

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 811**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 7/60 (2006.01)
C12P 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2004 E 10184019 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2348113**

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

30 Prioridad:

14.08.2003 EP 03017677

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

13.12.2016

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 593 811 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción microbiana de ácido L-ascórbico.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un microorganismo genéticamente modificado seleccionado de *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* o *Escherichia* capaz de expresar L-sorbosona deshidrogenasa como una forma activa in vivo y capaz de convertir directamente L-sorbosona en vitamina C y por lo tanto producir ácido L-ascórbico con alto rendimiento. El ácido L-ascórbico se usa ampliamente en las industrias farmacéutica, de alimentación y cosmética.

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

Los métodos de producción actuales para el ácido L-ascórbico tienen algunas características indeseables tales como el alto consumo de energía y el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos e inorgánicos. Por lo tanto, a lo largo de las pasadas décadas, se han investigado otros procedimientos para fabricar ácido L-ascórbico usando conversiones microbianas, que serían más baratas así como ecológicas. Se ha descrito la producción directa de ácido L-ascórbico en varios microorganismos.

La producción de ácido 2-ceto-L-gulónico (2-KGA), un precursor del ácido L-ascórbico, usando un plásmido que lleva genes que codifican la L-sorbosa deshidrogenasa (SDH) y la L-sorbosona deshidrogenasa (SNDH) ha sido descrita por Saito et al. (*Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 2, 1997, 454-460). Los genes correspondientes se han aislado de la cepa *Gluconobacter oxydans* T-100. Se ha descrito la conversión de la L-sorbosona en 2-KGA. Lee y Pan (*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 1999, 106-111) describen un método de cribado para la L-sorbosa y L-sorbosona deshidrogenasa para la producción de 2-KGA. La generación de cepas mutantes de *Gluconobacter melanogenus* con el fin de aumentar la productividad de 2-KGA de dichas cepas la han descrito Sugisawa et al. (*Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 54, No. 5, 1990, 1201-1209).

Se han descrito secuencias parciales de un polinucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 (WO 97/04101), sin embargo, dirigidas a diferentes secuencias de nucleótidos con actividades distintas de la de la L-sorbosona deshidrogenasa de la presente invención. De nuevo en esta referencia no se dice nada sobre la conversión directa de L-sorbosona en ácido L-ascórbico.

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

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que la conversión directa de la L-sorbosona en ácido L-ascórbico se puede llevar a cabo usando la L-sorbosona deshidrogenasa (en lo sucesivo denominada SNDH_{ai}) aislada de *G. oxydans* N44-1 o enzimas que son ortólogas de la misma procedentes de bacterias de ácido acético pertenecientes a los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*. Se aisló un gen responsable para esta reacción y se determinó la secuencia. La enzima sorbosona deshidrogenasa codificada por este gen convierte la L-sorbosona en ácido L-ascórbico. Esta enzima es diferente de las enzimas SNDH conocidas.

El ácido L-ascórbico o vitamina C, usados de forma intercambiable en la presente memoria, puede ser cualquier forma química del ácido L-ascórbico encontrado en soluciones acuosas, tales como por ejemplo en forma no disociada, en su forma de ácido libre o disociado como un anión. La forma de sal solubilizada del ácido L-ascórbico se puede caracterizar como el anión en presencia de cualquier clase de cationes encontrados normalmente en líquidos sobrenadantes de fermentación, tales como por ejemplo, potasio, sodio, amonio o calcio. También pueden estar incluidos cristales aislado de la forma de ácido libre del ácido L-ascórbico. Por otra parte, los cristales aislados de una forma de sal del ácido L-ascórbico se llaman con su nombre de sal correspondiente, es decir, ascorbato sódico, ascorbato potásico, ascorbato cálcico y similares.

La conversión de la L-sorbosona en vitamina C significa que la conversión del sustrato que da como resultado la vitamina C es llevada a cabo por la SNDH_{ai}, es decir, el sustrato se puede convertir directamente en vitamina C.

Un vector de clonación puede ser, por ejemplo, cualquier ADN de plásmido o fago u otra secuencia de ADN que sea capaz de replicación de forma autónoma en una célula hospedante, y que se caracterice por uno o un número pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los que dichas secuencias de ADN se pueden cortar de una forma determinable sin pérdida de función biológica esencial del vector, y en los que se puede empalmar un fragmento de ADN con el fin de producir su replicación. El vector de clonación puede contener

además, por ejemplo, un marcador adecuado para usar en la identificación de células transformadas con el vector de clonación. Dichos marcadores pueden proporcionar, por ejemplo, resistencia a antibióticos, tales como por ejemplo, tetraciclina o ampicilina.

5 Un vector de expresión puede ser cualquier vector que sea capaz de potenciar la expresión de un gen que se haya clonado en el mismo, después, por ejemplo, de transformación en un hospedante. El gen clonado normalmente se pone bajo el control (es decir, operativamente unido a) de determinadas secuencias de control tales como, por ejemplo, secuencias de promotor. Las secuencias de promotor pueden ser constitutivas o inducibles.

10 Una molécula de ácido nucleico puede incluir ADN y ARN. Puede ser útil cualquier forma, por ejemplo ácido nucleico bicatenario, monocatenario, y sus nucleósidos, como molécula de ácido nucleico. También están incluidos híbridos tales como, por ejemplo, híbridos de ADN-ARN, híbridos de ADN-ARN-proteína, híbridos de ARN-proteína e híbridos de ADN-proteína. Un polinucleótido puede consistir en varias bases, normalmente al menos 20 bases de nucleótidos.

15 El término "homología" indica la similitud de dos secuencias de polinucleótidos. Con el fin de determinar la homología, las secuencias de polinucleótidos se disponen de forma que se puedan comparar áreas similares. Si es necesario, en determinadas posiciones se pueden sustituir nucleótidos por una posición en blanco con el fin de mejorar la similitud. Las comparaciones de homología se pueden realizar, por ejemplo, manualmente o usando programas de ordenador, que están disponibles en el comercio. Preferiblemente, el programa se ejecuta en condiciones estándar con el fin de obtener la homología máxima. El grado de homología o similitud entre dos secuencias de nucleótidos se da en "% de homología".

20 Una mutación puede ser, por ejemplo, un cambio, inserción o eliminación de un solo par de bases en la secuencia de nucleótidos de interés o un suceso genético tal como una inserción de un elemento genético tal como, por ejemplo, un transposón.

25 La generación de una mutación en el ADN, es decir, mutagénesis, se puede llevar a cabo de diferentes formas, tales como, por ejemplo, aleatoriamente, es decir, mutagénesis aleatoria, en donde no es predecible el sitio exacto de mutación, produciéndose en cualquier parte en el o los cromosomas del microorganismo o en el o los plásmidos endógenos. La mutación también se puede generar, por ejemplo, como resultado de un daño físico causado por agentes tales como, por ejemplo, radiación, tratamiento químico o inserción de un elemento genético.

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

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

40 En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un microorganismo seleccionado de *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* o *Escherichia* capaz de expresar la L-sorbose deshidrogenasa como una forma activa in vivo y capaz de convertir directamente la L-sorbose en vitamina C, en donde dicho microorganismo se modifica genéticamente introduciendo más de 1 copia de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa capaz de convertir directamente la L-sorbose en ácido L-ascórbico, seleccionándose dicho polinucleótido del grupo que consiste en:

45 (a) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 18, 20, 22 o 27;

(b) polinucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 1, 11, 13, 15, 17, 19, 21 o 26;

(c) polinucleótidos cuya cadena complementaria hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido como se define en uno cualquiera de (a) a (b); y

50 (d) polinucleótidos que comparten al menos 80% de homología con una cadena de al menos 100 nucleótidos consecutivos del polinucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. El polinucleótido aislado se puede obtener de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa. La SEQ ID NO: 1 representa la secuencia completa de nucleótidos de la SNDH₁ que se aisló del microorganismo *Gluconobacter oxydans* N44-1. Se pueden usar partes de dicha secuencia para diferentes fines. Los polinucleótidos
55 cortos, por ejemplo, se pueden usar como cebadores para, por ejemplo, la amplificación de polinucleótidos adecuados aislados de otros organismos. Un nucleótido corto puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a

aproximadamente 100 pares de bases (pb), normalmente de aproximadamente 14 a aproximadamente 50, y preferiblemente de aproximadamente 17 a aproximadamente 30 pb. Los ejemplos de dichas secuencias cortas de polinucleótidos están representados por las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 23 o 24. Los polinucleótidos más largos pueden codificar polipéptidos que tienen actividad enzimática. Por ejemplo, la SNDHai tiene un dominio transmembrana que no se puede usar para la actividad enzimática. Si partes del polinucleótido que codifica la zona enzimáticamente activa de la proteína son expresadas sin el dominio transmembrana, dicho polipéptido puede tener suficiente actividad enzimática.

La molécula de polinucleótido aislada normalmente se obtiene de una secuencia de polinucleótido más larga que codifica un polipéptido que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa. Dichos polinucleótidos se pueden aislar, por ejemplo, de bacterias. Preferiblemente se aíslan de bacterias que pertenecen a los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter* incluyendo, pero no limitado a *G. oxydans*, *G. frateurii*, *G. cerinus* y *A. aceti*. Cuando dichos polinucleótidos se obtienen de secuencias de polinucleótidos más largas, se puede determinar la homología entre dicha secuencia de polinucleótido y la SEQ ID NO: 1. En dicho caso, se selecciona una zona que tiene al menos 100 nucleótidos consecutivos y el tramo correspondiente del otro polinucleótido se puede comparar con este. Cuando la secuencia de polinucleótido y el correspondiente tramo que se puede obtener de la SEQ ID NO: 1 tienen por ejemplo 60 nucleótidos que son idénticos comparando 100 nucleótidos consecutivos, entonces la homología es de 60%. Por lo tanto, en una realización, la invención se dirige a un polinucleótido aislado de acuerdo con la presente invención, en donde la secuencia de nucleótidos parcial se obtiene de una secuencia de polinucleótido que tiene una homología de al menos 80% con la SEQ ID NO: 1, en donde se comparan al menos 100 nucleótidos consecutivos. Preferiblemente, las secuencias parciales de polinucleótidos de la presente invención tienen una homología de al menos 90% con la SEQ ID NO: 1. Para la determinación de la homología, se pueden usar tramos de, por ejemplo, al menos 100, preferiblemente tramos de al menos 300 y más preferiblemente tramos de al menos 500 nucleótidos consecutivos.

La presente invención proporciona usos originales de secuencias de polinucleótidos que codifican la L-sorbose deshidrogenasa, para la producción de un microorganismo seleccionado de *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* o *Escherichia* incluyendo los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*, para producir ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose. Dicho polinucleótido preferiblemente codifica un polinucleótido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o un polipéptido obtenido o que se puede obtener de dicho polipéptido, por ejemplo, por sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que retiene la actividad de L-sorbose deshidrogenasa para producir ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose. Están incluidas además secuencias de polinucleótidos que codifican secuencias parciales de polipéptido de un polipéptido que retiene la actividad de la L-sorbose deshidrogenasa para producir ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose tal como, por ejemplo, polipéptidos representados por las SEQ ID NO: 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 27.

La célula hospedante pertenece a bacterias que pueden expresar la L-sorbose deshidrogenasa como una forma activa in vivo, tal como bacterias del género *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, tales como *P. putida* o *Escherichia*, tal como *E. coli*.

Por lo tanto, es un aspecto de la presente invención proporcionar una célula hospedante como se ha descrito antes, en donde dicho microorganismo se modifica genéticamente introduciendo más de 1 copia de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad L-sorbose deshidrogenasa capaz de convertir directamente L-sorbose en ácido L-ascórbico como se describe en la presente memoria. Dicha célula hospedante se llama entonces una célula hospedante recombinante u organismo recombinante.

Otro aspecto de esta invención es un procedimiento para producir ácido L-ascórbico que comprende convertir un sustrato en ácido L-ascórbico con ayuda del microorganismo recombinante producido por el procedimiento de la invención.

Como sustrato se puede usar una fuente de carbono que puede ser convertido en ácido L-ascórbico por la SNDHai codificada por un polinucleótido usado en la presente invención. Los sustratos preferidos se seleccionan de L-sorbose, D-sorbitol y L-sorbose.

En una realización, el procedimiento para producir ácido L-ascórbico comprende convertir L-sorbose en ácido L-ascórbico con la ayuda del microorganismo recombinante obtenido por el procedimiento descrito antes, comprendiendo dicho procedimiento para la producción de ácido L-ascórbico las etapas de:

(i) cultivar el microorganismo en condiciones adecuadas hasta una densidad celular de al menos aproximadamente 10 medido como la densidad óptica a 600 nm;

(ii) reducción de la velocidad de crecimiento a una cantidad menor de $0,02 \text{ h}^{-1}$; y

(iii) conversión de L-sorbose en ácido L-ascórbico.

Los métodos y técnicas diseñadas para la manipulación de las moléculas de ácido nucleico aisladas son bien conocidas en la técnica. Los métodos para el aislamiento, purificación y clonación de moléculas de ácido nucleico,

así como los métodos y técnicas que describen el uso de hospedantes eucariotas y procariotas y la expresión de ácidos nucleicos y proteínas en los mismos, son conocidos para el experto en la técnica.

Como se conoce en la técnica, los polipéptidos pueden contener sustituciones conservativas como sigue: como sustituciones de ejemplo son razonables Ala por Val/Leu/Ile, Arg por Lys/Gln/Asn, Asn por Gln/His/Lys/Arg, Asp por Glu, Cys por Ser, Gln por Asn, Glu por Asp, Gly por Pro/Ala, His por Asn/Gln/Lys/Arg, Ile por Leu/Val/Met/Ala/Phe/norLeu, Lys por Arg/Gln/Asn, Met por Leu/Phe/Ile, Phe por Leu/Val/Ile/Ala/Tyr, Pro por Ala, Ser por Thr, Thr por Ser, Trp por Tyr/Phe, Tyr por Trp/Phe/Thr/Ser, y Val por Ile/Leu/Met/Phe/Ala/norLeu. Como ejemplos preferidos, son razonables Ala por Val, Arg por Lys, Asn por Gln, Asp por Glu, Cys por Ser, Gln por Asn, Glu por Asp, Gly por Ala, His por Arg, Ile por Leu, Leu por Ile, Lys por Arg, Met por Leu, Phe por Leu, Pro por Ala, Ser por Thr, Thr por Ser, Trp por Tyr, Tyr por Phe, y Val por Leu.

Salvo que se indique otra cosa, todas las secuencias de nucleótidos determinadas por secuenciación de una molécula de ADN en la presente memoria se determinaron usando un secuenciador de ADN automático (tal como el analizador genético modelo Applied Biosystems PRISM 310). Por lo tanto, como se conoce en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada por este procedimiento automático, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en la presente memoria puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas de forma automática son típicamente al menos aproximadamente 90% homólogas, más típicamente al menos aproximadamente 95% a al menos aproximadamente 99,9% homólogas con la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real se puede determinar de forma más precisa por otros procedimientos que incluyen métodos de secuenciación de ADN manuales bien conocidos en la técnica. Como se conoce también en la técnica, una sola inserción o eliminación en una secuencia de nucleótidos determinada comparada con la secuencia real producirá un desplazamiento del marco en la traducción de la secuencia de nucleótidos de modo que la secuencia de aminoácidos prevista codificada por una secuencia de nucleótidos determinada será completamente diferente de la secuencia de aminoácidos codificada realmente por la molécula de ADN secuenciada, empezando en el punto de dicha inserción o eliminación.

Otra forma de describir la similitud de secuencias de polinucleótidos es determinar si dichas secuencias hibridan o no hibridan. Esto depende de las condiciones seleccionadas para la hibridación.

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

El gen que codifica la L-sorbozona deshidrogenasa, la molécula de ácido nucleico que contiene dicho gen, el vector de expresión y el organismo recombinante usado en la presente invención, se pueden obtener por las siguientes etapas:

(1) mutagénesis de transposón como se describe a continuación en cepas que pertenecen al género *Gluconobacter* o *Acetobacter* que produce ácido L-ascórbico a partir de L-sorbozona para obtener colonias que expresan resistencia a antibiótico codificada por el transposón usado;

(2) selección de mutantes que no producen ácido L-ascórbico en el cribado con L-sorbozona como sustrato;

(3) aislamiento de ADN cromosómico de los mutantes;

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

(5) determinación de la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN que contiene la inserción del transposón;

(6) clonación del fragmento de ADN de la cepa original que produce ácido L-ascórbico a partir de L-sorbozona;

(7) construcción del vector de expresión en el que el gen que codifica la L-sorbozona deshidrogenasa puede expresarse eficazmente;

(8) construcción de organismos recombinantes que llevan el gen que codifica la L-sorbozona deshidrogenasa mediante un método adecuado para introducir ADN en la célula hospedante, p. ej., transformación, transducción,

transferencia por conjugación y/o electroporación, cuya célula hospedante se convierte de esta manera en un organismo recombinante de esta invención.

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

Se conoce una variedad de transposones en la técnica, tales como Tn3, Tn5, Tn7, Tn9, Tn10, fago Mu y similares. Entre ellos, se sabe que Tn5 no tiene casi especificidad de inserción, y su tamaño es relativamente pequeño. Para el propósito de usarlo en mutagénesis aleatoria en la práctica de la presente invención, se prefiere Tn5. También son útiles una variedad de derivados de Tn5, designados Mini-Tn5s, que consisten en 19 pb de las repeticiones invertidas de Tn5 necesarias para la transposición, acopladas a genes de resistencia a antibióticos u otros genes de marcadores seleccionables, para la presente invención. Dichas Mini-Tn5s se insertan en un vector suicida, además de la Tn5 transposasa (tnp), para construir un sistema de mutagénesis de Tn5 suicida eficaz.

La mutagénesis aleatoria con transposón implica la introducción de un transposón en una célula bacteriana diana, por ejemplo, por transformación, transducción, apareamiento por conjugación o electroporación usando plásmido suicida o vectores fago. Los mutantes resultantes se pueden cribar con ayuda del marcador que lleva el transposón. La transposición del transposón en el genoma de la bacteria receptora se puede detectar después de perder el vector usado por segregación.

Para la introducción de transposones en microorganismos del género *Gluconobacter* o *Acetobacter*, se usan habitualmente los llamados vectores suicidas incluyendo por ejemplo un derivado de fago P1 y plásmidos de rango estrecho de hospedantes tales como un derivado de pBR325 que lleva el origen de replicación de ColE1. Los vectores de fago P1 y los vectores plasmídicos se pueden transferir por infección y por transformación, apareamiento por conjugación o electroporación, respectivamente, a las células receptoras, en donde estos vectores preferiblemente carecen de los orígenes adecuados de los receptores. La elección del vector suicida y transposón que se va a usar depende de criterios que incluyen, por ejemplo, la sensibilidad del fago, resistencia a antibióticos intrínseca de la célula receptora, la disponibilidad de un sistema de transferencia de genes incluyendo transformación, transferencia por conjugación, electroporación o infección para introducir el vector que lleva el transposón en *E. coli*.

Uno de los vectores preferibles para usar en la presente invención es, por ejemplo, el fago P1 (ATCC25404) que inyecta su ADN en un microorganismo que pertenece al género *Gluconobacter* o *Acetobacter*, sin embargo, este ADN no será capaz de replicación y se perderá por segregación. Dicho fago P1 que lleva Tn5 (P1::Tn5) se puede usar en forma de lisatos de fago que se pueden preparar mediante lisis de *E. coli* que lleva P1::Tn5 de acuerdo con procedimientos conocidos (véase: p. ej. "Methods for General and Molecular Bacteriology" Capítulo 17, Transposon Mutagenesis; American Society for Microbiology o patente de EE.UU. 5082785, 1992).

Para confirmar que el mutante deficiente realmente lleva el transposón, se pueden llevar a cabo métodos tales como, por ejemplo, hibridación de colonias o Southern con fragmentos de ADN marcados que contienen el transposón usado como la sonda por métodos convencionales (Molecular cloning, a laboratory manual 2ª edición, Maniatis T., et al., 1989).

Dicho mutante se aisló como se describe en el ejemplo 5 de la presente invención. El mutante transposón puede ser útil para la identificación posterior del gen diana que codifica la L-sorbozona deshidrogenasa y determinación de la secuencia de nucleótidos de la región marcada con el transposón.

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

Alternativamente, cuando dicho polipéptido de L-sorbozona deshidrogenasa se purifica de la cepa que produce ácido L-ascórbico a partir de L-sorbozona, el gen deseado se puede clonar en vectores plasmídicos o de fago a partir del ADN cromosómico total por los siguientes métodos ilustrativos:

(i) Las secuencias de aminoácidos parciales se pueden determinar a partir de proteínas purificadas o fragmentos peptídicos de las mismas tales como, por ejemplo, desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Dicha proteína entera o fragmentos peptídicos se pueden preparar aislando dicha proteína entera o por tratamiento con peptidasa del gel después de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). La proteína o fragmentos de la misma así obtenidos se pueden aplicar también a un secuenciador de proteínas tal como un secuenciador automático de fase gaseosa Applied Biosystems 470A. Las secuencias de aminoácidos se pueden usar para diseñar y preparar sondas de oligonucleótidos y/o cebadores con un sintetizador de ADN tal como, por ejemplo, el secuenciador automático de ADN Applied Biosystems 381A. Las sondas se pueden usar para aislar clones que llevan el gen diana, de una genoteca de la cepa que lleva el gen diana mediante, por ejemplo, hibridación Southern, de colonias o en placa.

(ii) Además, alternativamente, con el fin de seleccionar clones que expresan la proteína diana de la genoteca, se pueden aplicar métodos inmunológicos con, por ejemplo, un anticuerpo preparado contra la proteína diana.

(iii) El fragmento de ADN del gen diana se puede amplificar a partir del ADN cromosómico total, por ejemplo, por PCR con un conjunto de cebadores, es decir, dos oligonucleótidos sintetizados de acuerdo con las secuencias de aminoácidos determinadas como antes. Después, se puede aislar un clon que lleva el gen entero de la genoteca construida, p. ej., en *E. coli*, por ejemplo, por hibridación Southern, de colonias o en placa, con el producto de la PCR obtenido antes como la sonda.

El anticuerpo mencionado antes se puede preparar, por ejemplo, con las proteínas L-sorbose deshidrogenasa purificadas, las proteínas L-sorbose deshidrogenasa recombinantes purificadas tales como por ejemplo L-sorbose deshidrogenasa marcada con His expresada en *E. coli*, o su fragmento peptídico como un antígeno. Se puede usar una secuencia de polipéptido deducida de una secuencia de nucleótidos de la L-sorbose deshidrogenasa como un antígeno para preparar un anticuerpo.

Una vez que se obtiene un clon que lleva el gen deseado, la secuencia de nucleótidos del gen diana se puede determinar por un método bien conocido.

Para expresar la secuencia de nucleótidos/gen deseada de forma eficaz, se pueden usar diferentes promotores; p. ej., el promotor original del gen, promotores de genes de resistencia a antibióticos tal como por ejemplo el gen de resistencia a la kanamicina de Tn5, gen de resistencia a la ampicilina de pBR322, y beta-galactosidasa de *E. coli* (*lac*), promotor *trp*-, *tac*-, *trc*-, promotores del fago lambda y cualesquiera promotores que puedan ser funcionales en la célula hospedante. Para este fin, la célula hospedante pertenece a bacterias que pueden expresar la L-sorbose deshidrogenasa como una forma activa in vivo, seleccionada de bacterias del género *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* y *Escherichia*.

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

Se puede usar una gran variedad de combinaciones de hospedante/vector de clonación en la clonación del ADN bicatenario. Los vectores preferidos para la expresión del gen de la presente invención, es decir, el gen SNDHai, en *E. coli* se pueden seleccionar de cualesquiera vectores usados habitualmente en *E. coli*, tales como por ejemplo vectores pQE que pueden expresar proteínas recombinantes marcadas con His (QIAGEN AG Suiza), pBR322 o sus derivados, incluyendo, por ejemplo, pUC18 y pBluescript II (Stratagene Cloning Systems, Calif., EE.UU.), pACYC177 y pACYC184 y sus derivados, y un vector derivado de un plásmido de amplio rango de hospedantes tal como RK2 y RSF1010. Un vector preferido para la expresión de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en bacterias que incluyen *Gluconobacter*, *Acetobacter* y *Pseudomonas*, se selecciona de cualesquiera vectores que se puedan replicar en *Gluconobacter*, *Acetobacter* o *Pseudomonas*, así como en un organismo de clonación preferido tal como *E. coli*. El vector preferido es un vector de rango amplio de hospedantes tal como, por ejemplo, un vector cósmido como pVK100 y sus derivados y RSF1010. El número de copias y la estabilidad del vector deberían considerarse con cuidado para la expresión estable y eficaz del gen clonado y también para el cultivo eficaz de la célula hospedante que lleva el gen clonado. Las moléculas de ácido nucleico que contienen por ejemplo los elementos transponibles tales como Tn5 también se pueden usar como un vector para introducir el gen deseado en el hospedante preferido, en especial en un cromosoma. Las moléculas de ácido nucleico que contienen cualquier ADN aislado del hospedante preferido con el gen SNDHai de la presente invención, también pueden ser útiles para introducir este gen en la célula hospedante preferida, en especial en un cromosoma.

Dichas moléculas de ácido nucleico se pueden transferir al hospedante preferido aplicando cualquiera de los métodos convencionales, p. ej., transformación, transducción, apareamiento por conjugación o electroporación, que son bien conocidos en la técnica, considerando la naturaleza de la célula hospedante y la molécula de ácido nucleico.

Las secuencias de nucleótidos/gen de la L-sorbose deshidrogenasa usadas en un microorganismo de acuerdo con esta invención, se pueden ligar en un vector adecuado que contiene una región reguladora tal como, por ejemplo, un promotor, un sitio de unión al ribosoma, y un terminador de transcripción operable en la célula hospedante descrita antes, con un método bien conocido en la técnica para producir un vector de expresión.

Para construir un microorganismo recombinante que lleva un vector de expresión, se pueden usar diferentes métodos de transferencia de genes que incluyen, por ejemplo, transformación, transducción, apareamiento por conjugación y electroporación. El método para construir una célula recombinante se puede seleccionar de los métodos bien conocidos en el campo de la biología molecular. Por ejemplo, se pueden usar sistemas de transformación convencionales para *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* o *Escherichia*. También se puede usar un sistema de transducción para *E. coli*. El sistema de apareamiento por conjugación se puede usar ampliamente en bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo, por ejemplo, *E. coli*, *P. putida* y

Gluconobacter. Se describe un ejemplo de apareamiento por conjugación en el documento WO 89/06.688. La conjugación se puede producir, por ejemplo, en medio líquido o en una superficie sólida. Los ejemplos para un receptor para la producción de SNDH_{ai} incluyen microorganismos de *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* o *Escherichia*. Para el apareamiento por conjugación se puede añadir al receptor un marcador seleccionable; p. ej., habitualmente se selecciona resistencia contra el ácido nalidíxico o rafampicina. También se puede usar la resistencia natural, p. ej., resistencia contra la polimixina B es útil para muchas *Gluconobacters*.

Para aumentar el rendimiento de producción de la enzima L-sorbose deshidrogenasa en las células hospedantes descritas antes, dichos microorganismos se modifican genéticamente introduciendo más de 1 copia de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa como se describe en la presente memoria, en donde las proteínas L-sorbose deshidrogenasa se producen en una célula hospedante seleccionada de un grupo que consiste en *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* o *Escherichia*, usando el gen de la L-sorbose deshidrogenasa y como se describe en la presente invención.

El microorganismo que es capaz de expresar SNDH_{ai} codificada por una secuencia de polinucleótido descrita en la presente memoria, se puede cultivar en un medio acuoso complementado con nutrientes adecuados en condiciones aerobias. El cultivo se puede llevar a cabo en un modo discontinuo, discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo. El periodo de cultivo puede variar dependiendo por ejemplo del hospedante usado para la expresión del polipéptido diana, pH, temperatura y medio nutriente que se va a usar, y preferiblemente es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 días cuando se realiza en modo discontinuo o discontinuo alimentado. El cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, preferiblemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0. El intervalo de temperatura preferido para llevar a cabo el cultivo es de aproximadamente 13°C a aproximadamente 36°C, preferiblemente de aproximadamente 18°C a aproximadamente 33°C. Normalmente, el medio de cultivo puede contener nutrientes tales como fuentes de carbono asimilables, p. ej., glicerol, D-manitol, D-sorbitol, L-sorbose, eritritol, ribitol, xilitol, arabitol, inositol, dulcitol, D-ribosa, D-fructosa, D-glucosa y sacarosa, preferiblemente D-sorbitol, D-manitol, y glicerol; y fuentes de nitrógeno digeribles tales como sustancias orgánicas, p. ej., peptona, extracto de levadura, levadura de panadería, urea, aminoácidos y licor de maceración del maíz. También se pueden usar diferentes sustancias inorgánicas tales como fuentes de nitrógeno, p. ej., nitratos y sales de amonio. Además, el medio de cultivo normalmente puede contener sales inorgánicas, p. ej., sulfato magnésico, sulfato de manganeso, fosfato potásico y carbonato de calcio.

Se entiende que el procedimiento para la producción de vitamina C a partir del sustrato usando un hospedante que comprende SNDH_{ai} codificada por un polinucleótido como se describe en la presente memoria, se lleva a cabo con células en crecimiento, es decir, velocidades de crecimiento específicas de las células que son, por ejemplo al menos 0,02 h⁻¹.

Una realización de la presente invención es el uso de un microorganismo genéticamente modificado como se describe en la presente memoria para producir vitamina C.

La presente invención proporciona la producción de ácido L-ascórbico como se describe en la presente memoria. La fuente para la SNDH_{ai} no es crítica. Este procedimiento se puede llevar a cabo usando por ejemplo microorganismos que pueden expresar de forma natural la enzima SNDH_{ai} activa, SNDH_{ai} codificada por una secuencia de nucleótidos de la presente invención que se aísla de dichos microorganismos, organismos recombinantes como se ha descrito antes que llevan el gen de SNDH_{ai} de la presente invención, para convertir la L-sorbose en ácido L-ascórbico como se describe más adelante.

Los organismos recombinantes usados para la producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose se pueden cultivar como se ha descrito antes, en donde el organismo recombinante se selecciona del grupo que consiste en *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* y *Escherichia*, que lleva el gen de la L-sorbose deshidrogenasa como se describe en la presente memoria. El microorganismo recombinante se puede cultivar en las mismas condiciones descritas antes. Si el organismo recombinante que se usa para la producción de ácido L-ascórbico no puede convertir ninguna de las fuentes de carbono descritas antes en L-sorbose, entonces la L-sorbose debe añadirse al medio para ser usada como el precursor para la producción de ácido L-ascórbico. El periodo de reacción puede variar dependiendo del pH, temperatura y mezcla de reacción que se va a usar, y preferiblemente es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 días, cuando se realiza en modo discontinuo o discontinuo alimentado.

Los microorganismos que se pueden usar, p. ej., como fuente para la SNDH_{ai} pueden estar disponibles al público en diferentes fuentes, p. ej., Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Alemania, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 EE.UU. el 12 de mayo, 2003 o Culture Collection Division, NITE Biological Resource Center, 2-5-8, Kazusakamata, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón (antes: Institute for Fermentation, Osaka (IFO), 17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón). Los ejemplos de bacterias preferidas depositadas en IFO son, por ejemplo, *Gluconobacter oxydans* (anteriormente conocida como *G. melanogenus*) IFO 3293, *Gluconobacter oxydans* (anteriormente conocida como *G. melanogenus*) IFO 3292, *Gluconobacter oxydans* (anteriormente conocida como *G. rubiginosus*) IFO 3244, *Gluconobacter frateurii* (anteriormente conocida como *G. industrius*) IFO 3260, *Gluconobacter cerinus* IFO 3266, *Gluconobacter oxydans* IFO 3287, y *Acetobacter aceti subsp. orleanus* IFO 3259, las cuales se depositaron todas el 5 de abril, 1954; *Acetobacter aceti subsp. xylinum* IFO 13693

depositada el 22 de octubre, 1975, y *Acetobacter acetii* subsp. *xylinum* IFO 13773 depositada el 8 de diciembre, 1977. La cepa de *Acetobacter* sp. ATCC 15164, que también es un ejemplo de una bacteria preferida, se depositó en ATCC. La cepa *Gluconobacter oxydans* (anteriormente conocida como *G. melanogenus*) N44-1 como otro ejemplo de una bacteria conocida es un derivado de la cepa IFO 3293 y se describe en Sugisawa et al., *Agric. Biol. Chem.* 54: 1201-1209, 1990.

Se entiende que los microorganismos mencionados antes también incluyen sinónimos, basónimos de dichas especies que tienen las mismas propiedades fisiológicas, como se define en el Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de ácido L-ascórbico (vitamina C) con alto rendimiento, usando células en reposo de un microorganismo capaz de convertir fuentes de carbono dadas en vitamina C, seleccionado de *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* o *Escherichia* capaz de expresar la L-sorbose deshidrogenasa como una forma activa in vivo como se describe en la presente memoria.

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

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

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

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

La conversión del sustrato en vitamina C en relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, significa que la conversión del sustrato que da como resultado vitamina C es realizada por el microorganismo, es decir, el sustrato se puede convertir directamente en vitamina C. Dicho microorganismo se cultiva en condiciones que permiten dicha conversión a partir del sustrato definido antes.

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

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, se prefiere usar *Gluconobacter* o *Acetobacter acetii*, tales como, por ejemplo *G. oxydans*, *G. cerinus*, *G. frateurii*, *A. acetii* subsp. *xylinum* o *A. acetii* subsp. *orleanus*.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, los microorganismos que se pueden usar para la presente invención se seleccionan de *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* o *Escherichia*, y pueden estar disponibles al público en diferentes fuentes, p. ej., Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Alemania, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 EE.UU. el 12 de mayo, 2003 o Culture Collection Division, NITE Biological Resource Center, 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón (antes: Institute for Fermentation, Osaka (IFO), 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón). Los ejemplos de bacterias preferidas depositadas en IFO son, por ejemplo, *Gluconobacter oxydans* (anteriormente conocidas como *G. melanogenus*) IFO 3293, *Gluconobacter oxydans* (anteriormente conocidas como *G. melanogenus*) IFO 3292, *Gluconobacter oxydans* (anteriormente conocidas como *G. rubiginosus*) IFO 3244, *Gluconobacter frateurii* (anteriormente conocidas como *G. industrius*) IFO 3260, *Gluconobacter cerinus* IFO 3266, *Gluconobacter oxydans* IFO 3287, y *Acetobacter acetii* subsp. *orleanus* IFO 3259, que se depositaron todas el 5 de

abril, 1954; *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO 13693 depositada el 22 de octubre, 1975, y *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO 13773 depositada el 8 de diciembre, 1977. La cepa de *Acetobacter* sp. ATCC 15164, que también es un ejemplo de una bacteria preferida, se depositó en la ATCC. La cepa *Gluconobacter oxydans* (anteriormente conocidas como *G. melanogenus*) N44-1 como otro ejemplo de una bacteria preferida es un derivado de la cepa IFO 3293 y se describe en Sugisawa et al., *Agric. Biol. Chem.* 54: 1201-1209, 1990.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, se entiende que los microorganismos mencionados antes también incluyen sinónimos o basónimos de dichas especies que tienen las mismas propiedades fisiológicas, como define el Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas. La nomenclatura de los microorganismos usada en la presente memoria es la oficialmente aceptada (en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad) por el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas y la Sección de Bacteriología y Microbiología aplicada de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas, y publicada por su vehículo oficial el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM). Se hace referencia en particular a Urbance et al., *IJSEM* (2001) vol 51:1059-1070, con una notificación correctiva en *IJSEM* (2001) vol 51:1231-1233, que describe la reclasificación taxonómica de *G. oxydans* DSM 4025 como *Ketogulonicigenium vulgare*.

Como se usa en la presente memoria, células en reposo se refiere a células de un microorganismo que por ejemplo son viables pero no crecen activamente, o que crecen a velocidades de crecimiento específicas [μ] bajas, por ejemplo, velocidades de crecimiento inferiores a $0,02 \text{ h}^{-1}$, preferiblemente inferiores a $0,01 \text{ h}^{-1}$. Las células que presentan las velocidades de crecimiento anteriores se dice que están en un "modo de célula en reposo".

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

La fase de crecimiento y producción como se llevan a cabo en el procedimiento anterior usando células en reposo de un microorganismo se pueden llevar a cabo en el mismo recipiente, es decir, solo un recipiente, o en dos o más recipientes diferentes, con una etapa de separación celular opcional entre las dos fases. La vitamina C producida se puede recuperar de las células por cualquier medio adecuado. Medios de recuperación por ejemplo, en los que la vitamina C producida se puede separar del medio de producción. Opcionalmente, la vitamina C así producida se puede procesar posteriormente.

Para los fines de la presente invención en relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, las expresiones "fase de crecimiento", "etapa en crecimiento", "etapa de crecimiento" y "periodo de crecimiento" se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Lo mismo se aplica para las expresiones "fase de producción", "etapa de producción", "periodo de producción".

Una forma de llevar a cabo el procedimiento anterior usando células en reposo de un microorganismo de la presente invención, puede ser un procedimiento en donde el microorganismo se desarrolla en un primer recipiente, llamado recipiente de crecimiento, como fuente para las células en reposo, y al menos parte de las células se transfieren a un segundo recipiente, llamado recipiente de producción. Las condiciones en el recipiente de producción pueden ser tales que las células transferidas desde el recipiente de crecimiento se vuelven células en reposo como se ha definido antes. La vitamina C es producida en el segundo recipiente y recuperada de este.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, en un aspecto, la etapa de crecimiento se puede llevar a cabo en un medio acuoso en condiciones aerobias. El cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, en modo discontinuo, discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo. El periodo de cultivo puede variar dependiendo de la clase de células, pH, temperatura y medio nutriente que se va a usar, y puede ser por ejemplo de aproximadamente 10 h a aproximadamente 10 días, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 días, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 días, cuando se realiza en un modo discontinuo o discontinuo alimentado, dependiendo del microorganismo. Si las células se hacen crecer en modo continuo, el tiempo de permanencia puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 h, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 h, dependiendo del microorganismo. Si el microorganismo se selecciona de bacterias, el cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0, preferiblemente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, más preferiblemente aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, incluso más preferiblemente aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0. Si se usan algas o levaduras, el cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, a un pH menor de aproximadamente 7,0, preferiblemente menor de aproximadamente 6,0, más preferiblemente menor de aproximadamente 5,5, y lo más preferiblemente menor de aproximadamente 5,0. Un intervalo de temperatura adecuado para llevar a cabo el cultivo usando bacterias puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 13°C a aproximadamente 40°C , preferiblemente de aproximadamente 18°C a aproximadamente 37°C , más preferiblemente de aproximadamente 13°C a aproximadamente 36°C , y lo más preferiblemente de aproximadamente 18°C a aproximadamente 33°C . Si se usan algas o levaduras, un intervalo de temperatura

5 adecuado para llevar a cabo el cultivo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, más preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, incluso más preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 38°C, y lo más preferiblemente de aproximadamente 30°C a aproximadamente 38°C. El medio de cultivo para el crecimiento habitualmente puede contener nutrientes tales como fuentes de carbono asimilables, p. ej., glicerol, D-manitol, D-sorbitol, L-sorbosa, eritritol, ribitol, xilitol, arabitol, inositol, dulcitol, D-ribosa, D-fructosa, D-glucosa, y sacarosa, preferiblemente L-sorbosa, D-glucosa, D-sorbitol, D-manitol y glicerol; y fuentes de nitrógeno digeribles tales como sustancias orgánicas, p. ej., peptona, extracto de levadura y aminoácidos. El medio puede ser con o sin urea y/o licor de maceración del maíz y/o levadura de panadería. También se pueden usar diferentes sustancias inorgánicas como fuentes de nitrógeno, p. ej., nitratos y sales de amonio. Además, el medio de crecimiento habitualmente puede contener sales inorgánicas, p. ej., sulfato magnésico, sulfato de manganeso, fosfato potásico y carbonato de calcio.

10 En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, en la fase de crecimiento las velocidades de crecimiento específicas son, por ejemplo, al menos 0,02 h⁻¹. Para células en crecimiento en modo discontinuo, discontinuo alimentado o semicontinuo, la velocidad de crecimiento depende, por ejemplo, de la composición del medio de crecimiento, pH, temperatura, y similares. En general, las velocidades de crecimiento pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 h⁻¹, preferiblemente de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,15 h⁻¹, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,07 a aproximadamente 0,13 h⁻¹.

15 En otro aspecto del procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, las células en reposo se pueden proporcionar por cultivo del respectivo microorganismo en placas de agar que sirven así como recipiente de crecimiento, usando esencialmente las mismas condiciones, p. ej., periodo de cultivo, pH, temperatura, medio nutriente, descritos antes, con la adición de agar.

20 En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, si la fase de crecimiento y producción se llevan a cabo en dos recipientes separados, entonces las células de la fase de crecimiento se pueden recoger o concentrar y transferir a un segundo recipiente, el llamado recipiente de producción. Este recipiente puede contener un medio acuoso complementado con cualquier sustrato de producción aplicable que se pueda ser convertido en ácido L-ascórbico por las células. Las células del recipiente de crecimiento se pueden recoger o concentrar por cualquier operación adecuada, tal como por ejemplo centrifugación, ultrafiltración o microfiltración de flujo cruzado con membrana, filtración, decantación, floculación. Las células así obtenidas también se pueden transferir al recipiente de producción en forma del caldo original desde el recipiente de crecimiento, sin ser recogidas, concentradas o lavadas, es decir, en forma de una suspensión celular. En una realización preferida, las células se transfieren del recipiente de crecimiento al recipiente de producción en forma de una suspensión celular sin ninguna etapa de lavado o aislamiento entremedias.

25 Por lo tanto, en una realización preferida del procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, la etapa (a) y (c) del procedimiento de la presente invención como se ha descrito antes, no están separadas por ninguna etapa de lavado y/o separación.

30 En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, si la fase de crecimiento y producción se llevan a cabo en el mismo recipiente, las células se pueden desarrollar en condiciones adecuadas hasta la densidad celular deseada, seguido de una sustitución del medio de crecimiento por el medio de producción que contiene el sustrato de producción. Dicha sustitución puede ser, por ejemplo, la alimentación de medio de producción al recipiente al mismo tiempo y velocidad que la retirada o recogida de líquido sobrenadante del recipiente. Para mantener las células en reposo en el recipiente, se pueden usar operaciones para el reciclado o retención de células, tales como por ejemplo etapas de reciclado de células. Dichas etapas de reciclado, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a métodos que usan centrifugas, filtros, etapas de microfiltración o ultrafiltración de flujo cruzado con membrana, reactores de membrana, floculación o inmovilización celular en matrices porosas, no porosas o poliméricas adecuadas. Después de una fase de transición, el recipiente se lleva a condiciones del procedimiento en las que las células están en un modo de reposo como se ha definido antes, y el sustrato de producción es convertido eficazmente en vitamina C.

35 El medio acuoso en el recipiente de producción usado para la etapa de producción en relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, en lo sucesivo llamado medio de producción, puede contener solo el o los sustratos de producción para ser convertidos en ácido L-ascórbico, o puede contener por ejemplo, sales inorgánicas adicionales, p. ej., cloruro sódico, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, fosfato potásico, fosfato de calcio y carbonato de calcio. El medio de producción también puede contener fuentes de nitrógeno digeribles tales como por ejemplo sustancias orgánicas, p. ej., peptona, extracto de levadura, urea, aminoácidos, licor de maceración del maíz, y sustancias inorgánicas, p. ej., amoníaco, sulfato amónico y nitrato sódico, en concentraciones tales que las células se mantienen en un modo de células en reposo como se ha definido antes. El medio puede ser con o sin urea y/o licor de maceración del maíz y/o levadura de panadería. La etapa de producción se puede llevar a cabo, por ejemplo, en modo discontinuo, discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo. En caso de modo discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo, tanto las células del recipiente de crecimiento como del medio de producción se pueden alimentar de forma continua o intermitente al recipiente de producción a velocidades de alimentación adecuadas. Alternativamente, solo se puede

5 alimentar medio de producción de forma continua o intermitente al recipiente de producción, mientras que las células que vienen del recipiente de crecimiento se transfieren de una vez al recipiente de producción. Las células que vienen del recipiente de crecimiento se pueden usar como una suspensión celular dentro del recipiente de producción o se pueden usar, por ejemplo, para células floculadas o inmovilizadas en cualquier fase sólida tal como matrices porosas o poliméricas. El periodo de producción definido como el periodo que transcurre entre la entrada del sustrato en el recipiente de producción y la recogida del líquido sobrenadante que contiene vitamina C, también llamada corriente de recolección, pueden variar dependiendo por ejemplo del tipo y concentración de las células, pH, temperatura y medio nutriente que se va a usar, y es preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 h. El pH y la temperatura pueden ser diferentes del pH y la temperatura de la etapa de crecimiento, pero esencialmente son los mismos que para la etapa de crecimiento.

10 En una realización preferida del procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, la etapa de producción se lleva a cabo en modo continuo, que significa que se alimenta una primera corriente de alimentación que contiene las células del recipiente de crecimiento y una segunda corriente de alimentación que contiene el sustrato, de forma continua o intermitente al recipiente de producción. La primera corriente puede contener solo las células aisladas/separadas del medio de crecimiento o una suspensión celular, que viene directamente de la etapa de crecimiento, es decir, las células suspendidas en medio de crecimiento, sin ninguna etapa intermedia de separación, lavado y/o aislamiento de células. La segunda corriente de alimentación como se define en la presente memoria puede incluir todas las demás corrientes de alimentación necesarias para la operación de la etapa de producción, p. ej., el medio de producción que comprende el sustrato en forma de una o varias corrientes diferentes agua para dilución y base para control de pH.

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

20 Otra forma de llevar a cabo el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo de la presente invención, puede ser un procedimiento que usa una determinada densidad celular de células en reposo en el recipiente de producción. La densidad celular se mide como unidades de absorbancia (densidad óptica) a 600 nm por métodos conocidos para el experto. En una realización preferida, la densidad celular en la etapa de producción es al menos aproximadamente 10, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 200, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 120, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 120.

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

30 En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, la vitamina C producida contenida en la llamada corriente de recolección es recupera/recoge del recipiente de producción. La corriente recogida puede incluir, por ejemplo, solución acuosa exenta de células o que contiene células que viene del recipiente de producción, que contiene vitamina C como resultado de la conversión del sustrato de producción por las células en reposo en el recipiente de producción. Las células todavía presentes en la corriente de recolección se pueden separar de la vitamina C por cualquier operación conocida en la técnica, tal como, por ejemplo, filtración, centrifugación, decantación, ultrafiltración o microfiltración de flujo cruzado con membrana, ultrafiltración o microfiltración de flujo tangencial o filtración frontal. Después de esta operación de separación de células, la corriente de recolección está esencialmente exenta de células.

35 En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, el procedimiento de la presente invención conduce a rendimientos de vitamina C que son de al menos aproximadamente 1,8 g/l, preferiblemente al menos aproximadamente 2,5 g/l, más preferiblemente al menos aproximadamente 4,0 g/l, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 5,7 g/l. En una realización, el rendimiento de vitamina C producido por el procedimiento de la presente invención está en el intervalo de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 600 g/l. El rendimiento de vitamina C se refiere a la concentración de vitamina C en la corriente de recolección que viene directamente del recipiente de producción, es decir, el líquido sobrenadante exento de células que comprende vitamina C.

En relación con el procedimiento anterior que usa células en reposo de un microorganismo, en una realización de la presente invención, la vitamina C se produce por el procedimiento como se ha descrito antes que usa células en reposo de microorganismos recombinantes, tales como por ejemplo bacterias recombinantes que se seleccionan de bacterias que pueden expresar la L-sorbose deshidrogenasa como una forma activa in vivo, es decir, bacterias del género *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* y *Escherichia*, más preferidas de *Gluconobacter*, *Acetobacter* o *E. coli*. Incluso son más preferidas por ejemplo *G. oxydans* y *E. coli* y las más preferidas se seleccionan del grupo que consiste en *G. oxydans* N44-1, *G. oxydans* IFO 3293 y *G. oxydans* IFO 3244. Un microorganismo recombinante puede ser cualquier microorganismo que se modifique genéticamente por técnicas conocidas para contener uno o más genes deseados en su cromosoma o un plásmido introducido en dicho microorganismo, que lleve, p. ej., a un exceso de expresión de dicho o dichos genes. El gen o genes deseados que se introducen en dicho microorganismo pueden codificar, por ejemplo, una enzima implicada en la conversión de un sustrato en vitamina C. En una realización preferida, el gen deseado codifica una L-sorbose deshidrogenasa, que cataliza la conversión de L-sorbose en vitamina C. Una L-sorbose deshidrogenasa preferida usada en la presente invención es, por ejemplo, la L-sorbose deshidrogenasa (SNDHAI) de *G. oxydans* N44-1 (Sugisawa et al., *Agric. Biol. Chem.* 54: 1201-1209, 1990) representada por la SEQ ID NO: 2, la secuencia de nucleótidos que codifica dicha SNDHAI está representada por la SEQ ID NO: 1. Se entiende que las secuencias de nucleótidos que tienen una homología de al menos 80%, preferiblemente de al menos 90%, comparadas con la SEQ ID NO: 1 y que codifican enzimas que pueden catalizar la conversión de la L-sorbose en vitamina C también son parte de la presente invención.

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

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

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

En una realización preferida, la vitamina C se purifica de la corriente de recolección por una serie de etapas de procesamiento corriente abajo, como se ha descrito antes, sin tener que ser transferida a una solución acuosa en cualquier momento de este procesamiento, es decir, todas las etapas se llevan a cabo en un entorno acuoso. Dicho procedimiento de procesamiento corriente abajo preferido puede incluir, por ejemplo, la concentración de la corriente de recolección que viene del recipiente de producción mediante electrodiálisis de dos o tres compartimentos, conversión de vitamina C en su forma de sal presente en la solución concentrada en su forma ácida mediante electrodiálisis con membranas bipolares y/o intercambio iónico, purificación por métodos tales como por ejemplo el tratamiento con carbón activado, resinas de intercambio iónico o no iónicas, seguido de una etapa de concentración adicional y cristalización. Estos cristales se pueden separar, lavar y secar. Si es necesario, los cristales se pueden

volver a solubilizar en agua, tratar con carbón activado y/o resinas de intercambio iónico y recristalizar. Después estos cristales se pueden separar, lavar y secar.

Los siguientes ejemplos ilustran más la presente invención y no se pretende que limiten la invención de ninguna forma.

5 Ejemplo 1: Producción de ácido L-ascórbico con SNDHai purificada

1. Purificación de SNDHai:

Se suspendieron células de un microorganismo capaz de producir SNDHai cultivadas por fermentación discontinua alimentada (para el cultivo véase el ejemplo 3) en 25 ml de tampón de fosfato (20 mM, pH 7,0) que contenía MgCl₂, 2 mM, ditioneitol (DTT), 1 mM, y 2-3 comprimidos de inhibidor de proteasa exento de EDTA (Roche Diagnostics GmbH). La suspensión celular se trató tres veces con una prensa de French. Posteriormente, se añadieron 25 ml de tampón de fosfato (20 mM, pH 7,0) que contenía MgCl₂ 2 mM y NaCl 1 M y la suspensión se ultracentrifugó (30.000 rpm, 60 min, 4°C). El sedimento que contenía la fracción de membrana se lavó con tampón de fosfato (20 mM, pH 7,0) que contenía MgCl₂ 2 mM y NaCl 500 mM y después se suspendió en una cantidad adecuada de tampón de fosfato (20 mM, pH 7,0) que contenía MgCl₂ 2 mM. Después se añadió N-octilglucósido (Fluka) a una concentración final de 2% (p/v) y la suspensión se incubó durante 90 min con agitación suave sobre hielo. Después de centrifugación (20.000 rpm, 60 min, 4°C) se recogió el líquido sobrenadante rojizo transparente y se añadió polietilenglicol 6000 (Fluka) a una concentración final de 15% (p/v). Después de incubación durante 60 min a 4°C con agitación suave seguido de centrifugación (10.000 rpm, 30 min, 4°C), el sedimento se disolvió en tampón de Tris-HCl (20 mM, pH 7,6) que contenía MgCl₂ 2 mM y lauril-sulfobetaina al 0,5% (p/v) (Fluka). Después de agitación suave a 4°C durante la noche la solución se centrifugó (20.000 rpm, 30 min, 4°C). El líquido sobrenadante se recogió y se purificó más como sigue.

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

El líquido sobrenadante transparente IV se desalinizó en porciones de 2,5 ml en una columna de filtración en gel Sephadex G 25 (volumen hueco: 2,5 ml) usando tampón de Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) que contenía MgCl₂ 2 mM y lauril-sulfobetaina al 0,5 % (p/v).

Las fracciones positivas para SNDHai se mezclaron y se puso una parte alícuota (aproximadamente 10 ml) en una columna de intercambio aniónico fuerte (p. ej., Mono-Q HR, Amersham Biosciences, volumen de columna: 8 ml) que se había equilibrado antes de usar con tampón A1 (Tris 10 mM, BisTris 10 mM, MES 10 mM, MgCl₂ 2 mM, lauril-sulfobetaina al 0,5%, pH 7,6). Las proteínas que no se unían se eluyeron con 100% de tampón A1 y después de 4 volúmenes de columna se aplicó un gradiente de pH lineal en 6 volúmenes de columna hasta 100% de tampón B1 (Tris, 10 mM; BisTris, 10 mM; MES, 10 mM; MgCl₂, 2 mM, y lauril-sulfobetaina, 0,5%, pH 4,7) seguido de 8 volúmenes de columna de 100% de tampón B1. La SNDHai eluyó a un valor de pH de aproximadamente 6,5, que está muy cerca del valor de pI de 6,52 calculado a partir de la secuencia de aminoácidos. Las fracciones activas se mezclaron, se diluyeron con la misma cantidad de tampón de HEPES (50 mM, pH 8,0) que contenía MgCl₂ 2 mM y lauril-sulfobetaina al 0,5% (volumen final: 15-20 ml), y se aplicaron a otra columna de intercambio aniónico fuerte (p. ej., Mono-Q HR, Amersham Biosciences, volumen de columna: 1 ml) que se había equilibrado con tampón A2 (HEPES 15 mM, MgCl₂ 2 mM, lauril-sulfobetaina al 0,5%, pH 7,6). Las proteínas que no se unían se eluyeron con 100% de tampón A2 y después de 4 volúmenes de columna se aplicó un gradiente salino lineal en 20 volúmenes de columna hasta 40% de tampón B2 (HEPES, 15 mM; MgCl₂, 2 mM, LiCl, 1 M, y lauril-sulfobetaina, 0,5 %, pH 7,6) seguido de un gradiente por etapas hasta 100% de tampón B2. La SNDHai eluyó alrededor de LiCl 150 mM. Las fracciones activas mostraron una sola banda a aproximadamente 85 kDa en la electroforesis en gel SDS.

2. Ensayo fotométrico para la SNDHai.

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

3. Ensayo de producto para la SNDHai.

Se analizó directamente en las fracciones que contenían SNDHai pura la producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbozona con un ensayo de la siguiente composición (volumen total de 0,5 ml): SNDHai purificada y desalinizada 0,14 mg/ml, tampón de fosfato 50 mM (pH 6,5), albúmina de suero bovino 8 mg/ml (BSA), L-sorbozona 100 mM, PMS 1 mM, CaCl₂ 5 mM, PQQ-K₂ 50 μM. El ensayo se llevó a cabo en tubos de reacción adecuados a 25°C con suficiente agitación (900 rpm en un agitador de sobremesa) con exclusión de luz.

Las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) usando un sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, EE.UU.) con una columna LiChrospher-100-RP18 (125 x 4,6 mm) (Merck, Darmstadt, Alemania) unida a una columna Aminex-HPX-78H (300 x 7,8 mm) (Biorad, Reinach, Suiza). La fase móvil era ácido sulfúrico 0,004 M y el caudal era 0,6 ml/min. Se registraron dos señales usando un detector de UV (longitud de onda 254 nm) en combinación con un detector del índice de refracción. Además, la identificación del ácido L-ascórbico se hizo usando una amino-columna (YMC-Pack Polyamine-II, YMC, Inc., Kyoto, Japón) con detección UV a 254 nm. La fase móvil era NH₄H₂PO₄ 50 mM y acetonitrilo (40:60). Las productividades volumétricas de ácido L-ascórbico iniciales típicas en estas condiciones eran 0,5-1,0 g/l/h. Por lo tanto, después de 1 h de tiempo de reacción, la concentración de ácido L-ascórbico en el líquido sobrenadante era de 300 a 930 mg/l.

Ejemplo 2: Producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbozona y D-sorbitol en fermentaciones en tubos y matraces

Se usaron células de *G. oxydans* N44-1 para inocular 4 ml de medio líquido N° 3BD y se cultivaron en un tubo (18 mm de diámetro) a 30°C durante 3 días con agitación a 220 rpm. Al final del periodo de incubación se habían acumulado 20 mg/l de ácido L-ascórbico.

Se cultivaron células de la cepa N44-1 (por triplicado) en 50 ml de medio N° 5 que contenía D-sorbitol 100 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Difco), MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l, y CaCO₃ 15 g/l en un matraz de agitación con deflectores de 500 ml a 30°C con agitación a 200 rpm. Después de 72 h de cultivo, las cantidades de ácido L-ascórbico medidas por HPLC en los tres matraces eran 400, 500 y 680 mg/l.

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

Células *G. oxydans* N44-1 se cultivaron en 200 ml de medio N° 5 que contenía D-sorbitol 100 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l y CaCO₃ 15 g/l en un matraz de agitación con deflectores de 2 litros a 30°C con agitación a 180 rpm. Después de 48 h, se usaron 150 ml de este cultivo para inocular un biorreactor de 10 litros (B. Braun ED10, Melsungen, Alemania) previamente preparado con 5,3 litros de medio que contenía D-sorbitol 20 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza) y MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l y equipado con sensores de temperatura, pH y oxígeno disuelto y bucles de control. La temperatura se controló a 30°C, el pH se controló a 6,0 por adición de una disolución de amoníaco al 28%, el flujo de aire era 4,5 l/min y el oxígeno disuelto se controló al 30% mediante una cascada con velocidad de agitación (mínimo 300 rpm). Después de un tiempo de proceso de 6 h, se alimentó una solución de sorbitol de 500 g/l a una velocidad de 25 g/h durante un periodo de 44 h. Después de un tiempo de proceso de 96 h, quedaba aproximadamente 1% de sustrato en el líquido sobrenadante, y se habían producido 950 mg/l de ácido L-ascórbico.

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

Se cultivaron células de *G. oxydans* N44-1 en 100 ml de medio de cultivo 3BD en un matraz de agitación con deflectores de 500 ml a 30°C con agitación a 220 rpm durante 3 días. El cultivo resultante se centrifugó a 500 rpm para separar el CaCO₃. El líquido sobrenadante de esta etapa después se centrifugó a 5.000 rpm para sedimentar las células. Las células recogidas se suspendieron en 3 ml de tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 7,0) y las células se alteraron mediante dos pasos por una prensa de French (SIM-AMINCO Spetronic Instruments, EE.UU.) a 63,28 kg/cm² (900 psi). El homogeneizado resultante primero se centrifugó a 5.000 rpm para separar los restos celulares. Después el líquido sobrenadante se diluyó hasta una concentración final de proteínas de 3 mg de proteínas/ml. Esta muestra diluida se designó como el extracto exento de células (CFE). El CFE se centrifugó a 100.000 x g durante 60 min. El líquido sobrenadante se descartó y el sedimento se recogió como la fracción de membrana.

La reacción (200 μl) con la fracción de membrana (100 μl) se llevó a cabo en tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 7,0), 30°C con agitación a 220 rpm durante 15 h. Los sustratos ensayados eran L-sorbozona (concentración final 1%) y L-sorbozona (concentración final 2%). La concentración final de proteínas usada en la reacción era 1,5 mg/ml. Al final del periodo de incubación se habían producido 680 mg/l y 10 mg/l de ácido L-ascórbico a partir de 1% de L-sorbozona y 2% de L-sorbozona, respectivamente.

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

1. Mutagénesis de Tn5

El plásmido pSUP2021, un vector "suicida" que contiene Tn5 (Simon R. et al. 1983. *BIO/TECHNOLOGY* 1: 784-791), se transfirió de *E. coli* HB101 a *G. oxydans* N44-1 por un método de apareamiento por conjugación como sigue. *G.*

oxydans N44-1 se cultivó en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de medio líquido MB a 30°C durante la noche. *E. coli* HB101 que llevaba el plásmido auxiliar pRK2013 (D. H. Figurski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1648-1652, 1979) y *E. coli* HB101 que llevaba el plásmido pSUP2021 se cultivaron en tubos de ensayo que contenían 5 ml de medio LB con kanamicina 50 µg/ml a 37°C durante la noche. Se recogieron células de *G. oxydans* N44-1, *E. coli* HB101(pRK2013), y *E. coli* HB101(pSUP2021) de los cultivos de la noche por separado por centrifugación, y se suspendieron hasta el volumen original en medio MB. Después estas suspensiones celulares se mezclaron en volúmenes iguales y la mezcla se extendió sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm colocada sobre la parte superior de una placa de agar MB. Después de cultivar a 27°C durante un día, las células se separaron por raspado de la membrana y se prepararon diluciones en caldo MB. Después las células diluidas se extendieron sobre medio agar MB que contenía polimixina B 10 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml (medio MPK). La polimixina B selecciona frente a cepas donantes y auxiliares de *E. coli*, mientras que la kanamicina selecciona las células de *G. oxydans* que han sido transformadas con el plásmido pSUP2021 (es decir, los transconjugados). Se obtuvieron aproximadamente 30.000 transconjugados.

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

En total se transfirieron 3.760 transconjugados con palillos estériles a placas de rejilla con MPK y se cultivaron a 27°C durante 3 días. Para ensayar la producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbose, se separaron células de cada uno de los transconjugados de la placa de rejilla con un palillo estéril y se suspendieron en 50 µl de una mezcla de reacción de células en reposo que contenía L-sorbose al 0,5%, NaCl al 0,3%, y CaCO₃ al 1% en placas de microvaloración de 96 pocillos. Las placas de microvaloración se incubaron a 30°C durante un día sin agitación. Se analizó en un microlitro de cada una de las mezclas de reacción resultantes la formación de ácido L-ascórbico usando tiras de ensayo de ácido ascórbico y el instrumento RQFlex2 (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania). La cepa de control positivo era *G. oxydans* N44-1 desarrollada en idénticas condiciones. Por este método se identificó el mutante N44-1-6A9 no productor de ácido L-ascórbico. Después se llevaron a cabo análisis de hibridación de transferencia Southern para confirmar la presencia de Tn5 en el ADN cromosómico del mutante N44-1-6A9. Se digirieron 2 µg del ADN cromosómico aislado del mutante con *Apal*, *Clal*, *EcoRI*, *EcoRV*, *KpnI*, *StuI*, *BamHI*, *Sall* o *HindIII* y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 0,8%). Después el gel se trató con HCl 0,25 N durante 15 min, seguido de NaOH 0,5 N durante 30 min. El ADN se transfirió a una membrana de nailon con el sistema de transferencia descendente rápido TurboBlotter (Schleicher & Schuell GmbH, Alemania). La sonda se preparó con el kit de marcaje PCR-DIG (Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Alemania) usando los cebadores Tn2419 (SEQ ID NO: 3) y Tn3125R (SEQ ID NO: 4) con el plásmido pSUP2021 como molde. Se obtuvo un producto por PCR de 707 pb.

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

Después de la etapa de hibridación, la detección de la hibridación se hizo con conjugado anti-DIG-AP (Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Alemania) y sustrato ECF (Amersham Biosciences Uppsala, Suecia) usando el instrumento STORM (Amersham Biosciences). Todas las operaciones se hicieron de acuerdo con las instrucciones de los proveedores.

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

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

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

Se preparó el ADN cromosómico del mutante Tn5 de *G. oxydans* N44-1-6A9 y se digirió con *Apal*. Los fragmentos de ADN con el tamaño de 9 a 12 kb se aislaron del gel de agarosa y se ligaron con el vector de clonación pBluescript II KS+ (Stratagene, Suiza), previamente digerido con *Apal*. Después la mezcla de ligado se usó para transformar células de *E. coli* competentes, seleccionando en placas de L-agar que contenían kanamicina 50 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml. Se extrajo el plásmido de un transformante y se secuenciaron las regiones clonadas que flanqueaban la inserción Tn5. La secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto individual (interrumpido por la inserción Tn5) se ensambló después de eliminar un duplicado de 9 pb que se sabe que se produce durante el suceso de transposición de Tn5. La secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto completo, en lo sucesivo denominado el gen de SNDH*ai* de *Gluconobacter oxydans* N44-1, consistía en 2367 pb y se da como la SEQ ID NO: 1. La correspondiente secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 se da aquí como la SEQ ID NO: 2.

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

Usando el programa MOTIFS, las secuencias identificadores de quinoproteína deshidrogenasas bacterianas se identificaron fácilmente, indicando que la SNDHai tiene características de una enzima dependiente de PQQ.

Ejemplo 6: Análisis de transferencia Southern de las bacterias que producen ácido L-ascórbico a partir de L-sorbosona

El ADN cromosómico se preparó a partir de células de *Gluconobacter oxydans* IFO 3293, IFO 3292, IFO 3244, IFO 3287, *Gluconobacter frateurii* IFO 3260 y IFO 3265, *Gluconobacter cerinus* IFO 3266 y IFO 3269, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanus* IFO 3259, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO 13693 y IFO 13773, *Acetobacter* sp. ATCC 15164, y *Escherichia coli* K-12. Las cepas IFO 13693 y IFO 13773 se cultivaron a 27°C durante 3 días en medio N° 350 que contenía Bactopectona 5 g/l (Difco), extracto de levadura 5 g/l (Difco), glucosa 5 g/l, manitol 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 1 g/l, etanol 5 ml/l, y agar 15 g/l. Todas las demás cepas de *Acetobacter* y todas las cepas de *Gluconobacter* se cultivaron a 27°C durante 3 días en medio de agar-caldo de manitol (MB) que contenía manitol 25 g/l, extracto de levadura 5 g/l (Difco Laboratories, Detroit, Mich., EE.UU.), Bactopectona 3 g/l (Difco), y agar 18 g/l (Difco). *E. coli* K-12 se cultivó en medio de agar-caldo Luria. Las preparaciones de ADN cromosómico se usaron para la hibridación por transferencia Southern en condiciones restrictivas como se describe en el ejemplo 5. Las preparaciones de ADN cromosómico se digirieron con *Cla*I (cuando se analizaba la región de dominio N) o *Eco*RI (cuando se analizaba la región de dominio C), y se separó 1 µg de fragmentos de ADN por electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 1%). El gel se trató con HCl 0,25 N durante 15 min y después NaOH 0,5 N durante 30 min, y después se transfirió a membrana de nailon con el dispositivo Vacuum Blotter Modelo 785 (BIO-RAD Laboratories AG, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las sondas se prepararon con el kit de marcaje PCR-DIG (Roche Diagnostics) usando los conjuntos de cebadores descritos en la tabla 2. El producto P1 de la PCR corresponde a la región de SNDHai designada como el dominio N (posible región transmembrana) mientras que el producto P2 de la PCR corresponde a la región de SNDHai designada como el dominio C (posible región de deshidrogenasa principal).

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

Conjunto de cebadores	SEQ ID NO de los cebadores	producto de la PCR	Tamaño esperado del producto de la PCR (pb)
SNDH1F y SNDH420R	5 y 6	P1	420
SNDH501F y SNDH2364R	7 y 8	P2	1864
SNDH501F y SNDH1530R	7 y 9	P3	1030
SNDH1391F y SNDH2364R	10 y 8	P4	974

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

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

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

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

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

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

10

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

15 Se separaron muestras de las reacciones de PCR por electroforesis en gel de agarosa y las bandas se visualizaron con un transiluminador después de tinción con bromuro de etidio. Los resultados de las reacciones de la PCR se resumen en la tabla 4.

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

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

20 +, detectado; nd, no detectado; ne, no ensayado. *Esta PCR se hizo con el sistema de PCR rico en GC (Roche Diagnostics) con el mismo ciclo de reacciones usado para el sistema de PCR Expand High Fidelity.

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

Ortólogo de SNDHai de *Gluconobacter oxydans* IFO 3292

30 El producto de la PCR (aproximadamente 1 kb) obtenido tras amplificación con los cebadores SNDH1391F (SEQ ID NO: 10) y SNDH2364R (SEQ ID NO:8) y ADN cromosómico de *G. oxydans* IFO 3292 como molde, se usó para la secuenciación con el cebador SNDH1391F (SEQ ID NO: 10). La secuencia de nucleótidos determinada de 771 pb

(SEQ ID NO: 11) mostró 98,7% (761/771) de homología con los nucleótidos 1431-2201 de la secuencia de SNDHai de *G. oxydans* N44-1 (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos deducida de 256 aminoácidos (SEQ ID NO: 12) mostró 100% de identidad con los aminoácidos 478-733 de la secuencia de aminoácidos de SNDH de *G. oxydans* N44-1 (SEQ ID NO: 2).

5 Ortólogo de SNDHai de *Gluconobacter oxydans* IFO 3287

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

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

El producto de la PCR (aproximadamente 1 kb) obtenido tras amplificación con los cebadores SNDH1391F (SEQ ID NO: 10) y SNDH2364R (SEQ ID NO: 8) se usó para la secuenciación con el cebador SNDH1391F (SEQ ID NO: 10). La secuencia de nucleótidos determinada de 800 pb (SEQ ID NO: 17) mostró 98,8% (790/800) de homología con los nucleótidos 1469-2268 de la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos deducida de 266 restos (SEQ ID NO: 18) mostró 100% de identidad con los aminoácidos 491-756 de la SEQ ID NO: 2.

Ortólogo de SNDHai de *Acetobacter sp.* ATCC 15164

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

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

Ortólogo de *Gluconobacter oxydans* IFO 3244 SNDHai

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

45 Ejemplo 8: Producción de ácido L-ascórbico mayor a partir de L-sorbose mediante el aumento de la dosis de gen de SNDHai

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

50 La PCR se hizo con el sistema de PCR rico en GC (Roche Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El fragmento de ADN amplificado se insertó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El plásmido resultante después se digirió con *Hind*III y *Xho*I. El fragmento *Hind*III-*Xho*I que incluía el gen de SNDHai se ligó al vector pVK100 (disponible en la American Type Culture Collection, nº de catálogo ATCC 37156) previamente tratado con *Hind*III y *Xho*I. La mezcla de ligación se usó para transformar *E. coli* TG1. El plásmido deseado, designado pVK-P-SNDHai-T, se aisló de *E. coli*, y se introdujo en la cepa de *G. oxydans* N44-1 por

electroporación usando métodos convencionales (Electrocell manipulator ECM600, BTX Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

5 Células de las cepas de *G. oxydans* N44-1 y N44-1 que llevaban el plásmido pVK-P-SNDHai-T se cultivaron en 50 ml de medio N° 5 que contenía D-sorbitol 100 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Difco), MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l, y CaCO₃ 15 g/l en un matraz de agitación con deflectores de 500 ml a 30°C con agitación a 200 rpm. Después de 48 h de cultivo, las cantidades medidas de ácido L-ascórbico en el líquido sobrenadante por HPLC en los dos matraces eran 110 mg/l y 200 mg/l, respectivamente.

Ejemplo 9: Producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbosea usando células en reposo cultivadas en medio agar-caldo de manitol

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

15 Las cepas IFO 13693 y IFO 13773 se cultivaron a 27°C durante 3 días en medio N° 350 que contenía Bactopectona 5 g/l (Difco), extracto de levadura 5 g/l (Difco), glucosa 5 g/l, manitol 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 1 g/l, etanol 5 ml/l, y agar 15 g/l. Todas las demás cepas de *Acetobacter* y todas las cepas de *Gluconobacter* se cultivaron a 27°C durante 3 días en medio agar-caldo de manitol (MB) que contenía manitol 25 g/l, extracto de levadura 5 g/l (Difco Laboratories, Detroit, Mich., EE.UU.), Bactopectona 3 g/l (Difco), y agar 18 g/l (Difco).

20 Las células se rasparon de las placas de agar, se suspendieron en agua destilada y se usaron para las reacciones de las células en reposo llevadas a cabo a 30°C durante 20 h en tubos de 5 ml con agitación a 230 rpm. Las mezclas de reacción (0,5 ml) contenían 1% de L-sorbosea, 0,3% de NaCl, 1% de CaCO₃ y células en una concentración final de 10 unidades de absorbancia a 600 nanómetros (OD₆₀₀). Al final del periodo de incubación, las mezclas de reacción se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando un sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, EE.UU.) con una columna LiChrospher-100-RP18 (125 x 4,6 mm) (Merck, Darmstadt, Alemania) unida a una columna Aminex-HPX-78H (300 x 7,8 mm) (Biorad, Reinach, Suiza).
25 La fase móvil era ácido sulfúrico 0,004 M y el caudal era 0,6 ml/min. Se registraron dos señales usando un detector de UV (longitud de onda de 254 nm) en combinación con un detector del índice de refracción. Además, la identificación del ácido L-ascórbico se hizo usando una amino-columna (YMC-Pack Polyamine-II, YMC, Inc., Kyoto, Japón) con detección UV a 254 nm. La fase móvil era NH₄H₂PO₄ 50 mM y acetonitrilo (40:60).

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

35 Para excluir la presencia de ácido D-isoascórbico, la identificación del ácido L-ascórbico se hizo además por el tiempo de retención usando una amino-columna (YMC-Pack Polyamine-II, YMC, Inc., Kyoto, Japón) con detección UV a 254 nm. La fase móvil era NH₄H₂PO₄ 50 mM y acetonitrilo (40:60).

Las cepas *Gluconobacter* y *Acetobacter* producían ácido L-ascórbico a partir de L-sorbosea como se muestra en la tabla 5.

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

Cepa	ácido L-ascórbico (mg/l)
<i>G. oxydans</i> IFO 3293	1740
<i>G. oxydans</i> N44-1	570
<i>G. oxydans</i> IFO 3292	410
<i>G. oxydans</i> IFO 3244	1280
<i>G. frateurii</i> IFO 3260	50
<i>G. cerinus</i> IFO 3266	140
<i>G. oxydans</i> IFO 3287	60
<i>A. aceti</i> subsp. <i>Orleanus</i> IFO 3259	30
<i>A. aceti</i> subsp. <i>Xylinum</i> IFO 13693	40
<i>A. aceti</i> subsp. <i>Xylinum</i> IFO 13693	120
<i>Acetobacter sp.</i> ATCC 15164	310
Blanco	No detectado

40 Blanco; la reacción se hizo en la mezcla de reacción sin células.

Ejemplo 10: Producción de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol, L-sorbosea o L-sorbosea usando células en reposo cultivadas en medio agar 3BD

Células de *G. oxydans* N44-1 se cultivaron a 27°C durante 3 días en medio agar N° 3BD que contenía L-sorbosa 70 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 7,5 g/l (Difco), MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l, CaCO₃ 10 g/l y agar 18 g/l (Difco). Las reacciones de las células en reposo (1 ml de mezcla de reacción en tubo de 10 ml) se llevaron a cabo con D-sorbitol al 2%, L-sorbosa al 2% o L-sorbosona al 1% a 30°C durante 24 h como se describe en el ejemplo 9. La cepa N44-1 producía 280, 400 y 1780 mg/l de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol, L-sorbosa y L-sorbosona, respectivamente.

Se llevaron a cabo otras reacciones (0,5 ml de mezcla de reacción en tubo de 10 ml) con células N44-1 cultivadas en medio agar N° 3BD en mezclas de reacción que contenían D-sorbitol al 2%, L-sorbosa al 2% o L-sorbosona al 2% durante 2 días como se describe en el ejemplo 9. La cepa N44-1 producía 1,8, 2,0 y 5,1 g/l de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol, L-sorbosa y L-sorbosona, respectivamente.

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

Ejemplo 11: Producción de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol usando células en reposo cultivadas en medio líquido

Células de *G. oxydans* N44-1 se cultivaron en 200 ml de medio N° 5 que contenía D-sorbitol 100 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l y CaCO₃ 15 g/l en un matraz de agitación con deflectores de 2 litros a 30°C con agitación a 180 rpm. Después de 24 h, el cultivo se centrifugó a 3220 g (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemania), y las células se volvieron a suspender en solución de NaCl al 0,9%. NaCl, se centrifugaron de nuevo a 3220 g y el sedimento celular se usó para inocular un matraz de agitación con deflectores de 500 ml que contenía 50 ml de medio de crecimiento completo (D-sorbitol 100 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l, MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l, CaCO₃ 15 g/l) y otro matraz de agitación con deflectores de 500 ml que contenía 50 ml de medio de producción (D-sorbitol 100 g/l, NaCl 3 g/l, CaCO₃ 10 g/l). La densidad celular inicial, medida como la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀), en ambos matraces era 10. Ambos matraces se incubaron a 30°C con agitación a 180 rpm. Después de 48 h, la suspensión celular en medio de crecimiento y medio de producción había acumulado 1,06 y 1,18 g/l de ácido L-ascórbico, respectivamente. No se observó crecimiento adicional en medio completo durante el tiempo del periodo de incubación.

Ejemplo 12: Producción de ácido L-ascórbico a partir de L-sorbosona o D-sorbitol por células en reposo de microorganismos recombinantes con dosis mayores de gen de SNDHai

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

La PCR se hizo con el sistema de PCR rico en GC (Roche Diagnostics) GmbH de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El fragmento de ADN amplificado se insertó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El plásmido resultante después se digirió con *Hind*III y *Xho*I. El fragmento *Hind*III-*Xho*I que incluía el gen de SNDHai se ligó al vector pVK100 (disponible en la American Type Culture Collection, n° de catálogo ATCC 37156) previamente tratado con *Hind*III y *Xho*I. La mezcla de ligación se usó para transformar *E. coli* TG1. El plásmido deseado, designado pVK-P-SNDHai-T, se aisló de *E. coli*, y se introdujo en la cepa de *G. oxydans* N44-1 por electroporación usando métodos convencionales (Electrocell manipulator ECM600, BTX Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

Se cultivaron cada uno de los tres transformantes independientes, designados número de clon de N44-1(pVK-P-SNDHai-T) 1, 2, y 3, junto con la cepa original *G. oxydans* N44-1, en medio agar N° 3BD y medio agar MB. Las células se rasparon de las placas y se usaron para las reacciones de las células en reposo (L-sorbosona al 1% como sustrato) como se describe en el ejemplo 9. Después de crecimiento en agar N° 3BD, en el ensayo de células en reposo la cepa N44-1 producía 2,5 g/l de ácido L-ascórbico, mientras que los clones de las cepas N44-1(pVK-P-SNDHai-T) 1, 2 y 3 producían 4,2, 4,1 y 4,2, g/l de ácido L-ascórbico, respectivamente. Después de cultivo en agar MB, en el ensayo de células en reposo la cepa N44-1 producía 0,12 g/l de ácido L-ascórbico, mientras que los clones de las cepas N44-1(pVK-P-SNDHai-T) 1, 2 y 3 producían 1,8, 2,5 y 0,94 g/l de ácido L-ascórbico, respectivamente.

Se llevó a cabo otra reacción usando células de *G. oxydans* N44-1 y el clon 2 (véase antes) cultivadas en 50 ml de medio N° 5 (D-sorbitol 100 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l, MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l, CaCO₃ 15 g/l) por duplicado en matraces de agitación con deflectores de 500 ml a 30°C con agitación a 220 rpm durante 3 días. De un matraz de cada cepa se centrifugó el caldo resultante a 500 rpm para separar el CaCO₃. El líquido sobrenadante de esta etapa después se centrifugó a 5.000 rpm para sedimentar las células. Las células recogidas se volvieron a suspender en 10 ml de solución de NaCl al 0,9%, y se centrifugaron de nuevo a 5.000 rpm para sedimentar las células. Las células recogidas se volvieron a suspender en agua y se usaron para inocular 1 ml de medio de producción (D-sorbitol 20 g/l, NaCl 3 g/l, CaCO₃ 10 g/l) en un tubo de reacción de 10 ml a una densidad final de células en reposo correspondiente a 5 unidades de DO a 600 nm. Después de 20 h de tiempo de reacción a 30°C y 220 rpm, el líquido sobrenadante recogido del matraz de producción contenía 360 y 760 mg/l de ácido L-ascórbico,

respectivamente para las cepas N44-1 y N44-1 que expresaban en exceso SNDHai. En cambio, después de 72 h el líquido sobrenadante recogido del medio de crecimiento que quedaba contenía 0 y 440 mg/l de ácido L-ascórbico, respectivamente.

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

- 5 El gen de SNDHai sin codón de parada denominado SNDHai-1, que corresponde a los nucleótidos 1-2364 de la SEQ ID NO: 1, se amplificó a partir del ADN cromosómico de la cepa N44-1 por PCR (Roche High Fidelity kit) usando la pareja de cebadores SNDHai-Nde (SEQ ID NO: 30) y SNDHaiHis-X (SEQ ID NO: 31).

10 El ADN amplificado se clonó en pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) para obtener pCR2.1-TOPO-SNDHai-1, cuya secuencia de SNDHai se confirmó que era correcta por secuenciación de nucleótidos. El gen SNDHai-1 se cortó con *NdeI* y *XhoI* y se ligó entre los sitios *NdeI* y *XhoI* de pET-21b(+) (Novagen, Madison, WI, EE.UU.) para producir pET21b-SNDHaiHis; se añadió 6xHis en el extremo C de SNDHai. El pET21b-SNDHaiHis se introdujo en *E. coli* BL21 (DE3).

15 Se inocularon cinco ml de un cultivo de una la noche de *E. coli* BL21 (DE3)/ pET21b- SNDHaiHis en LB con carbenicilina 50 µg/ml en 200 ml del mismo medio. Las células se cultivaron a 230 rpm a 37°C durante 2 h, después se indujeron con IPTG 1 mM y se continuaron cultivando a 230 rpm a 25°C durante 3 h. El cultivo resultante se centrifugó y se lavó dos veces con solución salina y el sedimento celular se volvió a suspender en 2 ml de agua. Las células se usaron para la reacción de las células en reposo con la mezcla de reacción (500 µl en tubo de 5 ml) que contenía células a una DO600=10, sorbose monohidrato al 1%, PQQ 5 µM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 0,3%, y CaCO₃ al 1% llevada a cabo a 30°C durante 15 h. Se produjeron 0,14 g/l de ácido L-ascórbico después de incubación durante 20 15 h. Cuando la reacción de las células en reposo se hizo con PQQ 1 µM (las otras condiciones eran las mismas que las descritas antes), se produjeron 0,05 g/l de ácido L-ascórbico después de incubación durante 3 h.

Ejemplo 14: Producción de ácido L-ascórbico a partir de D-sorbitol por células en reposo de microorganismos recombinantes con dosis de gen SNDHai mayores

25 Células de *G. oxydans* N44-1 que expresan en exceso SNDHai se cultivan en 50 ml de medio N° 5 que contiene D-sorbitol 100 g/l, glicerol 0,5 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l y CaCO₃ 15 g/l en un matraz de agitación con deflectores de 500 ml a 30°C con agitación a 180 rpm durante 48 h. La suspensión de células resultante se usa para inocular un biorreactor de 2 litros, llamado recipiente de reacción (Biostat-MD, B. Braun Melsungen, Melsungen, Alemania) que contenía 1,25 l de medio compuesto de D-sorbitol 100 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l, KH₂PO₄ 0,3 g/l y CaSO₄ 0,12 g/l. Las células se cultivan a 30°C, velocidad de aireación 1 l/min, el pH se controla a 5,7 con una solución de Na₂CO₃ al 25%, el oxígeno disuelto se controla al 10% de saturación variando la velocidad de agitación. Después de 30 24 h, la densidad celular medida como unidades de absorción a 600 nm es 20. En este punto, se alimenta una solución de alimentación que contiene D-sorbitol 100 g/l, extracto de levadura 15 g/l (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza), MgSO₄·7H₂O 2,5 g/l, KH₂PO₄ 0,3 g/l y CaSO₄ 0,12 g/l en el recipiente de crecimiento a una velocidad de crecimiento de 125 ml/h, y se recoge continuamente el caldo a una velocidad de recolección de 125 ml/h. Por este medio, el volumen en el recipiente de crecimiento se mantiene constante a 1,25 litros. Otros parámetros del procedimiento continúan controlándose como se ha mencionado antes.

40 Este caldo se alimenta continuamente a una velocidad de 125 ml/h a un segundo reactor, llamado reactor de producción, cargado con 5 litros de medio de producción que contiene D-sorbitol 100 g/l, NaCl 0,3 g/l y CaSO₄ 0,12 g/l, y la temperatura se mantiene a 30°C, pH a 7,0 controlando con una solución de NaOH al 20%. La velocidad de reacción se mantiene constante a 10 l/min, y el oxígeno disuelto se controla al 20% variando la velocidad de agitación. El medio de producción con la misma composición se alimenta continuamente al recipiente de producción a una velocidad de alimentación de 375 ml/h. El volumen del recipiente se mantiene constante a 5 litros mediante la recolección continua de líquido sobrenadante a una velocidad de 500 ml/h, resultando de una corriente de filtrado de 45 un módulo de ultrafiltración de flujo cruzado con tamaño de poros de 500 kDa (UFP-500-E-9A, Amersham Biosciences), a través del cual la suspensión de células recogida del recipiente de producción se bombea a 50 l/h usando una bomba Masterflex. El flujo retenido es bombeado de nuevo al recipiente. Una vez que la densidad celular en el recipiente de producción alcanza 100 unidades de absorción a 600 nm, empiezan a recogerse las células de la corriente de células concentrada que fluye de nuevo al recipiente de producción a una velocidad de 25 50 ml/h, con el fin de mantener la densidad celular constante en el recipiente de producción.

La corriente recogida del líquido sobrenadante exento de células contiene 4 g/l de ácido L-ascórbico y se alimenta continuamente a una velocidad de 500 ml/h a un recipiente de recolección con una camisa doble a 30°C (Ecoline Re112, Lauda, Lauda-Koenigshofen, Alemania). Este recipiente alimenta continuamente líquido sobrenadante al compartimento del diluido de una unidad de electrodiálisis de dos compartimentos (pila que contiene 10 parejas de celdas con membranas de intercambio catiónico CMX-S y membranas de intercambio aniónico ASM, área total de membrana 0,2 m², de Eurodia Industries, Wissous, Francia) a una velocidad de 180 l/h, y se bombea una corriente constante fuera del recipiente para mantener su volumen constante a 2 litros. Otro recipiente con doble camisa que contiene inicialmente agua desionizada a 30°C se alimenta continuamente con agua desionizada de nueva 55 aportación a una velocidad de 62,5 ml/h, se bombea constantemente solución acuosa en el compartimento

5 concentrado de la unidad de electrodiálisis a una velocidad de 200 l/h, y se bombea fuera del recipiente una corriente de recolección constante. Las soluciones de alimentación se bombean a la pila de electrodiálisis usando bombas peristálticas (7518-00, Masterflex, EE.UU.), y la recirculación de soluciones a través de cada compartimento de electrodiálisis se hace con ayuda de bombas rotatorias (MD-20, IWAK, Tokyo, Japón). Durante todo el procedimiento, se aplican 14 V a la pila de electrodiálisis (fuente de alimentación FuMATech TS001/5, St. Ingbert, Alemania). La concentración del ácido L-ascórbico en la corriente de recogida es 16 g/l.

Ejemplo 15: Purificación del ácido L-ascórbico producido por una reacción de células en reposo por etapas de procesamiento corriente abajo

10 La corriente de recolección del ejemplo 14 que contiene 16 g/l de ácido L-ascórbico se alimenta a una resina de quelación (Amberlite IRC 748, Rohm and Haas, Philadelphia, PA, EE.UU.) para eliminar los cationes divalentes de la corriente. Después se recoge en un recipiente enfriado (recipiente de alimentación), y cuando se han recogido 10 litros, se procesan en un modo discontinuo a través de una unidad de electrodiálisis de membrana bipolar (pila que contiene 7 membranas Neosepta BP1 / CMB, área total de membranas 0,14 m², de Eurodia Industries, Wissous, Francia). Esta solución se bombea a 200 l/h a través del compartimento de alimentación de la unidad de electrodiálisis, y se recicla al recipiente de alimentación. Otro recipiente enfriado (recipiente de concentrado) que contiene inicialmente 5 litros de solución de NaOH 2 g/l se bombea a 100 l/h a través del compartimento de concentrado de la unidad de electrodiálisis de membrana bipolar. Aplicando un voltaje máximo de 25 V y corriente eléctrica máxima de 20 A, los cationes de sodio del compartimento de alimentación se transfieren al compartimento de concentrado, y así la forma sódica del ácido L-ascórbico presente en la corriente de alimentación se convierte en la correspondiente forma ácida. Después de alcanzar rendimientos de 90%, se detiene el procedimiento. En el recipiente de concentrado, 6 litros de solución que contiene NaOH 7,5 g/l se recogen en el recipiente de diluido, 9 litros de solución que contiene aproximadamente 16 g/l de ácido L-ascórbico en su forma de ácido libre y 1,6 g/l de ácido L-ascórbico en su forma de sal de sodio son procesados además a través de la resina de intercambio catiónico (Amberlite FPC 21 H, Rohm and Haas, Philadelphia, PA, EE.UU.), con el fin de aumentar el rendimiento de conversión de la sal de sodio en la forma de ácido libre a aproximadamente 99%. Alternativamente, la solución de 10 litros que contiene 16 g/l de ácido L-ascórbico en su forma de sal de sodio que viene de la etapa de electrodiálisis se trata directamente mediante la resina de intercambio catiónico, convirtiéndose en la forma de ácido libre con 99% de rendimiento. La corriente de ácido L-ascórbico en forma del ácido libre, obtenida por cualquiera de los métodos descritos antes, después se procesa además por una secuencia de las siguientes etapas: intercambio aniónico, tratamiento con carbón activado, concentración, cristalización, filtración de los cristales y secado. La pureza final de los cristales obtenidos es 98%, y el rendimiento obtenido con la etapa de procesamiento corriente abajo combinada es 80%.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> Producción microbiana de ácido L-ascórbico

<130> 21864 WO

5 <150> EP 03017677.0

< 151> 2003-08-14

<160> 31

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

10 < 211> 2367

< 212> ADN

< 213> Gluconobacter oxydans N44-1

<400> 1

```

atgaacagcg gccccgcac gctctccatg atcatcggga ttctgggcg cctcatggcc      60
gccttcctga tcatcgaagg cctccacctc atcatcctcg gcggtcgtg gttctacacc     120
ctcgccggca tcgcgctggc ggccagcagc gtctacatga tccgtcgcaa catcctctcg     180
acatggatcg ccctgggcct gcttgtggca acagccctgt ggtcgctcgc cgaagtcggc     240
accagcttct ggcccagctt ctcccgcctg atcgtgttcc tgtgcgtcgc cctgatcgcg     300
actctcatgg cgccctggct cagcggcccc ggccggcgct acttcaccgc ccccgtcaca     360
ggcgccacat ccggcgccct cggcgcgatc atcgtggctt tcctcgccgg catgttccgg     420
gtccaccgca ccatcgcccc gcaggacacc acccaccgc aggaaaccgc gtccaccgcc     480
gactccgacc agccaggcca tgactggccc gcctatggcc gcacggcttc cggcacgcgc     540
tacgccagct tcacgcagat caaccgcgac aatgtcagca agctccgcgt cgcctggacc     600
taccgcaccg gcgacatggc gctgaacggc gccgagttcc agggcacccc catcaagatc     660
ggcgacacgg tctatatctg ctcaccgcac aacatcgtct cggcccttga cccggacacc     720
ggcacggaaa agtgggaagt cgacccccac gccagacga aagtctggca gcgctgccgc     780
ggcgtcggct actggcatga cagcacggcc acggacgcca acgcgccctg cgcctcgcgc     840
atcgtcctca ccacgatcga cggccgctc atcaccatcg acgccgtac cggccaggcc     900
tgcacggatt tcggaacgaa cggcaacgtc aatctcctga ccggcctcgg cccgacagct     960
cccggctcgt actaccgac cgccgcccc ctcgtggcgg gtgacatcgt ggtcgtcggc    1020
ggccgcatcg ccgataacga gcgcaccggc gagccctccg gcgtcgtccg cggctatgat    1080
gtccgcaccg gcgcacaggt ctgggcctgg gacgccacca accgcacatc cggcaccaca    1140
cctctggccg aaggcgagat ctaccccgcc gaaaccccca acatgtgggg caccgccagc    1200
tacgaccgca aactcaacct cgtcttcttc ccgctcggca accagacccc cgatttctgg    1260
ggcggcgacc gcagcaaggc ctcagacgaa tacaacgacg ccttcgtcgc cgtggacgcc    1320
aagaccggcg acgaacgctg gcacttccgc accgccaacc acgacctcgt ggactacgat    1380
gccacggccc agcccacatc ctatgacatt ccggacggcc atggcggcac ccgccggcg     1440
atcatcgcca tgaccaagcg cggccagatc ttcgtgctcg accgccgca cggcaccg     1500
atcgtccctg tggaaatcgc caaagtcccg caggacggcg caccggaaca ccagtacct     1560
gccccgaac agccctattc cgccctctcc atcggaacag agcgcctgaa acccagcgac    1620
atgtggggtg gtacgatctt cgaccagctc ctgtgccgca tccagttcgc ctctaccgc    1680

```


ES 2 593 811 T3

tatgaaggcg agttcacccc cgtcaacgag aaacaggcca ccatcatcta tccgggctat 1740
 tacggcggca tcaactgggg cggcggcgcc gtggatgaaa gcaccggaac gctgctggtc 1800
 aacgacatcc gcatggccca gtggggcaag ttcatgaagc aggaagaagc ccgtcgcagc 1860
 ggcttcaaac ccagctcgga aggcgaatat tccgaacaga aaggcacccc ctggggcgtc 1920
 gtccgctcga tgttcttctc ccccgccgtt ctcccctgcg tgaaaccgcc ctatggcacg 1980
 atgaacgcca tcgacctgcg cagcggcaag gtcaaatgga gcatgccgct tggcacgatc 2040
 caggacatgc cggtcacagg catggtccca ggccctcgcca tcccgtcggc aatgccgacc 2100
 atgagcggcc cgctggccac ccataccggc ctggtgttct tctccggcac gctcgacaac 2160
 tatgtccgcy cgctcaaac cgcaccggc gaagtcgtct ggaaagcccg tctcccgcgc 2220
 gcctcacagg ccgctccgat gagctacatg tccgacaaga ccggcaaaca gtacatcgtc 2280
 gtcaccgcag gggcctgac ccgctccggc gtcgacaaaa accgcggcga ctacgtcatc 2340
 gcctacgccc tgccctccga agaataa 2367

<210> 2

<211> 788

5 <212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans N44-1

<400> 2

Met Asn Ser Gly Pro Arg Thr Leu Ser Met Ile Ile Gly Ile Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Leu Met Ala Ala Phe Leu Ile Ile Glu Gly Leu His Leu Ile Ile
 20 25 30
 Leu Gly Gly Ser Trp Phe Tyr Thr Leu Ala Gly Ile Ala Leu Ala Ala
 35 40 45
 Ser Ser Val Tyr Met Ile Arg Arg Asn Ile Leu Ser Thr Trp Ile Ala
 50 55 60
 Leu Gly Leu Leu Val Ala Thr Ala Leu Trp Ser Leu Ala Glu Val Gly
 65 70 75 80
 Thr Ser Phe Trp Pro Ser Phe Ser Arg Leu Ile Val Phe Leu Cys Val
 85 90 95
 Ala Leu Ile Ala Thr Leu Met Ala Pro Trp Leu Ser Gly Pro Gly Arg
 100 105 110
 Arg Tyr Phe Thr Arg Pro Val Thr Gly Ala Thr Ser Gly Ala Leu Gly
 115 120 125
 Ala Ile Ile Val Ala Phe Leu Ala Gly Met Phe Arg Val His Pro Thr
 130 135 140
 Ile Ala Pro Gln Asp Thr Thr His Pro Gln Glu Thr Ala Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 Asp Ser Asp Gln Pro Gly His Asp Trp Pro Ala Tyr Gly Arg Thr Ala
 165 170 175

ES 2 593 811 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 593 811 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Glu Glu
 785

<210> 3
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cebador

5

ES 2 593 811 T3

	<400> 3 cgcttctat gaaaggttg	20
5	<210> 4 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> Cebador	
10	<400> 4 agcggatgga gatcgggcgg	20
15	<210> 5 < 211> 30 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> Cebador	
20	<400> 5 atgaacagcg gccccgcac gctctcatg	30
25	<210> 6 < 211> 30 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> Cebador	
30	<400> 6 ccggaacatg ccggcgagga aagccacgat	30
35	<210> 7 < 211> 30 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> Cebador	
40	<400> 7 tgactggccc gcctatggcc gcacggcttc	30
45	<210> 8 < 211> 30 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> Cebador	
50	<400> 8 ttctcggag ggcagggcgt aggcgatgac	30
	<210> 9 < 211> 30 < 212> ADN < 213> Artificial <220> < 223> Cebador	
	<400> 9 cgggactttg cgcatttcca cagggacgat	30

ES 2 593 811 T3

<210> 10
 < 211> 30
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

5 <220>
 < 223> Cebador

<400> 10
 agcccatcct ctatgacatt ccggacggcc 30

10 <210> 11
 < 211> 771
 < 212> ADN
 < 213> Gluconobacter oxydans IFO 3292

<400> 11
 ccgcccggcg atcatcgcca tgaccaagcg cggccagatc ttcgtgctcg accgccgca 60
 cggcaccctcg atcgtccccg tggaaatgcg caaagtcccc caggacggcg caccggaaca 120
 ccagtacctc gccccgaac agccctattc cgccctctcc atcggaacag agcgcctgaa 180
 acccagcgat atgtggggcg gcacgatctt cgaccagctc ctgtgccgca tccagttcgc 240
 ctctaccgc tatgaaggcg agttcacccc cgtaacgag aagcaggcca ccatcatcta 300
 tccgggctat tacggcggca tcaactgggg cggcggcgcc gtggatgaaa gcaccggaac 360
 gctgctggtc aacgacatcc gcatggccca gtggggcaag ttcatagaagc aagaagaagc 420
 ccgccgcagc ggcttcaaac ccagctcggg aggcgaatat tccgaacaga aaggcaccctc 480
 ctggggcgtc gtccgctcga tgttcttctc ccccgccggt ctcccctgcg tgaaccgcc 540
 ctatggcacg atgaacgcca tcgacctgcg cagcggcaag gtcaaatagga gcatgccgct 600
 tggcacgata caggacatgc cggtcacgag catggtcccc ggccctcgcca tcccgctcgg 660
 aatgccgacc atgagcggcc cgctggccac ccataccggc ctggtcttct tctccggcac 720
 gctcgacaac tatgtccgcg cgctcaacac cgacaccggc gaagtcgtct g 771

15 <210> 12
 < 211> 256
 < 212> PRT
 < 213> Gluconobacter oxydans IFO 3292

<400> 12
 Arg Pro Ala Ile Ile Ala Met Thr Lys Arg Gly Gln Ile Phe Val Leu
 1 5 10 15
 Asp Arg Arg Asp Gly Thr Pro Ile Val Pro Val Glu Met Arg Lys Val
 20 25 30
 Pro Gln Asp Gly Ala Pro Glu His Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Gln Pro
 35 40 45

20

ES 2 593 811 T3

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

<210> 13
 <211> 350
 5 <212> ADN
 <213> Gluconobacter oxydans IFO 3287

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (123)..(123)
 10 <223> nes a o c o g o t

<400> 13
 atcatcgggga ttctggggcgc cctcatggcc gccttctctga tcatcgaagg cctccacctc 60
 atcatcctcg gcggctcatg gttttacacc ctcgccggca tcgctgctggc agccagcagc 120
 gntacatga tccgtcgcaa caccctctcg acatggatcg ccctcggcct gcttggtggca 180
 acagccctgt ggtcgtcgc cgaagtcggc accagcttct ggcccagctt ctcccgcctg 240
 atcgtatttc tgtgcgtcgc cctgatcgcg accctcatgg cgccctggct cagcggcccc 300
 ggccggcgct acttcacccg ccccgtcaca ggcgccacct ccggcgccct 350

ES 2 593 811 T3

<210> 14
 < 211> 116
 < 212> PRT
 < 213> Gluconobacter oxydans IFO 3287

5 <400> 14
 Ile Ile Gly Ile Leu Gly Ala Leu Met Ala Ala Phe Leu Ile Ile Glu
 1 5 10 15
 Gly Leu His Leu Ile Ile Leu Gly Gly Ser Trp Phe Tyr Thr Leu Ala
 20 25 30
 Gly Ile Ala Leu Ala Ala Ser Ser Val Tyr Met Ile Arg Arg Asn Ile
 35 40 45
 Leu Ser Thr Trp Ile Ala Leu Gly Leu Leu Val Ala Thr Ala Leu Trp
 50 55 60
 Ser Leu Ala Glu Val Gly Thr Ser Phe Trp Pro Ser Phe Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Ile Val Phe Leu Cys Val Ala Leu Ile Ala Thr Leu Met Ala Pro Trp
 85 90 95
 Leu Ser Gly Pro Gly Arg Arg Tyr Phe Thr Arg Pro Val Thr Gly Ala
 100 105 110
 Thr Ser Gly Ala
 115

<210> 15
 < 211> 808
 < 212> ADN
 < 213> Gluconobacter oxydans IFO 3287

10 <400> 15
 gcaagctccg cgtcgcctgg acctaccgca ctggcgacat ggcgctgaac ggggccgagt 60
 tccagggcac ccccatcaag atcggcgaca cggctctatat ctgctcgccg cacaacatcg 120
 tctcggccct cgaccccgat accggcacgg aaaagtggaa gttcgacccc cacgcccaga 180
 cgaaagtctg gcagcgctgc cgcggcgctc gctactggca tgacagcacg gccacggacg 240
 ccaacgcgcc ctgcgcctcg cgcacgtcctc tcaccacgat cgacgcccgc ctcatcacca 300
 tcgacgcccg caccggccag gcctgcacgg atttcggaac gaacggcaac gtcaatctcc 360
 tgaccggcct cggcccgaca gccccgggt cctactaccg gaccgcccgc cccctcgtgg 420
 ccggtgacat cgtggtcgtc ggcgccgca tcgccgataa cgagcgcacc ggcgaaccct 480
 ccggcgtcgt ccgcggctat gacgtccgca ccggcgcgca ggtctgggcc tgggacgcca 540
 ccaacccgca tcgcggcacc acaccgctgg ccgaaggcga gatctatccc gccgaaaccc 600
 ccaacatgtg gggcaccgcc agctacgacc cgaagctcaa cctcgtcttc ttcccgtcg 660
 gcaaccagac ccccgatctt tggggcggcg accgcagcaa ggcttctgat gaatacaacg 720
 acgccttcgt cgcggtggac gccaaagacc ggcagcaacg ctggcacttc cgcaccgcca 780
 accacgacct cgtggactac gatgccac 808

15 <210> 16
 < 211> 268
 < 212> PRT
 < 213> Gluconobacter oxydans IFO 3287

ES 2 593 811 T3

<400> 16

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

Gly Ala Glu Phe Gln Gly Thr Pro Ile Lys Ile Gly Asp Thr Val Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Asn Gly Asn Val Asn Leu Leu Thr Gly Leu Gly Pro Thr Ala Pro
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 800

<212> ADN

<213> Gluconobacter oxydans IFO 3287

5

ES 2 593 811 T3

<400> 17
tcttcgtgct cgaccgccgc gacggcacc c gatcgtccc cgtggaaatg cgcaaagtcc 60
cgcaggacgg cgcaccggaa caccagtacc tcgccccga acagccctat tccgccctct 120
ccatcggaac agagcgcctg aaaccagcg atagtgggg tggtacgatt ttcgaccagc 180
tcctgtgccg catccagttc gcctcctacc gctatgaagg cgagttcacc cccgtcaacg 240
agaaacaggc caccatcatc tatccgggct attacggcgg catcaactgg ggcggcggcg 300
ccgtggatga aagcaccgga acgctgctgg tcaacgacat ccgcatggcc cagtggggca 360
agttcatgaa gcaggaagaa gcccgtcgca gcggcttcaa acccagctcg gaaggcgaat 420
attccgaaca gaaaggcacc ccctggggcg tcgtccgctc gatgttcttc tccccgccg 480
gtctcccctg cgtaaaaccg ccctatggca cgatgaacgc catcgacctg cgcagcggca 540
aggtgaaatg gagcatgccg cttggcacga tccaggacat gccggctccac ggcattggtcc 600
caggcctcgc catcccgtc ggaatgcaa ccatgagcgg cccgctggcc acccataccg 660
gcttggctctt cttctccggc acgctcgaca actacgtccg cgcgctcaac accgacaccg 720
gcgaggtcgt ctgaaagcc cgtctccccg tcgcctcaca ggcgctccg atgagctaca 780
tgtccgacaa gaccggcaaa 800

<210> 18
<211> 266
5 <212> PRT
<213> Gluconobacter oxydans IFO 3287

<400> 18
Phe Val Leu Asp Arg Arg Asp Gly Thr Pro Ile Val Pro Val Glu Met
1 5 10 15
Arg Lys Val Pro Gln Asp Gly Ala Pro Glu His Gln Tyr Leu Ala Pro
20 25 30
Glu Gln Pro Tyr Ser Ala Leu Ser Ile Gly Thr Glu Arg Leu Lys Pro
35 40 45
Ser Asp Met Trp Gly Gly Thr Ile Phe Asp Gln Leu Leu Cys Arg Ile
50 55 60
Gln Phe Ala Ser Tyr Arg Tyr Glu Gly Glu Phe Thr Pro Val Asn Glu
65 70 75 80
Lys Gln Ala Thr Ile Ile Tyr Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Ile Asn Trp
85 90 95
Gly Gly Gly Ala Val Asp Glu Ser Thr Gly Thr Leu Leu Val Asn Asp
100 105 110
Ile Arg Met Ala Gln Trp Gly Lys Phe Met Lys Gln Glu Glu Ala Arg
115 120 125
Arg Ser Gly Phe Lys Pro Ser Ser Glu Gly Glu Tyr Ser Glu Gln Lys
130 135 140

ES 2 593 811 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19

< 211> 360

5 < 212> ADN

< 213> Acetobacter sp. ATCC 15164

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (123)..(123)

10 < 223> nes a o c o g o t

<400> 19

atcatcggga ttctgggagc cctcatggcc gccttcctga tcatcgaagg cctccacctc 60

atcatcctcg gcggtcgtg gttttacacc ctgcgggca tcgcgctggc ggccagcagc 120

gntacatga tccgtcga ca tctctctg acatggatcg ccctcggcct gcttgtagca 180

acagccctgt ggtcgtcgc cgaagtcggc accagcttct ggcccagctt ctcccgcctg 240

atcgtgttcc tgtgcgtcgc cctgatcgcg actctcatgg cgccctggct cagcgcccc 300

ggccggcgct acttcaccg ccccgtcaca ggggccacct ccggcgact cggcgcatc 360

<210> 20

< 211> 120

15 < 212> PRT

< 213> Acetobacter sp. ATCC 15164

<400> 20

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

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

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

ES 2 593 811 T3

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

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

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

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

Thr Ser Gly Ala Leu Gly Ala Ile
 115 120

- <210> 21
- < 211> 760
- 5 < 212> ADN
- < 213> Acetobacter sp. ATCC 15164

<400> 21
 accgcgacaa tgtcagcaag ctccgcgtcg cctggacctta cgcaccggc gacatggcgc 60
 tgaacggcgc cgaattccag ggcacccccca tcaagatcgg cgatacggtc tataatctgct 120
 caccaccacaa catcgtctcg gccctcgacc cgcacaccgg cacggaaaag tggaagtctg 180
 acccccacgc ccagacgaaa gtctggcagc gctgcccggg cgtcggctac tggcatgaca 240
 gcacagccac ggacgccaac gcgccctgcg cctcgcgcat cgtcctcacc acgatcgacg 300
 cccgcctcat caccatcgac gcccgaccg gccaggcctg cacggatttc ggaacgaacg 360
 gcaacgtcaa tctcctgacc ggcctcggcc cgacagcccc cggctcctac taccgaccg 420
 ccgccccct cgtggcgggt gacatcgtgg tcgtcggcgg ccgcatcgcc gataacgagc 480
 gcacaggcga gccttcggc gtcgtccgcg gctacgacgt ccgcaccggc gcacaggctt 540
 gggcctggga cgccaccaac ccgcatcgcg gcaccacacc actggccgaa ggcgagatct 600
 accccgccga aacccccaac atgtggggca ccgccagcta cgaccgaaa ctcaacctcg 660
 tcttcttccc gtcggcaac cagacccccg atttctgggg cggcgaccgc agcaaggcct 720
 cggatgaata caacgacgcc ttcgtcgccc tggacgccaa 760

- 10 <210> 22
- < 211> 252
- < 212> PRT
- < 213> Acetobacter sp. ATCC 15164

<400> 22
 Arg Asp Asn Val Ser Lys Leu Arg Val Ala Trp Thr Tyr Arg Thr Gly
 1 5 10 15
 Asp Met Ala Leu Asn Gly Ala Glu Phe Gln Gly Thr Pro Ile Lys Ile
 20 25 30
 Gly Asp Thr Val Tyr Ile Cys Ser Pro His Asn Ile Val Ser Ala Leu
 35 40 45
 Asp Pro Asp Thr Gly Thr Glu Lys Trp Lys Phe Asp Pro His Ala Gln
 50 55 60

ES 2 593 811 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cebador

<400> 23
 ggcgcgatca tcgtggcttt 20

10

<210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

15

<400> 24
 gggtaaggg ccgagacgat gtt 23

20

<210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 593 811 T3

<220>
< 223> Cebador

<400> 25
gcacgctcga caactatgtc 20

5 <210> 26
< 211> 2367
< 212> ADN
< 213> Gluconobacter oxydans IFO 3244

<400> 26
atgaacagcg gccccgcac gctctccatg atcatcggga ttctgggagc cctcatggcc 60
gccttcctga tcatcgaagg cctccacctc atcatcctcg gcggctcgtg gttctacacc 120
ctcgcggca tcgcgctggc ggccagcagc gtctacatga tccgtcgcaa catcctctcg 180
acatggatcg ccctcggcct gcttgtagca acagccctgt ggtcgcctcg cgaagtcggc 240
accagcttct ggcccagctt ctcccgcctg atcgtgttcc tgtgcgtcgc cctgatcgcg 300
actctcatgg cgccctggct cagcggcccc ggccggcgct acttcacccg ccccgtcaca 360
ggggccacct ccggcgcact cggcgccatc atcgtggctt tcctcgcggg catgttccgg 420
gtccacccga ccatcgcccc gcaggacacc acccaccgc aggaaaccgc gtccaccgcc 480
gactccgacc agcccggcca tgactggccc gcctatggcc gcacagcttc cggcacgcgc 540
tacgccagct tcacacagat caaccgcgac aatgtcagca agctccgcgt cgcctggacc 600
taccgcaccg gcgacatggc gctgaacggc gccgaattcc agggcacccc catcaagatc 660
ggcgatacgg tctatatctg ctaccccac aacatcgtct cggccctcga ccccgacacc 720
ggcacggaaa agtgggaagt cgacccccac gccagacga aagtctggca gcgctgccgc 780
ggcgtcggct actggcatga cagcacagcc acggacgcca acgcgccctg cgcctcgcgc 840
atcgtcctca ccacgatcga cgcccgcctc atcaccatcg acgcccgcac cggccaggcc 900
tgcacggatt tcggaacgaa cggcaacgtc aatctcctga ccggcctcgg cccgacagcc 960
cccggctcct actacccgac cgccgcccc ctcgtggcgg gtgacatcgt ggtcgtcggc 1020
ggccgcatcg ccgataacga gcgcacaggc gagccttccg gcgtcgtccg cggctacgac 1080
gtccgcaccg gcgcacaggt ctgggcctgg gacgccacca accgcatcg cggcaccaca 1140
ccactggccg aaggcgagat ctaccccgcc gaaaccccca acatgtgggg caccgccagc 1200
tacgaccga aactcaacct cgtcttcttc ccgctcggca accagacccc cgatttctgg 1260
ggcggcgacc gcagcaaggc ctcggatgaa tacaacgacg ccttcgtcgc cgtggacgcc 1320
aaaaccggcg acgaacgctg gcaactccgc accgccaacc acgatctcgt ggactacgat 1380
gccacggccc agcccatcct ctacgacatt ccggacggcc atggcggcac ccgcccggcg 1440
atcatcgcca tgaccaagcg cggccagatc ttcgtgctcg accgccgca cggcaccg 1500
atcgtccccg tgaaaatgcg caaagtcccc caggacggcg caccggaaca ccagtacct 1560
gccccgaac agccctattc cgccctctcc atcggaacag agcgcctgaa acccagcgat 1620
atgtggggcg gcacgatctt cgaccagctc ctgtgccgca tccagttcgc ctctaccgc 1680
tatgaaggcg agttcaccac cgtcaacgag aagcaggcca ccatcatcta tccgggctat 1740
tacggcggca tcaactgggg cggcggcgcc gtggatgaaa gcaccggaac gctgctggtc 1800
10 aacgacatcc gcatggccca gtggggcaag ttcatgaagc aagaagaagc ccgcccagc 1860

ES 2 593 811 T3

ggcttcaaac ccagctcgga aggcgaatat tccgaacaga aaggcacccc ctggggcgtc 1920
 gtccgctcga tgttcttctc ccccgccggt ctccccctgcg tgaaaccgcc ctatggcacg 1980
 atgaacgcca tcgacctgcg cagcggcaag gtcaaatgga gcatgccgct tggcacgac 2040
 caggacatgc cgggccacgg catgggtcccc ggccctcgcca tcccgctcgg aatgccgacc 2100
 atgagcggcc cgctggccac ccataccggc ctgggtcttct tctccggcac gctcgacaac 2160
 tatgtccgcg cgctcaacac cgacaccggc gaagtcgtct ggaaagcccg tctccccgct 2220
 gcctcacagg ccgctccgat gagctacatg tccgacaaga ccggcaaaca gtacatcgtc 2280
 gtcaccgcag gcggcctgac ccgctccggc gtcgacaaaa accgcggcga ctacgtcatc 2340
 gcctacgccc tgccctccga agaataa 2367

<210> 27

<211> 788

5 <212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans IFO 3244

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 593 811 T3

	195					200						205			
Asn	Gly 210	Ala	Glu	Phe	Gln	Gly 215	Thr	Pro	Ile	Lys	Ile 220	Gly	Asp	Thr	Val
Tyr	Ile	Cys	Ser	Pro	His 230	Asn	Ile	Val	Ser	Ala 235	Leu	Asp	Pro	Asp	Thr 240
Gly	Thr	Glu	Lys	Trp 245	Lys	Phe	Asp	Pro	His 250	Ala	Gln	Thr	Lys	Val 255	Trp
Gln	Arg	Cys	Arg 260	Gly	Val	Gly	Tyr	Trp 265	His	Asp	Ser	Thr	Ala 270	Thr	Asp
Ala	Asn	Ala 275	Pro	Cys	Ala	Ser	Arg 280	Ile	Val	Leu	Thr	Thr 285	Ile	Asp	Ala
Arg	Leu 290	Ile	Thr	Ile	Asp	Ala 295	Arg	Thr	Gly	Gln	Ala 300	Cys	Thr	Asp	Phe
Gly	Thr	Asn	Gly	Asn	Val 310	Asn	Leu	Leu	Thr	Gly 315	Leu	Gly	Pro	Thr	Ala 320
Pro	Gly	Ser	Tyr	Tyr 325	Pro	Thr	Ala	Ala	Pro 330	Leu	Val	Ala	Gly	Asp 335	Ile
Val	Val	Val	Gly 340	Gly	Arg	Ile	Ala	Asp 345	Asn	Glu	Arg	Thr	Gly 350	Glu	Pro
Ser	Gly	Val 355	Val	Arg	Gly	Tyr	Asp 360	Val	Arg	Thr	Gly	Ala 365	Gln	Val	Trp
Ala	Trp 370	Asp	Ala	Thr	Asn	Pro 375	His	Arg	Gly	Thr	Thr 380	Pro	Leu	Ala	Glu
Gly	Glu	Ile	Tyr	Pro	Ala 390	Glu	Thr	Pro	Asn	Met 395	Trp	Gly	Thr	Ala	Ser 400
Tyr	Asp	Pro	Lys	Leu 405	Asn	Leu	Val	Phe	Phe 410	Pro	Leu	Gly	Asn	Gln 415	Thr
Pro	Asp	Phe	Trp 420	Gly	Gly	Asp	Arg	Ser 425	Lys	Ala	Ser	Asp	Glu 430	Tyr	Asn
Asp	Ala	Phe 435	Val	Ala	Val	Asp	Ala 440	Lys	Thr	Gly	Asp	Glu 445	Arg	Trp	His
Phe	Arg 450	Thr	Ala	Asn	His	Asp 455	Leu	Val	Asp	Tyr	Asp 460	Ala	Thr	Ala	Gln
Pro	Ile	Leu	Tyr	Asp	Ile 470	Pro	Asp	Gly	His	Gly 475	Gly	Thr	Arg	Pro	Ala 480
Ile	Ile	Ala	Met	Thr 485	Lys	Arg	Gly	Gln	Ile 490	Phe	Val	Leu	Asp	Arg 495	Arg
Asp	Gly	Thr	Pro	Ile	Val	Pro	Val	Glu	Met	Arg	Lys	Val	Pro	Gln	Asp

ES 2 593 811 T3

500 505 510

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Glu Glu
785

<210> 28

< 211> 30

< 212> ADN

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 28

ccgaattcag gccgaacagc agcaggtcac 30

ES 2 593 811 T3

<210> 29
< 211> 30
< 212> ADN
< 213> Artificial

5 <220>
< 223> Cebador

<400> 29
gtgcctgggt acctcgggtg aggtcatgaa 30

10 <210> 30
< 211> 30
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador

15 <400> 30
aagtcatatg aacagcggcc cccgcacgct 30

<210> 31
< 211> 30
< 212> ADN
20 < 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador

<400> 31
atctcgagtt ctcggaggg cagggcgtag 30

25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de un microorganismo seleccionado de *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* o *Escherichia* capaz de expresar L-sorbose deshidrogenasa como una forma activa in vivo y capaz de convertir directamente la L-sorbose en vitamina C, en donde dicho microorganismo se modifica genéticamente introduciendo más de 1 copia de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa capaz de convertir directamente la L-sorbose en ácido L-ascórbico, seleccionándose dicho polinucleótido del grupo que consiste en:
- 5 (a) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 2, 12, 14, 16, 18, 20, 22 o 27;
- 10 (b) polinucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 1, 11, 13, 15, 17, 19, 21 o 26;
- (c) polinucleótidos cuya cadena complementaria hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido como se define en uno cualquiera de (a) a (b); y
- 15 (d) polinucleótidos que comparten al menos 80% de homología con una cadena de al menos 100 nucleótidos consecutivos del polinucleótido según la SEQ ID NO: 1.
2. Procedimiento para la conversión directa de L-sorbose en vitamina C usando un microorganismo obtenido por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- (i) cultivar el microorganismo en condiciones adecuadas a una densidad celular de al menos aproximadamente 10 medida como densidad óptica a 600 nm;
- 20 (ii) reducción de la velocidad de crecimiento a una cantidad menor de $0,02 \text{ h}^{-1}$; y
- (iii) conversión de L-sorbose en ácido L-ascórbico.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en donde la vitamina C se aísla del medio de producción.
4. Un procedimiento para aumentar la relación entre la vitamina C y el ácido 2-ceto-L-gulónico producido a partir de L-sorbose en un microorganismo que produce vitamina C, en donde células en reposo del microorganismo obtenido por el procedimiento según la reivindicación 1, se cultivan en condiciones adecuadas y en donde la relación entre la concentración de ácido L-ascórbico y ácido 2-ceto-L-gulónico es más de 0,1 medido en una reacción de células en reposo.
- 25 5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Gluconobacter*.
- 30 6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en donde el microorganismo se selecciona de *Gluconobacter oxydans*.
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa capaz de convertir directamente la L-sorbose en ácido L-ascórbico es expresado en exceso en dicho microorganismo.
- 35 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en donde dicho microorganismo comprende más de 1 copia del polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de L-sorbose deshidrogenasa capaz de convertir directamente la L-sorbose en ácido L-ascórbico, en donde dichas copias se clonan en un plásmido o integran en un cromosoma.
- 40 9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el rendimiento de ácido L-ascórbico producido por dicho microorganismo genéticamente modificado es al menos 1,8 g/l.