

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 335**

51 Int. Cl.:

C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2012 PCT/EP2012/063994**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13011018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2012 E 12735553 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2734631**

54 Título: **Oxidación y aminación de alcoholes primarios**

30 Prioridad:

20.07.2011 EP 11174729
05.08.2011 EP 11006458
09.01.2012 EP 12150451

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2017

73 Titular/es:

EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE

72 Inventor/es:

PÖTTER, MARKUS;
HAAS, THOMAS;
PFEFFER, JAN, CHRISTOPH;
SKERRA, ARNE;
KROUTIL, WOLFGANG;
LERCHNER, ALEXANDRA;
SATTLER, JOHANN, H.;
SCHAFFER, STEFFEN y
TAUBER, KATHARINA, CHRISTIN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 604 335 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

Oxidación y aminación de alcoholes primarios

La presente invención se refiere a un procedimiento para la oxidación de alcoholes, que comprende los pasos

a) puesta a disposición de un alcohol primario de la fórmula



siendo seleccionado R^1 a partir del grupo que comprende -OH, -SH, -NH₂ y -COOR², siendo x al menos 3, y siendo seleccionado R^2 a partir del grupo que comprende H, alquilo y arilo,

10 b) oxidación del alcohol primario mediante puesta en contacto con una alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)⁺, y

c) puesta en contacto del producto de oxidación del paso a) con una transaminasa,

tratándose en el caso de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)⁺, y/o de la transaminasa, de un enzima recombinante o aislado, y al empleo de tal catalizador de célula completa para la oxidación de un alcohol primario.

15 Las poliamidas son una clase de polímeros que están caracterizados por grupos amida recurrentes. A diferencia de las proteínas análogas desde el punto de vista químico, el concepto „poliamidas“ se refiere habitualmente a materiales sintéticos termoplásticos, disponibles en el comercio. Las poliamidas se derivan de aminas primarias o de aminas secundarias, que se obtienen convencionalmente en el craqueo de hidrocarburos. No obstante, también se pueden emplear derivados, más exactamente ácidos aminocarboxílicos, lactamas y diaminas, para la obtención de polímeros. Además son de interés alcanos gaseosos de cadena corta como eductos, que se pueden obtener
20 partiendo de materias primas regenerativas con procedimientos biotecnológicos.

Muchas poliamidas muy demandadas comercialmente se obtienen partiendo de lactamas. Por ejemplo, se puede obtener "poliamida 6" mediante polimerización de ε-Caprolactam, y "poliamida 12" mediante polimerización de laurilactama. Muchos productos interesantes comercialmente comprenden copolímeros de lactama, por ejemplo copolímeros de ε-caprolactama y laurilactama.

25 La obtención químico-técnica convencional de aminas no es eficiente, dependiente del abastecimiento de materias primas fósiles, y en este caso se producen grandes cantidades de productos secundarios no deseados, en algunos pasos de síntesis hasta un 80 %. Un ejemplo de tal proceso constituye la obtención de laurilactama, que se obtiene convencionalmente mediante trimerización de butadieno. El producto de trimerización ciclododecatrieno se hidrogena, y el ciclododecano resultante de ello se oxida para dar ciclodecanona, que se hace reaccionar a
30 continuación con hidroxilamina para dar ciclododecanoxina, que se transforma finalmente en laurilactama a través de una transposición de Beckmann.

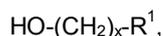
Teniendo presentes estos inconvenientes se desarrollaron procedimientos para obtener aminas bajo empleo de biocatalizadores, partiendo de materias primas regenerativas. El documento PCT/EP 2008/067447 describe un sistema biológico para la obtención de productos análogos químicamente, más exactamente ácidos ω-aminocarboxílicos, bajo empleo de una célula que presenta una serie de actividades enzimáticas apropiadas, y que es apta para transformar ácidos carboxílicos en los correspondientes ácidos ω-aminocarboxílicos. No obstante, un inconveniente conocido del sistema de oxidasa AlkBGT de *Pseudomonas putida* GPO1 empleado en este caso consiste en que no es apto para producir una oxidación selectiva de alcanos alifáticos para dar alcoholes primarios. Más bien se forma una pluralidad de productos de oxidación; en especial aumenta la proporción de productos más altamente oxidados, como el correspondiente aldehído, la correspondiente cetona o el correspondiente ácido carboxílico, con tiempo de reacción creciente (C. Grant, J. M. Woodley and F. Baganz (2011), Enzyme and Microbial Technology 48, 480-486), lo que reduce correspondientemente el rendimiento en la amina deseada.

45 En este contexto, la tarea que motiva la invención consiste en poner a disposición un procedimiento mejorado para la oxidación de alcoholes bajo empleo de biocatalizadores. Otra tarea consiste en mejorar el procedimiento en el sentido de que se aumente el rendimiento y/o se reduzca la concentración de productos secundarios. Finalmente existe demanda de un procedimiento que permita la obtención de poliamidas o eductos para su obtención a base de materias primas regenerativas.

Ésta y otras tareas se solucionan mediante el objeto de la presente solicitud, y en especial también mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas, resultando formas de realización de las reivindicaciones subordinadas.

5 Según la invención, en un primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento para la oxidación de alcoholes, que comprende los pasos

a) puesta a disposición de un alcohol primario de la fórmula



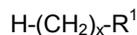
10 siendo seleccionado R^1 a partir del grupo que comprende -OH, -SH, -NH₂ y -COOR², siendo x al menos 3, y siendo seleccionado R^2 a partir del grupo que comprende H, alquilo y arilo,

b) oxidación del alcohol primario mediante puesta en contacto con una alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)^+ , y

c) puesta en contacto del producto de oxidación del paso a) con una transaminasa,

15 tratándose en el caso de la NAD(P)^+ -alcohol deshidrogenasa y/o de la transaminasa, de un enzima recombinante o aislado.

En una primera forma de realización del primer aspecto, el paso a) se efectúa mediante hidroxilación de un alcano de la fórmula



20 mediante una monooxigenasa, que es preferentemente recombinante o está aislada.

En una segunda forma de realización del primer aspecto, que constituye también una forma de realización de la primera forma de realización, en el caso de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)^+ se trata de una alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)^+ con al menos un átomo de cinc como cofactor.

25 En una tercera forma de realización del tercer aspecto, que constituye una forma de realización de la segunda forma de realización, en el caso de la alcohol deshidrogenasa se trata de la alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* (código de banco de datos P42328), o de una variante de la misma.

En una cuarta forma de realización del primer aspecto, que constituye una forma de realización de la primera a la tercera forma de realización, la monooxigenasa se selecciona a partir del grupo que comprende AlkBGT de *Pseudomonas putida*, Cytochrom P450 de *Candida tropicalis* o de *Cicer arietinum*.

30 En una quinta forma de realización del primer aspecto, que constituye también una forma de realización de la primera a la cuarta forma de realización, la transaminasa se selecciona a partir del grupo de transaminasas y sus variantes, que están caracterizadas por que presentan un aminoácido seleccionado a partir del grupo que comprende isoleucina, valina, fenilalanina, metionina y leucina en la posición de la secuencia de aminoácidos que corresponde a Val224 de la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695), y un aminoácido diferente a treonina, y preferentemente un aminoácido del grupo que comprende serina, cisteína, glicina y alanina en la posición de la secuencia de aminoácidos que corresponde a Gly230 de la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695).

35 En una sexta forma de realización del primer aspecto, que constituye también una forma de realización de la primera a la quinta forma de realización, el paso b) y/o paso c) se lleva a cabo en presencia de una alanindeshidrogenasa aislada o recombinante, y una fuente de nitrógeno inorgánica.

40 En una séptima forma de realización del primer aspecto, que también constituye una forma de realización de la primera a la séptima forma de realización, al menos un enzima del grupo que comprende alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)^+ , transaminasa, monooxigenasa y alanindeshidrogenasa, es recombinante y se pone a disposición en forma de un catalizador de célula completa, que presenta el correspondiente enzima.

En una octava forma de realización del primer aspecto, que constituye una forma de realización de la séptima forma de realización, todos los enzimas se ponen a disposición en forma de un o más de un catalizador de célula completa, presentando preferentemente un catalizador de célula completa todos los enzimas necesarios.

- 5 En una novena forma de realización del primer aspecto, que también constituye una forma de realización de la primera a la octava forma de realización, en el paso b), preferentemente en el paso b) y c), está presente un codisolvente orgánico, que presenta un logP de más de -1,38, preferentemente 0 a 1,2.

En una décima forma de realización del primer aspecto, que constituye una forma de realización de la novena forma de realización, el codisolvente se selecciona a partir del grupo que comprende ácidos grasos insaturados, preferentemente ácido oleico.

- 10 En una undécima forma de realización del cuarto aspecto, que constituye una forma de realización preferente de la novena forma de realización, en el caso del codisolvente se trata de un compuesto de la fórmula $R^3-O-(CH_2)_x-O-R^4$, seleccionándose R^3 y R^4 respectivamente, y de modo independiente entre sí, a partir del grupo que comprende metilo, etilo, propilo y butilo, y siendo x 1 a 4, siendo R^3 y R^4 metilo en cada caso, de modo independiente entre sí, y siendo x 2.

- 15 En una duodécima forma de realización del primer aspecto, que constituye una forma de realización preferente de la novena forma de realización, el codisolvente se selecciona a partir del grupo que comprende dialquiléteres, y es preferentemente dimetiléter. En un segundo aspecto, la tarea se soluciona según la invención mediante el empleo del catalizador de célula completa que presenta una alcohol deshidrogenasa dependiente de $NAD(P)^+$, preferentemente con al menos un átomo de cinc como cofactor, una transaminasa, opcionalmente una monooxigenasa, y opcionalmente una alanindeshidrogenasa, tratándose, en el caso de los enzimas, de enzimas recombinantes, para la oxidación y aminación de un alcohol primario de la fórmula $HO-(CH_2)_x-R^1$, seleccionándose R^1 a partir del grupo que comprende -OH, -SH, -NH₂ y -COOR², siendo x al menos 3, y seleccionándose R^2 a partir del grupo que comprende H, alquilo y arilo.

- 25 En una primera forma de realización del segundo aspecto, que constituye una forma de realización de la primera forma de realización, el empleo comprende además la presencia de un codisolvente orgánico, que presenta un logP de más de -1,38, preferentemente 0 a 1,2, y es preferentemente dimetiléter.

En una segunda forma de realización del segundo aspecto, que constituye una forma de realización de la segunda forma de realización, el codisolvente es seleccionado a partir del grupo que comprende ácidos grasos insaturados, y es preferentemente ácido oleico.

- 30 Otras formas de realización del segundo aspecto comprenden todas las formas de realización del primer aspecto de la presente invención.

Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que existe un grupo de alcohol deshidrogenasas que se pueden emplear para efectuar una oxidación de alcoholes primarios bajo formación de cantidades reducidas de productos secundarios.

- 35 Además, los inventores han descubierto sorprendentemente que existe una cascada de actividades enzimáticas con las que se pueden aminorar alcoholes sin formación de productos secundarios digna de mención, bajo empleo de biocatalizadores, no debiéndose añadir ni evacuar equivalentes de reducción.

- 40 Además, los inventores han descubierto sorprendentemente un procedimiento con el que se pueden obtener poliamidas de manera inesperada bajo empleo de un catalizador de célula completa, y partiendo de materias primas regenerativas.

Además, los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que la aminación de alcoholes primarios tras oxidación previa se puede llevar a cabo de modo especialmente ventajoso con un grupo de transaminasas caracterizado por propiedades secuenciales determinadas.

- 45 Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que, en un sistema para la oxidación y aminación de alcoholes primarios, que comprende una alcohol deshidrogenasa, una transaminasa y una alanindeshidrogenasa, es ventajoso el empleo de una alcohol deshidrogenasa diferente a una de tipo AlkJ, en especial el empleo de una alcohol deshidrogenasa dependiente de $NAD(P)^+$, respecto al rendimiento del procedimiento, en especial en el caso de puesta en práctica bajo empleo de un catalizador de célula completa.

El procedimiento según la invención se puede aplicar a un gran número de alcoholes relevantes industrialmente. En una forma de realización preferente, en este caso se trata de un ácido ω -hidroxicarboxílico o de un éster del mismo, preferentemente éster metílico, que se oxida y se amina para dar un ácido ω -aminocarboxílico. En otra forma de realización, se trata de un diol, que se oxida y se amina para dar una diamina. En otra forma de realización preferente, en el caso del alcohol primario se trata de una hidroxialquilamina. La longitud de la cadena de carbono es variable en este caso, y x asciende al menos a 3. La cadena de carbono presenta preferentemente más de tres átomos de carbono, es decir, $x = 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20$ o más. Los compuestos ejemplares comprenden ácido ω -hidroxiláurico, ω -hidroxilaurato de metilo, y alcanodiolos, en especial 1,8-octanodiol y 1,10-decanodiol.

En una forma de realización especialmente preferente, R^1 se selecciona a partir del grupo que comprende -OH y -COOR², x es al menos 11, y R^2 se selecciona a partir del grupo que comprende H, metilo, etilo y propilo. En una de las más preferentes formas de realización, en el caso del alcohol primario se trata de un éster metílico de ácido ω -hidroxigraso.

Según la invención, en el paso b) del procedimiento se emplean alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD(P)⁺ para la oxidación del alcohol primario. En este caso, como en el caso de todos los polipéptidos con actividad enzimática empleados según la invención, se puede tratar de células que comprenden polipéptidos con actividad enzimática o sus productos de lisis, o preparaciones de polipéptidos en todas las etapas de purificación, del producto de lisis crudo al polipéptido puro. Por el especialista en el sector son conocidos numerosos procedimientos con los que se pueden sobreexpresar y purificar, o bien aislar, polipéptidos con actividad enzimática en células apropiadas. De este modo, para la expresión de los polipéptidos se pueden emplear todos los sistemas de expresión disponibles para el especialista. Para la purificación entran en consideración procedimientos cromatográficos, a modo de ejemplo la purificación por cromatografía de afinidad de una proteína recombinante provista de Tag, bajo empleo de un ligando inmovilizado, a modo de ejemplo un ion níquel en el caso del Tag de histidina, de glutatión inmovilizado en el caso de una glutatión-S-transferasa fusionada en la proteína objetivo, o de maltosa inmovilizada en el caso de un Tag que comprende proteína enlazante de maltosa.

Los polipéptidos con actividad enzimática purificados se pueden emplear en forma soluble o inmovilizados. Por el especialista son conocidos procedimientos apropiados con los que se pueden inmovilizar polipéptidos en fases sólidas orgánicas o inorgánicas mediante enlace covalente o no covalente, a modo de ejemplo mediante química de copulación de sulfhidrilo (por ejemplo kits de la firma Pierce).

En una forma de realización preferente, en el caso de la célula empleada como catalizador de célula completa, o en el caso de la célula empleada como sistema de expresión, se trata de una célula procariota, preferentemente bacteriana. En otra forma de realización preferente se trata de una célula de mamífero. En otra forma de realización preferente se trata de una célula eucariota inferior, preferentemente una célula de levadura. Las células procariotas ejemplares comprenden *Escherichia*, especialmente *Escherichia coli*, y cepas de la especie *Pseudomonas* y *Corynebacterium*. Las células eucariotas inferiores ejemplares comprenden las especies *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Schizosaccharomyces*, especialmente las cepas *Candida tropicalis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En una forma de realización especialmente preferente, en el caso de la alcohol deshidrogenasa se trata de una alcohol deshidrogenasa que contiene cinc, dependiente de NAD(P)⁺, es decir, el enzima con actividad catalítica comprende al menos un átomo de cinc como cofactor, que está unido al polipéptido mediante enlace covalente a través de un motivo secuencial característico que comprende restos cisteína. En una forma de realización especialmente preferente, en el caso de la alcohol deshidrogenasa se trata de la alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* (código de banco de datos P42328), o una variante de la misma.

La enseñanza de la presente invención se puede realizar no solo bajo empleo de las secuencias exactas de aminoácidos o ácidos nucleicos de las macromoléculas biológicas aquí descritas, sino también bajo empleo de variantes de tales macromoléculas, que se pueden obtener mediante delección, adición o sustitución de un o más de un aminoácido o ácidos nucleicos. En una forma de realización preferente, el concepto "variante" de una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos, empleado a continuación como sinónimo y término intercambiable con el concepto "homólogo", como se usa en este caso, significa otra secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que, respecto a la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de tipo salvaje original, presenta una homología, en este caso empleada como sinónimo de identidad, de un 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98, 99 % o un porcentaje superior, estando sometidos a delección o sustituidos preferentemente aminoácidos diferentes a los que forman el centro catalíticamente activo, o aminoácidos esenciales para la estructura o el pliegue, o estando estos últimos sustituidos únicamente de modo convencional, a modo de ejemplo un glutamato en lugar de un aspartato, o una leucina en lugar de una valina. El estado de la técnica describe algoritmos que se pueden emplear para calcular la medida de homología de dos secuencias, por ejemplo Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, 3ª edición. En otra forma más preferente de realización de la presente invención, la variante de una

5 secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos, de modo preferente adicionalmente a la homología secuencial citada anteriormente, presenta esencialmente la misma actividad enzimática que la molécula de tipo salvaje, o bien la molécula original. Por ejemplo, una variante de un polipéptido con actividad enzimática como proteasa presenta la misma, o esencialmente la misma actividad proteolítica que el enzima polipeptídico, es decir, la capacidad de catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico. En una forma de realización especial, el concepto "esencialmente la misma actividad enzimática" significa una actividad respecto a los sustratos del polipéptido de tipo salvaje, que se sitúa claramente por encima de la actividad básica y/o se diferencia en menos de 3, preferentemente 2, de modo aún más preferente un orden de magnitud de los valores K_M - y/o k_{cat} , que presenta el polipéptido de tipo salvaje respecto a los mismos sustratos. En otra forma de realización preferente, el concepto "variante" de una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos comprende al menos una parte activa/o fragmento activo de la secuencia de ácidos nucleicos, o bien aminoácidos. En otra forma de realización preferente, el concepto "parte activa", como se emplea en este caso, significa una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una longitud menor que la longitud completa de la secuencia de aminoácidos, o bien codifica para una longitud de secuencia de aminoácidos menor que la longitud completa, presentando la secuencia de aminoácidos, o la secuencia de aminoácidos codificada con longitud menor que la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje, esencialmente la misma actividad enzimática que el polipéptido de tipo salvaje, o una variante del mismo, a modo de ejemplo como alcohol deshidrogenasa, monooxigenasa o transaminasa. En una forma de realización especial, el concepto "variante" de un ácido nucleico comprende un ácido nucleico cuya hebra complementaria, preferentemente bajo condiciones estrictas, se une al ácido nucleico de tipo salvaje. La severidad de la reacción de hibridación es fácilmente determinable por el especialista, y depende en general de la longitud de la sonda, de las temperaturas en el lavado y de la concentración de sales. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para la hibridación, mientras que muestras más cortas tienen suficiente con bajas temperaturas. Que tenga lugar una hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para anelar hebras complementarias, que están presentes en su entorno, y precisamente por debajo de la temperatura de fusión. La severidad de la reacción de hibridación y las correspondientes condiciones se describen detalladamente en Ausubel *et al.* 1995. En una forma de realización preferente, el concepto "variante" de un ácido nucleico, como se emplea en este caso, comprende cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la misma secuencia de aminoácidos que el ácido nucleico original, o una variante de esta secuencia de aminoácidos, en el ámbito de la degeneración del código genético.

30 Las alcohol deshidrogenasas constituyen una clase de enzimas muy considerada desde hace décadas en bioquímica en relación con procesos de fermentación técnicos de cervecaría, y altamente relevante desde el punto de vista biotecnológico, que comprende diversos grupos de isoformas. De este modo, existen alcohol deshidrogenasas unidas a membrana, dependientes de flavina, de *Pseudomonas putida* GPO1 tipo AlkJ, que emplean flavo cofactores en lugar de $NAD(P)^+$. Otro grupo comprende alcohol deshidrogenasas que contienen hierro, sensibles frente a oxígeno, que se encuentran en bacterias y en levaduras en forma inactiva. Otro grupo comprende alcohol deshidrogenasas dependientes de $NAD(P)^+$, entre éstas alcohol deshidrogenasas que contienen cinc, en las que el centro activo presenta un átomo de cinc coordinado con cisteína, que foja el sustrato alcohólico. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "alcohol deshidrogenasa", como se emplea en este caso, se entiende un enzima que oxida un aldehído, o bien una cetona, para dar el correspondiente alcohol primario, o bien secundario. En el procedimiento según la invención, en el caso de la alcohol deshidrogenasa se trata de una alcohol deshidrogenasa dependiente de $NAD(P)^+$, es decir, una alcohol deshidrogenasa que emplea $NAD(P)^+$ como cofactor para la oxidación del alcohol, o bien $NAD(P)H$ para la reducción del correspondiente aldehído, o bien de la correspondiente cetona. En la forma de realización más preferente, en el caso de la alcohol deshidrogenasa se trata de una alcohol deshidrogenasa dependiente de $NAD(P)^+$, que contiene cinc. En una forma de realización preferente, el concepto "alcohol deshidrogenasa dependiente de $NAD(P)^+$ ", como se emplea en este caso, designa una alcohol deshidrogenasa que es dependiente de NAD^+ y/o $NADP^+$.

Según la invención, en el paso c) se emplea una transaminasa. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "transaminasa", como se emplea en este caso, se entiende un enzima que cataliza la transferencia de grupos α -amino de un ácido donador, preferentemente un aminoácido, a una molécula aceptora, preferentemente un ácido α -cetocarboxílico. En una forma de realización preferente, la transaminasa se selecciona a partir del grupo de transaminasas y sus variantes, que están caracterizadas por que, en la posición de la secuencia de aminoácidos que corresponde a Val224 de la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695), presentan un aminoácido seleccionado a partir del grupo que comprende isoleucina, valina, fenilalanina, metionina y leucina, y, en la posición de la secuencia de aminoácidos que corresponde a Gly230 de la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695), presenta un aminoácido diferente a treonina, y preferentemente un aminoácido del grupo que comprende serina, cisteína, glicina y alanina. En una forma de realización especialmente preferente, la transaminasa se selecciona a partir del grupo que comprende ω -transaminasa de *Chromobacterium violaceum* DSM30191, transaminasa de *Pseudomonas putida* W619, de *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Streptomyces coelicolor* A3(2) y *Streptomyces avermitilis* MA 4680.

En una forma de realización preferente, el concepto "posición que corresponde a la posición X de la secuencia de aminoácidos de la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472", como se emplea en este caso, significa que la correspondiente posición en una alineación de la molécula investigada parece homóloga a la posición X de la secuencia de aminoácidos de la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. El especialista conoce numerosos paquetes software y algoritmos con los que se puede elaborar una alineación de secuencias de aminoácidos. Procedimientos con paquete software ejemplares comprenden el paquete ClustalW (Larkin *et al.*, 2007; Goujon *et al.* 2010), puesto a disposición por EMBL, o se presentan y se describen en Arthur M. Lesk (2008), Introduction to Bioinformatics, 3ª edición.

En el caso de los enzimas empleados según la invención se trata preferentemente de enzimas recombinantes. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "recombinante", como se emplea en este caso, se entiende que la correspondiente molécula de ácido nucleico no se presenta en la naturaleza y/o se obtuvo bajo empleo de métodos de técnica genética. En una forma de realización preferente se habla de una proteína recombinante si el correspondiente polipéptido está codificado por un ácido nucleico recombinante. En una forma de realización preferente, se entiende por una célula recombinante, como se emplea en este caso, una célula que presenta al menos un ácido nucleico recombinante o un polipéptido recombinante. Por el especialista son conocidos procedimientos apropiados para la obtención de moléculas o células recombinantes, a modo de ejemplo los descritos en Sambrook *et al.*, 1989.

La enseñanza según la invención se puede realizar tanto bajo empleo de enzimas aislados, como también bajo empleo de catalizadores de célula completa. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "catalizador de célula completa", como se emplea en este caso, se entiende una célula intacta, viable y metabólicamente activa, que pone a disposición una actividad enzimática deseada. El catalizador de célula completa puede transportar el sustrato a metabolizar, en el caso de la presente invención el alcohol, o el producto de oxidación formado a partir del mismo, bien al interior de la célula donde se metaboliza por enzimas citosólicos, o puede presentar el enzima de interés en su superficie, donde está directamente expuesto frente a sustratos en el medio. Por el especialista son conocidos numerosos sistemas para la obtención de catalizadores de célula completa, a modo de ejemplo por el documento DE 60216245.

Para una serie de aplicación se recomienda el empleo de enzimas aislados. En una forma de realización preferente, el concepto "aislado", como se emplea en este caso, significa que el enzima se presenta en forma más pura y/o más concentrada que en su fuente natural. En una forma de realización preferente, el enzima se considera aislado si es un enzima polipeptídico y constituye más de un 60, 70, 80, 90 o preferentemente un 95 % de la fracción de proteína másica de la correspondiente preparación. Por el especialista son conocidos numerosos procedimientos para la medida de la masa de una proteína en una disolución, a modo de ejemplo la estimación visual por medio del grosor de correspondientes bandas proteicas en geles de SDS-poliacrilamida, espectroscopía NMR o procedimientos basados en espectrometría de masas.

Las reacciones catalizadas por vía enzimática del procedimiento según la invención se realizan típicamente en un disolvente o en una mezcla de disolventes con proporción de agua elevada, preferentemente en presencia de un sistema tampón apropiado para el ajuste de un valor de pH compatible con la actividad enzimática. No obstante, en el caso de eductos hidrófobos, en especial en el caso de alcoholes con una cadena de carbono que comprende más de tres átomos de carbono, es ventajosa la presencia adicional de un codisolvente orgánico, que puede mediar el contacto del enzima con el sustrato. El codisolvente, o más de un codisolventes, se presenta en una proporción total en la mezcla de disolventes de, o menos de un 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o un 5 por ciento en volumen.

La hidrofobicidad del codisolvente juega un papel importante en este caso. Ésta se puede representar mediante el logP, el logaritmo decádico de coeficientes de distribución de n-octanol-agua. Un codisolvente apropiado presenta un logP de más de -1,38, de modo más preferente de -1 a +2, de modo aún más preferente de 0 a 1,5.

El coeficiente de distribución n-octanol-agua K^{ow} o P es un coeficiente de distribución adimensional, que indica la proporción de las concentraciones de una sustancia en un sistema bifásico constituido por 1-octanol y agua (véase J. Sangster, Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, Vol. 2 of Wiley Series in Solution Chemistry, John Wiley & Sons, Chichester, 1997). Más exactamente, el K^{ow} o P designa la proporción de la concentración de sustancia en la fase rica en octanol respecto a su concentración en la fase rica en agua.

El valor K^{ow} es una medida modelo para la proporción entre lipofilia (solubilidad en grasas) e hidrofilia (solubilidad en agua) de una sustancia. Existe la expectativa de poder estimar también los coeficientes de distribución de esta sustancia en otros sistemas con una fase acuosa con ayuda del coeficiente de distribución de una sustancia en el sistema octanol-agua. K^{ow} es mayor que uno si una sustancia es más soluble en disolventes similares a grasas, como n-octanol, menor que uno si es más soluble en agua. Correspondientemente, Log P es positivo para

5 substancias lipófilas y negativo para substancias hidrófilas. Ya que no se puede medir el K^{OW} para todos los productos químicos, existen los más diversos métodos para la predicción, por ejemplo mediante relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR), o mediante relaciones de energía libre lineales (LFER), a modo de ejemplo descritas en Eugene Kellogg G, Abraham DJ: Hydrophobicity: is LogP(o/w) more than the sum of its parts?. Eur J Med Chem. 2000 Jul-Aug;35(7-8):651-61 o Gudrun Wienke, "Messung und Vorausberechnung von n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten", Doktorarbeit, Univ. Oldenburg, 1-172, 1993.

En el ámbito de la presente invención, logP se determina según el método de Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, por medio del módulo de programa ACD/LogP DB.

10 Un codisolvente preferente presenta un logP de más de -1,38, más preferentemente de -1 a +2, de modo aún preferente de -0,75 a 1,5, o -0,5 a 0,5, o -0,4 a 0,4, o -0,3 a -0,1. En una forma de realización preferente, en el caso del codisolvente se trata de un dialquileter de la fórmula $Alk_1-O-Alk_2$ con un logP de más de -1,38, más preferentemente de -1 a +2, de modo aún más preferente de 0 a 1,5, seleccionándose ambos substituyentes alquilo Alk_1 y Alk_2 respectivamente, y de modo independiente entre sí, a partir del grupo que comprende metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo y terc-butilo. En una forma de realización especialmente preferente, en el caso del
15 codisolvente se trata de metil-terc-butileter (MTBE). En la forma de realización más preferente, en el caso del codisolvente se trata de dimetoxietano (DME). En otra forma de realización preferente, en el caso del codisolvente se trata de un compuesto de la fórmula $R^3 - O - (CH_2)_x - O - R^4$, seleccionándose R^3 y R^4 respectivamente, y de modo independiente entre sí, a partir del grupo que comprende metilo, etilo, propilo y butilo, y siendo x 1 a 4, siendo preferentemente R^3 y R^4 metilo en cada caso, y siendo x 2.

20 En otra forma de realización preferente, en el caso del codisolvente se trata de un ácido carboxílico o ácido graso, preferentemente un ácido graso con al menos 6, de modo más preferente al menos 12 átomos de carbono. el ácido graso puede ser un ácido graso saturado, a modo de ejemplo ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido aráquico o ácido behénico, o un ácido insaturado, a modo de ejemplo ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido petrosélico, ácido oleico, ácido eláidico, ácido vaccénico, ácido gadoleico,
25 ácido icosénico o ácido erúxico. Del mismo modo son posibles mezclas de diversos ácidos grasos, a modo de ejemplo ácido de cardo, que contiene principalmente ácidos grasos insaturados. Ya que no todos los ácidos grasos son solubles a temperatura ambiente en medida digna de mención, puede ser necesario adoptar otras medidas, como por ejemplo el aumento de la temperatura o, preferentemente, la adición de un disolvente adicional, para hacerlos accesibles a la fase acuosa. En una forma de realización especialmente preferente se emplea un ácido graso o un éster del mismo, preferentemente el éster metílico, del modo más preferente laurato de metilo, como tal disolvente adicional.

Según la invención, la cascada enzimática según la invención se puede desarrollar en presencia de una alaninodeshidrogenasa. Un punto fuerte especial de la presente invención es que este acondicionamiento posibilita un control de reacción neutro en equivalentes de reducción, es decir, la reacción se desarrolla sin alimentación o
35 eliminación de electrones en forma de equivalentes de reducción, ya que el NADH generado por la alcohol deshidrogenasa en el transcurso de la oxidación alcohólica se consume en la generación de alanina, bajo consumo de un donador de nitrógeno inorgánico, preferentemente amoniaco o una fuente de amoniaco.

En una forma de realización preferente, bajo el concepto "alaninodeshidrogenasa", como se emplea en este caso, se entiende un enzima que cataliza la transformación de L-alanina, bajo consumo de agua y NAD^+ , en piruvato, amoniaco y NADH. En el caso de la alaninodeshidrogenasa se trata preferentemente de una alaninodeshidrogenasa intracelular, de modo aún más preferente de una alaninodeshidrogenasa recombinante intracelular de un catalizador de célula completa bacteriano.

En una forma de realización preferente, para el procedimiento según la invención se emplea un catalizador de célula completa con todas las actividades necesarias, es decir, alcohol deshidrogenasa dependiente de $NAD(P)^+$,
45 transaminasa, y en caso dado monooxigenasa y/o alaninodeshidrogenasa. El empleo de tal catalizador de célula completa tiene la ventaja de que todas las actividades se emplean en forma de un único agente, y no es necesario elaborar enzimas en forma biológicamente activa a escala industrial. Por el especialista son conocidos procedimientos apropiados para la construcción de catalizadores de célula completa, en especial la construcción de sistemas plásmidos para la expresión de una o más de una proteína recombinante, o la integración del ADN codificante para la proteína recombinante necesaria en el ADN cromosómico de la célula huésped empleada.
50

Las características de la invención, dadas a conocer en la anterior descripción, las reivindicaciones y los dibujos, tanto por separado, como también en cualquier combinación, pueden ser esenciales para la realización de la invención en sus diversas formas de realización.

La figura 1 muestra una alineación ejemplar que comprende diversas transaminasas, en especial las de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695, "TACV_co"). Los restos aminoácido correspondientes a las posiciones Val224 y Gly230 de las últimas transaminasas están subrayados en todas las secuencias. La alineación se elaboró bajo empleo de Clustal W2.

- 5 **Ejemplo 1:** aminación de diversos sustratos bajo empleo de una alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ en comparación con alcohol deshidrogenasa AlkJ bajo empleo del procedimiento según la invención

Substratos:

Como sustratos se emplearon hexano-1,6-diol (1), 6-aminohexan-1-ol (2) y 6-hidroxihexanoato de etilo (3).

Enzimas:

- 10 Alanindeshidrogenasa

La L-alanindeshidrogenasa de *Bacillus subtilis* se exprimió en *E. coli*. En primer lugar se preparó un cultivo durante la noche, que se empleó a continuación para inocular el cultivo principal (medio LB-ampicilina). Las células se incubaron durante 24 horas a 30°C y 120 rpm en un agitador. A continuación se añadió bajo condiciones estériles IPTG (0,5 mM, isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido, Sigma) para la inducción, y los cultivos se agitaron durante 24 horas más a 20°C.

Las células se centrifugaron (8000 rpm, 20 min 4 °C), se lavaron, y se desechó el exceso. A continuación se alteraron las células bajo empleo de ultrasonido (1 s pulso, 4 s pausa, tiempo: 10 min, amplitud: 40 %), se centrifugó la mezcla (20 min, 18000 rpm, 4°C), y el enzima se purificó bajo empleo de una columna His-prep.

Alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* (ADH-hT; P42328.1))

20 Para la preparación de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ de *Bacillus stearothermophilus* (Fiorentino G, Cannio R, Rossi M, Bartolucci S: Decreasing the stability and changing the substrate specificity of the Bacillus stearothermophilus alcohol dehydrogenase by single amino acid replacements. Protein Eng 1998, 11: 925-930) se preparó en primer lugar un cultivo durante la noche (10 ml de medio LB/ampicilina, ampicilina 100µg/ml, 30°C, 120 Upm), que se empleó a continuación para inocular recipientes de cultivo, que se agitaron a su vez aproximadamente 12 horas a 37°C y 120 rpm. Las células se centrifugaron (8000 rpm, 20 minutos, 4°C), se lavaron, se desechó el exceso, y se liofilizó el comprimido. Finalmente se alteraron las células bajo empleo de ultrasonido (1 s pulso, 4 s pausa, tiempo: 10 min, amplitud: 40 %), se centrifugó la mezcla (20 min, 18000 rpm, 4°C) y se empleó como extracto crudo. La concentración de proteína se estimó por medio de SDS-PAGE.

AlkJ-alcohol deshidrogenasa (de *Pseudomonas oleovorans* Gp01):

30 Se preparó el enzima bajo las mismas condiciones que la alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus*, prescindiendo de que se empleó el plásmido pTZE03_AlkJ (SEQ ID NO 20) y canamicina como antibiótico (50 µg/ml). La concentración de proteínas se estimó igualmente por medio de SDS-PAGE.

Transaminasa CV-ωTA de *Chromobacterium violaceum*:

35 Para la preparación de CV-ωTA de *Chromobacterium violaceum* (U. Kaulmann, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes, J. M. Ward, Enzyme Microb. Technol. 2007, 41, 628-637; b) M. S. Humble, K. E. Cassimjee, M. Håkansson, Y. R. Kimbung, B. Walse, V. Abedi, H.-J. Federsei, P. Berglund, D. T. Logan, FEBS Journal 2012, 279, 779-792; c) D. Koszelewski, M. Göritzer, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, ChemCatChem 2010, 2, 73-77) se preparó en primer lugar un cultivo durante la noche (medio LB/ampicilina, 30°C, 120 rpm), que se empleó a continuación para inocular con el mismo medio botellas de cultivo que se agitaron aproximadamente tres horas a 37°C y 120 rpm, hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,7. A continuación se añadió disolución madre de IPTG (0,5 mM), y se indujo durante tres horas a 20°C y 120 rpm. Las células se centrifugaron, se desecho el residuo, y se almacenaron las células a 4°C. Finalmente, las células se alteraron bajo empleo de ultrasonido (1 s pulso, 4 s pausa, tiempo: 10 min, amplitud: 40 %), se centrifugó la mezcla (20 min, 18000 rpm, 4°C) y se empleó el residuo como extracto crudo.

Puesta en práctica del ensayo

El planteamiento de ensayo se describe en la tabla 1.

Tabla 1: planteamiento de ensayo

Planteamiento de ensayo	ADH-hT (crudo)	200 μ l
	Transaminasa	200 μ l
	AlaDH	10 μ l (250 U)
	L-alanina	22,3 mg (250 μ mol)
	NAD ⁺	0,5 mg (0,75 μ mol)
	NH ₄ Cl	21 mg (500 μ mol)
	PLP	0,1 mg (0,35 μ mol)
	NaOH 6 M	7,5 μ l
	H ₂ O / codisolvente	400 μ l
	Substrato	50 μ mol
	pH al final	8,5
	Volumen total	1,22 mL

5 El substrato se disuelve en la cantidad correspondiente de disolvente (véase la tabla 2), y se añade a L-alanina disuelta en 300 μ l de agua. Se añadió cloruro amónico a 75 μ l de agua. Se añadieron NAD⁺ y PLP disueltos respectivamente en 25 μ l de agua. El valor de pH se ajustó mediante adición de 7,5 μ l de una disolución de NaOH 6 M. Se añadieron transaminasa y alanindeshidrogenasa. La reacción se inició mediante adición de alcohol deshidrogenasa. Después de 22 horas, la reacción se detuvo mediante adición de los reactivos de derivatización indicados a continuación.

10 Derivatización de aminas:

15 A una muestra con 500 μ l se añadieron 200 μ l de trietilamina, así como ESOF (succinimidooxiformiato de etilo) (80 o 40 mg) en acetonitrilo (500 μ l). Las muestras se agitaron a continuación durante una hora a 45 °C y se extrajeron con diclorometano, se secaron sobre sulfato sódico, y se midieron bajo empleo de GC-MS. Si se trabajó sin alanindeshidrogenasa, se añadieron a una disolución acuosa L-alanina (500 mM), NAD⁺ (2 mM) y PLP (0.5 mM) a un valor de pH de 8,5 (ajustado mediante adición de NaOH) y substrato en DME (120 μ l, 25 mM). La reacción se inició mediante adición de 200 μ l de alcohol deshidrogenasa (dependiente de NAD⁺) o AlkJ) y transaminasa respectivamente. Las muestras se agitaron a 25°C y 300 rpm durante 24 horas. Las muestras se elaboraron como se describe anteriormente y se analizaron con GC-MS.

Resultados:

ES 2 604 335 T3

Tabla 2. Aminación en ausencia de alaninodeshidrogenasa. Los sustratos son hexano-1,6-diol (1), 6-aminohexan-1-ol (2) y 6-hidroxihexanoato de etilo (3).

Substrato	Enzima oxidante	Transaminasa	Substrato no transformado [%]	Producto [%]
1	AlkJ	CV	>99	<1 (monoamina)
				<1 (diamina)
1	ADH-hT	CV	<1	<99 (monoamina)
				>1 (diamina)
1	-	-	>99	<1
2	AlkJ	CV	91	9
2	ADH-hT	CV	76	24
2	-	-	>99	<1
3	AlkJ	CV	99	1
3	ADH-hT	CV	22	78
3	-	-	>99	<1

5 Tabla 3. Aminación en presencia de alaninodeshidrogenasa. Los Sustratoos son hexano-1,6-diol (1), 6-aminohexan-1-ol (2) y 6-hidroxihexanoato de etilo (3).

Substrato	Enzima oxidante	Transaminasa	Substrato no transformado [%]	Producto [%]
1	AlkJ	CV	>99	<1 (monoamina)
				<1 (diamina)
1	ADH-hT	CV	<1	92 (monoamina)
				8 (diamina)
1	-	-	>99	<1 (monoamina)
				<1 (diamina)
2	AlkJ	CV	>99	<1

Substrato	Enzima oxidante	Transaminasa	Substrato no transformado [%]	Producto [%]
2	ADH-hT	CV	19	81
2	-	-	>99	<1
3	AlkJ	CV	>99	<1
3	ADH-hT	CV	<1	>99
3	-	-	>99	<1

Sumario:

5 Para una serie de sustratos diferentes estructuralmente, esto es, hexano-1,6-diol (1), 6-aminohexan-1-ol (2) y 6-hidroxihexanoato de etilo (3), se mostró en cada caso que la reacción bajo empleo de alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ de *Bacillus stearothermophilus* se desarrolla de manera claramente más eficiente que bajo empleo de alcohol deshidrogenasa AlkJ. Este efecto técnico sorprendente se pudo mostrar igualmente en presencia y ausencia de alanindeshidrogenasa.

Ejemplo 2: Aminación de diversos sustratos alcohólicos

10 Para confirmar que el sistema enzimático según la invención transforma sustratos múltiples desde el punto de vista estructural se hicieron reaccionar *in vitro* alcanoles y alcanodíoles adicionales, bajo empleo de enzimas apropiados, para dar las correspondientes aminas, o bien diaminas. Se comprobó que la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HL-ADH, E-isoenzima; NP_001075997.1) y la alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* (ADH-hT; P42328.1) son apropiadas del mismo modo. Se emplearon dos aminasas diferentes, esto es, la de *Chromobacterium violaceum*^[16] (CV- ω TA) y una variante de una ω -TA (S)-selectiva de *Arthrobacter citreus* (ArS- ω TA) (A. R. Martin, R. DiSanto, I. Plotnikov, S. Kamat, D. Shonnard, S. Pannuri, Biochem. Eng. J. 2007, 37, 246-255). La alanindeshidrogenasa procedía de *Bacillus subtilis* (F. G. Mutti, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, J. H. Sattler, W. Kroutil, Adv. Synth. Catal. 2011, 353, 3227-3233).

20 Los productos se derivatizaron con (succinimidooxi)formiato de etilo (I. Edafiohgo, K. R. Scott, J. A. Moore, V. A. Famar, J. M. Nicholson, J. Med. Chem. 1991, 34, 387-392) y se identificaron mediante GC-MS, bajo empleo de una columna Agilent J&W HP-5 (30 m, 320 μ m, 0.25 μ m).

Tabla 4: aminación de alcoholes primarios

Nº	Substrato	c [%]	Aldehído [%]	Amina [%]
1	1-hexanol	>99	<1	> 99
2	1-octanol	50	<1	50
3	1-octanol	57 ^[b]	<1	57
4	1-decanol	2	<1	2
5	1-decanol	25 ^[b]	<1	25

Nº	Substrato	c [%]	Aldehído [%]	Amina [%]
6	1-dodecanol	10 ^[b]	<1	10

[a] Condiciones de reacción: substrato (50 mM), CV- ω TA (1 mg, 0,2 U) y ADH-hT (1 mg, 0,25 U), AlaDH (0,04 mg, 0,25 U), PLP (0,35 mM), NAD⁺ (0,75 mM), cloruro amónico (275 mM), L-alanina (250 mM), pH 8,5, 24 horas, 20 °C.
[b] Se añadió 1,2-dimetoxietano (10% v v⁻¹) como codisolvente.

Tabla 5: aminación de 1, ω -dioles^[c]

Nº	Sub.	Disolvente	Vol. disolv. [%]	T. [°C]	c [%]	Monoamina [%]	Diamina [%]
1	1,8-octanodiol	MTBE	30	35 ^[d]	52	49	3
2	1,8-octanodiol	MTBE	30	25	98	52	46
3	1,8-octanodiol	DME	40	25	95	80	15
4	1,8-octanodiol	DME	30	25	>99	18	82
5	1,8-octanodiol	DME	20	25	99	16	83
6	1,8-octanodiol	DME	10	25	99	1	98
7	1,8-octanodiol	DME	10	20	>99	<1	>99
8	1,10-decanoDiol	DME	20	25	99	6	93
9	1,10-decanoDiol	DME	20	20	>99	2	98
10	1,10-decanoDiol	DME	10	20	>99	1	99

[c] Condiciones de reacción generales: substrato (50 mM), CV- ω TA (1 mg, 0,25 U) and ADH-hT (1 mg, 0,2 U), AlaDH (0,1 mg, 0,7 U), PLP (0,35 mM), NAD⁺ (0,75 mM), cloruro amónico (275 mM), L-alanina (250 mM), pH 8.5. [d] Se emplea ArS- ω TA en lugar de CV- ω TA.

Citas bibliográficas:

- 5 PCT/EP/2008/067447 (2009): ω -AMINO CARBOXYLIC ACIDS, ω -AMINO CARBOXYLIC ACID ESTERS, OR RECOMBINANT CELLS WHICH PRODUCE LACTAMS THEREOF

C. Grant, J. M. Woodley and F. Baganz (2011), Enzyme and Microbial Technology 48, 480-486

Gudrun Wienke, "Messung und Vorausberechnung von n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten", Doktorarbeit, Univ. Oldenburg, 1-172, 1993

DE 60216245 (2007): FUNKTIONELLES OBERFLÄCHENDISPLAY VON POLYPEPTIDEN

Sambrook/Fritsch/Maniatis (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition

5 J. Sangster, Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, Vol. 2 of Wiley Series in Solution Chemistry, John Wiley & Sons, Chichester, 1997

Eugene Kellogg G, Abraham DJ: Hydrophobicity: is LogP(o/w) more than the sum of its parts?. Eur J Med Chem. 2000 Jul-Aug;35(7-8):651-61

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948.

10 Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R (2010) Nucleic acids research Jul, 38 Suppl: W695-9

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Evonik Degussa GmbH
- 15 <120> Oxidación de alcoholes
- <130> 2011E00296DE
- <160> "="
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 57
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> parte de secuencia
- 25 <400> 1

ES 2 604 335 T3

Val Val Ala Ala Arg Trp Leu Glu Glu Lys Ile Leu Glu Ile Gly Ala
1 5 10 15

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

Val Ile Val Pro Pro Ala Thr Tyr Trp Pro Glu Ile Glu Arg Ile Cys
35 40 45

Arg Lys Tyr Asp Val Leu Leu Val Ala
50 55

<210> 2

<211> 57

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 2

Ala His Cys Val Ala Glu Leu Glu Ala Leu Ile Glu Arg Glu Gly Ala
1 5 10 15

Asp Thr Ile Ala Ala Phe Ile Gly Glu Pro Ile Leu Gly Thr Gly Gly
20 25 30

Ile Val Pro Pro Pro Ala Gly Tyr Trp Glu Ala Ile Gln Thr Val Leu
35 40 45

10 Asn Lys His Asp Ile Leu Leu Val Ala
50 55

<210> 3

<211> 57

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> parte de secuencia

<400> 3

ES 2 604 335 T3

Gln His Cys Ala Asp Lys Leu Glu Glu Met Ile Leu Ala Glu Gly Pro
 1 5 10 15

Glu Thr Ile Ala Ala Phe Ile Gly Glu Pro Ile Leu Gly Thr Gly Gly
 20 25 30

Ile Val Pro Pro Pro Ala Gly Tyr Trp Glu Lys Ile Gln Ala Val Leu
 35 40 45

Lys Lys Tyr Asp Val Leu Leu Val Ala
 50 55

<210> 4

<211> 57

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 4

Asp Asp Leu Val Gln Glu Phe Glu Asp Arg Ile Glu Ser Leu Gly Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Ala Ala Phe Leu Ala Glu Pro Ile Leu Ala Ser Gly Gly
 20 25 30

Val Ile Ile Pro Pro Ala Gly Tyr His Ala Arg Phe Lys Ala Ile Cys
 35 40 45

Glu Lys His Asp Ile Leu Tyr Ile Ser
 50 55

10 <210> 5

<211> 57

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> parte de secuencia

<400> 5

ES 2 604 335 T3

Ala Glu Leu Ala Asn Glu Leu Glu Arg Ile Val Ala Leu His Asp Ala
1 5 10 15

Ser Thr Ile Ala Ala Val Ile Val Glu Pro Val Ala Gly Ser Thr Gly
20 25 30

Val Ile Leu Pro Pro Lys Gly Tyr Leu Gln Lys Leu Arg Glu Ile Cys
35 40 45

Thr Lys His Gly Ile Leu Leu Ile Phe
50 55

<210> 6

<211> 57

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 6

Ala Glu Leu Ala Asn Glu Leu Glu Arg Ile Val Ala Leu His Asp Ala
1 5 10 15

Ser Thr Ile Ala Ala Val Ile Val Glu Pro Val Ala Gly Ser Thr Gly
20 25 30

Val Ile Leu Pro Pro Lys Gly Tyr Leu Gln Lys Leu Arg Glu Ile Cys
35 40 45

Thr Lys His Gly Ile Leu Leu Ile Phe
50 55

10 <210> 7

<211> 57

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> parte de secuencia

<400> 7

ES 2 604 335 T3

Ala His Leu Ala Asp Glu Leu Glu Arg Ile Ile Ala Leu His Asp Ala
1 5 10 15

Ser Thr Ile Ala Ala Val Ile Val Glu Pro Met Ala Gly Ser Thr Gly
20 25 30

Val Leu Val Pro Pro Lys Gly Tyr Leu Glu Lys Leu Arg Glu Ile Thr
35 40 45

Ala Arg His Gly Ile Leu Leu Ile Phe
50 55

<210> 8

5 <211> 57

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

10 <400> 8

Ala His Leu Ala Asp Glu Leu Glu Arg Ile Val Ala Leu His Asp Pro
1 5 10 15

Ser Thr Ile Ala Ala Val Ile Val Glu Pro Leu Ala Gly Ser Ala Gly
20 25 30

Val Leu Val Pro Pro Val Gly Tyr Leu Asp Lys Leu Arg Glu Ile Thr
35 40 45

Thr Lys His Gly Ile Leu Leu Ile Phe
50 55

<210> 9

<211> 57

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 9

ES 2 604 335 T3

Val Glu Leu Ala Asn Glu Leu Leu Lys Leu Ile Glu Leu His Asp Ala
1 5 10 15

Ser Asn Ile Ala Ala Val Ile Val Glu Pro Met Ser Gly Ser Ala Gly
20 25 30

Val Leu Val Pro Pro Val Gly Tyr Leu Gln Arg Leu Arg Glu Ile Cys
35 40 45

Asp Gln His Asn Ile Leu Leu Ile Phe
50 55

<210> 10

<211> 57

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 10

Ile Ala Leu Ala Asp Glu Leu Leu Lys Leu Ile Glu Leu His Asp Ala
1 5 10 15

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

Val Leu Val Pro Pro Glu Gly Tyr Leu Lys Arg Asn Arg Glu Ile Cys
35 40 45

Asn Gln His Asn Ile Leu Leu Val Phe
50 55

10 <210> 11

<211> 57

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> parte de secuencia

<400> 11

ES 2 604 335 T3

Pro Ala Tyr Ser Ala Ala Phe Glu Ala Gln Leu Ala Gln His Ala Gly
1 5 10 15

Glu Leu Ala Ala Val Val Val Glu Pro Val Val Gln Gly Ala Gly Gly
20 25 30

Met Arg Phe His Asp Pro Arg Tyr Leu His Asp Leu Arg Asp Ile Cys
35 40 45

Arg Arg Tyr Glu Val Leu Leu Ile Phe
50 55

<210> 12

<211> 57

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 12

Glu Arg Asp Met Val Gly Phe Ala Arg Leu Met Ala Ala His Arg His
1 5 10 15

Glu Ile Ala Ala Val Ile Ile Glu Pro Ile Val Gln Gly Ala Gly Gly
20 25 30

10 Met Arg Met Tyr His Pro Glu Trp Leu Lys Arg Ile Arg Lys Ile Cys
35 40 45

Asp Arg Glu Gly Ile Leu Leu Ile Ala
50 55

<210> 13

<211> 57

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 13

ES 2 604 335 T3

Asp Gln Cys Leu Arg Glu Leu Ala Gln Leu Leu Glu Glu His His Glu
 1 5 10 15

Glu Ile Ala Ala Leu Ser Ile Glu Ser Met Val Gln Gly Ala Ser Gly
 20 25 30

Met Ile Val Met Pro Glu Gly Tyr Leu Ala Gly Val Arg Glu Leu Cys
 35 40 45

Thr Thr Tyr Asp Val Leu Met Ile Val
 50 55

<210> 14

<211> 54

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 14

Ala Asn Glu Ile Asp Arg Ile Met Thr Trp Glu Leu Ser Glu Thr Ile
 1 5 10 15

Ala Gly Val Ile Met Glu Pro Ile Ile Thr Gly Gly Gly Ile Leu Met
 20 25 30

Pro Pro Asp Gly Tyr Met Lys Lys Val Glu Asp Ile Cys Arg Arg His
 35 40 45

Gly Ala Leu Leu Ile Cys
 50

10 <210> 15

<211> 56

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> parte de secuencia

<400> 15

ES 2 604 335 T3

Leu Leu Ser Val Lys Tyr Thr Arg Arg Met Ile Glu Asn Tyr Gly Pro
1 5 10 15

Glu Gln Val Ala Ala Val Ile Thr Glu Val Ser Gln Gly Ala Gly Ser
20 25 30

Ala Met Pro Pro Tyr Glu Tyr Ile Pro Gln Phe Arg Lys Met Thr Lys
35 40 45

Glu Leu Gly Val Leu Trp Ile Asn
50 55

<210> 16

<211> 56

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 16

Leu Leu Ser Val Lys Tyr Thr Arg Arg Met Ile Glu Asn Tyr Gly Pro
1 5 10 15

Glu Gln Val Ala Ala Val Ile Thr Glu Val Ser Gln Gly Ala Gly Ser
20 25 30

Ala Met Pro Pro Tyr Glu Tyr Ile Pro Gln Ile Arg Lys Met Thr Lys
35 40 45

Glu Leu Gly Val Leu Trp Ile Asn
50 55

10 <210> 17

<211> 56

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> parte de secuencia

<400> 17

ES 2 604 335 T3

Leu Leu Ser Val Lys Tyr Thr Arg Arg Met Ile Glu Asn Tyr Gly Pro
 1 5 10 15

Glu Gln Val Ala Ala Val Ile Thr Glu Val Ser Gln Gly Val Gly Ser
 20 25 30

Thr Met Pro Pro Tyr Glu Tyr Val Pro Gln Ile Arg Lys Met Thr Lys
 35 40 45

Glu Leu Gly Val Leu Trp Ile Ser
 50 55

<210> 18

5 <211> 56

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

10 <400> 18

Lys Tyr Ala Ser Asp Val His Asp Leu Ile Gln Phe Gly Thr Ser Gly
 1 5 10 15

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

Val Glu Leu Ala Pro Gly Tyr Leu Pro Ala Ala Tyr Asp Ile Val Arg
 35 40 45

Lys Ala Gly Gly Val Cys Ile Ala
 50 55

<210> 19

<211> 57

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> parte de secuencia

<400> 19

ES 2 604 335 T3

Leu Ala Glu Leu Asp Tyr Ala Phe Asp Leu Ile Asp Arg Gln Ser Ser
1 5 10 15

Gly Asn Leu Ala Ala Phe Ile Ala Glu Pro Ile Leu Ser Ser Gly Gly
20 25 30

Ile Ile Glu Leu Pro Asp Gly Tyr Met Ala Ala Leu Lys Arg Lys Cys
35 40 45

Glu Ala Arg Gly Met Leu Leu Ile Leu
50 55

<210> 20

<211> 6949

<212> DNA

5 <213> artificial

<220>

<223> plásmido ptZE03_aLKj

<400> 1

ES 2 604 335 T3

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg	60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcacct agcgcaccgct cctttcgcct tcttcccttc	120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg	180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgcct ttgacgttg agtccacggt	300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc	360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat	600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaa	660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggctctgcg attccgactc	720
gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga	780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc	840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac	900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac	960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat	1020
ttcacctga atcaggatat ttttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgca	1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca	1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac	1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg	1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca	1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac	1380
cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa	1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaag atcttcttga	1500
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg	1560

ES 2 604 335 T3

gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
 accgaaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
 ccagggggaa acgcctggtg tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag 2040
 cgtcgatfff tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgcgta 2160
 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc 2220
 agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcaggaag cggagagcg cctgatgagg 2280
 tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac gggcttgtct 2460
 gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
 gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
 aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgta agggcggttt tttcctggtt 2700
 ggtcaactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
 acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
 ttgtgagggg aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg 2880
 tcaatgccag cgcttcgta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
 tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
 cgaaacacgg aaaccgaaga ccatcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
 gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgcacc gtggggccgc 3180
 catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcagaa 3240
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
 gctccagcga aagcggctct cgcgaaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcca 3420

ES 2 604 335 T3

ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcacc ggtcgagacc ccggtgccta 3480
 atgagtgagc taacttacat taattgcggt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagcgg gtttgcgtat 3600
 tgggcgccag ggtggttttt etttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
 ccgctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
 aatcctgtt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
 cggccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcctcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
 gcatttgcatt ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
 tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
 gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgtt atgggtgtct 4140
 ggtcagagac atcaagaaat aacgcgggaa cattagtca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
 catcctggtc atccagcggga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
 tgtgcaccgc cgttttacag gcttcgacgc cgcttcttcc taccatcagc accaccacgc 4320
 tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
 gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
 ccacgcggtt gggaaatgaa ttcagctccg ccctcgcgcg ttccactttt tcccgcgtt 4500
 tcgcagaaac gtgctgggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
 catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
 cttccgggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcagat gtgtccggga 4680
 tctcagcgt ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
 ccgttgagca ccgccgcgcg aaggaatggt gcctgcaagg agatggcgcg caacagctcc 4800
 ccggccacgg ggctgcccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
 cgagcccgat cttcccctc ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
 gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
 aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaataa 5040
 ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacg atgtacgact atataatcgt tggctgctga 5100
 tctgcaggat gtgtgcttgc taatcgtctt tcggccgacc cctctaaaag agtttgttta 5160
 cttgaagctg ggccgcgaga tacgaatccg ctaattcata tgccgttagg tattgctttg 5220
 cttcaaata gtaaaaagtt gaattgggct tttcaaactg cgcacagca aatctcaac 5280
 ggccggagcc tttctggcc acgagaaaa acgttaggtg gttcaagctc aatcaacgca 5340

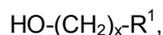
ES 2 604 335 T3

atggtctata tccgagggca tgaagacgat taccacgcat gggagcaggc ggccggccgc 5400
tactggggtt ggtaccgggc tcttgagttg ttcaaaaggc ttgaatgcaa ccagcgattc 5460
gataagtccg agcaccatgg ggttgacgga gaattagctg ttagtgattt aaaatatatc 5520
aatccgctta gcaaagcatt cgtgcaagcc ggcatggagg ccaatattaa tttcaacgga 5580
gatttcaacg gcgagtacca ggacggcgta gggttctatc aagtaacca aaaaaatgga 5640
caacgctgga gctcggcgcg tgcattcttg cacgggtgtac tttccagacc aaatctagac 5700
atcattactg atgcgcatgc atcaaaaatt ctttttgaag accgtaaggc ggttgggtgt 5760
tcttatataa agaaaaatat gcaccatcaa gtcaagacaa cgagtgggtg tgaagtactt 5820
cttagtcttg gcgcagtcgg cacgcctcac cttctaagtc tttctgggtg tggggctgca 5880
gccgagctta aggaacatgg tgtttctcta gtccatgatc ttctgaggt ggggaaaaat 5940
cttcaagatc atttggacat cacattgatg tgcgcagcaa attcgagaga gccgataggt 6000
gttgcctttt ctttcatccc tcgtgggtgc tcgggtttgt tttcatatgt gtttaagcgc 6060
gaggggtttc tcaactagtaa cgtggcagag tcgggtgggt ttgtaaaaag ttctcctgat 6120
cgtgatcggc ccaatttgca gtttcatttc cttccaactt atcttaaaga tcacggtcga 6180
aaaatagcgg gtggttatgg ttatacgcta catatatgtg atcttttgcc taagagccga 6240
ggcagaattg gcctaaaaag cgccaatcca ttacagccgc ctttaattga cccgaactat 6300
cttagcgatc atgaagatat taaaaccatg attgcgggta ttaagatagg gcgcgctatt 6360
ttgcaggccc catcgatggc gaagcatttt aagcatgaag tagtaccggg ccaggctggt 6420
aaaactgatg atgaaataat cgaagatatt cgtagggcag ctgagactat ataccatccg 6480
gtaggtactt gtaggatggg taaagatcca gcgtcagttg ttgatccgtg cctgaagatc 6540
cgtgggttgg caaatattag agtcgttgat gcgtcaatta tgccgcactt ggtcgcgggt 6600
aacacaaacg ctccaactat tatgattgca gaaaatgcgg cagaaataat tatgcggaat 6660
cttgatgtgg aagcattaga ggctagcgtc gagtttgctc gcgaggggtc agagctagag 6720
ttggcctggc gcgcctcga gggatcccac gtgctgggtc cgcgtggcag cgcggccgca 6780
ctggagcacc accaccacca ccaccaccac tgagatccgg ctgctaacaa agcccgaag 6840
gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag caataactag cataaccctt tggggcctct 6900
aaacgggtct tgaggggttt tttgctgaaa ggaggaacta tatccggat 6949

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la oxidación de alcoholes, que comprende los pasos

a) puesta a disposición de un alcohol primario de la fórmula



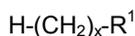
siendo seleccionado R^1 a partir del grupo que comprende -OH, -SH, -NH₂ y -COOR², siendo x al menos 3, y siendo seleccionado R^2 a partir del grupo que comprende H, alquilo y arilo,

b) oxidación del alcohol primario mediante puesta en contacto con una alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)⁺, y

c) puesta en contacto del producto de oxidación del paso a) con una transaminasa,

tratándose en el caso de la NAD(P)⁺-alcohol deshidrogenasa y/o de la transaminasa, de un enzima recombinante o aislado.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, efectuándose el paso a) mediante hidroxilación de un alcano de la fórmula



mediante una monooxigenasa, que es preferentemente recombinante o está aislada.

3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, tratándose, en el caso de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)⁺, de una alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)⁺ con al menos un átomo de cinc como cofactor.

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, tratándose, en el caso de la alcohol deshidrogenasa, de la alcohol deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* (código de banco de datos P42328), o de una variante de la misma.

5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 4, seleccionándose la monooxigenasa a partir del grupo que comprende AlkBGT de *Pseudomonas putida*, Cytochrom P450 de *Candida tropicalis* o de *Cicer arietinum*.

6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, seleccionándose la transaminasa a partir del grupo de transaminasas y sus variantes, que están caracterizadas por que presentan un aminoácido seleccionado a partir del grupo que comprende isoleucina, valina, fenilalanina, metionina y leucina en la posición de la secuencia de aminoácidos que corresponde a Val224 de la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695), y un aminoácido diferente a treonina, y preferentemente un aminoácido del grupo que comprende serina, cisteína, glicina y alanina en la posición de la secuencia de aminoácidos que corresponde a Gly230 de la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP_901695).

7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, llevándose a cabo el paso b) y/o paso c) se lleva a cabo en presencia de una alanindeshidrogenasa aislada o recombinante, y una fuente de nitrógeno inorgánica.

8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, siendo recombinante al menos un enzima del grupo que comprende alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)⁺, transaminasa, monooxigenasa y alanindeshidrogenasa, y poniéndose a disposición en forma de un catalizador de célula completa, que presenta el correspondiente enzima.

9.- Procedimiento según la reivindicación 8, poniéndose a disposición todos los enzimas en forma de un o más de un catalizador de célula completa, y presentando preferentemente un catalizador de célula completa todos los enzimas necesarios.

10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, estando presente en el paso b), preferentemente en el paso b) y c), un codisolvente orgánico, que presenta un logP de más de -1,38, preferentemente 0 a 1,2.

- 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, seleccionándose el codisolvente a partir del grupo que comprende ácidos grasos insaturados, preferentemente ácido oleico.
- 12.- Procedimiento según la reivindicación 10, tratándose, en el caso del codisolvente, de un compuesto de la fórmula $R^3-O-(CH_2)_x-O-R^4$, seleccionándose R^3 y R^4 respectivamente, y de modo independiente entre sí, a partir del grupo que comprende metilo, etilo, propilo y butilo, y siendo x 1 a 4, siendo preferentemente R^3 y R^4 metilo en cada caso, y siendo x 2.
- 13.- Empleo de un catalizador de célula completa que presenta una alcohol deshidrogenasa dependiente de $NAD(P)^+$, preferentemente con al menos un átomo de cinc como cofactor, una transaminasa, opcionalmente una monooxigenasa, y opcionalmente una alaninodeshidrogenasa, tratándose, en el caso de los enzimas, de enzimas recombinantes, para la oxidación y aminación de un alcohol primario de la fórmula $HO-(CH_2)_x-R^1$, seleccionándose R^1 a partir del grupo que comprende $-OH$, $-SH$, $-NH_2$ y $-COOR^2$, siendo x al menos 3, y seleccionándose R^2 a partir del grupo que comprende H, alquilo y arilo.
- 14.- Empleo según la reivindicación 13, que comprende además la presencia de un codisolvente orgánico, que presenta un logP de más de -1,38, preferentemente 0 a 1,2.
- 15.- Empleo según la reivindicación 14, seleccionándose el codisolvente a partir del grupo que comprende ácidos grasos insaturados, preferentemente ácido oleico.

TACV_co	VVAARWLEEKILE--IGADKVAAFVGEPIQAGGVI	PPA-TYWEIERICRKYDVL	LLVA	258
Q1GD43_3FCR	AHCVAELEALIER--EGADTIAAFIGEPI	LGTGGIVPPA-GYWEAIQT	VLNKHHDIL	LLVA 258
Q987B2_3GJU	QHCADKLEEMILA--EGPETIAAFIGEPI	LGTGGIVPPA-GYWEKIQAVL	KKYDVL	LLVA 259
Q3IWE9_3I5T	DDLVOEFEDRIES--LGPDTIAAFLAEPIL	ASGGVI	PPA-GYHARFKA	CEKHDILYIS 259
1.5.020	AELANELELRIVAL--HDASTIAAVIVEPV	AGSTGVI	LPK-GYLQKLRE	ICTKHGILLIF 254
1.5.021	AELANELELRIVAL--HDASTIAAVIVEPV	AGSTGVI	LPK-GYLQKLRE	ICTKHGILLIF 254
Ade	AHLADELERIIAL--HDASTIAAVIVEPM	AGSTGVL	PPK-GYLEKLR	EITARHGILLIF 252
TA_R.eu	AHLADELERIIVAL--HDPSTIAAVIVEP	LACSAGVL	PPV-GYLDKLR	EITTKHGILLIF 254
TA5_Pao132	VELANECLKLIEL--HDASNIAAVIVEP	MSGAGVL	PPV-GYLQRLRE	ICDQHNILLIF 270
P28269_3A8U	IALADELLKLIEL--HDASNIAAVFVEP	LASAGVL	PPPE-GYLKRNRE	ICNQHNI
P0A4X6_3BV0	PAYSAAFEAQLAQ--HAGELAAVVVEP	VQAGGMR	FHDP-RYLHDLR	DICRRYE
P12995_1S0A	ERDMVGFARLMAA--HRHEIAAVIIEP	IVQAGGMR	MYHP-EWLKR	IRKICDREGILLIA 244
P53555_3DOD	DQCIRELAQLLEE--HHEEIAALSIESM	VQGASGM	IVMPE-GYLAGVRE	LCTTYDVL
1.5.017	---ANEIDRIMTW--ELSETIAGVIMEPIITGGIL	MPD-GYMKKVEDICRRHGALLIC		253
Aci	LLSVKYTRRMIEEN--YGPEQVAAVITEV	SQAG-SAMPPY-EYI	PQFRKMTKE	LGVLWIN 268
Bme	LLSVKYTRRMIEEN--YGPEQVAAVITEV	SQAG-SAMPPY-EYI	PQIRKMTKE	LGVLWIN 268
TA_Aci_mut	LLSVKYTRRMIEEN--YGPEQVAAVITEV	SQGVG-STMPY-EYV	PQIRKMTKE	LGVLWIS 268
PCR05	-KYASDVHDLIQF--GTSGQVAGF	IGESIQQVGGIV	ELAP-GYLPAA	YDIVRKAGGVCIA 294
P16932_1ZOD	LAELDYAFDLDLDR--QSSGNLAAFAEPIL	SSGGIELPD-GYMAAL	KRCKEARGM	LLIL 242

Fig. 1