Leu Val Ser Arg Ala Asp Gly Pro Ser His Trp Asp Leu Ala His
 65 70 75 80

Tyr Val Asp Gln Ala Gly Phe Ala Asn Asp Val Phe Val Ala Tyr Trp
 85 90 95

Asp Asp Val Val Arg Phe Asp Ser Trp Phe Glu Pro Ala Arg Ala Ala
 100 105 110

Trp Thr Gly Pro Gly Ala Glu Gly Gly Gly Arg Phe Ile Glu Val Leu
 115 120 125

Arg Pro Ala Val Glu Arg Tyr Glu Thr Leu Phe Ser Ser Leu Gly Arg
 130 135 140

Pro Glu Gly Ile Ala Val Ile Ala Glu Gly Met Ser Gly Glu Val Leu
 145 150 155 160

ES 2 587 561 T3

Glu His Ala Tyr Trp Gly Gly Met Arg Asp Arg Ile Pro Leu Ser Gln
 165 170 175

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

Pro Arg Leu Arg Val Ile Ala Gln Asp Asn Leu Cys Met Ile Arg Ser
 195 200 205

Gly Gln Asp Trp Ser Asp Thr Asp Ala Ala Glu Arg Arg Met Tyr Leu
 210 215 220

Asp Asp Val Glu Pro Val Leu Arg Glu Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp
 225 230 235 240

Gln Gly Leu Ser Ile Gly Cys Tyr Ala Asn Arg Tyr Met Arg Leu Arg
 245 250 255

Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Glu Lys Ser Tyr Gly Gln Ser Trp Trp
 260 265 270

Gln Ser Leu Ser Ala Leu Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His
 275 280 285

Val Arg Ile Phe Gly Ala Ala Met Lys Tyr Leu Ser Ser Leu Gly Pro
 290 295 300

Ala Ala Arg Leu Arg Leu Tyr His Glu Val Thr Val Ala Ala Ala Asp
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Phe Glu Tyr Arg Gly Cys His Ala Lys Thr Gly Met Leu
 325 330 335

Ala Ala Ala Gly
 340

<210> 9

<211> 350

<212> PRT

5 <213> *Burkholderia ambifaria* IOP40-10

<400> 9

Met Glu Ser Ala Ile Asp Lys His Leu Val Cys Pro Arg Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Val Ala Asp Asp Tyr Gln Pro Pro Phe Pro Met Tyr Val Ala
 20 25 30

ES 2 587 561 T3

Arg Ala Ser Glu Asp Leu Ser Gln Val Val Met Gly Tyr Phe Gly Val
35 40 45

Gln Tyr Arg Gly Ala Asp Gln Arg Ser Ala Ala Leu Ala Ala Leu Arg
50 55 60

Arg Ile Val Ala Asp Phe Asp Ala Pro Asp Gly Pro Gly Asn His Asp
65 70 75 80

Leu Thr Gln His Thr Asp Asn Gln Gly Tyr Asp Asn Leu Ile Ala Val
85 90 95

Gly Tyr Trp Arg Asp Pro Asp Ala Tyr Ala Arg Trp Ile Ala Ser Pro
100 105 110

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

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

Leu Tyr Ala Phe Thr Ala Asp Phe Pro Gly Val Gly Ala Ile Met Asp
145 150 155 160

Gly Val Ser Gly Glu Ile Glu Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
165 170 175

Asp Arg Phe Pro Ile Ser Gln Thr Asp Trp Met His Ala Asp Gly Glu
180 185 190

Leu Arg Ile Val Ala Gly Asp Pro Ala Arg Gly Gly Arg Val Val Val
195 200 205

Leu Ala His Asp Asn Ile Ala Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Arg
210 215 220

Ala Ala Gln Asp Asp Glu Arg Arg Leu Tyr Leu Asp Glu Ile Glu Pro
225 230 235 240

Thr Leu Arg Ser Gly Met Glu Phe Leu Arg Asp Asn Gly Val Asp Val
245 250 255

Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Tyr Val Arg Ser Ile Asp Leu Asp Gly Asn
260 265 270

Leu Leu Asp Glu Ser Tyr Asn Ile Gly His Trp Arg Ser Leu Asp Arg

ES 2 587 561 T3

275	280	285
Leu Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Val		
290	295	300
Thr Phe Phe Arg Val Val Thr Gly Leu Ser Lys Leu Arg Leu Tyr His		
305	310	315
Glu Val Ser Val Phe Asp Ala Lys His Gln Val Tyr Glu Tyr Val Asn		
325	330	335
Cys His Pro Asn Thr Gly Met Met Arg Asp Ala Val Ala Arg		
340	345	350

<210> 10

<211> 350

<212> PRT

5 <213> *Burkholderia ambifaria* MC40-6

<400> 10

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

ES 2 587 561 T3

Val Leu Asp Glu Ser Tyr Asn Ile Gly His Trp Arg Ser Leu Asp Arg
 275 280 285

Leu Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Val
 290 295 300

Thr Phe Phe Arg Val Val Thr Gly Leu Ser Lys Leu Arg Leu Tyr His
 305 310 315 320

Glu Val Ser Val Phe Asp Ala Lys His Gln Val Tyr Glu Tyr Val Asn
 325 330 335

Cys His Pro Arg Thr Gly Leu Met Arg Asp Ala Val Ala Ile Ala Arg
 340 345 350

<210> 12

<211> 348

<212> PRT

5 <213> *Pantoea* sp. At-9b

<400> 12

Met Glu Ser Ala Ile Asp Thr His Leu Lys Cys Pro Arg Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Val His Asp Asp Tyr Gln Pro Pro Phe Pro Met Phe Ala Gly
 20 25 30

Arg Ala Asp Ala Ser Leu Thr Gln Val Val Met Ala Tyr Leu Gly Val
 35 40 45

Gln Phe Arg Glu Glu Gln Arg Ala Ala Ala Ile Thr Ala Met Gln His
 50 55 60

Ile Val Arg Ser Phe Ser Leu Asp Asn Gly Pro Gly Asn His Asp Val
 65 70 75 80

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

Tyr Trp Arg Asp Pro Ala Ala Tyr Cys Arg Trp Leu His Gln Pro Ala
 100 105 110

Ile Thr Gly Trp Trp Ser Ser Asp Asp Arg Leu Arg Asp Gly Leu Gly
 115 120 125

Tyr Phe Arg Glu Ile Ile Ala Pro Arg Ala Glu Gln Phe Glu Thr Leu
 130 135 140

ES 2 587 561 T3

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

Leu Ser Gly Glu Ile Gln Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Val Arg Asp
165 170 175

Arg Ile Pro Ala Ser Gln Thr Asp Trp Leu Gln Pro Asp Gly Glu Leu
180 185 190

Arg Ile Ile Ser Gly Asp Pro Ala Ala Gly Gly Arg Val Val Val Gln
195 200 205

Gly His Asp Asn Ile Thr Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Met Asp
210 215 220

Ala Asp Glu Gln Glu Arg Ala Leu Tyr Phe Thr Glu Met Leu Pro Pro
225 230 235 240

Leu Gln Ala Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Glu Gly Gln Thr Leu Gly
245 250 255

Cys Tyr Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn Val Asp Ile Asp Gly Asn Val
260 265 270

Leu Asp Ile Ala Tyr Asp Ile Gly Phe Trp Arg Ser Leu Asp Arg Leu
275 280 285

Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Thr Thr
290 295 300

Phe Phe Arg Val Val Ala Gly Leu Gln Lys Leu Arg Leu Tyr His Glu
305 310 315 320

Val Ser Val Ser Asp Ala Arg Phe Gln Thr Phe Glu Tyr Ile Asn Cys
325 330 335

His Pro Gln Thr Gly Met Leu Arg Asp Ala Val Arg
340 345

<210> 13

<211> 166

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas fluorescens* WH6

<400> 13

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

ES 2 587 561 T3

Gly Gly Arg Val Val Val Met Gly His Asp Asn Leu Thr Leu Ile Arg
 20 25 30

Ser Gly Gln Asp Trp Ala Asp Ala Glu Ala Asp Glu Arg Ser Leu Tyr
 35 40 45

Leu Asp Glu Ile Leu Pro Thr Leu Gln Asp Gly Met Asp Phe Leu Arg
 50 55 60

Asp Asn Gly Gln Pro Leu Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn
 65 70 75 80

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

Trp Arg Ser Val Glu Lys Leu Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr
 100 105 110

His Leu Arg Ile Phe Val Thr Phe Phe Arg Val Ala Ala Gly Leu Lys
 115 120 125

Lys Leu Arg Leu Tyr His Glu Val Ser Val Ser Asp Ala Lys Ser Gln
 130 135 140

Leu Phe Glu Tyr Ile Asn Cys His Pro His Thr Gly Met Leu Arg Asp
 145 150 155 160

Ala Gln Ala Ala Thr Ala
 165

<210> 14

<211> 186

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas fluorescens* WH6

<400> 14

Met Glu Ser Ala Ile Asp Thr His Leu Lys Cys Pro Arg Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Val Pro Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Phe Pro Met Trp Val Ala
 20 25 30

Arg Ala Asp Glu Gln Leu Glu Gln Val Val Met Ala Tyr Leu Gly Val
 35 40 45

Gln Tyr Arg Gly Glu Ala Gln Arg Glu Ala Ala Leu Gln Ala Met Arg
 50 55 60

ES 2 587 561 T3

His Ile Val Gly Ser Phe Ser Leu Ala Asp Gly Pro Gln Thr His Asp
65 70 75 80

Leu Thr His His Thr Asp Ser Ser Gly Phe Asp Asn Leu Ile Val Val
85 90 95

Gly Tyr Trp Lys Asp Pro Gly Ala His Cys Arg Trp Leu Arg Ser Ala
100 105 110

Pro Val Asn Asp Trp Trp Ala Ser Gln Asp Arg Leu Ser Asp Gly Leu
115 120 125

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

Leu Tyr Ala Phe Gln Asp Asn Leu Pro Gly Val Gly Ala Val Met Asp
145 150 155 160

Ala Thr Ser Gly Glu Ile Glu Asn Thr Val Thr Gly Ala Arg Cys Ala
165 170 175

Thr Ala Ser Pro Ser Pro Arg Gln Thr Gly
180 185

<210> 15

<211> 352

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas putida* F1

<400> 15

Met Glu Ser Ala Ile Asp Lys His Leu Val Cys Pro Arg Thr Leu Ser
1 5 10 15

Arg Arg Val Pro Asp Asp Tyr Gln Pro Pro Phe Pro Met Trp Val Gly
20 25 30

Arg Ala Asp Glu Gln Leu Thr Gln Val Val Met Ala Tyr Leu Gly Val
35 40 45

Gln Tyr Arg Gly Asp Gly Gln Arg Glu Arg Ala Leu Gln Ala Met Arg
50 55 60

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

Leu Thr His His Thr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Asn Leu Met Ile Val
85 90 95

ES 2 587 561 T3

Gly Tyr Trp Lys Asp Ala Gly Ala Tyr Cys Arg Trp Leu Arg Ser Pro
 100 105 110

Glu Val Asp Gly Trp Trp Ser Ser Pro Gln Arg Leu Asn Asp Gly Leu
 115 120 125

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

Leu Tyr Ala Phe Gln Asn Asp Leu Pro Gly Val Gly Ala Ile Met Asp
 145 150 155 160

Asn Thr Ser Gly Glu Ile Glu Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
 165 170 175

Asp Arg Phe Pro Val Ser Gln Thr Asp Trp Met Asn Pro Asn Gly Glu
 180 185 190

Leu Arg Val Val Ala Gly Asp Pro Ala Lys Gly Gly Arg Val Val Val
 195 200 205

Leu Gly His Asp Asn Ile Ala Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Ala
 210 215 220

Thr Ala Glu Ala Ala Glu Arg Ser Leu Tyr Leu Asp Glu Ile Leu Pro
 225 230 235 240

Thr Leu Gln Asp Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Asn Gly Gln Pro Leu
 245 250 255

Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn Ile Asp Ala Asp Gly Asn
 260 265 270

Leu Leu Asp Met Ser Tyr Asn Ile Gly His Trp Arg Ser Leu Glu Lys
 275 280 285

Leu Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Val
 290 295 300

Thr Phe Phe Arg Val Ala Ala Gly Leu Glu Lys Leu Arg Leu Tyr His
 305 310 315 320

Glu Val Ser Val Ser Asp Ala Ser Ser Gln Val Phe Glu Tyr Ile Asn
 325 330 335

Cys His Pro His Thr Gly Met Leu Arg Asp Ala Lys Val Ser Ser Asn
 340 345 350

ES 2 587 561 T3

<210> 16
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas putida* cepa BIRD-1

5 <400> 16

Met Glu Ser Ala Ile Asp Lys His Leu Met Cys Pro Arg Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Val Pro Asp Asp Tyr Gln Pro Pro Phe Pro Met Trp Val Gly
 20 25 30

Arg Ala Asp Glu Gln Leu Thr Gln Val Val Met Ala Tyr Leu Gly Val
 35 40 45

Gln Tyr Arg Gly Asp Ser Gln Arg Glu Arg Ala Leu Gln Ala Met Arg
 50 55 60

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

Leu Thr His His Thr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Asn Leu Met Ile Val
 85 90 95

Gly Tyr Trp Lys Asp Thr Gly Ala Tyr Cys Arg Trp Ser Arg Ser Pro
 100 105 110

Glu Val Asp Gly Trp Trp Ser Ser Pro Gln Arg Leu Asn Asp Gly Leu
 115 120 125

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

Leu Tyr Ala Phe Gln Ser Asp Leu Pro Gly Val Gly Ala Ile Met Asp
 145 150 155 160

Asn Thr Ser Gly Glu Ile Glu Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
 165 170 175

Asp Arg Phe Pro Val Ser Gln Thr Asp Trp Met Asn Pro Asn Gly Glu
 180 185 190

Leu Arg Val Val Ala Gly Asp Pro Ala Lys Gly Gly Arg Val Val Val
 195 200 205

Ile Gly His Asp Asn Ile Ala Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Ala
 210 215 220

ES 2 587 561 T3

Ala Ala Glu Ala Ala Glu Arg Ser Leu Tyr Leu Asp Glu Ile Leu Pro
225 230 235 240

Thr Leu Gln Asp Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Asn Gly Gln Pro Leu
245 250 255

Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn Ile Asp Ala Asp Gly Asn
260 265 270

Val Leu Asp Met Ser Tyr Asn Ile Gly His Trp Arg Ser Leu Glu Lys
275 280 285

Leu Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Val
290 295 300

Thr Phe Phe Arg Val Ala Ala Gly Leu Glu Lys Leu Arg Leu Tyr His
305 310 315 320

Glu Val Ser Val Ser Asp Ala Ser Ser Gln Val Phe Glu Tyr Ile Asn
325 330 335

Cys His Pro His Thr Gly Met Leu Arg Asp Ala Lys Val Ser Ser Asn
340 345 350

<210> 17

<211> 332

<212> PRT

5 <213> *Shewanella woodyi* ATCC 51908

<400> 17

Met Met Asn Asn Met Pro Lys Asn Trp Thr Pro Pro Ala Pro Ala Trp
1 5 10 15

Thr Ser Leu Trp Lys Thr Asp Glu Glu Asn Leu Val Cys Gly Leu Phe
20 25 30

Ala Ile Gln Gly Gln His Ser Ala Pro Leu Asp Asp Trp Ala Lys Lys
35 40 45

Ala Phe Thr Gly Glu Phe Ser Pro Lys Leu Leu Glu Gln Gly Met Phe
50 55 60

Thr Asp Lys Ala Gly Ile Thr Asn Tyr Leu Tyr Ile Ala Tyr Trp Phe
65 70 75 80

Ala Ser Asp Tyr Lys Thr Trp Trp Gln Gln Ser Ala Ala Asn Ser Trp
85 90 95

ES 2 587 561 T3

Trp Ala Ser Pro Leu Leu Asp Glu Gly Asp Ile Ser Val Trp Arg Glu
100 105 110

Val Phe Thr Met Pro His Gln Arg Phe Glu Thr Leu His Ser Ser Glu
115 120 125

Asn Ala His Gly Ala Ala Arg Leu Ser Pro Ser Leu Glu Gly Pro Met
130 135 140

Met Glu His Gly Tyr Ser Gly Ala Ala Arg Asp Arg Ile Pro Cys Ser
145 150 155 160

Ser Ser Gln Asp Ile Lys Asn Asp Asn Ser Ile Trp Glu His Leu Gln
165 170 175

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

Asn Met Cys Val Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Thr His Cys Glu Glu
195 200 205

Asp Glu Lys Glu Tyr Tyr Leu Thr Asn Val His Thr Val Leu Lys Lys
210 215 220

Gly Met Asp Tyr Leu Ser Asn Asn Pro Val Lys Thr His Cys Ala Ser
225 230 235 240

Met Arg Phe Ile Thr Lys Thr Asp Gly Asn Trp Cys Ser Val Glu Gln
245 250 255

Thr Phe Gly Leu Gly Tyr Gly Asn Asp Ile Tyr Ala Phe Glu Asn Trp
260 265 270

Ala Lys Ser His Pro Thr His Ile Ala Ile Phe Asp Arg Phe Met Gly
275 280 285

Met Val Glu Lys Tyr Asn Val Asp Leu Lys Leu Gln Leu Trp His Glu
290 295 300

Val Thr Leu Ile Pro Glu Gln Asp Cys Glu Phe Glu Tyr Ile Asn Cys
305 310 315 320

His Gly Gln Thr Gly Leu Leu Cys Tyr Ile Asn Ile
325 330

ES 2 587 561 T3

<210> 18
<211> 343
<212> PRT
<213> *Sphingomonas wittichii* RW1

5 <400> 18

ES 2 587 561 T3

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

Arg Arg Ile Ala Asp Asp Tyr Ala Pro Pro Tyr Pro Ala Trp Ser Ala
20 25 30

Arg Ile Asp Pro Ala Ile Gly Gln Val Val Met Ala Ser Tyr Gly Val
35 40 45

Gln Gly Arg Glu Ser Gly Asp Val Ala Ala Ala Leu Ala His Val Arg
50 55 60

Ala Leu Arg Ala Thr Leu Asp Ala Asp Val Arg His Val Asp Leu Ala
65 70 75 80

Arg Tyr Val Asp Glu Ala Gly Tyr Asp Thr Leu Val Leu Gln Pro Tyr
85 90 95

Trp Thr Asp Pro Glu Ala Phe Arg Arg Trp Glu Ala Arg Ala Asp Val
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ala Glu Thr Gly Leu Gly His Phe Arg Glu Ile
115 120 125

Leu Thr Pro Thr Val Glu Arg Leu Glu Thr Leu Tyr Ser Thr Glu Asp
130 135 140

Glu Met Glu Gly Leu Gly Arg Ala Leu Glu Arg Arg Ser Pro Pro Val
145 150 155 160

Gln Glu His Ala Tyr Trp Gly Ser Ala Arg Asp Arg Phe Pro Ile Ala
165 170 175

Gln Thr Asp Ala Leu Glu Pro Ala Gly Gln Leu Gly Phe Ala Ala Asp
180 185 190

Gly Ala Gly Arg Val Thr Val Arg Gly His Asp Asn Ile Ala Ile Ile
195 200 205

Arg Ser Gly Gln Asp Trp Gly Pro Thr Gly Gly Glu Glu Arg Arg Leu
210 215 220

Tyr Leu Ala Glu Ile Glu Pro Val Leu Arg Ala Gly Met Asp Phe Leu
225 230 235 240

ES 2 587 561 T3

Arg Asp Arg Gly Gly Glu Cys Gly Cys Tyr Leu Asn Arg Tyr Met Arg
 245 250 255

Ile Val Asp Met Asp Gly Ala Pro Gln Glu Lys Ser Phe Gly Trp Ser
 260 265 270

Tyr Trp Arg Ser Leu Gly Asp Met Glu Asn Trp Ser Glu Ala His Pro
 275 280 285

Ser His Leu Ala Ile Phe Gly Thr Phe Met Arg Ile Val Gln Gln Leu
 290 295 300

Asn Phe Asp Leu Lys Leu Arg Leu Trp His Glu Val Tyr Val Val Thr
 305 310 315 320

Pro Asp Gln Gln Leu Tyr Asp Tyr Arg Asn Cys His Pro Asp Thr Gly
 325 330 335

Phe Leu Lys Gln Met Pro Arg
 340

<210> 19

<211> 353

<212> PRT

5 <213> *Variovorax paradoxus* EPS

<400> 19

Met Glu Ser Ala Ile Ala Glu His Leu Lys Cys Pro Arg Thr Arg His
 1 5 10 15

Arg Arg Val Glu Asp Asp Tyr Thr Pro Pro Tyr Pro Val Trp Ser Ala
 20 25 30

Arg Ala Pro Thr Ser Val Thr Gln Val Thr Met Gly Tyr Phe Gly Val
 35 40 45

Gln Ser Arg Gly Pro Glu Met Gln Gly Arg Ala Cys Ala Ala Leu Met
 50 55 60

Lys Ile Ala Arg Asp Phe Ala Leu Pro Asp Gly Pro Gly His His Asp
 65 70 75 80

Leu Ala His Tyr Val Asp Ala Asp Gly Phe Asp Asn Met Val Ala Ile
 85 90 95

Ala Tyr Trp His Asp Ala Ala Ala Phe Ala Arg Trp Ser Ala Thr Pro
 100 105 110

ES 2 587 561 T3

Ala Ile Asp Ala Trp Trp Arg Ser Asp Glu Arg Leu Asn Glu Gly Leu
 115 120 125

Gly Tyr Phe Arg Glu Ile Ala Ser Pro Arg Val Glu His Phe Glu Thr
 130 135 140

Met Phe Asn Thr Pro Asp Arg Phe Glu Gly Ile Gly Val Val Met Gly
 145 150 155 160

Glu Leu Ser Gly Glu Leu Gln Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
 165 170 175

Asp Arg Ile Pro Leu Ser Gln Thr Asp Ala Leu Ser Pro Ser Gly Thr
 180 185 190

Arg Ala Val Val Ala Gly Thr Pro Ala Pro Gly Gln Arg Val Arg Ile
 195 200 205

Ala Gly His Glu Asn Ile Ala Met Ile Arg Ser Gly Gln Glu Trp Ala
 210 215 220

Asp Thr Thr Gly Gln Glu Arg Thr Leu Tyr Leu Glu Asp Met Glu Pro
 225 230 235 240

Val Leu Arg Glu Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Gln Gly Leu Gly Ile
 245 250 255

Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Tyr Met His His Leu Asp Ala Lys Gly Ala
 260 265 270

Pro Leu Gln Lys Ser Phe Gly Leu Ser Tyr Trp Arg Ser Leu Ala Asp
 275 280 285

Met Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Val Ala Ile Phe Gly
 290 295 300

Ser Phe Met Arg Tyr Val Gln Ala Leu Asn Phe Gln Leu Gln Leu Arg
 305 310 315 320

Val Tyr His Glu Val Ser Val Leu Lys Ala Asp Glu Gln Ser Tyr Glu
 325 330 335

Tyr Ile Asn Cys Arg Ala Arg Ser Gly Leu Met Asn Gly Leu Ala Val
 340 345 350

Thr

ES 2 587 561 T3

<210> 20
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> *Variovorax paradoxus* S110

5 <400> 20

Met Glu Ser Arg Asp Ala Asp Ala Arg Ala Leu Leu Ala Arg Val Ala
 1 5 10 15

Asn Thr Phe Ala Gly Val Gly Gly Pro Ala Ser Leu Gly Arg Gly Val
 20 25 30

Ala Thr Gly Ala Gly Gly Glu Arg Ser Asp Ile Phe Tyr Ala Tyr Trp
 35 40 45

Asn Ser Ser Ala Glu Tyr Ala Ser Trp Leu Thr Thr Pro Arg Val Ala
 50 55 60

Ser Leu Trp Thr Asp Asp Ala Leu Leu Arg Gly Pro Ile Gly Leu Trp
 65 70 75 80

Arg Glu Ser Met Ile Ile Pro Val Glu Arg Asn Glu Thr Asn Tyr Ser
 85 90 95

Asn Asp Ala Ala Tyr Asp Gly Ile Ala Gln Ile Asp Lys Glu Met Arg
 100 105 110

Lys Thr Asp Val His Gly Tyr Trp Gly Ser Ala Arg Glu Arg Ile Pro
 115 120 125

Ala Ser Ala His Asp Thr Met Pro Ser Ala Ala Pro Asp Phe Met Gly
 130 135 140

Arg Pro Ala Ala Ser Met Glu Thr Leu Gly Arg Arg Phe Arg Ile Thr
 145 150 155 160

Leu Pro Gly Asn Thr Cys Val Ile Arg Ser Phe Gln Asp Trp Ser Gln
 165 170 175

Ala Gln Ala Ala Glu Val Asp Trp Tyr Leu Gly Asn Val Glu Pro Val
 180 185 190

Leu Arg Val Gly Leu Asp Tyr Leu Asn Gly Asn Arg Thr Glu Ala Lys
 195 200 205

Cys Tyr Gly Met Arg Tyr Ile Arg Glu Tyr Asp Ile Ser Gly Ala Ile

ES 2 587 561 T3

210

215

220

Asp Leu Asn Arg Thr Ser Thr Phe Gly Tyr Phe Glu Ser Leu Gln Thr
225 230 235 240

Leu Glu Arg Trp Thr His Thr His Pro Thr His Leu Asp Ile Phe Arg
245 250 255

Ala Ala Ile Ser Met Val Gln Arg Phe Gln Gly Glu Val Ala Val Lys
260 265 270

Leu Gly His Glu Val Ser Val Leu Pro Glu Gly Met Leu Ser Ala Glu
275 280 285

Tyr Val Asn Cys Ala Arg Ser Thr Gly Phe Leu Pro Trp Phe His Glu
290 295 300

Asp
305

<210> 21

<211> 353

<212> PRT

5 <213> *Variovorax paradoxus* S110

<400> 21

Met Glu Ser Ala Ile Ala Glu His Leu Lys Cys Pro Arg Thr Arg His
1 5 10 15

Arg Arg Val Glu Asp Asp Tyr Ala Pro Pro Tyr Pro Ala Trp Ser Ala
20 25 30

Arg Ala Pro Gly Ala Val Arg Gln Val Val Met Gly Tyr Phe Gly Val
35 40 45

Gln Ser Arg Gly Ala Gly Met Gln Gly Arg Ala Cys Ala Ala Leu Met
50 55 60

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

Phe Ala His His Val Asp Ala Ala Gly Cys Asp Asn Met Val Ala Ile
85 90 95

Ala Tyr Trp Asn Asp Pro Ala Ala His Ala Arg Trp Cys Thr Ala Pro
100 105 110

Glu Val Asp Ala Trp Trp Arg Ser Asp Glu Arg Leu Ala Asp Gly Leu

ES 2 587 561 T3

115 120 125

Gly Tyr Phe Arg Glu Ile Val Ala Pro Arg Ala Glu His Phe Glu Thr
 130 135 140

Met Phe Asn Thr Pro Asp Arg Leu Glu Gly Val Gly Val Val Met Gly
 145 150 155 160

Gly Val Ser Gly Glu Leu Gln Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
 165 170 175

Asp Arg Ile Pro Leu Ser Gln Thr Asp Ala Met Ala Pro Ser Gly Thr
 180 185 190

Arg Ala Val Ile Ala Gly Ala Pro Ala Pro Gly Gln Arg Val Arg Ile
 195 200 205

Ala Gly His Glu Asn Ile Ala Met Ile Arg Ser Gly Gln Glu Trp Ala
 210 215 220

Asp Thr Thr Gly Gln Glu Arg Ala Leu Tyr Leu Gly Glu Met Glu Pro
 225 230 235 240

Val Leu Arg Glu Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Gln Gly Leu His Ile
 245 250 255

Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Tyr Met Gln His Leu Asp Ala Lys Gly Ala
 260 265 270

Pro Leu Glu Lys Ser Phe Gly Leu Ser Phe Trp His Ser Leu Ala Asp
 275 280 285

Met Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Val Ala Ile Phe Gly
 290 295 300

Ser Phe Met Arg Tyr Val Gln Ala Leu Asn Phe Gln Leu Gln Leu Arg
 305 310 315 320

Val Tyr His Glu Val Ser Val Leu Lys Ala Asp Glu Gln Ser Tyr Glu
 325 330 335

Tyr Ile Asn Cys His Ala Gly Ser Gly Leu Met Asn Gly Leu Gly Glu
 340 345 350

Val

<210> 22

<211> 347

<212> PRT

5 <213> *Xanthobacter autotrophicus* Py2

<400> 22

ES 2 587 561 T3

Met Val Phe His Val Glu Tyr Pro Arg Ile Val Pro Glu Arg Arg Pro
1 5 10 15

Pro Gly His Glu Pro Ala Ala Pro Arg Phe Ser Leu Arg Trp Glu Gln
20 25 30

Pro Val Gly Leu Val Val Cys Ala Tyr Phe Gly Leu Gln Gly Gln Asp
35 40 45

Leu Ala Trp Asp Glu Gln Lys Ala Phe Phe Asp Arg Leu Gln Thr Ser
50 55 60

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

Glu Thr Gly Ala Val Asn Ala Ile Leu Val Ala Tyr Trp Leu Asp Ala
85 90 95

Thr Ala His Ala Arg Trp Glu Arg Asn Ser Pro Phe Met Ala Trp Phe
100 105 110

Arg Asp Pro Ala Arg Leu Glu Gly Thr Arg Gly Val Trp Arg Glu Thr
115 120 125

Met His Val Pro Tyr Asp Arg His Glu Thr Ile Tyr Ser Thr Pro Ser
130 135 140

Tyr Val Ile Gly Leu Ala Arg Thr Pro Gly Ala Thr Arg Val Pro Ile
145 150 155 160

Thr Thr Asn Gly Tyr Phe Gly Ala Met Arg Asp Arg Met Pro Val Ser
165 170 175

Ala Ile Asp Thr Leu Glu Ser Pro Leu Gly Ala Met Pro Pro Arg Arg
180 185 190

Ala Pro Asp Ser His Gly Arg Arg Leu Thr Ala Ala Phe Pro Leu Asn
195 200 205

Leu Ile Ser Ile Arg Ser Gly Gln Tyr Trp Glu Gly Ala Gly Asn Glu
210 215 220

ES 2 587 561 T3

Gln Thr Ala Asp Tyr Ile Asp Asn Leu Gln Pro Lys Leu Met Arg Gly
225 230 235 240

Met Ala His Leu Ser Ser His Pro Glu Gln Thr Gly Thr Leu Thr Leu
245 250 255

Arg Ile Met Thr Asn Leu Asp Ala Glu Gly Arg Pro Arg Ala Glu Thr
260 265 270

Ser Val His Gly Tyr Phe Leu Ser Met Ala His Leu Glu Glu Trp Ser
275 280 285

Arg Ser His Glu Thr His Leu Asp Ile Tyr Arg His Ala Ile Ala Met
290 295 300

Asn Arg Leu Tyr Lys Glu Lys Arg Glu Val Phe Thr Trp His Glu Val
305 310 315 320

Phe Ala Leu Leu Pro Gly Ala His Ala Glu Tyr Ala Asn Cys His Gly
325 330 335

Gly Thr Gly Leu Leu Pro Tyr Phe Ala Asp Ala
340 345

<210> 23
<211> 363
<212> PRT
<213> *Gibberella zeae*

5

<400> 23

Met Leu Arg Ser Arg Phe Pro Ala Ser His His Phe Thr Val Ser Val
1 5 10 15

Phe Gly Cys Gln Tyr His Ser Glu Ala Pro Ser Val Glu Lys Thr Glu
20 25 30

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

Glu His Leu Glu Gln Asn Asp Val Pro Ser Lys Ile Trp Met Ser Tyr
50 55 60

Trp Glu Ser Pro Gln Lys Phe Lys Gln Trp Trp Glu Lys Asp Asp Thr
65 70 75 80

Ala Ser Phe Trp Ala Ser Leu Pro Asp Asp Ala Gly Phe Trp Arg Glu
85 90 95

ES 2 587 561 T3

Thr Phe Ser Leu Pro Ala Thr Arg Ala Met Tyr Glu Gly Thr Gly Lys
100 105 110

Asp Ala Tyr Gly Phe Gly His Cys Gly Ser Leu Ile Pro Leu Thr Thr
115 120 125

Lys Thr Gly Tyr Trp Gly Ala Tyr Arg Ser Arg Met Thr Pro Asp Phe
130 135 140

Glu Gly Asp Thr Phe Ser Ser Pro Ile Pro Thr Tyr Ala Asp Gln Ser
145 150 155 160

Val Pro Ala Asp Lys Ile Arg Pro Gly Arg Val Arg Ile Thr Asp Phe
165 170 175

Pro Asp Asn Leu Cys Met Val Val Glu Gly Gln His Tyr Ala Asp Met
180 185 190

Gly Glu Arg Glu Arg Glu Tyr Trp Asn Glu Asn Phe Asp Gly Leu Thr
195 200 205

Lys Gln Trp Val Thr Asn Val Val Thr Ala Gly His Glu Gln Gly Met
210 215 220

Val Ile Ala Arg Ala Cys His Gly Phe Ala Gly Glu Lys Lys Leu Gly
225 230 235 240

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

His Gln Ala Gln Ile Leu Ile Trp Gln Asp Ile Ser Lys Met Glu His
260 265 270

Ile Gly Arg Tyr Asp Gln Thr His Val Lys Leu Arg Arg Asp Phe Met
275 280 285

Lys Ala Tyr Gly Pro Gly Gly Glu Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Leu
290 295 300

Trp Val Asp Leu Gly Ile Leu Lys Lys Asp Glu Ile Asp Ala Glu Tyr
305 310 315 320

Val Gly Cys Tyr Glu Ser Thr Gly Phe Leu Lys Leu Asp Lys Gly Gln
325 330 335

Phe Phe Lys Val Glu Ser Thr Ala Gly Ser Lys Leu Pro Ser Phe Phe
340 345 350

ES 2 587 561 T3

Asp Glu Pro Ile Glu Ser Lys Pro Ile Glu Trp
 355 360

<210> 24

<211> 352

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas chlororaphis*

<400> 24

Met Glu Ser Ala Ile Asp Thr His Leu Lys Cys Pro Arg Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Val Pro Glu Glu Tyr Gln Pro Pro Phe Pro Met Trp Val Ala
 20 25 30

Arg Ala Asp Glu Gln Leu Gln Gln Val Val Met Gly Tyr Leu Gly Val
 35 40 45

Gln Tyr Arg Gly Glu Ala Gln Arg Glu Ala Ala Leu Gln Ala Met Arg
 50 55 60

His Ile Val Ser Ser Phe Ser Leu Pro Asp Gly Pro Gln Thr His Asp
 65 70 75 80

Leu Thr His His Thr Asp Ser Ser Gly Phe Asp Asn Leu Met Val Val
 85 90 95

Gly Tyr Trp Lys Asp Pro Ala Ala His Cys Arg Trp Leu Arg Ser Ala
 100 105 110

Glu Val Asn Asp Trp Trp Thr Ser Gln Asp Arg Leu Gly Glu Gly Leu
 115 120 125

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

Leu Tyr Ala Phe Gln Asp Asn Leu Pro Gly Val Gly Ala Val Met Asp
 145 150 155 160

Ser Thr Ser Gly Glu Ile Glu Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
 165 170 175

Asp Arg Phe Pro Ile Ser Gln Thr Asp Trp Met Lys Pro Thr Asn Glu
 180 185 190

Leu Gln Val Val Ala Gly Asp Pro Ala Lys Gly Gly Arg Val Val Ile
 195 200 205

ES 2 587 561 T3

Met Gly His Asp Asn Ile Ala Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Ala
 210 215 220

Asp Ala Glu Ala Glu Glu Arg Ser Leu Tyr Leu Asp Glu Ile Leu Pro
 225 230 235 240

Thr Leu Gln Asp Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Asn Gly Gln Pro Leu
 245 250 255

Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn Ile Asp Leu Asp Gly Asn
 260 265 270

Phe Leu Asp Val Ser Tyr Asn Ile Gly His Trp Arg Ser Leu Glu Lys
 275 280 285

Leu Glu Arg Trp Ala Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Val
 290 295 300

Thr Phe Phe Arg Val Ala Ala Gly Leu Lys Lys Leu Arg Leu Tyr His
 305 310 315 320

Glu Val Ser Val Ser Asp Ala Lys Ser Gln Val Phe Glu Tyr Ile Asn
 325 330 335

Cys His Pro His Thr Gly Met Leu Arg Asp Ala Val Val Ala Pro Thr
 340 345 350

<210> 25

<211> 352

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas* sp. K-9

<400> 25

Met Glu Ser Ala Ile Asp Thr His Leu Lys Cys Pro Arg Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Val Pro Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Phe Ala Met Trp Met Ala
 20 25 30

Arg Ala Asp Glu His Leu Glu Gln Val Val Met Ala Tyr Phe Gly Val
 35 40 45

Gln Tyr Arg Gly Glu Ala Gln Arg Ala Ala Ala Leu Gln Ala Met Arg
 50 55 60

His Ile Val Glu Ser Phe Ser Leu Ala Asp Gly Pro Gln Thr His Asp
 65 70 75 80

ES 2 587 561 T3

Leu Thr His His Thr Asp Asn Ser Gly Phe Asp Asn Leu Ile Val Val
 85 90 95

Gly Tyr Trp Lys Asp Pro Ala Ala His Cys Arg Trp Leu Arg Ser Ala
 100 105 110

Pro Val Asn Ala Trp Trp Ala Ser Glu Asp Arg Leu Asn Asp Gly Leu
 115 120 125

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

Leu Tyr Ala Phe Gln Asp Asn Leu Pro Gly Val Gly Ala Val Met Asp
 145 150 155 160

Arg Ile Ser Gly Glu Ile Glu Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
 165 170 175

Asp Arg Phe Pro Ile Ser Gln Thr Asp Trp Met Lys Pro Thr Ser Glu
 180 185 190

Leu Gln Val Ile Ala Gly Asp Pro Ala Lys Gly Gly Arg Val Val Val
 195 200 205

Leu Gly His Gly Asn Leu Thr Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Ala
 210 215 220

Asp Ala Glu Ala Glu Glu Arg Ser Leu Tyr Leu Asp Glu Ile Leu Pro
 225 230 235 240

Thr Leu Gln Asp Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Asn Gly Gln Pro Leu
 245 250 255

Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn Ile Asp Leu Asp Gly Asn
 260 265 270

Phe Leu Asp Val Ser Tyr Asn Ile Gly His Trp Arg Ser Val Glu Lys
 275 280 285

Leu Glu Arg Trp Thr Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Val
 290 295 300

Thr Phe Phe Arg Val Ala Ala Gly Leu Lys Lys Leu Arg Leu Tyr His
 305 310 315 320

Glu Val Ser Val Ser Asp Ala Lys Ser Gln Ile Phe Gly Tyr Ile Asn
 325 330 335

ES 2 587 561 T3

Cys His Pro Gln Thr Gly Met Leu Arg Asp Ala Gln Val Ser Pro Ala
 340 345 350

<210> 26

<211> 353

<212> PRT

5 <213> *Rhodococcus erythropolis*

<400> 26

Met Glu Ser Ala Ile Gly Glu His Leu Gln Cys Pro Arg Thr Leu Thr
 1 5 10 15

Arg Arg Val Pro Asp Thr Tyr Thr Pro Pro Phe Pro Met Trp Val Gly
 20 25 30

Arg Ala Asp Asp Ala Leu Gln Gln Val Val Met Gly Tyr Leu Gly Val
 35 40 45

Gln Phe Arg Asp Glu Asp Gln Arg Pro Ala Ala Leu Gln Ala Met Arg
 50 55 60

Asp Ile Val Ala Gly Phe Asp Leu Pro Asp Gly Pro Ala His His Asp
 65 70 75 80

Leu Thr His His Ile Asp Asn Gln Gly Tyr Glu Asn Leu Ile Val Val
 85 90 95

Gly Tyr Trp Lys Asp Val Ser Ser Gln His Arg Trp Ser Thr Ser Thr
 100 105 110

Pro Ile Ala Ser Trp Trp Glu Ser Glu Asp Arg Leu Ser Asp Gly Leu
 115 120 125

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

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

Gly Ile Ser Gly Glu Ile Asn Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
 165 170 175

Glu Arg Phe Pro Ile Ser Gln Thr Asp Trp Met Gln Ala Ser Gly Glu
 180 185 190

Leu Arg Val Ile Ala Gly Asp Pro Ala Val Gly Gly Arg Val Val Val
 195 200 205

ES 2 587 561 T3

Arg Gly His Asp Asn Ile Ala Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Ala
 210 215 220

Asp Ala Glu Ala Asp Glu Arg Ser Leu Tyr Leu Asp Glu Ile Leu Pro
 225 230 235 240

Thr Leu Gln Ser Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Asn Gly Pro Ala Val
 245 250 255

Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn Ile Asp Ile Asp Gly Asn
 260 265 270

Phe Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Ile Gly His Trp Ala Ser Leu Asp Gln
 275 280 285

Leu Glu Arg Trp Ser Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Thr
 290 295 300

Thr Phe Phe Arg Val Ala Ala Gly Leu Ser Lys Leu Arg Leu Tyr His
 305 310 315 320

Glu Val Ser Val Phe Asp Ala Ala Asp Gln Leu Tyr Glu Tyr Ile Asn
 325 330 335

Cys His Pro Gly Thr Gly Met Leu Arg Asp Ala Val Thr Ile Ala Glu
 340 345 350

His

<210> 27

<211> 353

<212> PRT

5 <213> *Rhodococcus globerulus*

<400> 27

Met Glu Ser Ala Ile Gly Glu His Leu Gln Cys Pro Arg Thr Leu Thr
 1 5 10 15

Arg Arg Val Pro Asp Thr Tyr Thr Pro Pro Phe Pro Met Trp Val Gly
 20 25 30

Arg Ala Asp Asp Thr Leu His Gln Val Val Met Gly Tyr Leu Gly Val
 35 40 45

Gln Phe Arg Gly Glu Asp Gln Arg Pro Ala Ala Leu Arg Ala Met Arg
 50 55 60

ES 2 587 561 T3

Asp Ile Val Ala Gly Phe Asp Leu Pro Asp Gly Pro Ala His His Asp
 65 70 75 80

 Leu Thr His His Ile Asp Asn Gln Gly Tyr Glu Asn Leu Ile Val Val
 85 90 95

 Gly Tyr Trp Lys Asp Val Ser Ser Gln His Arg Trp Ser Thr Ser Pro
 100 105 110

 Pro Val Ser Ser Trp Trp Glu Ser Glu Asp Arg Leu Ser Asp Gly Leu
 115 120 125

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

 Leu Tyr Ala Phe Gln Asp Asp Leu Pro Gly Val Gly Ala Val Met Asp
 145 150 155 160

 Gly Val Ser Gly Glu Ile Asn Glu His Gly Tyr Trp Gly Ser Met Arg
 165 170 175

 Glu Arg Phe Pro Ile Ser Gln Thr Asp Trp Met Gln Ala Ser Gly Glu
 180 185 190

 Leu Arg Val Val Ala Gly Asp Pro Ala Val Gly Gly Arg Val Val Val
 195 200 205

 Arg Gly His Asp Asn Ile Ala Leu Ile Arg Ser Gly Gln Asp Trp Ala
 210 215 220

 Asp Ala Glu Ala Asp Glu Arg Ser Leu Tyr Leu Asp Glu Ile Leu Pro
 225 230 235 240

 Thr Leu Gln Ser Gly Met Asp Phe Leu Arg Asp Asn Gly Pro Ala Val
 245 250 255

 Gly Cys Tyr Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn Ile Asp Ile Asp Gly Asn
 260 265 270

 Phe Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Ile Gly His Trp Ala Ser Leu Asp Gln
 275 280 285

 Leu Glu Arg Trp Ser Glu Ser His Pro Thr His Leu Arg Ile Phe Thr
 290 295 300

 Thr Phe Phe Arg Val Ala Glu Gly Leu Ser Lys Leu Arg Leu Tyr His

ES 2 587 561 T3

305 310 315 320

Glu Val Ser Val Phe Asp Ala Ala Asp Gln Leu Tyr Glu Tyr Ile Asn
325 330 335

Cys His Pro Gly Thr Gly Met Leu Arg Asp Ala Val Ile Thr Ala Glu
340 345 350

His

<210> 28

<211> 497

<212> PRT

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 28

Met Glu Met Ile Leu Ser Ile Ser Leu Cys Leu Thr Thr Leu Ile Thr
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Arg Arg Phe Leu Lys Arg Thr Ala Thr Lys Val Asn
20 25 30

Leu Pro Pro Ser Pro Trp Arg Leu Pro Val Ile Gly Asn Leu His Gln
35 40 45

Leu Ser Leu His Pro His Arg Ser Leu Arg Ser Leu Ser Leu Arg Tyr
50 55 60

Gly Pro Leu Met Leu Leu His Phe Gly Arg Val Pro Ile Leu Val Val
65 70 75 80

Ser Ser Gly Glu Ala Ala Gln Glu Val Leu Lys Thr His Asp His Lys
85 90 95

Phe Ala Asn Arg Pro Arg Ser Lys Ala Val His Gly Leu Met Asn Gly
100 105 110

Gly Arg Asp Val Val Phe Ala Pro Tyr Gly Glu Tyr Trp Arg Gln Met
115 120 125

Lys Ser Val Cys Ile Leu Asn Leu Leu Thr Asn Lys Met Val Glu Ser
130 135 140

Phe Glu Lys Val Arg Glu Asp Glu Val Asn Ala Met Ile Glu Lys Leu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asn Leu Ser Glu Leu Phe

ES 2 587 561 T3

Asp Ser Gly Leu Asp Tyr His Gly Lys Asn Leu Asn Tyr Ile Pro Phe
420 425 430

Gly Ser Gly Arg Arg Ile Cys Pro Gly Ile Asn Leu Ala Leu Gly Leu
435 440 445

Ala Glu Val Thr Val Ala Asn Leu Val Gly Arg Phe Asp Trp Arg Val
450 455 460

Glu Ala Gly Pro Asn Gly Asp Gln Pro Asp Leu Thr Glu Ala Ile Gly
465 470 475 480

Ile Asp Val Cys Arg Lys Phe Pro Leu Ile Ala Phe Pro Ser Ser Val
485 490 495

Val

REIVINDICACIONES

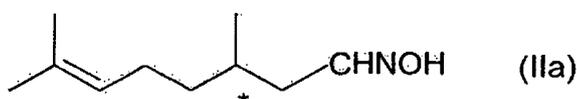
1. Procedimiento biocatalítico para la preparación de nitrilos en el que se hace reaccionar

- 5 a) una oxima, seleccionada entre citraloxima, neraloxima, geranialoxima, citronelaloxima y análogos parcial o completamente hidrogenados de las mismas, encontrándose el compuesto en forma estereoisoméricamente pura o como mezcla de estereoisómeros, en presencia de una aldoxima alifática deshidratasa (E.C. 4.99.1.5) o una fenilacetaldoxima deshidratasa (PAOx) (EC 4.99.1.7) para dar nitrilo, encontrándose el nitrilo en forma estereoisoméricamente pura o como mezcla de estereoisómeros y
- 10 b) dado el caso el producto de reacción se purifica adicionalmente a continuación.

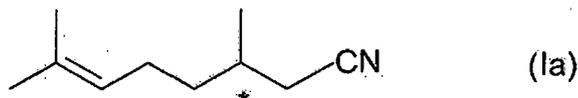
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la PAOx es una enzima de *Rhodococcus* sp., *Gibberella zeae* o *Bacillus* sp.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la PAOx presenta una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos idéntica a ésta en al menos un 60 %.

15 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se hace reaccionar citronelaloxima de fórmula IIa



para dar citronelilnitrilo de fórmula Ia



usándose el compuesto de fórmula IIa en forma estereoisoméricamente pura o como mezcla de estereoisómeros.

- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción se realiza de manera enzimática en presencia de PAOx, de una mezcla de proteínas que contiene una PAOx, o en presencia de un microorganismo recombinante, que expresa funcionalmente PAOx, de un homogeneizado de células derivado de éste que contiene PAOx o de una fracción del mismo que contiene una PAOx.
- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que PAOx o el microorganismo que expresa funcionalmente PAOx se encuentran en la mezcla de reacción libres o en forma inmovilizada.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 y 6, en el que el microorganismo recombinante es una cepa bacteriana que expresa funcionalmente PAOx.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el microorganismo recombinante porta un constructo de expresión, que presenta la secuencia de ácido nucleico de PAOx codificante, dado el caso adaptada al uso de codones del microorganismo.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el microorganismo expresa adicionalmente al menos una chaperona que favorece la expresión funcional de la PAOx.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el microorganismo recombinante es una cepa bacteriana que expresa adicionalmente a PAOx una o varias chaperonas seleccionadas entre GroEL y GroES.
- 35 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción se realiza en un sustrato como medio de reacción.

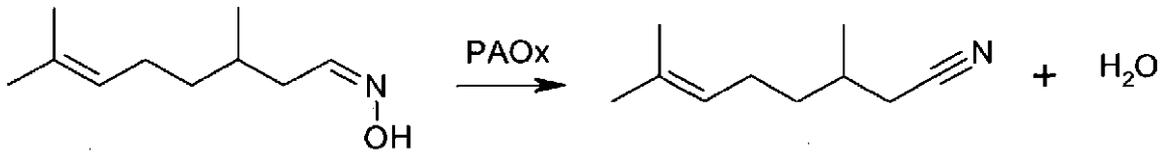


Fig. 1

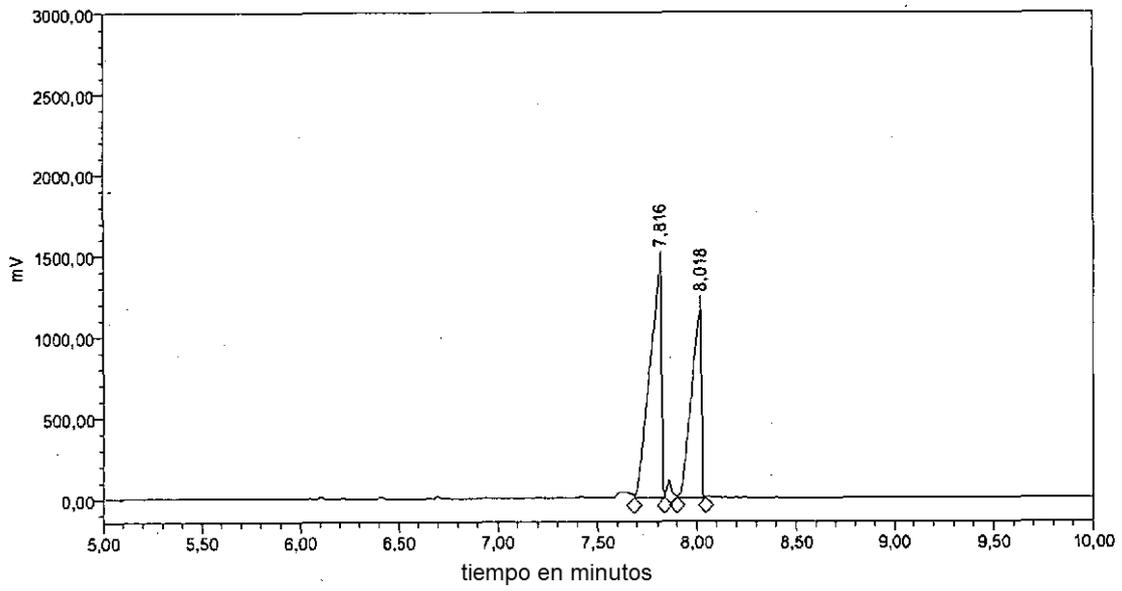


Fig. 2A

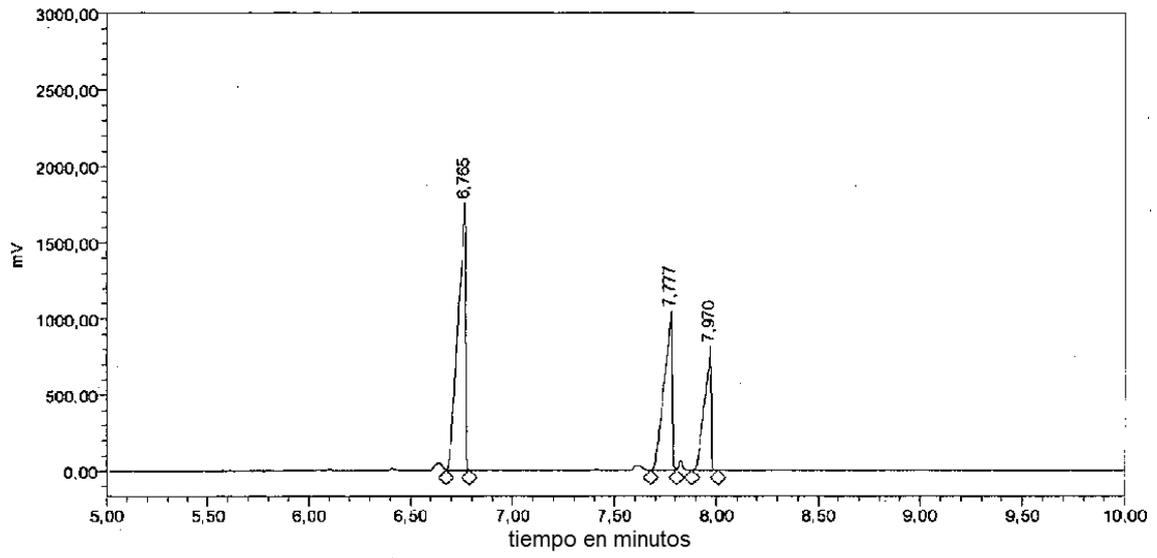


Fig. 2B

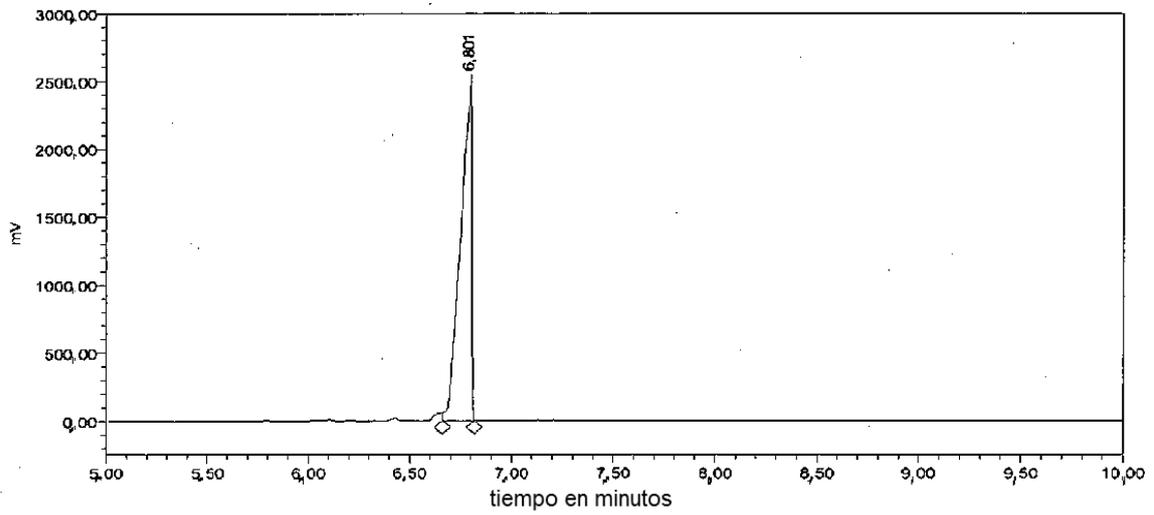


Fig. 2C