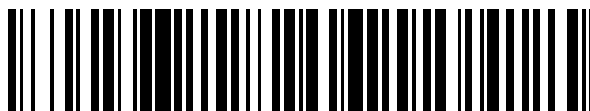


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 466**

51 Int. Cl.:

C07D 307/50 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 7/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2010 PCT/EP2010/062896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11026913**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010 E 10751918 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2473494**

54 Título: **Polipéptidos con actividad oxidorreductasa y sus usos**

30 Prioridad:

02.09.2009 EP 09169227
08.10.2009 EP 09172555

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2020

73 Titular/es:

PURAC BIOCHEM B.V. (100.0%)
Arkelsedijk 46
4206 AC Gorinchem, NL

72 Inventor/es:

RUIJSSENAARS, HARALD JOHAN;
WIERCKX, NICK JOHANNES PETRUS;
KOOPMAN, FRANK WOUTER;
STRAATHOF, ADRIANUS JOHANNES JOZEF y
WINDE, DE, JOHANNES, HENDRIK

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 744 466 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

Polipéptidos con actividad oxidorreductasa y sus usos

Campo de la invención

5 [0001] La invención se refiere a polipéptidos con actividad oxidorreductasa y a secuencias de polinucleótidos que comprenden un gen que codifica el polipéptido. La invención se refiere además a la producción de ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA). También se incluyen en la invención células transformadas con un polinucleótido según la invención adecuadas para producir estos polipéptidos, que pueden usarse también para la biotransformación de hidroximetilfurfural (HMF) en FDCA.

Antecedentes de la invención

10 [0002] El ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA) tiene un gran potencial para convertirse en una alternativa de base biológica para el tereftalato en la producción de poliésteres tales como el PET. Como tal y por otras razones, el FDCA se identificó como uno de los 12 productos químicos con mayor prioridad en el informe del Departamento de energía sobre los productos químicos con mayor valor añadido a partir de biomasa (Top Value-Added Chemicals from Biomass, Volume I - Results of screening for potential Candidates from Sugars and Synthesis gas, Departamento de energía (EE.UU.), 2004). Este compuesto puede obtenerse por oxidación de 5-hidroximetilfurfural (HMF), que se puede producir
15 calentando azúcares de hexosa bajo condiciones ácidas. El informe del Departamento de energía divulga en la página 27 algunas utilidades potenciales del FDCA. Estas incluyen un papel como sustrato para la producción de ácido succínico, 2,5-bis(aminometil)-tetrahydrofurano, 2,5-dihidroximetil-tetrahydrofurano, 2,5-dihidroximetilfurano y 2,5-furandicarbaldehído. Aunque la producción de FDCA por deshidratación oxidante química de azúcares C6 y usos del
20 FDCA se conocen bien y plantea las barreras técnicas indicadas en la tabla 13 de la página 26, para la biotransformación -conversiones posiblemente enzimáticas-, la situación era desconocida.

[0003] Un proceso para la preparación enzimática de FDCA se proporciona en WO2009/023174. En esta divulgación, una especie de hidroximetilfurfural se oxida con una cloroperoxidasa y productos oxidados de peróxido de hidrógeno que tienen un grupo ácido carboxílico en la posición C1 del hidroximetilfurfural, en particular el ácido
25 formilfuranocarboxílico o FFCA. Se muestran resultados, por ejemplo, en la figura 1. En otra forma de realización, se pone en contacto HMF con una oxidorreductasa en presencia de un sustrato oxidante, por lo cual el HMF se oxida a al menos uno de ácido diformilfurano o formilfuranocarboxílico.

[0004] Las desventajas del proceso conocido en WO2009/023174 son que la reacción requiere peróxido de hidrógeno y que el producto formado es una mezcla de FDCA con dos subproductos contaminantes, el ácido
30 hidroximetilfuranocarboxílico (HmFCA) y ácido formilfuranocarboxílico (FFCA). En consecuencia, el rendimiento de FDCA a partir de HMF se reduce y se necesitan pasos de recuperación adicionales para obtener FDCA en una forma sustancialmente purificada.

[0005] En la base de datos EBI, Uniprot B2T4R9, se identificó una secuencia de 577 aminoácidos que se infirió por homología como glucosa-metanol-colina oxidorreductasa en la "secuencia completa del cromosoma 1 de *Burkholderia phytofirmans* PsJN".
35

[0006] En la base de datos EBI, Uniprot B2JSZ0, se identificó una secuencia de 576 aminoácidos que se infirió por homología como glucosa-metanol-colina oxidorreductasa en la "secuencia completa del plásmido 1 de *Burkholderia phymatum* STM815".

[0007] En Deurzen, M.P.J. et al, J. Carbohydrate Chemistry 16(3), 299-309 (1997), se divulga la oxidación de 5-hidroximetilfurfural catalizada por una cloroperoxidasa. La reacción procede con un 60-74% de selectividad a furan-2,5-dicarboxaldehído (FDC). Los subproductos fueron el ácido 5-hidroximetil-2-furanocarboxílico (HFCA) y el ácido 5-formilfuran-2-carboxílico (FFCA).
40

Resumen de la invención

[0008] Un objeto de la invención es proporcionar una oxidorreductasa que puede usar oxígeno molecular para reacciones redox. Otro objeto es proporcionar una oxidorreductasa que tiene un amplio espectro de reacción. Otro
45

objeto es proporcionar una oxidorreductasa que tiene una alta regioespecificidad. Un objeto adicional de la invención es proporcionar un proceso para la producción de FDCA donde se puede evitar una cantidad sustancial de subproductos. Un objeto adicional de la invención es proporcionar un proceso para la producción de ácido 5-hidroximetil-2-furanocarboxílico (ácido HMF) donde se puede evitar una cantidad sustancial de subproductos. Uno o más de estos objetos se logran según la invención.

[0009] La presente invención proporciona polinucleótidos que codifican polipéptidos con la actividad oxidorreductasa. Los polinucleótidos de la invención codifican típicamente un polipéptido con actividad oxidorreductasa, en particular actividad HmfH oxidorreductasa.

[0010] Según la invención, se proporciona así un polipéptido según la reivindicación 1.

[0011] Estos polipéptidos de oxidorreductasa ofrecen una alternativa enzimática a las vías de oxidación química para producir el compuesto de valor añadido FDCA, lo que permite condiciones de reacción suaves (30°C, pH 7) y producir menos residuos. La oxidorreductasa es una oxidasa real, es decir, solo se requiere oxígeno molecular para la reacción de oxidación y se omite el requisito de regeneración de cofactores costosos. La enzima ofrece una amplia especificidad de reacción y regioespecificidad, oxidando grupos tanto alcohol como aldehído a, finalmente, ácido carboxílico, independientemente de si estos grupos están en la posición C2 o C5 de la estructura de furano.

[0012] También se proporciona según la invención un vector, tal como un vector de expresión, que incorpora una secuencia de polinucleótidos de la invención y una célula que comprende un polipéptido, un polinucleótido o un vector, según la invención.

[0013] La invención proporciona además un método para la preparación de un polipéptido con actividad oxidorreductasa, donde este método comprende el cultivo de una célula de la invención bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido y, opcionalmente, la recuperación del polipéptido expresado y un polipéptido obtenible por tal método.

[0014] Otra forma de realización de la invención se refiere a un proceso integrado para la producción de FDCA a partir de corrientes de alimentación ricas/enriquecidas en fructosa usando un biocatalizador de células enteras robusto.

Breve descripción de las figuras

[0015]

Fig. 1: esquema de reacción de oxidaciones catalizadas por la HmfH oxidorreductasa.

Fig. 2: mapa plasmídico del vector de expresión de la HmfH pJT'hmfH. Ptac', promotor tac; rep, gen que codifica la proteína de replicación pRO1600; gmR, gen de resistencia a gentamicina; bla, beta-lactamasa; pRO1600-ori, origen de replicación para *P. putida*; pUC ori, origen de replicación para *E. coli*.

Fig. 3: representación esquemática de la organización genética de genes metabólicos de furfural y HMF en *C. basilensis* HMF14 (A) y otras especies (B) que se identificaron como utilizadores potenciales de furfural y/o HMF.

Fig. 4: formación de FDCA, alcohol de HMF (H-oh) y ácido HMF (ácido H) a partir de HMF en el extracto celular crudo de *P. putida* S12 pJT'hmfH.

Fig. 5: formación de ácido HMF y FDCA en un cultivo por lote alimentado de *P. putida* pJT'hmfH. La flecha a mano izquierda indica el inicio de la alimentación de HMF; la flecha a mano derecha indica la adición de glicerol a la alimentación.

Fig. 6: formación de ácido HMF y FDCA en un cultivo por lote alimentado de *P. putida* pJT'hmfH. La flecha indica el inicio de la alimentación combinada de HMF y glicerol.

Figura 7a: concentraciones de ácido HMF, FDCA y biomasa en la fermentación por lote alimentado del ejemplo VIII. 7b: velocidades de alimentación de glicerol y HMF en la fermentación por lote alimentado del ejemplo VIII.

Breve descripción del listado de secuencias

[0016]

La SEQ ID NO: 1 expone la secuencia de ADN del cebador FN23: 5'-CGGAATTCACATGACAAGGGGAGACCG-3'. La secuencia subrayada indica un sitio de restricción de EcoRI;

5 la SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de ADN del cebador FN24; 5'-CGGAATTCGCTTCGGTCTTCAACTCGGATG-3'. La secuencia subrayada indica un sitio de restricción de EcoRI;

la SEQ ID NO: 3 expone la secuencia de aminoácidos de la HmfH;

la SEQ ID NO: 4 expone la secuencia codificante del *hmfH*.

Descripción detallada de la invención

10 [0017] En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprender" e "incluir" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" e "incluyendo" se deben interpretar de manera inclusiva. Es decir, estas palabras se destinan a expresar la posible inclusión de otros elementos o números enteros no específicamente enumerados, cuando el contexto lo permite.

15 [0018] Los artículos "un" y "una" se usan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

[0019] Amplio espectro de reacción significa en la presente que la oxidorreductasa puede actuar como catalizador para los muchos diferentes sustratos, por ejemplo, HMF, ácido HMF, alcohol de HMF, furfural, alcohol furfurílico. La regioespecificidad significa que oxida solo átomos de C específicos.

20 Polipéptido de oxidorreductasa

[0020] Un polipéptido según la invención con la actividad oxidorreductasa de clase EC 1.1 y EC 1.2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 o una variante del polipéptido de la misma con al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.

25 [0021] Una forma de realización de la invención es un polinucleótido que comprende: (a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad oxidorreductasa, donde este polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3; o (c) una secuencia de nucleótidos que es el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos tal y como se define en (a) o (b).

30 [0022] Una forma de realización es una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido, donde el contenido de GC puede ser de un 56% o más, un 58% o más, o de un 58-65%. Una forma de realización adicional es un vector que incorpora la secuencia de polinucleótidos o una construcción de ácido nucleico.

35 [0023] Los términos "homología", "identidad de secuencia" y similares se usan de forma intercambiable en la presente. A efectos de esta invención, se define en la presente que, para determinar el grado de identidad de secuencia compartida por dos secuencias de aminoácidos o por dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean a efectos de una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de un primer aminoácido o secuencia de ácido nucleico para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Tal alineamiento se puede realizar sobre las longitudes completas de las secuencias que se están comparando. Alternativamente, el alineamiento se puede realizar sobre una longitud de comparación más corta, por ejemplo, sobre aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más bases/ácidos nucleicos o aminoácidos.

40

[0024] Se comparan entonces los residuos de aminoácidos o nucleótidos con posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El grado de identidad compartido entre secuencias se expresa típicamente en términos de porcentaje de identidad entre las dos secuencias y es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (es decir, posiciones superpuestas) x 100). Preferiblemente, las dos secuencias que se están comparando son de la misma o sustancialmente la misma longitud.

[0025] La persona experta será consciente del hecho de que varios programas informáticos diferentes están disponibles para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, una comparación de secuencias y la determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias se pueden realizar usando un algoritmo matemático. En una forma de realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP del paquete de *software* Accelrys GCG (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), usando o una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso del espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La persona experta apreciará que todos estos diferentes parámetros producirán resultados ligeramente diferentes pero que el porcentaje de identidad total de dos secuencias no se altera significativamente cuando se usan algoritmos diferentes.

[0026] En otra forma de realización, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP del paquete de *software* Accelrys GCG (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso del espacio de 40, 50, 60, 70 o 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra forma de realización, la identidad en porcentaje de dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se determina usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) (disponible en ALIGN Query usando datos de secuencias del servidor Genestream IGH Montpellier Francia <http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) usando una tabla de pesos de residuos PAM120, una penalización por longitud del espacio de 12 y una penalización por espacio de 4.

[0027] Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención pueden usarse además como una "secuencia de consulta" para ejecutar una búsqueda en las bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando los programas BLASTn y BLASTx (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Se pueden realizar búsquedas BLAST de nucleótidos con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener homólogos de secuencias de nucleótidos a moléculas de ácido nucleico de oxidoreductasa de la invención. Se pueden realizar búsquedas de proteínas BLAST con el programa BLASTx, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener homólogos de secuencias de aminoácidos a moléculas de proteína oxidoreductasa de la invención. Para obtener alineamientos espaciados a efectos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTx y BLASTn). Véase la página web del National Center for Biotechnology Information en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

[0028] Como se utiliza en la presente, el término "hibridando selectivamente", "hibrida selectivamente" y términos similares se destinan a describir las condiciones para la hibridación y el lavado bajo las que las secuencias de nucleótidos al menos un 66%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, aún más preferiblemente al menos un 90%, preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98% o más preferiblemente al menos un 99% homólogas entre sí típicamente permanecen hibridadas entre sí. Es decir, tales secuencias que se hibridan pueden compartir al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, aún más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98% o más preferiblemente al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0029] Un ejemplo no limitativo preferido de tales condiciones de hibridación es la hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45°C, seguida de uno o más lavados en 1 X SSC, SDS al 0,1% a alrededor de 50°C, preferiblemente a alrededor de 55°C, preferiblemente a alrededor de 60°C e incluso más preferiblemente a alrededor de 65°C.

[0030] Las condiciones altamente astringentes incluyen, por ejemplo, la hibridación a aproximadamente 68°C en 5x SSC/5x solución de Denhardt/SDS al 1,0% y el lavado en 0,2x SSC/SDS al 0,1% a temperatura ambiente. Alternativamente, el lavado se puede realizar a 42°C.

5 [0031] La persona experta en la materia conocerá qué condiciones aplicar para condiciones de hibridación astringentes y altamente astringentes. Una guía adicional con respecto a tales condiciones está fácilmente disponible en la técnica, por ejemplo, en Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.).

10 [0032] Por supuesto, un polinucleótido que hibrida solo con una secuencia de poli A (tal como el tracto de poli(A) 3' terminal de los ARNm) o con una extensión complementaria de residuos T (o U), no se incluiría en un polinucleótido de la invención usado para hibridar específicamente con una porción de un ácido nucleico de la invención, ya que tal polinucleótido hibridaría con cualquier molécula de ácido nucleico con una extensión de poli (A) o el complemento de la misma (por ejemplo, prácticamente cualquier clon de ADNc bicatenario).

15 [0033] En un método típico, se pueden cribar genotecas construidas a partir de otros organismos, por ejemplo, una bacteria, en particular a partir de la familia de microorganismos Trichomaceae, por ejemplo, a partir del género *Burkholderia*, tal como *Burkholderia phytofirmans*.

20 [0034] Por ejemplo, se pueden cribar cepas de *Burkholderia* para buscar polinucleótidos de oxidoreductasa homólogos por análisis de transferencia de Southern. Tras la detección de fragmentos de restricción del ADN homólogos según la invención, se pueden construir genotecas a partir de fragmentos cromosómicos del mismo tamaño de la cepa apropiada, utilizando técnicas estándares bien conocidas por aquellas personas expertas en la técnica. Alternativamente, si el microorganismo es un eucariota, la transcripción de ARNm de la oxidoreductasa HmfH se puede identificar por hibridación Northern y, tras la identificación de la transcripción, se pueden preparar genotecas de ADNc usando ARN total aislado a partir del microorganismo eucariota.

25 [0035] Se pueden aislar secuencias de genes homólogos, por ejemplo, realizando una PCR usando dos grupos de cebadores oligonucleotídicos degenerados diseñados en base a secuencias de nucleótidos como se enseña en la presente.

[0036] La plantilla para la reacción puede ser ADN cromosómico total de la cepa que se conoce o se sospecha que expresa un polinucleótido según la invención. El producto de la PCR se puede subclonar y secuenciar para asegurar que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una nueva secuencia de ácido nucleico de oxidoreductasa o un equivalente funcional de la misma.

30 [0037] Alternativamente, la plantilla para la reacción puede ser ADNc obtenido por transcripción inversa de ARNm obtenido a partir de cepas que se sabe o sospecha que expresan un polinucleótido según la invención. El producto de la PCR se puede subclonar y secuenciar para asegurar que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una nueva secuencia de ácido nucleico de oxidoreductasa, o un equivalente funcional de la misma.

35 [0038] El fragmento de la PCR puede entonces usarse para aislar un clon de ADNc en toda su longitud por una variedad de métodos conocidos. Por ejemplo, el fragmento amplificado se puede marcar y usar para cribar una genoteca de ADNc de bacteriófagos o cósmidos. Alternativamente, el fragmento marcado se puede usar para cribar una genoteca genómica.

40 [0039] También se puede usar tecnología PCR para aislar secuencias de ADNc en toda su longitud a partir de otros organismos. Por ejemplo, se puede aislar ARN, siguiendo procedimientos estándares, a partir de una fuente celular o tisular apropiada. Se puede realizar una reacción de transcripción inversa sobre el ARN usando un cebador oligonucleotídico específico para el extremo más 5' del fragmento amplificado para el cebado de la síntesis de la primera cadena.

45 [0040] Al híbrido de ARN/ADN resultante se le puede entonces "añadir una cola" (por ejemplo, con guaninas) usando una reacción de transferasa terminal estándar, el híbrido se puede digerir con ribonucleasa H, y puede entonces realizarse el cebado de la síntesis de la segunda cadena (por ejemplo, con un cebador poli-C). Así, pueden aislarse fácilmente secuencias de ADNc aguas arriba del fragmento amplificado. Para una revisión de estrategias de clonación útiles, véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*; y Ausubel et al., *supra*.

[0041] Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, incluidos vectores de clonación y expresión, que comprenden un polinucleótido de la invención que codifica una proteína oxidorreductasa o un equivalente funcional de la misma y métodos de crecimiento, transformación o transfección de tales vectores en una célula huésped adecuada, por ejemplo, bajo condiciones donde ocurre la expresión de un polipéptido de la invención. Como se utiliza en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido.

[0042] Se pueden incorporar polinucleótidos de la invención en un vector replicable recombinante, por ejemplo, un vector de clonación o expresión. El vector se puede usar para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Así, en otra forma de realización, la invención proporciona un método para producir polinucleótidos de la invención introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y cultivando la célula huésped bajo condiciones que provocan la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula huésped. Se describen células huésped adecuadas a continuación.

[0043] El vector en que el casete de expresión o polinucleótido de la invención está insertado puede ser cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector a menudo dependerá de la célula huésped en la que se vaya a introducir.

[0044] Un vector según la invención puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado.

[0045] Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de una replicación autónoma en la célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y se replican así junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en la presente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante son a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" se pueden usar de forma intercambiable en la presente, ya que el plásmido es la forma de vector más frecuentemente usada. Sin embargo, se pretende que la invención incluya tales otras formas de vectores de expresión, tales como cósmidos, vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados incapaces de replicarse) y vectores fágicos que realizan funciones equivalentes.

[0046] Se pueden usar vectores según la invención *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN o se pueden usar para transfectar o transformar una célula huésped.

[0047] Un vector de la invención puede comprender dos o más, por ejemplo, tres, cuatro o cinco, polinucleótidos de la invención, por ejemplo, para la sobreexpresión.

[0048] Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en función de las células huésped que se van a usar para la expresión, que están operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar.

[0049] En un vector, tal como un vector de expresión, "operativamente unido/a/os/as" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped), es decir, el término "operativamente unido/a/os/as" se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia reguladora, tal como un promotor, potenciador u otra señal de regulación de la expresión, "operativamente unida" a una secuencia codificante está situada de manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue bajo condición compatible con las secuencias de control o las secuencias se disponen de manera que funcionan de forma conjunta para su fin pretendido, por ejemplo, la transcripción se inicia en un promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

[0050] El término "secuencia reguladora" o "secuencia de control" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, una señal de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

5 [0051] El término secuencias reguladoras o de control incluyen aquellas secuencias que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en una determinada célula huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido).

10 [0052] Un vector o construcción de expresión para una célula huésped dada puede comprender así los siguientes elementos operativamente unidos entre sí en un orden consecutivo del extremo 5' al extremo 3' respecto a la cadena codificante de la secuencia que codifica el polipéptido de la primera invención: (1) una secuencia promotora capaz de dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en la célula huésped dada; (2) opcionalmente, una secuencia señal capaz de dirigir la secreción del polipéptido desde la célula huésped dada en un medio de cultivo; (3) una secuencia de ADN de la invención que codifica una forma madura y preferiblemente activa de un polipéptido con actividad celobiohidrolasa; y, preferiblemente, también (4) una región de terminación de la transcripción (terminador) capaz de terminar la transcripción aguas abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

20 [0053] Aguas abajo de la secuencia de nucleótidos según la invención puede haber una región 3' no traducida que contiene uno o más sitios de terminación de la transcripción (por ejemplo, un terminador). El origen del terminador es menos crítico. El terminador puede, por ejemplo, ser nativo a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Sin embargo, preferiblemente se usa un terminador de levadura en células huésped de levadura y se utiliza un terminador fúngico filamentosos en células huésped fúngicas filamentosas. Más preferiblemente, el terminador es endógeno de la célula huésped (en la que debe expresarse la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido). En la región transcrita, puede estar presente un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones incluirá un AUG iniciador de la traducción en el principio y un codón de terminación situado de manera apropiada al final del polipéptido que se va a traducir.

30 [0054] También se puede conseguir una expresión mejorada del polinucleótido de la invención mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo, regiones promotoras, líderes de secreción y/o terminadoras, que pueden servir para aumentar la expresión y, si se desea, niveles de secreción de la proteína de interés del huésped de expresión y/o para proveer para el control inducible de la expresión de un polipéptido de la invención.

35 [0055] Aquellas personas expertas en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores, tales como vectores de expresión, de la invención se pueden introducir en células huésped para producir así proteínas o péptidos, codificados por ácidos nucleicos como se describe en la presente (por ejemplo, proteínas oxidorreductasa, formas mutantes de proteínas oxidorreductasa, fragmentos, variantes o equivalentes funcionales de las mismas, proteínas de fusión, etc.).

40 [0056] Los vectores, tales como vectores de expresión recombinantes, de la invención se pueden diseñar para la expresión de proteínas oxidorreductasa en células eucarióticas o procarióticas. Por ejemplo, se pueden expresar proteínas oxidorreductasa en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus), hongos filamentosos, células de levadura o células de mamíferos. Se tratan células huésped adecuadas adicionalmente en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Se describen ejemplos representativos de huéspedes apropiados de aquí en adelante.

[0057] Medios de cultivo y condiciones apropiados para las células huésped descritas anteriormente se conocen en la técnica.

45 [0058] Como se ha expuesto antes, el término "secuencias de control" o "secuencias reguladoras" se define en la presente para incluir por lo menos cualquier componente que pueda ser necesario y/o ventajoso para la expresión de un polipéptido. Cualquier secuencia de control puede ser nativa o foránea a la secuencia de ácido nucleico de la invención que codifica un polipéptido. Tales secuencias de control pueden incluir, pero de forma no limitativa, un promotor, un líder, secuencias iniciadoras de la traducción óptimas (como se describe en Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870), una secuencia señal de secreción, una secuencia propeptídica, una secuencia de poliadenilación,

un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen típicamente un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional.

[0059] Un microorganismo transformado de forma estable es uno al que se le ha introducido uno o más fragmentos de ADN de manera que las moléculas introducidas se mantienen, se replican y se segregan en un cultivo en crecimiento. La transformación estable se puede deber a una integración/integraciones cromosómica(s) múltiple(s) o individual(es) o por (un) elemento(s) extracromosómico(s) tal(es) como (un) vector(es) plasmídico(s). Un vector plasmídico es capaz de dirigir la expresión de polipéptidos codificados por fragmentos de ADN particulares.

[0060] La expresión puede ser constitutiva o regulada por promotores inducibles (o reprimibles) que posibilitan altos niveles de transcripción de fragmentos de ADN funcionalmente asociados que codifican polipéptidos específicos.

10 Aislamiento de la oxidorreductasa

[0061] La oxidorreductasa o material de ADN que expresa la oxidorreductasa se puede aislar a partir de un organismo, preferiblemente un microorganismo que expresa la oxidorreductasa. Preferiblemente, el microorganismo es capaz de usar HMF, pero esto no es necesario. El microorganismo se elige preferiblemente del grupo que consiste en: *Cupriavidus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*; *Cupriavidus basisliensis*, *Burkholderia phytofirmans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Methylobacterium radiotolerans*, *Cupriavidus basisliensis* HMF14, *Burkholderia phytofirmans* PsJN, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831.

[0062] La oxidorreductasa más preferida útil en la presente invención es usando un HMF y es una oxidorreductasa aislada de *Cupriavidus basilensis* HMF 14 en la presente, depositada conforme al Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a efectos del procedimiento en materia de patentes en la DSMZ: *Cupriavidus basilensis* HMF14 = DSM 22875, fecha de depósito: agosto 19, 2009, depositante TNO, Schoemakerstraat 97, 2628VK Delft, Países Bajos.

[0063] Hemos aislado así la bacteria que utiliza HMF, *Cupriavidus basilensis* cepa HMF14, e identificado los genes implicados en la vía de degradación de HMF. Uno de los genes (definido en la presente como *hmfH*) codificaba una oxidorreductasa de 579 aminoácidos de 62 kDa dependiente de FAD que se descubrió que oxida alcohol furfurílico, furfural, HMF y ácido 5-hidroximetil-furóico. Los grupos alcohol/aldehído en el C2 y C5 en estas moléculas se oxidaron, sin el requisito de una construcción de ácido nucleico adicional que codifique una reductasa, aunque la presencia de tales actividades puede ser ventajosa (véase la figura 1).

La presente invención proporciona así polinucleótidos que codifican polipéptidos, por ejemplo, enzimas con actividad oxidorreductasa (actividades EC 1.1 + EC 1.2) como se define en la reivindicación 1. Las enzimas son en la presente una subclase de polipéptidos.

Reacción de oxidación

[0064] La reacción de oxidación es, en la presente, una o más reacciones de un oxidante con un compuesto furánico en presencia de la oxidorreductasa que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y una o más coenzimas (descritas en la presente a continuación). La reacción de oxidación puede comprender un paso de reacción de oxidación que da como resultado un producto (por ejemplo, la oxidación del ácido HMF a FDCA). Alternativamente puede comprender más de un paso de reacción de oxidación, donde cada paso da como resultado un producto intermedio, donde el último producto intermedio es el producto final (por ejemplo, la oxidación de HMF a FDCA). Se proporcionan ejemplos de reacciones de oxidación en la figura 1.

[0065] Una reacción de oxidación es la producción de ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA), donde uno o más precursores furánicos de FDCA se convierte(n) en FDCA, por reacción con un oxidante en presencia de un catalizador de oxidorreductasa y una o más coenzimas, donde el catalizador de oxidorreductasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. El precursor furánico del FDCA se puede elegir del grupo que consiste en 5-hidroximetilfurfural (HMF), 2,5-dihidroximetilfuranol (alcohol de HMF) y ácido 5-hidroximetil-2-furanocarboxílico (ácido HMF), preferiblemente el precursor furánico es HMF. El HMF puede obtenerse a partir de uno o más azúcares de hexosa calentando en presencia de ácido, de una manera convencional. Los azúcares de hexosa pueden obtenerse a partir de biomasa. La reacción de oxidación también puede ser un proceso para la producción de ácido 5-hidroximetil-2-furanocarboxílico (ácido HMF) donde uno o más precursores furánicos del ácido HMF se convierte(n) en ácido HMF por reacción con un oxidante en presencia de un catalizador de oxidorreductasa y una o más coenzimas, donde el catalizador de oxidorreductasa

comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. En una forma de realización, el precursor furánico del ácido HMF se elige del grupo elegido de 5-hidroximetilfurfural (HMF) y 2,5-dihidroximetilfurano (alcohol de HMF). Otros procesos de oxidación son posibles.

- 5 [0066] Las reacciones de oxidación se realizan preferiblemente a temperatura relativamente suave, es decir, 10-80°C, más preferiblemente 20-45°C, más preferiblemente alrededor de 25-40°C. El pH durante la reacción es preferiblemente un pH de 3 a 8, más preferiblemente alrededor de pH 7. El tiempo de reacción es 6-18 h usando oxígeno atmosférico u oxígeno puro y preferiblemente la enzima es reactiva durante tiempos más largos.

[0067] El reactor puede ser cualquier biorreactor (aireado) adecuado. Se puede operar por lotes, en continuo o preferiblemente por lote alimentado.

- 10 [0068] Los productos de oxidación tales como el FDCA, el ácido HMF, etc. se pueden recuperar de la mezcla reactiva por enfriamiento/recristalización y separación del producto de oxidación cristalizado, por ejemplo, FDCA cristalizado. Sin embargo, son adecuados otros métodos de recuperación, tales como, pero de forma no limitativa, la precipitación ácida y la extracción con solvente, como se conoce en la técnica.

- 15 [0069] Opcionalmente, la reacción tiene lugar en presencia de una coenzima. La coenzima puede ser el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) y/o el dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y/o la pirroloquinolina quinolona (PQQ). Se descubrió un efecto sinérgico en la reacción de oxidación de la invención con actividad deshidrogenasa, por ejemplo, la actividad de deshidrogenación endógena descubierta en una célula donde tiene lugar la reacción de oxidación o presente en un extracto celular de tal célula. El proceso para la producción de un polímero de uno o más monómeros, donde uno de los monómeros es FDCA conforme

20 **Oxidante**

- [0070] El oxidante durante las reacciones según la invención puede ser cualquier oxidante, preferiblemente oxígeno. La fuente más económica de oxígeno es el aire. Esto es ventajoso porque el aire se obtiene fácilmente de la atmósfera sin ningún coste, sin toxicidad y sin necesidad de eliminarlo después de la reacción. Alternativamente, se puede emplear un sistema de liberación de oxígeno molecular. El sistema generador de oxígeno puede elegirse en principio de los
25 varios sistemas generadores de oxígeno que se han divulgado en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar las enzimas catalasas ya presentes en la mezcla reactiva para generar oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno.

Compuestos furánicos

- [0071] En la presente se entiende que los compuestos furánicos son cualquier compuesto con un grupo furano que se puede oxidar a ácido 2,5-furandicarboxílico o un precursor del mismo. Los compuestos de furano preferidos incluyen el
30 hidroximetilfurfural (HMF), el ácido hidroximetilfuranocarboxílico (ácido HMF), el 2,5-dihidroximetilfurano (alcohol de HMF). El anillo de furano o cualquiera de sus grupos laterales sustituibles se pueden sustituir, por ejemplo, con OH, alquilo C1-C10, alquilo, alilo, arilo o una fracción de RO-éter, incluidos los grupos cíclicos, en el anillo de furano en cualquier posición disponible.

Expresión de oxidorreductasa

- [0072] Independientemente del mecanismo exacto utilizado para la expresión de enzimas, se contempla que tal
35 expresión es transferible por la introducción de genes que codifican estas enzimas en otra célula huésped por métodos conocidos en la técnica. Elementos genéticos como los definidos en la presente incluyen ácidos nucleicos (generalmente ADN o ARN) que tienen secuencias codificantes expresables para productos tales como proteínas, específicamente enzimas, apoproteínas o ARN antisentido, que expresan o regulan la expresión de enzimas relevantes.
40 Las proteínas expresadas pueden funcionar como enzimas, reprimir o desactivar la represión de la actividad enzimática o controlar la expresión de enzimas. El ADN recombinante que codifica estas secuencias expresables puede ser o cromosómico (integrado en el cromosoma de la célula huésped por, por ejemplo, recombinación homóloga) o extracromosómico (por ejemplo, llevado por uno o más plásmidos, cósmidos y otros vectores capaces de autorreplicarse). Se entiende que el ADN recombinante utilizado para transformar la célula huésped conforme a esta
45 invención puede incluir, además de genes estructurales y factores de transcripción, secuencias de control de la expresión, incluidos promotores, represores y potenciadores, que actúan para controlar la expresión o la desactivación de la represión de secuencias codificantes para proteínas, apoproteínas o ARN antisentido. Por ejemplo, tales

secuencias de control se pueden insertar en células huésped salvajes para promover la sobreexpresión de enzimas seleccionadas ya codificadas en el genoma de la célula huésped o, alternativamente, se pueden usar para controlar la síntesis de enzimas codificadas extracromosómicamente.

[0073] El ADN recombinante se puede introducir en la célula huésped por cualquier medio, incluidos, pero de forma no limitativa, plásmidos, cósmidos, fagos, cromosomas artificiales de levadura u otros vectores que median la transferencia de elementos genéticos a una célula huésped. Estos vectores pueden incluir un origen de replicación, junto con elementos de control que actúan en cis que controlan la replicación del vector y los elementos genéticos que lleva el vector. Marcadores seleccionables pueden estar presentes en el vector para ayudar en la identificación de células huésped en las que se han introducido elementos genéticos.

[0074] La persona experta en la materia conoce bien los medios para introducir elementos genéticos en una célula huésped (por ejemplo, la clonación). Se puede utilizar un vector plasmídico de múltiples copias extracromosómico para insertar los elementos genéticos conforme a la presente invención. La introducción transmitida por plásmidos del elemento genético en células huésped implica la escisión inicial de un vector plasmídico con una enzima de restricción, seguida del ligamiento del plásmido y los elementos genéticos que codifican las especies de enzima deseadas conforme a la invención. Tras la recircularización del plásmido recombinante ligado, se utiliza la infección (por ejemplo, empaquetado en un fago lambda) u otro mecanismo para la transferencia de plásmidos (por ejemplo, la electroporación, la microinyección, etc.) para transferir el plásmido a la célula huésped. La persona experta en la materia conoce bien los plásmidos adecuados para la inserción de elementos genéticos en la célula huésped.

[0075] Otros métodos de clonación génica incluyen, pero de forma no limitativa, la integración directa del material genético en el cromosoma. Esto puede ocurrir por una variedad de medios, incluyendo clonando los elementos genéticos descritos en la presente en plásmidos no replicativos flanqueados por secuencias de ADN homólogas del cromosoma huésped; al transformar dicho plásmido recombinante en un huésped, los elementos genéticos se pueden introducir en el cromosoma por recombinación de ADN. Tales cepas recombinantes se pueden recuperar si los fragmentos de ADN integrantes contienen un marcador seleccionable, tal como resistencia a antibióticos. Alternativamente, los elementos genéticos se pueden introducir directamente en el cromosoma de una célula huésped sin el uso de un plásmido no replicativo. Esto se puede hacer produciendo sintéticamente fragmentos de ADN de los elementos genéticos de acuerdo a la presente invención que contengan también secuencias de ADN homólogas del cromosoma huésped. De nuevo, si estos fragmentos de ADN sintéticos contienen también un marcador seleccionable, los elementos genéticos se pueden insertar en el cromosoma huésped.

Célula huésped

[0076] La oxidorreductasa se puede expresar de manera favorable en una célula huésped. La célula huésped según la invención puede ser cualquier célula huésped. La célula puede ser una célula procariota, una célula eucariota, una célula vegetal o una célula animal. En tal célula, se pueden eliminar, bloquear o romper por completo o en parte uno o más genes, donde opcionalmente uno o más genes codifican una proteasa. Según una forma de realización, la célula huésped según la invención es una célula fúngica. Preferiblemente, la célula fúngica es una célula de levadura, tal como una cepa de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*. Más preferiblemente, de *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* y *Pichia pastoris*, o una célula fúngica filamentosa. Más preferiblemente, la célula eucariota es una célula fúngica filamentosa.

[0077] "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como definen Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es estrictamente aeróbico. Las cepas fúngicas filamentosas incluyen, pero de forma no limitativa, cepas de *Acremonium*, *Agaricus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Panerochaete*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium* y *Trichoderma*.

[0078] Las células fúngicas filamentosas preferidas pertenecen a una especie de un género de *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Talaromyces* o *Trichoderma* y, más preferiblemente, una especie de *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus fumigatus*, *Talaromyces emersonii*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium lucknowense*, *Trichoderma reesei* o *Penicillium chrysogenum*. Cuando la célula

huésped según la invención es una célula huésped de *Aspergillus*, la célula huésped es preferiblemente CBS 513.88, CBS124.903 o un derivado de las mismas.

[0079] Según otra forma de realización, la célula huésped según la invención es una célula procariótica. Preferiblemente, la célula huésped procariótica es una célula bacteriana. El término "célula bacteriana" incluye microorganismos tanto gramnegativos como grampositivos. Se pueden seleccionar bacterias adecuadas de, por ejemplo, *Escherichia*, *Anabaena*, *Caulobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium* (*Sinorhizobium*), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus* o *Streptomyces*. Preferiblemente, la célula bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. punitis*, *B. megaterium*, *B. halodurans*, *B. pumilus*, *Gluconobacter oxydans*, *Caulobacter crescentus* CB 15, *Methylobacterium extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas zeaxanthinifaciens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas putida* S12, *Paracoccus denitrificans*, *E. coli*, *C. glutamicum*, *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces lividans*, *Sinorhizobium melioli* y *Rhizobium radiobacter*.

[0080] Varias cepas de hongos filamentosos son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivos, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL): por ejemplo, las cepas de *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892, *P. chrysogenum* CBS 455.95, *Penicillium citrinum* ATCC 38065, *Penicillium chrysogenum* P2, *Talaromyces emersonii* CBS 124.902, *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 o ATCC 48272, *Trichoderma reesei* ATCC 26921 o ATCC 56765 o ATCC 26921, *Aspergillus sojae* ATCC11906, *Chrysosporium lucknowense* ATCC44006. También se pueden usar derivados de las mismas.

[0081] Según otra forma de realización, la célula huésped según la invención es una célula procariótica. Preferiblemente, la célula huésped procariótica es una célula bacteriana. El término "célula bacteriana" incluye microorganismos tanto gramnegativos como grampositivos. Se pueden seleccionar bacterias adecuadas de, por ejemplo, *Escherichia*, *Anabaena*, *Caulobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium* (*Sinorhizobium*), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus* o *Streptomyces*. Preferiblemente, la célula bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. punitis*, *B. megaterium*, *B. halodurans*, *B. pumilus*, *G. oxydans*, *Caulobacter crescentus* CB 15, *Methylobacterium extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas putida*, *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *E. coli*, *C. glutamicum*, *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces lividans*, *Sinorhizobium melioli* y *Rhizobium radiobacter*.

[0082] Para usos específicos de un compuesto producido en una célula huésped según la invención, la selección de la célula huésped puede hacerse según tal uso. Por ejemplo, cuando el compuesto producido en una célula huésped según la invención se va a usar en aplicaciones alimentarias, se puede seleccionar una célula huésped de un organismo apto para uso alimentario tal como *Saccharomyces cerevisiae*. Los usos específicos incluyen, pero de forma no limitativa, aplicaciones alimentarias, de alimentación (animal), farmacéuticas, agrícolas, tal como la protección de cultivos, y/o de cuidado personal.

[0083] La invención se refiere además a un método para la preparación de un polipéptido con actividad oxidoreductasa, donde este método comprende el cultivo de una célula según la invención bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido y, opcionalmente, la recuperación del polipéptido expresado y a un polipéptido obtenible por ese método.

Materia prima

[0084] Las plantas de cultivo agrícolas naturalmente ricas en fructanos (por ejemplo, el topinambur o las raíces de achicoria) se pueden convertir en una materia prima rica en HMF por hidrólisis (combinada) convencional y procesamiento termoquímico. La tecnología para generar HMF a partir de fructosa está bien establecida y es robusta. También se puede utilizar materia prima rica en glucosa, pero la formación termoquímica de HMF procede más eficazmente a partir de fructosa. Por lo tanto, se puede incluir un paso enzimático adicional para convertir glucosa en fructosa, usando glucosa isomerasa. Este último proceso está bien establecido en la industria alimentaria para producir jarabe de maíz rico en fructosa (JMRF) a partir de almidón hidrolizado. Para evitar la competencia con aplicaciones alimentarias, el hidrolizado lignocelulósico sería la materia prima preferida para producir HMF/FDCA.

Biotransformación

- [0085] Para la biotransformación de HMF a FDCA, se emplea un biocatalizador de células enteras robusto (células libres o inmovilizadas) que expresa la HMF oxidoreductasa de *Cupriavidus basilensis* descrita en la presente antes. Un biocatalizador de células enteras tiene varias ventajas sobre un catalizador enzimático en este proceso: la HMF oxidoreductasa está protegida de la inactivación química por el sustrato altamente reactivo y las deshidrogenasas autóctonas del huésped pueden asistir a la HMF oxidoreductasa en los dos primeros pasos de oxidación que conducen de HMF a (probablemente) el monoácido correspondiente, que entonces es convertido al diácido por la HmfH. Preferiblemente, se pueden requerir medidas adicionales para asegurar la regeneración del cofactor. El biocatalizador de células enteras debería permitir un procesamiento mínimo del corriente de alimentación de HMF, es decir, tolerar preferiblemente un pH bajo, una alta Tª y los compuestos tóxicos (entre ellos, el sustrato) generados en la hidrólisis/conversión termoquímica de la materia prima. *Pseudomonas putida* S12 puede que cuente con los requisitos para ser un organismo huésped adecuado en vista de su tolerancia a diversos factores estresantes químicos, su rango de pH relativamente amplio y la presencia de deshidrogenasas autóctonas que asisten a la HMF oxidoreductasa y dan como resultado una biotransformación más eficiente de HMF a FDCA.
- [0086] Como alternativa al biocatalizador de células enteras, de una manera similar al biocatalizador de células enteras, se pueden usar un lisado celular, enzima purificada o una enzima inmovilizada sola o como una mezcla de enzimas.

Recuperación de producto y biomasa

- [0087] Después de la biotransformación, las células se pueden separar del caldo por métodos establecidos y reutilizarse. El FDCA se puede recuperar del caldo acelular por precipitación ácida y se puede redisolver en un solvente orgánico adecuado a temperatura elevada. Tras la disolución, el FDCA se puede recuperar por precipitación ácida y extracción de solvente, u otros métodos de purificación conocidos en la técnica, a alta pureza en la forma de diácido, en el caso de que se desee.

Usos del FDCA

- [0088] El FDCA se puede usar como una alternativa al tereftalato en la producción de poliésteres. También se puede usar como un sustrato para una gran variedad de compuestos valiosos. Por ejemplo, son un sustrato conocido para la producción de ácido succínico, el 2,5-bis(aminometil)-tetrahidrofurano, el 2,5-dihidroximetil-tetrahidrofurano, el 2,5-dihidroximetilfurano y el 2,5-furandicarbaldehído. El FDCA se puede usar en la producción de recubrimientos, por ejemplo, en recubrimientos de resina alquídica y termoplásticos. También se puede usar como un xileno equivalente en biocombustibles y como solvente.
- [0089] El FDCA se puede esterificar, y los ésteres se pueden usar como plastificantes. Se puede convertir en su diol, que se puede usar en poliésteres de tipo PET y poliuretanos. Además, se puede convertir en su diamina, la diamina se puede usar como agente de extensión de cadena y la diamina se puede convertir en diisocianato, que se puede usar en la producción de poliuretanos. A través del proceso según la invención se puede producir FDCA y los productos obtenidos a partir del FDCA a partir de biomasa, incluida la biomasa lignocelulósica, a través de la biotransformación.

EJEMPLOS

Metodología General

- [0090] **Cepas y plásmidos** *Cupriavidus basilensis* HMF 14, depositado en la DSMZ: *Cupriavidus basilensis* HMF14 = DSM 22875, fecha de depósito: 19 de agosto de 2009, es un aislado del suelo que es capaz de usar furanos como una única fuente de carbono. *Pseudomonas putida* S12 (ATCC 700801) se usó como el huésped para la expresión de la HMF oxidoreductasa. *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) se usó a efectos generales de clonación. El plásmido lanzadera derivado de pUCP22 de *E. coli*-*P. putida* pJTmcs (no publicado) se usó para la expresión de la HMF oxidoreductasa bajo control del promotor *tac* constitutivo. Para la replicación en *E. coli*, se emplea el origen de replicación pUC; para la replicación en *P. putida*, se emplea el origen de replicación pRO1600. El promotor *tac* constitutivo dirige la expresión del gen *hmfH*. El gen marcador de β-lactamasa (*bla*) se usa para la selección antibiótica (resistencia a ampicilina) en *E. coli*. Para la selección antibiótica en *P. putida*, se usa el gen marcador de la gentamicina acetiltransferasa (*gmR*).

[0091] Un mapa plasmídico del vector de expresión de la HmfH pJT'hmfH se proporciona en la figura 2. Ptac', promotor *tac*; rep, origen de replicación de amplio rango de huéspedes; gmR, gen de resistencia a gentamicina; bla, beta-lactamasa; pUC ori, origen de replicación para *E. coli*.

[0092] **Medios y condiciones de cultivo:** se usó medio de sales minerales (MM) como medio definido. El MM contenía lo siguiente (por litro de agua desmineralizada): 3,88 g de K_2HPO_4 , 1,63 g de NaH_2PO_4 , 2,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mg de EDTA, 2 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,2 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,4 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ y 1 mg de $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, suplementado con una fuente de carbono como se ha especificado. Se usó caldo de Luria (caldo L: 10 g/l de Bacto triptona (Difco), 5 g/l de extracto de levadura (Difco), 5 g/l de NaCl) como medio completo para la propagación de *P. putida* S12 y cepas derivadas, *C. basilensis* HMF14 y *E. coli* DH5 α y derivados. El caldo L sólido se solidificó con 2 % (p/v) de agar (Difco).

[0093] Para experimentos por lote alimentado, la fase de carga inicial se realizó en 1 l de medio de sales minerales adaptado con la composición siguiente: 3,88 g de K_2HPO_4 , 1,63 g de NaH_2PO_4 , 2,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 20 mg de EDTA, 4 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,4 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,4 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,8 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mg de $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg/l de gentamicina y 100 mM de glicerol. Tras la reducción del glicerol inicial, la alimentación se inició y se controló para permitir el crecimiento máximo mientras se mantiene el glicerol como el sustrato limitante en el cultivo. La solución de alimentación contenía (por l): 368,4 g de glicerol y 10 g/l de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 12,6 g/l de DMF.

[0094] **Antibióticos:** se añadió ampicilina (AMP) a 100 μ g/ml para *E. coli*. Se añadió gentamicina (gm) a 30 μ g/ml en caldo de Luria y 10 μ g/ml en medio de sales minerales para *P. putida* S12. Los antibióticos se compraron de Sigma-Aldrich.

[0095] **Cultivo:** *P. putida* y *C. basilensis* se cultivaron a 30 °C. *E. coli* se cultivó a 37 °C. Se realizaron experimentos en matraces de agitación en MM en botellas de Boston (Alltech applied sciences BV; Breda, Países Bajos) en una incubadora de agitación horizontal. Se realizaron experimentos en matraces de agitación en caldo L en matraces Erlenmeyer con tapones de algodón en una incubadora de agitación horizontal. Se realizaron experimentos por lote alimentado en fermentadores de 1 l (New Brunswick Scientific) usando un controlador BioFlo110. La fermentación por lotes inicial se inició con células lavadas de un precultivo durante toda la noche en 100 ml de MM suplementado con 40 mM de glicerol y 2 mM de glucosa. La velocidad de agitación inicial se estableció en 200 r.p.m. y se suministró aire al espacio de cabeza a 1 l min⁻¹ usando un controlador de flujo de masas D-5111 de M+W Instruments. La tensión de oxígeno disuelto (OD) se monitoreó continuamente con una sonda InPro modelo 6900 (Mettler Toledo BV; Tiel, Países Bajos) y se mantuvo a un 30 % de saturación de aire por ajuste automático de la velocidad de agitación a un máximo de 1000 r.p.m. Cuando se alcanzó la velocidad de agitación máxima, el aire se sustituyó con oxígeno purificado con un flujo de 0,2 l min⁻¹ y la velocidad de agitación máxima se estableció en 800 r.p.m. El pH se mantuvo en 7,0 por adición automática de NH_4OH al 25 % durante la fase de carga inicial, el pH se mantuvo constante durante la fase de alimentación por adición automática de 10 mM de NaOH. La temperatura se mantuvo a 30°C.

[0096] **Ensayos y métodos analíticos:** el contenido de peso en seco celular (PSC) de cultivos bacterianos se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) usando un Biowave Cell Density Meter (WPA Ltd) o un espectrofotómetro de microplaca universal μ Quant MQX200 (Biotek), usando microplacas de 96-pocillos de fondo plano (Greiner). Una DO_{600} de 1,0 corresponde a 0,56 g PSC/l (Biowave) o 1,4 g PSC/l (μ Quant) para *P. putida*.

[0097] **Análisis HPLC:** se analizaron FDCA, HMF, alcohol de HMF y ácido HMF por RP-HPLC (sistema Agilent 1100) usando un detector de red de diodos ajustado a 230 nm. La columna usada fue una Zorbax Eclipse XDB-C8 (tamaño de los poros de 80Å, área de superficie de 180 m²/g, Agilent) operado a 25 °C. Como eluyente, se usó un gradiente de acetonitrilo en 20 mM de KH_2PO_4 (pH 2 o pH 6) con acetonitrilo al 1 % en un flujo de 1,2 ml/min, aumentando de un 0 a un 5 % en 3,5 min y de un 5 a un 40 % en 2,5 min.

[0098] **Preparación de extractos celulares:** se prepararon extractos celulares de *C. basilensis* HMF14 salvaje o transformantes de *P. putida* S12 que expresan HMF oxidoreductasa a partir de 50 ml de cultivos en fase de crecimiento exponencial tardía usando MM suplementado con o 12 mM de succinato (*C. basilensis* HMF14, $DO_{600} \approx 1.5$) o 20 mM de glucosa (*P. putida* S12, $DO_{600} \approx 4$). Los cultivos se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en 3 ml de tampón de ensayo. Las células se rompieron por sonicación, usando o un sonicador Branson (micropunta en modo de pulso, salida establecida en 3 y porcentaje de ciclo de trabajo establecido en un 40 %; 3 ciclos de sonicación: 45 s de pulsación y 15 s de pausa) o un Sonic Vibra-Cell (Sonics&Materials, EE.UU.) (micropunta cónica de 5 mm; modo de pulso establecido en 1 min (0,5 s de pulso, 2 s de pausa). Tras la sonicación, los restos se eliminaron por centrifugado

a 8228 × g durante 3 min a 4 °C. El sobrenadante se desaló usando una columna de filtración en gel PD10 (GE healthcare) y se usó como extracto celular para ensayos de HMF oxidorreductasa. La concentración de proteína se midió usando reactivo Bradford (Sigma-Aldrich).

[0099] **Ensayo de HMF oxidorreductasa:** se realizaron ensayos de HMF oxidorreductasa en extractos celulares de *C. basilensis* HMF14 salvaje o transformantes de *P. putida* S12 que expresan la HMF oxidorreductasa de *C. basilensis* HMF14. Como control negativo, se usó *P. putida* S12 salvaje o un mutante de *C. basilensis* HMF14 que llevaba la inserción de un transposón en el gen *hmfH*. El extracto celular se incubó con furfural, alcohol furfurílico, HMF o ácido HMF a 30 °C bajo condiciones oxigenadas. La mezcla reactiva contenía 1 ml de extracto celular, 976 µl de MM saturado de oxígeno, 20 µl de una solución 2 mM de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y 4 µl de un patrón 0,5 M de sustrato (furfural, alcohol furfurílico, HMF o ácido HMF). Las muestras se extrajeron en intervalos establecidos y la reacción se detuvo inmediatamente por adición de HCl a una concentración final de 1 M. Las concentraciones de sustrato y producto en las muestras se determinaron por HPLC. Como control pobre en oxígeno, se redujo el oxígeno de los diferentes componentes de la mezcla reactiva mediante una corriente continua de gas nitrógeno y la misma mezcla reactiva se incubó en viales de espacio de cabeza con un tapón de goma bajo gas nitrógeno.

[0100] **Productos químicos:** el patrón analítico de FDCA se compró de Immunosource B.V. (Halle-Zoersel, Bélgica). El ácido 5-hidroximetil-furoico (ácido HMF) se compró de Matrix Scientific (Columbia SC, Estados Unidos). Se descubrió que este compuesto estaba altamente esterificado. Inmediatamente antes del uso, una solución 10 mM del ácido HMF esterificado se hirvió durante dos horas en 2 M de H₂SO₄, se enfrió y se ajustó a pH 7,0 con NaOH tras la adición de 50 mM de tampón fosfato. Todos los demás productos químicos se compraron de Sigma-Aldrich Chemie B.V. (Zwijndrecht, Países Bajos).

[0101] **Técnicas moleculares y genéticas:** el ADN genómico se aisló usando el kit tisular DNeasy (QIAGEN). El ADN plasmídico se aisló con el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN). Los fragmentos de ADN retenidos en agarosa se aislaron con el kit QIAEXII gel extraction (QIAGEN).

[0102] Las reacciones de PCR se realizaron con la polimerasa Accuprime Pfx (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Los cebadores usados para amplificar la HMF oxidorreductasa a partir de ADN genómico de *C. basilensis* HMF14 fueron FN23: 5'-CGGAATTCACATGACAAGGGGAGACCG-3' (SEQ ID NO: 1) y FN24; 5'-CGGAATTCGCTTCGCTTCAACTCGGATG-3' (SEQ ID NO: 2). Las secuencias subrayadas indican un sitio de restricción EcoRI.

[0103] Se introdujo ADN plasmídico en células electrocompetentes usando un dispositivo de electroporación Gene Pulser (BioRad).

[0104] El ADN cromosómico que flanquea el transposón se identificó por métodos estándares conocidos en la técnica {Ausubel, F.M. et al. Current protocols in molecular biology (Green publishing association, Nueva York; 1987)} y la secuencia de los locus genéticos completos se obtuvieron por desplazamiento con cebador. La síntesis de oligonucleótidos y la secuenciación del ADN fueron realizadas por MWG Biotech AG (Alemania).

[0105] Otras técnicas de biología molecular estándares se realizaron según Sambrook y Russell {Sambrook, J, Russel, D.W. Molecular cloning; a laboratory manual (Cold spring Harbor Laboratory Press, Nueva York: 2001)}

Ejemplo I

Producción de FDCA en el extracto celular de *C. basilensis* HMF14

[0106] Cuando se incubó el extracto celular de *C. basilensis*, a partir de un precultivo de fase logarítmica tardía (DO₆₀₀ ≈ 1,5) cultivado en MM suplementado con 12 mM de succinato y 3 mM de HMF, con o HMF o ácido HMF, se observó la formación de FDCA.

[0107] Cuando se usó HMF como el sustrato, se observó una acumulación transitoria rápida de ácido HMF y alcohol de HMF concurrente con la formación de FDCA. En el extracto celular desalado, la concentración de ácido HMF disminuyó a una velocidad más lenta y la producción de FDCA fue más lenta en comparación con el extracto celular crudo. Ya que se produjo FDCA en el extracto celular desalado, así como en el extracto celular crudo, no pareció que la conversión de HMF a FDCA implique cofactores. Sin embargo, parece que los cofactores u otros componentes de bajo peso

molecular del extracto celular crudo tuvieron un efecto sinérgico en la formación de FDCA. Cuando se añadió ácido HMF como sustrato, se observó la formación inmediata de FDCA en el extracto celular tanto crudo como desalado. Se demostró además que se requería la presencia de oxígeno para la formación de FDCA, ya que no se produjo FDCA bajo condiciones anaeróbicas. Se observó la conversión estequiométrica del ácido HMF en FDCA.

5 **Ejemplo II**

Aislamiento y caracterización del gen *hmfH* que codifica la HMF oxidorreductasa

[0108] Se descubrió que el gen *hmfH* codifica una proteína de 62 317 Da perteneciente a la familia de la glucosa-metanol-colina (GMC) oxidorreductasa dependiente de FAD. Se demostró que esta enzima tiene la capacidad para oxidar ácido HMF a ácido furano-dicarboxílico (FDCA). Además, la enzima también aceptó el HMF como sustrato, que se oxidó, a través del ácido HMF, a FDCA. La máxima homología con la HmfH en la base de datos de NCBI no redundante se encontró con la GMC oxidorreductasa de *Burkholderia phytofirmans* PsJN (etiqueta del locus Bphyt_2180; 68 % de identidad sobre una extensión de 562 aminoácidos). En base a los datos de secuencia del operón HMF/furfural de *C. basilensis* HMF14 se identificaron otros potenciales agentes degradantes de HMF/furfural. Se evaluó el crecimiento de las cepas seleccionadas en medio de sales minerales con o HMF o furfural como la única fuente de carbono. Las cepas que fueron capaces de crecer en HMF tenían un ortólogo de *hmfH* codificante de oxidorreductasas que son entre un 45 y un 68 % idénticas a HmfH. Una cepa (*Burkholderia xenovorans* LB400) fue incapaz de utilizar HMF, aunque su oxidorreductasa era un 44 % idéntica a HmfH.

[0109] La figura 3 proporciona una representación esquemática de la organización genética de los genes metabólicos del furfural y el HMF en *C. basilensis* HMF14 (A) y otras especies (B) que se identificaron como potenciales utilizadores de furfural y/o HMF. Los colores corresponden a actividades enzimáticas en la figura 1. Los números en negrita (**x/y**) bajo las flechas indican el porcentaje de identidad (**x**) con respecto a la correspondiente extensión de aminoácidos de la proteína de *C. basilensis* HMF14 en **y**. Se identificaron genes ortólogos mediante búsquedas de homología de BLASTx en la base de datos de proteínas no redundante del National Center for Biotechnology Information. Las coincidencias para el agrupamiento de furfural se definieron como relevantes cuando los ortólogos para *hmfA*, *B*, *C*, *D* y *E* estaban presentes en un único genoma, donde el ortólogo de *hmfA* codificaba una enzima que era al menos un 50 % idéntica a HmfA. El mismo criterio se usó para definir los ortólogos de *hmfF* y *hmfG*, mientras que se usó un 40 % de identidad con la HmfH como criterio para los ortólogos de *hmfH*. Los números en cursiva indican las etiquetas del locus genómico de la cepa indicada. Las flechas blancas representan genes sin función metabólica. C: visión de conjunto del fenotipo de crecimiento de las cepas evaluadas en medio de sales minerales con o furfural o HMF (3 mM) como la única fuente de carbono. ND: no determinado.

[0110] En las figuras se proporcionan la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto que codifica la HMF-oxidorreductasa HmfH (Fig. 4) y la secuencia de aminoácidos deducida (Fig. 3).

Ejemplo III

Clonación de *hmfH* en *P. putida* S12 y expresión de la oxidorreductasa codificada

[0111] El gen *hmfH* que codifica la HMF oxidorreductasa se clonó en el vector de expresión pJT'mcs. El fragmento de PCR obtenido con los cebadores FN23 y FN24 sobre el ADN genómico de *C. basilensis* HMF14 se digirió con EcoRI (Fermentas). El fragmento digerido se ligó al vector pJT'mcs digerido por EcoRI y tratado con FastAP (Fermentas), lo que produjo el plásmido de expresión de la HmfH pJT'hmfH. La orientación correcta del inserto de *hmfH* se verificó por medios de digestión de control y por secuenciación de nucleótidos conocidos en la técnica. La expresión de HMF oxidorreductasa se demostró en extracto celular de *P. putida* pJT'hmfH cultivada en MM + 20 mM de glucosa y 10 mg/l de gentamicina (DO₆₀₀ ≈ 4) por la formación de FDCA usando HMF o ácido HMF como sustrato (tabla 1).

Tabla 1. Formación de FDCA a partir de ácido HMF o HMF en extracto celular de *P. putida* pJT'hmfH. Como control, se usó extracto celular de *P. putida* S12 que alberga el vector de expresión vacío pJT'mcs.

	Oxígeno	
extracto celular	sí	no
desalado	+	-

no desalado	+	-
control, desalado	-	-
control, no desalado	-	-

[0112] Estos resultados confirmaron que la formación de FDCA ocurre solo en presencia de oxígeno y la cataliza la oxidoreductasa codificada por *hmfH*. Cuando se usó HMF como sustrato, se observó la acumulación transitoria de ácido HMF en extracto celular tanto desalado como crudo. La formación de ácido HMF en el extracto celular desalado (cofactores de bajo PM eliminados) indicó que la HmfH no solo oxidó el ácido HMF a FDCA, sino que puede oxidar también el HMF a su forma de ácido monocarboxílico.

[0113] Además de la HmfH, también las deshidrogenasas aparentemente no específicas que son autóctonas de *P. putida* S12 pueden formar ácido HMF a partir de HMF (tabla 2), siempre que los equivalentes reductores no se eliminen por desalación. La actividad aldehído reductasa/alcohol deshidrogenasa fue dependiente de NADH/NAD⁺, mientras que la actividad aldehído deshidrogenasa pudo sostenerse con una combinación de los dos portadores de electrones artificiales, PMS y DCPIP, donde el PMS es el portador de electrones primario y el DCPIP es el aceptor de electrones final. También se observaron actividades similares en el extracto celular de *C. basilensis* HMF14.

Tabla 2. Actividades de HMF-deshidrogenasa no específicas medidas en extracto celular de *P. putida* S12 salvaje.

Actividad enzimática	Sustrato	Producto	Cofactor	<i>P. putida</i> S12
aldehído reductasa	HMF	alcohol de HMF	NADH	1106
alcohol deshidrogenasa	alcohol de HMF	HMF	NAD ⁺	ND
aldehído deshidrogenasa	HMF	ácido HMF	PMS/DCPIP	8

ND: no determinado por falta de sustrato disponible comercialmente. Actividades representadas en U g⁻¹ de proteína. PMS/DCPIP: metosulfato de fenazina/2,6-diclorofenol-indofenol.

[0114] En la figura 4 se muestra la formación de FDCA, alcohol de HMF (H-oh) y ácido HMF (ácido H) a partir del HMF en el extracto celular crudo de *P. putida* S12 pJT^{hmfH}. La figura 4 ilustra los efectos sinérgicos de las deshidrogenasas endógenas y la HmfH en el extracto celular de *P. putida* S12 pJT^{hmfH}. Primero, se observó una disminución rápida del HMF concomitante con la formación de alcohol de HMF que fue probablemente catalizada por una aldehído reductasa. Al mismo tiempo, también comenzó a acumularse ácido HMF (posiblemente a través de la aldehído deshidrogenasa) y FDCA (a través de la HmfH). Inmediatamente tras la formación, el alcohol de HMF desapareció, probablemente a través de la reoxidación a HMF, ácido HMF y FDCA. Solo el ácido HMF mostró una acumulación significativa antes de ser oxidado (casi) completamente a FDCA en un intervalo temporal de 25 h. Estos resultados sugieren que la oxidación de ácido HMF a FDCA fue el paso limitante de la velocidad en este sistema acelular.

Ejemplo IV

Transformación de células enteras de HMF a FDCA con *P. putida* S12 que expresa HmfH

[0115] Debido a que las deshidrogenasas endógenas de *P. putida* S12 pueden actuar sinérgicamente con la HmfH en la oxidación del HMF a FDCA proporcionando un medio adicional de generación de ácido HMF a partir de HMF, un proceso de biotransformación de células enteras de HMF en FDCA puede tener ventajas sobre un proceso enzimático. Para investigar esta posibilidad, se evaluó la producción de HMF a FDCA en células en reposo, células en crecimiento y células rotas.

[0116] Se cultivaron cultivos en frascos de agitación en 150 ml de MM + 40mM de glicerol y 2 mM de glucosa suplementada con 10 mg/l de gentamicina en matraces Erlenmeyer de 1 l. Las células se cosecharon al final de la fase logarítmica (DO₆₀₀ ≈ 4), se lavaron y se concentraron en MM suplementado con 19,4 g/l de K₂HPO₄, 8,15 g/l de NaH₂PO₄, 40 mM de glicerol y 10 mg/l de gentamicina. Se incubaron alícuotas (10 ml) de las suspensiones celulares concentradas (correspondientes a 1,65 g de PSC) con HMF en matraces Erlenmeyer de 250 ml y se extrajeron muestras en intervalos regulares para el análisis del FDCA. Para las células en reposo, glicerol se omitió del medio de resuspensión y las células rotas se obtuvieron por sonicación.

[0117] Como se ha observado previamente, el HMF se convirtió rápidamente en alcohol de HMF y ácido HMF, seguido de un descenso de ácido HMF y la formación concurrente de FDCA. Tanto las velocidades de producción de FDCA como las velocidades de disminución de ácido HMF se presentan en la tabla IV-a, para dos concentraciones de HMF evaluadas.

5 Tabla 3. Producción de FDCA a partir de HMF y velocidad de disminución de ácido HMF usando células en crecimiento, células en reposo y células sonicadas de *P. putida* S12 pJT^{hmfH}, a diferentes concentraciones de partida de HMF.

concentración de HMF (mM)	Velocidad de disminución de ácido HMF (μmol/gPSC/h)			Velocidad de producción de FDCA (μmol/gPSC/h)		
	células en crecimiento	células en reposo	células rotas	células en crecimiento	células en reposo	células rotas
25	194 ± 10 ^b	120 ^a	73 ^a	145 ± 3,5 ^b	115 ^a	115 ^a
50	377 ± 27 ^b	ND ^c	ND ^c	450 ± 80 ^b	ND ^c	ND ^c
a) Se observó una conversión incompleta de ácido HMF a FDCA. b) Experimentos duplicados; la variación es la desviación máxima de la media de dos experimentos independientes. c) ND = no determinado						

10 [0118] La tabla 3 muestra que la producción de FDCA fue más eficiente con células en crecimiento de *P. putida* S12 que expresan HmfH. La velocidad de producción de FDCA total, la eficiencia de conversión, así como la velocidad de disminución de ácido HMF fueron mayores para las incubaciones de células en crecimiento. Además, la velocidad de producción de FDCA fue dependiente de la concentración inicial de HMF lo que sugiere que el sistema no estaba saturado.

Ejemplo V

Producción de FDCA por lote alimentado de HMF con *P. putida* S12 que expresa HmfH

15 [0119] La producción de FDCA resultó ser más eficiente con células en crecimiento de *P. putida* S12 que expresa HmfH. Por lo tanto, se realizaron experimentos por lote alimentado para demostrar la producción de FDCA con células enteras de *P. putida* S12 pJT^{hmfH}.

20 [0120] En la fase inicial, se cultivó *P. putida* pJT^{hmfH} en MM con una alimentación de glicerol a una densidad celular de 13 g PSC/l. Al final de esta fase, se inició la alimentación de HMF, administrando HMF a una velocidad de 0,8 mmol/l/h. Sin coalimentación de glicerol, el ácido HMF y el FDCA se formaron a una velocidad igual de 0,41 mmol/l/h (véase la Fig. 5). Posteriormente la alimentación se sustituyó por una solución que contenía 0,21 M de HMF y 4 M de glicerol, alimentado a aproximadamente 5 ml/h. Con esta coalimentación de glicerol, la concentración de ácido HMF se redujo rápidamente, mientras que la formación de FDCA continuó a aproximadamente la misma velocidad (Fig. 5). El experimento se detuvo cuando una cantidad total de 44,6 mmol de HMF se había añadido al lote alimentado. Los resultados mostraron una conversión casi completa (es decir, un 96,5 % de eficiencia) a FDCA.

25 [0121] En un experimento similar, se coalimentó glicerol a una velocidad media de 0,7 mmol/l/h junto con HMF. En este cultivo por lote alimentado, no se observó ninguna acumulación del producto intermedio de ácido HMF y todo el HMF se convirtió directamente a FDCA (Fig. 6).

Ejemplo VI

Purificación de FDCA a partir de caldo de fermentación

30 [0122] Se descubrió que la solubilidad del FDCA a un pH de 1,0 era de alrededor de 1,5 g/l en agua. Esta propiedad se empleó ventajosamente para la recuperación del producto de FDCA del caldo de fermentación. Tras la eliminación de células por centrifugación (9500 x g durante 5 min), se añadieron aproximadamente 10 ml de H₂SO₄ al 96 % a 100 ml del caldo clarificado a temperatura ambiente bajo agitación continua hasta pH 1, para precipitar el FDCA. El precipitado se recuperó por centrifugación a 8228 x g durante 10 min y el sedimento secado al aire se redisolvió en metanol a 60

°C. Tras la eliminación de los residuos no disueltos por filtración a través de un filtro de 0,22 µm precalentado, se analizó la pureza del filtrado por HPLC. La pureza del FDCA recuperado del caldo de fermentación por el procedimiento anterior fue aproximadamente de un 65 %. puede conseguirse una purificación adicional de FDCA usando métodos bien conocidos en la técnica.

5 **Ejemplo VII**

Producción de FDCA por lote alimentado a partir de HMF con *P. putida* S12 que expresa HmfH

[0123] Un segundo experimento de producción de FDCA por lote alimentado se realizó para aumentar el título de FDCA y la productividad con células enteras de *P. putida* S12 pJT^{hmfH}.

[0124] En la fase de carga inicial, se cultivó *P. putida* pJT^{hmfH} en MM hasta que se redujo el glicerol inicial ($DO_{600} \approx 8$) tras 23,2 horas de fermentación. En este punto, la alimentación de glicerol se inició a una velocidad que permitió un aumento de biomasa de aproximadamente 0,45 g PSC/l/h. Tras 50,7 horas de fermentación, la alimentación de glicerol se disminuyó a una velocidad que permitió un aumento de biomasa de aproximadamente 0,045 g PSC/l/h. Tras 123,4 horas de fermentación, se aumentó la alimentación de glicerol a una velocidad que permitió un aumento de biomasa de aproximadamente 0,25 g PSC/l/h hasta el final de la fermentación. Durante este periodo, se aplicó una alimentación de HMF. La alimentación de HMF comenzó a una velocidad de 0,65 mmol/h/g PSC tras 26,7 horas de fermentación, lo que condujo a la acumulación tanto de ácido HMF como de FDCA. La velocidad de alimentación de HMF se disminuyó a 0,28 mmol/h/g PSC tras 33,3 horas de fermentación, se disminuyó adicionalmente a 0,09 mmol/h/g PSC tras 72,8 horas de fermentación y se detuvo tras 117,4 horas de fermentación. La alimentación de HMF decreciente llevó a una disminución gradual de la concentración de ácido HMF en el fermentador, mientras que la concentración de FDCA continuó aumentando. La fermentación se detuvo cuando no se pudo detectar más ácido HMF. En este punto se añadieron 188 mmol de HMF al fermentador, lo que condujo a la producción de aproximadamente 182 mmol de FDCA (es decir, una eficiencia de un 97%) a una concentración de 30,8 g/l. La Figura 7a muestra la formación de biomasa, ácido HMF y FDCA en el cultivo por lote alimentado de *P. putida* pJT^{hmfH}. La Figura 7b muestra las velocidades de alimentación de glicerol y HMF del mismo cultivo.

25 **Ejemplo VIII**

Purificación de FDCA a partir de caldo de fermentación

[0125] Se descubrió que la solubilidad de FDCA a un pH de 0,5 fue de alrededor de 0,4 g/l en agua. Como esta concentración permanece en solución tras la precipitación, el título aumentado obtenido en el ejemplo VIII lleva a una pérdida mucho más reducida del producto de la purificación por precipitación.

[0126] Tras la eliminación de células por centrifugación (9500 x g durante 15 min), se hirvieron 500 ml del caldo clarificado durante 3 minutos para precipitar proteínas y se centrifugaron durante 20 min a 9500 x g. Se añadieron aproximadamente 50 ml de H₂SO₄ al 96 % al sobrenadante a 4°C bajo agitación continua hasta pH 0,5, para precipitar el FDCA. El precipitado se recuperó por centrifugación a 8228 x g durante 20 min, se lavó una vez con 250 ml de agua y se centrifugó de nuevo a 8228 x g durante 20 min. El sedimento resultante se secó al aire y luego se disolvió en aproximadamente 1200 ml de tetrahidrofurano (THF) a 30 °C. Tras la eliminación de residuos no disueltos por filtración, la solución de THF clarificada se evaporó bajo vacío a 50 °C hasta que quedaron 11,8 g de polvo de FDCA seco con una alta pureza (>99%), que es un 78% del FDCA inicialmente en el caldo de fermentación. Si es necesario, la purificación de FDCA se puede optimizar adicionalmente usando métodos bien conocidos en la técnica.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 [0127]

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD OXIDORREDUCTASA Y SUS USOS

<130> 27470-WO-PCT

<160> 4

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 28

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 1

10 cggaattcca catgacaagg ggagaccg 28

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> ADN sintético

<400> 2

cggaattcgc ttcggtcttc aactcggatg 30

<210> 3

20 <211> 579

<212> PRT

<213> Cupriavidus basilensis

<400> 3

Met Asp Thr Pro Arg Glu Arg Phe Asp Tyr Val Ile Val Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Asn Arg Leu Ser Gln Asp Pro Ala Ile
20 25 30

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

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

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

Ser Lys Val Tyr Glu Gln Gly Arg Val Met Gly Gly Gly Ser Ser Ile
85 90 95

ES 2 744 466 T3

Asn Val Gln Ala Ala Asn Arg Gly Leu Pro Arg Asp Tyr Asp Glu Trp
 100 105 110

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

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

Gly Ser His Gly Pro Val Pro Ile Arg Arg Ile Leu Pro Gln Ala Trp
 145 150 155 160

Pro Pro Phe Cys Thr Glu Phe Ala His Ala Met Gly Arg Ser Gly Leu
 165 170 175

Ser Ala Leu Ala Asp Gln Asn Ala Glu Phe Gly Asp Gly Trp Phe Pro
 180 185 190

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

Tyr Leu Asp Ala Asp Thr Arg Arg Arg Ala Asn Leu Arg Ile Tyr Ala
 210 215 220

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

Val Ile Ala Met Arg Ala Asp Gly Ser Arg Leu Ala Leu Asp Ala Gly
 245 250 255

Glu Val Ile Val Ser Ala Gly Ala Leu Gln Ser Pro Ala Ile Leu Met
 260 265 270

Arg Ala Gly Ile Gly Asp Ala Gly Ala Leu Gln Ala Leu Gly Ile Glu
 275 280 285

Val Val Ala Asp Arg Pro Gly Val Gly Arg Asn Leu Gln Asp His Pro
 290 295 300

Ala Leu Thr Phe Cys Gln Phe Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Met Pro Leu
 305 310 315 320

Ser Arg Arg Arg Ala Ser Met Thr Ala Ala Arg Phe Ser Ser Gly Val
 325 330 335

Pro Gly Gly Glu Ala Ser Asp Met Tyr Leu Ser Ser Ser Thr Arg Ala
 340 345 350

Gly Trp His Ala Leu Gly Asn Arg Leu Gly Leu Phe Phe Leu Trp Cys
355 360 365

Asn Arg Pro Phe Ser Arg Gly Gln Val Ser Leu Ala Gly Ala Gln Pro
370 375 380

Asp Val Pro Pro Met Val Glu Leu Asn Leu Leu Asp Asp Glu Arg Asp
385 390 395 400

Leu Arg Arg Met Val Ala Gly Val Arg Lys Leu Val Gln Ile Val Gly
405 410 415

Ala Ser Ala Leu His Gln His Pro Gly Asp Phe Phe Pro Ala Thr Phe
420 425 430

Ser Pro Arg Val Lys Ala Leu Ser Arg Val Ser Arg Gly Asn Val Leu
435 440 445

Leu Thr Glu Leu Leu Gly Ala Val Leu Asp Val Ser Gly Pro Leu Arg
450 455 460

Arg Ser Leu Ile Ala Arg Phe Val Thr Gly Gly Ala Asn Leu Ala Ser
465 470 475 480

Leu Leu Thr Asp Glu Ser Ala Leu Glu Gly Phe Val Arg Gln Ser Val
485 490 495

Phe Gly Val Trp His Ala Ser Gly Thr Cys Arg Met Gly Ala His Ala
500 505 510

Asp Arg Ser Ala Val Thr Asp Ala Ala Gly Arg Val His Asp Val Gly
515 520 525

Arg Leu Arg Val Ile Asp Ala Ser Leu Met Pro Arg Leu Pro Thr Ala
530 535 540

Asn Thr Asn Ile Pro Thr Ile Met Leu Ala Glu Lys Ile Ala Asp Thr
545 550 555 560

Met Gln Ala Glu Arg Arg Ala Val Arg Pro Ala Ser Ser Glu Val Ala
565 570 575

His Pro Ser

<210> 4
 <211> 1740
 <212> ADN
 <213> Cupriavidus basilensis

5 <400> 4

atggatacgc cgagggagcg tttcgactac gtgattgttg gcggcgggtc cgccgggttg	60
gtactggcca atcgccgtgc gcaggaccgc gccatccgcg tcgcgctgat cgagggcgggc	120
gtcgatacgc cgccggacgc tgtgccggcg gagatcctcg acagctatcc gatgcccttg	180
ttcttcggtg accggtatat ctggccatcg ctgcaagccc gcgccgtggc agggggcagg	240
tccaaggtct acgagcaagg gcgcgtcatg ggcgggcggt ccagcatcaa cgtgcaggcg	300
gcaaaccgcg ggctgccgcg cgactacgat gaggggccgc cgtcgggcgc gtccggatgg	360
tcgtggcagg atgtgctgcc gtatttcgcg caccttgagc gcgatgtgga ttacggcaac	420
agcccgtgc acggcagcca cggaccggtg ccgatccgcc gcatcctgcc gcaggcttgg	480
ccgccgttct gcacggagtt tgcgcacgcg atggggccga gcggcttgtc cgcgctggcc	540
gaccagaacg cggagttcgg cgatggctgg tttccggccg ccttctcgaa cctggatgac	600
aagcgggttt cgaccgccat cgcctatctc gacgcggata cgcgccggcg ggccaatctg	660
cggatctatg ccgagacaac ggtgcgcaag ctcgctgtat ccggccggga agcgcgtggg	720
gtgatcgcca tgcgggccga tgggtcgcgg ctggcgctgg acgccgggga ggtcatcgtg	780
tccgcggggc ccttgagtc gcccgccatc ctgatgcgcg cggggatcgg cgacgcgggc	840
gcgctgcagg ccctcggcat cgaggtcgta gccgaccgac ccggcgttgg ccgcaatctc	900
caggatcatc ccgcgctgac gttctgccag ttcctcgcgc ccagtagccg catgccgctc	960
tcgcgccggc gcgctagcat gacggcgggc cggttctcat cgggggtgcc aggtggcgag	1020
gcgtcggaca tgtacctgac cagttccaca cgggcaggct ggcattgcact cggtaatcgg	1080
ctcggcctct tcttctctgt gtgcaatcgg ccattctcgc gcgggcaggc gagccttgcg	1140
ggagcccagc cggatgtgcc gcccatggtg gagctcaacc tgctcgacga cgagcgggat	1200
ctgcggcgca tgggtggccg cgtagcgaag ttggtgcaga tcgtgggtgc gtcggccttg	1260
catcagcatc ccggtgattt cttccccgct acgttttcgc cgcgcgtcaa ggcgctgagc	1320
cgcgtgagcc gcggcaatgt gttgctcacg gaggttgctg gggcagtgtg tgatgtctcg	1380
gggccgctgc gcagaagcct gatcgcgcgc tttgtcacgg gcggcgcaaa cctggccagc	1440
ctgctgacgg atgagtccgc gctagagggc ttcgtgcgcc agagcgtctt cggggtctgg	1500
catgccagcg gcacttgccg gatgggcgcg catgcggacc ggagcgcggg gacggatgcg	1560
gcggggccgcg ttcacgatgt tggcaggctg cgcgttattg acgcctctct gatgccgcgg	1620
ctgccgacgg ccaataccaa catccccacc atcatgctcg cggaaaagat tgccgacacc	1680
atgcaagccg agcgcgcgcg ggtccggccg gcatcgagcg aagttgccca tccgagttga	1740

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido con actividad oxidorreductasa de la clase EC 1.1 y EC 1.2 donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

2. Polinucleótido que comprende:

- (a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 4;
 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad oxidorreductasa, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3; o
 (c) una secuencia de nucleótidos que es el complemento inverso de una secuencia de nucleótidos tal y como se define en (a) o (b).

3. Construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido según la reivindicación 2.

4. Vector que incorpora el polinucleótido según la reivindicación 2 o la construcción de ácido nucleico según la reivindicación 3.

5. Célula que incluye una construcción de expresión para la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica una oxidorreductasa con una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, donde dicha construcción de expresión es expresable en dicha célula y la expresión de la misma confiere a o aumenta en la célula la capacidad para oxidar el 5-hidroximetilfurfural (HMF) y el ácido 5-hidroximetil-2-furanocarboxílico (ácido HMF) a ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA), en comparación con una célula salvaje correspondiente que carece de la construcción de expresión.

6. Célula según la reivindicación 5, **caracterizada por el hecho de que** la célula es:

- una bacteria elegida del grupo que consiste en los géneros *Escherichia*, *Anabaena*, *Caulobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium* (*Sinorhizobium*), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus* o *Streptomyces*; o las especies *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilis*, *B. megaterium*, *B. halodurans*, *B. pumilus*, *G. oxydans*, *Caulobacter crescentus* CB 15, *Methylobacterium extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas putida*, *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *E. coli*, *C. glutamicum*, *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces lividans*, *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium radiobacter*, o
- una célula de levadura elegida del grupo que consiste en los géneros *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*; o las especies *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* y *Pichia pastoris* o una célula fúngica filamentosa del grupo de los géneros *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Talaromyces* o *Trichoderma*; o las especies *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus fumigatus*, *Talaromyces emersonii*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium lucknowense*, *Trichoderma reesei* o *Penicillium chrysogenum*.

7. Proceso para la producción de ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA), donde uno o más precursores furánicos del FDCA se convierte a FDCA, por reacción con un oxidante en presencia de un catalizador de oxidorreductasa y opcionalmente una o más coenzimas, **caracterizado por el hecho de que** el catalizador de oxidorreductasa comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

8. Proceso según la reivindicación 7, **caracterizado por el hecho de que** el precursor furánico del FDCA se elige del grupo que consiste en 5-hidroximetilfurfural (HMF), 2,5-dihidroximetilfurano (alcohol de HMF) y ácido 5-hidroximetil-2-furanocarboxílico (ácido HMF), preferiblemente el precursor furánico es el HMF.

9. Proceso según la reivindicación 7 u 8, **caracterizado por el hecho de que** el precursor furánico del FDCA es el HMF y el HMF se obtiene a partir de uno o más azúcares de hexosa por calentamiento en presencia de ácido, donde preferiblemente el uno o más azúcares de hexosa se obtiene a partir de biomasa.

10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, **caracterizado por el hecho de que** la coenzima es el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) y/o la pirroloquinolina quinolona (PQQ) y/o el dinucleótido de flavina y adenina (FAD).
- 5 11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, donde el catalizador de oxidorreductasa es un extracto acelular de una célula, donde el catalizador de oxidorreductasa comprende un polipéptido con actividad oxidorreductasa y donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7-11, donde el catalizador de oxidorreductasa es un biocatalizador de células enteras donde una célula es como se define en la reivindicación 5.
- 10 13. Proceso según la reivindicación 12, donde la célula se elige de una especie de bacteria, de célula de levadura o de célula fúngica filamentosa como se define en la reivindicación 6.
14. Método para la preparación del polipéptido con actividad oxidorreductasa de clase EC 1.1 y EC 1.2, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, y donde el método comprende el cultivo de la célula como se define en la reivindicación 5 o 6 bajo condiciones
- 15 15. Uso de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 o una variante de dicho polipéptido con al menos un 60% o más identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 3 como una oxidorreductasa de clase EC 1.1 y EC 1.2.

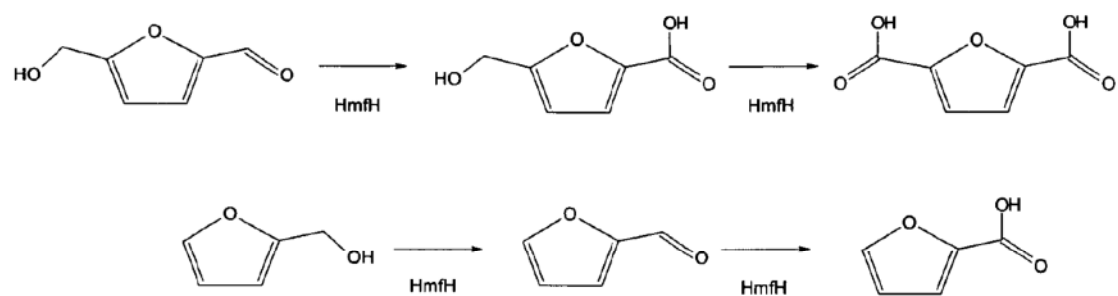


Fig. 1

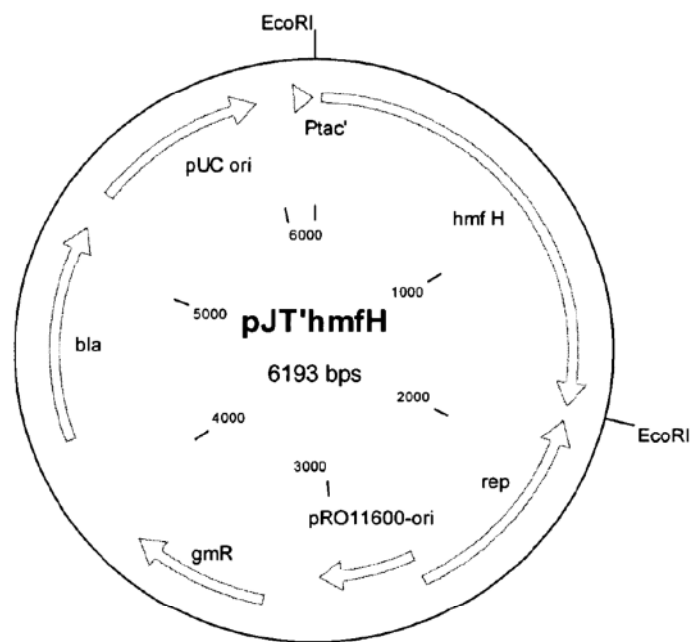


Fig. 2

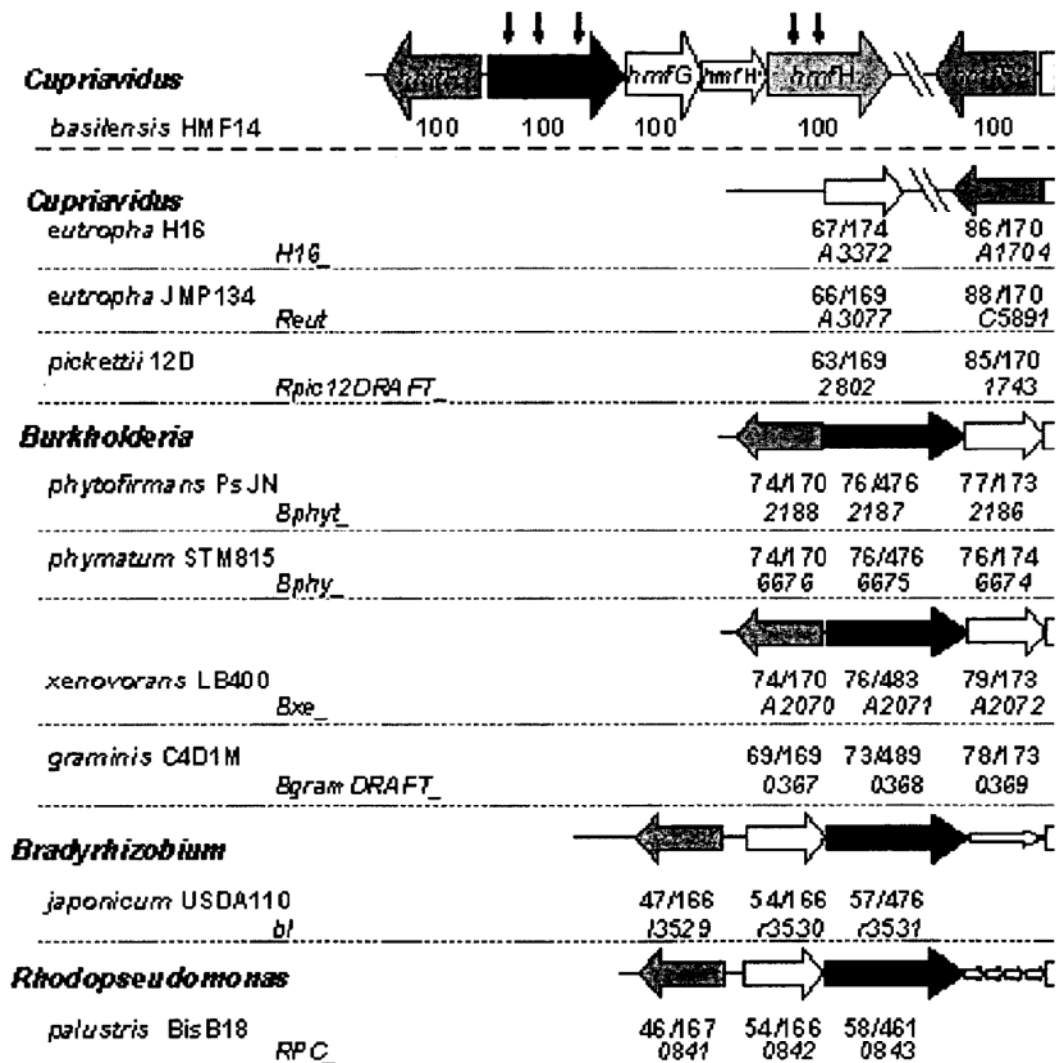


Fig. 3A

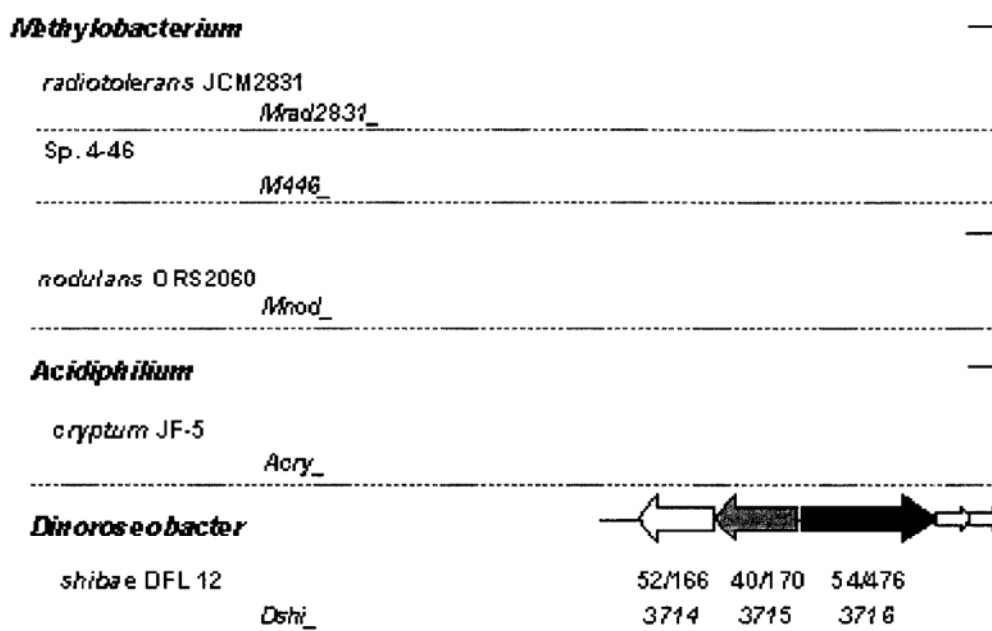


Fig. 3B

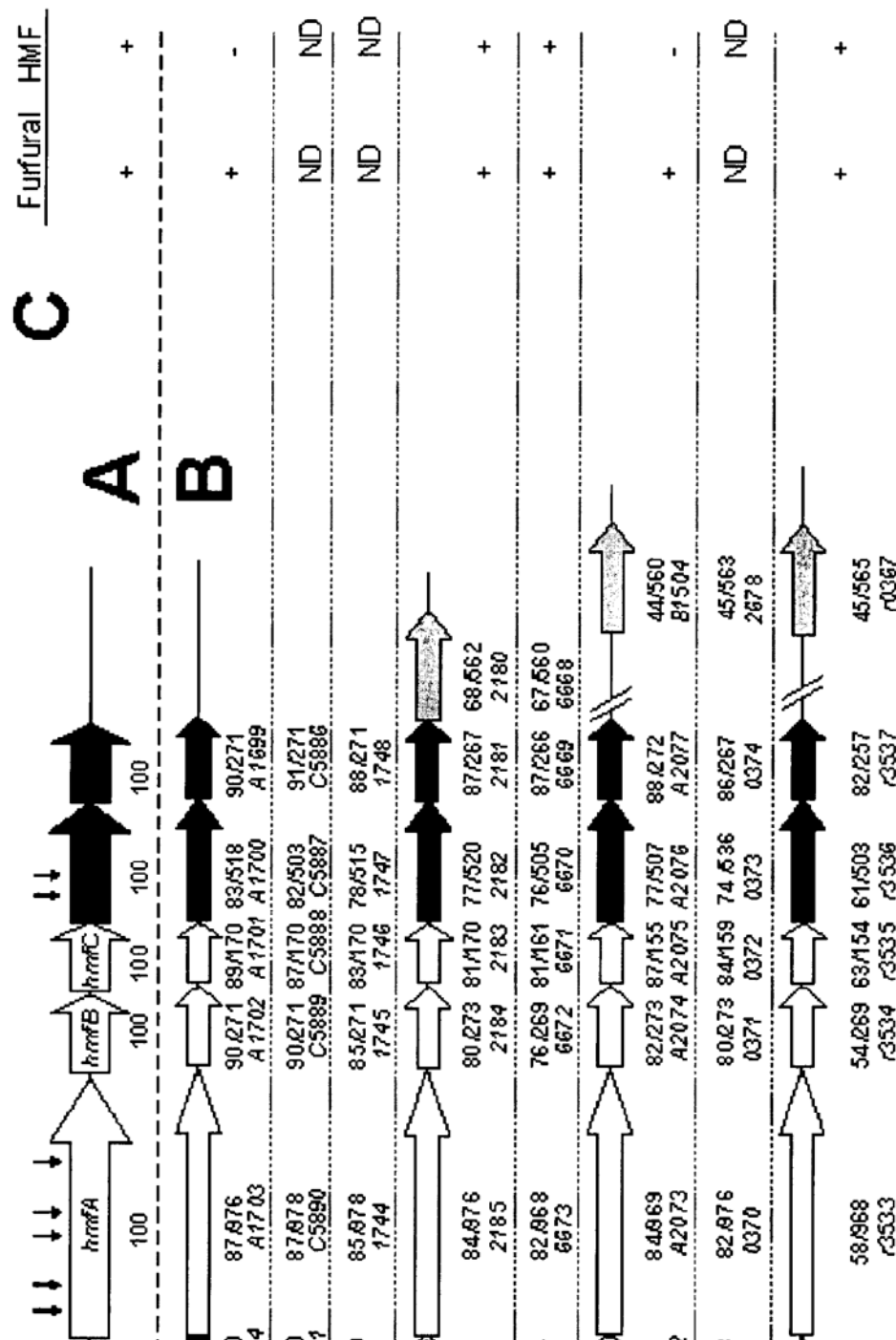


Fig. 3C

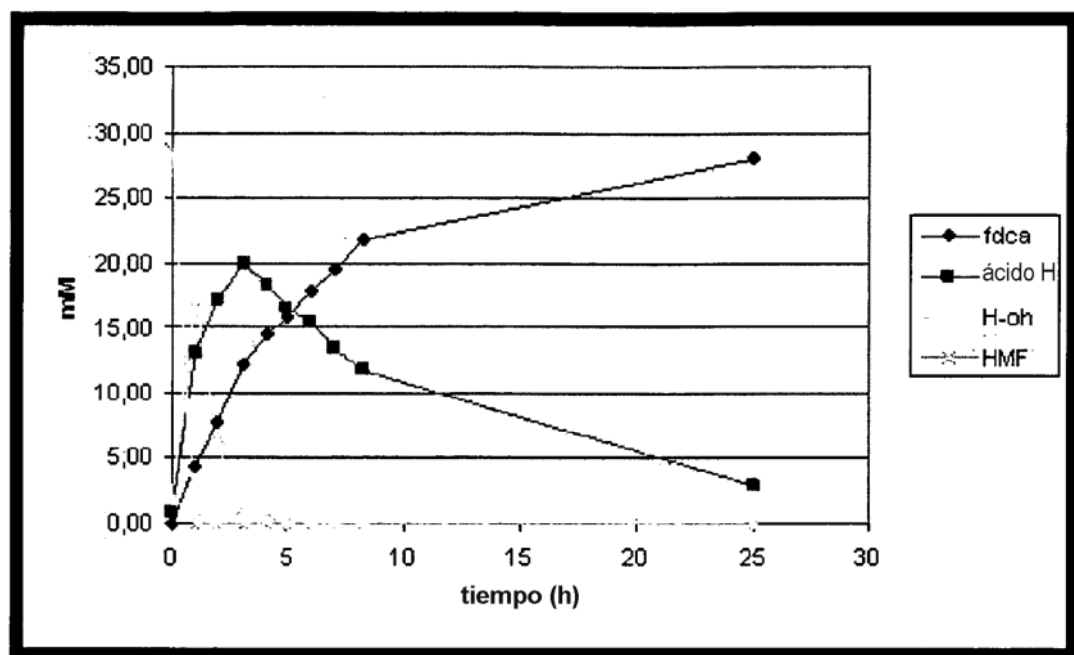


Fig. 4

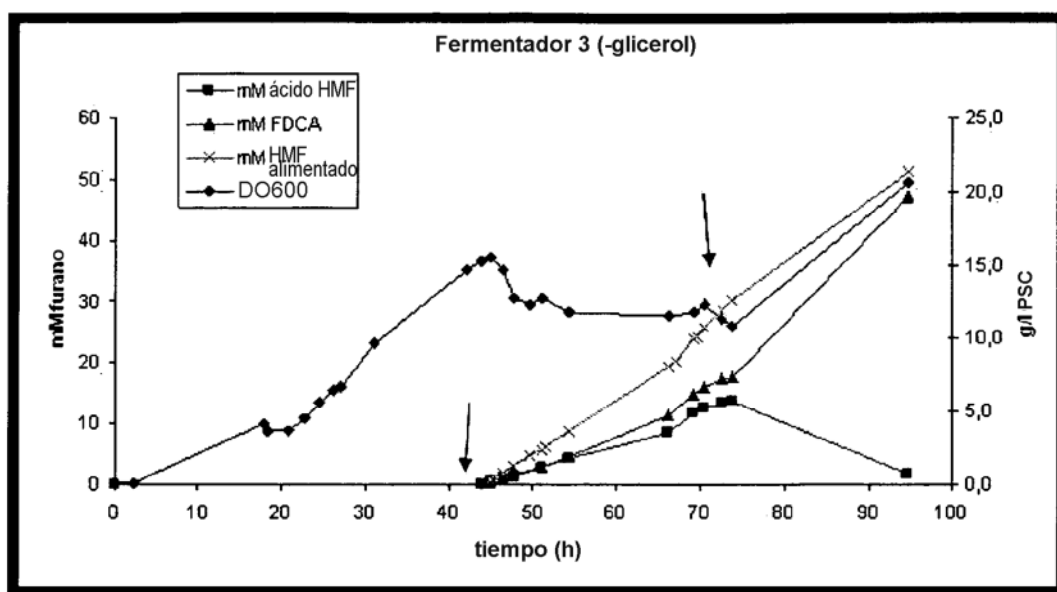


Fig. 5

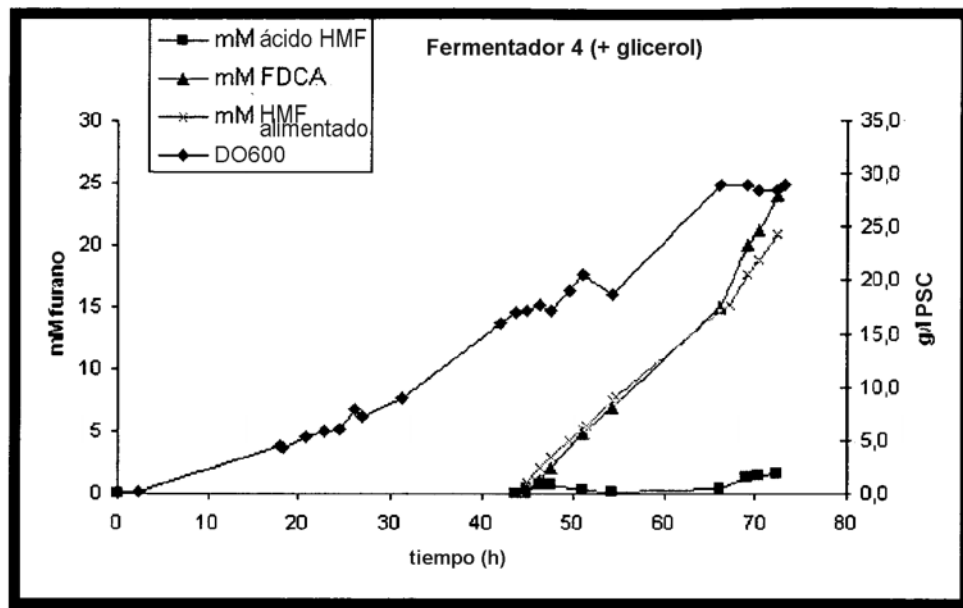


Fig. 6

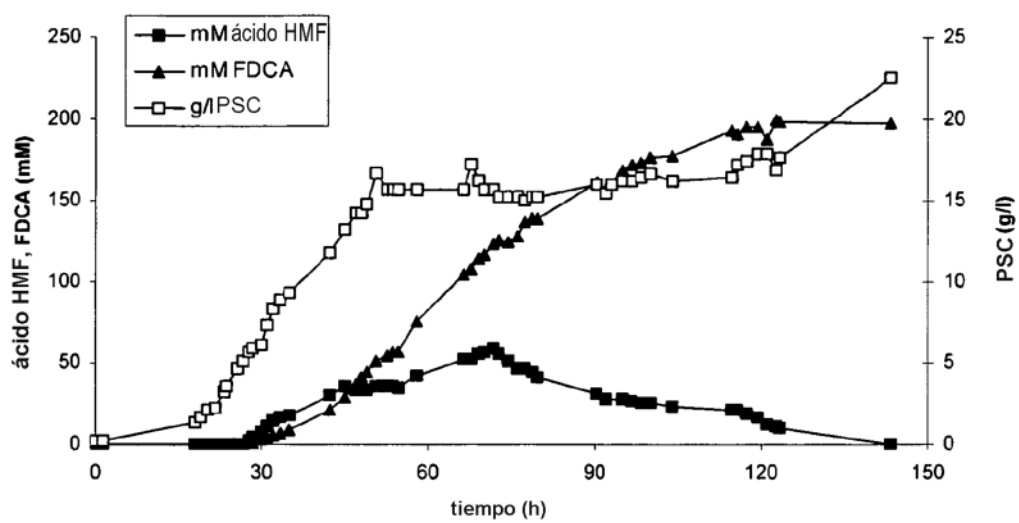


Fig. 7A

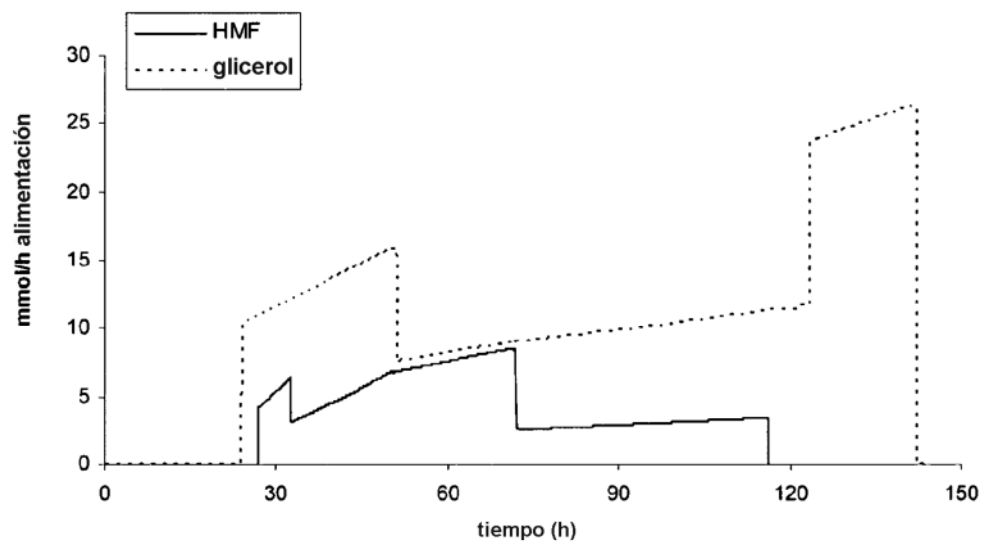


Fig. 7B