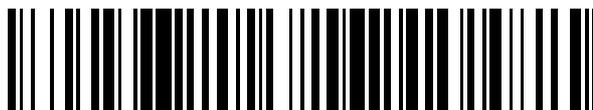


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 143**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/00** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013 PCT/EP2013/077069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14095986**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013 E 13810940 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2935602**

54 Título: **Preparación de aminas y diaminas a partir de un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos**

30 Prioridad:

**21.12.2012 EP 12199048**

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

**29.05.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHAFFER, STEFFEN;  
CORTHALS, JASMIN;  
WESSEL, MIRJA;  
HENNEMANN, HANS-GEORG;  
HÄGER, HARALD;  
VOLLAND, MICHAEL y  
ROOS, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 670 143 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

Preparación de aminas y diaminas a partir de un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos

5 La invención se refiere a un catalizador de células enteras, que expresa una  $\alpha$ -dioxigenasa recombinante y/o la combinación a base de una ácido graso reductasa recombinante y de una fosfopanteteinil-transferasa que fosfopanteteinila la ácido graso reductasa y que, adicionalmente, expresa una transaminasa, siendo la fosfopanteteinil-transferasa y/o transaminasa preferiblemente recombinante; así como a un procedimiento para la reacción de un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos para dar una amina o diamina, que comprende las etapas poner en contacto el ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o el monoéster de los mismos con una ácido graso reductasa fosfopanteteinilada o de una  $\alpha$ -dioxigenasa y poner en contacto el producto con una transaminasa.

15 Las poliamidas son una clase de polímeros que se caracterizan por grupos amido repetitivos. El término "poliamida" se refiere, a diferencia de las proteínas químicamente relacionadas, a materiales sintéticos termoplásticos, habitualmente sintéticos, adquiribles en el comercio. Las poliamidas se derivan de aminas primarias o de aminas secundarias que se obtienen convencionalmente a través de hidrocarburos craqueados. Sin embargo, para la preparación de polímeros también pueden utilizarse derivados, más exactamente ácidos aminocarboxílicos, lactamas y diaminas. Son de interés como eductos, además, alcanos de cadena corta, gaseosos, que pueden obtenerse con procedimientos biotecnológicos partiendo de materias primas renovables.

20 La producción químico-técnica convencional de aminas y diaminas de este tipo depende del abastecimiento con materias primas fósiles, es ineficaz y en este caso precipitan grandes cantidades de productos secundarios indeseados, en algunas etapas de la síntesis en hasta un 80%. Un ejemplo de un proceso de este tipo lo representa la preparación de laurilactama. Convencionalmente, ésta tiene lugar a través de un procedimiento multi-etapa que no proporciona sólo un bajo rendimiento, sino que, al mismo tiempo, requiere la provisión de una infraestructura compleja.

25 A la vista de estos inconvenientes se desarrollaron procedimientos con el fin de obtener aminas y diaminas utilizando biocatalizadores partiendo de materias primas renovables. Como materias primas renovables entran en consideración, en particular, fuentes para ácidos grasos que pueden obtenerse en forma de aceite de colza, aceite de cardo yesquero, aceite de palmiste, aceite de nuez de coco, aceite de semillas de girasol y productos naturales similares a partir de una pluralidad de fuentes biológicas, en particular de plantas.

30 El documento PCT/EP 2008/067447 describe un sistema biotecnológico para la preparación de productos químicamente relacionados, más concretamente ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, utilizando una célula que presenta una serie de actividades enzimáticas adecuadas y que está en condiciones de transformar ácidos carboxílicos en correspondientes ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos. El procedimiento comprende una cascada de reacciones enzimáticamente catalizadas, en particular, la oxidación de un ácido graso en el átomo de carbono en posición terminal al aldehído y la subsiguiente aminación utilizando una transaminasa y un aminoácido como donante de amina que puede ser regenerado a través de una aminoácido deshidrogenasa.

35 Un inconveniente conocido del sistema AlkBGT-oxidasa de *Pseudomonas putida* GPO1 utilizado en este caso consiste, sin embargo, en que no está en condiciones de proporcionar una oxidación selectiva de alcanos alifáticos a alcoholes primarios. Más bien, se manifiesta una pluralidad de productos de oxidación; en particular aumenta la proporción de productos más oxidados tal como el correspondiente aldehído, cetona o el correspondiente ácido carboxílico con un tiempo de reacción creciente (C. Grant, J. M. Woodley y F. Baganz (2011), *Enzyme and Microbial Technology* 48, 480-486), lo cual reduce de manera correspondiente el rendimiento de la amina deseada.

40 El problema de la oxidación relativamente no selectiva se acentúa debido a que los productos de oxidación resultantes son estructuralmente muy similares. Esto determina que es muy difícil separarlos de manera eficaz de los productos de oxidación deseados y sin una pérdida de rendimiento significativa.

45 Otro inconveniente de este procedimiento consiste en que productos secundarios oxidados en exceso, por ejemplo el ácido carboxílico del ácido graso empleado como educto, el reciclaje de disolventes hidrofóbicos y de intercambiadores de cationes líquidos hidrofóbicos, que pueden ser utilizados de acuerdo con el documento PCT/EP 2011/071491 para la separación del producto a partir de la mezcla de reacción acuosa, va a expensas de la eficacia del aprovechamiento de los recursos.

A este respecto, se ha de destacar que la complejidad de sistemas biotecnológicos con una cascada de reacciones tal como la descrita en el documento PCT/EP 2008/067447, de las que en cada caso se cataliza una reacción de

una enzima determinada, dificulta la optimización de las condiciones de reacción. Así, en el caso de los aminoácidos grasos  $\omega$  básicamente reactivos como producto se da la posibilidad de que, a partir de una concentración crítica determinada, reaccionen en el interior de la célula con componentes esenciales del organismo y, por consiguiente, actúen de forma tóxica. Si este es el caso, entonces se perjudica la capacidad de crecimiento y síntesis del organismo hasta la muerte de la célula, sin que el agente de desarrollo pudiera reconocer inmediatamente la toxicidad o incluso asociar un determinado educto, producto intermedio o producto. Asimismo, tampoco es previsible qué organismo soporte qué concentración de una sustancia químicamente reactiva.

También en relación con un rendimiento del producto a mejorar y de una formación a reducir de productos secundarios, el experto en la materia no puede identificar de forma rutinaria factores limitantes y decisivos en un sistema tal como el descrito en el documento PCT/EP 2008/067447. Si el rendimiento de producto es demasiado bajo, esto puede entonces deberse a que una de las enzimas esté presente en una concentración demasiado baja, sin que se conociera de cuál de las enzimas que entran en consideración se trata en este caso, es decir, el educto no reacciona en el marco de tiempo previsto o antes de la degradación por parte de enzimas concurrentes en virtud de una capacidad insuficiente de síntesis. Alternativamente, es sin más posible de que una célula esté presente ciertamente de manera detectable en la célula en forma de un polipéptido, pero precisamente en esta célula no presente el plegamiento esencial para la actividad o que falte un co-factor desconocido hasta la fecha, pero esencial para la actividad. De igual manera, como ya se ha mencionado, el producto metabólico para la célula puede ser tóxico o puede ser degradado. Finalmente, se ha de contar con interacciones interferentes con enzimas endógenas, es decir, que se presentan de forma natural en una célula utilizada como catalizador de células enteras.

Por consiguiente, existe la necesidad de procedimientos para la preparación de alquil-monoaminas y -diaminas a partir de ácidos grasos, en las que las reacciones enzimáticamente catalizadas discurran de forma más selectiva y se minimice la formación de productos secundarios indeseados.

Ante estos antecedentes, la misión en la que se basa la invención consiste en proporcionar un procedimiento biotecnológico, lo más eficaz posible en relación con el rendimiento, el equilibrio de carbono y/o nitrógeno y/o la pureza, para la preparación de alquil-monoaminas y -diaminas a partir de ácidos grasos.

Otra misión en la que se basa la invención consiste en proporcionar un procedimiento biotecnológico lo más eficiente posible en relación con el rendimiento, el equilibrio de carbono y/o nitrógeno, la capacidad de reutilizar agentes utilizados y/o la pureza del producto para la preparación de alquil-monoaminas y -diaminas a partir de ácidos grasos. A este respecto, por un equilibrio carbono y/o nitrógeno eficiente se entiende preferiblemente que una proporción lo más elevada posible del carbono y/o nitrógeno alimentado a una célula para la reacción de un ácido carboxílico o de un éster de ácido carboxílico en forma de sustratos adecuados se encuentre de nuevo en el producto final deseado, en lugar de reaccionar, por ejemplo, para dar otros productos que no sean los deseados.

Otra misión en la que se basa la invención consiste en mejorar la aptitud para el tratamiento de una mezcla de reacción multi-fase de la preparación de alquil-monoaminas y -diaminas a partir de ácidos grasos, particularmente en relación con la capacidad de reutilización para el tratamiento de disolvente hidrofóbicos e intercambiadores de cationes líquidos utilizados, así como en relación con la formación y separación de fases en el caso de un sistema bifásico que comprende una fase acuosa en la que discurre la reacción del ácido carboxílico o del éster de ácido carboxílico, y de una fase orgánica con disolventes orgánicos y/o intercambiadores de cationes líquidos.

Estos y otros problemas se resuelven mediante el objeto de la presente solicitud y, en particular, también mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas, resultando formas de realización a partir de las reivindicaciones subordinadas.

El problema que se plantea la invención se resuelve en un primer aspecto mediante un catalizador de células enteras que expresa una  $\alpha$ -dioxigenasa recombinante o la combinación a base de una ácido graso reductasa recombinante y de una fosfopanteteinil-transferasa que fosfopanteteinila la ácido graso reductasa y que expresa adicionalmente una transaminasa.

En una primera forma de realización del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un catalizador de células enteras que expresa adicionalmente una aminoácido deshidrogenasa.

En una segunda forma de realización, que representa también una forma de realización de la primera forma de realización, el problema se resuelve mediante un catalizador de células enteras que expresa adicionalmente una alcano hidroxilasa.

En una tercera forma de realización, que representa también una forma de realización de la primera a segunda formas de realización, el problema se resuelve mediante un catalizador de células enteras que expresa adicionalmente un polipéptido de la familia AlkL.

5 En una cuarta forma de realización, que representa también una forma de realización de la segunda forma de realización, el problema se resuelve mediante un catalizador de células enteras que expresa adicionalmente una alcohol deshidrogenasa.

10 En una quinta forma de realización, que representa también una forma de realización de la primera a cuarta formas de realización, el problema se resuelve mediante un catalizador de células enteras en donde se reduce la actividad de al menos una enzima que participa en la  $\beta$ -oxidación con respecto al tipo salvaje del catalizador de células enteras.

En una sexta forma de realización, que representa también una forma de realización de la primera a quinta forma de realización, el problema se resuelve mediante un catalizador de células enteras, en donde la actividad de BioH o de una variante del mismo está reducida o incrementada con respecto al tipo salvaje del catalizador de células enteras.

15 En una séptima forma de realización, que representa también una forma de realización de la primera a sexta formas de realización, el problema se resuelve mediante un catalizador de células enteras, en donde la actividad de FadL o de una variante del mismo está incrementada con respecto al tipo salvaje del catalizador de células enteras.

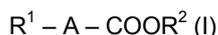
20 En un segundo aspecto, el problema en el que se basa la invención se resuelve mediante un procedimiento para la reacción de un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos para formar una amina o diamina, que comprende las etapas

- a) proporcionar un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o un monoéster de los mismos, para el caso de que se trate de un ácido dicarboxílico,
- b) poner en contacto el ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o el monoéster de los mismos con una ácido graso reductasa fosfopanteteinilada o una  $\alpha$ -dioxigenasa bajo formación de un producto de aldehído, y
- c) poner en contacto el producto de la etapa b) con una transaminasa.

25 En un segundo aspecto, el problema en el que se basa la invención se resuelve mediante un procedimiento en el que en el caso de la etapa c) está presente una aminoácido deshidrogenasa.

30 En una primera forma de realización del segundo aspecto, el problema se resuelve mediante un procedimiento, en el que al primer aspecto de la presente invención se proporciona al menos una enzima del grupo que comprende ácido graso reductasa fosfopanteteinilada,  $\alpha$ -dioxigenasa, transaminasa, aminoácido deshidrogenasa y alcano hidroxilasa en forma de un catalizador de células enteras.

En una segunda forma de realización, que representa también una forma de realización de la primera forma de realización, el problema se resuelve mediante un procedimiento, en el que en el caso del ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o del monoéster de los mismos se trata de un compuesto de la fórmula (I)

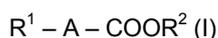


35 en donde  $R^1$  se elige del grupo que comprende -H y  $COOR^3$ ,  
 en donde  $R^2$  y  $R^3$ , en cada caso e independientemente uno de otro, se eligen del grupo que comprende H, metilo, etilo y propilo,  
 con la condición de que al menos uno de los radicales  $R^2$  y  $R^3$  sea H,  
 40 en donde A representa un grupo hidrocarbonado con al menos cuatro átomos de carbono no ramificado, ramificado, lineal, cíclico, sustituido o no sustituido.

En una tercera forma de realización, que representa también una forma de realización de la primera a segunda formas de realización, el problema se resuelve mediante un procedimiento, en el que A presenta la fórmula  $-(CH_2)_n-$ , siendo n al menos 4, preferiblemente al menos 10.

45 En un tercer aspecto, el problema en el que se basa la invención se resuelve mediante un uso del catalizador de células enteras según el primer aspecto o del procedimiento según el segundo aspecto para la aminación de un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos.

En un cuarto aspecto, el problema en el que se basa la invención se resuelve mediante una mezcla de reacción que comprende el catalizador de células enteras según el primer aspecto en solución acuosa, así como un ácido graso, ácido  $\omega$ -hidroxi-graso, ácido  $\omega$ -oxo-graso o un monoéster de los mismos de la fórmula (I)



en donde  $R^1$  se elige del grupo que comprende  $-H - CHO, OH$  y  $COOR^3$ ,

en donde  $R^2$  y  $R^3$ , en cada caso e independientemente uno de otro, se eligen del grupo que comprende H, metilo, etilo y propilo,

con la condición de que al menos uno de los radicales  $R^2$  y  $R^3$  sea H,

en donde A representa un grupo hidrocarbonado con al menos cuatro átomos de carbono no ramificado, ramificado, lineal, cíclico, sustituido o no sustituido.

La presente invención se basa en el reconocimiento de los autores de la misma de que una ácido graso reductasa o  $\alpha$ -dioxigenasa funcionalmente recombinante en un catalizador de células enteras, el cual se utiliza para la preparación de aminas y diaminas a partir de ácidos grasos y presenta una dotación enzimática correspondiente, aumenta de manera sorprendente el rendimiento en aminas y diaminas.

Además, la presente invención se basa en el reconocimiento de los autores de la misma de que una ácido graso reductasa o  $\alpha$ -dioxigenasa funcionalmente recombinante en un catalizador de células enteras, el cual se utiliza para la preparación de aminas y diaminas a partir de ácidos grasos y presenta una dotación enzimática correspondiente, reduce de manera sorprendente la concentración de productos secundarios perturbadores, en particular de ácidos grasos oxidados en exceso en forma de ácidos dicarboxílicos y ésteres de los mismos en el producto resultante.

Además, la presente invención se basa en el reconocimiento de los autores de la misma de que una ácido graso reductasa o  $\alpha$ -dioxigenasa funcionalmente recombinante en un catalizador de células enteras, el cual se utiliza para la preparación de aminas y diaminas y presenta una dotación enzimática correspondiente, mejora la pureza y la capacidad de reutilización de intercambiadores de cationes líquidos tales como ácido oleico que se utilizan para la separación de la amina y diamina a partir de una solución de fermentación que comprende el catalizador de células enteras.

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la reacción de un ácido carboxílico o un ácido dicarboxílico o un monoéster de los mismos para formar una amina o diamina, que se caracteriza porque junto a las enzimas que catalizan la transformación del ácido graso en la amina a través de sus diferentes etapas de oxidación, también está presente una ácido graso reductasa o  $\alpha$ -dioxigenasa, preferiblemente cuando se emplea un catalizador de células enteras para llevar a cabo el procedimiento. En una forma de realización preferida, por la expresión "ácido graso reductasa", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una enzima que cataliza la transformación de un ácido  $\omega$ -carboxílico, también denominado ácido dicarboxílico o ácido  $\omega$ -carboxi-graso, para dar el correspondiente ácido  $\omega$ -oxo-graso bajo consumo de ATP y NAD(P)H. En el estado de la técnica, por ejemplo en el documento WO/2010/135624, se describen ácido graso reductasas para la preparación de ácidos  $\omega$ -hidroxi-grasos, pero no como parte de un sistema para la preparación de  $\omega$ -aminoácidos grasos. En una forma de realización todavía preferida, la ácido graso reductasa se elige del grupo de ácido graso reductasas que comprenden las secuencias de aminoácidos YP\_887275.1, ZP\_11001941.1, ZP\_06852401.1, NP\_959974.1, YP\_001070587.1, ZP\_05217435.1, YP\_882653.1, YP\_639435.1, ZP\_10800193.1, YP\_006452763.1, YP\_006730440.1, ZP\_11196216.1, YP\_005349252.1, ZP\_05224908.1, YP\_005338837.1, YP\_006307000.1, YP\_005343991.1, ZP\_11001942.1, ZP\_09979565.1, YP\_005003162.1, YP\_953393.1, YP\_001850422.1, ZP\_11011489.1, ZP\_12689264.1, YP\_905678.1, ZP\_09976919.1, YP\_004746059.1, NP\_217106.1, YP\_004525443.1, NP\_337166.1, ZP\_09685823.1, YP\_978699.1, ZP\_06437984.1, ZP\_06514086.1, NP\_856267.1, CAA19077.1, NP\_301424.1, ZP\_06522140.1, ZP\_06518098.1, ZP\_11008938.1, ZP\_07432374.2, AAR91681.1, YP\_006808747.1, YP\_001851230.1, ZP\_15327751.1, ZP\_15455857.1, ZP\_12874284.1, ZP\_15332534.1, ZP\_15512956.1, ZP\_14244106.1, ZP\_15470899.1, ZP\_11439367.1, YP\_001703694.1, ZP\_15446742.1, YP\_006808978.1, ZP\_07964926.1, YP\_006521379.1, ZP\_10796908.1, ZP\_15512957.1, ZP\_12874283.1, YP\_005350955.1, ZP\_14243341.1, YP\_001705436.1, ZP\_15329649.1, YP\_006522325.1, YP\_006732197.1, YP\_003658971.1, ZP\_05227804.1, YP\_001703695.1, YP\_006308707.1, ZP\_15342047.1, YP\_006521380.1, ZP\_15327752.1, YP\_005340557.1, ZP\_11439578.1, ZP\_15392943.1, ZP\_15514789.1, ZP\_12996178.1, ZP\_09412214.1, ZP\_06849686.1, YP\_889972.1, YP\_006570321.1, ZP\_15375693.1, YP\_006308219.1, YP\_006521600.1, YP\_005340029.1, YP\_005350457.1, ZP\_11439836.1, ZP\_12994664.1, ZP\_14240588.1, ZP\_14236860.1, ZP\_09410830.1, YP\_006731697.1, YP\_005264225.1, YP\_001704097.1, ZP\_15328186.1, ZP\_09402885.1, ZP\_12690463.1, AF059871.1, ZP\_07966879.1, YP\_118225.1, YP\_001828302.1, YP\_006566873.1, YP\_003660169.1, ZP\_15337407.1, ZP\_08240521.1, ZP\_10456477.1, YP\_001537947.1, YP\_004016539.1, ZP\_07664024.1, ZP\_14244107.1, ZP\_09794557.1, ZP\_09274211.1, ZP\_05224899.1, ZP\_15484175.1, AAA17105.1, ZP\_11437924.1, ZP\_15446621.1, YP\_003646340.1, ZP\_15382134.1, ZP\_14237669.1, ZP\_09165547.1, YP\_004019203.1, ZP\_14240225.1, YP\_001220863.1, CBA74242.1, ZP\_12994240.1, EIE27140.1, ZP\_15354547.1, ZP\_15432557.1, ZP\_15500132.1, ZP\_15478632.1, ZP\_06846978.1, AAA17108.1, ZP\_15333767.1, ZP\_05217205.1, AAD44234.1, YP\_005348984.1, YP\_006306749.1, ZP\_05224611.1, YP\_005343772.1, YP\_006730188.1, YP\_882425.1, ZP\_10799956.1, ZP\_05045132.1, NP\_960176.1, ZP\_12398880.1, ZP\_11192735.1, ZP\_11440091.1,

- ZP\_05217203.1, ZP\_06846979.1, ZP\_10800936.1, ZP\_06523596.1, YP\_882421.1, YP\_006306748.1, YP\_006522017.1, ZP\_15432556.1, ZP\_15354095.1, ZP\_05227781.1, ZP\_09684639.1, YP\_006730187.1, YP\_005343770.1, YP\_005338616.1, YP\_005348983.1, ZP\_15472813.1, ZP\_15457007.1, ZP\_15421152.1, ZP\_15488933.1, ZP\_14240030.1, YP\_001704825.1, ZP\_15328982.1, YP\_005911512.1, ZP\_09411638.1, ZP\_12876400.1, ZP\_12995435.1, ZP\_07667680.1, YP\_001281387.1, EIE21044.1, ZP\_15375054.1, NP\_334518.1, 4DQV\_A, ZP\_06435375.1, YP\_003030020.1, YP\_976237.1, ZP\_04926822.1, YP\_004998149.1, YP\_004743589.1, YP\_005907921.1, NP\_214615.1, YP\_001286047.1, ZP\_06515541.1, ZP\_05139482.1, YP\_888016.1, ZP\_06452908.1, ZP\_06519578.1, YP\_004721827.1, CAJ77696.1, ZP\_09680854.1, ZP\_09686453.1, YP\_884815.1, YP\_884815.1, CAB55600.1, ZP\_09081423.1, YP\_006521568.1, ZP\_11440626.1, ZP\_15513309.1, ZP\_09410778.1, ZP\_15374248.1, ZP\_15405954.1, YP\_001704047.1, ZP\_14236911.1, ZP\_12873916.1, ZP\_14242094.1, ZP\_12994610.1, ZP\_07664023.1, ZP\_15446620.1, ZP\_15484174.1, ZP\_14240245.1, YP\_005358845.1 y XP\_002669159.1, en particular YP\_006731697.1, ZP\_09839660.1, YP\_001704097.1, YP\_889972.1, ZP\_05045132.1, ZP\_09794557.1, ZP\_08240521.1, NP\_959974.1, ZP\_10456477.1, YP\_118225.1, NP\_217106, YP\_905678.1, YP\_887275.1, ZP\_11001941.1, YP\_953393.1 e YP\_005349252.1 y variantes de los mismos.
- En el caso de las ácido graso reductasas se trata de un grupo de enzimas que para su actividad requieren una fosfopanteteinilación, es decir, la fijación covalente de un cofactor fosfopanteteinilo en la enzima. De manera correspondiente, la ácido graso reductasa utilizada de acuerdo con la invención está fosfopanteteinilada, y expresa un catalizador de células enteras que expresa la ácido graso reductasa, como parte de su dotación de enzimas expresadas de forma endógena o en forma recombinante, una fosfopanteteinil-transferasa que fosfopanteteinila la ácido graso reductasa. En una forma de realización preferida, por la expresión "fosfopanteteinil-transferasa", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una enzima que transfiere un radical fosfopanteteinilo de una fosfopanteteinil-CoA a una enzima, preferiblemente a la ácido graso reductasa. En una forma de realización particularmente preferida, la fosfopanteteinil-transferasa se elige del grupo de fosfopanteteinil-transferasas que comprenden las secuencias de aminoácidos ABI83656.1, YP\_006811024.1, YP\_120266.1, YP\_005265173.1, YP\_004006671.1, ZP\_08152482.1, ZP\_11104141.1, ZP\_14482198.1, YP\_706581.1, ZP\_10002626.1, ZP\_09308410.1, YP\_002783881.1, ZP\_18276502.1, ZP\_09271851.1, ZP\_08204640.1, YP\_002766085.1, ZP\_09788717.1, ZP\_09799863.1, ZP\_10961877.1, YP\_003273299.1, GAB86168.1, YP\_006668875.1, ZP\_08766535.1, ZP\_09793386.1, ZP\_09212827.1, ZP\_09276344.1, ZP\_09213870.1, ZP\_09081490.1, ZP\_10947586.1, YP\_003658841.1, ZP\_06852853.1, YP\_953148.1, ZP\_11011170.1, YP\_639258.1, YP\_886985.1, ZP\_11194383.1, ZP\_09681094.1, ZP\_06455719.1, NP\_337369.1, YP\_004077819.1, NP\_217310.1, YP\_006452521.1, YP\_005339056.1, ZP\_05226335.1, ZP\_07965127.1, ZP\_07419314.2, NP\_302077.1, YP\_005003342.1, YP\_005349465.1, ZP\_10800435.1, ZP\_06564430.1, YP\_882860.1, YP\_001135287.1, YP\_001850220.1, ZP\_05217634.1, YP\_003646683.1, YP\_004746246.1, ZP\_15327906.1, ZP\_09979035.1, YP\_001703848.1, YP\_906028.1, ZP\_15395499.1, ZP\_11438833.1, ZP\_11005955.1, ZP\_09410582.1, NP\_961833.1, YP\_001106197.1, ZP\_14237113.1, YP\_004085491.1, YP\_003835595.1, ZP\_12994399.1, YP\_004523804.1, ZP\_12690887.1, YP\_003339468.1, ZP\_06589331.1, YP\_004801334.1, ZP\_09974565.1, ZP\_04608379.1, ZP\_13037142.1, YP\_712537.1, ZP\_11236665.1, NP\_630748.1, ZP\_06527138.1, YP\_003835167.1, CCH33620.1, ZP\_10309401.1, ZP\_08881396.1, YP\_003102953.1, YP\_003487252.1, ZP\_08881565.1, YP\_006263961.1, NP\_822924.1, YP\_004914569.1, ZP\_09400366.1, AFB71333.1, ZP\_07309518.1, ZP\_09172171.1, ZP\_06710898.1, CAN89630.1, ZP\_06921116.1, ZP\_08804003.1, ZP\_19189663.1, ZP\_10545589.1, YP\_006248725.1, ZP\_10455557.1, YP\_004015869.1, ZP\_08801530.1, ZP\_10550999.1, YP\_004492879.1, ZP\_09958730.1, ZP\_08286666.1, ZP\_11212856.1, AAL15597.1, AAZ94407.1, ZP\_19188802.1, AFF18625.1, ZP\_06575404.1, AAK06801.1, ADC79635.1, YP\_004080528.1, YP\_004921314.1, ACY01405.1, YP\_004584022.1, YP\_003114157.1, YP\_003203177.1, AFB69911.1, YP\_006876460.1, ZP\_08024798.1, YP\_006269867.1, YP\_006881814.1, CCK26150.1, ZP\_07307765.1, ZP\_07315112.1, YP\_005466392.1, NP\_824081.1, YP\_003493882.1, ZP\_06412387.1, ZP\_10068239.1, ZP\_08234258.1, YP\_001822177.1, ZP\_03979107.1, ZP\_07979043.1, BAA22407.1, ZP\_09402950.1, YP\_003112617.1, NP\_738483.1, YP\_480609.1, EKX90208.1, BAE93744.1, BAB69186.1, ZP\_04713061.1, YP\_006881735.1, ZP\_07274901.1, ZP\_11379052.1, ZP\_06581115.1, YP\_006437406.1, ZP\_12871839.1, NP\_601186.1, ZP\_08451808.1, YP\_005057339.1, YP\_005303909.1, ZP\_07090824.1, YP\_003783676.1, YP\_004630011.1, ZP\_06588772.1, AAX98203.1, AFK80329.1, ZP\_08124665.1, ZP\_03710365.1, AAB17877.1, ZP\_07403633.1, ZP\_11268660.1, ZP\_07288841.1, ABV83217.1, ZP\_16178576.1, AAG43513.1, ZP\_09155938.1, YP\_004605750.1, ZP\_03918977.1, AAF71762.1, ZP\_05007864.1, ZP\_06836265.1, ZP\_03934882.1, YP\_001508477.1, ZP\_06043756.1, ZP\_05366306.1, YP\_002835056.1, ZP\_03933464.1, ZP\_07469321.1, ZP\_07713507.1, YP\_005160553.1, NP\_939820.1, AAU93794.1, ZP\_14659796.1, ZP\_14383679.1, YP\_005058606.1, YP\_001221073.1, ZP\_08231568.1, YP\_250920.1, ZP\_11383249.1, YP\_003916320.1, ZP\_08681170.1, YP\_001800249.1, YP\_001157632.1, YP\_166099.1, ZP\_10088015.1, YP\_004760065.1, ZP\_07947675.1, YP\_001603066.1, YP\_003812683.1, YP\_004403402.1, ZP\_08292153.1, ZP\_09471260.1, YP\_004018108.1, ZP\_05115352.1, AAD13565.1, ZP\_09295321.1, YP\_001535629.1, ZP\_04607273.1, YP\_006561753.1, ZP\_00960958.1, YP\_006571985.1, ZP\_08862188.1, YP\_002906426.1, CCK30433.1, ZP\_13042493.1, ZP\_09090153.1, YP\_614397.1, ZP\_11163860.1, YP\_003983492.1, YP\_004080668.1, ZP\_09420475.1,

ZP\_05914565.1, ZP\_01101149.1, ZP\_14743088.1, YP\_001239694.1, ZP\_09127532.1, YP\_003833873.1, ZP\_08516197.1, ZP\_10160483.1, ZP\_01987188.1, ZP\_01755304.1, ZP\_08825027.1, ZP\_05077116.1, YP\_001444606.1, ZP\_03392800.1, ZP\_01057781.1, AFB69889.1, ZP\_08815097.1 y AAO17175.1, y variantes de los mismos. En una forma de realización particularmente preferida, en este caso se trata de la fosfopanteteinil-transferasa con el código del banco de datos ABI83656.1 o una variante de la misma.

Alternativa o adicionalmente a la combinación a base de ácido graso reductasa y fosfopanteteinil-transferasa, el catalizador de células enteras puede presentar también una  $\alpha$ -dioxigenasa. En una forma de realización preferida, por el término " $\alpha$ -dioxigenasa", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una enzima que cataliza la transformación de un ácido carboxílico y/o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos, bajo el consumo de una molécula de oxígeno y bajo disociación de una molécula de dióxido de carbono, en un ácido carboxílico y/o ácido dicarboxílico o un monoéster de los mismos, acortado en un átomo de carbono con respecto al ácido carboxílico y/o ácido dicarboxílico o un monoéster de los mismos empleado como educto en el átomo de carbono  $\omega$  en posición terminal y portador de un grupo aldehído en el átomo de carbono  $\omega$  en posición terminal. En una forma de realización particularmente preferida, la  $\alpha$ -dioxigenasa se elige del grupo de  $\alpha$ -dioxigenasas que comprenden las secuencias de aminoácidos NP\_001066718.1, EAY82977.1, BAH79993.1, ABG22011.1, BAJ90503.1, AFD04418.1, AFD04417.1, BAJ87736.1, AFW75180.1, ABG22012.1, XP\_002311389.1, CAH05011.1, XP\_002279884.1, CBI34957.3, AAG59584.1, NP\_001234414.1, NP\_001234410.1, XP\_003553942.1, XP\_002275161.1, XP\_003553937.1, CBI34960.3, CAA07589.1, XP\_003543402.1, XP\_002517402.1, XP\_002882184.1, NP\_186791.1, AAK85133.1, CAN77070.1, XP\_002529555.1, CAH64542.1, NP\_001234061.1, XP\_002281357.1, ADM21465.1, XP\_002318527.1, NP\_177509.1, CAN74266.1, XP\_002888940.1, NP\_001185393.1, XP\_003631072.1, BAJ33800.1, XP\_002517377.1, XP\_003530944.1, BAJ34623.1, ABG22013.1, ABP02610.1, XP\_001773135.1, XP\_002960339.1, ABK95279.1, ABD73303.1, ABD73304.1, YP\_001805721.1, ZP\_08971815.1, ZP\_08430366.1, YP\_823013.1, ZP\_05026427.1, ZP\_11003953.1, YP\_007064484.1, YP\_007113008.1, YP\_633369.1, ZP\_18906570.1, ZP\_09251410.1, ZP\_10050808.1, ZP\_01306662.1, YP\_001516886.1, ZP\_05042862.1, AAC49625.1, ZP\_09648375.1, ZP\_09792714.1, ZP\_09788527.1, XP\_001728273.1, AAC83355.1, YP\_890542.1, ZP\_11000891.1, XP\_002605323.1, EGO58341.1, YP\_006249145.1, YP\_001507004.1, YP\_001704637.1, ZP\_12876141.1, ZP\_11150830.1, ZP\_14236257.1, ZP\_09411385.1, ZP\_14243118.1, EKD16664.1, ZP\_15416799.1, ZP\_15338016.1, ZP\_10080295.1, ZP\_11438929.1, ZP\_12995210.1, ZP\_10946648.1, YP\_003409541.1, XP\_001637870.1, YP\_005451221.1, XP\_001212758.1, ZP\_07290489.1, ZP\_05781329.1, ZP\_19187748.1, ZP\_06574534.1, XP\_002605322.1, NP\_822950.1, YP\_006366425.1, EJP63377.1, EKD21217.1, XP\_001795927.1, XP\_003042615.1, ZP\_06566152.1, EGU88116.1, EFW94417.1, XP\_388327.1, EKJ68934.1, ZP\_07290463.1, CCC10458.1, YP\_001107201.1, XP\_003348248.1, T49753, CAD31840.1, XP\_001229975.1, CBN77040.1, YP\_004813753.1, XP\_002513273.1, XP\_001627136.1, AFG52858.1, AFG52857.1, AEW08450.1, NP\_841291.1, YP\_004512343.1, ACG75701.1 y ZP\_03500906.1 y variantes de las mismas. En una forma de realización particularmente preferida, se trata de la  $\alpha$ -dioxigenasa con el código del banco de datos NP\_001066718.1 o una variante de la misma.

Junto a la  $\alpha$ -dioxigenasa o la combinación a base de ácido graso reductasa y fosfopanteteinil-transferasa, el catalizador de células enteras de acuerdo con la invención presenta necesariamente una transaminasa que amina a los grupos aldehído en posición terminal. En una forma de realización preferida, por el término "transaminasa", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una enzima que cataliza la transferencia de grupos  $\alpha$ -amino de una molécula donante, preferiblemente un aminoácido, a una molécula aceptora, preferiblemente un ácido  $\alpha$ -cetocarboxílico. En una forma de realización particularmente preferida, la transaminasa se elige del grupo de transaminasas que comprenden las secuencias de aminoácidos 3HMU\_A, AAD41041.1, AAK15486.1, ABE03917.1, ADR60699.1, ADR61066.1, ADR62525.1, AEL07495.1, CAZ86955.1, EFW82310.1, EFW87681.1, EGC99983.1, EGD03176.1, EGE58369.1, EGH06681.1, EGH08331.1, EGH24301.1, EGH32343.1, EGH46412.1, EGH55033.1, EGH62152.1, EGH67339.1, EGH70821.1, EGH71404.1, EGH78772.1, EGH85312.1, EGH97105.1, EGP57596.1, NP\_102850.1, NP\_106560.1, NP\_248912.1, NP\_248990.1, NP\_354026.2, NP\_421926.1, NP\_637699.1, NP\_642792.1, NP\_744329.1, NP\_744732.1, NP\_747283.1, NP\_795039.1, NP\_901695.1 (, XP\_002943905.1, YP\_001021095.1, YP\_001059677.1, YP\_001061726.1, YP\_001066961.1, YP\_001074671.1, YP\_001120907.1, YP\_001140117.1, YP\_001170616.1, YP\_001185848.1, YP\_001188121.1, YP\_001233688.1, YP\_001268866.1, YP\_001270391.1, YP\_001345703.1, YP\_001412573.1, YP\_001417624.1, YP\_001526058.1, YP\_001579295.1, YP\_001581170.1, YP\_001668026.1, YP\_001669478.1, YP\_001671460.1, YP\_001685569.1, YP\_001747156.1, YP\_001749732.1, YP\_001765463.1, YP\_001766294.1, YP\_001790770.1, YP\_001808775.1, YP\_001809596.1, YP\_001859758.1, YP\_001888405.1, YP\_001903233.1, YP\_001977571.1, YP\_002229759.1, YP\_002231363.1, YP\_002280472.1, YP\_002297678.1, YP\_002543874.1, YP\_002549011.1, YP\_002796201.1, YP\_002801960.1, YP\_002875335.1, YP\_002897523.1, YP\_002912290.1, YP\_002974935.1, YP\_003060891.1, YP\_003264235.1, YP\_003552364.1, YP\_003578319.1, YP\_003591946.1, YP\_003607814.1, YP\_003641922.1, YP\_003674025.1, YP\_003692877.1, YP\_003755112.1, YP\_003896973.1, YP\_003907026.1, YP\_003912421.1, YP\_004086766.1, YP\_004142571.1, YP\_004147141.1, YP\_004228105.1, YP\_004278247.1, YP\_004305252.1, YP\_004356916.1, YP\_004361407.1, YP\_004378186.1, YP\_004379856.1, YP\_004390782.1, YP\_004472442.1, YP\_004590892.1,

YP\_004612414.1, YP\_004676537.1, YP\_004693233.1, YP\_004701580.1, YP\_004701637.1, YP\_004704442.1,  
 YP\_108931.1, YP\_110490.1, YP\_168667.1, YP\_237931.1, YP\_260624.1, YP\_262985.1, YP\_271307.1,  
 YP\_276987.1, YP\_334171.1, YP\_337172.1, YP\_350660.1, YP\_351134.1, YP\_364386.1, YP\_366340.1,  
 YP\_369710.1, YP\_370582.1, YP\_426342.1, YP\_440141.1, YP\_442361.1, YP\_468848.1, YP\_521636.1,  
 5 YP\_554363.1, YP\_608454.1, YP\_610700.1, YP\_614980.1, YP\_622254.1, YP\_625753.1, YP\_680590.1,  
 YP\_751687.1, YP\_767071.1, YP\_774090.1, YP\_774932.1, YP\_788372.1, YP\_858562.1, YP\_928515.1,  
 P\_983084.1, YP\_995622.1, ZP\_00948889.1, ZP\_00954344.1, ZP\_00959736.1, ZP\_00998881.1, ZP\_01011725.1,  
 ZP\_01037109.1, ZP\_01058030.1, ZP\_01076707.1, ZP\_01103959.1, ZP\_01167926.1, ZP\_01224713.1,  
 ZP\_01442907.1, ZP\_01446892.1, ZP\_01550953.1, ZP\_01625518.1, ZP\_01745731.1, ZP\_01750280.1,  
 10 ZP\_01754305.1, ZP\_01763880.1, ZP\_01769626.1, ZP\_01865961.1, ZP\_01881393.1, ZP\_01901558.1,  
 ZP\_02145337.1, ZP\_02151268.1, ZP\_02152332.1, ZP\_02167267.1, ZP\_02190082.1, ZP\_02242934.1,  
 ZP\_02360937.1, ZP\_02367056.1, ZP\_02385477.1, ZP\_02456487.1, ZP\_02883670.1, ZP\_03263915.1,  
 ZP\_03263990.1, ZP\_03400081.1, ZP\_03452573.1, ZP\_03456092.1, ZP\_03517291.1, ZP\_03529055.1,  
 ZP\_03571515.1, ZP\_03572809.1, ZP\_03587785.1, ZP\_03588560.1, ZP\_03697266.1, ZP\_03697962.1,  
 15 ZP\_04521092.1, ZP\_04590693.1, ZP\_04890914.1, ZP\_04891982.1, ZP\_04893793.1, ZP\_04902131.1,  
 ZP\_04905327.1, ZP\_04941068.1, ZP\_04944536.1, ZP\_04945255.1, ZP\_04959332.1, ZP\_04964181.1,  
 ZP\_05053721.1, ZP\_05063588.1, ZP\_05073059.1, ZP\_05077806.1, ZP\_05082750.1, ZP\_05091128.1,  
 ZP\_05095488.1, ZP\_05101701.1, ZP\_05116783.1, ZP\_05121836.1, ZP\_05127756.1, ZP\_05637806.1,  
 ZP\_05742087.1, ZP\_05783548.1, ZP\_05786246.1, ZP\_05843149.1, ZP\_05945960.1, ZP\_06459045.1,  
 20 ZP\_06487195.1, ZP\_06492453.1, ZP\_06493162.1, ZP\_06703644.1, ZP\_06731146.1, ZP\_06839371.1,  
 ZP\_07007312.1, ZP\_07266194.1, ZP\_07374050.1, ZP\_07662787.1, ZP\_07778196.1, ZP\_07797983.1,  
 ZP\_08099459.1, ZP\_08138203.1, ZP\_08141719.1, ZP\_08142973.1, ZP\_08177102.1, ZP\_08185821.1,  
 ZP\_08186468.1, ZP\_08208888.1, ZP\_08266590.1, ZP\_08402041.1, ZP\_08406891.1, ZP\_08522175.1,  
 ZP\_08527488.1, ZP\_08631252.1, ZP\_08636687 y variantes de las mismas.

25 En el caso de la ácido graso reductasa utilizada de acuerdo con la invención y, preferiblemente, también en el caso  
 de otras enzimas utilizadas de acuerdo con la invención se trata de enzimas recombinantes. En una forma de  
 realización preferida, el término "recombinante", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende que la molécula de  
 ácido nucleico que codifica la correspondiente enzima no se presenta en la célula natural y/o se preparó utilizando  
 30 métodos de tecnología genética. En una forma de realización preferida, se habla de una proteína recombinante  
 cuando el polipéptido correspondiente es codificado por un ácido nucleico recombinante. En una forma de  
 realización preferida, por una célula recombinante, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una célula que  
 presenta al menos un ácido nucleico recombinante o un polipéptido recombinante. El experto en la materia es  
 conocedor de procedimientos adecuados para la preparación de moléculas o células recombinantes, por ejemplo los  
 descritos en Sambrook/Fritsch/Maniatis (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor  
 35 Laboratory Press, 2ª edición. Enzimas recombinantes se sobre-expresan preferiblemente utilizando sistemas de  
 vectores pET o pGEX que son conocidos por el experto en la materia.

Con relación a la elección del organismo, el catalizador de células enteras empleable de acuerdo con la invención no  
 se ve sometido a limitación alguna, siempre que sea cultivable, estable y eventualmente sea accesible a  
 40 modificaciones introducidas por tecnología genética, p. ej., procedimientos para el debilitamiento de las actividades  
 enzimáticas, por ejemplo inactivaciones. Así, igualmente se puede tratar de una célula procarionte o eucariótica. En  
 el caso de una célula eucariótica son particularmente preferidos eucariontes unicelulares, particularmente levaduras  
 tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Pichia pastoris*. En el caso de células  
 procariontes se puede tratar, por ejemplo, de una bacteria que se elige del grupo que comprende *Magnetococcus*,  
 45 *Mariprofundus*, *Acetobacter*, *Acetobacterium*, *Acidiphilium*, *Afiplia*, *Ahrensia*, *Asticcacaulis*, *Aurantimonas*,  
*Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bartonella*, *tribocorum*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*,  
*subvibrioides*, *Bruceella*, *Caulobacter*, *Chelativorans*, *Citricella*, *Citromicrobium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*,  
*Dinoroseobacter*, *Erythrobacter*, *Fulvimarina*, *Gluconacetobacter*, *Granulibacter*, *Hirschia*, *Hoeflea*, *Hyphomicrobium*,  
*Hyphomonas*, *Ketogulonicigenium*, *Labrenzia*, *Loktanella*, *Magnetospirillum*, *Maricaulis*, *Maritimibacter*,  
 50 *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Nitrobacter*, *Novosphingobium*, *Oceanibulbus*,  
*Oceanicaulis*, *Oceanicola*, *Ochrobactrum*, *Octadecabacter*, *Oligotropha*, *Paracoccus*, *Parvibaculum*, *Parvularcula*,  
*Pelagibaca*, *Phaeobacter*, *Phenylobacterium*, *Polymorphum*, *Pseudovibrio*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*,  
*Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Roseibium*, *Roseobacter*, *Roseomonas*, *Roseovarius*, *Ruegeria*, *Sagittula*,  
*Silicibacter*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Starkeya*, *Sulfitobacter*, *Thalassibium*, *Xanthobacter*,  
*Zymomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Orientia*, *Rickettsia*,  
 55 *Wolbachia*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Taiwanensis*, *Lautropia*, *Limnobacter*, *Polynucleobacter*, *Ralstonia*,  
*Chromobacterium*, *Eikenella*, *corrodens*, *Basfia*, *Kingella*, *Laribacter*, *Lutiella*, *Neisseria*, *Simonsiella*, *Achromobacter*,  
*Acidovorax*, *Alicyclophilus*, *Aromatoleum*, *Azoarcus*, *Comamonas*, *Dechloromonas*, *Delftia*, *Gallionella*,  
*Herbaspirillum*, *Hermiimonas*, *Hylemonella*, *Janthinobacterium*, *Leptothrix*, *Methylibium*, *Methylobacillus*,  
*Methylophilales*, *Methyloversatilis*, *Methylovorus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospora*, *Oxalobacter*, *Parasutterella*,  
 60 *Polaromonas*, *Polaromonas*, *Pusillimonas*, *Rhodoferrax*, *Rubrivivax*, *Sideroxydans*, *Sutterella*, *wadsworthensis*.

Taylorella, Thauera, Thiobacillus, Thiomonas, Variovorax, Verminephrobacter, Anaeromyxobacter, Bdellovibrio, bacteriovorus, Bilophila, Desulfarculus, Desulfatibacillum, Desulfobacca, Desulfobacterium, Desulfobulbus, Desulfococcus, Desulfohalobium, Desulfotibacterium, Desulfomicrobium, Desulfonatronospira, Desulfotalea, Desulfovibrio, Desulfuromonas, Geobacter, Haliangium, Hippea, Lawsonia, Myxococcus, Pelobacter, Plesiocystis, Sorangium, Stigmatella, Syntrophobacter, Syntrophus, Arcobacter, Caminibacter, Campylobacter, Helicobacter, Nitratrifactor, Nitratrifactor, Sulfuricurvum, Sulfurimonas, Sulfurospirillum, Sulfurovum, Wolinella, Buchnera, Blochmannia, Hamiltonella, Regiella, Riesia, Citrobacter, Cronobacter, Dickeya, Edwardsiella, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Klebsiella, Pantoea, Pectobacterium, Proteus, Providencia, Rahnella, Salmonella, Serratia, Shigella, Sodalis, Wigglesworthia, Glossina, Xenorhabdus, Yersinia, Acidithiobacillus, Acinetobacter, Aeromonas, Alcanivorax, Alkalilimnicola, Allochromatium, Alteromonadales, Alteromonas, Baumannia, Beggiatoa, Bermanella, Carsonella, Ruthia, Vesicomysocius, Cardiobacterium, Chromohalobacter, Colwellia, Congregibacter, Coxiella, Dichelobacter, Endoriftia, Enhydrobacter, Ferrimonas, Francisella, Glaciecola, Hahella, Halomonas, Halorhodospira, Halothiobacillus, Idiomarina, Kangiella, Legionella, Marinobacter, Marinomonas, Methylobacter, Methylococcus, Methylocytophaga, Methylophaga, Moraxella, Moritella, Neptuniibacter, Nitrocyclus, Pseudoalteromonas, Psychrobacter, Psychromonas, Reinekea, Rickettsiella, Saccharophagus, Shewanella, Succinatimonas, Teredinibacter, Thioalkalimicrobium, Thioalkalivibrio, Thiomicrospira, Tolumonas, Vibrionales, Actinobacillus, Aggregatibacter, Gallibacterium, Haemophilus, Histophilus, Mannheimia, Pasteurella, Azotobacter, Cellvibrio, Pseudomonas, Aliivibrio, Grimontia, Photobacterium, Photobacterium, Vibrio, Pseudoxanthomonas, Stenotrophomonas, Xanthomonas, Xylella, Borrelia, Brachyspira, Leptospira, Spirochaeta, Treponema, Hodgkinia, Puniceispirillum, Liberibacter, Pelagibacter, Odysseella, Accumulibacter, en particular *B. subtilis*, *B. megaterium*, *C. glutamicum*, *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Burkholderia thailandensis*, cianobacterias, *Klebsiella* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* sp., *Rhizobium* sp. y *Rhizobium meliloti*. En una forma de realización particularmente preferida, se trata de una enterobacteria, lo más preferiblemente de *Escherichia coli*.

Es ventajoso que el catalizador de células enteras de acuerdo con la invención presente, junto a la ácido graso reductasa, fosfopanteteinil-transferasa y la transaminasa, también una alanina deshidrogenasa, con el fin de regenerar la alanina consumida por la transaminasa durante la aminación del grupo aldehído en posición terminal a partir de moléculas nitrogenadas inorgánicas. En una forma de realización preferida, por la expresión "alanina deshidrogenasa", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una enzima que cataliza la transformación de L-alanina bajo el consumo de agua y NAD<sup>+</sup> en piruvato, amoníaco y NADH y la reacción inversa. En una forma de realización particularmente preferida, la alanina deshidrogenasa se elige del grupo de alanina deshidrogenasas que comprende la secuencia de aminoácidos de la alanina deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (código del banco de datos L20916), *Rhizobium leguminosarum* (código del banco de datos CP001622), *Vibrio proteolyticus* (código del banco de datos AF070716), *Mycobacterium tuberculosis* (código del banco de datos X63069), *Enterobacter aerogenes* (código del banco de datos AB013821), EGR93259.1, YP\_003654745.1, YP\_003651439.1, YP\_003637111.1, YP\_003631815.1, YP\_001327051.1, YP\_001262560.1, YP\_886996.1, YP\_882850.1, YP\_704410.1, YP\_703508.1, ZP\_08624689.1, YP\_001230376.1, P17557.1, P17556.1, CCB94892.1, CCB73698.1, YP\_001168635.1, YP\_004668736.1, YP\_004569425.1, YP\_003513168.1, YP\_004561169.1, ZP\_08554945.1, YP\_400777.1, ZP\_08311476.1, ZP\_08310170.1, ZP\_08267322.1, ZP\_08263846.1, ZP\_07898723.1, YP\_149301.1, YP\_148605.1, YP\_004340432.1, EFT09946.1, EFS80513.1, EFS51332.1, EFS42459.1, YP\_003060895.1, YP\_003059033.1, ZP\_03305373.1, YP\_847214.1, YP\_004095847.1, YP\_003338282.1, YP\_003337256.1, YP\_355846.1, YP\_253131.1, ZP\_08197563.1, ZP\_08196283.1, ADW06447.1, YP\_734091.1, NP\_102173.1, ZP\_08170259.1, EGD36706.1, EGD32748.1, ZP\_08155540.1, YP\_004142849.1, YP\_002417649.1, YP\_001301040.1, YP\_002992892.1, YP\_081348.1, YP\_080482.1, YP\_002476349.1, ZP\_08115025.1, ZP\_08114403.1, YP\_003552869.1, YP\_002358112.1, YP\_575010.1, YP\_477594.1, YP\_474564.1, YP\_130399.1, YP\_129373.1, YP\_123314.1, NP\_810467.1, NP\_646469.1, NP\_626044.1, NP\_391071.1 (codificado por SEQ ID NO: 11), ZP\_08086822.1, ZP\_08084776.1, ZP\_08083119.1, ZP\_08020768.1, ZP\_08013590.1, ZP\_08011832.1, YP\_003783744.1, YP\_002781576.1, YP\_002780533.1, ZP\_02195873.1, NP\_797482.1, ZP\_07645051.1, ZP\_07643260.1, ZP\_06611917.1, AAT40119.1, ZP\_07864946.1, YP\_004068409.1, YP\_002796203.1, YP\_002774420.1, YP\_003600348.1, YP\_003599946.1, YP\_003565624.1, YP\_003565223.1, YP\_335198.1, YP\_423850.1, YP\_155059.1, ZP\_07843538.1, ZP\_07841226.1, ZP\_06928932.1, ZP\_05692073.1, ZP\_05687006.1, ZP\_04867480.1, YP\_775531.1, CBE70214.1, ZP\_07721182.1, ZP\_04302850.1, ZP\_04298961.1, ZP\_04287684.1, ZP\_04277177.1, ZP\_04248389.1, ZP\_04235899.1, ZP\_02159718.1, ZP\_02152178.1, YP\_003974610.1, YP\_003546595.1, YP\_002317127.1, ZP\_07313778.1, ZP\_07302778.1, ZP\_07298850.1, CBK69442.1, YP\_003413835.1, YP\_003595089.1, ZP\_06807811.1, YP\_003582455.1, YP\_003464731.1, YP\_003496397.1, YP\_003421918.1, CBL07274.1, CBK64956.1, YP\_003508515.1, AAL87460.1, AAC23579.1, AAC23577.1, ACU78652.1, YP\_003471439.1, YP\_003452777.1, ZP\_06384971.1, ACY25368.1, ABC26869.1, AAP44334.1, EEZ80018.1, ZP\_05110458.1, 1PJB\_A, ZP\_04717201.1, ZP\_04689103.1, CAO90307.1, CAM75354.1, CAA44791.1, BAA77513.1, EGR96638.1, EGL90046.1, YP\_004510847.1, ZP\_08450330.1, YP\_003387804.1, YP\_003058152.1, EFS74272.1, EFS67128.1, ZP\_06844564.1, YP\_826658.1, YP\_001195249.1, YP\_003095978.1, YP\_469292.1, YP\_004442054.1, YP\_004461174.1, YP\_004055616.1, YP\_003576656.1, YP\_003094537.1,

5 YP\_001295973.1, AEE71143.1, YP\_004447480.1, YP\_003761844.1, YP\_040853.1, YP\_003154888.1, YP\_003142045.1, YP\_002280953.1, NP\_371963.1, NP\_422368.1, EGC98966.1, EGC76398.1, YP\_004263661.1, YP\_004252039.1, YP\_679036.1, YP\_499973.1, ZP\_08054972.1, ZP\_08053009.1, ZP\_04067276.1, ZP\_03968868.1, ZP\_03963857.1, ZP\_03933079.1, ZP\_03497046.1, ZP\_06668924.1, ZP\_06667106.1, ZP\_06324464.1, ZP\_06196777.1, ZP\_05114159.1, ZP\_05083968.1, ZP\_05070370.1, ZP\_05030022.1, ZP\_04673064.1, ZP\_03517011.1, ZP\_03505783.1, XP\_001310698.1, ABK27691.1 y CAB59281.2 y variantes de las mismas. Para la reacción catalizada por la alanina deshidrogenasa no sólo es necesaria la presencia de piruvato que se forma como parte del metabolismo primario de toda célula que entra en consideración como catalizador de células enteras, sino también de amonio. Este último se proporciona típicamente en forma de sales nitrogenadas inorgánicas, por ejemplo sales de amonio, nitratos o similares. Preferiblemente, al medio de reacción acuoso se añade una sal de amonio, p. ej., cloruro de amonio.

15 Además, es ventajoso que el catalizador de células enteras de acuerdo con la invención exprese una alcano hidroxilasa y, opcionalmente, otras enzimas esenciales para la actividad de la alcano hidroxilasa, en particular para el caso de que como sustratos para la preparación de una diamina se emplee un ácido graso con sólo una función carboxi en posición terminal. La alcano hidroxilasa y/o una alcohol deshidrogenasa expresada adicionalmente oxidan al átomo de carbono en posición terminal, luego hasta el grupo aldehído que puede ser aminado a continuación por la transaminasa o hasta el grupo carboxi que, mediante una  $\alpha$ -dioxigenasa o la combinación a base de ácido graso reductasa y una fosfopanteteinil-transferasa, se transforma en un grupo aldehído en posición terminal, el cual, a continuación, puede ser aminado por la transaminasa. En una forma de realización preferida, por el término "alcano hidroxilasa", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una enzima que cataliza la hidroxilación de radicales alquilo lineales no sustituidos que comprenden al menos seis, preferiblemente doce radicales hidrocarbonados.

25 Como alcano hidroxilasas son adecuados, conforme a la invención, numerosos sistemas de oxidación tal como se describen, entre otros, en el documento PCT/EP 2008/067447. En una forma de realización preferida, en el caso de la alcano hidroxilasa se trata de una citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153. En una forma de realización preferida, por la expresión "citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153" se entiende una oxidasa citosólica que es parte de un sistema de 3 componentes que comprende, además, una ferredoxina y una ferredoxina-reductasa, con un lugar de unión de alcano y la capacidad de hidroxilar alcanos. En una forma de realización particularmente preferida, se trata de una enzima que presenta al menos un 80, preferiblemente un 90, lo más preferiblemente un 95 o 99 por ciento de identidad de la secuencia con respecto a la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP\_691921) o de una enzima que comprende una secuencia de polipéptidos que presenta al menos un 80, preferiblemente un 90, lo más preferiblemente un 95 o 99 por ciento de identidad de la secuencia con respecto a la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP\_691921) y, además de ello, presenta actividad de alcano hidroxilasa. Los códigos del banco de datos mencionados se refieren en este caso, tal como a lo largo de esta solicitud, a los bancos de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EE.UU.), mejor dicho la versión disponible en línea el 21 de noviembre de 2012. En una forma de realización preferida, por la expresión "citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153" se entiende una oxidasa no unida a membrana que comprende un lugar de unión para alcanos, radicales alquilo lineales no sustituidos que comprenden al menos cinco, preferiblemente doce radicales hidrocarbonados o alcanos hidroxilados una vez y cuya cadena polipeptídica comprende el motivo LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN. En una forma de realización preferida, en el caso de una "citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153", tal como se utiliza en esta memoria, se trata de una citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP\_691921) o de una variante de la misma, que presenta preferiblemente actividad de alcano hidroxilasa.

45 Para el abastecimiento óptimo de la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 con electrones del agente reductor, preferiblemente NADH, se prefiere que la célula exprese la alcano hidroxilasa junto con ferredoxina-reductasa que interactúa funcionalmente con la misma y ferredoxina que interactúa funcionalmente con la misma. En este caso, se puede tratar de polipéptidos aislados o, en el caso de utilizar un catalizador de células enteras, de polipéptidos co-expresados o de polipéptidos condensados en el extremo N o C con la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153. El que una ferredoxina-reductasa o una ferredoxina pueda interactuar con una citocromo P450-monooxigenasa dada de la familia CYP153 funcionalmente entre sí, el experto en la materia lo puede comprobar fácilmente si el agente reductor es oxidado en presencia de un sustrato de alcano o de los tres polipéptidos con mayor eficacia que para el caso de que falte al menos uno de los tres. Alternativamente, puede utilizarse el ensayo enzimático descrito por Scheps, D., Malca, H., Hoffmann, B., Nestl, B. M. y Hauer, B. (2011) *Org. Biomol. Chem.*, 9, 6727, que en el caso de polipéptidos de interacción funcional muestra un claro aumento de la velocidad de la reacción. En una forma de realización particularmente preferida, la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina-reductasa proceden del mismo organismo. En una forma de realización particularmente preferida, se trata de la ferredoxina-reductasa de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP\_691923) o de una variante de la misma, de la ferredoxina de *Alcanivorax borkumensis* SK2

(código del banco de datos YP\_691920) o de una variante de la misma y de la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP\_691921) o de una variante de la misma.

5 En otra forma de realización preferida, en el caso de la alcano hidroxilasa se trata de una AlkB-monooxigenasa. AlkB representa una óxido-reductasa dada a conocer en principio a partir del sistema AlkBGT de *Pseudomonas putida* Gpo1, que depende de otros dos polipéptidos, AlkG y AlkT. AlkT se caracteriza como rubredoxina-reductasa dependiente de FAD, que transmite electrones a AlkG a partir de NADH. En el caso de AlkG se trata de una rubredoxina, una proteína redox con contenido en hierro que actúa como donante directo de electrones para AlkB.

10 En una forma de realización preferida, por el término "AlkB-monooxigenasa" se entiende un polipéptido con una homología de la secuencia de al menos, indicada en la secuencia de una preferencia creciente, 75, 80 85, 90, 92, 94, 96, 98 o 99% con respecto a la secuencia de la AlkB de *Pseudomonas putida* Gpo1 (código del banco de datos: CAB54050.1; este código del banco de datos procede, como todos los otros utilizados en la solicitud, del estado de la técnica, a saber del banco de datos NCBI, más exactamente de la descarga disponible en línea el 15 de octubre de 2012), con la capacidad de oxidar alcanos. En una forma de realización particularmente preferida, en el caso de

15 la AlkB-monooxigenasa se trata de una óxido reductasa que oxida alcanos, que coopera funcionalmente con los polipéptidos AlkG (CAB54052.1) y AlkT (CAB54063.1) de *Pseudomonas putida* Gpo1. Para el abastecimiento óptimo con electrones de la AlkB-alcano hidroxilasa, se prefiere que la célula exprese la alcano hidroxilasa junto con proteínas auxiliares que interactúan funcionalmente con la misma, preferiblemente AlkG y/o AlkT o en cada caso variantes de la misma, tratándose en una forma de realización particularmente preferida de nuevo de polipéptidos

20 AlkG (CAB54052.1) y AlkT (CAB54063.1) de *Pseudomonas putida* Gpo1.

En el caso de utilizar un catalizador de células enteras, se puede plantear el problema de que se tenga que poner en contacto el sustrato con una enzima localizada intracelularmente, con el fin de que se produzca la reacción deseada. En el caso de alcanos de cadena larga y derivados de los mismos se prefiere que el catalizador de células enteras presente un polipéptido de la familia AlkL. AlkL es una proteína de la membrana de *Pseudomonas putida* que puede

25 importar ácidos grasos de cadena larga y derivados de los mismos a células bacterianas. En una forma de realización preferida, en el caso de un "polipéptido de la familia AlkL", tal como se utiliza en esta memoria, se trata de un polipéptido que a lo largo de una longitud de 230 aminoácidos consecutivos presenta una identidad de la secuencia de al menos 80, preferiblemente 90, todavía más preferiblemente 90% con respecto a AlkL de *Pseudomonas putida* (código del banco de datos CAB69081) o una variante de AlkL de *Pseudomonas putida* y

30 presenta preferiblemente la capacidad de sustentar la importación de alcanos de cadena larga al interior de una célula. En otra forma de realización, en el caso de un "polipéptido de la familia AlkL", tal como se utiliza en esta memoria, se trata de un polipéptido localizado en la membrana externa de una bacteria Gram-negativa que presenta el motivo de secuencia DXWAPAXQ(V/A)GXR, representando X un aminoácido proteinógeno y de preferencia, adicionalmente es AlkL de *Pseudomonas putida* (código del banco de datos CAB69081) o una variante de la misma.

35 Miembros a modo de ejemplo de la familia AlkL comprenden AlkL de *Pseudomonas putida* (código del banco de datos CAB69081), *Marinobacter aquaeolei* VTB8 (código del banco de datos YP\_957722), *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633 (código del banco de datos ZP\_00953584), *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9 (código del banco de datos ZP\_09158756), *Caulobacter* sp. K31 (código del banco de datos YP\_001672217), *Pseudomonas oleovorans* (código del banco de datos Q00595) y variantes de los mismos.

40 La enseñanza de la presente invención no sólo se puede realizar utilizando macromoléculas con las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos exactas, a las que se hace referencia en esta memoria, o bien no sólo utilizando una célula con una actividad de un polipéptido, reducida con relación al tipo salvaje respectivo, con las secuencias de aminoácidos exactas a las que se hace referencia en esta memoria, sino también utilizando una variante de macromoléculas de este tipo o de una célula con una actividad reducida con relación al tipo salvaje respectivo de la

45 célula respectiva de una variante del polipéptido que se puede obtener por delección, adición o sustitución de uno o más de un aminoácido o ácido nucleico. En una forma de realización preferida, el término "variante" de una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos en lo que sigue, con el mismo significado y de manera intercambiable con el término "homólogo", tal como se utiliza en esta memoria, significa otra secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que comprende o representa una secuencia que, con relación a la secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos de tipo salvaje original correspondiente presenta una homología, utilizada en este caso de manera equivalente a identidad, de 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98, 99% o más por ciento, en donde preferiblemente otros aminoácidos que configuran el centro catalíticamente activo o aminoácidos esenciales para la estructura o el plegamiento están suprimidos o sustituidos o aquellos que únicamente están sustituidos de forma conservativa, por ejemplo un glutamato en lugar de un aspartato o una leucina en lugar de una valina. El estado de

50 la técnica describe algoritmos que pueden utilizarse con el fin de calcular la magnitud de homología de dos secuencias, p. ej. Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, 3ª edición. En otra forma de realización preferida de la presente invención, la variante de una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos presenta preferiblemente, de manera adicional a la homología de secuencia arriba mencionada, esencialmente la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje o bien de la molécula original. Por ejemplo, una variante de un

55

polipéptido enzimáticamente activo como proteasa presenta la misma o esencialmente la misma actividad proteolítica que la enzima polipeptídica, es decir, la capacidad de catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico. En una forma de realización particular, la expresión “esencialmente la misma actividad enzimática” significa una actividad en relación con los sustratos del polipéptido de tipo salvaje que se encuentra claramente por encima de la actividad de fondo y/o que se diferencia en menos de 3, preferiblemente 2, todavía más preferiblemente un orden de magnitud de valores  $K_m$  y/o  $k_{cat}$  que presenta el polipéptido de tipo salvaje con relación a los mismos sustratos. En otra forma de realización preferida, el término “variante” comprende una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de al menos una parte/o fragmento activo de la secuencia de ácidos nucleicos o bien de aminoácidos. En otra forma de realización preferida, la expresión “parte activa”, tal como se utiliza en esta memoria, significa una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una longitud menor que la longitud completa de la secuencia de aminoácidos o bien codifica una longitud menor que la longitud completa de la secuencia de aminoácidos, presentando la secuencia de aminoácidos o la secuencia de aminoácidos codificada con una longitud menor que la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje esencialmente la misma actividad enzimática que el polipéptido de tipo salvaje o una variante del mismo, por ejemplo como proteasa. En una forma de realización particular, el término “variante” de un ácido nucleico comprende un ácido nucleico, cuya cadena complementaria, preferiblemente bajo condiciones rigurosas, se une al ácido nucleico de tipo salvaje. La rigurosidad de la reacción de hibridación se puede determinar fácilmente por el experto en la materia y depende, en general, de la longitud de la sonda, de las temperaturas durante el lavado y de la concentración salina. En general, sondas largas requieren temperaturas más elevadas para la hibridación, mientras que, por el contrario, sondas más cortas se contentan con temperaturas bajas. El que tenga lugar una hibridación depende, en general, de la capacidad del ADN desnaturalizado de reasociarse a cadenas complementarias que estén presentes en su entorno, a saber, por debajo de la temperatura de fusión. La rigurosidad de la reacción de hibridación y correspondientes condiciones se describen con detalle en F M Ausubel (1995), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. Instrucciones para la identificación de secuencias de ADN mediante hibridación las encuentra el experto en la materia, entre otros, en el manual “The DIG System Users Guide for Filter Hybridization” de la razón social Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl *et al.* (*International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en una forma de realización preferida bajo condiciones rigurosas, es decir, se forman sólo híbridos en los que la sonda y la secuencia diana, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda, son al menos un 70% idénticas. Es sabido que la rigurosidad de la hibridación, incluidas las etapas de lavado, se ve afectada o bien determinada por variación de la composición del tampón, la temperatura y la concentración salina. La reacción de hibridación se lleva a cabo, por lo general, con una rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (*Hybaid Hybridisation Guide*, Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996). Para la reacción de hibridación puede emplearse, por ejemplo, un tampón correspondiente al tampón 5x SSC a una temperatura de aprox. 50°C - 68°C. En este caso, las sondas pueden hibridarse también con polinucleótidos que presenten menos de un 70% de identidad con respecto a la secuencia de la sonda. Híbridos de este tipo son menos estables y se separan mediante lavado bajo condiciones rigurosas. Esto puede alcanzarse, por ejemplo, mediante la reducción de la concentración salina a 2x SSC y eventualmente a continuación 0,5x SSC (*The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation*, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura en la secuencia de una preferencia creciente de aprox. 50°C - 68°C, de aprox. 52°C - 68°C, de aprox. 54°C - 68°C, de aprox. 56°C - 68°C, de aprox. 58°C - 68°C, de aprox. 60°C - 68°C, de aprox. 62°C - 68°C, de aprox. 64°C - 68°C, de aprox. 66°C - 68°C. Se prefieren intervalos de temperaturas de aprox. 64°C - 68°C o de aprox. 66°C - 68°C. Eventualmente, es posible reducir la concentración salina hasta una concentración correspondiente a 0,2 x SSC o 0,1 x SSC. Mediante el aumento escalonado de la temperatura de hibridación en pasos de aprox. 1 - 2°C desde 50°C a 68°C pueden aislarse fragmentos de polinucleótidos que, por ejemplo en la secuencia de una preferencia creciente, presentan al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con la secuencia de la molécula de ácido nucleico empleada. Instrucciones adicionales para la hibridación se pueden adquirir en el comercio en forma de los denominados kits (p. ej. DIG Essay Hyb de la razón social Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de catálogo 1603558). En una forma de realización preferida, el término “variante” de un ácido nucleico, tal como se utiliza en esta memoria, comprende una secuencia de ácidos nucleicos arbitraria que codifica la misma secuencia de aminoácidos que el ácido nucleico original o una variante de esta secuencia de aminoácidos en el marco de la degeneración del código genético.

En una forma de realización preferida, la célula utilizada de acuerdo con la invención presenta una actividad reducida con respecto a su tipo salvaje de al menos una enzima que cataliza una de las reacciones de la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos, tratándose preferiblemente de una enzima del grupo que comprende la ácido graso-CoA-ligasa, acil-CoA-deshidrogenasa, 2,4-dienoil-CoA-reductasa, enoil-CoA-hidratasa y 3-cetoacil-CoA-tiolasa, un importador de ácidos grasos o variantes de los mismos. La  $\beta$  oxidación de ácidos grasos es una vía metabólica ampliamente difundida que permite a organismos procariontes y eucariontes de igual manera oxidar a ácidos grasos y poner a disposición del metabolismo la energía química contenida en los mismos. En un sentido amplio, comienza con la captación de un ácido graso en la célula. Allí, siempre que las condiciones lo requieran, el ácido graso es oxidado primeramente en la posición  $\beta$  del éster de CoA-ácido graso por una acil-CoA-deshidrogenasa, en el caso de *E. coli*

FadE. Una molécula similar puede formarse alternativamente también a partir de un ácido graso doblemente insaturado por reducción mediante una 2,4-dienoil-CoA-reductasa, en el caso de *E. coli* FadH. Una enzima multifuncional, la enoil-CoA-hidratasa/3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa, en el caso de *E. coli* FadB, cataliza a continuación la hidratación bajo formación del alcohol secundario y su subsiguiente oxidación a la cetona. En la última etapa, una 3-cetoacil-CoA-tiolasa, en el caso de *E. coli* FadA, cataliza la disociación de la cetoacil-CoA con el resultado de que se liberan acetil-CoA y un CoA-éster del ácido graso acortado en dos átomos de carbono en comparación con la molécula de partida. En la medida en que no se trate asimismo de acetil-CoA, este último se puede alimentar de nuevo al ciclo de  $\beta$ -oxidación y acortarse bajo oxidación. En la regulación de la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos participa también FadR, un regulador del operón Fad que comprende los genes necesarios para la degradación de ácidos grasos, sin que FadR catalice una reacción de la  $\beta$  oxidación. En una forma de realización preferida, por la expresión "enzima que cataliza una de las reacciones de la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos" se entiende cualquier tipo de enzima que interactúe directamente con el sustrato de ácido graso o una molécula que resulta en la vía a la acetil-CoA del mismo, preferiblemente lo reconozca como sustrato y catalice su transformación en un producto metabólico situado en esta vía de degradación más próximo a la acetil-CoA, preferiblemente incluido el importador de ácidos grasos que determina la captación del ácido graso en la célula. Por ejemplo, a estas enzimas, según la definición precedente, pertenece la acil-CoA-deshidrogenasa, dado que ésta interactúa con el éster CoA de ácido graso y cataliza su transformación en enoil-CoA que en la vía metabólica de la  $\beta$  oxidación se encuentra más próxima a la acetil-CoA que el éster CoA de ácido graso. En una forma de realización particularmente preferida por la expresión "enzima que cataliza una de las reacciones de la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende toda enzima del grupo que comprende los productos génicos FadA, FadB, FadD, FadL y FadE de *E. coli* y sus variantes u homólogos de otros organismos. Los productos génicos FadA, FadB, FadD, FadL y FadE de *E. coli*, al igual que las variantes y homólogos de numerosos otros organismos biotecnológicamente aprovechables y sus secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos, se describen en el estado de la técnica, por ejemplo FadA bajo el número de acceso AP009048.1, FadB bajo el número de acceso BAE77457.1, FadD bajo el número de acceso BAA15609.1 y FadE bajo el número de acceso BAA77891.2. El estado de la técnica da a conocer numerosos ensayos que son especialmente adecuados para la medición de la actividad de enzimas que catalizan una de las reacciones de la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos, por ejemplo en K Kameda y W D Nunn (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5702-5707, Hi Marrakchi, W E DeWolf, C Quinn, J West, B J Polizzi, C Y So et al. (2003) *Biochem. J.* 370, 1055-1062, Lobo et al. (2001) y X Yu, T Liu, F Zhu y C Khosia (2011) PNAS, *publicación electrónica antes de la impresión*.

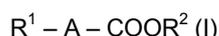
Para la efectividad del catalizador de células enteras de acuerdo con la invención es ventajoso que el sustrato a reaccionar, preferiblemente el ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o un monoéster de los mismos, pueda entrar en contacto fácilmente con las enzimas necesarias de acuerdo con la invención que están localizadas en el interior del catalizador de células enteras. Por lo tanto, es decisivo que el sustrato pueda acceder al interior de la célula. Con el fin de facilitar esto, se prefiere que el catalizador de células enteras exprese un importador de ácidos grasos, en el caso de un catalizador de células enteras bacteriano, en particular Gram-negativo, de manera particularmente preferida el importador de ácidos grasos FadL (código del banco de datos: BAA16205.1) o una variante, preferiblemente en una concentración y con una actividad que esté incrementada con respecto a la actividad del tipo salvaje del catalizador de células enteras correspondiente. El aumento de la actividad de un polipéptido con respecto al tipo salvaje de la célula puede alcanzarse a través de diferentes vías accesibles de forma rutinaria por el experto en la materia, por ejemplo la incorporación de copias adicionales, unidas funcionalmente con un promotor de la secuencia de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido o el intercambio del promotor natural por un promotor más potente.

Se ha demostrado que las aminas y diaminas se producen, de acuerdo con la invención, con un mayor rendimiento y pureza cuando el fondo de enzimas expresadas de forma endógena y el catalizador de células enteras esté optimizado de modo que se reduzca o elimine la actividad de enzimas endógenas de degradar o modificar de otro modo los eductos, productos intermedios o productos del procedimiento de acuerdo con la invención o utilizando la célula de acuerdo con la invención, preferiblemente ésteres metílicos de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ácidos  $\omega$ -hidroxicarboxílicos, ácidos  $\omega$ -oxocarboxílicos y ácidos dicarboxílicos, en vías metabólicas que se apartan de la formación del producto deseado. Ante estos antecedentes, puede ser ventajoso que en el caso del catalizador de células enteras de acuerdo con la invención se trate de una célula que presente una actividad de la esterasa BioH [código del banco de datos YP\_492020.1] reducida con respecto a su tipo salvaje o una variante de la misma. Células de este tipo con una actividad BioH reducida, su preparación y ensayos para la determinación de la actividad se describen en la solicitud de patente europea EP 12007663.3.

Para el caso de que como ácido carboxílico, ácido dicarboxílico o monoésteres de los mismos se empleen mezclas de compuestos en los que los grupos carboxi en posición terminal se presenten en una medida elevada, preferiblemente en al menos un 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento en forma de un éster, por ejemplo por motivos de la mejor disponibilidad de estos sustratos o de la toxicidad de ácidos carboxílicos o ácidos dicarboxílicos libres, el monoéster puede proporcionarse por hidrólisis parcial o completa de ácidos dicarboxílicos totalmente esterificados o

bien el ácido carboxílico libre puede proporcionarse por hidrólisis parcial o completa de ácidos carboxílicos totalmente esterificados. Para este caso puede ser ventajoso aumentar la capacidad de la célula para la hidrólisis del éster por sobre-expresión de una esterasa adecuada. En una forma de realización preferida, para ello se aumenta la actividad de la éster hidrolasa BioH o de una variante de la misma con respecto al tipo salvaje del catalizador de células enteras empleado, de manera particularmente por sobre-expresión. El monoéster correspondiente y/o el ácido carboxílico o ácido dicarboxílico no esterificado se proporciona entonces *in situ* mediante hidrólisis del éster. La hidrólisis parcial o completa de un ácido dicarboxílico totalmente esterificado puede tener lugar también por hidrólisis catalizada químicamente, por ejemplo a valores de pH bajos.

El catalizador de células enteras de acuerdo con la invención puede emplearse preferiblemente en un procedimiento para la reacción de un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos para dar la correspondiente amina o diamina, tratándose en el caso del ácido carboxílico o ácido dicarboxílico del monoéster de los mismos de un compuesto de la fórmula (I)



en donde  $R^1$  se elige del grupo que comprende -H y  $COOR^3$ , en donde  $R^2$  y  $R^3$  se eligen, en cada caso independientemente uno del otro, del grupo que comprende H, metilo, etilo y propilo, con la condición de que al menos uno de los radicales  $R^2$  y  $R^3$  sea H, representando A un grupo hidrocarbonado con al menos cuatro átomos de carbono no ramificado, ramificado, lineal, cíclico, sustituido o no sustituido. En una forma de realización preferida, en el caso de A se trata de una estructura de la fórmula  $-(CH_2)_n-$ , siendo n preferiblemente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. En una forma de realización más preferida, en el caso del ácido carboxílico o ácido dicarboxílico se trata de ácido láurico o de ácido  $\omega$ -carboxiláurico. En otra forma de realización más preferida, en el caso del ácido carboxílico se trata de un ácido carboxílico de la fórmula  $CH_3-(CH_2)_n-COOH$ , siendo n preferiblemente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, preferiblemente se trata de ácido hexanoico o ácido decanoico. En otra forma de realización más preferida, en el caso del ácido carboxílico o ácido dicarboxílico se trata de un ácido dicarboxílico de la fórmula  $HOOC-(CH_2)_n-COOH$ , siendo n preferiblemente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, preferiblemente de ácido  $\omega$ -carboxihexanoico o ácido  $\omega$ -carboxidecanoico. En otra forma de realización más preferida, en el caso del ácido carboxílico o ácido dicarboxílico se trata de ácido  $\omega$ -carboxitetradecanoico. De manera correspondiente, en el caso de la amina o bien diamina preparada conforme a la invención se trata preferiblemente de un compuesto de la fórmula  $CH_3-(CH_2)_n-NH_2$  o bien  $NH_2-(CH_2)_n-NH_2$ , siendo n en cada caso preferiblemente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30.

Con relación al ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o del monoéster de los mismos, al igual que a cualquier compuesto químico descrito en esta solicitud, se cumple que la fórmula indicada respectiva comprende todas las sales, protonadas o desprotonadas, del compuesto respectivo. Por ejemplo, el ácido láurico comprende no sólo la forma protonada, sino también la sal laureato con todos los cationes, por ejemplo laureato de sodio.

El procedimiento de acuerdo con la invención requiere que las enzimas empleadas para el procedimiento de acuerdo con la invención, opcionalmente proporcionadas en forma del catalizador de células enteras de acuerdo con la invención, se pongan en contacto con el ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o el monoéster de los mismos en una solución acuosa. En una forma de realización preferida, por la expresión "poner en contacto", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende que la enzima respectiva entra en contacto directo con su sustrato, en particular sin que se intercalen barreras físicas tales como membranas impermeables o similares. La puesta en contacto tiene lugar en el caso más sencillo debido a que el sustrato se añade a una solución acuosa en la que se encuentra la enzima o el catalizador de células enteras.

Para la realización de la enseñanza de acuerdo con la invención se adecua una mezcla de reacción que comprende el catalizador de células enteras de acuerdo con la invención en solución acuosa, así como un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o el monoéster de los mismos de la fórmula (I), en donde  $R^1$  se elige del grupo que comprende -H y  $COOR^3$ , en donde  $R^2$  y  $R^3$  se eligen, en cada caso independientemente uno del otro, del grupo que comprende H, metilo, etilo y propilo, con la condición de que al menos uno de los radicales  $R^2$  y  $R^3$  sea H, representando A un grupo hidrocarbonado con al menos cuatro átomos de carbono no ramificado, ramificado, lineal, cíclico, sustituido o no sustituido, preferiblemente de la fórmula  $-(CH_2)_n-$ , siendo n al menos 4, de manera particularmente preferida al menos 10. La solución acuosa debe estar constituida en este caso, por ejemplo en relación con la composición, el valor del pH y la temperatura, de modo que sustente al menos temporalmente la durabilidad o al menos la capacidad catalítica del catalizador de células enteras. El experto en la materia conoce numerosos medios de cultivo acuosos adecuados como solución acuosa que son adecuados para la obtención o el cultivo de células, en particular de células de importancia biotecnológica. A ellos pertenecen de igual manera medios completos tales como medios LB, medios mínimos tales como medios M9, así como medios selectivos, por ejemplo aquellos que contienen una

elevada concentración salina y, por lo tanto, únicamente posibilitan el crecimiento de organismos halófilos o al menos halotolerantes. En una forma de realización preferida, por la expresión "medio de cultivo acuoso", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende un medio de reacción a base de agua que, en relación con todos los factores relevantes, en particular valor del pH, contenido de sales y temperatura, esté constituido de manera que mantenga o fomente la viabilidad de células contenidas en el mismo, preferiblemente microorganismos y tanto el medio de cultivo acuoso como también la fase orgánica hidrofóbica estén presentes en forma líquida. Los requisitos de temperatura de diferentes células de importancia biotecnológica pueden deducirse de libros de texto microbiológicos y de biología molecular, p. ej., Fuchs/Schlegl, 2008. En una forma de realización preferida, el valor del pH del medio de cultivo acuoso en el momento del contacto oscila entre 4 y 9, preferiblemente entre 4,5 y 8,5, lo más preferiblemente entre 6,5 y 7,5. En otra forma de realización preferida, la temperatura oscila entre 0 y 45°C, preferiblemente entre 15 y 40°C, lo más preferiblemente entre 20 y 37°C. La mezcla de reacción está contenida típicamente en un fermentador. Como fermentador puede actuar cualquier recipiente de reacción que pueda ser esterilizado, preferiblemente sometido a autoclave y permita el cultivo del catalizador de células enteras, la ventilación y el control de las condiciones de reacción, por ejemplo del contenido en oxígeno y de la temperatura.

En una forma de realización preferida, la mezcla de reacción comprende, adicionalmente a la solución acuosa, una fase orgánica hidrofóbica. Ésta puede comprender un disolvente orgánico y/o un intercambiador de cationes líquido hidrofóbico para la separación del  $\omega$ -aminoácido graso a partir de la solución acuosa. Disolventes e intercambiadores de cationes adecuados se describen en el documento EP 11191520.3.

La presente invención se explica adicionalmente mediante las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes, de los que se pueden deducir características, formas de realización, aspectos y ventajas adicionales de la presente invención.

Figura 1: Detección de mono- y di-aminas en el caldo de fermentación de la cepa *E.coli* W3110 pACYC{Placuv5}{carA\_Ms-npt\_Noc} / pJ281\_alaDH\_B.s.\_TA\_C.v.(ct) tras un tiempo de proceso de 21,75 h.

#### Ejemplo 1

#### **Preparación de un vector de expresión para la expresión de los genes MSMEG\_2956 de *Mycobacterium smegmatis* y *npt* de *Nocardia* sp.**

Para la preparación de vectores para la co-expresión de MSMEG\_2956 (*carA*, SEQ ID NO 1) de *Mycobacterium smegmatis* que codifica una ácido graso reductasa (YP\_887275.1) y con *npt* (SEQ ID NO 2) de *Nocardia* sp que codifica una fosfopanteteinil-transferasa (ABI83656.1) que fosfopanteteinila ácido graso reductasa, ambos genes fueron amplificados mediante PCR bajo la incorporación de regiones homólogas para la clonación por recombinación. En este caso, el ADN genómico del organismo donante servía para la amplificación del gen MSMEG\_2956 y un fragmento de ADN sintetizado servía para la amplificación del gen *npt* como muestra. Los genes se encuentran bajo el control de un promotor lacuv5 (SEQ ID NO 3), el cual fue asimismo amplificado mediante PCR partiendo de un vector presente bajo incorporación de regiones homólogas para la clonación por recombinación. En este caso, pasaron a emplearse los siguientes oligonucleótidos:

Plac\_H1\_dir: 5'-TTATGCGACTCCTGCTGGCTATGGTGGGATTTCC-3' (SEQ ID NO 4)

Plac\_H2\_inv: 5'-GATCGTCATATGCCACTCTCCTTGGTTCC-3' (SEQ ID NO 5)

carA\_H2\_dir: 5'-TGGCATATGACGATCGAAACGCGCG-3' (SEQ ID NO 6)

carA\_H3\_inv: 5'-TCCTTCTCTTACAGCAATCCGAGCATCT-3' (SEQ ID NO 7)

npt\_H3\_dir: 5'-GCTGTAAGAGAAGGAGTTCTATCATGATCGAG-3' (SEQ ID NO 8)

npt\_H4\_inv: 5'-GCAGCCTAGGTTAATTTATCAGGCGTACGCGATCG-3' (SEQ ID NO 9)

Para la PCR para la amplificación del  $P_{lacuv5}$  y del gen *npt* se emplearon los siguientes parámetros: 1 x: desnaturalización inicial, 98°C, 0:30 min; 35 x: desnaturalización, 98°C, 0:10 min, reasociación, 55°C, 0:20 min; elongación, 72°C, 0:15 min; 1 x: elongación terminal, 72°C, 10 min. Para la amplificación del gen MSMEG\_2956 se emplearon los siguientes parámetros: 1 x: desnaturalización inicial, 98°C, 0:30 min; 35 x: desnaturalización, 98°C, 0:10 min, reasociación, 65°C, 0:20 min; elongación, 72°C, 1 min; 1 x: elongación terminal, 72°C, 10 min. Para la amplificación se utilizó la Mezcla Maestra de Alta Fidelidad Phusion™ de New England Biolabs (Frankfurt) correspondiente a los consejos del fabricante. En cada caso 50  $\mu$ l de las reacciones PCR se separaron a continuación en un gel de TAE-agarosa al 1%. La realización de la PCR, la electroforesis en gel de agarosa, la

tinción con bromuro de etidio del ADN y la determinación de los tamaños de fragmentos por PCR tuvieron lugar de la manera conocida por el experto en la materia. En todos los casos se podían amplificar fragmentos de PCR del tamaño esperado. Estos ascendían P<sub>lacuv5</sub> a 325 pares de bases, MSMEG\_2956 a 3,5 pares de kilobases y *npt* a 718 pares de bases. Para el aislamiento del ADN a partir del gel de agarosa se recortó del gel con un bisturí el ADN diana y se purificó con el kit de extracción de gel *QiaQuick* según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden). Los productos de PCR purificados se clonaron en un vector pACYDuet-1 cortado con *Eco*Ni y *Pac*I (Merck, Darmstadt) mediante recombinación utilizando el kit de clonación y ensamblaje sin costuras Geneart® según las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). La transformación de *E. coli* DH10β químicamente competente (New England Biolabs, Frankfurt) tuvo lugar según el modo conocido por el experto en la materia. La inserción correcta de los genes diana se examinó mediante análisis por restricción y se confirmó la autenticidad de los genes incorporados mediante secuenciación de ADN. El vector de expresión preparado se designó pACYC(Placuv5)[carA\_Ms-npt\_Noc] (SEQ ID NO 10).

### Ejemplo 2

#### **Preparación de un vector de expresión para la co-expresión de los genes *ald* de *Bacillus subtilis* y Cv2025 de *Chromobacterium violaceum***

Para la preparación de un vector de expresión de *E. coli* para los genes *ald* (SEQ ID NO 11) de *Bacillus subtilis* que codifica una alanina deshidrogenasa (NP\_391071.1) y *Cv\_2025* (SEQ ID NO 12) de *Chromobacterium violaceum* que codifica una transaminasa (NP\_901695.1) se clonó el gen *ald* de *Bacillus subtilis* en intercambio por el gen *ald* de *Bacillus sphaericus* en el vector de expresión de *E. coli* pJ281\_alaD\_Bsp\_TA\_C.v.(ct) (secuencia y preparación, véase el Ejemplo 1 del documento WO/2013/024114 y la SEQ ID NO 17 allí recogida). El gen *ald* de *Bacillus subtilis* se amplificó por PCR a partir de ADN cromosómico de la cepa *Bacillus subtilis* str. 168. En este caso pasaron a emplearse los siguientes oligonucleótidos:

alaDH\_pCR22\_dir: 5'-ATGATCATAGGGGTTCTAAAGAG-3'  
(SEQ ID NO 13)  
alaDH\_pCR22\_inv: 5'-TTAAGCACCCGCCACAGATG-3'  
(SEQ ID NO 14)

Para la PCR se emplearon los siguientes parámetros: 1x: desnaturalización inicial, 98°C, 0:30 min; 35 x: desnaturalización, 98°C, 0:10 min, reasociación, 65°C, 0:30 min; elongación, 72°C, 0:20 min; 1 x: elongación terminal, 72°C, 10 min. Para la amplificación se utilizó la Mezcla Maestra de Alta Fidelidad Phusion™ de New England Biolabs (Frankfurt) correspondiente a los consejos del fabricante. En cada caso 50 µl de las reacciones PCR se separaron a continuación en un gel de TAE-agarosa al 1%. La realización de la PCR, la electroforesis en gel de agarosa, la tinción con bromuro de etidio del ADN y la determinación de los tamaños de fragmentos por PCR tuvieron lugar de la manera conocida por el experto en la materia. El fragmento de PCR mostró el tamaño esperado de 1137 pares de bases y se purificó con el kit de purificación de PCR Quick de Qiagen (Hilden) según las instrucciones del fabricante. Para el ligamiento del producto de PCR con el vector se colgaron 5'-fosfatos con ayuda de la polinucleótido quinasa (New England Biolabs, Frankfurt) al producto de PCR. En este caso, se siguieron los consejos del fabricante.

El vector se digirió con las endonucleasas de restricción *Hind*III y *Nde*I, con lo cual se separó el gen de *Bacillus sphaericus* *ald* contenido. La tanda de la digestión de restricción se separó en un gel de TAE-agarosa al 1%. Se pudieron identificar dos bandas con los tamaños de 5696 pb y 1124 pb. Para el aislamiento del ADN del vector a partir del gel de agarosa, la banda de ADN de 5696 pb se aisló del gel con un bisturí y se purificó con el kit de extracción de gel Quick de Qiagen (Hilden) según los datos del fabricante. Para la generación de extremos romos los colgantes 5' del ADN del vector purificado se rellenaron con ayuda del fragmento Klenow de la ADN-polimerasa I (New England Biolabs, Frankfurt). En este caso, se siguieron los datos del fabricante. El fragmento de ADN de *Bacillus subtilis* *ald* con restos 5'-fosfato se ligó en el vector con extremos romos. El vector de expresión de *E. coli* acabado se designó pJ281\_alaDH\_B.s.\_TA\_C.v.(Ct) (SEQ ID NO 15).

### Ejemplo 3

#### **Preparación de una cepa de *E. coli* que sobre-expresa los genes MSMEG\_2956 de *Mycobacterium smegmatis* y *npt* de *Nocardia* sp., *ald* de *Bacillus subtilis* y Cv2025 de *Chromobacterium violaceum***

Para la generación de una cepa de *E. coli* que co-expresa los genes MSMEG\_2956 de *Mycobacterium smegmatis* que codifica una ácido graso reductasa (YP\_887275.1) y *npt* de *Nocardia* sp. que codifica una fosfopanteteinil-transferasa que fosfopanteteinila la ácido graso reductasa (ABI83656.1) en combinación con los genes *ald* de *Bacillus subtilis* que codifican una alanina deshidrogenasa (NP\_391071.1) y Cv2025 de *Chromobacterium violaceum* que codifica una transaminasa (NP\_901695.1), la cepa de *E. coli* W3110 se transformó con los plásmidos

pACYC(Placuv5)[carA\_Ms\_npt\_Noc] (SEQ ID NO 10) y pJ281\_alaDH\_B.s\_TA\_C.v.(ct) (SEQ ID NO 15) mediante electroporación y se sembró en placas de agar LB con cloranfenicol (50 µg/ml) y canamicina (50 µg/mol). Los transformantes se verificaron mediante preparación de plásmidos y análisis de restricción analítico en relación con la presencia de los plásmidos correctos. La cepa generada se designó *E. coli* W3110 pACYC(Placuv5)[carA\_Ms\_npt\_Noc] / pJ281-alaDH\_B.s\_TA\_C.v.(ct). La cepa se utilizó con el fin de examinar su capacidad para la producción de dodecandiamina partiendo de ácido dodecanodioico y dodecilamina partiendo de ácido dodecanoico. El producto génico CarA, una ácido graso reductasa, que es activado por la fosfopanteteinil-transferasa *npt* sobre-expresada, hace reaccionar el sustrato ácido dodecanoico o bien ácido dodecanodioico para dar el aldehído o bien dialdehído respectivo. La función del producto génico Cv\_2505 consiste en hacer reaccionar el (di)-aldehído en posición terminal para dar dodecilamina o bien dodecanodiamina. El donante de amino alanina, requerido para la reacción de aminación, es proporcionado por el producto génico *ald* a partir de piruvato.

Ejemplo 4

**Producción de dodecandiamina y dodecilamina por parte de cepas de *E. coli* con un vector de expresión para los genes MSMEG\_2956 de *Mycobacterium smegmatis* y *npt* de *Nocardia sp.* en combinación con un vector de expresión para los genes *ald* de *Bacillus subtilis* y Cv\_2025 de *Chromobacterium violaceum***

Se utilizó la cepa producida en el Ejemplo 3 con el fin de examinar su capacidad para la producción de dodecilamina y dodecandiamina. La biotransformación de ácido dodecanoico o bien dodecandiamina. La biotransformación de ácido dodecanoico o bien ácido dodecanodioico en dodecilamina o ben dodecandiamina se llevó a cabo en el sistema de fermentación paralela óctuplo de DASGIP. En este caso, se procedió de la siguiente manera: para la fermentación se utilizaron reactores de 1 L. Las sondas de pH se calibraron mediante una calibración de dos puntos con soluciones estándares de pH 4,0 y pH 7,0. Los reactores se cargaron con 300 mL de agua potable y se sometieron a autoclave durante 20 min a 121°C con el fin de garantizar la esterilidad. A continuación, las sondas de pO2 se polarizaron durante la noche (al menos durante 6 h) en el sistema DASGIP. A la mañana siguiente, se retiró el agua debajo de la cámara limpia y se reemplazó por 300 mL de medio de densidad celular elevada y 50 mg/L de cloranfenicol y 50 mg/L de canamicina. Seguidamente, las sondas de pO2 se calibraron con una calibración de un punto (agitador: 400 rpm / gasificación: 10 sL/h de aire) y los tramos de alimentación, de agente de corrección y de agente de inducción se limpiaron mediante limpieza in situ. Para ello, las mangueras se lavaron con etanol al 70%, a continuación con NaOH 1 M, después con agua totalmente desalada estéril, y finalmente se cargaron con los medios respectivos.

Las cepas de *E. coli* productoras de dodecandiamina y dodecilamina se cultivaron primeramente a partir del criocultivo en medio LB (25 mL en un matraz con deflectores de 100 mL) con los antibióticos arriba mencionados a lo largo de una noche a 37°C y 200 rpm durante aprox. 18 h. A continuación, 2 mL del cultivo en medio de alta densidad celular (glucosa 15 g/L (30 mL/L de una solución madre de 500 g/L sometida a autoclave por separado con MgSO4\*7H2O al 1% y NH4Cl al 2,2%), (NH4)2SO4 1,76 g/L, K2HPO4 19,08 g/L, KH2PO4 12,5 g/L, extracto de levadura 6,66 g/L, citrato trisódico dihidrato 2,24 g/L, solución de citrato de amonio-hierro 17 mL/L de una solución madre al 1% sometida a autoclave por separado, solución de oligoelementos 5 mL/L de solución madre sometida a autoclave por separado (HCl (al 37%) 36,50 g/L, MnCl2\*4H2O 1,91 g/L, ZnSO4\*7H2O 1,87 g/L, ácido etilendiaminotetraacético dihidrato 0,84 g/L, H3BO3 0,30 g/L, Na2MoO4\*2H2O 0,25 g/L, CaCl2\*2H2O 4,70 g/L, FeSO4\*7H2O 17,80 g/L, CuCl2\*2H2O 0,15 g/L)) (25 mL en un matraz con deflectores de 100 mL) se sobre-inocularon con los antibióticos arriba mencionados y se incubaron a 37°C / 200 rpm durante otras 5,5 h.

Los reactores se inocularon con una densidad óptica de 0,1 al extraer un volumen correspondiente del cultivo previo en una jeringa de 5 mL (bajo condiciones estériles) y los reactores se inocularon mediante cánula a través de un tabique revestido con etanol al 70%.

Se utilizó el siguiente programa estándar:

Regulador de DO		Regulador del pH	
Pre-ajuste	0%	Pre-ajuste	0 ml/h
P	0,1	P	5
Ti	300 s	Ti	200 s
Mín	0%	Mín	0 mL/h
Máx	100%	Máx	40 mL/h

45

N (Rotación)	de	a	XO2 (mezcla gaseosa)	de	a	F (flujo de gas)	de	a
Crecimiento y biotransformación	0%	30%	Crecimiento y biotransformación	0%	100%	Crecimiento y biotransformación	15%	80%
	400 rpm	1500 rpm		21 %	21%		6 sL/h	72 sL/h

Guión	
Activador nítido	31% DO (1/60h)
Inducción de IPTG	2 h después comienzo de alimentación
Activador de alimentación	50% DO
Tasa de alimentación	3 [mL/h]

5 El experimento llevado a cabo se puede dividir en dos fases, el cultivo, en el que las células deben alcanzar una determinada densidad óptica, y la subsiguiente biotransformación en la que, después de la adición de los sustratos ácido dodecanoico, ácido oleico o bien ácido dodecanodioico, ha de tener lugar una reacción para dar dodecilamina, oleilamina o bien dodecandiamina de enzimas formadas en la expresión. Los valores del pH se regularon parcialmente con amoníaco (12,5%) a pH 6,8. Durante el cultivo y la biotransformación se reguló en 30% el oxígeno disuelto (DO, dissolved oxygen) en el cultivo a través del número de revoluciones del agitador y de la tasa de gasificación. La fermentación se llevó a cabo como tanda discontinua, activando el comienzo de la alimentación, 5 g/Lh de alimentación de glucosa (500 g/L de glucosa con MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O al 1% y NH<sub>4</sub>Cl al 2,2%) por encima de un pico de DO. Con el inicio de la alimentación se redujo también la temperatura de previamente 37°C a 30°C. La expresión de la transaminasa, alanino deshidrogenasa, ácido carboxílico reductasa y fosfopanteteinil transferasa se indujo 2 h después del inicio de la alimentación mediante la adición automática de IPTG 1 mM. Antes del inicio de la biotransformación se determinó la densidad óptica de los caldos de cultivo.

10 El inicio de la fase de biotransformación tuvo lugar durante 1 h o bien 12 h después del inicio de la alimentación. Para ello, al caldo de fermentación se añadieron en forma de tanda 150 mL o 75 mL de una mezcla a base de ácido dodecanoico o bien ácido dodecanodioico y ácido oleico (90% técnico). Con el fin de proporcionar un donante de grupos amino para la transaminasa, media hora antes del inicio de la biotransformación se añadieron al caldo de fermentación 5 mL de una solución de sulfato de amonio 3 M. Para la toma de muestras se retiraron 2 mL de caldo de fermentación de la caldera y una parte de los mismos se diluyeron en la relación 1/20 en uno y en una mezcla a base de 80% de acetonitrilo, 20% de agua y ácido fórmico al 0,1% y se extrajeron. De todos los reactores se tomaron muestras a las 1,25 h, 2,75 h, 4,25 h, 18,25 h y 21,75 h después del inicio de la biotransformación. Las tasas de conversión para el oxígeno (OTR = oxygen transfer rate) y carbono (CTR = carbon transfer rate) se determinaron durante la fermentación a través de la analítica de los gases de escape en los sistemas DASGIP. La fermentación finalizó 21,75 h después del inicio de la biotransformación. El agitador, la gasificación, la regulación de la temperatura y la regulación del pH se expusieron y la caldera se dejó reposar durante 5-10 minutos.

#### Método del escaneo por HPLC-ESI/MS

30 La evaluación cualitativa de las muestras tuvo lugar mediante acoplamiento HPLC/MS con detección MS de alta resolución en el modo de escaneo.

En este caso pasaron a emplearse los siguientes aparatos:

- Instalación de HPLC Accela (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) con automuestreador, bomba cuaternaria, detector de PDA y horno de columna
- Espectrómetro de masas LTQ-FT (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) con fuente ESI
- Columna de HPLC: Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, tamaño de partícula: 2,6 µm, tamaño de poro: 100 Å (Phenomenex; Aschaffenburg)

35 Las muestras se prepararon pipeteando 1950 µL de disolvente (80% (v/v) de acetonitrilo, 20% de H<sub>2</sub>O bidest. (v/v) + ácido fórmico al 0,1%) y 50 µL de muestra en un recipiente de reacción de 2 mL. La mezcla se sometió a vórtice durante aprox. 10 segundos y, a continuación, se centrifugó a aprox. 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante transparente se retiró con una pipeta.

## ES 2 670 143 T3

La separación por HPLC tuvo lugar con la columna de HPLC arriba mencionada. El volumen de inyección ascendió a 0,5 µL, la temperatura de la columna a 40°C y el caudal a 0,3 mL/min. La fase móvil se componía de eluyente A (ácido trifluoroacético acuoso al 0,02% (v/v)) y eluyente B (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,015% (v/v)). Se utilizó el siguiente perfil de gradiente:

	Tiempo [min]	Eluyente A [%]	Eluyente B [%]
5	0	98	2
	2	98	2
	17	2	98
10	32	2	98

El análisis ESI-MS tuvo lugar en un modo positivo con los siguientes parámetros de la fuente ESI:

15	• tensión ESI:	4kV
	• temperatura del capilar	300°C
	• flujo de gas de la envoltura	40
	• flujo de gas auxiliar	5
	• flujo de gas de barrido	3

La detección tuvo lugar en un intervalo de masas de  $m/z = 100$  a 1000. La resolución por espectrometría de masas ascendió a  $R = 100.000$ .

20 Los resultados se representan en la siguiente tabla.

Sustrato	Inducción	Intensidad MS [-]		
		Dodecandiamina	Dodecilamina	Oleilamina
LS/ ácido oleico (150 ml)	IPTG 1 mM (12h)	n.d.	1.160.000	23.700
DDS/ ácido oleico (75 ml)	IPTG 1 mM en H <sub>2</sub> O/ etanol (12h)	742.000	n.d.	18.000
DDS/ ácido oleico (150 ml)	IPTG 1 mM (1h)	30.700	n.d.	n.d.
DDS/ ácido oleico (150 ml)	IPTG 1 mM (12h)	23.500	n.d.	n.d.

Determinación cuantitativa de mono- y di-aminas en el caldo de fermentación de la cepa *E.coli* W3110 pACYC{Placuv5}[carA\_Ms-npt\_Noc] / pJ281\_alaDH\_B.s.\_TA\_C.v.(ct) tras un tiempo de proceso de 21,75 h (n.d. = no detectable; LS = ácido láurico, DDS = ácido dodecanodioico).

La Figura 1 aclara datos adicionales.

25 La determinación cuantitativa de 1,12-dodecandiamina y dodecilamina tuvo lugar mediante medición HPLC/UV, después de derivatización mediante orto-ftaldialdehído. Se midió el sobrenadante metanólico. Los parámetros cromatográficos más importantes están recopilados en la siguiente Tabla.

Columna	Luna 5u C8, 100 Å, 150 x 4.60 mm, (Phenomenex; Aschaffenburg)
Instalación de HPLC	Agilent 1200
Eluyente A	2,5 mL de ácido acético (100 %) en 1 L de agua bidest., ajuste del pH con lejía de sosa a pH 6,0
Eluyente B	Metanol
Temp. de la columna	40 °C
Caudal	1 mL/min
Gradiente	0,0-1 min: 30,0% de B, 1,0-17,0 min: 90,0% de B, 17-19,5 min: 90,0% de B, 19,6-20,5 min: 30,0% de B
Detector	DAD, 334 nm
Derivatización/ volumen de inyección	Derivatización automática mediante programa de inyector, 1 µL de muestra se hace reaccionar con 9 µL de reactivo de derivatización; composición del reactivo de derivatización: 10 g/L de o-ftaldialdehído disuelto en tampón borato (0,4 mol/L), bajo adición de

	mercaptoetanol (5 mL/L) y metanol (100 mL/L)
Calibrado	Calibrado externo, intervalo de medición 50-1000 mg/L, calibrado de 5 puntos, calibrado antes y después de la serie de muestras, notificación sobre las dos series de calibrado, regresión cuadrática

Los resultados están representados en las siguientes tablas.

Sustrato	Inducción	Dodecilamina [mg/L]	Dodecandiamina [mg/L]
DDS/ ácido oleico (75 ml)	IPTG 1 mM en H <sub>2</sub> O/ etanol (12h)	n.d.	40,5
DDS/ ácido oleico (150 ml)	IPTG 1 mM (1h)	n.d.	3,1
DDS/ ácido oleico (150 ml)	IPTG 1 mM (12h)	n.d.	<1 <sup>*)</sup>
LS/ ácido oleico (150 ml)	IPTG 1 mM (12h)	11,6	n.d.

5 Cuantificación de mono- y di-aminas en el caldo de fermentación de la cepa *E.coli* W3110 pACYC{Placuv5}[carA\_Ms-npt\_Noc] / pJ281\_alaDH\_B.s.\_TA\_C.v.(ct) tras un tiempo de proceso de 21,75 h (n.d. = no detectable, <sup>\*)</sup> menor que el límite de detección, DDS = ácido dodecanodioico, LS = ácido láurico).

Se demostró que las cepas están en condiciones de preparar las respectivas aminas dodecilamina, dodecandiamina y oleilamina a partir de ácido dodecanoico, ácido dodecanodioico y ácido oleico.

#### Ejemplo 5

#### 10 **Preparación de un vector de expresión para la expresión del gen $\alpha$ DOX que codifica una $\alpha$ -dioxigenasa de *Oryza sativa***

Para la preparación de un vector para la expresión de  $\alpha$ DOX (Os12g0448900, SEQ ID NO 16) de *Oryza sativa* que codifica una  $\alpha$ -dioxigenasa (NP\_001066718.1) se optimizó en codones el gen para la expresión en *Escherichia coli*, se sintetizó y al mismo tiempo se introdujo un lugar de corte *NdeI* aguas arriba y un lugar de corte *AvrII* aguas abajo. El fragmento de ADN sintetizado se digirió con las endonucleasas de restricción *NdeI* y *AvrII* y se ligó en el vector correspondientemente cortado pACYC(Placuv5)[carA\_Ms-npt\_Noc] (SEQ ID NO 10) bajo separación de los genes carA\_Ms y npt\_Noc. El promotor lacuv5 contenido en el vector (SEQ ID NO 3) se obtuvo con ello. El vector acabado se designó pACYC(Placuv5)[DOX\_Os(co\_Ec)] (SEQ ID NO 17). El vector pACYC es un vector de *E. coli* que induce resistencia a cloranfenicol, así como porta un origen de replicación de p15A y, con ello, presenta un bajo número de copias (10-15 copias por célula).

#### Ejemplo 6

#### **Preparación de una cepa de *E. coli* con delección en el gen *bioH* que sobre-expresa los genes $\alpha$ DOX de *Oryza sativa*, *ald* de *Bacillus subtilis* y Cv2025 de *Chromobacterium violaceum***

25 Para la generación de una cepa de *E. coli* que co-expresa el gen  $\alpha$ DOX de *Oryza sativa* que codifica una  $\alpha$ -dioxigenasa (NP\_001066718.1) en combinación con los genes *ald* (SEQ ID NO 11) de *Bacillus subtilis* que codifica una alanina deshidrogenasa (NP\_391071.1) y Cv2025 (SEQ ID NO 12) de *Chromobacterium violaceum* que codifica una transaminasa (NP\_901695.1), la cepa de *E. coli* W3110  $\Delta$ *bioH* (preparación, véase el documento EP 12007663, Ejemplo 1) se transformó con los plásmidos pACYC(Placuv5)[DOX\_Os(co\_Ec)] (SEQ ID NO 17) y pJ281\_alaDH\_B.s.\_TA\_C.v.(ct) (SEQ ID NO 15) mediante electroporación y se sembró en placas de agar LB con cloranfenicol (50  $\mu$ g/ml) y canamicina (50  $\mu$ g/mol). Los transformantes se verificaron mediante preparación de plásmidos y análisis de restricción analítico en relación con la presencia de los plásmidos correctos. La cepa generada se designó *E. coli*  $\Delta$ *bioH* pACYC(Placuv5)[DOX\_Os(co\_Ec)] / pJ281-alaDH\_B.s.\_TA\_C.v.(ct). La cepa se utilizó con el fin de examinar su capacidad para la producción de éster metílico del ácido aminoundecanoico partiendo de éster metílico del ácido dodecandioico.

#### 35 Ejemplo 7

**Producción de éster metílico del ácido aminoundecanoico partiendo de éster metílico del ácido dodecanodioico mediante una cepa de *E. coli* con un vector de expresión para el gen  $\alpha$ DOX de *Oryza sativa* en combinación con un vector de expresión para los genes *ald* de *Bacillus subtilis* y Cv\_2025 de *Chromobacterium violaceum***

Se utilizó la cepa descrita en el Ejemplo 8 con el fin de examinar su capacidad para la producción de éster metílico del ácido aminoundecanoico. En este caso, se procedió de la siguiente manera: la cepa a examinar se extendió primeramente sobre una placa de agar LB con 50 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de canamicina y se incubó a 37°C durante la noche. Como control se extendió adicionalmente la cepa *E. coli* W3110 ΔbioH sobre una placa de agar LB sin antibióticos. Las cepas se cultivaron entonces en caldo de Luria-Bertani según Miller (Merck, Darmstadt) con 50 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de canamicina (para la cepa portadora del plásmido) como cultivo previo de 20 ml a partir de en cada caso una colonia individual. Como cultivo principal se dispusieron 100 ml de caldo de LB con 50 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de canamicina en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con deflectores y se inocularon con 2 ml del cultivo previo. El cultivo tuvo lugar primeramente a 37°C y 200 rpm en un agitador de incubación. Al alcanzar una densidad óptica (600 nm) de 0,5-0,7, se indujo la expresión del gen mediante la adición de IPTG 1 mM. El cultivo ulterior tuvo lugar a 22°C y 200 rpm a lo largo de la noche. Al día siguiente, los cultivos se recogieron mediante centrifugación durante 10 minutos a 4°C y 5525 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento de células se lavó en tampón fosfato de potasio 200 mM (pH 7,5). Finalmente, el sedimento celular se recogió en tampón fosfato de potasio 200 mM con cloruro de amonio 50 mM y glucosa al 0,5% (p/v), de modo que se alcanzó una DO (600 nm) de 20. A la suspensión de células se añadió éster metílico del ácido dodecanodioico 12,5 mM (abcr, Karlsruhe) en etanol y se agitó ligeramente durante 4 horas a 30°C y 300 rpm. Durante la incubación se tomaron muestras en los momentos de 0 min, 60 min, 120 min, 180 min y 240 min y se extrajeron en una mezcla a base de 80% de acetonitrilo, 20% de agua y ácido fórmico al 0,1%. El sobrenadante se analizó mediante analítica HPLC/MS. Los resultados están representados en la siguiente Tabla.

Cepa	Tiempo [min]	Superficie pico éster metílico del ácido aminoundecanoico
<i>E. coli</i> W3110 ΔbioH	0	n.d.
	120	n.d.
	180	n.d.
	240	n.d.
<i>E. coli</i> W3110 ΔbioH pACYC{Placuv5}[DOX] / pJ281_alaDH_B.s._TA_C.v.(ct)	0	n.d.
	120	57616
	180	371989
	240	1764605

20 Producción de éster metílico del ácido aminoundecanoico con *E. coli* W3110 ΔbioH, sobre-expresados αDOX de *Oryza sativa*, ald de *Bacillus subtilis* y Cv\_2025 de *Chromobacterium violaceum*. Se indican las superficies pico (n.d. = no detectable).

25 Pudo demostrarse que la cepa *E. coli* W3110 ΔbioH pACYC{Placuv5}[DOX] / pJ281\_alaDH\_B.s.\_TA\_C.v.(ct) está capacitada para la formación de éster metílico del ácido aminoundecanoico partiendo de éster metílico del ácido dodecanodioico.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Evonik Industries AG

<120> Preparación de aminas y diaminas a partir de un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos

5 <130> 2012000206

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

< 211> 3507

10 < 212> ADN

< 213> Mycobacterium smegmatis

<400>

atgacgatcg aaacgcgcga agaccgcttc aaccggcgca ttgaccactt gttcgaaaacc	60
gaccgcgagt tcgccgcgcg ccgtcccgac gaggcgatca gcgcggctgc cgcgatccg	120
gagttgcgcc ttctgcccgc ggtcaaacag attctggccg gctatgcgga ccgccctgcg	180
ctcggcaagc gcgccgtcga gttcgtcacc gacgaagaag gccgcaccac cgcgaagctc	240
ctgccccgct tcgacacccat cacctaccgt cagctcgcag gccggatcca ggccgtgacc	300
aatgcctggc acaaccatcc ggtgaatgcc ggtgaccgcg tggccatcct gggtttcacc	360
agtgtcgact acacgacgat cgacatcgcc ctgctcgaac tcggcgccgt gtccgtaccg	420
ctgcagacca gtgcgccggt ggcccaactg cagccgatcg tcgccgagac cgagcccaag	480
gtgatcgctg cgagcgtcga cttcctcgcc gacgcagtcg ctctcgtcga gtccgggccc	540
gcgccgtcgc gactggtggt gttcgcactac agccacgagg tcgacgatca gcgtgaggcg	600
ttcagggcgc ccaagggcaa gctcgcaggc accggcgtcg tcgtcgagac gatcaccgac	660
gtactggacc gcggcggttc actcgcgcgc gcaccgctct acgtgcccgga cgagaccgac	720
ccgctgaccc ttctcatcta cacctccggc agcaccggca ctcccaaggg cgcgatgtac	780
cccgagtcca agaccgccac gatgtggcag gccgggtcca aggcccggtg ggacgagacc	840
ctcggcgtga tgccgtcaat caccctgaac ttcatgcca tgagtacgt catggggcgc	900
ggcatcctgt gcagcacact cgcagcggc ggaaccgct acttcgccgc acgcagcgac	960
ctgtccacct tcctggagga cctcgcctc gtgcggcca cgcagctcaa ctctgttcct	1020
cgcatctggg acatgctggt ccaggagtac cagagccgc tcgacaaccg ccgcgccgag	1080
ggatccgag accgagccga agccgcagtc ctcgaagagg tcgcaccca actgctcggc	1140
gggcgattcg tttcggccct gaccggatcg gctcccatct cggcggagat gaagagctgg	1200
gtcagggacc tgctcgacat gcatctgctg gagggctacg gctccaccga ggccggcgcg	1260
gtgttcatcg acgggcagat ccagcgcgcg ccggctcatcg actacaagct ggtcgacgtg	1320

1

ES 2 670 143 T3

cccgatctcg gctacttcgc cacggaccgg cctaccgcgc gcggcgaact tctgggcaag 1380  
 tccgagcaga tgttccccgg ctactacaag cgtccggaga tcaccgccga gatgttcgac 1440  
 gaggacgggt actaccgcac cggcgacatc gtccgccgagc tcggggcccga ccatctcgaa 1500  
 tacctcgacc gccgcaacaa cgtgctgaaa ctgtcgcagg gcgaattcgt cacgggtctcc 1560  
 aagctggagg cgggtgttcgg cgacagcccc ctggtagccc agatctacgt ctaccggcaac 1620  
 agcgcgcggc cctatctgct ggcggtcgtg gtcccgaccg aagaggcact gtcacgttgg 1680  
 gacggtgacg aactcaagtc gcgcatcagc gactcactgc aggacgcggc acgagccgcc 1740  
 ggattgcagt cgtatgagat cccgcgtgac ttectcgtcg agacaacacc tttcacgctg 1800  
 gagaacggcc tgctgaccgg tatccgcaag ctggcccggc cgaactgaa ggcgcactac 1860  
 ggcgaacgcc tcgaacagct ctaccgcgac ctggccgagg ggcaggccaa cgagttgcgc 1920  
 gagttgcgcc gcaaccggagc cgaccggccc gtggtcgaga ccgtcagccg cgcgcggtc 1980  
 gcactgctcg gtgcctccgt cacggatctg cggtcogatg cgcacttcac cgatctgggt 2040  
 ggagattcgt tgtcggcctt gagcttctcg aacctgttc acgagatctt cgatgtcgac 2100  
 gtgccggctg gcgtcatcgt cagcccggcc accgacctgg caggcgtcgc gccctacatc 2160  
 gagggcgaac tgccgcggctc caagcgcgcc acatacgcgt cgggtgcacgg gcgcgacgcc 2220  
 accgaggtgc gcgcgcgtga tctcgcctg ggcaagttca tcgacgccaa gaccctgtcc 2280  
 gccgcgccgg gtctcgcgcg ttcgggcacc gagatccgca ccgtgctgct gaccggcgcc 2340  
 accgggttcc tgggcccgcta tctggcgtg gaatggctgg agcgcacgga cctgggtggac 2400  
 ggcaagggtg tctgcctggc gcgcgcgccg agcgcacgag aggcccgggc gcgtctggac 2460  
 gccacgttcg acaccgggga cgcgacactg ctcgagcact accgcgcgct gccagccgat 2520  
 cacctcgagg tgatcgccgg tgacaagggc gaggccgac tcgggtctcga ccacgacacg 2580  
 tggcagcgac tggccgacac cgtcgatctg atcgtcgatc cggccgccct ggtcaatcac 2640  
 gtctgcccgt acagccagat gttcggaccc aatgcgctcg gcaccgccga actcatccgg 2700  
 atcgcgctga ccaccacgat caagccgtac gtgtacgtct cgacgatcgg tgtgggacag 2760  
 ggcacatccc ccgaggcgtt cgtcgaggac gccgacatcc gcgagatcag cgcgacgcgc 2820  
 cgggtcgacg actcgtacgc caacggctac ggcaacagca agtgggcccg cgaggtcctg 2880  
 ctgcgggagg cgcacgactg gtgtggtctg ccggctctcg tgttccgctg cgacatgatc 2940  
 ctggccgaca cgacctactc gggtcagctg aacctgcgg acatgttcac ccgcctgatg 3000  
 ctgagcctcg tggcgaccgg catcgcgccc ggttcgttct acgaactcga tgcggacggc 3060  
 aaccggcagc gcgcccacta cgacgggctg cccgtggagt tcacgcgca ggcgatctcc 3120  
 accatcggct cgcaggtcac cgacggatc gagacgttcc acgtgatgaa cccgtacgac 3180  
 gacggcatcg gcctcgacga gtacgtggac tggctgatcg aggccggcta ccccggtcac 3240

ES 2 670 143 T3

cgcgctgacg actacgccac ctggctgagc cggttcgaaa ccgcaactgcg gccctgccc 3300  
 gaacggcaac gtcaggcctc gctgctgccg ctgctgcaca actatcagca gccctcaccg 3360  
 cccgtgtgcg gtgccatggc acccaccgac cggttccgtg ccgcggtgca ggacgcgaag 3420  
 atcggccccc acaaggacat tccgcacgtc acggccgacg tgatcgtcaa gtacatcagc 3480  
 aacctgcaga tgctcggatt gctgtaa 3507

<210> 2

< 211> 672

< 212> ADN

5 < 213> Nocardia sp.

<400> 2

atgatcgaga caatthttgcc tgctgggtgc gaggcggctg agctgctgga gtatccggag 60  
 gacctgaagg cgcattccggc ggaggagcat ctcatcgcga agtcgggtgga gaagcggcgc 120  
 cgggacttca tcggggccag gcattgtgcc cggctggcgc tggctgagct cggcgagccg 180  
 ccggtggcga tcggcaaagg ggagcggggt gcgccgatct ggccgcgcgg cgtcgtcggc 240  
 agcctcaacc attgcgacgg atatcgggcc gcggcgggtg cgcacaagat gcgcttccgt 300  
 tcgatcggca tcgatgccga gccgcacgcy acgtcgcccg aaggcgtgct ggattcggtc 360  
 agcctgccgc cggagcggga gtggttgaag accaccgatt ccgcaactgca cctggaccgt 420  
 ttactgttct gcgccaagga agccacctac aaggcgtggt ggccgctgac cgcgcgctgg 480  
 ctcggcttcg aggaagcgc caacacctc gagatcgaag acggctccgc cgattccggc 540  
 aacggcacct ttcacagcga gctgctggtg ccgggacaga cgaatgacgg tgggacgccg 600  
 ctgctttcgt tcgacggccg gtggctgatc gccgacgggt tcacctcac cgcgatcggc 660  
 tacgcctgat aa 672

<210> 3

10 < 211> 153

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> promotor

15 <400> 3

ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtaagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttga 60  
 cactttatgc ttccggctcg tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca ataacaattt 120  
 cacacaggat ctaggaacca aggagagtgg cat 153

ES 2 670 143 T3

<210> 4  
< 211> 34  
< 212>ADN  
< 213> Secuencia Artificial

5 <220>  
< 223> Cebador

<400> 4

ttatgcgact cctgctggct atgggggat ttcc 34

10 <210> 5  
< 211> 29  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia Artificial

<220>  
< 223> Cebador

15 <400> 5

gatcgcatata tgccactctc ctgggtcc 29

20 <210> 6  
< 211> 25  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia Artificial

<220>  
< 223> Cebador

<400> 6

tggcatatga cgatcgaaac ggcgcg 25

25 <210> 7  
< 211> 28  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia Artificial

30 <220>  
< 223> Cebador

<400> 7

tccttctctt acagcaatcc gagcatct 28

35 <210> 8  
< 211> 32  
< 212> ADN  
< 213> Secuencia Artificial

<220>  
< 223> Cebador

# ES 2 670 143 T3

<400> 8

gctgtaagag aaggagtct atcatgatcg ag 32

<210> 9

< 211> 35

5 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 9

10 gcagcctagg ttaattatc aggcgtacgc gatcg 35

<210> 10

< 211> 8047

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>

< 223> Vector

<400> 10

ES 2 670 143 T3

attaacctag gctgctgcca cagctgagca ataactagca taacccttg gggcctctaa	60
acgggtcttg aggggttttt tgctgaaacc tcaggcattt gagaagcaca cggtcacact	120
gcttccggta gtcaataaac cggtaaacca gcaatagaca taagcggcta tttaacgacc	180
ctgccotgaa cagacgaccg ggtcgaattt gctttogaat ttctgccatt catccgctta	240
ttatcactta ttcaggcgta gcaccaggcg tttaaaggca ccaataactg ccttaaaaaa	300
attacgcccc gcctgccac tcatcgcagt actgttgtaa ttcattaagc attctgccga	360
catggaagcc atcacagacg gcatgatgaa cctgaatcgc cagcggcatc agcaccttgt	420
cgccttgcgt ataatatattg cccatagtga aaacgggggc gaagaagttg tccatattgg	480
ccacgtttaa atcaaaactg gtgaaactca cccagggatt ggctgagacg aaaaacatat	540
tctcaataaa ccttttaggg aaataggcca ggttttcacc gtaacacgcc acatcttgcg	600
aatatatgtg tagaaactgc cggaaatcgt cgtggtattc actccagagc gatgaaaacg	660
tttcagtttg ctcatggaaa acgggtgaac aagggtgaac actatcccat atcaccagct	720
caccgtcttt cattgccata cggaaactccg gatgagcatt catcaggcgg gcaagaatgt	780
gaataaaggc cggataaaac ttgtgcttat tttcttttac ggtctttaa aaggccgtaa	840
tatccagctg aacgggtctg ttataggtac attgagcaac tgactgaaat gcctcaaaat	900
gttcttttac atgccattgg gatatatcaa cggtggtata tccagtgatt ttttctcca	960
ttttagcttc cttagctcct gaaaatctcg ataactcaa aaatacggcc ggtagtgatc	1020
ttatttcatt atgggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg atcaacgtct cattttcgcc	1080
aaaagttggc ccagggtctc cgggtatcaa cagggacacc aggatttatt tattctgcga	1140
agtgatcttc cgtcacaggt atttattcgg cgcaaagtgc gtcgggtgat gctgccaaact	1200
tactgattta gtgtatgatg gtgtttttga ggtgctccag tggcttctgt ttctatcagc	1260
tgccctoct gttcagctac tgacggggtg gtgcgtaacg gcaaaagcac cgcgggacat	1320
cagcgctagc ggagtgtata ctggcttact atgttggcac tgatgagggt gtcagtgaag	1380
tgcttcatgt ggcaggagaa aaaaggctgc accgggtcgt cagcagaata tgtgatacag	1440
gatatatcc gcttctcgc tcaactgactc gctacgctcg gtcgttcgac tgcggcgagc	1500

ES 2 670 143 T3

ggaaatggct tacgaacggg gcggagattt cctggaagat gccaggaaga tacttaacag 1560  
 ggaagtgaga gggccgcggc aaagccggtt ttccataggc tccgcccc tgacaagcat 1620  
 cacgaaatct gacgctcaaa tcagtgggtg cgaaaccgga caggactata aagataccag 1680  
 gcgtttcccc tggcggctcc ctctgctgct ctctgttcc tgcctttcgg tttaccggtg 1740  
 tcattccgct gttatggccg cgtttgtctc attccacgcc tgacactcag ttccgggtag 1800  
 gcagttcgct ccaagctgga ctgtatgcac gaaccccccg ttcagtccga ccgctgcgcc 1860  
 ttatccggta actatcgtct tgagtccaac cgggaaagac atgcaaaagc accactggca 1920  
 gcagccactg gtaattgatt tagaggagt agtcttgaag tcatgcccgg gttaaggcta 1980  
 aactgaaagg acaagttttg gtgactgcgc tcctccaagc cagttacctc ggttcaaga 2040  
 gttgtagct cagagaacct tcgaaaaacc gccctgcaag gcggtttttt cgttttcaga 2100  
 gcaagagatt acgcgagac caaaacgac tcaagaagat catcttatta atcagataaa 2160  
 atatttctag atttcagtgc aatttatctc ttcaaagtga gcacctgaag tcagccccat 2220  
 acgatataag ttgtaattct catgttagtc atgccccgcg cccaccggaa ggagctgact 2280  
 ggggtgaagg ctctcaaggg catcggtcga gatcccggtg cctaatgagt gagctaactt 2340  
 acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgct gtgccagctg 2400  
 cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ccagggtggt 2460  
 ttttcttttc accagtgaga cgggcaacag ctgattgccc ttcaccgctt ggccctgaga 2520  
 gagttgcagc aagcgggtcca cgctgggttg ccccagcagg cgaaaatcct gtttgatggt 2580  
 ggttaacggc gggatataac atgagctgct ttccggtatcg tcgtatccca ctaccgagat 2640  
 gtccgcacca acgcgagacc cggactcggg aatggcgcgc attgcgcca gcgccatctg 2700  
 atcgttgcca accagcatcg cagtgggaac gatgcctca ttcagcattt gcatggttg 2760  
 ttgaaaaccg gacatggcac tccagtcgcc ttcccgttcc gctatcggct gaatttgatt 2820  
 gcgagtgaga tatttatgcc agccagccag acgcagacgc gccgagacag aacttaatgg 2880  
 gcccgctaac agcgcgattt gctggtgacc caatgcgacc agatgctcca cgcccagtcg 2940  
 cgtaccgtct tcatgggaga aaataaact gttgatgggt gtctggtcag agacatcaag 3000  
 aaataacgcc ggaacattag tgcaggcagc ttccacagca atggcatcct ggtcatccag 3060  
 cggatagtta atgatcagcc cactgacgcg ttgcgcgaga agattgtgca ccgccgcttt 3120  
 acaggcttcg acgccgcttc gttctacat cgacaccacc acgctggcac ccagttgatc 3180  
 ggcgcgagat ttaatcgccg cgacaatttg cgacggcgcg tgcagggcca gactggaggt 3240  
 ggcaacgcca atcagcaacg actgtttgcc cgccagttgt tgtgccacgc ggttgggaat 3300  
 gtaattcagc tccgccatcg ccgcttcac ttttcccgc gttttcgcag aaacgtggct 3360

ES 2 670 143 T3

ggctggttc accacgctgg aaacggtctg ataagagaca cggcataact ctgcgacatc 3420  
 gtataacggt actggtttca cattcaccac cctgaattga ctctcttccg ggcgctatca 3480  
 tgccataccg cgaaaggttt tgcgccattc gatggtgtcc gggatctcga cgtctccct 3540  
 tatgcgactc ctgctggcta tgggtgggatt tcccttgctg aaatgggaga tccgatcatg 3600  
 ttcgagctct tattcaaata cactgctgtg ttggcggtaa gcgttctcga gcgcgccgcg 3660  
 gcgatcgcac ctggtgttta aacggccggc cctgcaggg gcagtgagcg caacgcaatt 3720  
 aatgtaagtt agctcaactca ttaggcaccc caggcttgac actttatgct tccggctcgt 3780  
 ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa taacaatttc acacaggatc taggaaccaa 3840  
 ggagagtggc atatgacgat cgaaacgctc gaagaccgct tcaaccggcg cattgaccac 3900  
 ttgttcgaaa ccgaccgca gttccgccc gcccgcccg acgagggcga cagcgcggct 3960  
 gccgccgac cggagttagc ccttctgccc gcggctcaaac agattctggc cggctatgcg 4020  
 gaccgccctg cgtcggcaa gcgcccgtc gagttcgtca ccgacgaaga aggccgacc 4080  
 acccgaagc tctgccccg cttcgacacc atcacctacc gtcagctcgc aggccggtc 4140  
 caggccgtga ccaatgcctg gcacaacat ccggtgaatg ccggtgaccg cgtggccatc 4200  
 ctgggtttca ccagtgtcga ctacacgacg atcgacatcg cctgctcga actcggcgcc 4260  
 gtgtccgtac cgtgcagac cagtgcgccg gtggcccaac tgcagccgat cgtcgcgag 4320  
 accgagccca aggtgatcgc gtcgagcgtc gacttctcgc ccgacgcagt cgtctcgtc 4380  
 gagtccgggc ccgcccgtc gcgactggtg gtgttcgact acagccacga ggtcagcgt 4440  
 cagcgtgagg cgttcgaggc ggccaagggc aagctcgcag gcaccggcgt cgtcgtcag 4500  
 acgatcaccg acgtaactgga ccgcccggcg tcaactcgcg acgcaccgct ctacgtgcc 4560  
 gacgagaccg acccgtgac cttctcacc tacacctccg gcagcaccgg cactcccaag 4620  
 ggcgcatgt accccgagtc caagaccgcc acgatgtggc aggcggggtc caaggcccgg 4680  
 tgggacgaga ccctcggcgt gatgcccga atcacctga acttcatgcc catgagtcac 4740  
 gtcattgggc gcggcatcct gtgcagcaca ctgccagcg gcggaaccgc gtacttccc 4800  
 gcacgcagcg acctgtccac cttctggag gacctcggc tcgtgcggcc cacgcagctc 4860  
 aactcgttc ctgcacatct ggacatgctg ttccaggagt accagagccg cctcgacaac 4920  
 cgcgcgccc agggatccga ggaccgagcc gaagccgag tctcgaaga ggtccgcacc 4980  
 caactgctcg gcggcgatt cgtttcggcc ctgaccgat cggctcccat ctggcgag 5040  
 atgaagagct gggtcgagga cctgctcag atgcacatgc tggagggcta cggctccacc 5100  
 gagccggcg cgggtttcat cgacgggag atccagcgc ccgggtcat cgactacaag 5160  
 ctggtcagc tgcctgatct cggctacttc gccacggacc ggccctacc gcgcgggaa 5220  
 cttctggtca agtccgagca gatgttccc ggctactaca agcgtccgga gatcaccgcc 5280

ES 2 670 143 T3

gagatgttcg acgaggacgg gtactaccgc accggcgaca tcgtcgccga gctcgggcc 5340  
gaccatctcg aatacctcga ccgcccgaac aacgtgctga aactgtcgca gggcgaattc 5400  
gtcacggtct ccaagctgga ggcggtgttc ggcgacagcc ccctggtacg ccagatctac 5460  
gtctacggca acagcgcgcg gtctatctg ctggcggtcg tggccccgac cgaagaggca 5520  
ctgtcacggt gggacggtga cgaactcaag tcgcgcatca gcgactcact gcaggacgcg 5580  
gcacgagccg ccgattgca gtctatgag atccccgctg acttcctcgt cgagacaaca 5640  
cctttcacgc tggagaacgg cctgctgacc ggtatccgca agctggcccg gccgaaactg 5700  
aaggcgcaact acggcgaacg cctcgaacag ctctacaccg acctggccga ggggcaggcc 5760  
aacgagttgc gcgagttgcg ccgcaacgga gccgaccggc ccgtggtcga gaccgtcagc 5820  
cgcgcccggg tcgcaactgct cgggtgcctcc gtcacggatc tgcggtccga tgcgcacttc 5880  
accgatctgg gtggagattc gttgtcggcc ttgagcttct cgaacctggt gcacgagatc 5940  
ttcgatgtcg acgtgccggg cggcgtcatc gtcagcccgg ccaccgacct ggcaggcgtc 6000  
gcggcctaca tcgagggcga actgcgcggc tccaagcggc ccacatacgc gtcggtgcac 6060  
gggcgcgacg ccaccgaggt gcgcgcgct gatctcgccc tgggcaagt catcgacgcc 6120  
aagaccctgt ccgcccggc gggctcgccg cgttcgggca ccgagatccg caccgtgctg 6180  
ctgaccggcg ccaccgggtt cctgggcccgc tatctggcgc tggaatggct ggagcgcag 6240  
gacctggtgg acggcaaggt gatctgcctg gtgcgcgccc gcagcgacga cgaggcccgg 6300  
gcgctctggt acgccacggt cgacaccggg gacgcgacac tgctcgagca ctaccgcgcg 6360  
ctggcagccc atcacctcga ggtgatcgcc ggtgacaagg gcgaggccga tctgggtctc 6420  
gaccacgaca cgtggcagcg actggccgac accgtcgatc tgatcgtcga tccggcccgc 6480  
ctggtcaatc acgtcctgcc gtacagccag atgttcggac ccaatgcgct cggcaccgcc 6540  
gaactcatcc ggatcgcgct gaccaccacg atcaagccgt acgtgtacgt ctcgacgatc 6600  
gggtgtgggac agggcatctc ccccaggcg ttcgtcgagg acgcccacat ccgcgagatc 6660  
agcgcgacgc gccgggtcga cgactcgtac gccaacggct acggcaacag caagtgggcc 6720  
ggcgaggtcc tgetgcggga ggcgcacgac tgggtgtggtc tgcccgtctc ggtgttccgc 6780  
tgcgacatga tcctggccga cacgacctac tcgggtcagc tgaacctgcc ggacatgttc 6840  
acccgcctga tgetgagcct cgtggcgacc ggcacgcgc ccggttcggt ctacgaactc 6900  
gatgcgggac gcaaccggca gcgcgcccac tacgacgggc tgcccgtgga gttcatcgcc 6960  
gaggcgatct ccaccatcgg ctgcgaggtc accgacggat tcgagacggt ccacgtgatg 7020  
aaccgctacg acgacggcat cggcctcgac gagtacgtgg actggctgat cgaggcccggc 7080  
taccocgtgc accgcgtcga cgactacgcc acctggctga gccggttcga aaccgcactg 7140

ES 2 670 143 T3

cgggcccctgc cggaacggca acgtcaggcc tcgctgctgc cgctgctgca caactatcag 7200  
 cagccctcac cgcccggtg cggtgccatg gcacccaccg accggttccg tgccgcggtg 7260  
 caggacgcga agatcggccc cgacaaggac attccgcacg tcacggccga cgtgatcgtc 7320  
 aagtacatca gcaacctgca gatgctcggga ttgctgtaag agaaggagt ctatcatgat 7380  
 cgagacaatt ttgcctgctg gtgtcagtc ggctgagctg ctggagtatc cggaggacct 7440  
 gaaggcgcac ccggcgggag agcatctcat cgcgaagtgc gtggagaagc ggcgccggga 7500  
 cttcatcggg gccaggcatt gtgcccggt ggctggtgct gagctcggcg agccgccggt 7560  
 ggcgatcggc aaaggggagc ggggtgcgcc gatctggccg cgcggcgtcg tcggcagcct 7620  
 caccattgc gacggatcgc gggccgcggc ggtggcgcac aagatgcgct tccgttcgat 7680  
 cggcatcgat gccgagccgc acgcgacgct gccgaaggc gtgctggatt cggtcagcct 7740  
 gccgccggag cgggagtggc tgaagaccac cgattccgca ctgcacctg accgtttact 7800  
 gttctgcgcc aaggaagcca cctacaaggc gtggtggccg ctgaccgcgc gctggtcgg 7860  
 cttcagaggaa gcgcacatca ccttcgagat cgaagcggc tccgccgatt ccggcaacgg 7920  
 cacctttcac agcagactgc tgggtgccgg acagacgaat gacggtgga cgcctgctg 7980  
 ttcgttcgac ggcgggtggc tgatcggcga cgggttcac ctcaccgca tcgcgtacgc 8040  
 ctgataa 8047

<210> 11  
 <211> 1137  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus subtilis

5

<400> 11

atgatcatag gggttcctaa agagataaaa aacaatgaaa accgtgtcgc attaaccccc 60  
 gggggcgttt ctcagctcat ttcaaaggc caccgggtgc tggttgaaac aggcgcgggc 120  
 cttggaagcg gatttgaaaa tgaagcctat gagtacgag gagcggaaat cattgctgat 180  
 ccgaagcagg tctgggacgc cgaaatggtc atgaaagtaa aagaaccgct gccggaagaa 240  
 tatgtttatt ttcgcaaagg acttgtgctg tttacgtacc ttcatttagc agctgagcct 300  
 gagctgcac aggccttgaa ggataaagga gtaactgccca tcgcatatga aacggtcagt 360  
 gaaggccgga cattgcctct tctgacgccca atgtcagagg ttgcgggag aatggcagcg 420  
 caaatcggcg ctcaattctt agaaaagcct aaaggcggaa aaggcattct gcttgccggg 480  
 gtgcctggcg tttccgcggc aaaagtaaca attatcggag gaggcgttgt cgggacaaac 540  
 gcggcgaaaa tgctgtcgg cctcgggtgca gatgtgacga tcattgactt aaacgcagac 600  
 cgcttgccgc agcttgatga catcttcggc catcagatta aaacgttaat ttctaaccg 660  
 gtcaatattg ctgatgctgt ggcggaagcg gatctcctca tttgcgcggt attaattccg 720

ES 2 670 143 T3

ggtgctaaag ctccgactct tgtcactgag gaaatggtaa aacaaatgaa acccggttca 780  
 gttattgttg atgtagcgat cgaccaaggc ggcacgcgac aaactgtcga ccatatcaca 840  
 acacatgata agccaacata tgaaaaacac ggggttgtgc attatgctgt agcgaacatg 900  
 ccaggcgcag tccctcgtac atcaacaatc gccctgacta acggttactgt tccatacgcg 960  
 ctgcaaatac cgaacaaagg ggcagtaaaa gcgctcgcag acaatacggc actgagagcg 1020  
 ggtttaaaca ccgcaaacgg acacgtgacc tatgaagctg tagcaagaga tctaggctat 1080  
 gagtatgttc ctgccgagaa agctttacag gatgaatcat ctgtggcggg tgcttaa 1137

<210> 12

< 211> 1380

5 < 212> ADN

< 213> Chromobacterium violaceum

<400> 12

atgcagaaac agcgtaccac ctctcagtgg cgtgaactcg atgcggcgca tcctctccat 60  
 ccgtttaccg ataccgcgag cctcaatcag gcgggtgcgc gtgtgatgac ccgtggcgaa 120  
 ggcgtgtatc tctgggatag cgaaggcaac aaaattattg atggcatggc gggcctctgg 180  
 tgcgtgaacg tgggctatgg ccgtaaagat tttgcggaag cggcgcgctc tcagatggaa 240  
 gaactccgtt tttataacac cttctttaa accaccatc cggcgggtgt ggaactcagc 300  
 agcctcctcg ccgaagttac cccggcaggt tttgatcgtg tgttttatac caacagcggc 360  
 agcgaagcgg tggataccat gattcgtatg gtgcgctcgt attgggatgt gcagggcaaa 420  
 ccggaaaaaa aaaccctcat tggccgttgg aacggctatc acggcagcac cattggcggg 480  
 gcgagcctcg gcggcatgaa atatatgcat gaacagggcg atctcccgat tccgggcatg 540  
 gcgcatattg aacagccgtg gtggtataaa catggcaaag atatgacccc ggatgaattt 600  
 ggcgtggttg cggcgcggtg gctcgaagaa aaaattctcg aaatcggcgc ggataaagtg 660  
 gcggcgtttg tgggcaacc gattcagggg gcggcgggtg tgattgttcc gccggcaacc 720  
 tattggccgg aaattgaacg tatttgccgc aaatatgatg tgctcctcgt tgcggatgaa 780  
 gtgatttgcg gctttggccg taccggcgaa tggtttgcc atcagcattt tggctttcag 840  
 ccggacctct ttaccgcggc gaaaggcctc agcagcggct atctcccgat tggcgcgggtg 900  
 tttgtgggca aacgtgttgc ggaaggtctc attgcgggcg gtgattttaa ccatggcttt 960  
 acctatagcg gccatccggt gtgtgcggcg gtggcgcgat cgaatgttgc ggcgctccgt 1020  
 gatgaaagca ttgtgcagcg tgtgaaagat gatattggcc cgtatatgca gaaacgttgg 1080  
 cgtgaaacct ttagccggtt tgaacatgtg gatgatgtgc gtggcgtggg catggtgcag 1140  
 gcgtttaccg tcgtgaaaaa caaagcgaac cgtgaactct ttccggattt tggcgaattt 1200  
 ggcaccctct gccgcgatat ttttttcgc aacaacctca ttatgcgtgc gtgcggcgat 1260

ES 2 670 143 T3

cacattgtgt ctgcaccgcc gctcgttatg acccgtgagg aagtggatga aatgctcgcc 1320

gtggcggaac gttgcctcga agaatttgaa cagaccctca aagcgcgtgg cctcgcctaa 1380

<210> 13

< 211> 24

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Cebador

<400> 13

atgatcatag gggttcctaa agag 24

10 <210> 14

< 211> 20

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> Cebador

<400> 14

ttaagcacc gccacagatg 20

<210> 15

< 211> 6866

20 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Vector

<400> 15

# ES 2 670 143 T3

atgatcatag gggttcctaa agagataaaa aacaatgaaa accgtgtcgc attaacaccc	60
gggggcgttt ctcagctcat ttcaaacggc caccgggtgc tggttgaaac aggcgcgggc	120
cttgaagcg gatttgaaaa tgaagcctat gagtcagcag gagcggaat cattgctgat	180
ccgaagcagg tctgggacgc cgaaatggtc atgaaagtaa aagaaccgct gccggaagaa	240
tatgtttatt ttcgcaaagg acttgtgctg tttacgtacc ttcatttagc agctgagcct	300
gagcttgcac aggccttgaa ggataaagga gtaactgcc aacggtcagt	360
gaagcccgga cattgcctct tctgacgcca atgtcagagg ttgcgggcag aatggcagcg	420
caaatcggcg ctcaattctt agaaaagcct aaaggcggaa aaggcattct gcttgccggg	480
gtgcctggcg tttcccgcgg aaaagtaaca attatcggag gaggcggtgt cgggacaaac	540
gcggcgaaaa tggctgtcgg cctcgggtgca gatgtgacga tcattgactt aaacgcagac	600
cgcttgccgc agcttgatga catcttcggc catcagatta aaacgttaat ttctaaccg	660
gtcaatattg ctgatgctgt ggcggaagcg gatctcctca tttgcgcggt attaattccg	720
ggtgctaaag ctccgactct tgtcactgag gaaatggtaa aacaaatgaa acccggttca	780

ES 2 670 143 T3

gttattgttg atgtagcgat cgaccaaggc ggcacgtcgc aaactgtcga ccatatcaca 840  
 acacatgatc agccaacata tgaaaaacac ggggttgtgc attatgctgt agcgaacatg 900  
 ccaggcgcag tccctcgtac atcaacaatc gccctgacta acgttactgt tccatacgcg 960  
 ctgcaaatcg cgaacaaaag ggcagtaaaa gcgctcgcag acaatacggc actgagagcg 1020  
 ggtttaaaca ccgcaaacgg acacgtgacc tatgaagctg tagcaagaga tctaggctat 1080  
 gagtatgttc ctgccgagaa agctttacag gatgaatcat ctgtggcggg tgcttaatta 1140  
 aggagatata atatgcagaa acagcgtacc acctctcagt ggcgtgaact cgatgcggcg 1200  
 catcatctcc atccgtttac cgataccgcg agcctcaatc aggcgggtgc gcgtgtgatg 1260  
 acccgtggcg aaggcgtgta tctctgggat agcgaaggca acaaaattat tgatggcatg 1320  
 gcgggcctct ggtgctgtaa cgtgggctat ggccgtaaaag attttgcgga agcggcgcgt 1380  
 cgtcagatgg aagaactccc gttttataac accttcttta aaaccacca tccggcggtg 1440  
 gtggaactca gcagcctcct cgccgaagtt acccggcag gttttgatcg tgtgttttat 1500  
 accaacagcg gcagcgaag cgtggatacc atgattcgtg tggcgcgtcg ttattgggat 1560  
 gtgcagggca aaccggaaaa aaaaaccctc attggccgtt ggaacggcta tcacggcagc 1620  
 accattggcg gtgcgagcct cggcggcatg aatatatgc atgaacaggg cgatctcccg 1680  
 attccgggca tggcgcatat tgaacagccg tgggtgtata aacatggcaa agatatgacc 1740  
 ccggtgaat ttggcgtggt tgccgcgcgt tggctcgaag aaaaaattct cgaaatcggc 1800  
 gcggataaag tggcggcgtt tgtgggcgaa ccgattcagg gtgcgggcgg tgtgattggt 1860  
 ccgccggcaa cctattggcc ggaaattgaa cgtatttgcc gcaaatatga tgtgctcctc 1920  
 gttgcggatg aagtgattg cggctttggc cgtaccggcg aatggtttg ccatcagcat 1980  
 tttgctttc agccggacct ctttaccgcg gcgaaaggcc tcagcagcgg ctatctcccg 2040  
 attggcgcgg tgtttgtggg caaacgtggt gcggaaggtc tcattgcggg cggtgathtt 2100  
 aacctggct ttacctatag cggccatccg gtgtgtgcgg cggtggcgca tgcgaatggt 2160  
 gcggcgcctc gtgatgaag cattgtgcag cgtgtgaaag atgatattgg cccgtatatg 2220  
 cagaaacggt ggcgtgaaac ctttagccgt tttgaacatg tggatgatgt gcgtggcgtg 2280  
 ggcattggtc aggcgtttac cctcgtgaaa aacaaagcga aacgtgaact ctttccggat 2340  
 tttggcgaat ttggcaccct ctgccgcgat atttttttc gcaacaacct cattatgcgt 2400  
 gcgtgcggcg atcacattgt gtctgcaccg ccgctcgtta tgaccctgc ggaagtggat 2460  
 gaaatgctcg ccgtggcgga acgttgctc gaagaatttg aacagaccct caaagcgcgt 2520  
 ggcctcgcct aataatctag atcaacaact ctctggcgc accatcgtcg gctacagcct 2580  
 cgggaattgc tgcaagtcga cggatcgcg gaattaattc tcatgtttga cagcttatca 2640

ES 2 670 143 T3

ctgatcagtg aattaatggc gatgacgcat cctcacgata atatccgggt aggcgcaatc 2700  
actttcgtct ctactccggt acaaagcgag gctgggtatt tcccggcctt tttgggcccg 2760  
ccggatcccc ccacttcaga agttcctata cactagagaa taggaacttc actatagagt 2820  
cgaataaggg cgacaccccc taattagccc gggcgaaaagg cccagtcttt cgactgagcc 2880  
tttcgtttta tttgatgcct ggcagttccc tactctcgca tggggagtcc ccacactacc 2940  
atcggcgcta cggcgtttca ctctcagtt cggcatgggg tcaggtggga ccaccgcgct 3000  
actgccgcca ggcaaaacaag ggggtgtatg agccatattc aggtataaat gggctcgcga 3060  
taatgttcag aattggtaa ttggttgtaa cactgacccc tatttgttta tttttctaaa 3120  
tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt 3180  
gaaaaaggaa gaatatgagc catattcaac gggaaacgtc gaggccgcga ttaaattcca 3240  
acatggatgc tgatttatat gggataaat gggctcgcga taatgtcggg caatcaggtg 3300  
cgacaatcta tcgcttgat gggagcccc atgcgccaga gttgtttctg aaacatggca 3360  
aaggtagcgt tgccaatgat gttacagatg agatggtcag actaaactgg ctgacggaat 3420  
ttatgccact tccgaccatc aagcatttta tccgtactcc tgatgatgca tggttactca 3480  
ccactcggat ccccgaaaa acagcgttcc aggtattaga agaatatcct gattcaggtg 3540  
aaaaatattg tgatgcgctg gcagtgttcc tgcgccggtt gcaactcgatt cctgtttga 3600  
attgtccttt taacagcgat cgcgtatttc gcctcgtca ggcgcaatca cgaatgaata 3660  
acggtttggt tgatgcgagt gatthtgatg acgagcgtaa tggctggcct gttgaacaag 3720  
tctgaaaga aatgcataaa cttttgccat tctcacggga ttcagtcgtc actcatggtg 3780  
attctcact tgataacctt atthttgacg aggggaaatt aataggttgt attgatgttg 3840  
gacgagtcgg aatcgcagac cgataccagg atottgccat cctatggaac tgcctcggtg 3900  
agttttctcc ttcattacag aaacggcttt ttcaaaaata tggattgat aatcctgata 3960  
tgaataaatt gcagtttcat ttgatgctcg atgagtttt ctaaaagcgg cgcgccatcg 4020  
aatggcgcaa aacctttcgc ggtatggcat gatagcggc ggaagagagt caattcaggg 4080  
tggtagaatat gaaaccagta acgttatagc atgtcgcaga gtatgccggt gtctcttctc 4140  
agaccgtttc ccgctgggtg aaccaggcca gccacgtttc tgcgaaaacg cgggaaaaag 4200  
tggaaagcggc gatggcggag ctgaattaca ttcccacccg cgtggcacia caactggcgg 4260  
gcaaacagtc gttgctgatt ggcgttgcca cctccagtct ggccctgca cgcgcgtcgc 4320  
aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcgccg atcaactggg tgcagcgtg gtggtgtcga 4380  
tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta aagcggcggg gcacaatctt ctgcgcgaac 4440  
gcgtcagtg gctgatcatt aactatccgc tggatgacca ggatgccatt gctgtggaag 4500  
ctgcctgcac taatgttccg gcgttatttc ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca 4560

ES 2 670 143 T3

gtattatfff ctcccatgag gacggtacgc gactgggctg ggagcatctg gtcgcattgg 4620  
gtcaccagca aatcgcgctg ttagcgggcc cattaagttc tgtctcggcg cgtctgcgtc 4680  
tggctggctg gcataaatat ctcaactcga atcaaattca gccgatagcg gaacgggaag 4740  
gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac aaacatgca aatgctgaat gagggcatcg 4800  
ttcccactgc gatgctgggt gccaacgatc agatggcgct gggcgcaatg cgcgccatta 4860  
ccgagtccgg gctgcgcgtt ggtgcggata tctcggtagt gggatacgac gataccgaag 4920  
atagctcatg ttatatcccg ccgttaacca ccatcaaaac ggattttcgc ctgctggggc 4980  
aaaccagcgt ggaccgctg ctgcaactct ctcagggcca ggcggtgaag ggcaatcagc 5040  
tgttgccagt ctcaactggtg aaaagaaaaa ccaccctggc gcccaatacg caaacccct 5100  
ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa 5160  
gcgggcagtg actcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt acgcgcgcgt cgttccactg 5220  
agcgtcagac ccgtagaaa agatcaaagg atcttctga gatccttttt ttctgcgcgt 5280  
aatctgctgc ttgcaaaaca aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 5340  
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 5400  
tgttcttcta gtgtagccgt agttagccca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 5460  
atacctcgtc ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 5520  
taccggggtg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg 5580  
gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatacctaca 5640  
gcgtagagta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 5700  
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 5760  
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 5820  
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 5880  
cttttctgg ctttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 5940  
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgcg agccgaacga ccgagcgcag 6000  
cgagtcagtg agcgaggaag cggaaggcga gagtagggaa ctgccaggca tcaaaactaag 6060  
cagaaggccc ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actctttctg tgttgtaaaa 6120  
cgacggccag tcttaagctc gggccccctg ggcggttctg ataacgagta atcgtaatc 6180  
cgcaataaac gtaaaaaccc gcttcggcgg gttttttat ggggggagtt tagggaaaga 6240  
gcatttgca gaatatttaa gggcgcctgt cactttgctt gatatatgag aattatttaa 6300  
ccttataaat gagaaaaaag caacgcactt taataagat acgttgcttt ttcgattgat 6360  
gaacacctat aattaaacta ttcactatatt atttatgatt ttttgatat acaatattc 6420

ES 2 670 143 T3

tagtttgta aagagaatta agaaaataaa tctcgaaaat aataaaggga aaatcagttt 6480  
 ttgatataca aattatacat gtcaacgata atacaaaata taatacaaac tataagatgt 6540  
 tatcagtatt tattatgcat ttagaataaa ttttgtgtcg cccttattcg actcactata 6600  
 gaagttccta ttctctagta agtataggaa cttcacttca ttttggatcc ggccggcctg 6660  
 cagccccgca gggcctgtct cggtcgatca ttcagcccgg ctcatagata tgcgggcagt 6720  
 gagcgcaacg caattaatgt aagttagctc actcattagg caccocaggc ttgacacttt 6780  
 atgcttccgg ctcgataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaataaca atttcacaca 6840  
 ggatctagga accaaggaga gtggca 6866

<210> 16  
 < 211> 1857  
 < 212> ADN  
 < 213> Oryza sativa

5

<400> 16

atgggttctg gtctgttcaa gccgcgtgtt caccocgatc tgcgtgacgt tttctctaaa 60  
 atgtctttct tcgacaaaat cggtttcctg ttcattccacg cgttcgacaa acgtaacctg 120  
 tggcacaaaag ttccggttcc gatcgggtctg ctgtacctga acaccocgtcg taccctgctg 180  
 gaaaaataca atctgctggc cgttgggtcgt tcttctcacc gtgcgctgtt cgacccaaaa 240  
 gaattcctgt accgtaccga agatggtaaa tacaatgacc cgcacaacgc ggaagccggc 300  
 tctcaaaaaca ccttctttgg tcgcaacatg gagccggttg accagcagga cgaactgatg 360  
 tctccggacc cgttcggtgt tgcgacaaa ctgctggcgc gtctggaata caaagacacc 420  
 ggcaaacagt tcaacatcct ggccgcagcg tggatccagt tcatggttca cgattggatg 480  
 gaccacatgg aggacaccgg tcaaattggt atcaccocgc cgaagaagt tgcgaacgaa 540  
 tgccocgtga aatctttcaa attccaccoc acgaaagaac tgccgaccaa ctctgacggt 600  
 atcaaaaatcg gtcactacaa catccgtacc gcgtggtggg acggttctgc ggtttacggt 660  
 aacaatgaag aacgtgcgga aaaactgcgt acctacgttg acggtaaact ggttatcgggt 720  
 gatgacggtc tgtgctgca caaagaaaac ggtgttgcgc tgtctggtga catccgcaac 780  
 tcttggcggg gcgtttctat cctgcaggct ctgttcgta aagaacacaa cgcggtttgc 840  
 gacgcgatca aggaagaaca cccgaacctg tctgacgaag aactgtaccg ttacgcgaaa 900  
 ctggttacct ctgcggttat cgcgaaagt cacaccatcg actggaccgt tgaactgctg 960  
 aagaccacaaa ccatgcgtgc ggccgatgcgt gcgaaactgg acggcctgct gggtaaaaaa 1020  
 atcaaaagaca cctttggcca catcgggtgt cccgatcctgg gtggtctggt tggctctgaaa 1080  
 aaaccaaaaca accacgggtg tccgtactct ctgactgaag aattcacctc tgtgtatcgt 1140  
 atgactctc tgatccgcgc taccctgaaa ctgcgtgacc cgaccgggtca gccggacgcg 1200

ES 2 670 143 T3

aataactctc cgccgtgcct ggaagacatc gacatcggtg agatgatcgg tctgaaaggt 1260  
 gaggaacagc tgtctaaaat tggcttcgaa aaacaggcgc tgtctatggg ttaccaggcg 1320  
 tgtggtgccc tggaaactgtg gaactaccgg tctttcttcc gtaacctgat cccacagaac 1380  
 ctggacggta ccaatcgttc tgaccgtatc gacctggcgg cgctggaagt ttatcgtgac 1440  
 cgtgaacggt ctgttcgcgc ttacaacgaa ttccgtcgtc gtctgttcct gatcccgatc 1500  
 aatcttggg aagacctgac ctctgacaaa gacgcgattg aaacctccg tgcgatctac 1560  
 ggtgacgacg ttgaaaaact ggacctgctg gttggtctga tggcggaaaa gaaaatcaaa 1620  
 ggcttcgcga tctctgaaac cgcgttcaac atcttcatcc tgatggcttc tcgtcgtctg 1680  
 gaagcggacc gtttcttcac ctccaacttc aacgaagaga cgtacaccaa aaaaggtatg 1740  
 cagtgggtta aaaccaccga aggtctgcgc gacgttatca accgtcacta tccggaatc 1800  
 accgcgaaat ggatgaaatc ttcttctgcg ttctctggtt gggacgcgga ctactag 1857

<210> 17  
 < 211> 5704  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 < 223> vector

<400> 17

ctagcgtgct gccaccgctg agcaataact agcataacc cttggggcct ctaaaccggg 60  
 cttgaggggt tttttgctga aacctcaggc atttgagaag cacacggcca cactgcttcc 120  
 ggtagtcaat aaaccggtaa accagcaata gacataagcg gctatttaac gaccctgccc 180  
 tgaaccgacg accgggtcga atttgcttcc gaatttctgc cattcatccg ottattatca 240  
 cttattcagg cgtagcacca ggcgtttaag ggcaccaata actgccttaa aaaaattacg 300  
 ccccgccctg ccaactcatcg cagtactggt gtaattcatt aagcattctg cgcacatgga 360  
 agccatcaca gacggcatga tgaacctgaa tcgccagcgg catcagcacc ttgtcgcctt 420  
 gcgtataata tttgccata gtgaaaacgg gggcgaagaa gttgtccata ttggccacgt 480  
 ttaaatcaaa actggtgaaa ctcaccaggc gattggctga gacgaaaaac atattctcaa 540  
 taaacccttt agggaaatag gccaggtttt caccgtaaca cgccacatct tgccaatata 600  
 tgtgtagaaa ctgccgaaa tcgtcgtggt attcactcca gagcgtgaa aacgtttcag 660  
 tttgctcatg gaaaacgggt taacaagggt gaacactatc ccatatcacc agctcaccgt 720  
 ctttcattgc catacggaac tccggatgag cattcatcag gcgggcaaga atgtgaataa 780  
 aggccggata aaacttgtgc ttatcttctt ttacggtctt taaaaggcc gtaatatcca 840  
 gctgaacggg ctggttatag gtacattgag caactgactg aaatgcctca aaatgttctt 900  
 tacgatgcca ttgggatata tcaacgggtg tatatccagt gatttttttc tccattttag 960

10

ES 2 670 143 T3

cttccttagc	tctgaaaat	ctcgataact	caaaaaatac	gcccggtagt	gatcttattt	1020
cattatggtg	aaagttgga	cctcttacgt	gccgatcaac	gtctcatttt	cgccaaaagt	1080
tggcccaggg	cttcccggta	tcaacagggg	caccaggatt	tatttattct	gcgaagtgat	1140
cttccgtcac	aggtatttat	tcggcgcaaa	gtgcgtcggg	tgatgctgcc	aacttactga	1200
tttagtgtat	gatggtgttt	ttgaggtgct	ccagtggctt	ctgtttctat	cagctgtccc	1260
tcctgttcag	ctactgacgg	gggtgtgctg	aacggcaaaa	gcaccgccgg	acatcagcgc	1320
tagcggagtg	tatactggct	tactatgttg	gcaactgatga	gggtgtcagt	gaagtgcttc	1380
atgtggcagg	agaaaaaagg	ctgcaccggg	gcgtcagcag	aatatgtgat	acaggatata	1440
ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgtctacg	ctcggtcggt	cgactgcggc	gagcggaaat	1500
ggcttacgaa	cggggcggag	atttctctgga	agatgccagg	aagatactta	acagggaagt	1560
gagagggccg	cggcaaaagg	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacaa	gcatcacgaa	1620
atctgacgct	caaatcagtg	gtggcgaaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	1680
cccctggcgg	ctccctcgtg	cgctctcctg	ttcctgcctt	tcggtttacc	ggtgtcattc	1740
cgctgttatg	gccgcgtttg	tctcattcca	cgctgacac	tcagttccgg	gtaggcagtt	1800
cgctccaagc	tggactgtat	gcacgaacct	cccgttcagt	ccgaccgctg	cgcttatcc	1860
ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccgggaa	agacatgcaa	aagcaccact	ggcagcagcc	1920
actggttaatt	gatttagagg	agttagtctt	gaagtcatgc	gccggttaag	gctaaactga	1980
aaggacaagt	tttgggtgact	gcgctcctcc	aagccagtta	cctcggttca	aagagttggt	2040
agctcagaga	accttcgaaa	aaccgccttg	caaggcgggt	ttttcgtttt	cagagcaaga	2100
gattacgcgc	agacaaaaac	gatctcaaga	agatcatctt	attaatcaga	taaaatattt	2160
ctagatttca	gtgcaattta	tctcttcaaa	tgtagcacct	gaagtcagcc	ccatacgata	2220
taagttgtaa	ttctcatggt	agtcatgccc	cgccccacc	ggaaggagct	gactgggttg	2280
aaggctctca	agggcatcgg	tcgagatccc	ggtgcctaata	gagtgagcta	acttacatta	2340
attgcgttgc	gctcactgcc	cgctttccag	tcgggaaacc	tgtcgtgcca	gctgcattaa	2400
tgaatcggcc	aacgcgcggg	gagagcggtg	ttgcgtattg	ggcgcaggg	tggttttct	2460
tttaccagtg	gagacgggca	acagctgatt	gcccttcacc	gcctggccct	gagagagttg	2520
cagcaagcgg	tccacgctgg	tttgcctcag	caggcgaaaa	tcctgtttga	tgggtggttaa	2580
cggcgggata	taacatgagc	tgtcttcggg	atcgtcgtat	cccactaccg	agatgtccgc	2640
accaacgcgc	agcccggact	cggtaatggc	gcgcattgcg	cccagcgcca	tctgatcgtt	2700
ggcaaccagc	atcgcagtg	gaacgatgcc	ctcattcagc	atttgcagtg	tttgttga	2760
accggacatg	gcaactccagt	cgcttcccg	ttccgctatc	ggctgaattt	gattgcgagt	2820

ES 2 670 143 T3

gagatattta tgccagccag ccagacgcag acgcgccgag acagaactta atgggccccg 2880  
taacagcgcg atttgctggt gacccaatgc gaccagatgc tccacgccc a gtccggtacc 2940  
gtcttcatgg gagaaaataa tactgttgat ggggtgtctgg tcagagacat caagaaataa 3000  
cgccggaaca ttagtgccag cagcttccac agcaatggca tcctggteat ccagcggata 3060  
gttaatgatc agcccactga cgcgttgccg gagaagattg tgcaccgccg ctttacaggc 3120  
ttcgacgccg cttcgttcta ccatcgacac caccacgctg gcacccagtt gatcggcgcg 3180  
agatttaatc gccgcgacaa tttgcgacgg cgcgtgcagg gccagactgg aggtggcaac 3240  
gccaatcagc aacgactggt tgcccgccag ttggttgccc acgcggttgg gaatgtaatt 3300  
cagctccgcc atcgcgcgtt ccactttttc ccgcgttttc gcagaaacgt ggctggcctg 3360  
gttcaccacg cgggaaacgg tctgataaga gacaccggca tactctgcga catcgtataa 3420  
cgttactggt ttcacattca ccacctgaa ttgactctct tccgggcgct atcatgccat 3480  
accgcgaaag gttttgcgcc attcgatggt gtccgggatc tcgacgctct cccttatgcg 3540  
actcctgctg gctatgggtg gatttccctt gctgaaatgg gagatccgat catgttcgag 3600  
ctcttattca aatacactgc tgtgttgccg gtaagcgttc tcgagcgcgg ccgcgcgatc 3660  
gcacctgggt tttaaaacgg cggcccctgc aggggcagtg agcgcacgc aattaatgta 3720  
agttagctca ctcattaggc accccaggct tgacacttta tgcttccggc tcgtataatg 3780  
tgtggaattg tgagcggata acaataacaa tttcacacag gatctaggaa ccaaggagag 3840  
tggcatatgg gttctggtct gttcaagccg cgtgttcacc cggatctgcg tgacgttttc 3900  
tctaaaatgt ctttcttcca caaaatcggg ttctcttcca tccacgcgtt cgacaaacgt 3960  
aacctgtggc acaaagtctc gggtccgatc ggtctgctgt acctgaacac ccgtcgtacc 4020  
ctgctggaaa aatacaatct gctggccggt ggtcgttctt ctcacggtgc gctgttcgac 4080  
ccaaaagaat tcctgtaccg taccgaagat ggtaaataca atgaccgcga caacgcggaa 4140  
gccggctctc aaaacacctt ctttggtcgc aacatggagc cggttgacca gcaggacgaa 4200  
ctgatgtctc cggaccctgt cgttgttgcg accaaaactgc tggcgcgtcg tgaatacaaa 4260  
gacaccggca aacagttcaa catcctggcg gcagcgtgga tccagttcat ggttcacgat 4320  
tggatggacc acatggagga caccggtcaa attggtatca ccgcgccgaa agaagttgcg 4380  
aacgaatgcc cgctgaaatc tttcaaattc caccgcagca aagaactgcc gaccaactct 4440  
gacggtatca aaatcgggtc ctacaacatc cgtaccgcgt ggtgggacgg ttctgcggtt 4500  
tacggttaaca atgaagaacg tgccgaaaaa ctgcgtacct acgttgacgg taaactggtt 4560  
atcggtgatg acggtctgct gctgcacaaa gaaaacggtg ttgcgctgct tggtgacatc 4620  
cgcaactctt gggcgggctt ttctatcctg caggctctgt tcgttaaaga acacaacgcg 4680  
gtttgcgacg cgatcaagga agaaccccc aacctgtctg acgaagaact gtaccgttac 4740

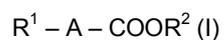
ES 2 670 143 T3

gcgaaactgg ttacctctgc ggttatcgcg aaagttcaca ccatcgactg gaccggtgaa	4800
ctgctgaaga ccaaaacat gcgtgcggcg atgcgtgca actggtacgg cctgctgggt	4860
aaaaaatca aagacacctt tggccacatc ggtggtccga tcctgggtgg tctggttgg	4920
ctgaaaaaac caaacaacca cgggtgtccg tactctctga ctgaagaatt cacctctgtg	4980
tatcgtatgc actctctgat cccgtctacc ctgaaactgc gtgacccgac cggtcagccg	5040
gacgcgaata actctccgcc gtgcctggaa gacatcgaca tcggtgagat gatcggctcg	5100
aaaggtgagg aacagctgtc taaaattggc ttcgaaaaac aggcgctgtc tatgggttac	5160
caggcgtgtg gtgcgctgga actgtggaac tacccgtctt tcttccgtaa cctgatccca	5220
cagaacctgg acggtaccaa tcgttctgac cgtatcgacc tggcggcgct ggaagttat	5280
cgtgaccgtg aacgttctgt tcgcggttac aacgaattcc gtcgtcgtct gttcctgac	5340
ccgatcaaat cttggaaga cctgacctct gacaaagacg cgattgaaac catccgtgcg	5400
atctacggtg acgacgttga aaaactggac ctgctggttg gtctgatggc ggaaaagaaa	5460
atcaaaggct tcgcatctc tgaaccgcg ttcaacatct tcacctgat ggcttctcgt	5520
cgtctggaag cggaccgttt cttcacctcc aacttcaacg aagagacgta caccaaaaa	5580
ggtatgcagt gggttaaac caccgaaggc ctgcgcgacg ttatcaaccg tcactatccg	5640
gaaatcaccg cgaatggat gaaatcttct tctgcgttct ctgtttgga cgcggactac	5700
tagc	5704

## REIVINDICACIONES

1. Catalizador de células enteras, que expresa una  $\alpha$ -dioxigenasa recombinante o la combinación a base de una ácido graso reductasa recombinante y de una fosfopanteteinil-transferasa que fosfopanteteinila la ácido graso reductasa y que, adicionalmente, expresa una transaminasa.
- 5 2. Catalizador de células enteras según la reivindicación 1, en donde el catalizador de células enteras expresa adicionalmente una aminoácido deshidrogenasa.
3. Catalizador de células enteras según una de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el catalizador de células enteras expresa adicionalmente una alcano hidroxilasa.
- 10 4. Catalizador de células enteras según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el catalizador de células enteras expresa adicionalmente un polipéptido de la familia ALK.
5. Catalizador de células enteras según una de las reivindicaciones 1 a 4, que expresa adicionalmente una alcohol deshidrogenasa.
6. Catalizador de células enteras según una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la actividad de al menos una enzima que participa en la  $\beta$  oxidación está reducida con respecto al tipo salvaje del catalizador de células enteras.
- 15 7. Catalizador de células enteras según una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la actividad de BioH o de una variante del mismo está reducida o incrementada con respecto al tipo salvaje del catalizador de células enteras.
8. Catalizador de células enteras según una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la actividad de FadL o de una variante del mismo está incrementada con respecto al tipo salvaje del catalizador de células enteras.
- 20 9. Procedimiento para la reacción de un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos para formar una amina o diamina, que comprende las etapas
- 25 a) proporcionar un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o un monoéster de los mismos, para el caso de que se trate de un ácido dicarboxílico,  
 b) poner en contacto el ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o el monoéster de los mismos con una ácido graso reductasa fosfopanteteinilada o una  $\alpha$ -dioxigenasa bajo formación de un producto de aldehído, y  
 c) poner en contacto el producto de la etapa b) con una transaminasa.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que en la etapa c) está presente una aminoácido deshidrogenasa.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 10, en el que se proporciona al menos una enzima del grupo que comprende ácido graso reductasa fosfopanteteinilada,  $\alpha$ -dioxigenasa, transaminasa, aminoácido deshidrogenasa y alcano hidroxilasa en forma de un catalizador de células enteras según una de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 11, en el que en el caso del ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o del monoéster de los mismos se trata de un compuesto de la fórmula (I)
- $$R^1 - A - COOR^2 \text{ (I)}$$
- 35 en donde  $R^1$  se elige del grupo que comprende -H y  $COOR^3$ ,  
 en donde  $R^2$  y  $R^3$ , en cada caso e independientemente uno de otro, se eligen del grupo que comprende H, metilo, etilo y propilo,  
 con la condición de que al menos uno de los radicales  $R^2$  y  $R^3$  sea H,  
 en donde A representa un grupo hidrocarbonado con al menos cuatro átomos de carbono no ramificado, ramificado, lineal, cíclico, sustituido o no sustituido.
- 40 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 12, en el que A presenta la fórmula  $-(CH_2)_n-$ , siendo n al menos 4, preferiblemente al menos 10.
14. Uso del catalizador de células enteras según una de las reivindicaciones 1 a 8 o del procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 12, para la aminación de un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o de un monoéster de los mismos.

15. Mezcla de reacción que comprende el catalizador de células enteras según una de las reivindicaciones 1 a 8 en solución acuosa, así como un ácido carboxílico o ácido dicarboxílico o un monoéster de los mismos de la fórmula (I)



- 5 en donde  $R^1$  se elige del grupo que comprende -H y  $COOR^3$ ,  
 en donde  $R^2$  y  $R^3$ , en cada caso e independientemente uno de otro, se eligen del grupo que comprende H, metilo, etilo y propilo,  
 con la condición de que al menos uno de los radicales  $R^2$  y  $R^3$  sea H,  
 en donde A representa un grupo hidrocarbonado con al menos cuatro átomos de carbono no ramificado, ramificado, lineal, cíclico, sustituido o no sustituido.

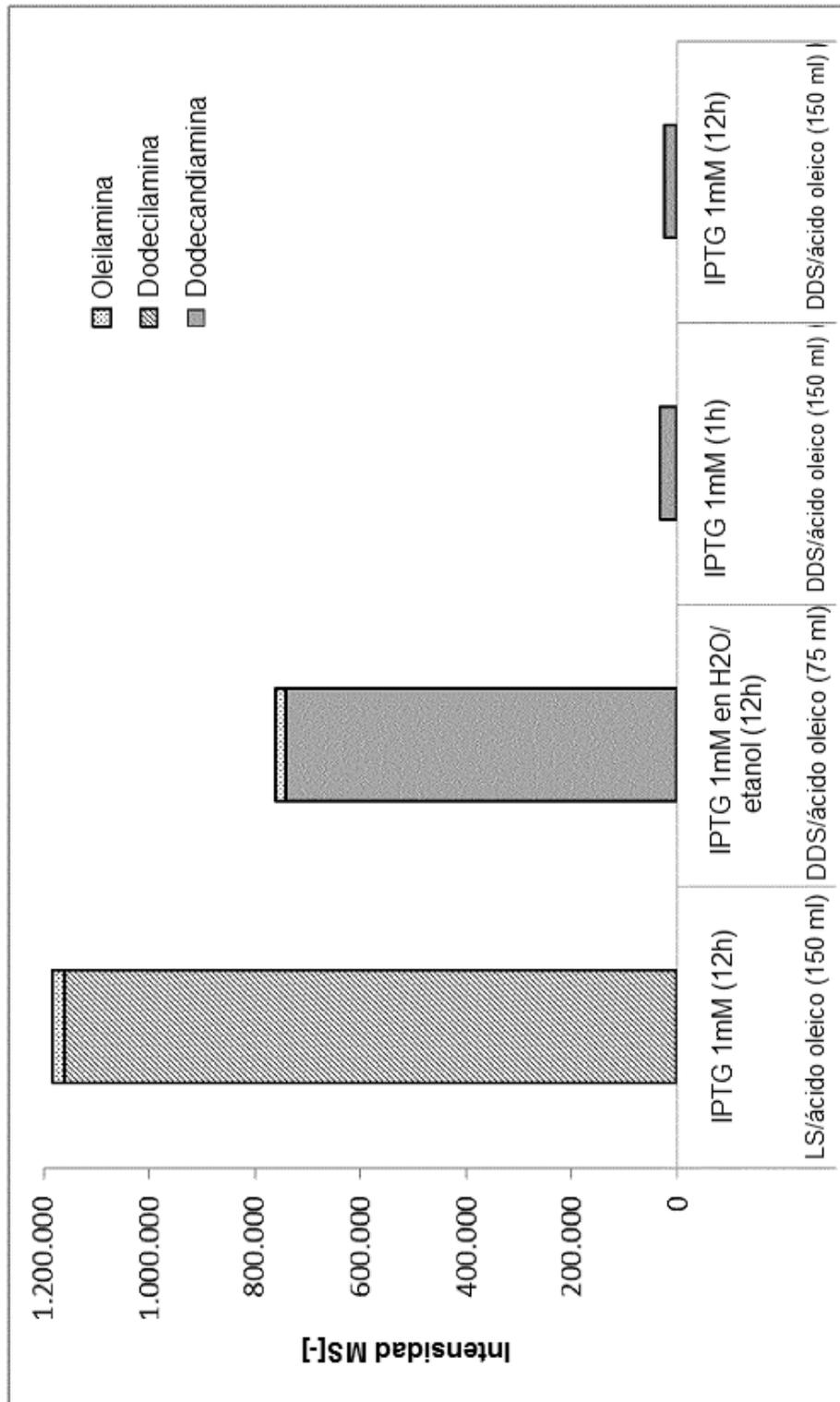


Figura 1