

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 245**

51 Int. Cl.:

C12P 13/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2011 PCT/EP2011/062056**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12007548**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2011 E 11733837 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2593556**

54 Título: **Método enzimático para aminación (R)-selectiva**

30 Prioridad:

14.07.2010 EP 10169573

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

17.01.2018

73 Titular/es:

DPx Holdings B.V. (100.0%)

Kabelweg 37

1014 BA Amsterdam, NL

72 Inventor/es:

SCHÜRMAN, MARTIN;

PEETERS, WIJNAND PETER HELENA;

SMEETS, NATASCHA HUBERTINA JOHANNES;

SCHWAB, HELMUT;

STEINER, KERSTIN;

LYPETSKA, KATERYNA MYKOLAYIVNA y

STROHMEIER, GERNOT

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 650 245 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

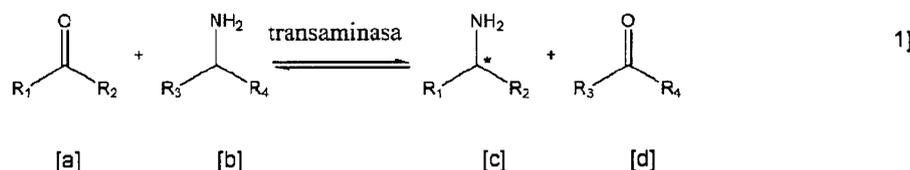
Método enzimático para aminación (R)-selectiva

- 5 La presente invención se refiere a un método para la aminación (R)-selectiva de cetonas y a microorganismos depositados para su uso en este método.

Un número considerable de compuestos farmacéuticamente activos (existentes y en desarrollo) contienen una funcionalidad de amina quiral que no puede derivarse directamente de forma sintética de aminoácidos naturales.

- 10 Según los fabricantes farmacéuticos, la síntesis asimétrica de aminas de cetonas es una de las reacciones más deseables para el futuro (Constable et al., Green Chem. 2007, 9, 411). Además, es un objetivo de los fabricantes farmacéuticos confiar tanto como sea posible en rutas "verdes" en la síntesis de sus compuestos farmacéuticamente activos. Por lo tanto, se prefieren las conversiones biocatalíticas.

- 15 Una ruta atractiva para la producción biocatalítica de aminas quirales es la transaminación estereoselectiva a partir de una cetona y un donante de amina, de acuerdo con la reacción [1]:



- 20 Las enzimas estereoselectivas requeridas (denominadas indistintamente transaminasas, aminotransferasas o aminofrasas) se han indicado, por ejemplo, la ω -transaminasa (S)-selectiva de *Vibrio fluvialis* (Shin et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, 61, 463), aunque las enzimas (S)-selectivas son mucho más abundantes que las enzimas (R)-selectivas.

- 25 Las transaminasas estereoselectivas se han descrito, por ejemplo, en las publicaciones de patentes europeas EP1038953 y EP987332.

El documento EP1038953 se refiere a un ADN que codifica una transaminasa capaz de sintetizar (R)- α -metilbencilamina ópticamente activa en presencia de *sec*-butilamina.

- 30 El documento EP987332 se refiere en particular a una transaminasa de una especie de *Mycobacterium aurum* que puede catalizar la transaminación estereoselectiva de acetofenona y *sec*-butilamina a una (R)- α -metilbencilamina enantioméricamente enriquecida y 2-butanona. La misma transaminasa también se usó para la resolución racémica o (RS)- α -metilbencilamina para obtener (S)- α -metilbencilamina enantioméricamente enriquecida, así como la síntesis de D-alanina y D-serina enantioméricamente enriquecidas.

El documento US7169592 se refiere a un ADN de una especie de *Arthrobacter* que codifica una transaminasa recombinante, que puede catalizar la transaminación (R)-estereoselectiva de varias cetonas en presencia de un donante de amino para producir (R)-aminas enantioméricamente enriquecidas.

- 40 Iwasaki et. al. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006 (69), 499-505) describen una transaminasa R-específica de *Arthrobacter* sp.

- 45 El documento WO 2011/026556 se refiere a una secuencia de aminoácidos de la ω -transaminasa de (R)-selectiva de *Aspergillus terreus*, identificada por la SEQ ID No. 3.

- 50 1 masmdkvfag yaarqailles tettnpfakg iawvegelvp laeariplld qgfmhdsdly
 61 dvpsvwdgrf frlddhitrl easctklrlr lplprdqvkq ilvemvaksg irdafveliv
 121 trglkgvrgt rpedivnnly mfvqpyvwm epdmqrvvgs avvartvrv ppgaidptvk
 181 nlqwgdlvrg mfeaadrkat ypfiltgdah ltegsqgniv lvkdgvlytp drglvqgvtr
 241 ksvinaaeaf gievrvfvp velayrcdei fmcttaggim pittldgmpv nggqigpitk
 301 kiwdgywamh ydaaysfeid ynern

Existe la necesidad de transaminasas estereoselectivas adicionales para poder aplicar reacciones de transaminación estereoselectivas a un espectro más amplio de compuestos.

La presente invención se refiere a un método para la síntesis enzimática de (R) -aminas enantioméricamente enriquecidas de fórmula general [1][c] a partir de las correspondientes cetonas de fórmula general [1][a] usando transaminasas.

Estas transaminasas se seleccionan del grupo que consiste en

- 10 a) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1;
- b) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 3;
- 15 c) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 5;
- d) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 7;
- e) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 9;
- 20 f) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 11;
- g) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 13;
- 25 h) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 15;
- i) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 17;
- j) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 19;
- 30 k) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 21;
- l) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 23;
- 35 m) una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 25;
- n) una proteína que tiene actividad transaminasa y aislada de un microorganismo seleccionado del grupo de organismos que consiste en *Rahnella aquatilis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum tritici*, *Sinorhizobium morelense*, *Curtobacterium pusillum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Microbacterium ginsengisoli*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Pseudomonas citronellolis*, *Yersinia kristensenii*, *Achromobacter spanius*, *Achromobacter insolitus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium frederiksbergense*, *Mycobacterium sacrum*, *Mycobacterium fluoranthenvorans*, *Burkholderia* sp., *Burkholderia tropica*, *Cosmospora episphaeria*, y *Fusarium oxysporum*, con la condición de que las proteínas que se han mencionado anteriormente (es decir, la alternativa (a)) no consistan en una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos n.º 3 del documento WO2011/026556.

45 De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado, en estudios de alineamiento de secuencias usando alineamiento múltiple de secuencias de ClustalW2 en configuraciones predeterminadas (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>, Larkin et al., *Bioinformatics* 2007, 23, 2947), que las transaminasas de SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 y 25 para su uso en esta invención varían en un amplio rango de

50 porcentaje de identidad con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de SEQ ID No. 1 de la transaminasa. Incluso en un porcentaje de identidad de aproximadamente el 30 % con respecto a la SEQ ID No. 1, se encuentran aún transaminasas muy adecuadas de acuerdo con la presente invención.

Los inventores han descubierto, sin embargo, que las transaminasas que pueden usarse en la presente invención (y

55 los mutantes derivados de las mismas) tienen todas en común, que tienen al menos 37 aminoácidos conservados, concretamente, A32, A44, D50, G52, D57, Y60, V65, G68, F71, L73, R79, V106, V116, R122, G123, P145, P177, K180, N181, W184, D186, E213, G216, N218, P230, L235, G237, R240, V243, E269, A276, G277, G278, P281, G296, W307, y Y321, cuando se comparan con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de la SEC ID No. 1 en las posiciones correspondientes a las posiciones anteriores en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1.

Los residuos de aminoácidos de las secuencias de proteínas mutantes o de tipo silvestre correspondientes a las posiciones de los residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de la transaminasa de SEQ ID No. 1 se pueden identificar realizando alineaciones de secuencia múltiple ClustalW2 en la configuración por defecto. Los residuos de aminoácidos, que se colocan en la misma columna como un residuo de aminoácidos de la secuencia de transaminasa que se da en SEQ ID No. 1 en tales alineamientos, se definen como posiciones correspondientes a este residuo de aminoácidos respectivo de la secuencia de transaminasa de SEQ. ID No. 1.

Muestras de cada uno de los microorganismos *Rahnella aquatilis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum tritici*, *Sinorhizobium morelense*, *Curtobacterium pusillum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Microbacterium ginsengisoli*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Pseudomonas citronellolis*, *Yersinia kristensenii*, *Achromobacter spanius*, *Achromobacter insolitus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium frederiksbergense*, *Mycobacterium sacrum*, *Mycobacterium fluoranthenorans*, *Burkholderia* sp., *Burkholderia tropica*, *Cosmospora episphaeria*, y *Fusarium oxysporum* se depositaron en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) en Braunschweig, Alemania, el 13 de julio de 2010.

En las estructuras químicas anteriores [1][a] y [1][c], R₁ y R₂ son diferentes y pueden ser independientemente alifáticos lineales o ramificados, heteroalifáticos, aromáticos, heteroaromáticos o formar una estructura cíclica.

Más en particular, R₁ y R₂ son diferentes y R₁ y R₂ contienen independientemente de 1 a 30 átomos de carbono y R₁ y R₂ son alifáticos independientemente sustituidos o no sustituidos; alifáticos ramificados sustituidos o sin sustituir; alifáticos cíclicos sustituidos o sin sustituir; alifáticos heterocíclicos sustituidos o sin sustituir, que contienen al menos un átomo de oxígeno, azufre o nitrógeno; aromáticos sustituidos o sin sustituir; heteroaromáticos sustituidos o sin sustituir que contienen al menos un átomo de azufre, oxígeno o nitrógeno; o juntos forman una estructura cíclica o una estructura heterocíclica sustituida o sin sustituir, que contiene al menos un átomo de oxígeno, azufre o nitrógeno; en donde los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en, pero sin limitación, un átomo de halógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, grupo hidroxilo, grupo metoxi, monofluorometilo, difluorometilo y trifluorometilo.

Preferiblemente, la concentración final del producto de (R)-amina enantioméricamente enriquecida se encuentra entre el 1 y el 50 % en peso de la mezcla de reacción. Mucho más preferiblemente, la concentración final del producto de (R)-amina enantioméricamente enriquecida se encuentra entre el 5 y el 35 % en peso de la mezcla de reacción.

Un proceso de acuerdo con esta invención puede realizarse en una mezcla de reacción acuosa con todas las reacciones disueltas o en suspensiones con algunos de los reactivos al menos parcialmente disueltos y algunas de las reacciones al menos parcialmente como material sólido.

El uso de un disolvente no miscible en agua, tal como un disolvente orgánico que forma una segunda fase líquida junto a la fase acuosa tamponada que contiene una transaminasa, puede ser ventajoso en reacciones de transaminasas frente a reacciones en suspensión meramente acuosas o acuosas, ya que el disolvente orgánico puede actuar como depósito para cetonas poco solubles en el agua y donantes de amino. Puede aumentar la velocidad de transferencia de masa para la disolución de cetonas poco solubles en agua o donantes amino en la fase acuosa que contiene la transaminasa en comparación con las reacciones en suspensión (sólido-acuoso). Además, puede reducir la inhibición potencial del sustrato o del producto mediante la eliminación por extracción de estos inhibidores potenciales. Además, dicha eliminación por extracción de al menos uno de los productos de reacción de transaminasa puede llevar el equilibrio de la reacción transaminasa en la fase acuosa al lado del producto, mejorando de este modo el rendimiento y/o la eficacia de la reacción catalizada por transaminasa.

Un proceso de acuerdo con esta invención puede realizarse en una mezcla de reacción que comprende una fase acuosa y una segunda fase orgánica. En caso de que se use una mezcla de reacción que comprenda una fase acuosa y una segunda fase orgánica, la mezcla de reacción comprende preferiblemente una fase acuosa y una segunda fase orgánica y la relación volumétrica de agua:fase orgánica está entre 100 y 0,01. Mas preferiblemente, la mezcla de reacción comprende una fase acuosa y una segunda fase orgánica, y la relación volumétrica del agua:fase orgánica está entre 20 y 0,1. Mucho más preferiblemente, la mezcla de reacción comprende una fase acuosa y una segunda fase orgánica, y la relación volumétrica del agua:fase orgánica está entre 20 y 1.

Los disolventes orgánicos adecuados pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo de, pero sin limitación, ciclohexanona, diclorometano, pentano, heptano, MTBE (metil-*terc*-butiléter), tolueno, 2-metil-tetrahidrofurano,

acetato de butilo y acetato de etilo.

Las transaminasas a) a m) anteriores para su uso en esta invención se han identificado en búsquedas de bases de datos en bases de datos públicas de nucleótidos y polipéptidos como EMBL/GenBank/DDBJ, Swiss-Prot/UniProtKB
5 (lanzado el 15 de junio de 2010), RefSeq o no redundante a través de los servidores EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) anotados como "proteína hipotética" con la mayor similitud con las aminotransferasas de L-aminoácidos de cadena ramificada o 4-amino-4-desoxicorismato liasas (EC4.1.3.38) pertenecientes a la superfamilia de las enzimas dependientes de piridoxal 5'-fosfato de clase IV (PLPDE_IV). La actividad y expresión funcional hasta ahora no han sido informadas para soportar la anotación.

10

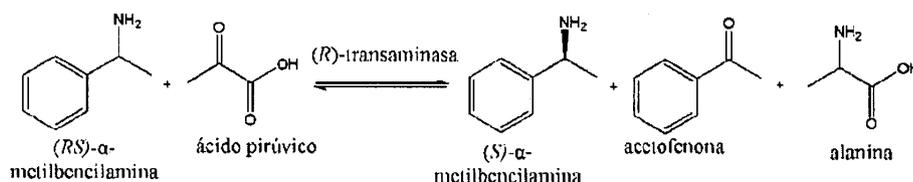
Sorprendentemente, se ha encontrado que las transaminasas a) a m) son de hecho ω -transaminasas (*R*)-selectivas en lugar de aminotransferasas de aminoácidos (*S*)-selectivas como se describirá a continuación. Además, las transaminasas a) a m) difieren en el espectro del sustrato de las (*R*)-transaminasas descritas en los documentos EP1038953, EP987332 y US7169592.

15

Las transaminasas a) a n) anteriores para su uso en esta invención se han caracterizado por su actividad y enantioselectividad en una o más de las siguientes conversiones de ω -transaminasas:

(i) Resolución racémica de (*RS*)- α -metilbencilamina.

20



La enantioselectividad de enzimas en general y las transaminasas específicamente, puede determinarse en una resolución racémica de una mezcla racémica de un sustrato que comprende un centro quiral. Una transaminasa (*R*)-selectiva para su uso en esta invención es una enzima que somete a transaminación preferiblemente (*R*)- α -metilbencilamina (MBA) a partir de MBA racémico en presencia de un sustrato de cetona tal como ácido pirúvico. Una (*R*)-transaminasa para su uso en esta invención es una enzima que convierte preferiblemente el enantiómero (*R*) en el enantiómero (*S*) de α -metilbencilamina en presencia de ácido pirúvico que da como resultado el enriquecimiento del enantiómero (*S*) restante con un exceso enantiomérico (e.e.) de al menos el 10 %.
25 Preferiblemente, el e.e. resultante de (*S*)-MBA es al menos del 50 %. Más preferiblemente, el e.e. es al menos del 60 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 70 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 80 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 90 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 95 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 97 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 98 %. Mucho más preferiblemente, el e.e. es al menos del 99 %.
30
35

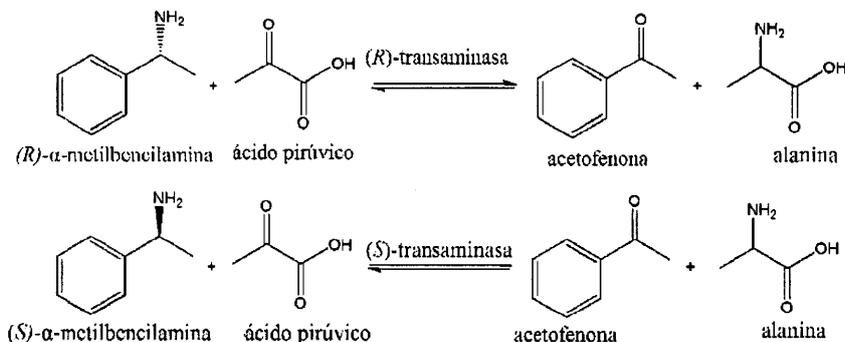
Típicamente, se hacen reaccionar 80 mM de α -metilbencilamina (MBA) racémica con piruvato sódico 40 mM en tampón de fosfato de potasio 100 mM (KPi) a pH 7,0 que contiene piridoxal 5'-fosfato (PLP) 0,1 mM a 28 °C durante 20 h en presencia de una transaminasa. Las concentraciones y excesos enantioméricos de (*R*) y/o (*S*)-MBA pueden determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC) con materiales de columna quirales adecuados. La formulación de la (*R*)-transaminasa no es crítica; se puede añadir como enzima (parcialmente) purificada, extracto libre de células (CFE) o extracto de células en bruto; forma líquida, en polvo o inmovilizada; células permeabilizadas, células enteras o caldo de cultivo que contienen células que comprenden la transaminasa o en cualquier otra forma.
40
45

(ii) Actividad y selectividad en los enantiómeros puros de α -metilbencilamina.

La enantioselectividad de una enzima también se caracteriza por sus actividades específicas hacia los enantiómeros individuales de un sustrato específico. Estos se pueden determinar en ensayos de actividad separados con las formas enantiopuras individuales del sustrato. De acuerdo con esta invención, las actividades de transaminasa específicas hacia los dos enantiómeros de α -metilbencilamina (MBA) son una medida para la (*R*)-selectividad de una transaminasa. En el contexto de esta invención, la relación de las actividades específicas en (*R*)-MBA sobre las actividades específicas en (*S*)-MBA se define como el valor de enantioselectividad de transaminasa (TEV). Una
50

transaminasa (R)-selectiva se define como una transaminasa con un valor TEV de >1. Una buena (R)-selectividad de una transaminasa se define como una relación de actividad específica en (R) sobre (S)-MBA de TEV ≥ 10 . Una alta (R)-selectividad de una transaminasa se define como una relación de actividad específica en (R) sobre (S)-MBA de TEV ≥ 100 .

5



Las actividades específicas de transaminasas en (R) y (S)-MBA se determinan por separado usando un ensayo espectrofotométrico. En un volumen de reacción final de 1 ml, se mezclan 50 μl de una dilución adecuada de una transaminasa en forma líquida en una cubeta con (R) o (S)-MBA 12,5 mM y piruvato sódico 5 mM en presencia de tampón KPi 50 mM a pH 7,5 que contiene PLP 0,1 mM. Las reacciones se inician mediante la adición de 10 μl de piruvato sódico 0,5 M (en tampón KPi 50 mM a pH 7,5, PLP 0,1 mM) a los otros componentes del ensayo, después de la preincubación a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Después de la adición de piruvato sódico, se registra la absorción a 300 nm y la actividad transaminasa en las muestras se calcula según la ley de Lambert-Beer utilizando el coeficiente de extinción molar para acetofenona a 300 nm de $\epsilon = 0,28 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$. Una unidad (U) de actividad transaminasa se define como 1 μmol de acetofenona formada a partir de (R)-MBA o (S)-MBA 12,5 mM y piruvato sódico 5 mM a 30 $^{\circ}\text{C}$ en tampón KPi 50 mM a pH 7,5 que contiene PLP 0,1 mM por minuto. Las actividades de transaminasas específicas del CFE (U/mg de proteína CFE total) se calculan dividiendo los valores de actividad volumétrica (U/ml de CFE) por la concentración total de proteína en la muestra de transaminasa líquida. El valor de enantioselectividad de transaminasas (TEV) se calcula dividiendo la actividad volumétrica o específica en (R)-MBA por la actividad volumétrica o específica, respectivamente, en (S)-MBA.

Preferiblemente, la (R)-transaminasa tiene un TEV de al menos 1, más preferiblemente la (R)-transaminasa tiene un TEV de al menos 10, incluso más preferiblemente la (R)-transaminasa tiene un TEV de al menos 100.

(iii) Síntesis de (R)-aminas enantioméricamente enriquecidas de las cetonas correspondientes y donantes de aminoácidos adecuados tales como benzilamina o α -metilbenzilamina.

El resultado deseado típico de una reacción catalizada por una transaminasa (R)-selectiva es la formación de una (R)-amina enantioméricamente enriquecida de acuerdo con la fórmula 1[c] de un donante amino y un sustrato de cetona. Los donadores amino adecuados para las reacciones de transaminasas (R)-selectivas comprenden, por ejemplo, MBA racémica o (R)-MBA, 1-aminoindano racémico o (R)-1-aminoindano, 1-aminotetralina racémico o (R)-1-aminotetralina, alanina racémica o D-alanina, isopropilamina, benzilamina, sec-butilamina racémica o (R)-sec-butilamina (2-aminobutano), β -alanina o ácido racémico o D-3-aminobutírico.

Generalmente, con una transaminasa particular, se prefieren ciertos donantes amino. Sorprendentemente, se ha encontrado que con la transaminasa de SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 23, y SEQ ID No. 43 los donantes amino preferidos son MBA racémicos o (R)-MBA o sec-butilamina racémica o (R)-sec-butilamina.

Típicamente 70 mM de donante amino se hace reaccionar con 70 mM de sustrato de cetona en presencia de una (R)-transaminasa en una mezcla de reacción acuosa tamponada con fosfato de potasio 100 mM (KPi) a pH 7,5 a 28 $^{\circ}\text{C}$. Opcionalmente, se pueden usar disolventes miscibles con agua o inmiscibles para solubilizar el donante amino o sustrato de cetona. Una transaminasa (R)-selectiva para su uso en esta invención mostrará al menos una baja conversión de al menos el 0,5 % a la (R)-amina enantioméricamente enriquecida deseada a partir de cantidades equimolares de donante amino y el sustrato cetona con (R)-amina enantioméricamente enriquecida que tiene un exceso enantiomérico de al menos el 50 % después de una reacción de una noche a 28 $^{\circ}\text{C}$. La forma de la (R)-

transaminasa no es importante; se puede agregar como una enzima (parcialmente) purificada, extracto libre de células, o extracto celular en bruto; forma líquida, en polvo o inmovilizada; células permeabilizadas, células enteras o caldo de cultivo que contiene células que comprenden la transaminasa o en cualquier otra forma.

- 5 Es conocido por el experto en la técnica que las reacciones de transaminasa son reacciones reversibles y el grado de conversión está influido por el equilibrio de los sustratos y productos específicos. Adicionalmente se conoce por el experto en la técnica que el grado de conversión de sustrato a concentraciones equimolares de donante de amino y sustrato de cetona pueden aumentarse, por ejemplo, mediante eliminación de producto *in situ* mediante la evaporación de uno de los productos de reacción o usando resinas, o adición de enzimas que adicionalmente
10 convierten uno de los productos de reacción tal como piruvato descarboxilasa o lactato deshidrogenasa. Adicionalmente se sabe que el grado de conversión del sustrato de cetona 1[a] en el producto de amina 1[c] puede aumentarse por un exceso de donante de amino 1[b].

- Preferiblemente, la (*R*)-amina enantioméricamente enriquecida producida tiene un e.e. de al menos el 50 %. Más
15 preferiblemente, el e.e. es al menos del 60 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 70 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 80 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 90 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 95 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 96 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 97 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 98 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 99 %. Mucho más preferiblemente, la (*R*)-amina
20 enantioméricamente enriquecida producida tiene un e.e. de más del 99 %.

- En la presente solicitud, "una proteína que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de (una secuencia de referencia)" significa que dicha proteína es un homólogo de la secuencia de referencia respectiva que tiene una secuencia de aminoácidos, que es para al menos el 90 % idéntica a la secuencia
25 de aminoácidos de la secuencia de referencia como se determina en alineamientos de secuencias realizados con herramientas de alineamiento de secuencias tales como BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) o Align Plus 5 (Scientific & Educational Software, Cary, NC, Estados Unidos).

- El término "homólogo" se usa en el presente documento en particular para polinucleótidos o polipéptidos que tienen
30 una identidad de secuencias de al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 65 %, más preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, en particular al menos el 85 %, más en particular al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 %. El término homólogo también pretende incluir secuencias de ácidos nucleicos (secuencias de polinucleótidos) que se diferencian de otra
35 secuencia de ácidos nucleicos debido a la degeneración del código genético y codifican la misma secuencia de polipéptidos.

- Identidad o similitud de secuencias se define en el presente documento como una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de ácidos nucleicos, como se determina comparando las
40 secuencias. Normalmente, las identidades o similitudes de secuencia se comparan con respecto a la longitud completa de las secuencias, pero sin embargo, también pueden compararse sólo una parte de las secuencias que se alinean entre sí. En la materia, "identidad" o "similitud" también se refiere al grado de vinculación de secuencias entre secuencias de polipéptidos o secuencias de ácidos nucleicos, como pueda ser el caso, como se determina por el apareamiento entre dichas secuencias. Los métodos preferidos para determinar la identidad o similitud se diseñan
45 para dar el mayor apareamiento entre las secuencias ensayadas. En el contexto de esta invención, un método de programa informático preferido para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluye BLASTP y BLASTN (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 1990, 215, 403-410, públicamente disponible en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, MD, USA). Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de polipéptidos usando BLASTP son apertura de huecos 10,0, extensión de huecos 0,5,
50 matriz Blosum 62. Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos usando BLASTN son apertura de huecos 10,0, extensión de huecos 0,5, matriz completa de ADN (matriz de identidad de ADN).

- La transaminasa para su uso en esta invención puede usarse de cualquier forma. Por ejemplo, la transaminasa
55 puede usarse - por ejemplo en forma de una dispersión, una solución o en forma inmovilizada - como enzima bruta, como una enzima comercialmente disponible, como una enzima purificada adicionalmente a partir de una preparación comercialmente disponible, como una enzima obtenida de su fuente por una combinación de procedimientos de purificación conocidos, en células completas (opcionalmente permeabilizadas y/o inmovilizadas) que naturalmente o mediante modificación genética poseen la actividad de transaminasa requerida, o en un lisado

de células con tal actividad.

Una célula que comprende una transaminasa en un procedimiento de la invención puede construirse usando técnicas de biología molecular que se conocen en la técnica *per se*. Por ejemplo, si una transaminasa va a producirse en un sistema heterólogo, tales técnicas pueden usarse para proporcionar un vector que comprende un gen que codifica una transaminasa.

Un gen que codifica un polipéptido con actividad de transaminasa puede adaptarse al uso de codón preferido de la célula huésped usada para la producción del polipéptido para mejorar el nivel de expresión del polipéptido. Un procedimiento adecuado para lograr una adaptación tal es, por ejemplo, la optimización de pares de codones como se describe en el documento WO08000632.

Un vector que comprende un gen tal puede comprender uno o más elementos reguladores, por ejemplo, uno o más promotores, que pueden ligarse operativamente a un gen que codifica una transaminasa. Los ejemplos de tales vectores comprenden plásmidos como pBAD/*Myc*-HisC, pBAD-DEST49, pET-DEST42 (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), plásmidos de las series pET, por ejemplo, pET-26b(+) (Novagen, Nottingham, RU) o pMS470Δ8 (Balzer et al., *Nucleic Acids Research*, 1992, 20 (8): 1851-1858).

Como se usa en el presente documento, el término "operativamente ligado" se refiere a un enlace de elementos de polinucleótido (o secuencias codificantes o secuencia de ácidos nucleicos) en una relación funcional. Una secuencia de ácidos nucleicos está "operativamente ligada" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia codificante.

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, localizados en la dirección 5' con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen, y está estructuralmente identificado por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de la transcripción y muchas otras secuencias de ADN que incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a factor de transcripción, sitios de unión a proteína represora y activadora y cualquier otras secuencias de nucleótidos conocidas para un experto en la materia por actuar directamente o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones medioambientales y en desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación medioambiental y en desarrollo. El término "homólogo" cuando se usa para indicar la relación entre una molécula de ácido nucleico o polipéptido (recombinante) dada y un organismo huésped o célula huésped dada se entiende que significa que en la naturaleza la molécula de ácido nucleico o polipéptido es producida por una célula huésped u organismos de la misma especie, preferentemente de la misma variedad o cepa.

El promotor que podría usarse para lograr la expresión de las secuencias de nucleótidos que codifican una enzima para su uso en un procedimiento de la invención, en particular una transaminasa, tal como se describe en el presente documento anteriormente, puede ser nativo a la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima a expresarse, o puede ser heterólogo a la secuencia de nucleótidos (secuencia codificante) con la que está operativamente ligado. Preferentemente, el promotor es homólogo, es decir, endógeno a la célula huésped.

Si se usa un promotor heterólogo (a la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de interés), el promotor heterólogo puede producir preferentemente un mayor nivel en estado estacionario del transcrito que comprende la secuencia codificante (o puede producir más moléculas de transcrito, es decir, moléculas de ARNm, por unidad de tiempo) que el promotor que es nativo a la secuencia codificante. Los promotores adecuados en este contexto incluyen tanto promotores naturales constitutivos como inducibles, además de promotores manipulados, que son muy conocidos para el experto en la técnica.

Un "promotor constitutivo fuerte" es uno que produce ARNm que va a iniciarse a alta frecuencia en comparación con una célula huésped nativa.

Los ejemplos de tales promotores constitutivos fuertes en microorganismos Gram-positivos incluyen SP01-26, SP01-15, *veg*, *pyc* (promotor de piruvato carboxilasa) y *amyE*.

Los ejemplos de promotores inducibles en microorganismos Gram-positivos incluyen el promotor Pspac inducible con IPTG, el promotor PxyIA inducible con xilosa.

Los ejemplos de promotores constitutivos e inducibles en microorganismos Gram-negativos incluyen, pero sin limitación, *tac*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *laclq*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara* (*P_{BAD}*), SP6, λ -Pr, y λ -PL.

- 5 Los ejemplos de promotores constitutivos e inducibles en microorganismos eucariotas tales como levaduras y hongos incluyen, pero sin limitación, el promotor AOX, GAP y TEF.

El término "heterólogo" cuando se usa con respecto a un ácido nucleico (ADN o ARN) o proteína se refiere a un ácido nucleico o proteína que no se produce naturalmente como parte del organismo, célula, genoma o secuencia de ADN o ARN en que el que está presente, o que se encuentra en una célula o localización o localizaciones en el genoma o secuencia de ADN o ARN que se diferencian de los que se encuentran en la naturaleza. Los ácidos nucleicos o proteínas heterólogos no son endógenos a la célula en la que se introducen, pero han sido obtenidos de otra célula o se producen sintéticamente o recombinantemente. Generalmente, aunque no es necesario, tales ácidos nucleicos codifican proteínas que normalmente no son producidas por la célula en la que el ADN se transcribe o expresa. De forma similar, el ARN exógeno codifica proteínas normalmente no expresadas en la célula en la que el ARN exógeno está presente. Los ácidos nucleicos y proteínas heterólogos también pueden denominarse ácidos nucleicos o proteínas extraños. Cualquier ácido nucleico o proteína que un experto en la materia reconozca como heterólogo o extraño a la célula en la que se expresa está englobado en el presente documento por el término ácido nucleico o proteína heteróloga.

20 La célula huésped o microorganismo puede seleccionarse en particular del grupo de géneros que consiste en *Aspergillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Saccharomyces*, *Pseudomonas*, *Gluconobacter*, *Penicillium*, y *Pichia*. En particular, la cepa huésped y, por tanto, la célula huésped adecuada para la producción de una transaminasa, puede seleccionarse del grupo de células huésped de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, y *Pichia pastoris*.

Las proteínas que tienen actividad de transaminasa mencionadas anteriormente en n) son producidas por microorganismos presentes en muestras de tierra recogidas de Países Bajos y Alemania. Estos microorganismos se enriquecieron de estas muestras de tierra en un medio de cultivo usando una (R)-amina como única fuente de nitrógeno para el microorganismo para el crecimiento. Para este fin se usaron las seis siguientes (R)-aminas estructuralmente diversas como única fuente de nitrógeno: (R)-2-aminobutano, (R)-3,3-dimetil-2-aminobutano, (R)- α -metilbencilamina, (R)- α -etilbencilamina, (R)-1-aminoindano y (R)-1-aminotetralina.

35 Posterior al enriquecimiento en medio líquido, los microorganismos se aislaron sobre placas de agar que contenían la (R)-amina respectiva como única fuente de nitrógeno, de nuevo se cultivaron cultivos puros en el medio de enriquecimiento líquido respectivo y se usaron para reacciones de transaminasa en sistemas de células completas. Las conversiones y excesos enantioméricos resultantes de las (R)-aminas producidas se monitorizaron por análisis de HPLC o CG.

40 El resultado deseado típico de una reacción catalizada por una transaminasa (R)-selectiva es la formación de una (R)-amina enantioméricamente enriquecida de acuerdo con la fórmula 1[c] de un donante amino y un sustrato de cetona. Los donantes amino adecuados para las reacciones de transaminasas (R)-selectivas comprenden, por ejemplo, MBA racémica o (R)-MBA, 1-aminoindano racémico o (R)-1-aminoindano, 1-aminotetralina racémico o (R)-1-aminotetralina, alanina racémica o D-alanina, isopropilamina, bencilamina, sec-butilamina racémica o (R)-sec-butilamina (2-aminobutano), β -alanina o ácido racémico o D-3-aminobutírico.

Típicamente se hacen reaccionar 80 mM de donante de amino con 40 mM de sustrato de cetona en presencia de una (R)-transaminasa en una mezcla de reacción acuosa tamponada con fosfato de potasio (KPi) 100 mM a pH 7,5 a 28 °C. Preferentemente, al menos 100 mM de sustrato de cetona se usan en presencia de una (R)-transaminasa en una mezcla de reacción acuosa tamponada con fosfato de potasio 100 mM (KPi) a pH 7,5 a 28 °C. Opcionalmente pueden usarse disolventes miscibles o inmiscibles en agua para solubilizar el donante de amino o sustrato de cetona. Una transaminasa (R)-selectiva según la presente invención presentará al menos baja conversión del 0,5 % en la (R)-amina enantioméricamente enriquecida deseada a partir de cantidades equimolares de donante de amino y sustrato de cetona con la (R)-amina enantioméricamente enriquecida que tiene un exceso enantiomérico de al menos el 50 % después de la reacción durante la noche a 28 °C.

La forma de la (R)-transaminasa no es crítica; se puede añadir como enzima (parcialmente) purificada, extracto libre de células o extracto de células en bruto; forma líquida, en polvo o inmovilizada; células permeabilizadas, células enteras o caldo de cultivo que contienen células que comprenden la transaminasa o en cualquier otra forma.

Es conocido por el experto en la técnica que las reacciones de transaminasa son reacciones reversibles y el grado de conversión está influido por el equilibrio de los sustratos y productos específicos. Adicionalmente se conoce por el experto en la técnica que el grado de conversión de sustrato a concentraciones equimolares de donante de amino y sustrato de cetona pueden aumentarse, por ejemplo, mediante eliminación de producto *in situ* mediante la evaporación de uno de los productos de reacción o usando resinas, o adición de enzimas que adicionalmente convierten uno de los productos de reacción tal como piruvato descarboxilasa o lactato deshidrogenasa.

Preferiblemente, la (*R*)-amina enantioméricamente enriquecida producida tiene un e.e. de al menos el 50 %. Más preferiblemente, el e.e. es al menos del 60 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 70 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 80 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 90 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 95 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 96 %. Incluso más preferiblemente, el e.e. es al menos del 97 %. Mucho más preferiblemente, la (*R*)-amina enantioméricamente enriquecida producida tiene un e.e. de al menos el 99 %.

15

El resultado final fue una colección de 31 microorganismos, que se caracterizaron como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Los depósitos en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) en Braunschweig, Alemania, se hicieron el 13 de julio de 2010

Código	Microorganismo (nombre científico)	Número de depósito de DSMZ
3Na	<i>Rahnella aquatilis</i>	DSM 23797
3Kb	<i>Rahnella aquatilis</i>	no aplicable
3Ba	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	no aplicable
3Db	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	DSM 23793
3H1	<i>Sinorhizobium morelense</i>	DSM 23794
5BaB	<i>Curtobacterium pusillum</i>	DSM 23787
5BaS	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	DSM 23771
2A2	<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	no aplicable
2Ca	<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	no aplicable
2Cb	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	no aplicable
2M1	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	DSM 23795
2Da	<i>Yersinia kristensenii</i>	DSM 23792
2K1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	no aplicable
6Ab	<i>Ochrobactrum tritici</i>	DSM 23786
6Bb	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	DSM 23789
6I	<i>Achromobacter spanius</i>	DSM 23791
6F	<i>Achromobacter spanius</i>	no aplicable
1Ea	<i>Achromobacter insolitus</i>	DSM 23790
1Ia	<i>Mycobacterium frederiksbergense</i>	DSM 23798
1Ib	<i>Mycobacterium sacrum</i>	DSM 23785
1Eb	<i>Mycobacterium fluoranthenvivorans</i>	no aplicable
1A2	<i>Mycobacterium fluoranthenvivorans</i>	no aplicable
1Nb	<i>Mycobacterium fluoranthenvivorans</i>	DSM 23796
1Ja	<i>Mycobacterium fluoranthenvivorans</i>	no aplicable
1A1	<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	DSM 23784
4D1	<i>Burkholderia</i> sp.	no aplicable
4F1	<i>Burkholderia tropica</i>	DSM 23799
4Bd	<i>Cosmospora episphaeria</i>	DSM 23772
4I	<i>Rahnella aquatilis</i>	no aplicable
4Ba	<i>Fusarium oxysporum</i>	DSM 23770
4Bc	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	DSM 23788

20

Para la síntesis de (*R*)-aminotetralina enantioméricamente enriquecida a partir de tetralona se usa preferentemente el microorganismo *Sinorhizobium morelense*, *Rahnella aquatilis* u *Ochrobactrum anthropi* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies. Más preferentemente, el microorganismo *Rahnella aquatilis* u *Ochrobactrum anthropi* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies. Mucho más preferentemente se usa el microorganismo *Ochrobactrum anthropi* o una transaminasa obtenible de esta especie.

25

Para la síntesis de (R)-aminoindano enantioméricamente enriquecido a partir de indanona se usa preferentemente el microorganismo *Paecilomyces lilacinus* o *Curtobacterium pusillum* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies. Mucho más preferiblemente se usa el microorganismo *Curtobacterium pusillum* o una transaminasa
5 obtenible de esta especie.

Para la síntesis de (R)- α -etilbencilamina enantioméricamente enriquecida a partir de propiofenona se usa preferentemente el microorganismo *Microbacterium ginsengisoli*, *Yersinia kristensenii*, *Pseudomonas citronellolis* u *Ochrobactrum anthropi* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies. Más preferentemente se usa
10 el microorganismo *Yersinia kristensenii*, *Pseudomonas citronellolis* u *Ochrobactrum anthropi* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies. Incluso más preferiblemente se usa el microorganismo *Pseudomonas citronellolis* u *Ochrobactrum anthropi* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies. Mucho más preferiblemente se usa el microorganismo *Ochrobactrum anthropi* o una transaminasa obtenible de esta especie.

15 Para la síntesis de (R)- α -metilbencilamina enantioméricamente enriquecida a partir de acetofenona se usa preferentemente el microorganismo *Mycobacterium fortuitum*, *Ochrobactrum tritici* o *Achromobacter spanius* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies. Más preferentemente se usa el microorganismo *Ochrobactrum tritici* o *Achromobacter spanius* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies. Mucho más preferiblemente se usa el microorganismo *Achromobacter spanius* o una transaminasa obtenible de esta
20 especie.

Para la síntesis de (R)-3,3-dimetil-2-aminobutano enantioméricamente enriquecido a partir de 3,3-dimetil-2-butanona se usa preferiblemente un microorganismo del género *Mycobacterium* o una transaminasa obtenible de este género. Más preferiblemente se usa un microorganismo del grupo de *Mycobacterium frederiksbergense*, *Mycobacterium
25 sacrum* o *Mycobacterium fluoranthenvivorans*, o una transaminasa obtenible de una de estas especies, respectivamente. Incluso más preferiblemente se usa el microorganismo *Microbacterium ginsengisoli* o *Achromobacter insolitus* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies. Mucho más preferiblemente se usa el microorganismo *Achromobacter insolitus* o una transaminasa obtenible de esta especie.

30 Para la síntesis de (R)-2-aminobutano enantioméricamente enriquecido a partir de 2-butanona se usa preferentemente un microorganismo del género *Burkholderia* o una transaminasa obtenible de este género. Más preferentemente se usa un microorganismo del grupo de *Cosmospora episphaeria* o *Fusarium oxysporum* o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies, respectivamente. Incluso más preferiblemente se usa el microorganismo *Microbacterium trichothecenolyticum* o una transaminasa obtenible de esta especie. Mucho más
35 preferiblemente se usa un microorganismo del grupo de *Burkholderia sp.*, *Burkholderia tropica* o *Rahnella aquatilis*, o una transaminasa obtenible de cualquiera de estas especies, respectivamente.

El reaslamiento de los microorganismos individuales de los conjuntos depositados puede lograrse sembrando diluciones adecuadas de los microorganismos reunidos y volviendo a extender sobre el medio de enriquecimiento selectivo que contiene la (R)-amina respectiva, en la que se han enriquecido originalmente. El volver a extender de
40 forma repetida sobre la (R)-amina respectiva que contiene medio de enriquecimiento selectivo se realiza hasta que sólo se obtienen colonias de morfología uniforme. Posteriormente se realiza la secuenciación de ARNr 16S o ARNr D2-LSU, por ejemplo, usando el sistema MicroSEQ® validado (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), para identificar de nuevo los microorganismos individuales.

45 Las transaminasas obtenibles de las cepas en la Tabla 1 incluyen enzimas derivadas de secuencias de genes de transaminasa de las cepas en la Tabla 1. Estas secuencias de genes pueden identificarse y aislarse por diversos métodos conocidos para el experto en la técnica, tales como secuenciación del genoma y comparación de secuencias con secuencias de transaminasa conocidas, aislamiento de ADN y usando sondas con secuencias de
50 ADN que tienen un alto grado de identidad (al menos el 80 %) con genes de transaminasa conocidos, purificación de enzimas y secuenciación de enzimas, transformación de ADN derivado de estas cepas en otros organismos huésped y selección para el crecimiento sobre (R)-aminas seguido de secuenciación de ADN, o combinaciones de estos enfoques (Ausubel et al., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York 1987).

55 Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un microorganismo depositado que comprende una enzima que tiene actividad (R)-transaminasa del grupo de organismos que consiste en *Ochrobactrum anthropi* (depositado como DSM 23793), *Ochrobactrum tritici* (depositado como DSM 23786), *Sinorhizobium morelense* (depositado como DSM 23794), *Curtobacterium pusillum* (depositado como DSM 23787), *Paecilomyces lilacinus*

(depositado como DSM 23771), *Microbacterium ginsengisoli*, *Microbacterium trichothecenolyticum* (depositado como DSM 23788), *Pseudomonas citronellolis* (depositado como DSM 23795), *Yersinia kristensenii* (depositado como DSM 23792), *Achromobacter insolitus* (depositado como DSM 23790), *Mycobacterium fortuitum* (depositado como DSM 23789), *Mycobacterium frederiksbergense* (depositado como DSM 23798), *Mycobacterium sacrum* (depositado como DSM 23785), *Mycobacterium fluoranthenvorans* (depositado como DSM 23796), *Burkholderia* sp., *Burkholderia tropica* (depositado como DSM 23799), *Cosmospora episphaeria* (depositado como DSM 23772), y *Fusarium oxysporum* (depositado como DSM 23770).

Por consiguiente, un aspecto adicional de la descripción se refiere a un microorganismo que comprende una enzima que tiene actividad (R)-transaminasa seleccionada del grupo que consiste en Cpu-TA1 [SEQ ID No.30], Cpu-TA2 [SEQ ID No.33], Cpu-TA3 [SEQ ID No.35], Raq-TA2 [SEQ ID No.38], Raq-TA3 [SEQ ID No.40], Asp-TA1 [SEQ ID No.43] y Mgi-TA1 [SEQ ID No. 46] o una proteína que tiene al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, preferiblemente al menos un 92 %, preferiblemente al menos un 93 %, preferiblemente al menos un 94 %, preferiblemente al menos un 95 %, preferiblemente al menos un 96 %, preferiblemente al menos un 97 %, preferiblemente al menos un 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad con cualquiera de estas secuencias de aminoácidos.

Por consiguiente, un aspecto adicional se refiere a un polipéptido que tiene actividad (R)-transaminasa y puede obtenerse a partir de un organismo seleccionado del grupo que organismos que consiste en *Rahnella aquatilis* (depositado como DSM 23797), *Ochrobactrum anthropi* (depositado como DSM 23793), *Ochrobactrum tritici* (depositado como DSM 23786), *Sinorhizobium morelense* (depositado como DSM 23794), *Curtobacterium pusillum* (depositado como DSM 23787), *Paecilomyces lilacinus* (depositado como DSM 23771), *Microbacterium ginsengisoli*, *Microbacterium trichothecenolyticum* (depositado como DSM 23788), *Pseudomonas citronellolis* (depositado como DSM 23795), *Yersinia kristensenii* (depositado como DSM 23792), *Achromobacter spanius* (depositado como DSM 23791), *Achromobacter insolitus* (depositado como DSM 23790), *Mycobacterium fortuitum* (depositado como DSM 23789), *Mycobacterium frederiksbergense* (depositado como DSM 23798), *Mycobacterium sacrum* (depositado como DSM 23785), *Mycobacterium fluoranthenvorans* (depositado como DSM 23796), *Burkholderia* sp., *Burkholderia tropica* (depositado como DSM 23799), *Cosmospora episphaeria* (depositado como DSM 23772), y *Fusarium oxysporum* (depositado como DSM 23770).

Por consiguiente, un aspecto adicional se refiere a un polipéptido que tiene actividad (R)-transaminasa y al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, preferiblemente al menos un 92 %, preferiblemente al menos un 93 %, preferiblemente al menos un 94 %, preferiblemente al menos un 95 %, preferiblemente al menos un 96 %, preferiblemente al menos un 97 %, preferiblemente al menos un 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene actividad (R)-transaminasa y obtenible a partir de organismo seleccionado del grupo que organismos que consisten en *Rahnella aquatilis* (depositado como DSM 23797), *Ochrobactrum anthropi* (depositado como DSM 23793), *Ochrobactrum tritici* (depositado como DSM 23786), *Sinorhizobium morelense* (depositado como DSM 23794), *Curtobacterium pusillum* (depositado como DSM 23787), *Paecilomyces lilacinus* (depositado como DSM 23771), *Microbacterium ginsengisoli*, *Microbacterium trichothecenolyticum* (depositado como DSM 23788), *Pseudomonas citronellolis* (depositado como DSM 23795), *Yersinia kristensenii* (depositado como DSM 23792), *Achromobacter spanius* (depositado como DSM 23791), *Achromobacter insolitus* (depositado como DSM 23790), *Mycobacterium fortuitum* (depositado como DSM 23789), *Mycobacterium frederiksbergense* (depositado como DSM 23798), *Mycobacterium sacrum* (depositado como DSM 23785), *Mycobacterium fluoranthenvorans* (depositado como DSM 23796), *Burkholderia* sp., *Burkholderia tropica* (depositado como DSM 23799), *Cosmospora episphaeria* (depositado como DSM 23772), and *Fusarium oxysporum*(depositado como DSM 23770).

Por consiguiente, un aspecto adicional se refiere a un polipéptido que tiene actividad (R)-transaminasa seleccionada del grupo que consiste en Cpu-TA1 [SEQ ID No.30], Cpu-TA2 [SEQ ID No.33], Cpu-TA3 [SEQ ID No.35], Raq-TA2 [SEQ ID No.38], Raq-TA3 [SEQ ID No.40], Asp-TA1 [SEQ ID No.43] y Mgi-TA1 [SEQ ID No. 46] o una proteína que tiene al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, preferiblemente al menos un 92 %, preferiblemente al menos un 93 %, preferiblemente al menos un 94 %, preferiblemente al menos un 95 %, preferiblemente al menos un 96 %, preferiblemente al menos un 97 %, preferiblemente al menos un 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad con cualquiera de estas secuencias polipeptídicas.

Por consiguiente, un aspecto adicional se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene actividad (R)-transaminasa y al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, preferiblemente al menos un 92 %, preferiblemente al menos un 93 %, preferiblemente al menos un 94 %, preferiblemente al menos un 95 %, preferiblemente al menos un 96 %, preferiblemente al menos un 97 %, preferiblemente al menos un 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad con cualquiera de estas secuencias polipeptídicas.

preferiblemente al menos un 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene actividad (R)-transaminasa y obtenible a partir de organismo seleccionado del grupo que organismos que consisten en *Rahnella aquatilis* (depositado como DSM 23797), *Ochrobactrum anthropi* (depositado como DSM 23793), *Ochrobactrum tritici* (depositado como DSM 23786), *Sinorhizobium morelense* (depositado como DSM 23794), *Curtobacterium pusillum* (depositado como DSM 23787), *Paecilomyces lilacinus* (depositado como DSM 23771), *Microbacterium ginsengisoli*, *Microbacterium trichothecenolyticum* (depositado como DSM 23788), *Pseudomonas citronellolis* (depositado como DSM 23795), *Yersinia kristensenii* (depositado como DSM 23792), *Achromobacter spanius* (depositado como DSM 23791), *Achromobacter insolitus* (depositado como DSM 23790), *Mycobacterium fortuitum* (depositado como DSM 23789), *Mycobacterium frederiksbergense* (depositado como DSM 23798), *Mycobacterium sacrum* (depositado como DSM 23785), *Mycobacterium fluoranthenivorans* (depositado como DSM 23796), *Burkholderia* sp., *Burkholderia tropica* (depositado como DSM 23799), *Cosmospora episphaeria* (depositado como DSM 23772), and *Fusarium oxysporum* (depositado como DSM 23770).

Por consiguiente, un aspecto adicional se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene actividad (R)-transaminasa seleccionada del grupo que consiste en Cpu-TA1 [SEQ ID No.30], Cpu-TA2 [SEQ ID No.33], Cpu-TA3 [SEQ ID No.35], Raq-TA2 [SEQ ID No.38], Raq-TA3 [SEQ ID No.40], Asp-TA1 [SEQ ID No.43] y Mgi-TA1 [SEQ ID No. 46] o una proteína que tiene al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, preferiblemente al menos un 92 %, preferiblemente al menos un 93 %, preferiblemente al menos un 94 %, preferiblemente al menos un 95 %, preferiblemente al menos un 96 %, preferiblemente al menos un 97 %, preferiblemente al menos un 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad con cualquiera de estas secuencias polipeptídicas.

Las enzimas derivadas de secuencias génicas de las cepas en la tabla 1 también incluyen enzimas con identidades de secuencia de al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, preferiblemente al menos un 92 %, preferiblemente al menos un 93 %, preferiblemente al menos un 94 %, preferiblemente al menos un 95 %, preferiblemente al menos un 96 %, preferiblemente al menos un 97 %, preferiblemente al menos un 98 %, preferiblemente al menos un 99 % que se obtienen por mutagénesis de genes obtenidos a partir de cepas en la tabla 1. Los métodos de mutagénesis se conocen por el experto en la técnica e incluyen síntesis de genes, además de procedimientos de mutagénesis usando cebadores mutagénicos (Bloom & Arnold, Proc Natl Acad Sci USA 2009, 106, 9995).

Ejemplos

General

35 Medio de crecimiento microbiano

Medio LB (Luria Bertani)

10 g/l de Triptona Bacto (BD, Le Pont de Claix, Francia)
 5 g/l de Extracto de Levadura Bacto Triptona (BD, Le Pont de Claix, Francia)
 5 g/l de NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
 15 g/l de agar Bacto (para medio sólido, BD, Le Pont de Claix, Francia)

Los componentes se disolvieron en agua desmineralizada y, si fue necesario, el pH se ajustó a 7,0. Los medios se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 121 °C. Para medios sólidos se añadió agar antes de la esterilización en autoclave. Los antibióticos se añadieron después de que el medio esterilizado en autoclave se hubiera enfriado a 60 °C.

Medio de enriquecimiento selectivo (SEM)

10 g/l de base de carbono de levadura Difco (YCB, BD, Sparks, MD, Estados Unidos)
 Glicerol 55 mM (Merck, Darmstadt, Alemania)
 Ácido pirúvico 10 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
 Sustrato de (R)-amina 5 mM
 15 g/l de agar noble Difco (BD, Le Pont de Claix, Francia)

Se preparó una solución madre de medio YCB (100 g/l), glicerol 550 mM y ácido pirúvico 100 mM en agua MilliQ (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos) y se esterilizó por filtración a través de filtros estériles de 0,22 µm. Se prepararon medios de enriquecimiento líquido añadiendo un sustrato de (R)-amina seleccionado del grupo (R)-2-

aminobutano, (R)-3,3-dimetil-2-aminobutano, (R)- α -metilbencilamina, (R)- α -etilbencilamina, (R)-1-aminoindano y (R)-1-aminotetralina a 1:10 con solución madre de medio de enriquecimiento diluida con agua MilliQ estéril. Los medios de enriquecimiento sólidos se prepararon por consiguiente con agua MilliQ esterilizada en autoclave que contenía agar noble para obtener una concentración final de 15 g/l.

5

Antibióticos

Se usó medio LB que contenía carbenicilina o neomicina en concentraciones finales de 100 μ g/ml para seleccionar y cultivar cepas de *Escherichia coli* recombinantes que contenían vectores de expresión que comprenden [SEC IDs

10

Técnicas moleculares y

15 Técnicas genéticas y de biología molecular convencionales son generalmente conocidas en la técnica y se han descrito previamente (Maniatis et al. 1982 "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Miller 1972 "Experiments in molecular genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; Sambrook and Russell 2001 "Molecular cloning: a laboratory manual" (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press; F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology",

20

Plasmidos y cepas

Se usaron cepas TOP10 de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para todos los procedimientos de clonación. También se usó *E. coli* para la expresión de proteínas. Para la inducción de expresión génica se usó L-arabinosa a una concentración final del 0,02 % (peso/volumen).

25

Clonación de genes diana

30 Los genes diana de acuerdo con las [SEQ IDs No. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26] se optimizaron por pares de codones de acuerdo con un procedimiento descrito en el documento WO08000632. Se añadieron los sitios *attB* a todos los genes en la dirección 5' del sitio de unión ribosómico y codón de iniciación y en la dirección 3' del codón de terminación para facilitar la clonación usando la tecnología Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Se obtuvieron genes sintéticos de Geneart (Regensburg, Alemania). Las construcciones génicas se clonaron en un vector de expresión derivado de pBAD/Myc-HisC (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) usando

35

40

Identificación de plásmidos

Los plásmidos que llevan los diferentes genes se identificaron por medios genéticos, bioquímicos y/o fenotípicos generalmente conocidos en la técnica, tales como resistencia de transformantes a antibióticos, análisis de diagnóstico por PCR de transformante o purificación de ADN de plásmido, análisis de restricción del ADN de plásmido purificado o análisis de secuencias de ADN.

45

Determinación de concentraciones de proteína en solución

50 Las concentraciones de proteínas en disoluciones tales como extractos libres de células (CFE) se determinaron usando un procedimiento de unión a colorante de proteína modificado como se describe por Bradford in Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976). De cada muestra, se incubaron 50 μ l en una dilución apropiada se incubaron con 950 μ l de reactivo (100 mg de Brilliant Blue G250 disuelto en 46 ml de etanol y 100 ml de ácido orto-fosfórico al 85 %, se llenó hasta 1.000 ml con agua Milli-Q) durante al menos cinco minutos a temperatura ambiente. La absorción de

55

cada muestra a una longitud de onda de 595 nm se midió en un espectrofotómetro de UV/VIS Perkin Elmer Lambda20 o Lambda35. La concentración de proteína en las muestras se calculó usando una recta de calibración determinada con soluciones que contenían concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA, que variaban de 0,0125 mg/ml a 0,20 mg/ml).

Análisis

Análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

- 5 Las cetonas y aminas que contienen grupos aromáticos se analizaron en una columna Prevail C18 de 15 cm. Para la separación y cuantificación de los enantiómeros de α -metilbencilamina, α -etilbencilamina, 2-aminotetralina se usó una columna Crownpak Cr (+) (Daicel) con derivatización postcolumna de las aminas usando o-ftalaldehído más mercaptoetanol y detección con fluorescencia. Para la separación y cuantificación de los enantiómeros de 1-aminotetralina y 1-aminoindano se usaron Prevail C18 de 15 cm más columnas Crownpak Cr (+) con derivatización
10 postcolumna de las aminas usando o-ftalaldehído más mercaptoetanol y se usó detección con fluorescencia.

Cromatografía de gases

- Las alquilcetonas y alquilaminas tales como 2-butanona, 2-aminobutano, 3,3-dimetil-butanona y 3,3-dimetil-2-aminobutano se analizaron en una columna CP-Sil 8 CB (Varian) para columna de aminas usando materiales de referencia comercialmente disponibles (Sigma-Aldrich). Para la separación y cuantificación de las (R)- y (S)-alquilaminas se usó una columna Chiralsil-CB (Agilent).

EJEMPLO 1 - Enriquecimiento de microorganismos en (R)-aminas como única fuente de nitrógeno

- 20 Las muestras de tierra de diversos sitios en Países Bajos y Alemania se suspendieron en tampón fosfato de potasio (KPi) 100 mM a pH 7,0 y se incubaron con agitación a 180 rotaciones por minuto (rpm) y 28 °C durante 1 hora. Las suspensiones se filtraron a través de papel de filtro Whatman. Se usaron 100 μ l de filtrado, cada uno, para inocular matraces Erlenmeyer de 100 ml que contenían 10 ml de SEM que contenía una de las seis (R)-aminas
25 seleccionadas del grupo (R)-2-aminobutano, (R) -3,3-dimetil-2-aminobutano, (R)- α -metilbencilamina, (R)- α -etilbencilamina, (R)-1-aminoindano y (R)-1-aminotetralina. Los matraces se incubaron con agitación en un agitador orbital a 180 rpm y 28 °C. Cuando el crecimiento microbiano se obtuvo en forma de turbidez significativa del medio de cultivo o "agregados celulares", 100 μ l de este medio de cultivo se usaron para inocular SEM que contenía 5 mM de la misma (R)-amina. Después de dos de dichos pases, 100 μ l de una dilución 1:100 del último medio de cultivo se
30 sembraron sobre placas de agar de SEM que contenían 5 mM de la (R)-amina correspondiente. Adicionalmente, aproximadamente 10 μ l del cultivo sin diluir se extendieron sobre placas de agar de SEM que contenían 5 mM de la (R)-amina correspondiente. Las placas de agar inoculadas se incubaron a 28 °C hasta que se observó el crecimiento. Las colonias con diferente morfología se volvieron a extender sobre placas de SEM frescas para separar diferentes especies microbianas. La extensión continuó hasta que se obtuvieron cultivos puros con
35 morfologías uniformes después de la incubación a 28 °C y almacenamiento a 4 °C.

- Los microorganismos seleccionados se enviaron para identificación por MicroSEQ® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a BaseClear (Leiden, Países Bajos). Las secuencias de ARNr 16S o D2-LSU bacterianos o fúngicos obtenidas se compararon con la base de datos de secuencias MicroSEQ® validada (en BaseClear, Leiden,
40 Países Bajos) y en el caso de que no se obtuviera identidad superior al 99 % se comparó con la base de datos de nucleótidos no redundante (nr) usando el algoritmo BlastN en la página de inicio de NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Una visión general de los resultados de estos análisis de secuencias se facilita en la Tabla 2.

- 45 Tabla 2: Identificación de cepas aisladas por enriquecimiento por identificación por MicroSeq

(R)-amina	Aislado	Género	especie	% de coincidencia
1-aminotetralina	3Na	<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	99,8
1-aminotetralina	3Kb	<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	99,8
1-aminotetralina	3Ba	<i>Ochrobactrum</i>	<i>anthropi</i>	100
1-aminotetralina	3Db	<i>Ochrobactrum</i>	<i>anthropi</i>	100
1-aminotetralina	3H1	<i>Sinorhizobium</i>	<i>morelense</i>	100
1-aminoindano	5BaB	<i>Curtobacterium</i>	<i>pusillum</i>	100
1-aminoindano	5BaS	<i>Paecilomyces</i>	<i>lilacinus</i>	100
α -etilbencilamina	2A2	<i>Microbacterium</i>	<i>ginsengisoli</i>	99,8
α -etilbencilamina	2Ca	<i>Microbacterium</i>	<i>ginsengisoli</i>	99,8
α -etilbencilamina	2Cb	<i>Ochrobactrum</i>	<i>anthropi</i>	100
α -etilbencilamina	2M1	<i>Pseudomonas</i>	<i>citronellolis</i>	99,0
α -etilbencilamina	2Da	<i>Yersinia</i>	<i>kristensenii</i>	99,1

α -etilbencilamina	2K1	<i>Ochrobactrum</i>	<i>anthropi</i>	100
α -metilbencilamina	6Ab	<i>Ochrobactrum</i>	<i>tritici</i>	100
α -metilbencilamina	6Bb	<i>Mycobacterium</i>	<i>fortuitum</i>	99,3
α -metilbencilamina	6I	<i>Achromobacter</i>	<i>spanius</i>	100
α -metilbencilamina	6F	<i>Achromobacter</i>	<i>spanius</i>	100
3,3-dimetil-2-aminobutano	1Ea	<i>Achromobacter</i>	<i>insolitus</i>	99,6
3,3-dimetil-2-aminobutano	1Ia	<i>Mycobacterium</i>	<i>frederiksbergense</i>	99,4
3,3-dimetil-2-aminobutano	1Ib	<i>Mycobacterium</i>	<i>sacrum</i>	99,4
3,3-dimetil-2-aminobutano	1Eb	<i>Mycobacterium</i>	<i>fluoranthenvivorans</i>	100
3,3-dimetil-2-aminobutano	1A2	<i>Mycobacterium</i>	<i>fluoranthenvivorans</i>	99,8
3,3-dimetil-2-aminobutano	1Nb	<i>Mycobacterium</i>	<i>fluoranthenvivorans</i>	100
3,3-dimetil-2-aminobutano	1Ja	<i>Mycobacterium</i>	<i>fluoranthenvivorans</i>	100
3,3-dimetil-2-aminobutano	1A1	<i>Microbacterium</i>	<i>ginsengisoli</i>	99,8
2-aminobutano	4D1	<i>Burkholderia</i>	sp.	100
2-aminobutano	4F1	<i>Burkholderia</i>	<i>tropica</i>	100
2-aminobutano	4Bd	<i>Cosmospora</i>	<i>episphaeria</i>	99,0
2-aminobutano	4I	<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	99,8
2-aminobutano	4Ba	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	100
2-aminobutano	4Bc	<i>Microbacterium</i>	<i>trichothecenolyticum</i>	99,8

EJEMPLO - 2 Detección de actividad de (R)-transaminasa en aislados de enriquecimiento

De los cultivos puros de las cepas aisladas por enriquecimiento sobre placas de agar de SEM, se inocularon 25 ml de cultivos de SEM líquidos que contenían 5 mM de la (R)-amina respectiva, en la que los microorganismos se habían enriquecido, y se cultivaron en un agitador orbital a 180 rotaciones por minuto (rpm) y a 28 °C hasta que los cultivos se volvieron turbios. Posteriormente, los cultivos se transfirieron a tubos de centrífuga de 50 ml y se centrifugaron durante 10 min a 50.000x g en el rotor JA-25.50 en la centrífuga Beckman Avanti J-20 XPI (Beckman-Coulter, Woerden, Países Bajos). Los sedimentos de células se resuspendieron en 2 ml de tampón fosfato de potasio (KPi) 100 mM a pH 7,0 que contenía piridoxal 5'-fosfato (PLP) 0,1 mM. Las suspensiones de células se usaron para determinar la actividad de (R)-transaminasa usando 40 mM de donante de amino y sustrato de cetona. Las suspensiones de células de cepas aisladas por enriquecimiento 3Kb, 3Na, 3Ba, 3Db y 3H1 se probaron con (R)- α -metilbencilamina 40 mM como donante de amina y 1-tetralona como sustrato de cetona dando acetofenona y 1-aminotetralina como productos. Las suspensiones de células de cepas aisladas por enriquecimiento 5BaB y 5BaS se ensayaron con (R)- α -metilbencilamina 40 mM como donante de amina y 1-aminoindano como sustrato de cetona dando acetofenona y 1-aminoindano como productos. Las suspensiones de células de cepas aisladas por enriquecimiento 2A2, 2Ca, 2Cb, 2M1, 2Da y 2K1 se probaron con (R)- α -metilbencilamina 40 mM como donante de amina y propiofenona como sustrato de cetona dando acetofenona y α -etilbencilamina como productos. Las suspensiones de células de cepas aisladas por enriquecimiento 5BaB y 5BaS se ensayaron con (R)- α -metilbencilamina 40 mM como donante de amina y 1-aminoindano como sustrato de cetona dando acetofenona y 1-aminoindano como productos. Las suspensiones de células de cepas aisladas por enriquecimiento 6Ab, 6Bb, 6I y 6F se ensayaron con bencilamina 40 mM como donante de amina y acetofenona como sustrato de cetona dando benzaldehído y α -metilbencilamina como productos. Las concentraciones y el exceso enantiomérico (e.e.) de los productos de amina formados se determinaron por HPLC como se describe en la parte general. Los resultados de los análisis por HPLC se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Concentraciones y excesos enantioméricos de (R)-aminas producidas por los microorganismos enriquecidos de donantes de amino y sustratos de cetona.

(R)-amina producida	Aislado	Producto amina [g/l]	e.e. (R)
1-aminotetralina	3Na	0,31	99
1-aminotetralina	3Kb	0,24	99,6
1-aminotetralina	3Ba	0,40	98
1-aminotetralina	3Db	0,41	99
1-aminotetralina	3H1	0,12	88
1-aminoindano	5BaB	0,17	99,8
1-aminoindano	5BaS	0,17	99,8
α -etilbencilamina	2A2	0,32	95
α -etilbencilamina	2Ca	0,29	98

α -etilbencilamina	2Cb	0,25	98
α -etilbencilamina	2M1	0,33	98
α -etilbencilamina	2Da	0,34	96
α -etilbencilamina	2K1	0,30	98
α -metilbencilamina	6Ab	0,08	94
α -metilbencilamina	6Bb	0,17	64
α -metilbencilamina	6I	0,09	94
α -metilbencilamina	6F	0,10	70

Estos resultados demuestran la presencia de transaminasas con (R)-selectividad de buena a excelente en los microorganismos enriquecidos.

5 EJEMPLO 3 - Expresión de (R)-transaminasas de bases de datos públicas

Los genes optimizados por pares de codones que codifican los polipéptidos de las transaminasas putativas como se resume en la Tabla 4 se clonaron en un vector de expresión derivado de pBAD/Myc-HisC (como se describe en el documento EP1513946) usando la tecnología Gateway (Invitrogen) de acuerdo con los protocolos del fabricante

10 (www.invitrogen.com) como se describe en la parte general.

Tabla 4: Visión general de las secuencias de polipéptidos, nucleótidos y números de acceso

Polipéptido (secuencia de aminoácidos)	Nucleótido (gen optimizado por pares de codones)	Número de acceso a la proteína	Nombre del plásmido
SEQ ID No. 1	SEQ ID No. 2	XP_001209325	pBAD-XP_001209325
SEQ ID No. 3	SEQ ID No. 4	XP_002564064	pBAD-XP_002564064
SEQ ID No. 5	SEQ ID No. 6	EEU44019	pBAD-EEU44019
SEQ ID No. 7	SEQ ID No. 8	XP_001402221	pBAD-XP_001402221
SEQ ID No. 9	SEQ ID No. 10	YP_761201	pBAD-YP_761201
SEQ ID No. 11	SEQ ID No. 12	YP_838940	pBAD-YP_838940
SEQ ID No. 13	SEQ ID No. 14	YP_955297	pBAD-YP_955297
SEQ ID No. 15	SEQ ID No. 16	EDI73966	pBAD-EDI73966
SEQ ID No. 17	SEQ ID No. 18	NP_085750	pBAD-NP_085750
SEQ ID No. 19	SEQ ID No. 20	EDH25885	pBAD-EDH25885
SEQ ID No. 21	SEQ ID No. 22	EBP64591	pBAD-EBP64591
SEQ ID No. 23	SEQ ID No. 24	ECU93014	pBAD-ECU93014
SEQ ID No. 25	SEQ ID No. 26	YP_366475	pBAD-YP_366475

Adicionalmente, los genes sintéticos optimizados por pares de codones que codifican los polipéptidos L-treonina
15 aldolasa (LTA_SAV, número de acceso Q82N15) de *Streptomyces avermitilis* (como control negativo) y (R)-
transaminasas ABN35871 (secuencia 2 del documento US7169592) y AAN21261 (Secuencia 1 del documento
US6413752) se ordenaron y clonaron como se ha descrito anteriormente. Después de la transformación de células
TOP10 de *E. coli* competentes y siembra sobre placas de LB-agar selectivo que contenían 100 μ g/ml de antibiótico
se obtuvieron las cepas pBAD de *E. coli* recombinantes respectivas como se facilita en la Tabla 4. 5 ml de
20 precultivos de LB más 50 μ g/ml de precultivos de antibiótico se inocularon con las placas de agar respectivas y se
cultivaron durante la noche a 28 °C y 180 rpm en un agitador orbital. A partir de dichos precultivos, los cultivos de
expresión se inocularon en matraces Erlenmeyer que contenían 50 - 100 ml de LB más 50 μ g/ml de antibiótico a una
densidad de células inicial de $OD_{620} = 0,05$. Estos cultivos se incubaron a 28 °C y 180 rpm en un agitador orbital. En
la mitad de la fase de crecimiento exponencial (OD_{620} de aproximadamente 0,6), la expresión de los genes diana se
25 indujo mediante la adición de 0,02 % (peso/volumen) de L-arabinosa a los matraces de cultivo. Después de la
inducción, el cultivo continuó a 28 °C y 180 rpm en un agitador orbital durante la noche (aproximadamente 20 h).
Posteriormente, las células se recogieron por centrifugación a 5.000x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se
desechó y las células se resuspendieron y se pesaron. Los sedimentos de células se resuspendieron en dos veces
el volumen del peso húmedo de tampón KP_i 50 mM frío en hielo a pH 7,5 que contenía PLP 0,1 mM. Los extractos
30 libres de células (CFE) se obtuvieron por sonicación de las suspensiones de células usando un sonicador Vibra-Cell
VCX130 de Sonics (Meirin/Satigny, Suiza) (salida 100 %, 10 s encendido/10 s apagado, durante 10 min) con
enfriamiento en un baño de hielo/acetona y centrifugación en una centrifuga 5415R Eppendorf (Hamburgo,

Alemania) a 13.000x g y 4 °C durante 30 min. Los sobrenadantes (= CFE) se transfirieron a tubos frescos y se guardaron sobre hielo para uso inmediato o se guardaron a -20 °C. Las concentraciones de proteína en los CFE se determinaron usando un procedimiento modificado según Bradford como se describe en la parte general.

5 EJEMPLO 4 - (i) Resolución racémica de (RS)- α -metilbencilamina

Los extractos libres de células (CFE) con transaminasas expresadas en *E. coli* de forma heteróloga XP_001209325 y EDH25885 se probaron para determinar la actividad de (R)-transaminasa y se compararon con CFE que contenían L-treonina aldolasa expresada en *E. coli* de forma heteróloga (LTA_SAV, número de acceso Q82N15) a partir de *Streptomyces avelmitilis* (como control negativo), y (R)-transaminasas ABN35871 (Secuencia 2 del documento US7169592) y AAN21261 (Secuencia 1 del documento EP987332) en la resolución racémica de (RS)- α -metilbencilamina (MBA) 80 mM, piruvato de sodio 40 mM en tampón KP_i 100 mM que contiene PLP 0,1 mM y se incubaron a 28 °C durante 20 h. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 0,9 ml de reactivo de parada (50 % (v/v) de acetonitrilo en H₂O que contenía ácido fórmico al 0,1 % (v/v)) a 0,1 ml de volumen de reacción y se analizaron por HPLC sobre una fase quiral como se describe en la parte general. Los resultados de los análisis de HPLC se dan en la Tabla 5.

Tabla 5: Concentración y e.e. de α -MBA en reacciones de transaminasa

Enzima	% de e.e. (S)- α -MBA	(S)- α -MBA [g/l]	(R)- α -MBA [g/l]
ABN35871	63	0,5	0,1
AAN21261	22	0,5	0,3
EDH25885	10	0,5	0,4
XP_001209325	>99	0,5	<0,01
LTA_SAV	<2	0,5	0,5

20

Estos resultados muestran que XP_001209325 es una (R)-transaminasa muy eficaz y selectiva, debido a que convirtió selectivamente toda la (R)- α -MBA, pero no (S)- α -MBA. Otras (R)-transaminasas como ABN35871 o AAN21261 también fueron selectivas, pero a productividades claramente inferiores produciendo menores e.e. en la resolución racémica de (RS)- α -MBA. EDH25885 también presentó baja actividad de (R)-transaminasa selectiva en (RS)- α -MBA.

25

EJEMPLO 5 - Síntesis de (R)-aminas enriquecidas enantioméricamente

En un volumen final de 0,25 μ l tamponados con fosfato de potasio (KP_i) 100 mM a pH 7,5 se hicieron reaccionar cantidades equimolares de 70 mM de donante de amino y 70 mM de sustrato de cetona en presencia de 0,1 ml de CFE de una transaminasa a 28 °C durante 24 h. El CFE que comprende transaminasas XP_001209325, AAN21261 y ABN35871, respectivamente, se incubó con bencilacetona y α -metilbencilamina dando 4-fenil-2-butilamina y acetofenona; propiofenona y α -metilbencilamina dando α -etilbencilamina y acetofenona; 1-indanona y α -metilbencilamina dando 1-aminoindano y acetofenona; 1-tetralona y α -metilbencilamina dando 1-aminotetralina y acetofenona; 2-tetralona y α -metilbencilamina dando 2-aminotetralina y acetofenona; butanona y α -metilbencilamina dando 2-aminobutano y acetofenona; y 3,3-dimetil-2-butanona y α -metilbencilamina dando 3,3-dimetil-2-aminobutano y acetofenona, respectivamente. Las reacciones se detuvieron mediante adición de 0,75 ml de reactivo de parada (50 % (v/v) de acetonitrilo en H₂O que contenía 0,1 % (v/v) de ácido fórmico) a 0,25 ml de volumen de reacción. Las concentraciones de producto y excesos enantioméricos se analizaron por HPLC como se describe en la parte general. Los resultados de los análisis de HPLC se dan en la Tabla 6.

40

Tabla 6: Concentraciones de productos de amina y e.e. con transaminasa XP_001209325 en comparación con transaminasas AAN21261 y ABN35871. n.d.: no determinado

Producto de (R)-amina	XP_001209325		AAN21261		ABN35871	
	amina [mM]	e.e. [%]	amina [mM]	e.e. [%]	amina [mM]	e.e. [%]
4-fenil-2-butilamina	16,0	n.d.	<0,1	n.d.	<0,1	n.d.
2-aminobutano	6,2	69	0,9	n.d.	6,9	-27
3,3-dimetil-butilamina	0,7	50	0,3	n.d.	6,4	97
1-aminoindano	<0,1	n.d.	<0,1	n.d.	<0,1	n.d.
α -etilbencilamina	1,7	99	7,9	99	2,3	99
1-aminotetralina	<0,1	n.d.	<0,1	n.d.	<0,1	n.d.
2-aminotetralina	0,4	96	0,7	61	0,3	97

Adicionalmente, el CFE que comprende la transaminasa YP_955297 se incubó con propiofenona y α -metilbencilamina dando α -etilbencilamina y acetofenona. La reacción se detuvo mediante adición de 0,75 ml de reactivo de parada (50 % (v/v) de acetonitrilo en H₂O que contenía 0,1 % (v/v) de ácido fórmico) a 0,25 ml de volumen de reacción. La concentración de producto y el exceso enantiomérico se analizaron por HPLC como se describe en la parte general. Después de 24 h de incubación a 28 °C se obtuvieron 0,87 mmol/l de (R)- α -etilbencilamina con un e.e. del 99 %.

Los resultados anteriores muestran que las transaminasas XP_001209325 e YP_955297 son (R)-transaminasas altamente selectivas. Adicionalmente es evidente que XP_001209325 tiene un espectro de sustrato diferente que las transaminasas AAN21261 y ABN35871: 4-fenil-2-butilamina se formó en concentraciones significativas por XP_001209325, pero no por las transaminasas AAN21261 y ABN35871 (Tabla 6). Adicionalmente, XP_001209325 produjo (R)-2-aminobutano enantioméricamente enriquecido a partir de 2-butanona, mientras que ABN35871 liberó (S)-2-aminobutano enantioméricamente enriquecido (Tabla 6).

EJEMPLO 6 - Selectividad de (R)-transaminasas por α -metilbencilaminas quirales

Para examinar la enantioselectividad de (R)-transaminasas, se probaron en la conversión de las formas de enantiómeros puros de α -metilbencilamina (MBA). Los extractos libres de células que contenían transaminasas como se prepararon en el EJEMPLO 3 se probaron por separado en su actividad por (R)-MBA y (S)-MBA, respectivamente, con piruvato como sustrato de cetona en un ensayo espectrofotométrico en un espectrofotómetro de UV/VIS Perkin Elmer Lambda35 termostatizado a 30 °C a una longitud de onda de 300 nm.

En un volumen final de reacción de 1 ml, se mezclaron 50 μ l de una dilución adecuada de un CFE que contenía transaminasa en cubetas UV de plástico desechables o de cuarzo con (R) o (S)-MBA 12,5 mM y piruvato de sodio 5 mM en presencia de tampón KP_i 50 mM a pH 7,5 que contenía PLP 0,1 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 10 μ l de piruvato de sodio 0,5 M (en tampón KP_i 50 mM a pH 7,5, PLP 0,1 mM) a los otros componentes de ensayo que habían sido previamente incubados en el fotómetro a 30 °C durante 5 min. Después de la adición de piruvato de sodio, se registró la absorción a 300 nm y la actividad de transaminasa en las muestras (CFE) se calculó según la ley de Lambert-Beer con un coeficiente de extinción molar para acetofenona de $\epsilon = 0,28 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$. Una unidad (U) de actividad transaminasa se define como 1 μ mol de acetofenona formada a partir de (R)-MBA o (S)-MBA 12,5 mM y piruvato sódico 5 mM a 30 °C en tampón KP_i 50 mM a pH 7,5 que contiene PLP 0,1 mM por minuto. Las actividades de transaminasa específicas de los CFE (U/mg de proteína de CFE total) se calcularon dividiendo los valores de la actividad volumétrica (U/ml de CFE) entre la concentración total de proteína como se determina según los procedimientos generales. La relación de actividades de transaminasa específica en (R) con respecto a (S)-MBA se define como el valor de enantioselectividad de transaminasa (TEV). Una transaminasa (R)-selectiva se define como una transaminasa con un valor TEV de >1 . Una buena (R)-selectividad se define como una relación de actividad específica en (R) sobre (S)-MBA de TEV ≥ 5 . Una alta (R)-selectividad se define como una relación de actividad específica en (R) sobre (S)-MBA de TEV ≥ 10 . Las actividades específicas de las transaminasas en los CFE en (R) y (S)-MBA y los TEV como se determinan en estos experimentos se facilitan en la Tabla 7.

Tabla 7: Actividades de transaminasa específica en (R) y (S)-MBA y TEV

Transaminasa	Actividad de (R)-MBA	Actividad de (S)-MBA	TEV
	[mU/mg]	[mU/mg]	
XP_001209325	559	38	15
XP_002564064	12	0,9	13
YP_761201	32	7,2	4
YP_955297	210	26	8
NP_085750	4,6	0,6	8
EBP64591	18	13	1,3
EDI73966	15	14	1,1
ABN35871	1111	20	56
AAN21261	578	39	15

Como es evidente a partir de este experimento, las transaminasas XP_001209325, XP_002564064, YP_761201, YP_955297, NP_085750, EBP64591, y EDI73966 son transaminasas (R)-selectivas como son las transaminasas ABN35871 y AAN21261. Las transaminasas YP_955297 y NP_085750 presentaron buena (R)-selectividad con TEV superiores a 5, mientras que XP_001209325 y XP_002564064 incluso mostraron alta (R)-selectividad con TEV

superiores a 10.

EJEMPLO 7 - Re-aislamiento de microorganismos de depósitos reunidos

- 5 El re-aislamiento de los microorganismos individuales del depósito reunido se logra sembrando 1:1000, 1:10.000 y otras diluciones del depósito reunido sobre placas de agar de medio de enriquecimiento selectivo (SEM) que contenían una de las seis (R)-aminas como única fuente de nitrógeno como se describe en la parte general y el EJEMPLO 1. Se obtienen cultivos puros volviendo a extender repetidamente sobre las placas de agar de SEM que contienen la (R)-amina respectiva, en la que se han enriquecido originalmente. El volver a extender de forma
- 10 repetida sobre la (R)-amina respectiva que contiene medio de enriquecimiento selectivo se realiza hasta que sólo se obtienen colonias de morfología uniforme. Posteriormente se realiza la secuenciación de ARNr 16S o ARNr D2-LSU usando el sistema MicroSEQ® validado (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), para identificar de nuevo los microorganismos individuales.

15 EJEMPLO 8 - Transaminación enzimática de fenoxiacetona

Extracto libre de células con (R)-transaminasa XP_001209325 heterológamente expresada en *E. coli* [SEC ID No. 1] (2 U/ml) como se produce y se ensaya como en el EJEMPLO 3 y EJEMPLO 6 se incubó con 0,1 M de sustrato de cetona fenoxiacetona y 0,5 M del donante de amino isopropilamina, (RS)-2-butilamina (eficazmente (R)-2-butilamina

20 0,25 M) y (RS)- α -metilbencilamina (eficazmente (R)-MBA 0,25 M), respectivamente, en tampón KPi 50 mM a pH 7,5 que contenía PLP 0,1 mM a 30 °C durante 24 h. La cantidad de 1-fenoxi-2-propilamina formada se midió por análisis de HPLC. Las condiciones de HPLC fueron del siguiente modo:

25 50 μ l de mezcla de reacción se añadieron a 950 μ l de una mezcla 50:50 de acetonitrilo/agua con ácido fórmico al 0,01 % (v/v) y se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm.

Condiciones de HPLC:

30 Columna: Purospher Star RP C18 (250 x 4,0, 5 μ m)
 Eluyente A: ácido fórmico al 0,01 % en agua
 Eluyente B: Acetonitrilo
 Flujo: 0,8 ml/min
 Temperatura de columna: 30 °C
 Volumen de inyección: 4 μ l
 35 Detección: UV 210 nm (o 254 nm)

Los resultados de estos experimentos se dan en la tabla 8.

40 Tabla 8: Conversión de fenoxiacetona en 1-fenoxi-2-propilamina catalizada por la (R)-transaminasa XP_001209325 [SEQ ID No.1]

Donante	Conversión de cetona		1-Fenoxi-2-propilamina	
	[%]	[mol/l]	[mol/l]	[% en peso]
2-butilamina	64	0,064		1,0
MBA	32	0,032		0,5
isopropilamina	31	0,031		0,5

2-butilamina y MBA son donantes de amino eficazmente mejores que la isopropilamina para la (R)-transaminasa selectiva XP_001209325 [SEC ID No. 1] ya que la presente concentración de (R)-2-butilamina y (R)-MBA son 0,25 M en comparación con 0,5 M del donante de amino aquiral isopropilamina. Por lo tanto, se obtienen conversiones

45 comparables o incluso mejores con los donantes de amino 2-butilamina y MBA, respectivamente, a concentraciones de donante de amino relativamente menores en comparación con el donante de amino isopropilamina. Se obtuvieron concentraciones de producto incluso altas del 1,0 % en peso (con 2-butilamina como donante de amino).

EJEMPLO 9 - Transaminación de bencilacetona en presencia de una segunda fase de disolvente orgánico

50 El extracto libre de células con (R)-transaminasa XP_001209325 heterológamente expresada en *E. coli* [SEC ID No. 1] (2 U/ml) según se produce y se ensaya como en el EJEMPLO 3 y EJEMPLO 6 se incubó con 0,1 M de sustrato de cetona bencilacetona y 0,25 M del donante de amino (RS)- α -metilbencilamina en tampón KPi 50 mM a pH 7,5 que contenía PLP 0,5 mM a 30 °C durante 24 h. Las reacciones se realizaron en presencia y ausencia de 15 % (v/v) del

disolvente orgánico no miscible en agua ciclohexano. La cantidad de 4-fenil-2-propilamina formada y el exceso enantiomérico (e.e.) de las reacciones se midieron por análisis de HPLC como se describe en el EJEMPLO 8. La determinación de los excesos enantioméricos se realizó por análisis de HPLC sobre una fase estacionaria quiral del siguiente modo:

5

20 µl de la mezcla de reacción se mezclaron con 50 µl de disolución de reactivo de Marfey (1 % en p/v de N-α-[2,4-dinitrofenil-5-fluorofenil] -L-alanina-amida en acetona) y 10 µl de disolución saturada de NaHCO₃. Después de la incubación de la mezcla a 40 °C durante 1 hora se añadieron 10 µl de HCl 2 N y 920 µl de acetonitrilo y la muestra se centrifugó durante 5 min antes de la inyección.

10

Condiciones de HPLC:

Columna: Purospher Star RP C18 (250 x 4,0, 5 µm)

Eluyente A: ácido fórmico al 0,01 % en agua

15

Eluyente B: Acetonitrilo

Flujo: 1 ml/min

Temperatura de columna: 30 °C

Volumen de inyección: 2 µl

Detección: UV 338,1 nm

20

50/50 isocrático de eluyente A/eluyente B

Los resultados de estos experimentos se dan en la tabla 9.

Tabla 9: Conversión y e.e. de (R)-4-fenil-2-propilamina formada por XP_001209325 [SEQ ID No.1] d bencilcetona en presencia y ausencia del disolvente orgánico no miscible en agua ciclohexano

25

Condición	Conversión en 4-fenil-2-propilamina [%]	e.e. (R)-4-fenil-2-propilamina [%]
sin disolvente orgánico	32	>99,9
ciclohexano al 15 % (v/v)	22	>99,9

Estos resultados muestran que la (R)-transaminasa selectiva XP_001209325 [SEC ID No. 1] tolera bien la presencia del disolvente orgánico no miscible en agua ciclohexano y que su presencia no afecta la enantioselectividad de la reacción enzimática.

30

EJEMPLO 10 - (R)-Transaminasas recombinantes de genomas de los microorganismos enriquecidos

De las seis cepas, que se enriquecieron sobre medios selectivos para su actividad de (R)-transaminasa selectiva (EJEMPLO 1 y 2), ADN genómico de 3 Kb de *Rahnella aquatilis*, 1A1 DSM 23784 de *Microbacterium ginsengisoli*, 3H1 DSM 23794 de *Sinorhizobium morelense*, 5BaB DSM 23787 de *Curtobacterium pusillum*, 11a DSM 23798 de *Mycobacterium frederiksbergense* y 61 DSM 2 37 91 de *Achromobacter spanius* se aisló con el kit Easy-DNA (Invitrogen) según el manual del fabricante y finalmente se eluyó con tampón TE. La calidad del ADN se comprobó fotométricamente, además de por digestión con BspI43I o BamHI (Fermentas, St. Leon-Rot) seguido de electroforesis en gel de agarosa. Las muestras de ADN genómico aisladas de este modo de 3 Kb de *Rahnella aquatilis*, 1A1 DSM 23784 de *Microbacterium ginsengisoli*, 5BaB DSM 23787 de *Curtobacterium pusillum*, 61 DSM 23791 de *Achromobacter spanius* y 1A1 DSM 23784 de *Microbacterium ginsengisoli* se usaron para la secuenciación del genoma.

35

40

Estas secuencias genómicas se cargaron a un servidor y se realizaron búsquedas con BLAST por comparación con las secuencias de (R)-transaminasa conocidas SEC ID No. 1 y por comparación con los éxitos encontrados en uno de los genomas. Se identificaron varios éxitos con diferente grado de similitud y se eligieron para la posterior clonación de *NdeI/HindIII* en pMS470Δ8 (Balzer et al., Nucleic Acids Research, 1992, 20 (8): 1851-1858) y expresión en *E. coli*. Tres de los genes no pudieron amplificarse por PCR y uno contuvo *NdeI* y *HindIII* en la secuencia nativa y, por tanto, Asp-TAI, Cpu-TAI, Cpu-TA3 Raq-TA2 y Mgi-TAI se optimizaron por codones ordenados para determinar la expresión en *E. coli* a partir de tecnologías Genart/life (Regensburg, Alemania).

45

50

Tabla 10: Identidad por búsqueda con BLAST con la (R)-transaminasa de SEC ID No. 1

proteína	Organismo de origen	SEQ ID No.	Identidad de secuencia para SEQ ID No.1
Cpu-TA1	<i>Curtobacterium pusillum</i> 5BaB DSM 23787	30	26 %
Cpu-TA2	<i>Curtobacterium pusillum</i> 5BaB DSM 23787	33	32 %

Cpu-TA3	<i>Curtobacterium pusillum</i> 5BaB DSM 23787	35	27 %
Raq-TA2	<i>Rahnella aquatilis</i> 3Kb	38	27 %
Raq-TA3	<i>Rahnella aquatilis</i> 3Kb	40	22 %
Asp-TA1	<i>Achromobacter spanius</i> 61 DSM 23791	43	27 %
Mgi-TA1	<i>Micro bacterium ginsengisoli</i> 1A1 DSM 23784	46	24 %

Los 6 genes diana se expresaron en TOP10F' de *E. coli* en medio LB complementado con ampicilina (100 µg/ml) después de la inducción con IPTG 0,5 mM a 25 °C durante la noche. Como control sirvió un cultivo de TOP10F' de *E. coli* que contenía un vector pMS470 sin un gen de transaminasa insertado. Las células se recogieron y se usaron por sonicación en tampón KP_i 50 mM a pH 7,5 que contenía PLP 0,1 mM y se centrifugaron. Los usados se concentraron usando concentradores VivaSpin (Sartorius, Viena, Austria). Las concentraciones de proteína de los usados se determinaron por el ensayo de proteínas de Bradford.

Todos los lisados se probaron en reacciones de transaminación usando las aminas en bruto correspondientes en las que el microorganismo donante se había enriquecido como un donante y piruvato como un aceptor. Se usó un exceso de cinco veces de una amina racémica o enantiopura (50 mM) con respecto a ácido pirúvico (10 mM) en tampón KP_i 50 mM a pH 7,5 que contenía PLP 0,1 mM a 30 °C durante 24 h. En las reacciones con Mgi-TA1, 10 mM de ácido pirúvico y 10 mM de donante de amino MBA o 1-aminotetralina, respectivamente, se aplicaron en tampón KP_i 50 mM a pH 7,5 que contenía PLP 0,1 mM a 30 °C durante 19 h. La formación de la cetona correspondiente se detectó en HPLC como se ha descrito en los EJEMPLOS 8 y 9. La selectividad de las nuevas transaminasas se determinó por la formación de L o D-alanina y la reactividad de diferentes enantiómeros de las aminas respectivas. Las nuevas transaminasas Cpu-TA1 [SEQ ID No.30], Cpu-TA2 [SEQ ID No.33], Cpu-TA3 [SEQ ID No.35], Raq-TA2 [SEQ ID No.38], Raq-TA3 [SEQ ID No.40], Asp-TA1 [SEQ ID No.43], y Mgi-TA1 [SEQ ID No. 46] mostraron (R)-selectividad (Tabla 11). Cpu-TA2 también se probó con MBA y alanina como donantes de amino y fenoxiacetona y acetofenona como cetonas aceptoras, respectivamente. Los productos de amina de estas dos reacciones fueron (R)-1-fenoxi-2-propilamina y (R)-MBA enantioméricamente enriquecidas, respectivamente (Tabla 11).

Estos resultados muestran que las nuevas transaminasas Cpu-TA1 [SEQ ID No. 30], Cpu-TA2 [SEQ ID No. 33], Cpu-TA3 [SEQ ID No. 35], Raq-TA2 [SEQ ID No. 38], Raq-TA3 [SEQ ID No. 40], Asp-TA1 [SEQ ID No. 43] y Mgi-TA1 [SEQ ID No. 46] son de hecho transaminasas (R)-selectivas.

Tabla 11: Reacciones de transaminación catalizadas por nuevas transaminasas y sus selectividades.

Enzima	Donante amino	Aceptor cetona	Conversión en cetona [%]	Producto	Selectividad del producto
Asp-TA1	MBA	Piruvato	1,5	alanina	(R) (= D)
Cpu-TA1	1-aminoindano	Piruvato	89,0	alanina	(R) (= D)
	(R)-1-aminoindano	Piruvato	96,7	alanina	(R) (= D)
Cpu-TA2	1-aminoindano	Piruvato	15,4	alanina	(R) (= D)
	MBA	Fenoxiacetona	1,1	1-fenoxi-2-propilamina	(R)
Cpu-TA3	alanina	Acetofenona	1,3	MBA	(R)
	1-aminoindano	Piruvato	26,6	alanina	(R) (= D)
Raq-TA2	(R)-1-aminoindano	Piruvato	17,4	alanina	(R) (= D)
	1-aminotetralina	Piruvato	19,2	alanina	(R) (= D)
Raq-TA3	(R)-1-aminotetralina	Piruvato	17,9	alanina	(R) (= D)
	1-aminotetralina	Piruvato	17,0	alanina	(R) (= D)
Mgi-TA1	(R)-1-aminotetralina	Piruvato	62,5	alanina	(R) (= D)
	(S)-1-aminotetralina	Piruvato	6,5	alanina	(R) (= D)
Mgi-TA1	MBA	Piruvato	21,0	alanina	(R) (= D)
	1-	Piruvato	34,0	alanina	(R) (= D)

	aminotetralina				
vector pMS sin inserción de transaminasa (- control)	MBA	Piruvato	0,6		

EJEMPLO 11 - Síntesis de 4-fenil-2-propilamina a partir de bencilacetona y (R)- α -metilbencilamina en presencia de disolvente orgánico no miscible en agua

- 5 Extracto libre de células con (R)-transaminasa XP_001209325 [SEC ID N° 1] heterológamente expresada en *E. coli* como se produce y se ensaya como en el EJEMPLO 3 y EJEMPLO 6 se incubó con 0,08 M del donante de amino (R)- α -metilbencilamina (MBA) y un exceso de 1,5 veces el sustrato de cetona bencilacetona (0,12 M) en tampón KP_i 50 mM a pH 7,5 que contenía PLP 0,1 mM a 28 °C durante 20 h. Las reacciones se realizaron en presencia y ausencia de 10 % (v/v) del disolvente orgánico no miscible en agua ciclohexano. La cantidad de 4-fenil-2-propilamina formada se midió por análisis de HPLC como se describe en la parte general.

Sin adición de ciclohexanona se formó 4-fenil-2-propilamina 42,8 mM, mientras que con el 10 % (v/v) de ciclohexanona se formó una concentración incluso mayor de 4-fenil-2-propilamina 44,3 mM a partir de bencilacetona con (R)-MBA como donante de amino.

- 15 EJEMPLO 12 - Síntesis enzimática de (R)-sec-butilamina a partir de (R)- α -metilbencilamina

Las transaminasas XP_001209325 [SEQ ID No. 1], XP_002564064 [SEQ ID No. 3], EEU44019 [SEQ ID No. 5], XP_001402221 [SEQ ID No. 7], YP_761201 [SEQ ID No. 9], YP_838940 [SEQ ID No. 11], YP_955297 [SEQ ID No. 13], EDI73966 [SEQ ID No. 15], NP_085750 [SEQ ID No. 17], EDH25885 [SEQ ID No. 19], EBP64591 [SEQ ID No. 21], y ECU93014 [SEQ ID No. 23], así como ABN35871 y AAN21261 se produjeron como se ha descrito en el EJEMPLO 3. Los extractos libres de células que contenían las transaminasas heterológamente expresadas se hicieron reaccionar con butanona 25 mM y (R)- α -metilbencilamina 50 mM a 28 °C con agitación a 400 rpm durante 24 h en tampón KP_i 100 mM a pH 7,5 que contenía PLP 0,1 mM en un volumen total de 1 ml. Después de 20 h, las reacciones se inactivaron mediante la adición de una muestra de 100 μ l de cada reacción a 50 μ l de disolución de 2-hexanona y 850 μ l de acetonitrilo y centrifugación durante 10 min a 3000 x g. Las muestras se analizaron por detección CG-FID sobre CpSil 8 para columna de aminas (30 m x 0,25 x 0,5) usando MBA comercial, acetofenona, butanona y sec-butilamina como referencia (Sigma-Aldrich). Los resultados se resumen en la Tabla 12.

- 30 Tabla 12: Concentración de sec-butilamina en mM formada a partir de (R)-MBA y butanona después de 24 h usando las transaminasas respectivas

Transaminasa	sec-Butilamina [mM]
ABN35871	0,99
AAN21261	7,96
YP_955297	1,52
YP_838940	0,45
XP_001209325	15,74
EBP64591	0,06
EDI73966	0,42
XP_002564064 b	0,63
YP_761201	0,42
EEU44019 b	0,23
XP_001402221	0,71
NP_085750 b	0,08

EJEMPLO 13 - Síntesis enzimática de (R)-3,3-dimetil-2-butilamina a partir de (R)-MBA y 3,3-dimetil-butanona

- 35 Los extractos libres de células que contenían las transaminasas XP_001209325 [SEQ ID No. 1], YP_955297 [SEQ ID No. 13], ABN35871 y AAN21261 heterológamente expresadas producidas como se describe en el EJEMPLO 3 se hicieron reaccionar con 3,3-dimetil-butanona 25 mM y (R)- α -metilbencilamina 50 mM a 28 °C con agitación a 400 rpm durante 24 h en tampón KP_i 100 mM a pH 7,5 que contenía PLP 0,1 mM en un volumen total de 1 ml. Después de 20 h, las reacciones se inactivaron mediante la adición de una muestra de 100 μ l de cada reacción a 50 μ l de disolución de 2-hexanona y 850 μ l de acetonitrilo y centrifugación durante 10 min a 3000 x g. Las muestras se analizaron por detección CG-FID sobre CpSil 8 para columna de aminas (30 m x 0,25 x 0,5) usando MBA comercial,

acetofenona, butanona y sec-butilamina como referencia (Sigma-Aldrich). Los resultados se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13: Concentración de sec-butilamina en mM formada a partir de (R)-MBA y 3,3-dimetil-butanona después de 24 h usando las transaminasas respectivas

Transaminasa	3,3-dimetil-2-butilamina [mM]
ABN35871	0,00
AAN21261	3,28
YP_955297	0,34
XP_001209325	1,49

5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

10

<120> Aminación R-selectiva

<130> 27644-PCT

15

<150> EP10169573.2

<151> 14-07-2010

<160> 46

20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 325

<212> PRT

<213> Aspergillus terreus

25

<400> 1

ES 2 650 245 T3

Met Ala Ser Met Asp Lys Val Phe Ala Gly Tyr Ala Ala Arg Gln Ala
 1 5 10 15

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

Trp Val Glu Gly Glu Leu Val Pro Leu Ala Glu Ala Arg Ile Pro Leu
 35 40 45

Leu Asp Gln Gly Phe Met His Ser Asp Leu Thr Tyr Asp Val Pro Ser
 50 55 60

Val Trp Asp Gly Arg Phe Phe Arg Leu Asp Asp His Ile Thr Arg Leu
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Cys Thr Lys Leu Arg Leu Arg Leu Pro Leu Pro Arg Asp
 85 90 95

Gln Val Lys Gln Ile Leu Val Glu Met Val Ala Lys Ser Gly Ile Arg
 100 105 110

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

Gly Thr Arg Pro Glu Asp Ile Val Asn Asn Leu Tyr Met Phe Val Gln
 130 135 140

Pro Tyr Val Trp Val Met Glu Pro Asp Met Gln Arg Val Gly Gly Ser
 145 150 155 160

Ala Val Val Ala Arg Thr Val Arg Arg Val Pro Pro Gly Ala Ile Asp

ES 2 650 245 T3

165 170 175

Pro Thr Val Lys Asn Leu Gln Trp Gly Asp Leu Val Arg Gly Met Phe
180 185 190

Glu Ala Ala Asp Arg Gly Ala Thr Tyr Pro Phe Leu Thr Asp Gly Asp
195 200 205

Ala His Leu Thr Glu Gly Ser Gly Phe Asn Ile Val Leu Val Lys Asp
210 215 220

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

Lys Ser Val Ile Asn Ala Ala Glu Ala Phe Gly Ile Glu Val Arg Val
245 250 255

Glu Phe Val Pro Val Glu Leu Ala Tyr Arg Cys Asp Glu Ile Phe Met
260 265 270

Cys Thr Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Ile Thr Thr Leu Asp Gly Met
275 280 285

Pro Val Asn Gly Gly Gln Ile Gly Pro Ile Thr Lys Lys Ile Trp Asp
290 295 300

Gly Tyr Trp Ala Met His Tyr Asp Ala Ala Tyr Ser Phe Glu Ile Asp
305 310 315 320

Tyr Asn Glu Arg Asn
325

<210> 2
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID 1

<400> 2
 atggcgtcta tggacaaagt attcgcgtggt tacgctgcac gtcaggctat cctggaatcc 60
 actgaaacta ccaaccggtt cgctaaaggt atcgcatggg ttgaaggatga actggtaccg 120
 ctggctgaag cgcgtatccc gctgctggat cagggcttca tgcactctga cctgacttac 180
 gacgttccgt ctgtatggga cggtcgtttc ttccgtctgg atgaccacat cactcgtctg 240
 gaagcgtcct gcaccaaact gcgtctgcgt ctgccgctgc cgcgcgacca ggtaagcag 300
 atcctggttg aaatggtgc taaatctggt atccgtgacg cattcgttga gctgatcgtt 360

ES 2 650 245 T3

actcgcggtc tgaagcgcg tgcgtggtact cgtccggaag atatcgtaa caacctgtac 420
atgttcgttc agccgtacgt atgggtaatg gaaccggata tgcagcgcgt tggtagttct 480
gctgttggtg cgcgtaccgt tgcgtcgcgt cgcgcagggtg caatcgacc gaccgttaa 540
aacctgcagt ggggcgacct ggttcgtggt atgttcgaag cagctgaccg cggtagcaact 600
taccggttcc tgactgacgg tgacgcacac ctgactgaag gttctggctt caacatcgtt 660
ctggttaaag acggcgtact gtacactccg gaccgcgggtg ttctgcaggg cgtaactcgt 720
aagtctgtta tcaacgctgc tgaagcgttc ggtatcgaag ttgcggttga gttcgttccg 780
gttgaactgg cttaccgctg cgacgaaatc ttcattgtga ctactgcagg tggtagcatg 840
ccaatcacca ctctggacgg tatgccggtt aacggtggtc agatcggctc gatcaccaag 900
aaaatctggg acggttactg ggcgatgcac tacgacgctg cttactcctt cgaaatcgac 960
tacaacgaac gtaattaa 978

<210> 3
<211> 319
<212> PRT
<213> Penicillium chrysogenum

5

<400> 3
Met Ala Thr Met Glu Lys Ile Phe Ala Ala Tyr His Glu Arg Gln Lys
1 5 10 15
Leu Leu Ala Ala Asn Thr His Pro Phe Ala Lys Gly Val Ala Trp Val
20 25 30
Glu Gly Glu Leu Thr Pro Leu His Glu Ala Arg Ile Pro Ile Leu Asp
35 40 45
Gln Gly Phe Met His Ser Asp Leu Thr Tyr Asp Val Pro Ser Val Trp
50 55 60
Asp Gly Arg Phe Phe Arg Leu Asp Asp His Ile Thr Arg Leu Glu Ala
65 70 75 80
Ser Cys Thr Lys Leu Arg Met Lys Leu Pro Leu Pro Arg Asp Glu Val
85 90 95
Lys Gln Ile Leu Val Asp Met Val Ala Lys Ser Gly Ile Arg Asp Ala
100 105 110
Phe Val Glu Ile Ile Val Thr Arg Gly Leu Lys Gly Val Arg Gly Ser
115 120 125

10

ES 2 650 245 T3

Arg Pro Glu Asp Ile Val Asn Arg Ile Tyr Met Phe Ile Gln Pro Tyr
 130 135 140

Val Trp Cys Met Glu Pro Glu Val Gln Pro Val Gly Gly Ser Ala Ile
 145 150 155 160

Ile Ala Arg Thr Val Arg Arg Val Pro Pro Gly Cys Ile Asp Pro Thr
 165 170 175

Val Lys Asn Leu Gln Trp Gly Asp Leu Val Arg Gly Leu Phe Glu Ala
 180 185 190

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

Leu Thr Glu Gly Ser Gly Phe Asn Ile Val Leu Val Lys Asp Asn Ile
 210 215 220

Leu Tyr Thr Pro Ala Arg Gly Val Leu Glu Gly Val Thr Arg Lys Ser
 225 230 235 240

Val Ile Asp Val Ala Arg Ala Ser Gly Phe Asp Ile Lys Val Glu Leu
 245 250 255

Val Pro Val Gln Met Ala Tyr Asp Ala Asp Glu Ile Phe Met Cys Thr
 260 265 270

Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Ile Thr Ser Leu Asp Gly Lys Pro Val
 275 280 285

Asn Asp Gly Lys Val Gly Ser Val Thr Lys Lys Ile Trp Asp Gly Tyr
 290 295 300

Trp Ala Ile His Tyr Asp Pro Ala Tyr Ser Phe Glu Ile Ala Tyr
 305 310 315

<210> 4
 <211> 960
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID 3

<400> 4
 atggcgacca tggaaaaaat cttcgctgct taccacgagc gtcagaaact gctggcagct 60
 aacactcacc cgttcgctaa aggcgtagca tgggttgaag gtgaactgac tccgctgcac 120
 gaagcgcgta tcccgattct ggatcagggc ttcattgcact ctgacctgac ttacgacggt 180

ES 2 650 245 T3

ccgtctgtat gggacggtcg tttcttccgt ctggatgacc acatcactcg tctggaagcg 240
 tcctgcacca aactgcgtat gaagctgccg ctgccgcgcg acgaagtaa gcagatcctg 300
 gttgatatgg ttgctaaatc tggatccgt gacgcattcg ttgaaatcat cgttactcgc 360
 ggtctgaaag gcgttcgtgg ttcccgtccg gaagatatcg ttaaccgtat ctacatgttc 420
 atccagccgt acgtatggtg catggaaccg gaagttcagc cggtaggtgg ttctgctatc 480
 atcgcgcgta ccgttcgtcg cgttccgccca gggtgcatcg acccgaccgt taaaaacctg 540
 cagtgggggcg acctggttcg tggctgtttc gaagcgtctg accgcggtgc agaatacccg 600
 ttctgactg acggtgacac caacctgact gaaggttctg gcttcaacat cgttctggtt 660
 aaagacaaca tcctgtacac tccggcacgt ggtgttctgg aaggcgtaac tcgtaagtct 720
 gttatcgacg ttgctcgcgc ttctggcttc gacatcaaag ttgagctggt tccggtacag 780
 atggcttacg acgctgacga aatcttcatg tgtactactg caggtggtat catgccaatc 840
 acttctctgg acggttaagcc ggtaacgac ggtaaagttg gttctgttac caagaaatc 900
 tgggacgggt actgggcaat ccactacgac ccggcttact ccttcgaaat cgcttattaa 960

<210> 5
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Nectria haematococca

5

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

10

ES 2 650 245 T3

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

5
 <210> 6
 <211> 963
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID 5

<400> 6
 atggcaacca tggacaaagt attcgctggt tacgctgaac gtcaggctgt tctggaagcg 60
 tctaaaaacc cgctggcgaa aggcgttgca tggattcagg gcgaactggt tccgctgcac 120

ES 2 650 245 T3

gaagcgcgta tcccgctgct ggatcagggc ttcattgcaact ctgacctgac ttacgacggt 180
 ccgtctgtat gggacggctg tttcttccgt ctggaagatc acctgaaccg tctggaagcg 240
 tcctgcaaga aatgcgtct gcgtatgccg ctgccgcgtg aagaagttat caaaactctg 300
 gttgatatgg ttgctaaatc tggatccgt gacgcattcg ttgaactgat cgttactcgc 360
 ggtctgactg gcgttcgtgg tgcgaagccg gaagagctgc tgaacaacaa cctgtacatg 420
 ttcattccagc cgtacgtatg ggtaatggac ccggacgctc agtacaccgg tggtcgtgct 480
 atcgttgctc gtaccgttcg tcgcgtaccg ccaggttcta tcgacccgac tatcaaaaac 540
 ctgcagtggg gcgacctggt tcgtggtctg ttcgaagcta acgaccgcgg tgcaacttac 600
 ccgttctcga ctgacggatg cgtaacctg actgaaggtt ctggcttcaa cgttgttctg 660
 atcaagacg gcgtactgta cactccggac cgcggtgctc tgcagggtat cactcgttaag 720
 tctgttatcg acgctgcacg ttcctgcggt tacgaaatcc gcgttgaaca cgttccgatc 780
 gaagcaactt accaggctga cgaatcctg atgtgtacta ctgctggcgg tatcatgcca 840
 atcaccactc tggatgacaa gccggttaaa gacggtaaag ttggtccgat caccaaagct 900
 atctgggacc gttactgggc aatgcactgg gaagacgagt tctctttcaa gatcaactac 960
 taa 963

<210> 7
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Aspergillus niger

5

<400> 7
 Met Ala Ser Met Asn Gln Val Leu Thr Glu Tyr Ala Thr Arg Arg Ala
 1 5 10 15
 Thr Leu Glu Ala Ser Lys Asn Pro Tyr Ala Lys Gly Ile Ala Trp Val
 20 25 30
 Glu Gly Gln Leu Val Pro Leu Arg Glu Ala Arg Ile Pro Leu Ile Asp
 35 40 45
 Gln Gly Phe Leu Arg Ser Asp Leu Thr Tyr Asp Val Ile Ser Val Trp
 50 55 60
 Asp Gly Trp Phe Phe Arg Leu Asp Asp His Leu Ser Arg Leu Glu Leu
 65 70 75 80
 Ala Cys Ala Lys Ser Arg Leu Lys Leu Pro Ile Ser Arg Asp Glu Val
 85 90 95

10

ES 2 650 245 T3

Lys Gln Ser Leu Val Arg Met Val Ala Gln Ser Gly Ile Arg Asp Ala
 100 105 110

Tyr Val Ala Leu Ile Val Thr Arg Gly Leu Gln Ser Val Arg Gly Ala
 115 120 125

Lys Pro Glu Asp Leu Val Asn Asn Leu Tyr Met Phe Val Gln Pro Tyr
 130 135 140

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

Val Thr Arg Thr Val Arg Arg Val Pro Pro Gly Ala Ile Tyr Pro Thr
 165 170 175

Val Lys Asn Leu Gln Trp Gly Asp Leu Thr Arg Gly Met Leu Glu Ala
 180 185 190

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

Leu Thr Glu Gly Ser Gly Tyr Asn Ile Val Leu Ile Lys Ala Gly Ala
 210 215 220

Ile Tyr Thr Pro Asp Arg Gly Val Leu His Gly Val Thr Arg Thr Ser
 225 230 235 240

Val Ile Asp Val Ala Arg Ala Cys Gly Ile Gln Val His Leu Glu Ala
 245 250 255

Val Pro Val Glu Leu Val Tyr Gln Cys Asp Glu Ile Phe Met Cys Thr
 260 265 270

Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Ile Thr Glu Leu Asp Gly Lys Pro Val
 275 280 285

Asn Gly Gly Arg Ile Gly Pro Ile Thr Lys Lys Ile Trp Asp Gly Tyr
 290 295 300

Trp Gly Met His Tyr Asp Pro Ala Tyr Ser Phe Ala Val Ser Tyr Asp
 305 310 315 320

Asp Gly Ser Lys Ala Lys Leu
 325

- <210> 8
- <211> 984
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 650 245 T3

<220>

<223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID 7

<400> 8

atggcttcta tgaaccaggt tctgactgaa tacgcaactc gtcgtgcaac tctggaagcg	60
tctaaaaacc cgtacgctaa aggtatcgca tgggttgaag gtcagctggt accgctgctg	120
gaagcgcgta tcccgctgat cgaccagggc ttcttgcggt ctgacctgac ttacgacggt	180
atctccgcat gggacggctg gttcttccgt ctggatgacc acctgtctcg cctggaactg	240
gcatgtgcga aatctcgctt gaaactgccg atctcccgtg acgaagttaa gcagtctctg	300
gtacgtatgg ttgctcagtc tggatccgt gacgcttacg ttgctctgat cgttactcgc	360
ggtctgcagt ctgtacgtgg tgcgaagccg gaagatctgg ttaacaacct gtacatgttc	420
gttcagccgt acgtatgggt aatggaaccg gaagttcagc gcgttggtgg ttctgctggt	480
gttactcgta ctgttcgtcg cgttccgccg ggtgctatct acccgaccgt taaaaacctg	540
cagtggggcg acctgactcg cggtatgctg gaagcagctg accgcggttc tatgtaccgc	600
ttctgactg acgggtgacgg tcacctgact gaaggttctg gttacaacat cgttctgatc	660
aaagctggcg caatctacac tccggaccgt ggtgttctgc acggtgttac tcgtacttct	720
gttatcgacg ttgctcgcgc ttgcggtatt caggttcacc tggaagcggg accggttgag	780
ctggtttacc agtgcgacga aatcttcctg tgtactactg caggtggtat catgccaatc	840
actgaactgg acggtaaacg ggtaaacggt ggtcgtatcg gtccgatcac caagaaaatc	900
tgggacgggt actggggtat gcactacgac ccggcttact ccttcgctgt ttcttacgac	960
gacggttcta aagcgaagtt ataa	984

5

<210> 9

<211> 321

<212> PRT

<213> Hyphomonas neptunium

<400> 9

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

10

ES 2 650 245 T3

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

Ser Cys Ala Lys Met Arg Leu Pro Leu Pro Ile Ala Arg Pro Glu Leu
85 90 95

Arg Arg Leu Val Met Glu Leu Val Ser Arg Ser Gly Leu Arg Asp Ala
100 105 110

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

Gln Ala Glu Asp Ile Ile Pro Asn Leu Tyr Leu Met Ala Val Pro Tyr
130 135 140

Val Trp Ile Leu Pro Leu Glu Tyr Gln Asn His Gly Ala Pro Ala Val
145 150 155 160

Val Thr Arg Thr Val Arg Arg Thr Pro Pro Gly Ala Leu Asp Pro Thr
165 170 175

Ile Lys Asn Leu Gln Trp Gly Asp Leu Val Arg Gly Leu Met Glu Ala
180 185 190

Gly Asp Arg Asp Ser Phe Phe Pro Ile Leu Pro Asp Gly Asp Gly Asn
195 200 205

Ala Thr Glu Gly Ala Gly Tyr Asn Ile Val Leu Val Arg Asn Gly Glu
210 215 220

Leu His Thr Pro Arg Arg Gly Val Leu Glu Gly Ile Thr Arg Arg Thr
225 230 235 240

Val Leu Glu Ile Ala Ala Ala Arg Gly Leu Lys Thr His Val Thr Glu
245 250 255

Ile Pro Ile Gln Ala Leu Tyr Glu Cys Asp Glu Leu Phe Met Cys Ser
260 265 270

Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Leu Val Leu Leu Asp Gly Asn Ile Val
275 280 285

Gly Asp Gly Thr Val Gly Pro Val Thr Arg Met Ile Trp Glu Ala Tyr
290 295 300

Trp Asp Leu His Asp Asp Pro Gln Leu Ser Glu Pro Val Thr Tyr Ala
305 310 315 320

Pro

<210> 10

ES 2 650 245 T3

<211> 966
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID 9

<400> 10
 atgctgactt tccagaaagt tctgactggc ttccagactc gcgctgacgc tccgctgaa 60
 cgtactgacg cattcgctga cggtatcgcc tggatcgaaa acgagttcgt tccgatcggg 120
 aaagcgcgta tcccgatcct ggatcagggc ttcctgcact ctgacctgac ttacgacggt 180
 ccggcagtat ggaacggtcg tatcttccgt ctggatgacc acctggaccg tctggaagtt 240
 tcctgtgcga agatgcgtct gccgctgcca atcgcgcgctc cggaactgcg tcgtctggta 300
 atggaactgg tttcccgttc tggctcgcgt gacgcttacg ttgaaatcat cgttactcgc 360
 ggtctgaaat tctcgcgcgg tgctcaggct gaagatatca tccogaacct gtacctgatg 420
 gctgttccgt acgtatggat tctgccgctg gaataccaga accacggtgc accggtggtt 480
 gttactcgta ccgttcgtcg tactccgcca ggtgcgctgg acccgactat caaaaacctg 540
 cagtggggcg acctggttcg tggctcgtatg gaagctggcg accgtgactc cttcttcccg 600
 atcctgccgg acggtgacgg taacgcaact gaagtgacag gttacaacat cgttctgggt 660
 cgtaacgggtg aactgcacac tccgcgctgc ggtgttctgg aaggtatcac tcgtcgtacc 720
 gttctggaaa tcgctgctgc tcgcggtctg aaaactcacg ttactgaaat cccgattcag 780
 gcgctgtacg agtgcgacga actgttcacg tgctccactg caggtggtat catgccgctg 840
 gttctgctgg acggtaacat cgttgggtgac ggtactggtg gtccggtaac tcgtatgatc 900
 tgggaagcat actgggatct gcacgacgac ccgcagctgt ctgaaccggt aacttacgca 960
 ccgtaa 966

10 <210> 11
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cenocepacia

15 <400> 11
 Met Pro Arg Glu Thr Arg Ser Ala His His Gly Ile Pro Ser Val Glu
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Phe Pro Gln Gly Ala Ala Tyr Met Asn Gly Arg Phe Ile
 20 25 30

ES 2 650 245 T3

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

ES 2 650 245 T3

275 280 285

Gly Pro Met Thr Arg Arg Leu Phe Asp Ala Tyr Trp Ala Lys His Gly
 290 295 300

Asp Pro Ala Trp Ser Leu Ala Val Asp Tyr Ala Asp Gly
 305 310 315

<210> 12
 <211> 954
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID 11

<400> 12

atgccgcgctg	aaactcgttc	tgacacaccac	ggatatcccg	ctggtgaagc	gccggcattc	60
ccgcagggcg	cagcttacat	gaacggtcgt	ttcatcccaa	tcgctgacgc	tcgcgtttct	120
gtactggact	ggggcttcct	gcaactctgac	gttacttacg	acaccgttca	cgatatggaac	180
ggtcgtttct	tccgctctgga	caagcacatc	gaacgtttcc	gtcgtttctct	ggcgcgctctg	240
cgtctgaacg	ttccgctgac	tgacgacgcg	ctgcgtgaca	tccctggttga	gtgctgacgt	300
cgttctggct	tgcgctcacgc	ttacgttgaa	atgctgtgca	ctcgcgggtgt	ttctccgact	360
ttctctcgcg	atccgcgcga	cgctgttaac	cagttcatcg	cgttcgctgt	tccgtacgg	420
tctgttgcta	acgaacgtca	gctgcgtgaa	ggctctgcacc	tgacggttat	cgacgacg	480
cgctgatcc	cgccagaatc	cgctgatccg	cagatcaaaa	actaccactg	gctggatctg	540
gctgctggct	tgctgaaagg	ttacgacgct	ggcgcagaat	ccgttctgct	gaaatgcact	600
gacggttcta	tcgctgaagg	tccgggcttc	aacgtattcg	ttgttcgctga	cggtcgtctg	660
cgtactccgg	aacgtggtgt	tctgcacggt	atcactcgtc	agactgtatt	cgaactggca	720
actgcgatgg	gtatcgacgc	tcaggctgca	cgtatcgacg	acgctcagct	gcgtgacgct	780
gacgaagttt	tcatcacttc	tactgcaggt	ggatcatgc	cggttaactcg	tctgaacgac	840
gcaactatcg	gtgacggtcg	tccgggtccg	atgactcgtc	gtctgttcga	cgcttactgg	900
gcgaagcacg	gtgaccggcg	atggtctctg	gcggttgact	acgctgacgg	ataa	954

<210> 13
 <211> 337
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium vanbaalenii

<400> 13

Met	Gly	Ile	Asp	Thr	Gly	Thr	Ser	Asn	Leu	Val	Ala	Val	Glu	Pro	Gly
1				5					10					15	

ES 2 650 245 T3

Ala Ile Arg Glu Asp Thr Pro Ala Gly Ser Val Ile Gln Tyr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Glu Ile Asp Tyr Ser Ser Pro Phe Ala Gly Gly Val Ala Trp Ile
 35 40 45

Glu Gly Glu Tyr Leu Pro Ala Glu Asp Ala Lys Ile Ser Ile Phe Asp
 50 55 60

Thr Gly Phe Gly His Ser Asp Leu Thr Tyr Thr Val Ala His Val Trp
 65 70 75 80

His Gly Asn Ile Phe Arg Leu Gly Asp His Leu Asp Arg Leu Leu Asp
 85 90 95

Gly Ala Arg Lys Leu Arg Leu Asp Ser Gly Tyr Thr Lys Asp Glu Leu
 100 105 110

Ala Asp Ile Thr Lys Lys Cys Val Ser Leu Ser Gln Leu Arg Glu Ser
 115 120 125

Phe Val Asn Leu Thr Ile Thr Arg Gly Tyr Gly Lys Arg Lys Gly Glu
 130 135 140

Lys Asp Leu Ser Lys Leu Thr His Gln Val Tyr Ile Tyr Ala Ile Pro
 145 150 155 160

Tyr Leu Trp Ala Phe Pro Pro Ala Glu Gln Ile Phe Gly Thr Thr Ala
 165 170 175

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

Thr Ile Lys Asn Tyr Gln Trp Gly Asp Leu Thr Ala Ala Ser Phe Glu
 195 200 205

Ala Lys Asp Arg Gly Ala Arg Thr Ala Ile Leu Met Asp Ala Asp Asn
 210 215 220

Cys Val Ala Glu Gly Pro Gly Phe Asn Val Cys Ile Val Lys Asp Gly
 225 230 235 240

Lys Leu Ala Ser Pro Ser Arg Asn Ala Leu Pro Gly Ile Thr Arg Lys
 245 250 255

Thr Val Phe Glu Ile Ala Gly Ala Met Gly Ile Glu Ala Ala Leu Arg
 260 265 270

ES 2 650 245 T3

Asp Val Thr Ser His Glu Leu Tyr Asp Ala Asp Glu Ile Met Ala Val
 275 280 285

Thr Thr Ala Gly Gly Val Thr Pro Ile Asn Thr Leu Asp Gly Val Pro
 290 295 300

Ile Gly Asp Gly Glu Pro Gly Pro Val Thr Val Ala Ile Arg Asp Arg
 305 310 315 320

Phe Trp Ala Leu Met Asp Glu Pro Gly Pro Leu Ile Glu Ala Ile Gln
 325 330 335

Tyr

<210> 14

<211> 1014

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 13

<400> 14

atgggtatcg acaccggtac ttctaacctg gttgctggtg agccgggtgc tatccgtgaa 60
 gatactccgg caggttctgt tatccagtac tctgactacg aaatcgacta ctcttctccg 120
 ttcgctggcg gcggttgcatt gatcgaaggt gaatacctgc cggcagaaga tgcgaagatc 180
 tccatcttcg acaactggctt cggtcactct gacctgactt acaccgttgc tcacgtatgg 240
 cacggttaaca tcttccgtct gggtgaccac ctggaccgtc tgctggacgg tgcgcgtaag 300
 ctgcgtctgg attccggtta caccaaagac gaactggctg acatcaccaa gaaatgcgta 360
 tctctgtctc agctgcgtga atccttcggt aacctgacta tcaactcgcg ttacggtaag 420
 cgtaaagggtg aaaaagacct gtctaaactg actcaccagg tttacatcta cgcaatcccg 480
 tacctgtggg cattcccgcc agcagagcag atcttcggtg ctactgctgt tgttccgcgt 540
 cacgttcgtc gcgctggtcg taacaccgtt gatccgacta tcaaaaacta ccagtggggc 600
 gacctgactg cagcttcttt cgaagcgaag gaccgcggtg cacgtactgc gattctgatg 660
 gacgctgaca actgcggtgc tgaagggtcc ggcttcaacg tttgcatcgt taaagacggt 720
 aaactggctt ctccgtcccg taacgcgctg ccaggtatca ctogtaaaac cgtattcgaa 780
 atcgctggcg caatgggtat cgaagctgca ctgcgtgacg taacttctca cgaactgtac 840
 gacgctgacg aaatcatggc ggtaactact gctggcggcg ttactccgat caacaccctg 900
 gatggcgctc cgatcgtgga cggatgaacc ggtccgggtg ccggttctat ccgtgaccgc 960
 ttctggggcg tgatggacga accgggtccg ctgatcgaag cgattcagta ctaa 1014

<210> 15

<211> 305

<212> PRT

ES 2 650 245 T3

<213> Desconocido

<220>

<223> Organismo aislado del suelo

5

<400> 15

Met Val Ser Asp Ile Phe Pro Lys Gly Ser Ala Trp Met Asn Gly Glu
1 5 10 15

Phe Ile Gln Leu Ser Glu Ala Lys Ile Pro Ile Leu Asp Trp Gly Phe
20 25 30

Leu Arg Ser Asp Ala Thr Tyr Asp Val Val His Val Trp Lys Gly Ser
35 40 45

Phe Phe Gln Leu Asp Lys His Ile Asp Arg Phe Phe Lys Ser Thr Glu
50 55 60

Lys Leu Arg Met Pro Cys Arg Leu Ser Arg Glu Glu Ile Lys Arg Ile
65 70 75 80

Leu Ala Gly Cys Val Lys Lys Ala Asp Leu Glu Asp Ser Tyr Val Glu
85 90 95

Met Ile Gln Thr Arg Gly Met Ser Pro Asn Phe Val Arg Asp Pro Arg
100 105 110

Lys Ala Thr Pro Arg Phe Met Ala Phe Ala Val Pro Phe Gly Trp Ile
115 120 125

Leu Arg Pro Glu Asp Phe Glu Lys Gly Leu Asp Val Tyr Leu Thr Asp
130 135 140

Ile Thr Arg Ile Pro Pro Ser Ser Val Asp Pro Thr Ile Lys Asn Tyr
145 150 155 160

His Trp Met Asp Leu Val Thr Gly Met Leu Asp Ala Tyr Asp Arg Gly
165 170 175

His His Thr Ala Ile Leu Val Asp Glu Asp Asn Asn Val Ser Glu Gly
180 185 190

Pro Gly Phe Asn Ile Phe Ser Val Asp Glu Asn Glu Ile Asn Thr Pro
195 200 205

ES 2 650 245 T3

Asp His Gly Val Leu Glu Gly Ile Thr Arg Gln Thr Val Ile Asp Leu
 210 215 220

Ala Lys Glu Leu Asn Ile Lys Val Asn Lys Lys Pro Ile Thr Ile Lys
 225 230 235 240

Met Leu Lys Ser Ser Glu Glu Leu Phe Ala Thr Ser Thr Ala Gly Gly
 245 250 255

Val Met Pro Ile Thr Lys Ile Ser Gly Lys Asn Ile Asn Lys Gly Thr
 260 265 270

Val Gly Asp Ile Thr Arg Lys Ile His Lys Leu Tyr Trp Asp Lys His
 275 280 285

Ser Asp Pro Asp Trp Ser Thr Ser Ile Asn Asp Ile Leu Leu Tyr Lys
 290 295 300

Val
 305

<210> 16
 <211> 915
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 15

<400> 16
 atggttttctg acatcttccc gaaaggttct gcatggatga acggtgaatt catccagctg 60
 tctgaagcga aaatcccgat cctcgactgg ggcttctctg gttctgacgc aacttacgac 120
 gttgttcacg tatggaaagg ttctttcttc cagctggaca agcacatcga ccgcttcttc 180
 aaatctactg aaaaactgcg tatgccatgc cgtctgtctc gtgaagaaat caagcgtatc 240
 ctggctggct gcgttaagaa agctgacctg gaagactcct acggtgaaat gatccagact 300
 cgcggtatgt ctccgaactt cgttcgtgac ccgcgtaaag caactccgcg ctcatggcg 360
 ttcgctgttc cgttcggctg gattctgctg ccggaagact tcgaaaaagg tctggacggt 420
 tacctgactg acatcactcg tatcccgccg tcttccggtg atccgactat caaaaactac 480
 cactggatgg acctggttac cggtatgctg gatgcttac accgcggtca ccacactgcg 540
 attctgggtg acgaagataa caacgtttct gaaggccgg gcttcaacat cttctctggt 600
 gacgaaaacg aaatcaacac tccggatcac ggcgtactgg aaggatcac tcgtcagact 660
 gttatcgacc tggctaaaga gctgaacatc aaagttaaca agaaaccaat cactatcaaa 720

ES 2 650 245 T3

atgctgaaat cttctgaaga gctgttcgca acttctactg ctggcggcgt aatgccgatc 780
 accaagatct ccggtaaaaa catcaacaaa ggcaccgttg gtgacatcac tcgtaagatc 840
 cacaaactgt actgggacaa gcaactctgat ccggactggg ctacttccat caacgacatc 900
 ctgctgtaca aggta 915

<210> 17
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Mesorhizobium loti

5

<400> 17
 Met Ala Phe Met Asp Gly Gln Tyr Leu Pro Met Ser Glu Ala Lys Val
 1 5 10 15
 Ser Val Leu Asp Trp Gly Phe Leu His Ser Asp Ala Thr Tyr Asp Thr
 20 25 30
 Val His Val Trp Asp Gly Arg Phe Phe Arg Leu Asn Leu His Val Asp
 35 40 45
 Arg Phe Phe Arg Gly Met Glu Lys Leu Arg Met Lys Leu Pro Tyr Asn
 50 55 60
 Arg Ser Glu Ile Glu Lys Ile Leu Ser Thr Cys Val Ala Leu Ser Gly
 65 70 75 80
 His Lys Ser Ala Tyr Val Glu Met Ile Cys Thr Arg Gly Gly Ser Pro
 85 90 95
 Thr Phe Ser Arg Asp Pro Arg Gln Ser Glu Asn Arg Phe Ile Ala Phe
 100 105 110
 Ala Val Pro Phe Gly Ser Val Ala Asn Lys Glu Gln Leu Glu Arg Gly
 115 120 125
 Leu His Val Ala Ile Ser Asn Thr Val Arg Ile Pro Pro Lys Ser Ile
 130 135 140
 Asp Pro Thr Ile Lys Asn Tyr His Trp Leu Asp Leu Val Lys Gly Leu
 145 150 155 160
 Phe Asp Ala Tyr Asp Tyr Gly Ala Glu Thr Ala Leu Ile Val Asp Ile
 165 170 175
 Asn Asp Asn Ile Ala Glu Gly Pro Gly Phe Asn Val Phe Thr Val Lys
 180 185 190

10

ES 2 650 245 T3

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

Arg Gln Thr Val Phe Asp Leu Cys Asp Glu Leu Gly Leu Ser Val Ser
 210 215 220

Ala Gly Asp Ile Asp Arg Asn Glu Leu Lys Gly Ala Asp Glu Val Phe
 225 230 235 240

Ile Thr Ser Thr Ala Gly Gly Ile Met Pro Val Ser Lys Ile Asp Glu
 245 250 255

Thr Val Val Gly Asp Gly Lys Val Gly Ala Leu Thr Arg Gln Leu Ala
 260 265 270

Asp Leu Tyr Trp Glu Lys His Ala Asp Pro Ala Trp Ser Thr Ala Val
 275 280 285

Asn Tyr Ala
 290

<210> 18
 <211> 876
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 17

<400> 18
 atggcggttca tggacggtca gtacctgccg atgtctgaag cgaaagtttc tgtactggac 60
 tggggcttcc tgcactctga cgcaacttac gacaccgttc acgtatggga cggtcgtttc 120
 ttccgtctga acctgcacgt tgaccgcttc ttccgcggtg tggaaaaact gcgtatgaag 180
 ctgccgtaca accgttctga aatcgaaaaa atcctgtcta cttgcgtagc gctgtctggt 240
 cacaagtctg cttacgttga aatgatctgt actcgcggtg gttctccgac tttctctcgc 300
 gatccgcgtc agtctgaaaa ccgcttcacg gcgcttcgctg ttccgctcgg ttctggtgct 360
 aacaagagc agctggaacg tggctctgcac gttgctatct ccaacaccgt tcgtatcccg 420
 ccaaagtcta tcgaccgac tatcaaaaac taccactggc tggatctggt taaaggctctg 480
 ttcgacgctt acgactacgg cgcaaaaact gcaactgatcg ttgatataca cgacaacatc 540
 gctgaaggtc cgggcttcaa cgtattcacc gttaaagacg gtcgtctgaa aactccggct 600
 tacggcgctc tggcaggtat cactcgtcag actgtattcg acctgtgcga cgaactgggt 660
 ctgtctgttt ctgctggcga catcgaccgt aacgaactga aagggtgctga cgaagttttc 720
 atcacttcta ctgcaggtgg tatcatgccg gtttccaaga tcgacgaaac cgttgttggg 780

ES 2 650 245 T3

gacggtaaag ttgggtgcgct gactcgtcag ctggctgacc tgtactggga aaaacacgct 840

gatccggcat ggtctactgc tgtaactac gcataa 876

<210> 19

<211> 299

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

10 <223> Organismo aislado del suelo

<400> 19

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

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

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

Leu Glu Asp Tyr Leu Asp Arg Phe Met Val Ser Met Asp Lys Leu Arg
50 55 60

Leu Asp Val Gly Met Thr Arg Ala Glu Ile Lys Ala Ala Leu Val Glu
65 70 75 80

Leu Val Ala Thr Ser Gly Leu Lys Ser Ala Tyr Val Ser Met Val Ala
85 90 95

Ser Arg Gly Thr Pro Gln Val Pro Gly Thr Arg Asp Pro Arg Ala Cys
100 105 110

Thr Asn His Phe Tyr Ala Trp Ala Val Pro Phe Ile Trp Val Ile Pro
115 120 125

Gln Glu Val Ala Gln Arg Gly Ala His Ile Ser Val Glu Glu Asn Leu
130 135 140

Arg Arg Ile Pro Pro His Ser Val Asp Pro Thr Val Lys Asn Tyr His
145 150 155 160

Trp Gly Asp Met Thr Ala Ala Leu Phe Asn Ala Leu Asp Ala Gly Tyr
165 170 175

Asp Thr Thr Val Leu Leu Asp Thr Asp Gly Tyr Val Thr Glu Gly Pro
180 185 190

ES 2 650 245 T3

Gly Phe Asn Ile Phe Ala Val Ile Asp Gly Lys Val Leu Thr Pro Arg
 195 200 205

Ser Gly Met Leu Glu Gly Ile Ser Arg Lys Thr Val Leu Glu Ile Cys
 210 215 220

Ala Asp Leu Gly Ile Pro Cys Ala Gln Thr Asp Ile Ser Leu Asp Glu
 225 230 235 240

Phe Leu Ser Ala Asp Glu Val Phe Thr Ala Thr Thr Ala Gly Gly Pro
 245 250 255

Val Pro Val Thr Arg Val Asn Lys Thr Ile Leu Gly Asn Asp Ala Val
 260 265 270

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

Arg Asp Asp Leu Thr Glu Lys Ile Thr Tyr Val
 290 295

<210> 20
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 19

<400> 20
 atgacttact ccgcaggtgc tgcattgatg gacggtaaag ttatcccggg ttctgaagcg 60
 aagatctccg tattcgactg gggcttgact cgttctgaca tcacttacga cgttggtcac 120
 gtatgggaag gtgcattctt ccgtctggaa gactacctgg atcgcttcat ggtttccatg 180
 gacaagctgc gtctggacgt tggatgact cgcgctgaaa tcaaagctgc gctggtttaa 240
 ctggttgcaa cttctggtct gaaatctgct tacgtttcca tgggtgcttc tcgcggtact 300
 ccgcaggttc cgggtactcg tgaccgcgc gcttgacca accacttcta cgcatgggcg 360
 gtaccgttca tctgggttat cccgcaggaa gttgctcagc gtggtgctca catctccggt 420
 gaagaaaacc tgcgtcgtat cccgccgcac tctggtgatc cgaccgttaa aactaccac 480
 tggggcgaca tgactgctgc gctgttcaac gcgctggatg ctggttacga cactaccggt 540
 ctgctggata ctgacggtta cgttactgaa ggtccgggct tcaacatctt cgctgttatc 600
 gacggtaaag ttctgactcc gcgttctggt atgctggaag gtatctcccg taaaaccggt 660
 ctggaaatct gcgcagacct ggtatccca tgcgcacaga ctgacatctc tctggacgag 720
 ttctgtctg ctgacgaagt attcactgca accactgctg gcggtccggt accggttaact 780

ES 2 650 245 T3

cgcgtaaca aaactattct gggtaacgac gctggtggtc cgatcactgc gcgtctgctg 840

aaaacttact gggactggca caaccgtgac gacctgaccg agaagatcac ttacgtctaa 900

<210> 21

<211> 299

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

10 <223> Organismo aislado del suelo

<400> 21

Met Thr Tyr Ala Thr Gly Ala Ala Trp Met Asp Gly Gln Val Ile Pro
1 5 10 15

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

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

Leu Glu Asp Tyr Leu Asp Arg Phe Thr Val Ser Met Asp Lys Leu Arg
50 55 60

Leu Asp Val Gly Met Asn Arg Ala Asp Ile Lys Ala Ala Leu Val Glu
65 70 75 80

Leu Val Ala Thr Ser Gly Leu Gln Ser Ala Tyr Val Ser Met Val Ala
85 90 95

Ser Arg Gly Thr Pro Leu Val Pro Gly Thr Arg Asp Pro Arg Ala Cys
100 105 110

Thr Asn His Phe Tyr Ala Trp Ala Val Pro Phe Ile Trp Val Ile Pro
115 120 125

Gln Glu Val Ala Gln Arg Gly Ala His Ile Ser Val Glu Glu Asn Leu
130 135 140

Arg Arg Ile Pro Pro His Ser Val Asp Pro Thr Val Lys Asn Tyr His
145 150 155 160

Trp Gly Asp Met Thr Ala Ala Leu Phe Asn Ala Leu Asp Ala Gly Tyr
165 170 175

Asp Thr Thr Val Leu Leu Asp Thr Asn Gly Tyr Ile Thr Glu Gly Pro
180 185 190

ES 2 650 245 T3

Gly Phe Asn Ile Phe Ala Val Ile Asp Gly Lys Val Leu Thr Pro Arg
 195 200 205

Leu Gly Met Leu Glu Gly Ile Ser Arg Lys Thr Val Leu Glu Ile Cys
 210 215 220

Ala Asp Leu Gly Ile Pro Cys Ala Glu Ala Asp Ile Ser Leu Ala Glu
 225 230 235 240

Phe Leu Ser Ala Asp Glu Leu Phe Thr Ala Thr Thr Ala Gly Gly Pro
 245 250 255

Val Pro Val Thr Arg Val Asn Lys Thr Ile Leu Gly Asn Asp Ala Ile
 260 265 270

Gly Pro Ile Thr Ala Gln Val Leu Lys Thr Tyr Trp Asp Trp His His
 275 280 285

Arg Asp Asp Leu Thr Glu Lys Ile Ala Tyr Ile
 290 295

<210> 22
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 21

<400> 22
 atgacttacg caactggcgc tgcattgatg gacggtcagg ttatcccggg ttctgaagcg 60
 aagatctccg tattcgactg gggcttgact cgttctgaca tcacttacga cgttggtcac 120
 gtatgggaag gtgcgttctt ccgtctggaa gactacctgg atcgcttcac cgtttccatg 180
 gacaagctgc gtctggacgt tggtatgaac cgcgctgaca tcaaagcggc actggttgaa 240
 ctggttgcaa cttctggtct gcagtctgct tacgtttcca tgggtgcttc tcgcggtact 300
 ccgctgggtac cgggtactcg tgaccgcgc gcttgacca accacttcta cgcatgggcg 360
 gtaccgttca tctgggttat cccgcaggaa gttgctcagc gtggtgcgca catctccggt 420
 gaagaaaacc tgcgtcgtat cccgcgcac tctggtgatc cgaccgttaa gaactaccac 480
 tggggcgaca tgactgctgc gctgttcaac gcgctggatg ctggttacga cactaccggt 540
 ctgctggata ccaacggtta catcactgaa ggtccgggct tcaacatctt cgctgttatc 600
 gacggtaaag ttctgactcc gcgtctgggt atgctggaag gtatctcccg taaaaccggt 660
 ctggaatct gcgcagacct ggtatccca tgccgagaag ctgacatctc tctggctgag 720
 ttctgtctg ctgacgaact gttcactgca accactgcag gtggtccggt accggttaact 780

ES 2 650 245 T3

cgcgtaaca aaactattct ggtaacgac gctatcggtc cgatcactgc tcaggttctg 840

aaaacttact gggactggca ccaccgtgac gacctgactg aaaaaatcgc ttacatttaa 900

<210> 23

<211> 326

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Organismo aislado del suelo

<400> 23

Met Ala Ile Ile Gln Val Gln Gln Ile Met His Glu Asn Pro Leu His
1 5 10 15

Ala Arg Ala Pro His Glu Pro Arg Tyr Glu Asp Gly Ser Ala Phe Cys
20 25 30

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

Ala Gly Phe Leu His Ala Asp Ala Ala Tyr Asp Val Val Thr Val Ser
50 55 60

Arg Gly Asn Phe Phe Arg Leu Asp Asp His Leu Ala Arg Met Glu Glu
65 70 75 80

Ser Ser Ala Lys Phe Phe Leu Glu Asn Pro Phe Asn Arg Asp Gln Val
85 90 95

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

Tyr Val Trp Trp Cys Val Thr Arg Gly Pro Leu Ser Val Asp Arg Arg
115 120 125

Asp Arg Ser Ala Met Lys Asn Ala Met Phe Ala Phe Ala Val Pro Phe
130 135 140

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

Ile Ser Lys Arg Tyr Asn Arg Ile Ser Ala Lys Ala Val Asp Pro Thr
165 170 175

Ala Lys Asn Phe His Trp Met Asp Met Lys Leu Ala Leu Phe Glu Ala
180 185 190

ES 2 650 245 T3

Met Thr Gln Glu Lys Asp Trp Ala Val Leu Val Asp Glu His Asp Asn
 195 200 205

Leu Thr Glu Ala Ala Gly Ala Asn Val Phe Phe Val Lys Asn Gly Glu
 210 215 220

Leu Tyr Thr Pro Ala Glu Gly Cys Leu Leu Gly Ile Thr Arg Gln Ser
 225 230 235 240

Val Phe Asp Ile Ala Ala Glu Leu Gly Ile Lys Val Asn Ile Gly Lys
 245 250 255

Tyr Thr Ala Thr Gln Leu Arg Glu Ala Asp Glu Ala Phe Thr Ser Ser
 260 265 270

Ser Ala Gly Gly Ile Met Pro Val Ser Ala Val Asp Asp Gln Pro Leu
 275 280 285

Gly Asn His Asn Gly Pro Gly Pro Ile Ser Glu Lys Ile His Asn Leu
 290 295 300

Tyr Trp Glu Lys Arg Trp Ala Gly Trp His Ala Gln Pro Ala Glu Tyr
 305 310 315 320

Phe Ser Ser Ile Pro Ala
 325

<210> 24

<211> 981

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 23

<400> 24

atggctatca tccaggttca gcagatcatg cacgaaaacc cgctgcacgc gcgtgctccg	60
cacgaaccgc gctacgaaga cggttctgca ttctgcgacg gtaaatacgt tccgatttct	120
gaagcaaccg ttccgctggt tgatgctggc ttcctgcacg ctgacgctgc ttacgacggt	180
gttaccgttt ctgcggttaa cttcttccgt ctggatgacc acctggcgcg tatggaagag	240
tcttctgcga aattcttctt gaaaaccgc ttcaaccgtg accaggttcg tgaaatcctg	300
cacaacctgg ttcgtaacgc aggtctgaaa gacgcttacg tatggtggtg cgtaactcgc	360
ggtccgctgt ctggtgaccg tcgtgaccgt tctgcgatga agaacgcaat gttcgtcttc	420
gctgttccgt tcttcttcca ggtgacgac gaagttcgta ctgcggttc taacctgctg	480
atctccaagc gctacaaccg tatctctgcg aaagctggtg atccgactgc gaaaaacttc	540

ES 2 650 245 T3

cactggatgg acatgaagct ggcgctgttc gaagcgaatga ctcaggaaaa agactgggag 600
 gtactgggtg acgaacacga caacctgact gaagctgcag gtgctaactg attcttcggt 660
 aaaaacggtg aactgtacac tccggcagaa ggttgctctg tgggtatcac tcgtcagtct 720
 gtattcgaca tcgctgctga actgggtatc aaagttaaca tcggtaaata cactgcaact 780
 cagctgcgtg aagctgacga agcattcact tcttcttccg caggtggtat catgccggtt 840
 tctgctggtg atgaccagcc gctgggtaac cacaacggtc cgggtccaat ctctgagaag 900
 atccacaacc tgtactggga aaaacgctgg gctggctggc acgctcagcc ggcagaatac 960
 ttctcttcca tcccggcata a 981

<210> 25
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Burkholderia sp. 383

<400> 25
 Met Ala Ile Ile Gln Val Gln Gln Ile Met His Glu Asn Pro Leu His
 1 5 10 15
 Ala Arg Ala Pro His Glu Pro Arg Tyr Glu Asp Gly Ser Ala Phe Cys
 20 25 30
 Asp Gly Asn Tyr Val Pro Ile Thr Glu Ala Thr Val Pro Leu Val Asp
 35 40 45
 Ala Gly Phe Leu His Ala Asp Ala Ala Tyr Asp Val Val Thr Val Ser
 50 55 60
 Arg Gly Asn Phe Phe Arg Leu Asp Asp His Leu Thr Arg Met Glu Glu
 65 70 75 80
 Ser Ser Ala Lys Phe Phe Leu Glu Asn Pro Phe Asn Arg Asp Gln Val
 85 90 95
 Lys Glu Ile Leu His Asn Leu Val Arg Asn Ala Gly Leu Lys Asp Ala
 100 105 110
 Tyr Val Trp Trp Cys Val Thr Arg Gly Pro Leu Ser Val Asp Arg Arg
 115 120 125
 Asp Arg Gly Ala Met Lys Asn Ala Met Phe Ala Phe Ala Val Pro Phe
 130 135 140
 Phe Phe Gln Ala Asp Asp Glu Val Arg Thr Arg Gly Ser Asn Leu Leu
 145 150 155 160

5

10

ES 2 650 245 T3

Ile Ser Lys Leu Tyr Asn Arg Ile Ser Ala Lys Ala Val Asp Pro Thr
 165 170 175

Ala Lys Asn Phe His Trp Met Asp Met Lys Leu Ala Leu Phe Glu Ala
 180 185 190

Met Thr Gln Glu Lys Asp Trp Ala Val Leu Val Asp Glu Ser Asp Asn
 195 200 205

Leu Thr Glu Ala Ala Gly Ala Asn Val Phe Phe Ala Lys Asn Gly Glu
 210 215 220

Leu Tyr Thr Pro Ala Glu Gly Cys Leu Leu Gly Ile Thr Arg Gln Ser
 225 230 235 240

Val Phe Asp Ile Ala Ala Glu Leu Gly Ile Lys Val Asn Ile Gly Lys
 245 250 255

Tyr Thr Ala Thr Gln Leu Arg Glu Ala Asp Glu Ala Phe Thr Ser Ser
 260 265 270

Ser Ala Gly Gly Ile Met Pro Val Ser Ala Ile Asp Asp Gln Pro Leu
 275 280 285

Gly Asn Arg Asn Gly Pro Gly Pro Ile Ser Glu Lys Ile His Asn Leu
 290 295 300

Tyr Trp Glu Lys Arg Trp Ala Gly Trp His Ala Gln Pro Ala Glu Tyr
 305 310 315 320

Phe Ser Ser Val Pro Ala
 325

<210> 26
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 25

<400> 26
 atggctatca tccaggttca gcagatcatg cacgaaaacc cgctgcacgc gcgtgctccg 60
 cacgaaccgc gctacgaaga cggttctgca ttctgcgacg gtaactacgt tccgatcact 120
 gaagcaaccg ttccgctggg tgatgctggc ttctgcacg ctgacgctgc ttacgacggt 180
 gttaccgttt ctgcggttaa cttcttccgt ctggatgacc acctgactcg tatggaagag 240

ES 2 650 245 T3

tcttctgcga aattcttctt gaaaacccg ttcaaccgtg accagggttaa agaaatcctg 300
 cacaacctgg ttcgtaacgc aggtctgaaa gacgcttacg tatggtggtg cgtaactcgc 360
 ggtccgctgt ctgttgaccg tcgtgaccgc ggtgcatga agaacgcaat gttcgtttc 420
 gctgttccgt tcttcttcca ggctgatgac gaagtctgta ctgcgggttc taacctgctg 480
 atctccaagc tgtacaaccg tatctctgcg aaagcggttg atccgactgc gaaaaacttc 540
 cactggatgg acatgaagct ggcgctgttc gaagcgtgta ctcaggaaaa agactgggcg 600
 gtactgggtg acgaatctga caacctgact gaagctgcag gtgctaactg attctctcgt 660
 aaaaacgggtg aactgtacac tccggcagaa ggttgctcgc tgggtatcac tcgtcagctc 720
 gtattcgaca tcgctgctga actgggtatc aaagttaaca tcggtaaata cactgcaact 780
 cagctgcgtg aagctgacga agcattcact tcttcttccg cagggtggtat catgccggtt 840
 tctgctatcg acgaccagcc gctgggtaac cgtaacggtc cgggtccgat ttctgagaag 900
 atccacaacc tgtactggga aaaaagctgg gctggctggc acgctcagcc ggcagaatac 960
 ttctcttccg ttcccgcata a 981

<210> 27
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp. YM-1

5

<400> 27
 Met Gly Tyr Thr Leu Trp Asn Asp Gln Ile Val Lys Asp Glu Glu Val
 1 5 10 15
 Lys Ile Asp Lys Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Val Tyr
 20 25 30
 Glu Val Val Lys Val Tyr Asn Gly Glu Met Phe Thr Val Asn Glu His
 35 40 45
 Ile Asp Arg Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Lys Ile Arg Ile Thr Ile Pro
 50 55 60
 Tyr Thr Lys Asp Lys Phe His Gln Leu Leu His Glu Leu Val Glu Lys
 65 70 75 80
 Asn Glu Leu Asn Thr Gly His Ile Tyr Phe Gln Val Thr Arg Gly Thr
 85 90 95
 Ser Pro Arg Ala His Gln Phe Pro Glu Asn Thr Val Lys Pro Val Ile
 100 105 110
 Ile Gly Tyr Thr Lys Glu Asn Pro Arg Pro Leu Glu Asn Leu Glu Lys

10

ES 2 650 245 T3

115 120 125

Gly Val Lys Ala Thr Phe Val Glu Asp Ile Arg Trp Leu Arg Cys Asp
 130 135 140

Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Ala Val Leu Ala Lys Gln Glu Ala
 145 150 155 160

His Glu Lys Gly Cys Tyr Glu Ala Ile Leu His Arg Asn Asn Thr Val
 165 170 175

Thr Glu Gly Ser Ser Ser Asn Val Phe Gly Ile Lys Asp Gly Ile Leu
 180 185 190

Tyr Thr His Pro Ala Asn Asn Met Ile Leu Lys Gly Ile Thr Arg Asp
 195 200 205

Val Val Ile Ala Cys Ala Asn Glu Ile Asn Met Pro Val Lys Glu Ile
 210 215 220

Pro Phe Thr Thr His Glu Ala Leu Lys Met Asp Glu Leu Phe Val Thr
 225 230 235 240

Ser Thr Thr Ser Glu Ile Thr Pro Val Ile Glu Ile Asp Gly Lys Leu
 245 250 255

Ile Arg Asp Gly Lys Val Gly Glu Trp Thr Arg Lys Leu Gln Lys Gln
 260 265 270

Phe Glu Thr Lys Ile Pro Lys Pro Leu His Ile
 275 280

<210> 28
 <211> 852
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 27

<400> 28
 atgggttaca ctctgtggaa cgaccagatc gttaaagacg aagaagttaa gatcgacaaa 60
 gaagaccgtg gttaccagtt cggtgacggt gtttacgaag ttgttaaagt ttacaacggt 120
 gaaatgttca cggttaacga acacatcgac cgtctgtacg cttctgctga aaaaatccgt 180
 atcactatcc cgtacaccaa agacaaattc caccagctgc tgcacgaact gggtgaaaaa 240
 aacgaactga acaccggtca catctacttc caggtaactc gcggtacttc tccgcgcgct 300
 caccagttcc cggaaaacac cgtaagccg gttatcatcg gttacaccaa agagaacccg 360

ES 2 650 245 T3

cgcccgtgg aaaacctgga aaaaggcggt aaagcaactt tcgttgaaga tatccgctgg 420
ctgcgctgcg acatcaagtc tctgaacctg ctgggtgctg tactggcgaa gcaggaagca 480
cacgaaaaag gctgctacga agctatcctg caccgtaaca acaccgtaac tgaaggttct 540
tcttctaacg tattcggat caaagacggt attctgtaca ctcacccggc taacaacatg 600
atcctgaaag gtatcactcg tgacgttggt atcgcttgcg caaacgaaat caacatgccg 660
gttaaagaga tcccgttcac cactcacgaa gcgctgaaaa tggacgaact gttcgttaact 720
tctaccactt ctgaaatcac tccggttacc gaaatcgacg gtaaaactgat ccgtgacggg 780
aaagttggcg agtggactcg taagctgcag aagcagttcg aaaccaagat cccgaagccg 840
ctgcacatat aa 852

<210> 29
<211> 918
<212> ADN
<213> Curtobacterium pusillum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(918)

<400> 29
atg acc cgt gcg acc ctc ctg acc gtg acc gcg ccg acc cgt ccc gcc 48
Met Thr Arg Ala Thr Leu Leu Thr Val Thr Ala Pro Thr Arg Pro Ala
1 5 10 15
tcg gcg gac gag cac ggg gcg gac cgt gcc gcc ggc gac gcc ggc ttc 96
Ser Ala Asp Glu His Gly Ala Asp Arg Ala Ala Gly Asp Ala Gly Phe
20 25 30
gtc ctc gcc gac ttc ggc gca ccg cag gtc cgc atc acc gac ctc ggc 144
Val Leu Ala Asp Phe Gly Ala Pro Gln Val Arg Ile Thr Asp Leu Gly
35 40 45
atc acg cgc ggc gac ggg gtg ttc gag acc atc gcc gtg atc gac ggc 192
Ile Thr Arg Gly Asp Gly Val Phe Glu Thr Ile Ala Val Ile Asp Gly
50 55 60
cac ccg cag gcg ctg gaa ctg cac ctc gga ccg ctg gcc cac tcg gcg 240
His Pro Gln Ala Leu Glu Leu His Leu Gly Arg Leu Ala His Ser Ala
65 70 75 80
gcg ctc ctc gac ctc ccc gaa ccg gat gcg gcg gtg tgg ccg gag gcc 288
Ala Leu Leu Asp Leu Pro Glu Pro Asp Ala Ala Val Trp Arg Glu Ala
85 90 95
gtc ctc gcg ggc gtg gcg gac tac ccg tcc cgc aac ggc gac ggc ggc 336
Val Leu Ala Gly Val Ala Asp Tyr Arg Ser Arg Asn Gly Asp Gly Gly
100 105 110
gaa ctg ttc gcc aag ctc atc ctg acc ccg ggc atc gag ggc gag gcc 384
Glu Leu Phe Ala Lys Leu Ile Leu Thr Arg Gly Ile Glu Gly Glu Gly
115 120 125

5
10

ES 2 650 245 T3

cgg ccg agc ggg tgg gtg ttc gtg gac gag ggc gag gac ttc tcg cag	432
Arg Pro Ser Gly Trp Val Phe Val Asp Glu Gly Glu Asp Phe Ser Gln	
130 135 140	
cag cgc ctc ggg atc cgc gtc gtc acg ctc gac cgc ggc tac cgt cac	480
Gln Arg Leu Gly Ile Arg Val Val Thr Leu Asp Arg Gly Tyr Arg His	
145 150 155 160	
gac gtg gcg gag acg tcc ccg tgg ctg ctg gcc gga gcg aag tcc ctg	528
Asp Val Ala Glu Thr Ser Pro Trp Leu Leu Ala Gly Ala Lys Ser Leu	
165 170 175	
tcg tac gcg acc aat cgc gcc gcc ggc cgg gag gcg gcc cgc cgg ggc	576
Ser Tyr Ala Thr Asn Arg Ala Ala Gly Arg Glu Ala Ala Arg Arg Gly	
180 185 190	
gcc gac gac gtg atc ttc gtc agc tcc gac gga tac gca ctg gag ggg	624
Ala Asp Asp Val Ile Phe Val Ser Ser Asp Gly Tyr Ala Leu Glu Gly	
195 200 205	
ccg acc tcg aac gtc atc gtg ctt gcg gac ggc gtc gtg cgc acc ccg	672
Pro Thr Ser Asn Val Ile Val Leu Ala Asp Gly Val Val Arg Thr Pro	
210 215 220	
cag acg gac cag ggc atc ctg gcc ggc acc acc cag gcg gcc gtg ttc	720
Gln Thr Asp Gln Gly Ile Leu Ala Gly Thr Thr Gln Ala Ala Val Phe	
225 230 235 240	
gac ttc ttc gag gag cgc gcc tac ccc acc gag tac cgc cgc atc tcc	768
Asp Phe Phe Glu Glu Arg Gly Tyr Pro Thr Glu Tyr Arg Arg Ile Ser	
245 250 255	
gcg gac gag ctg cgc gac gcg gag gcg ctg tgg ctc gtc tcc agc gtg	816
Ala Asp Glu Leu Arg Asp Ala Glu Ala Leu Trp Leu Val Ser Ser Val	
260 265 270	
cgc cag gcc gca ccg atc acg gcg ctc gac gac cgc gag tac ccg gtc	864
Arg Gln Ala Ala Pro Ile Thr Ala Leu Asp Asp Arg Glu Tyr Pro Val	
275 280 285	
gac gcg gcg ctc acg gcc gac ctg aac gcg tac ctg ctc gcc cgc acc	912
Asp Ala Ala Leu Thr Ala Asp Leu Asn Ala Tyr Leu Leu Ala Arg Thr	
290 295 300	
gac tga	918
Asp	
305	
<210> 30	
<211> 305	
<212> PRT	
<213> Curtobacterium pusillum	
<400> 30	
Met Thr Arg Ala Thr Leu Leu Thr Val Thr Ala Pro Thr Arg Pro Ala	
1 5 10 15	
Ser Ala Asp Glu His Gly Ala Asp Arg Ala Ala Gly Asp Ala Gly Phe	
20 25 30	

5

10

ES 2 650 245 T3

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

Ile Thr Arg Gly Asp Gly Val Phe Glu Thr Ile Ala Val Ile Asp Gly
 50 55 60

His Pro Gln Ala Leu Glu Leu His Leu Gly Arg Leu Ala His Ser Ala
 65 70 75 80

Ala Leu Leu Asp Leu Pro Glu Pro Asp Ala Ala Val Trp Arg Glu Ala
 85 90 95

Val Leu Ala Gly Val Ala Asp Tyr Arg Ser Arg Asn Gly Asp Gly Gly
 100 105 110

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

Arg Pro Ser Gly Trp Val Phe Val Asp Glu Gly Glu Asp Phe Ser Gln
 130 135 140

Gln Arg Leu Gly Ile Arg Val Val Thr Leu Asp Arg Gly Tyr Arg His
 145 150 155 160

Asp Val Ala Glu Thr Ser Pro Trp Leu Leu Ala Gly Ala Lys Ser Leu
 165 170 175

Ser Tyr Ala Thr Asn Arg Ala Ala Gly Arg Glu Ala Ala Arg Arg Gly
 180 185 190

Ala Asp Asp Val Ile Phe Val Ser Ser Asp Gly Tyr Ala Leu Glu Gly
 195 200 205

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

Gln Thr Asp Gln Gly Ile Leu Ala Gly Thr Thr Gln Ala Ala Val Phe
 225 230 235 240

Asp Phe Phe Glu Glu Arg Gly Tyr Pro Thr Glu Tyr Arg Arg Ile Ser
 245 250 255

Ala Asp Glu Leu Arg Asp Ala Glu Ala Leu Trp Leu Val Ser Ser Val
 260 265 270

Arg Gln Ala Ala Pro Ile Thr Ala Leu Asp Asp Arg Glu Tyr Pro Val
 275 280 285

ES 2 650 245 T3

Asp Ala Ala Leu Thr Ala Asp Leu Asn Ala Tyr Leu Leu Ala Arg Thr
 290 295 300

Asp
 305

5 <210> 31
 <211> 918
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 30

<400> 31
 atgaccctg caaccctgct gaccgttacc gcaccgacct gtccggcaag cgcagatgaa 60
 catggtgcag atcgtgcagc cggatgatgca ggttttgctc tggcagattt tggatgcaccg 120
 caggttcgtg ttaccgatct ggttattacc cgtggtgatg gtgtttttga aaccattgca 180
 gttattgatg gtcattccga ggactggaa ctgcatctgg gtcgtctggc acatagcgcga 240
 gcactgctgg atctgccgga accggatgca gcagtttggc gtgaagccgt gctggcaggc 300
 gttgcagatt atcgtagccg taatggtgat ggcggtgaac tgtttgcaaa actgattctg 360
 acccgtggta ttgaaggtga aggtcgtccg agcgggtggg tttttgttga tgaaggcgaa 420
 gatttttagcc agcagccctt ggtattcgt gttgttacc tggatcgtgg ttatcgtcat 480
 gatgttcag aaaccagccc gtggtgctg gctggtgcaa aaagcctgag ctatgcaacc 540
 aatcgtgccg caggctcgtg agcagcacgt cgtggtgccg atgatgttat tttgtttagc 600
 agtgatgggt atgcaactga aggtccgacc agcaatgta ttgtgctggc cgatgggtgtt 660
 gttcgtacac cgcagaccga tcagggcatt ctggcaggca ccaccaggc agccgttttt 720
 gatttttttg aagaacgcgg ttatccgacc gaatcgtc gtatttcagc cgatgaactg 780
 cgtgatgccg aagcactgtg gctggttagc agcgttcgtc aggcagcacc gattacagca 840
 ctggatgatc gtgaatatcc ggtgatgca gcactgacc cagatctgaa tgcatatctg 900
 ctggcacgta ccgattaa 918

15 <210> 32
 <211> 1131
 <212> ADN
 <213> Curtobacterium pusillum

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1131)

<400> 32

ES 2 650 245 T3

atg Met 1	act Thr	tct Ser	acc Thr	agc Ser 5	atc Ile	tcc Ser	ctt Leu	acc Thr	agc Ser 10	ggc Gly	ccc Pro	acc Thr	gag Glu	acg Thr 15	agc Ser	48
ggc Gly	ctg Leu	ctc Leu	tgg Trp 20	cag Gln	gtc Val	acc Thr	cgc Arg	aac Asn 25	gag Glu	gcg Ala	gcg Ala	cgc Arg	gac Asp 30	gcc Ala	gcc Ala	96
gag Glu	cgc Arg	gag Glu 35	gag Glu	atc Ile	ctc Leu	gcc Ala	gat Asp 40	ccc Pro	ggt Gly	ttc Phe	ggc Gly	aac Asn 45	cac His	ttc Phe	acc Thr	144
gac Asp 50	cac His	atg Met	gtc Val	gac Asp	atc Ile	tgc Cys 55	tgg Trp	tcg Ser	gcg Ala	aag Lys	gga Gly 60	ggc Gly	tgg Trp	cac His	cgg Arg	192
ccg Pro 65	cgc Arg	gtc Val	tcg Ser	ccg Pro	tac Tyr 70	ggc Gly	ccg Pro	atc Ile	cag Gln	ctc Leu 75	gac Asp	ccg Pro	tcg Ser	gcc Ala 80	gcc Ala	240
gtg Val	ctg Leu	cac His	tac Tyr	gcg Ala	cag Gln	gag Glu	atc Ile	ttc Phe	gag Glu	ggg Gly	ctg Leu	aag Lys	gcg Ala	tac Tyr 95	cgc Arg	288
cac His	gag Glu	gac Asp	ggc Gly 100	tcg Ser	atc Ile	tgg Trp	aca Thr	ttc Phe 105	cgc Arg	ccg Pro	gag Glu	gcc Ala	aac Asn 110	gcc Ala	gcc Ala	336
cgc Arg	atg Met	cag Gln 115	cgc Arg	tcg Ser	gcc Ala	tat Tyr	cgc Arg 120	ctg Leu	gcg Ala	ctg Leu	ccc Pro	gag Glu	ctc Leu	ccg Pro	gtc Val	384
gag Glu	cac His	ttc Phe 130	ctc Leu	gac Asp	tcg Ser	ttg Leu	aag Lys 135	cag Gln	ctc Leu	gtc Val	gcg Ala	gtg Val	gac Asp	ggc Gly	gat Asp	432
tgg Trp 145	gtg Val	ccg Pro	acc Thr	gcg Ala	ccg Pro	gag Glu	acc Thr	agc Ser	ctc Leu	tac Tyr	ctg Leu	cgt Arg	ccg Pro	ttc Phe	atg Met 160	480
ttc Phe	gcc Ala	aag Lys	gag Glu	gcg Ala	ttc Phe	ctg Leu	ggc Gly	gtg Val	cgc Arg	ccg Pro	gcg Ala	aac Asn	aag Lys	gtc Val 175	gcg Ala	528
tac Tyr	tac Tyr	ctg Leu	atc Ile	gcg Ala	agc Ser	ccg Pro	gcg Ala	ggc Gly	gcc Ala	tat Tyr	ttc Phe	tcg Ser	ggc Gly	ggc Gly	gtc Val	576
gca Ala	ccc Pro	gtc Val	tcg Ser	atc Ile	tgg Trp	ctg Leu	tcc Ser	gac Asp	cgc Arg	tgg Trp	tcg Ser	cgc Arg	gcc Ala	ggc Gly	cac His	624
ggg Gly	ggc Gly	acc Thr	ggg Gly	gcg Ala	gcg Ala	aag Lys 215	acc Thr	ggc Gly	ggc Gly	aac Asn	tac Tyr	ggc Ala	tcc Ser	agc Ser	ctc Leu	672
ctg Leu 225	cct Pro	cag Gln	gcc Ala	gag Glu	gcg Ala	ggc Ala	gag Glu	cac His	ggc Gly	tgc Cys	gca Ala	cag Gln	gtg Val	ctg Leu	ttc Phe 240	720
ctc Leu	gac Asp	tcg Ser	gtc Val	gaa Glu 245	ggc Gly	cga Arg	tac Tyr	ctc Leu	gag Glu	gag Glu	ctc Leu	ggc Gly	ggg Gly	atg Met	aac Asn 255	768

ES 2 650 245 T3

gtg gtg ctc gtc tac aag gac ggc acg gtg gtg acc ccg gag tcc gac 816
 Val Val Leu Val Tyr Lys Asp Gly Thr Val Val Thr Pro Glu Ser Asp
 260 265 270

agc atc ctg gag ggc atc acg ctg gac tcg atc ctg cag ctc gcg cgt 864
 Ser Ile Leu Glu Gly Ile Thr Leu Asp Ser Ile Leu Gln Leu Ala Arg
 275 280 285

gat cgc ggc cac cgg gtc gag cgc cgc cgg gtg acg atc gac gag tgg 912
 Asp Arg Gly His Arg Val Glu Arg Arg Arg Val Thr Ile Asp Glu Trp
 290 295 300

cgc gac ggc gtc gag agc ggc gac atc gtc gag gtg ttc gcc tgc ggc 960
 Arg Asp Gly Val Glu Ser Gly Asp Ile Val Glu Val Phe Ala Cys Gly
 305 310 315 320

acg gcc gcg gtg atc acc ccg atc ggc gag ctc aag tcg gac acc ttc 1008
 Thr Ala Ala Val Ile Thr Pro Ile Gly Glu Leu Lys Ser Asp Thr Phe
 325 330 335

acc gtc ggc gac atc acc gcg cct ccc ggt gag ctg acg atg gcg ctg 1056
 Thr Val Gly Asp Ile Thr Ala Pro Pro Gly Glu Leu Thr Met Ala Leu
 340 345 350

cgc cag gag ctc acc gac atc cag tac ggc cgc gtc cac gac cgg cac 1104
 Arg Gln Glu Leu Thr Asp Ile Gln Tyr Gly Arg Val His Asp Arg His
 355 360 365

aac tgg atg acg cgc ctc gac gcg tag 1131
 Asn Trp Met Thr Arg Leu Asp Ala
 370 375

<210> 33
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> Curtobacterium pusillum

5

<400> 33
 Met Thr Ser Thr Ser Ile Ser Leu Thr Ser Gly Pro Thr Glu Thr Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Trp Gln Val Thr Arg Asn Glu Ala Ala Arg Asp Ala Ala
 20 25 30

Glu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Asp Pro Gly Phe Gly Asn His Phe Thr
 35 40 45

Asp His Met Val Asp Ile Cys Trp Ser Ala Lys Gly Gly Trp His Arg
 50 55 60

Pro Arg Val Ser Pro Tyr Gly Pro Ile Gln Leu Asp Pro Ser Ala Ala
 65 70 75 80

Val Leu His Tyr Ala Gln Glu Ile Phe Glu Gly Leu Lys Ala Tyr Arg
 85 90 95

10

ES 2 650 245 T3

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

ES 2 650 245 T3

	340	345	350	
	Arg Gln Glu Leu Thr Asp Ile Gln Tyr Gly Arg Val His Asp Arg His			
	355	360	365	
	Asn Trp Met Thr Arg Leu Asp Ala			
	370	375		
5	<210> 34 <211> 795 <212> ADN <213> Curtobacterium pusillum			
10	<220> <221> CDS <222> (1)..(795)			
	<400> 34 atg gac gcg agc agc acc ctc ttc gac tgg gcg gcc ggc gag ctc gtc 48 Met Asp Ala Ser Ser Thr Leu Phe Asp Trp Ala Gly Gly Glu Leu Val 1 5 10 15			
	gcc cgg gac tcc tgc gag gtc gcc gag acc gcg ctg ctc gtc gcg gac 96 Ala Arg Asp Ser Cys Glu Val Ala Glu Thr Ala Leu Leu Val Ala Asp 20 25 30			
	tcc ttc ctc gtc gcc gac gcc acc gct ctc gcc ctc ggt ctg cac gcc 144 Ser Phe Leu Val Ala Asp Gly Thr Ala Leu Ala Leu Gly Leu His Gly 35 40 45			
	tcc cgg ttc cag gac tcc gcg cgt ctg cag ggg cac ccc gac cga gcg 192 Ser Arg Phe Gln Asp Ser Ala Arg Leu Gln Gly His Pro Asp Arg Ala 50 55 60			
	gag ctg cag cgg ttc tgg gag gcg gcc gtc gcc gcg ctg ccg cgc acc 240 Glu Leu Gln Arg Phe Trp Glu Ala Gly Val Ala Ala Leu Pro Arg Thr 65 70 75 80			
	gcc gcc tgg ttc ccg cgg ttc gag ctg gtg cgc acc cgc gac gcg ctg 288 Gly Ala Trp Phe Pro Arg Phe Glu Leu Val Arg Thr Arg Asp Ala Leu 85 90 95			
	cgg ttg cga ttc ccg ttg cgc acc gcg ccg gcg ttg acg agc gag ctg 336 Arg Leu Arg Phe Arg Leu Arg Thr Ala Pro Ala Leu Thr Ser Glu Leu 100 105 110			
	gtc gtc gcc acg gcg gcc tcc gac ccg cga cgg gct ccc gac atc aaa 384 Val Val Ala Thr Ala Ala Ser Asp Pro Arg Arg Ala Pro Asp Ile Lys 115 120 125			
	ggg ccc gac atc gac ccg ctg tgg gtg ctg cgc cag cgc gca cag gcg 432 Gly Pro Asp Ile Asp Arg Leu Ser Val Leu Arg Gln Arg Ala Gln Ala 130 135 140			
	gcc gcc gcc cag gag gcg atc ctg ctc gac gag gga ttc gtg gcc gac 480 Ala Gly Ala Gln Glu Ala Ile Leu Leu Asp Glu Gly Phe Val Ala Asp 145 150 155 160			
	ggt gcg acc acc gcc ctg ctc tgg tgg cgc gcc gac acg ctc tac acg 528			

ES 2 650 245 T3

Gly Ala Thr Thr Ala Leu Leu Trp Trp Arg Gly Asp Thr Leu Tyr Thr
 165 170 175

ccc ccg ctg tcc ctg ccc cgg gtg gac agc gtc gcc gcg cgc acc gtc 576
 Pro Pro Leu Ser Leu Pro Arg Val Asp Ser Val Ala Ala Arg Thr Val
 180 185 190

cgc gcc atc gcc gcc gcc ctg cgg gtg ccg gtc gac gag gag gag gcg 624
 Arg Gly Ile Ala Ala Ala Leu Arg Val Pro Val Asp Glu Glu Glu Ala
 195 200 205

cgc ccc gcg cag ctg gac gcc gtg acg ctc tgg gcc gtc aac gcc ctg 672
 Arg Pro Ala Gln Leu Asp Gly Val Thr Leu Trp Ala Val Asn Ala Leu
 210 215 220

cac gcc atc cgg gcc gtc acg gcc tgg gtg gac gcc ccc gga ctg tcg 720
 His Gly Ile Arg Ala Val Thr Ala Trp Val Asp Gly Pro Gly Leu Ser
 225 230 235 240

cag gat ccg gca cgc acg gac gcc tgg cgc gcc cgc ttc gcg atg ctg 768
 Gln Asp Pro Ala Arg Thr Asp Ala Trp Arg Ala Arg Phe Ala Met Leu
 245 250 255

tcg cgt ccg ctg ccg ctc gca gcc tga 795
 Ser Arg Pro Leu Pro Leu Ala Ala
 260

<210> 35
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Curtobacterium pusillum

<400> 35
 Met Asp Ala Ser Ser Thr Leu Phe Asp Trp Ala Gly Gly Glu Leu Val
 1 5 10 15

Ala Arg Asp Ser Cys Glu Val Ala Glu Thr Ala Leu Leu Val Ala Asp
 20 25 30

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

Ser Arg Phe Gln Asp Ser Ala Arg Leu Gln Gly His Pro Asp Arg Ala
 50 55 60

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

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

Arg Leu Arg Phe Arg Leu Arg Thr Ala Pro Ala Leu Thr Ser Glu Leu
 100 105 110

5

10

ES 2 650 245 T3

Val Val Ala Thr Ala Ala Ser Asp Pro Arg Arg Ala Pro Asp Ile Lys
 115 120 125

Gly Pro Asp Ile Asp Arg Leu Ser Val Leu Arg Gln Arg Ala Gln Ala
 130 135 140

Ala Gly Ala Gln Glu Ala Ile Leu Leu Asp Glu Gly Phe Val Ala Asp
 145 150 155 160

Gly Ala Thr Thr Ala Leu Leu Trp Trp Arg Gly Asp Thr Leu Tyr Thr
 165 170 175

Pro Pro Leu Ser Leu Pro Arg Val Asp Ser Val Ala Ala Arg Thr Val
 180 185 190

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

Arg Pro Ala Gln Leu Asp Gly Val Thr Leu Trp Ala Val Asn Ala Leu
 210 215 220

His Gly Ile Arg Ala Val Thr Ala Trp Val Asp Gly Pro Gly Leu Ser
 225 230 235 240

Gln Asp Pro Ala Arg Thr Asp Ala Trp Arg Ala Arg Phe Ala Met Leu
 245 250 255

Ser Arg Pro Leu Pro Leu Ala Ala
 260

<210> 36
 <211> 795
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón de la SEQ ID NO 35

<400> 36
 atggatgcaa gcagcaccct gtttgattgg gcagcgggtg aactgggtgc acgtgatagc 60
 tgtgaagttg cagaaaccgc actgctggtt gcagatagct ttctgggtgc cgatggcacc 120
 gcactggcac tgggtctgca tggtagccgt tttcaggata gcgcacgtct gcagggtcac 180
 ccgcatcgtg cagaactgca gcgtttttgg gaagccggtg ttgcagcact gcctcgtacc 240
 ggtgcatggt ttccgcgttt tgaactggtg cgtaccctgt atgcactgcg tctgcgtttt 300
 cgtctgcgta cagcaccggc actgaccagc gaactggtgg ttgccaccgc agcaagcgat 360
 ccgcgtcgtg caccggatat taaaggtccg gatattgatc gtctgagcgt tctgcgtcag 420

ES 2 650 245 T3

cgtgcacagg cagccggtgc acaagaggca attctgctgg atgaaggttt tgttgcagat 480
 ggtgcaacca cagccctgct gtggtggcgt ggtgataccc tgtatacccc tccgctgagc 540
 ctgcctcgtg ttgatagcgt tgcagcccgt accgctcgtg gtattgcagc agccctgctg 600
 gttccggttg atgaagaaga agcacgtccg gcacagctgg atggtgtgac cctgtgggca 660
 gttaatgcac tgcattggcat tctgtcagtt accgcatggg ttgatggtcc gggctctgagc 720
 caggatccgg cacgtaccga tgcctggcgt gcacgttttg caatgctgag ccgtccgctg 780
 ccgctggcag cataa 795

<210> 37
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Rahnella aquatilis

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(930)

<400> 37
 atg acg aag aaa gct gat tac att tgg ttc aac ggc gag atg gtt cca 48
 Met Thr Lys Lys Ala Asp Tyr Ile Trp Phe Asn Gly Glu Met Val Pro
 1 5 10 15
 tgg gca gaa gct aaa gtc cat gtc atg tca cac gca ctg cat tac ggc 96
 Trp Ala Glu Ala Lys Val His Val Met Ser His Ala Leu His Tyr Gly
 20 25 30
 act tcc gtt ttc gaa ggc gtg cgt tgc tac gac tcc cat aaa ggc cca 144
 Thr Ser Val Phe Glu Gly Val Arg Cys Tyr Asp Ser His Lys Gly Pro
 35 40 45
 gtc gta ttc cgt cac cgt gaa cat atg cag cgt ctg cgc gat tcc gca 192
 Val Val Phe Arg His Arg Glu His Met Gln Arg Leu Arg Asp Ser Ala
 50 55 60
 aaa att tac cgt atg cct gtt tcc cag agt gtg gat gag ctg atg gaa 240
 Lys Ile Tyr Arg Met Pro Val Ser Gln Ser Val Asp Glu Leu Met Glu
 65 70 75 80
 gct tgc cgc gaa acc ctg cgt aaa aac aat ctg gtc agc gcg tat atc 288
 Ala Cys Arg Glu Thr Leu Arg Lys Asn Asn Leu Val Ser Ala Tyr Ile
 85 90 95
 cgt ccg ctg gtg ttt gtc ggc gat gtg ggt atg ggc gtt aat ccg ccg 336
 Arg Pro Leu Val Phe Val Gly Asp Val Gly Met Gly Val Asn Pro Pro
 100 105 110
 gac ggc tac aaa act gat gtg atc atc gcc gcc ttc ccg tgg ggc gcg 384
 Asp Gly Tyr Lys Thr Asp Val Ile Ile Ala Ala Phe Pro Trp Gly Ala
 115 120 125
 tat ctg ggt gaa gaa gcg ctg gag cag ggt atc gac gcg atg gtg tct 432
 Tyr Leu Gly Glu Glu Ala Leu Glu Gln Gly Ile Asp Ala Met Val Ser
 130 135 140
 tca tgg aac cgc gtt gct gca aac acc att cca acc gct gcg aaa gcc 480

ES 2 650 245 T3

Ser Trp Asn Arg Val Ala Ala Asn Thr Ile Pro Thr Ala Ala Lys Ala
 145 150 155 160

ggt ggt aac tac ctg tcc tcc ctg ctg gtc ggc agc gaa gca cgt cgt 528
 Gly Gly Asn Tyr Leu Ser Ser Leu Leu Val Gly Ser Glu Ala Arg Arg
 165 170 175

cac ggt tat cag gaa ggt atc gcg ctg gac att cac ggc tat gtg tct 576
 His Gly Tyr Gln Glu Gly Ile Ala Leu Asp Ile His Gly Tyr Val Ser
 180 185 190

gaa ggc gct ggc gaa aac ctg ttt gaa gtg aaa gaa ggc att ctg ttc 624
 Glu Gly Ala Gly Glu Asn Leu Phe Glu Val Lys Glu Gly Ile Leu Phe
 195 200 205

aca ccg cca ttt acc tct tct gcc ctg cca ggt atc acc cgt gac gct 672
 Thr Pro Pro Phe Thr Ser Ser Ala Leu Pro Gly Ile Thr Arg Asp Ala
 210 215 220

att att aaa ctg gca aaa gac ctg ggt ctt gaa gtg cgt gag caa gtt 720
 Ile Ile Lys Leu Ala Lys Asp Leu Gly Leu Glu Val Arg Glu Gln Val
 225 230 235 240

ctg tcc cgt gaa tcc ctg tat ctg gca gac gaa gtc ttc atg tcc ggt 768
 Leu Ser Arg Glu Ser Leu Tyr Leu Ala Asp Glu Val Phe Met Ser Gly
 245 250 255

acc gct gca gaa atc acc ccg gtg gcg agc gtt gac ggc att cag gtc 816
 Thr Ala Ala Glu Ile Thr Pro Val Arg Ser Val Asp Gly Ile Gln Val
 260 265 270

ggt atc ggt aaa cgt ggt ccg gtg acc aaa caa att cag gat gca ttc 864
 Gly Ile Gly Lys Arg Gly Pro Val Thr Lys Gln Ile Gln Asp Ala Phe
 275 280 285

ttc ggc ctg ttc acc ggc aaa acc gaa gat aaa tgg ggt tgg ctg gat 912
 Phe Gly Leu Phe Thr Gly Lys Thr Glu Asp Lys Trp Gly Trp Leu Asp
 290 295 300

cca atc aac cca caa taa 930
 Pro Ile Asn Pro Gln
 305

<210> 38
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Rahnella aquatilis

<400> 38
 Met Thr Lys Lys Ala Asp Tyr Ile Trp Phe Asn Gly Glu Met Val Pro
 1 5 10 15

Trp Ala Glu Ala Lys Val His Val Met Ser His Ala Leu His Tyr Gly
 20 25 30

Thr Ser Val Phe Glu Gly Val Arg Cys Tyr Asp Ser His Lys Gly Pro
 35 40 45

5

10

ES 2 650 245 T3

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

Lys Ile Tyr Arg Met Pro Val Ser Gln Ser Val Asp Glu Leu Met Glu
65 70 75 80

Ala Cys Arg Glu Thr Leu Arg Lys Asn Asn Leu Val Ser Ala Tyr Ile
85 90 95

Arg Pro Leu Val Phe Val Gly Asp Val Gly Met Gly Val Asn Pro Pro
100 105 110

Asp Gly Tyr Lys Thr Asp Val Ile Ile Ala Ala Phe Pro Trp Gly Ala
115 120 125

Tyr Leu Gly Glu Glu Ala Leu Glu Gln Gly Ile Asp Ala Met Val Ser
130 135 140

Ser Trp Asn Arg Val Ala Ala Asn Thr Ile Pro Thr Ala Ala Lys Ala
145 150 155 160

Gly Gly Asn Tyr Leu Ser Ser Leu Leu Val Gly Ser Glu Ala Arg Arg
165 170 175

His Gly Tyr Gln Glu Gly Ile Ala Leu Asp Ile His Gly Tyr Val Ser
180 185 190

Glu Gly Ala Gly Glu Asn Leu Phe Glu Val Lys Glu Gly Ile Leu Phe
195 200 205

Thr Pro Pro Phe Thr Ser Ser Ala Leu Pro Gly Ile Thr Arg Asp Ala
210 215 220

Ile Ile Lys Leu Ala Lys Asp Leu Gly Leu Glu Val Arg Glu Gln Val
225 230 235 240

Leu Ser Arg Glu Ser Leu Tyr Leu Ala Asp Glu Val Phe Met Ser Gly
245 250 255

Thr Ala Ala Glu Ile Thr Pro Val Arg Ser Val Asp Gly Ile Gln Val
260 265 270

Gly Ile Gly Lys Arg Gly Pro Val Thr Lys Gln Ile Gln Asp Ala Phe
275 280 285

Phe Gly Leu Phe Thr Gly Lys Thr Glu Asp Lys Trp Gly Trp Leu Asp
290 295 300

Pro Ile Asn Pro Gln
305

ES 2 650 245 T3

<210> 39
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 38

<400> 39
 atgaccaaaa aagccgacta catttggttt aatggtgaaa tggttccgtg ggctgaagca 60
 aaagttcatg ttatgagcca tgcaactgcat tatggcacca gcgtttttga aggtgttcgt 120
 tgttatgata gccataaagg tccggttggt tttcgtcatc gtgaacacat gcagcgtctg 180
 cgtgatagcg caaaaatcta tcgatgccc gttagccaga gcgttgatga actgatggaa 240
 gcatgtcgtg aaaccctgcg taaaacaat ctggttagcg catatattcg tccgctgggt 300
 tttgttgggtg atgttggtat ggggtgtaat ccgcctgatg gttataaaac cgatgttatt 360
 attgcagcat ttccgtgggg tgcatatctg ggtgaagaag cactggaaca gggatttgat 420
 gcaatggtta gcagctggaa tcgtgttgca gcaaatacca ttccgaccgc agcaaaagcc 480
 ggtggttaatt atctgagcag cctgctgggt ggtagcgaag cacgtcgtca tggttatcaa 540
 gaaggtattg cactggatat tcatggctat gttagcgaag gtgccggtga aaacctgttt 600
 gaagttaaag aaggcattct gtttacccca ccgtttacca gcagcgcact gcctgggtatt 660
 acccgtgatg caattatcaa actggcaaaa gatctgggtc tggagttcg tgaacagggt 720
 ctgagccgtg aaagcctgta tctggcagat gaagttttta tgagcggcac cgcagcagaa 780
 attacaccgg ttcgtagcgt ggatgggtatt caggttggtta ttggtaaacg tgggtccggtt 840
 accaaacaaa ttcaggatgc attttttggc ctgtttaccg gcaaaaccga agataaatgg 900
 ggttggtggtg atccgattaa tccgcagtaa 930

10

<210> 40
 <211> 798
 <212> ADN
 <213> Rahnella aquatilis

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(798)

20

<400> 40
 atg tgg att aat ggt gtg gcg gcc gcg atg ttg tcg gca agt gac cgt 48
 Met Trp Ile Asn Gly Val Ala Ala Ala Met Leu Ser Ala Ser Asp Arg
 1 5 10 15
 tca gtg cag ttt ggc gac ggt tgc ttt acc aca gcc agg gtg tca gac 96

ES 2 650 245 T3

Ser	Val	Gln	Phe	Gly	Asp	Gly	Cys	Phe	Thr	Thr	Ala	Arg	Val	Ser	Asp	
			20					25					30			
ggt	gtg	att	gtg	ttt	ctg	gcc	ggg	cat	att	cag	cgt	ctg	caa	cgt	gct	144
Gly	Val	Ile	Val	Phe	Leu	Ala	Gly	His	Ile	Gln	Arg	Leu	Gln	Arg	Ala	
		35					40					45				
gcg	tcg	gta	ctg	cgg	att	gaa	ggt	gtg	gac	tgg	acg	gct	ctg	gaa	cag	192
Ala	Ser	Val	Leu	Arg	Ile	Glu	Gly	Val	Asp	Trp	Thr	Ala	Leu	Glu	Gln	
		50				55					60					
gaa	atg	gtt	ctg	gct	gcc	gga	cag	cag	aaa	gag	gca	gtg	gtt	aaa	gcc	240
Glu	Met	Val	Leu	Ala	Ala	Gly	Gln	Gln	Lys	Glu	Ala	Val	Val	Lys	Ala	
		65			70					75					80	
gtc	gtg	acg	cgc	ggg	cag	ggc	ggc	cga	ggt	tac	agc	gcc	gca	ggt	tgc	288
Val	Val	Thr	Arg	Gly	Gln	Gly	Gly	Arg	Gly	Tyr	Ser	Ala	Ala	Gly	Cys	
				85					90					95		
tct	gcg	ccg	acg	cgt	att	gtt	tct	gcg	tct	gat	tat	ccg	gtg	cat	tat	336
Ser	Ala	Pro	Thr	Arg	Ile	Val	Ser	Ala	Ser	Asp	Tyr	Pro	Val	His	Tyr	
			100					105					110			
cac	gcg	tgg	cgg	caa	cag	ggc	gtg	aaa	ctc	gcg	ctg	agc	ccg	gtc	aca	384
His	Ala	Trp	Arg	Gln	Gln	Gly	Val	Lys	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Thr	
		115					120					125				
ctg	agt	aag	aac	ccg	ttg	ctg	gcc	gga	ata	aaa	cat	ctt	aac	cgg	ctg	432
Leu	Ser	Lys	Asn	Pro	Leu	Leu	Ala	Gly	Ile	Lys	His	Leu	Asn	Arg	Leu	
		130				135					140					
gaa	cag	gta	atg	atc	cgc	atg	cat	ctt	gac	cag	aca	gat	gcc	aat	gaa	480
Glu	Gln	Val	Met	Ile	Arg	Met	His	Leu	Asp	Gln	Thr	Asp	Ala	Asn	Glu	
		145			150					155					160	
gcg	ctg	gtg	gtt	gac	acc	tgg	ggc	tgc	ctg	gtg	gaa	tgc	tgt	gcg	gca	528
Ala	Leu	Val	Val	Asp	Thr	Ser	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Cys	Cys	Ala	Ala	
				165					170					175		
aat	tta	ttc	tgg	cgt	aag	gga	aat	cag	gtg	ttt	act	ccg	gat	tta	tcg	576
Asn	Leu	Phe	Trp	Arg	Lys	Gly	Asn	Gln	Val	Phe	Thr	Pro	Asp	Leu	Ser	
			180					185					190			
cag	tcc	ggc	gtt	gat	ggt	ctt	atg	cgt	cag	cac	gtc	atc	cgc	gta	ctt	624
Gln	Ser	Gly	Val	Asp	Gly	Leu	Met	Arg	Gln	His	Val	Ile	Arg	Val	Leu	
		195					200					205				
gaa	gcg	aca	tcc	ccc	tgg	gtt	gtg	aac	atc	gtc	agt	gaa	tct	gcg	gaa	672
Glu	Ala	Thr	Ser	Pro	Trp	Val	Val	Asn	Ile	Val	Ser	Glu	Ser	Ala	Glu	
		210				215					220					
aca	tta	tca	gat	gct	gac	gaa	atc	ctg	att	tgt	aac	gcc	ctg	atg	ccc	720
Thr	Leu	Ser	Asp	Ala	Asp	Glu	Ile	Leu	Ile	Cys	Asn	Ala	Leu	Met	Pro	
				225		230				235					240	
gtt	ctg	ccg	gtg	aat	cag	gtc	gat	gac	aaa	tat	tac	att	tca	cgg	cgt	768
Val	Leu	Pro	Val	Asn	Gln	Val	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Ser	Arg	Arg	
				245					250					255		
ttg	tgc	gat	ttc	ctg	ctc	cag	agc	tgt	taa							798
Leu	Cys	Asp	Phe	Leu	Leu	Gln	Ser	Cys								
			260					265								

<210> 41
 <211> 265
 <212> PRT

ES 2 650 245 T3

<213> *Rahnella aquatilis*

<400> 41

Met Trp Ile Asn Gly Val Ala Ala Ala Met Leu Ser Ala Ser Asp Arg
1 5 10 15

Ser Val Gln Phe Gly Asp Gly Cys Phe Thr Thr Ala Arg Val Ser Asp
20 25 30

Gly Val Ile Val Phe Leu Ala Gly His Ile Gln Arg Leu Gln Arg Ala
35 40 45

Ala Ser Val Leu Arg Ile Glu Gly Val Asp Trp Thr Ala Leu Glu Gln
50 55 60

Glu Met Val Leu Ala Ala Gly Gln Gln Lys Glu Ala Val Val Lys Ala
65 70 75 80

Val Val Thr Arg Gly Gln Gly Gly Arg Gly Tyr Ser Ala Ala Gly Cys
85 90 95

Ser Ala Pro Thr Arg Ile Val Ser Ala Ser Asp Tyr Pro Val His Tyr
100 105 110

His Ala Trp Arg Gln Gln Gly Val Lys Leu Ala Leu Ser Pro Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Asn Pro Leu Leu Ala Gly Ile Lys His Leu Asn Arg Leu
130 135 140

Glu Gln Val Met Ile Arg Met His Leu Asp Gln Thr Asp Ala Asn Glu
145 150 155 160

Ala Leu Val Val Asp Thr Ser Gly Cys Leu Val Glu Cys Cys Ala Ala
165 170 175

Asn Leu Phe Trp Arg Lys Gly Asn Gln Val Phe Thr Pro Asp Leu Ser
180 185 190

Gln Ser Gly Val Asp Gly Leu Met Arg Gln His Val Ile Arg Val Leu
195 200 205

Glu Ala Thr Ser Pro Trp Val Val Asn Ile Val Ser Glu Ser Ala Glu
210 215 220

ES 2 650 245 T3

Thr Leu Ser Asp Ala Asp Glu Ile Leu Ile Cys Asn Ala Leu Met Pro
225 230 235 240

Val Leu Pro Val Asn Gln Val Asp Asp Lys Tyr Tyr Ile Ser Arg Arg
245 250 255

Leu Cys Asp Phe Leu Leu Gln Ser Cys
260 265

<210> 42
<211> 867
5 <212> ADN
<213> Achromobacter spanius

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(867)

<400> 42
atg att ccg ggc gtg ccg ggc gaa agc cag gtg tat ctc aac ggc gag 48
Met Ile Pro Gly Val Pro Gly Glu Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Glu
1 5 10 15

ttc ctg cgt gtc gac gag gcg aaa gtc tcc gtc ctg gac cgc ggt ttt 96
Phe Leu Arg Val Asp Glu Ala Lys Val Ser Val Leu Asp Arg Gly Phe
20 25 30

att ttt ggc gac ggc atc tac gaa gtc gtt ccc gtg tac cag ggc aag 144
Ile Phe Gly Asp Gly Ile Tyr Glu Val Val Pro Val Tyr Gln Gly Lys
35 40 45

gca ttc cgc atg gcg gag cac ctt aac cgc ctg gac cgc agc ctg gcc 192
Ala Phe Arg Met Ala Glu His Leu Asn Arg Leu Asp Arg Ser Leu Ala
50 55 60

gcc ttg cgc atc acg ccg ccg atg gat cgc gcg ggc tgg gtc gac ctg 240
Ala Leu Arg Ile Thr Pro Pro Met Asp Arg Ala Gly Trp Val Asp Leu
65 70 75 80

atc gaa cag ttg ctg gcg cgc acc acg ctg gac acc tgc atc gtg tac 288
Ile Glu Gln Leu Leu Ala Arg Thr Thr Leu Asp Thr Cys Ile Val Tyr
85 90 95

ttg cag gtc acg cgc ggc gtt gcc aag cgc gac cac cag ttc ccg gcc 336
Leu Gln Val Thr Arg Gly Val Ala Lys Arg Asp His Gln Phe Pro Ala
100 105 110

acg ccg gtt acg ccc acc gtg ttc ggc atg att tcg gcg tgg tcc cct 384
Thr Pro Val Thr Pro Thr Val Phe Gly Met Ile Ser Ala Trp Ser Pro
115 120 125

ccg ccc gcc gcg caa cgc acg cag ggc ttg acc gcc atc agc att ccc 432
Pro Pro Ala Ala Gln Arg Thr Gln Gly Leu Thr Ala Ile Ser Ile Pro
130 135 140

gac gaa cgc tgg ctg cat tgc gag atc aag tcg gtg tcg ctg ttg ggt 480
Asp Glu Arg Trp Leu His Cys Glu Ile Lys Ser Val Ser Leu Leu Gly
145 150 155 160

ES 2 650 245 T3

aac gtg ctg gcc aag cag cag gcg gtg gat gcg aac gcc gac gaa gtc 528
 Asn Val Leu Ala Lys Gln Gln Ala Val Asp Ala Asn Ala Asp Glu Val
 165 170 175

gtg cag ttt cgc gat ggc tat ctg acc gaa ggc tcg tcc acc aac atc 576
 Val Gln Phe Arg Asp Gly Tyr Leu Thr Glu Gly Ser Ser Thr Asn Ile
 180 185 190

tgg gtg gtg tct ggc ggc aag ttg ttg gcg ccg ccc aag aac aac ctg 624
 Trp Val Val Ser Gly Gly Lys Leu Leu Ala Pro Pro Lys Asn Asn Leu
 195 200 205

atc ctg gaa ggc atc cgc tac ggt ctg atg ggc gag ctg gcc gaa gca 672
 Ile Leu Glu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu Met Gly Glu Leu Ala Glu Ala
 210 215 220

gcg ggc atc cca ttc gag tcg cgc cgc atc acc cag caa gag gtg gaa 720
 Ala Gly Ile Pro Phe Glu Ser Arg Arg Ile Thr Gln Gln Glu Val Glu
 225 230 235 240

tcc gcc gac gaa ttg atg ctg tct tcc gcc acc aag gaa gtg ctg gcg 768
 Ser Ala Asp Glu Leu Met Leu Ser Ser Ala Thr Lys Glu Val Leu Ala
 245 250 255

att gtt tcc ttg gac gga aag ccg gtg ggt tcg ggc aag ccc ggc cct 816
 Ile Val Ser Leu Asp Gly Lys Pro Val Gly Ser Gly Lys Pro Gly Pro
 260 265 270

gtt ttt gag cag ttg cga gcg ggt tat gat gcc cgc atc gcc gcg ctg 864
 Val Phe Glu Gln Leu Arg Ala Gly Tyr Asp Ala Arg Ile Ala Ala Leu
 275 280 285

taa 867

<210> 43
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Achromobacter spanius

<400> 43
 Met Ile Pro Gly Val Pro Gly Glu Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Glu
 1 5 10 15

Phe Leu Arg Val Asp Glu Ala Lys Val Ser Val Leu Asp Arg Gly Phe
 20 25 30

Ile Phe Gly Asp Gly Ile Tyr Glu Val Val Pro Val Tyr Gln Gly Lys
 35 40 45

Ala Phe Arg Met Ala Glu His Leu Asn Arg Leu Asp Arg Ser Leu Ala
 50 55 60

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

5

ES 2 650 245 T3

Ile Glu Gln Leu Leu Ala Arg Thr Thr Leu Asp Thr Cys Ile Val Tyr
85 90 95

Leu Gln Val Thr Arg Gly Val Ala Lys Arg Asp His Gln Phe Pro Ala
100 105 110

Thr Pro Val Thr Pro Thr Val Phe Gly Met Ile Ser Ala Trp Ser Pro
115 120 125

Pro Pro Ala Ala Gln Arg Thr Gln Gly Leu Thr Ala Ile Ser Ile Pro
130 135 140

Asp Glu Arg Trp Leu His Cys Glu Ile Lys Ser Val Ser Leu Leu Gly
145 150 155 160

Asn Val Leu Ala Lys Gln Gln Ala Val Asp Ala Asn Ala Asp Glu Val
165 170 175

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

Trp Val Val Ser Gly Gly Lys Leu Leu Ala Pro Pro Lys Asn Asn Leu
195 200 205

Ile Leu Glu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu Met Gly Glu Leu Ala Glu Ala
210 215 220

Ala Gly Ile Pro Phe Glu Ser Arg Arg Ile Thr Gln Gln Glu Val Glu
225 230 235 240

Ser Ala Asp Glu Leu Met Leu Ser Ser Ala Thr Lys Glu Val Leu Ala
245 250 255

Ile Val Ser Leu Asp Gly Lys Pro Val Gly Ser Gly Lys Pro Gly Pro
260 265 270

Val Phe Glu Gln Leu Arg Ala Gly Tyr Asp Ala Arg Ile Ala Ala Leu
275 280 285

<210> 44
<211> 867
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia optimizada por codón que codifica la SEQ ID NO 43

<400> 44
atgattccgg gtgttccagg tgaagccag gtttatctga atggtgaatt tctgcgtgtt

60

ES 2 650 245 T3

gatgaagcaa aagttagcgt tctggatcgc ggttttatct ttggtgatgg tatttatgaa 120
 gtggtgccgg tttatcaggg taaagcattt cgtatggcag aacatctgaa tcgtctggat 180
 cgtagcctgg cagcactcgc tattaccct cccgatggatc gtgcaggttg ggtgatctg 240
 attgaacagc tgctggcacg taccaccctg gatacctgta ttgtttatct gcaggttacc 300
 cgtggtggtg caaaacgtga tcatcagttt ccggcaacac cggttacccc gaccgttttt 360
 ggcattgatta gcgcatggtc accgcctccg gcagcccagc gtaccaggg tctgaccgca 420
 attagcattc cggatgaacg ttggctgcat tgtgaaatca aaagcgttag cctgctgggt 480
 aatgttctgg caaaacagca ggcagttgat gcaaatgcag atgaagttgt tcagtttctg 540
 gatggttatac tgaccgaagg tagcagcacc aatatttggg ttgtagcgg tggtaaactg 600
 ctggctccgc ctaaaaacaa tctgattctg gaaggtattc gctatggtct gatgggtgaa 660
 ctggcagaag cagcaggtat tccgtttgaa agccgtcgtta ttacacagca agagttgaa 720
 agcgcagatg aactgatgct gacgagcgc accaaagaag ttctggccat tgtagcctg 780
 gatggtaaac cggttgtag cggcaaaccg ggtccggttt ttgagcagct gcgtgccggt 840
 tatgatgcac gtattgcagc actgtaa 867

<210> 45
 <211> 885
 <212> ADN
 <213> Microbacterium ginsengisoli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(885)

<400> 45
 atg acc tgg cgt ttc gcg ctc atc atc gag ccc gtg gca tcc gat gac 48
 Met Thr Trp Arg Phe Ala Leu Ile Ile Glu Pro Val Ala Ser Asp Asp
 1 5 10 15
 ccc cgc acc gac ttc gac acg acc ttc gcg ccc gtc gac gcc tcg gcc 96
 Pro Arg Thr Asp Phe Asp Thr Thr Phe Ala Pro Val Asp Ala Ser Ala
 20 25 30
 ccc gcc ctc agc atc ggc gag ctc agc acc cag cgc gga gac gga atc 144
 Pro Ala Leu Ser Ile Gly Glu Leu Ser Thr Gln Arg Gly Asp Gly Ile
 35 40 45
 ttc gag tcg atc ggt gtc gtc gac agg cac ccg cag gag gtc gag gcg 192
 Phe Glu Ser Ile Gly Val Val Asp Arg His Pro Gln Glu Val Glu Ala
 50 55 60
 cac ctg gcg cgg ctc gcg cac tcc gcc gag atc tgc gac ctt ccg gtg 240
 His Leu Ala Arg Leu Ala His Ser Ala Glu Ile Cys Asp Leu Pro Val
 65 70 75 80
 ccg aac ctc gcc cag tgg cgc gcc gcc gtc gcc cgc gcg gcg gcg cag 288
 Pro Asn Leu Ala Gln Trp Arg Ala Ala Val Ala Arg Ala Ala Ala Gln
 85 90 95

ES 2 650 245 T3

tgc ccg gag ggc gag gcg gtc atc aag ctc atc ctg agt cgc ggc atc 336
 Cys Pro Glu Gly Glu Ala Val Ile Lys Leu Ile Leu Ser Arg Gly Ile
 100 105 110

gag cac ggt ccg acc ccg acc gcg tgg gtg acc gcg tcg gcc gcg ccc 384
 Glu His Gly Pro Thr Pro Thr Ala Trp Val Thr Ala Ser Ala Ala Pro
 115 120 125

aac tat gcc cgc ccg ccg gcc gaa ggc atc tcc gtc gtc gtg ctc gat 432
 Asn Tyr Ala Arg Pro Arg Ala Glu Gly Ile Ser Val Val Val Leu Asp
 130 135 140

cgc ggg ctc gac ctc gcc gca ccc gcc cgc gcc ccc tgg ctg ctg ctc 480
 Arg Gly Leu Asp Leu Ala Ala Pro Ala Arg Ala Pro Trp Leu Leu Leu
 145 150 155 160

ggt gcg aag acg ttg tcg tat gcg acc aac atg gcg gcg ctg cgc gag 528
 Gly Ala Lys Thr Leu Ser Tyr Ala Thr Asn Met Ala Ala Leu Arg Glu
 165 170 175

gcg cac cga cgc ggc gcg gat gac gcc gtc ttc gcc acg tcc gat gga 576
 Ala His Arg Arg Gly Ala Asp Asp Ala Val Phe Ala Thr Ser Asp Gly
 180 185 190

ttc ctg ctc gag gcg ccg acc gcg tcg ctc gtg ctg cgc cgc ggc gat 624
 Phe Leu Leu Glu Ala Pro Thr Ala Ser Leu Val Leu Arg Arg Gly Asp
 195 200 205

gtg ttc gtg acc ccc gag ccc gcc gcc ggc atc ctg cac gcc acc act 672
 Val Phe Val Thr Pro Glu Pro Ala Ala Gly Ile Leu His Gly Thr Thr
 210 215 220

cag ctg agc ctg ttc gcc cac ctc gcc gag cgg ggg ttc acg acc gcc 720
 Gln Leu Ser Leu Phe Ala His Leu Ala Glu Arg Gly Phe Thr Thr Ala
 225 230 235 240

tac gag acc ctt ccg acg gcg gcc ctc gcc gac gcg gat gcc gcg tgg 768
 Tyr Glu Thr Leu Pro Thr Ala Ala Leu Ala Asp Ala Asp Ala Ala Trp
 245 250 255

ctc gtc tcg agc gtc cgc ctc gcg gcc ccg atc acg gcc gtc gac gcc 816
 Leu Val Ser Ser Val Arg Leu Ala Ala Pro Ile Thr Ala Val Asp Gly
 260 265 270

cgg gct ctc ccg cat gat gcg gcc ttc acg gcc gag ctg aac gcc tac 864
 Arg Ala Leu Pro His Asp Ala Ala Phe Thr Ala Glu Leu Asn Ala Tyr
 275 280 285

ctg ctc tcg ccg cgc gac tga 885
 Leu Leu Ser Pro Arg Asp
 290

<210> 46
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> Microbacterium ginsengisoli

<400> 46
 Met Thr Trp Arg Phe Ala Leu Ile Ile Glu Pro Val Ala Ser Asp Asp
 1 5 10 15

5

10

ES 2 650 245 T3

Pro Arg Thr Asp Phe Asp Thr Thr Phe Ala Pro Val Asp Ala Ser Ala
 20 25 30

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

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

His Leu Ala Arg Leu Ala His Ser Ala Glu Ile Cys Asp Leu Pro Val
 65 70 75 80

Pro Asn Leu Ala Gln Trp Arg Ala Ala Val Ala Arg Ala Ala Ala Gln
 85 90 95

Cys Pro Glu Gly Glu Ala Val Ile Lys Leu Ile Leu Ser Arg Gly Ile
 100 105 110

Glu His Gly Pro Thr Pro Thr Ala Trp Val Thr Ala Ser Ala Ala Pro
 115 120 125

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

Arg Gly Leu Asp Leu Ala Ala Pro Ala Arg Ala Pro Trp Leu Leu Leu
 145 150 155 160

Gly Ala Lys Thr Leu Ser Tyr Ala Thr Asn Met Ala Ala Leu Arg Glu
 165 170 175

Ala His Arg Arg Gly Ala Asp Asp Ala Val Phe Ala Thr Ser Asp Gly
 180 185 190

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

Val Phe Val Thr Pro Glu Pro Ala Ala Gly Ile Leu His Gly Thr Thr
 210 215 220

Gln Leu Ser Leu Phe Ala His Leu Ala Glu Arg Gly Phe Thr Thr Ala
 225 230 235 240

Tyr Glu Thr Leu Pro Thr Ala Ala Leu Ala Asp Ala Asp Ala Ala Trp
 245 250 255

Leu Val Ser Ser Val Arg Leu Ala Ala Pro Ile Thr Ala Val Asp Gly

ES 2 650 245 T3

260

265

270

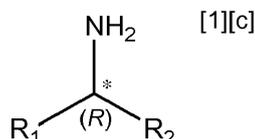
Arg Ala Leu Pro His Asp Ala Ala Phe Thr Ala Glu Leu Asn Ala Tyr
275 280 285

Leu Leu Ser Pro Arg Asp
290

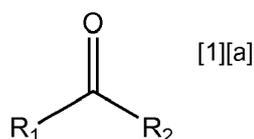
REIVINDICACIONES

1. Un método para la síntesis enzimática de una (*R*)-amina enriquecida enantioméricamente de fórmula general [1][c]

5



a partir de la cetona correspondiente de la fórmula general [1][a]



10

y un donante amino adecuado, en el que R_1 y R_2 son diferentes y son independientemente alifáticos lineales o ramificados, aromáticos, heteroaromáticos o forman una estructura cíclica, usando una transaminasa seleccionada del grupo que consiste en

15

a. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1;

b. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 3;

20

c. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 5;

d. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 7;

25

e. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 9;

f. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 11;

g. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 13;

30

h. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 15;

i. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 17;

35

j. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 19;

k. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 21;

l. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 23;

40

m. una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 25, y

n. una proteína que tiene actividad de transaminasa y que puede obtenerse a partir de un organismo seleccionado del grupo que organismos que consiste en *Rahnella aquatilis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum tritici*, *Sinorhizobium morelense*, *Curtobacterium pusillum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Microbacterium ginsengisoli*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Pseudomonas citronellolis*, *Yersinia kristensenii*, *Achromobacter spanius*, *Achromobacter insolitus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium frederiksbergense*, *Mycobacterium sacrum*, *Mycobacterium fluoranthenvorans*, *Burkholderia* sp., *Burkholderia tropica*, *Cosmospora episphaeria*, y *Fusarium oxysporum*, con la condición de que las proteínas que se han mencionado anteriormente (es decir, la alternativa (a)) no consistan en una secuencia de aminoácidos idéntica a las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID no. 3 del documento WO2011/026556.

50

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ contienen independientemente de 1 a 30 átomos de carbono y R₁ y R₂ son alifáticos independientemente sustituidos o no sustituidos; alifáticos ramificados sustituidos o sin sustituir; alifáticos cíclicos sustituidos o sin sustituir; alifáticos heterocíclicos sustituidos o sin sustituir, que contienen al menos un átomo de oxígeno, azufre o nitrógeno; aromáticos sustituidos o sin sustituir; heteroaromáticos sustituidos o sin sustituir que contienen al menos un átomo de azufre, o nitrógeno; o juntos forman una estructura cíclica o una estructura heterocíclica sustituida o sin sustituir, que contiene al menos un átomo de oxígeno, azufre o nitrógeno; en donde los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en, pero sin limitación, un átomo de halógeno, un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, grupo hidroxilo, grupo metoxi, monofluorometilo, difluorometilo y trifluorometilo.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** la concentración final del producto de (R)-amina enantioméricamente enriquecida se encuentra entre el 1 y el 50 % en peso de la mezcla de reacción.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la transaminasa es una proteína que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 1.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el donante amino es α -metilbencilamina.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el donante amino es sec-butilamina.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** la concentración final del producto de (R)-amina enantioméricamente enriquecida se encuentra entre el 5 y el 35 % en peso de la mezcla de reacción.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de reacción comprende una fase acuosa y una segunda fase orgánica.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de reacción comprende una fase acuosa y la segunda fase orgánica, y la relación volumétrica del agua:fase orgánica está entre 100 y 0,01.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de reacción comprende una fase acuosa y la segunda fase orgánica, y la relación volumétrica del agua:fase orgánica está entre 20 y 0,1.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de reacción comprende una fase acuosa y la segunda fase orgánica, y la relación volumétrica del agua:fase orgánica está entre 20 y 1.
12. Un microorganismo depositado que comprende una enzima que tiene actividad (R)-transaminasa del grupo que organismos que consisten en *Ochrobactrum anthropi* (depositado como DSM 23793), *Ochrobactrum tritici* (depositado como DSM 23786), *Sinorhizobium morelense* (depositado como DSM 23794), *Curtobacterium pusillum* (depositado como DSM 23787), *Paecilomyces lilacinus* (depositado como DSM 23771), *Microbacterium ginsengisoli* (depositado como DSM 23784), *Microbacterium trichothecenolyticum* (depositado como DSM 23788), *Pseudomonas citronellolis* (depositado como DSM 23795), *Yersinia kristensenii* (depositado como DSM 23792), *Achromobacter insolitus* (depositado como DSM 23790), *Mycobacterium fortuitum* (depositado como DSM 23789), *Mycobacterium frederiksbergense* (depositado como DSM 23798), *Mycobacterium sacrum* (depositado como DSM 23785), *Mycobacterium fluoranthenivorans* (depositado como DSM 23796), *Burkholderia tropica* (depositado como DSM 23799), *Cosmospora episphaeria* (depositado como DSM 23772), y *Fusarium oxysporum* (depositado como DSM 23770).