

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 824**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/62** (2006.01)

**C12P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2016 PCT/EP2016/071150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17042254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2016 E 16777914 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3347479**

54 Título: **Producción enzimática de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído**

30 Prioridad:

**10.09.2015 EP 15184678**

**29.02.2016 EP 16157821**

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

**01.06.2020**

73 Titular/es:

**SCIENTIST OF FORTUNE S.A. (100.0%)**

**296-298 Route de Longwy  
1940 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**MARLIERE, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 763 824 T3

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

## DESCRIPCIÓN

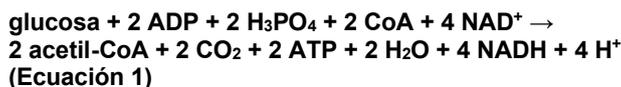
Producción enzimática de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción enzimática de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído, utilizando dicho procedimiento una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa, así como al uso de una fosfoacetolasa o de una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa o de un microorganismo que expresa una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa para la producción de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído.

Además, se refiere a composiciones que contienen (a) un 2-hidroxialdehído y una fosfoacetolasa y/o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa; o (b) un 2-hidroxialdehído y un microorganismo que expresa una fosfoacetolasa y/o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa, en las que el microorganismo ha sido genéticamente modificado mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica dicha enzima(s).

Durante las últimas décadas, los profesionales de la ingeniería metabólica se han esforzado por explorar soluciones biológicas para la producción de productos químicos, proporcionando así alternativas a los procedimientos químicos más tradicionales. En general, las soluciones biológicas permiten la utilización de materias primas renovables (por ejemplo, azúcares) y compiten con procedimientos petroquímicos existentes. Una solución biológica de varios pasos para la producción de un producto químico generalmente comprende un microorganismo como catalizador para la conversión de la materia prima en una molécula diana. Un conjunto completo de reacciones enzimáticas para la producción de una molécula diana particular puede agruparse en las que pertenecen a las rutas centrales de carbono y las que pertenecen a la ruta específica del producto. Las reacciones que pertenecen a las rutas centrales del carbono y específicas del producto están vinculadas en esas restricciones de oxidorreducción (normalmente, NAD(P)H) y energéticas (normalmente, ATP) de cada reacción enzimática que deben tenerse en cuenta en un equilibrio general que contribuya a la competitividad del procedimiento. Históricamente, las rutas centrales de carbono de los heterótrofos que crecen en azúcares se han descrito como la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMPP (de sus siglas en inglés); es decir, "glucólisis"), la ruta de la pentosa fosfato (PPP, de sus siglas en inglés), la ruta Entner-Doudoroff (EDP, de sus siglas en inglés) y ruta de fosfoacetolasa (PKP, de sus siglas en inglés) (véase Gottschalk (1986), *Bacterial Metabolism*, 2ª Edición, Springer-Verlag, Nueva York). Cada ruta central o combinaciones de rutas centrales ofrecen ventajas y desventajas con respecto a una molécula diana específica. Para proporcionar bioprocesos competitivos, se han descrito microorganismos recombinantes con modificaciones que implican la EMPP, PPP y EDP (M. Emmerling y col., *Metab. Eng.* 1:117 (1999); L. O. Ingram y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2420 (1987); C. T. Trinh y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3634 (2008)). Más recientemente, se han descrito microorganismos recombinantes con modificaciones que implican la PKP (véase Sonderegger y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004), 2892-2897, la Patente de Estados Unidos 7.253.001, Chinen y col. *J. Biosci. Bioeng.* 103 (2007), 262-269, la Patente de Estados Unidos 7.785.858; Fleige y col., *Appl. Microbiol. Cell Physiol.* 91 (2011), 769-776).

La EMPP (glucólisis) convierte 1 mol de glucosa en 2 moles de piruvato (PYR, de sus siglas en inglés). Cuando se desea acetyl-CoA, se puede convertir 1 mol de PYR en 1 mol de acetyl-CoA (AcCoA) con la generación simultánea de 1 mol de CO<sub>2</sub> y 1 mol de NADH. La suma de las reacciones se da en la Ecuación 1.



La PPP proporciona un medio para convertir 1 mol de glucosa en 1 mol de CO<sub>2</sub> y 2 moles de NADPH, con la generación simultánea de 0,67 moles de fructosa-6-fosfato (F6P, de sus siglas en inglés) y 0,33 moles de gliceraldehído-3-fosfato (GAP, de sus siglas en inglés). La F6P y el GAP así formados deben ser metabolizados mediante otras rutas de reacción, por ejemplo, mediante la EMPP. La EDP convierte 1 mol de glucosa en 1 mol de GAP y 1 mol de PYR con la generación simultánea de 1 mol de NADPH. Al igual que con la PPP, el GAP así formado debe ser metabolizado mediante otras rutas de reacción. La PKP proporciona un medio para convertir 1 mol de glucosa en 1 mol de GAP y 1,5 moles de fosfato de acetyl (AcP, de sus siglas en inglés). Cuando se desea acetyl-CoA, se puede convertir 1 equivalente de AcP más 1 equivalente de coenzima A (CoA) en equivalente de 1 acetyl-CoA y 1 equivalente de fosfato inorgánico (Pi, de sus siglas en inglés) por la acción de la fosfotransacetilasa.

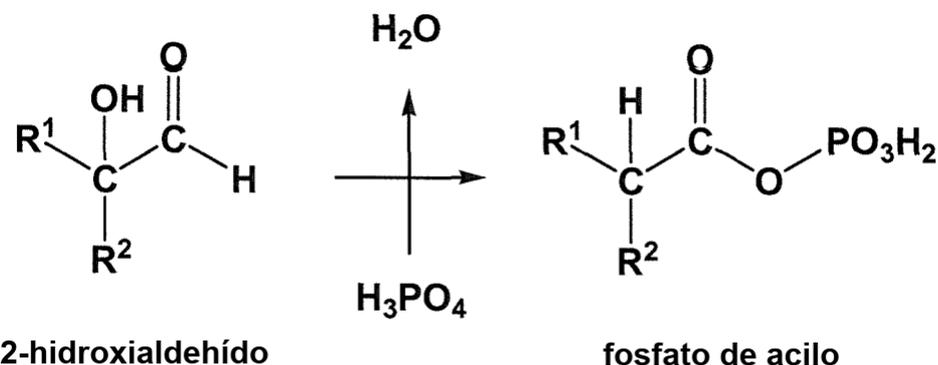
En vista de la creciente demanda de procedimientos que hacen uso de recursos renovables para producir todo tipo de compuestos, es deseable proporcionar medios y procedimientos que permitan una producción eficaz de metabolitos centrales, tales como acil-CoA o ácidos carboxílicos, o sus precursores, construyendo así una plataforma para desarrollar procedimientos adicionales para convertir estos metabolitos en compuestos útiles.

El documento WO 2015/144447 (1 de octubre de 2015) y el documento WO 2015/181074 (3 de diciembre de 2015) se refieren a la producción enzimática de fosfato de acetyl.

Matsakas y col., *Current Biochemical Engineering* 1:141 (2014), desvelan nuevas tendencias en la producción microbiana de ácido 3-hidroxi propiónico, incluida la producción de fosfato de 3-hidroxi propionilo a partir de 3-hidroxi propionil-CoA.

Por lo tanto, existe una necesidad de proporcionar procedimientos, que comprendan rutas centrales de carbono y específicas del producto, que maximicen la conversión de materia prima en producto mediante la mejor acomodación de las restricciones de oxidorreducción y energéticas de las reacciones enzimáticas, permitiendo así la producción energéticamente eficaz de precursores de acil-CoA o ácido carboxílico, en particular de microorganismos que pueden usarse para la producción de numerosos compuestos industrialmente importantes a partir de recursos renovables, tales como ácidos orgánicos, alquenos, dienos o ácidos carboxílicos de cadena corta.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción enzimática de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído y fosfato en el que la producción de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído y fosfato se logra mediante el uso de una fosfocetolasa o de una sulfoacetaldehído acetiltransferasa (Documento EC 2.3.3.15) de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH y C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> en la que si R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> no puede ser H.

La expresión "en el que si R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> no puede ser H" como se usa en el contexto de la presente invención significa que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> no pueden ser H al mismo tiempo, es decir, también significa que si R<sup>2</sup> es H, R<sup>1</sup> no puede ser H.

El presente inventor ha descubierto que las enzimas que se clasifican como fosfocetolasas o como sulfoacetaldehído acetiltransferasas (Documento EC 2.3.3.15) son capaces de catalizar la formación de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído como se definió anteriormente y fosfato.

Se conocen diferentes tipos de fosfocetolasas y todas ellas pueden emplearse en el procedimiento de acuerdo con la invención. Generalmente, las fosfocetolasas se clasifican en dos tipos según la preferencia del sustrato con respecto a su reacción catalizada de manera natural: xilulosa-5-fosfato (X5P, de sus siglas en inglés) fosfocetolasas, que están clasificadas en el documento EC 4.1.2.9 y que usan de manera natural X5P y fructosa-6-fosfato (F6P, de sus siglas en inglés) como sustrato, pero que prefieren X5P y X5P/fructosa-6-fosfato (F6P) fosfocetolasas, que se clasifican en el documento 4.1.2.22 y que pueden usar tanto X5P como F6P con actividades comparables como sustrato (Suzuki y col., J. Biol. Chem. 44 (2010), 34279-34287). En lo sucesivo, el término "fosfocetolasa" siempre se refiere a ambos tipos.

Por lo tanto, las X5P fosfocetolasas son enzimas que se clasifican en el documento EC 4.1.2.9 y que son capaces de catalizar la siguiente reacción:



El otro tipo de fosfocetolasas que se clasifican en el documento EC 4.1.2.22 se denominan generalmente fructosa-6-fosfato fosfocetolasas y son capaces de catalizar de manera natural la siguiente reacción:



También hay casos en los que se asigna una fosfocetolasa a ambos tipos de fosfocetolasas, por ejemplo, en el caso de la fosfocetolasa de *Nitrolancetus hollandicus* Lb, o cuando una fosfocetolasa identificada aún no se ha asignado a ninguno de los dos tipos, pero simplemente se clasifica en general como una fosfocetolasa. El término "fosfocetolasa" cuando se usa en el presente documento también se refiere a todas estas fosfocetolasas.

Por lo tanto, en una realización del procedimiento de acuerdo con la presente invención, la conversión enzimática de un 2-hidroxialdehído y fosfato en un fosfato de acilo de acuerdo con el esquema de reacción mostrado anteriormente se logra mediante el uso de una fosfocetolasa que se clasifica como fosfocetolasas en el documento EC 4.1.2.9. Esta enzima se ha identificado en una variedad de organismos, en particular, en microorganismos tales como bacterias y hongos. En una realización preferida, la fosfocetolasa (Documento EC 4.1.2.9) se origina a partir de un organismo procarionta, preferentemente una bacteria. Se ha descrito que la enzima, por ejemplo, se produce en *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* (números de acceso de Uniprot: Q88S87; Q88U67), *Lactobacillus pentosus* (número de referencia de Uniprot: Q937F6), *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis* (número de referencia de Uniprot:

A0PAD9), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (número de referencia de Uniprot: Q9AEM9), *Butyrovibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter intestinalis*, *Fibrobacter succinogenes*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Starkeya novella*, *Thiobacillus* sp., *Thermobispora bispora* (cepa ATCC 19993 / DSM 43833 / CBS 139.67 / JCM 10125 / NBRC 14880 / R51; número de referencia de Uniprot D6YAD9), *Thermobaculum terrenum* (cepa ATCC BAA-798 / YNP1; número de referencia de Uniprot D1CI63) y *Nitrolancetus hollandicus* Lb (número de referencia de Uniprot I4EJ52).

En otra realización preferida, la fosfocetolasa (Documento EC 4.1.2.9) se origina a partir de un organismo eucariota, preferentemente un hongo, por ejemplo, una levadura, tal como *S. cerevisiae*. Se ha descrito que la enzima, por ejemplo, se produce en *Emericella nidulans* (número de referencia de Uniprot: Q5B3G7), *Metarhizium anisopliae* (número de referencia de Uniprot: C1K2N2), *Candida boidinii*, *Candida curvata*, *Candida famata*, *Candida humicola*, *Candida parapsilosis*, *Candida parapsilosis* NCYC 926, *Candida tropicalis*, *Cyberlindnera jadinii*, *Cyberlindnera saturnus*, *Debaromyces robertsiae*, *Fusarium oxysporum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces phaseolusporus*, *Lipomyces starkeyi*, *Ogataea angusta*, *Pachysolen tannophilus*, *Priceomyces medius*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichosporon cutaneum* y *Yarrowia lipolytica*.

La actividad enzimática de una fosfocetolasa (Documento EC 4.1.2.9) se puede evaluar con procedimientos conocidos por un experto en la materia. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Meile y col. (*J. Bacteriol.* 183 (2001), 2929-2936) y en Suzuki y col. (*Acta Cryst.* F66 (2010), 941-943).

La fosfocetolasa (Documento EC 4.1.2.9) está estructural y funcionalmente bien definida. Por ejemplo, Petrareanu y col. (*Acta Crystallographica* F66 (2010), 805-807) describen el análisis cristalográfico de rayos X de la xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa de *Lactococcus lactis*.

En otra realización del procedimiento de acuerdo con la presente invención, la conversión enzimática de un 2-hidroxialdehído y fosfato en un fosfato de acilo de acuerdo con el esquema de reacción mostrado anteriormente se logra mediante el uso de una fosfocetolasa que se clasifica como una fructosa-6-fosfato fosfocetolasa en el documento EC 4.1.2.22. Esta enzima se ha identificado en una variedad de organismos, en particular, en microorganismos tales como bacterias y hongos. En una realización preferida, la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (Documento EC 4.1.2.22) se origina a partir de un organismo procarionta, preferentemente una bacteria. Se ha descrito que la enzima, por ejemplo, se produce en *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (número de referencia de Uniprot: Q9AEM9), *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, en particular *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium mongoliense*, *Bifidobacterium bombi*, *Cupriavidus necator*, *Gardnerella vaginalis*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Lactococcus crispatus*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Nitrolancetus hollandicus* Lb (número de referencia de Uniprot I4EJ52).

En otra realización preferida, la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (Documento EC 4.1.2.22) se origina a partir de un organismo procarionta, preferentemente un hongo, por ejemplo, una levadura, tal como *S. pastorianus*. Se ha descrito que la enzima, por ejemplo, se produce en *Candida* sp., *Candida* sp. 107, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis* y *Saccharomyces pastorianus*.

La enzima está estructural y funcionalmente bien definida. Por ejemplo, Suzuki y col. (*Acta Crystallographica* F66 (2010), 941-943; *J. Biol. Chem.* 285 (2010), 34279-34287) describen la sobreexpresión, cristalización y análisis de rayos X de la fosfocetolasa de *Bifidobacterium breve*. El gen que codifica la xilulosa-5-fosfato/fructosa-6-fosfato fosfocetolasa de la *Bifidobacterium lactis* se describe, por ejemplo, en Meile y col. (*J. Bacteriol.* 183 (2001), 2929-2936).

La actividad enzimática de una fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (Documento EC 4.1.2.22) se puede evaluar con procedimientos conocidos por un experto en la materia. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Meile y col. (*J. Bacteriol.* 183 (2001), 2929-2936) y en Suzuki y col. (*Acta Cryst.* F66 (2010), 941-943).

Otras fosfocetolasas que aún no se han clasificado en los documentos EC 4.2.1.9 o EC 4.2.1.22 y que pueden usarse en el procedimiento de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, la fosfocetolasa de *Thermosynechococcus elongatus* (cepa BP-1; número de referencia de Uniprot: Q8DJN6), la fosfocetolasa de *Bacillus coagulans* 36D1 (número de referencia de Uniprot: G2TIL0), la fosfocetolasa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (cepa KF147; número de referencia de Uniprot: A9QST6), la fosfocetolasa de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* (número de referencia de Uniprot: Q6R2Q6) y la fosfocetolasa de *Clostridium acetobutylicum* (cepa ATCC 824; número de referencia de Uniprot: Q97JE3; Servisky y col. (*J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (2012), 1859-1867); SEQ ID NO: 2).

En los ejemplos adjuntos se muestra que el 2,3-hidroxiopropanal (D, L-gliceraldehído) y el 2-hidroxiopropanal (D, L-lactaldehído) se pueden convertir mediante fosfocetolasa en fosfato de 3-hidroxiopropionilo y fosfato de propionilo, respectivamente, que luego se puede convertir en ácido 3-hidroxiopropiónico y ácido propiónico, respectivamente, mediante hidrólisis espontánea.

En una realización, la fosfocetolasa empleada en un procedimiento de acuerdo con la presente invención es una fosfocetolasa de *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* (número de referencia de Uniprot: Q6R2Q6; SEQ ID NO: 1) o una fosfocetolasa de *Clostridium acetobutylicum* (cepa ATCC 824; número de referencia de Uniprot: Q97JE3; SEQ ID NO: 2), o una fosfocetolasa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (cepa KF147; número de referencia de Uniprot: A9QST6; SEQ ID NO: 3) o una fosfocetolasa de *Lactococcus crispatus* (número de referencia de Uniprot: D5H215; SEQ ID NO: 20) o una fosfocetolasa de *Bifidobacterium gallicum* (DSM 20093; número de referencia de Uniprot: D1NS90; SEQ ID NO: 16) o una fosfocetolasa de *Leuconostoc citreum* (cepa KM20; número de referencia de Uniprot: B1MWV8; SEQ ID NO: 17) o una fosfocetolasa de *Streptococcus gordonii* (cepa Challis / ATCC 35105 / CH1

/ DL1 / V288; número de referencia de Uniprot: A8AV21; SEQ ID NO: 18) o una fosfocetolasa de *Leuconostoc citreum* (cepa ATCC 25259; número de referencia de Uniprot: Q3SKJ7; SEQ ID NO: 19).

En una realización preferida, la fosfocetolasa empleada en el procedimiento de la invención tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3 o 16 a 20 o muestra una secuencia de aminoácidos que es al menos un x % homóloga a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3 o 16 a 20 y es una fosfocetolasa con x siendo un número entero entre 30 y 100, preferentemente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 en la que dicha enzima es capaz de convertir un 2-hidroxialdehído y fosfato en un fosfato de acilo como se establece anteriormente en el presente documento. Preferentemente, el grado de identidad se determina mediante la comparación de la secuencia respectiva con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO mencionadas anteriormente. Cuando las secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, el grado de identidad se refiere preferentemente al porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia más corta que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia más larga o al porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia más larga que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia más corta. El grado de identidad de secuencia puede determinarse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la materia usando preferentemente algoritmos informáticos adecuados tales como CLUSTAL.

Cuando se usa el procedimiento de análisis Clustal para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 80 % idéntica a una secuencia de referencia, se pueden usar configuraciones predeterminadas o las configuraciones son preferentemente las siguientes: Matriz: blosum 30; Penalización por hueco abierto: 10,0; Penalización por hueco extendido: 0,05; Retraso divergente: 40; Distancia de separación de huecos: 8 para comparaciones de secuencias de aminoácidos. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, la penalización de espacio extendido se establece preferentemente en 5,0.

Preferentemente, el grado de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia.

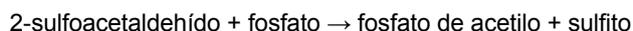
Se ha descrito que una alineación múltiple de secuencias de fosfocetolasa muestra varias regiones altamente conservadas y dos de estas regiones se usan como patrones característicos para fosfocetolasas (<http://prosite.expasy.org/PDOC60002>). El primer patrón característico es E-G-G-E-L-G-Y y el segundo patrón característicos es G-x(3)-[DN]-x-P-x(2)-[LIVFT]-x(3)-[LIVM]-x-G-D-G-E. La función del primer patrón característico aún no se conoce, mientras que el segundo patrón característico corresponde al sitio de unión de pirofosfato de tiamina. Por lo tanto, en una realización preferida, una fosfocetolasa como se define en el presente documento anteriormente, tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos uno de los dos patrones característicos mencionados anteriormente, preferentemente al menos el segundo patrón característico, y aún más preferentemente ambos patrones característicos.

Las comparaciones de secuencias muestran que la identidad de secuencia global entre fosfocetolasas de diferentes orígenes puede ser tan baja como alrededor de un 26 %. Por ejemplo, Meile y col. (J. Biol. Chem. 183 (2001), 2929-2936) informa que el gen D-xilulosa 5-fosfato/D-fructosa 6-fosfato fosfocetolasa (xpf) de *Bifidobacterium lactis* reveló identidades de un 26 % a un 55 % a las secuencias en los genomas de otros organismos.

Si una fosfocetolasa elegida es capaz de catalizar la conversión de un 2-hidroxialdehído y fosfato en fosfato de acilo y H<sub>2</sub>O puede, por ejemplo, evaluarse mediante un ensayo como se establece en los Ejemplos.

El término "fosfato" como se usa en relación con el procedimiento de la invención se refiere a un compuesto que es aceptable como fuente de fosfato para la enzima empleada en el procedimiento para la conversión de un 2-hidroxialdehído y fosfato en un fosfato de acilo y H<sub>2</sub>O. Una posibilidad es la provisión de fosfato en forma de ácido fosfórico, es decir, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Sin embargo, también son concebibles otras formas, en particular sales de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) en las que uno, dos o tres de los átomos de hidrógeno se reemplazan por otros iones, tales como iones de sodio. Las fosfocetolasas son enzimas dependientes de tiamina difosfato, es decir, requieren tiamina difosfato (también conocido como ThDP o TPP) como cofactor. Por lo tanto, es ventajoso que en un procedimiento de acuerdo con la invención, cuando se emplea una fosfocetolasa, se proporcione TPP durante la reacción. Además, algunas fosfocetolasas requieren iones, tales como Mg<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup> como cofactores. En ese caso, el procedimiento de acuerdo con la invención también incluye la presencia de dichos iones durante la conversión como se describió anteriormente.

La conversión enzimática de un 2-hidroxialdehído y fosfato en un fosfato de acilo de acuerdo con el esquema de reacción mostrado anteriormente también se puede lograr mediante el uso de una sulfoacetaldehído acetiltransferasa (Documento EC 2.3.3.15). Las sulfoacetaldehído acetiltransferasas (Documento EC 2.3.3.15) son enzimas que pueden catalizar la siguiente reacción:



La enzima ha sido identificada en una variedad de organismos, en particular bacterias. En una realización preferida, la sulfoacetaldehído acetiltransferasa (Documento EC 2.3.3.15) se origina a partir de un organismo procarionta, preferentemente una bacteria. Se ha descrito que la enzima, por ejemplo, se produce en *Castellaniella defragrans* (número de referencia de Uniprot: Q84H44; previamente *Alcaligenes defragrans* (Ruff y col., Biochem. J. 369 (2003), 275-285)), *Alcaligenes xylooxidans xylooxidans* (número de referencia de Uniprot: Q84H41), *Desulfonispora thiosulfatigenes* (número de referencia de Uniprot: Q93PS3), *Rhizobium meliloti* (cepa 1021) (número de referencia de Uniprot: Q92UW6), *Ruegeria pomeroyi* (número de referencia de Uniprot: Q5LMK2), *Cupriavidus necator* (número de referencia de Uniprot: Q0K022), *Roseovarius nubinhibens* (número de referencia de Uniprot: A3SR25), *Acinetobacter*

sp. y *Pseudomonas aeruginosa*.

En principio, se puede emplear cualquier sulfoacetaldehído acetiltransferasa (Documento EC 2.3.3.15) en la conversión de un 2-hidroxi-aldehído y fosfato en un fosfato de acilo de acuerdo con un procedimiento de la invención.

Las sulfoacetaldehído acetiltransferasas son, como las fosfocetolasas, enzimas dependientes del pirofosfato de tiamina (TPP) y, por lo tanto, se caracterizan porque contienen un dominio de unión a TPP. Entre las sulfoacetaldehído acetiltransferasas conocidas, el dominio de unión a TPP está altamente conservado (véase, por ejemplo, Ruff y col., *Biochem. J.* 369 (2003), 275-285). En general, las sulfoacetaldehído acetiltransferasas conocidas muestran un alto grado de conservación de secuencia cerca del extremo N, incluido el dominio de unión a TPP (véase Ruff y col., loc. cit.). Se puede observar divergencia de secuencia en el extremo N de las enzimas en sí y en una región cercana al aminoácido 400 de la enzima de *C. defragrans*. Ruff y col. (loc. cit.) describen que las sulfoacetaldehído acetiltransferasas forman 3 subgrupos (véase la Figura 4 de dicha publicación). Se dice que los subgrupos 2 y 3 muestran un dominio de unión a TPP que se ajusta a la secuencia consenso PROSITE (L/I/V/M/F)(G/S/A)<sub>5</sub>PX<sub>4</sub>(L/I/V/M/F/Y/W)X(L/I/V/M/F)XGD(G/S/A)(G/S/A/C), mientras que el subgrupo se desvía ligeramente de la secuencia consenso:

(L/I/V/M/F)(G/S/A)<sub>5</sub>PX<sub>4</sub>(L/I/V/M/F/Y/W)X(L/I/V/M/Y)XGD(G/S/A)(G/S/A/C).

Además de estas regiones, la identidad de secuencia entre las diferentes sulfoacetaldehído acetiltransferasas puede ser bastante baja (hasta aproximadamente un 44 %).

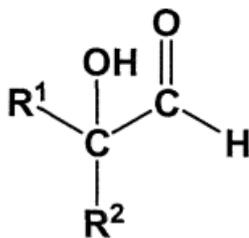
En una realización preferida, la sulfoacetaldehído acetiltransferasa empleada en un procedimiento de acuerdo con la presente invención es la sulfoacetaldehído acetiltransferasa de *C. defragrans* que muestra la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 4 o la sulfoacetaldehído acetiltransferasa de *Alcaligenes xylooxidans xylooxidans* que muestra la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 o la sulfoacetaldehído acetiltransferasa de *Desulfonispora thiosulfatigenes* que muestra la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 6 o la sulfoacetaldehído acetiltransferasa de *Rhizobium meliloti* (cepa 1021) que muestra la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7 o la sulfoacetaldehído acetiltransferasa de *Roseovarius nubinhibens* que muestra la secuencia de aminoácidos como se representa en la SEQ ID NO: 8 o que muestra una secuencia de aminoácidos relacionada.

Por lo tanto, en una realización preferida, la sulfoacetaldehído acetiltransferasa empleada en el procedimiento de la invención tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 8 o muestra una secuencia de aminoácidos que es al menos un x % homóloga a una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 8 y es una sulfoacetaldehído acetiltransferasa con x siendo un número entero entre 30 y 100, preferentemente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 en la que dicha enzima es capaz de convertir un 2-hidroxi-aldehído y fosfato en un fosfato de acilo como se establece anteriormente en el presente documento. Preferentemente, el grado de identidad se determina como se describe anteriormente.

La actividad enzimática de una sulfoacetaldehído acetiltransferasa (Documento EC 2.3.3.15) se puede evaluar con procedimientos conocidos por un experto en la materia. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Ruff y col. (*Biochem. J.* 369 (2003), 275-285).

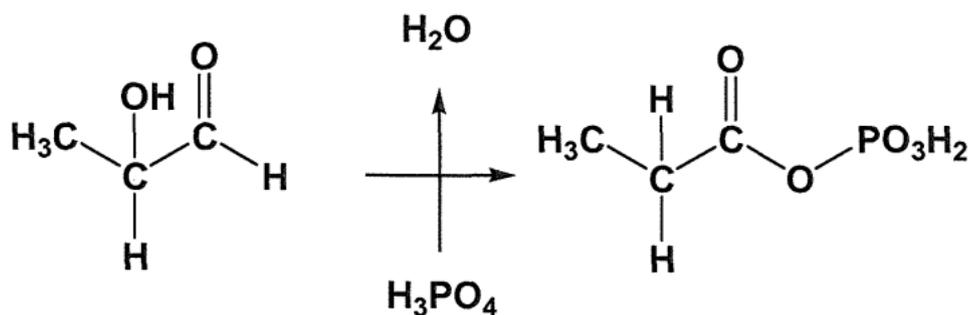
En los Ejemplos se muestra que D, L-lactaldehído (2-hidroxi-propanal racémico) y D, L-gliceraldehído (2,3-hidroxi-propanal racémico) se pueden convertir mediante sulfoacetaldehído acetiltransferasas en fosfato de propionilo y fosfato de 3-hidroxi-propionilo, respectivamente, que luego se puede convertir en ácido propiónico y ácido 3-hidroxi-propiónico, respectivamente, mediante hidrolización espontánea.

En una realización preferida, el 2-hidroxi-aldehído de la siguiente fórmula



## 2-hidroxi-aldehído

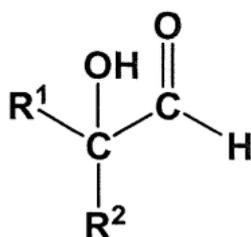
en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH y C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> en la que si R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> no puede ser H, que se convierte en un fosfato de acilo de acuerdo con un procedimiento de la presente invención, es 2-hidroxi-propanal (lactaldehído) que se convierte en fosfato de propionilo. Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción enzimática de fosfato de propionilo a partir de 2-hidroxi-propanal (lactaldehído) mediante el uso de una fosfocetolasa o una sulfoacetaldehído acetiltransferasa (Documento EC 2.3.3.15) en el que la conversión de 2-hidroxi-propanal (lactaldehído) en fosfato de propionilo se produce de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



**2-hidroxiopropanal**

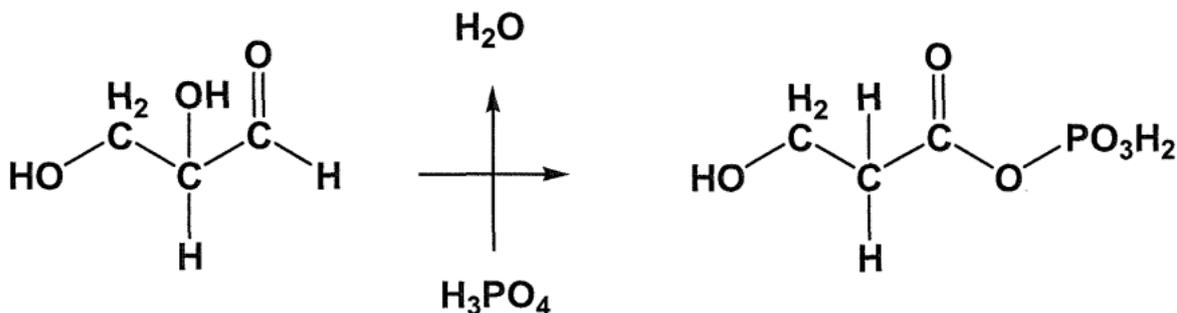
**fosfato de propionilo**

En otra realización preferida, el 2-hidroxialdehído de la siguiente fórmula



**2-hidroxialdehído**

5 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH y C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> en la que si R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> no puede ser H, que se convierte en un fosfato de acilo de acuerdo con un procedimiento de la presente invención, es 2,3-dihidroxiopropanal (gliceraldehído) que se convierte en fosfato de 3-hidroxiopropionilo. Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción enzimática de fosfato de 3-hidroxiopropionilo a partir de 2,3-dihidroxiopropanal (gliceraldehído) mediante el uso de una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhido acetiltransferasa (Documento EC 2.3.3.15) en el que la conversión de 2,3-dihidroxiopropanal (gliceraldehído) en fosfato de 3-hidroxiopropionilo se produce de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:

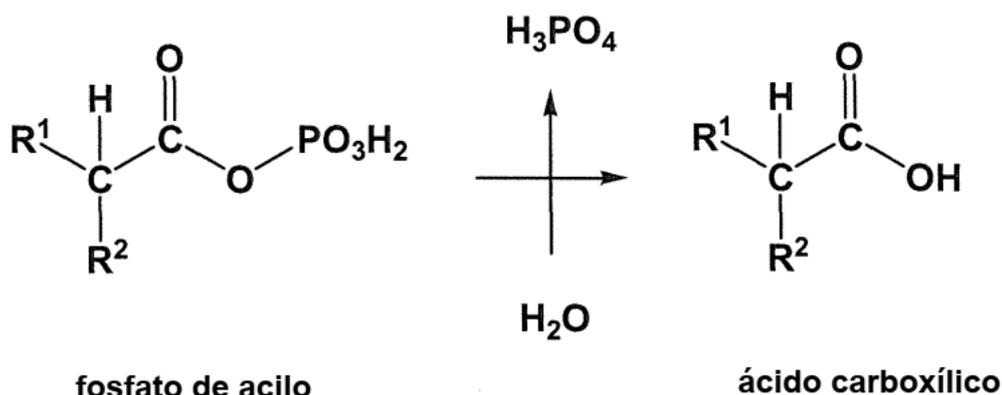


**2,3-dihidroxiopropanal**

**fosfato de 3-hidroxiopropionilo**

El fosfato de acilo producido de acuerdo con un procedimiento de la presente invención se puede convertir adicionalmente en moléculas deseadas tales como un ácido carboxílico o una acil-Coenzima A correspondiente (también denominada acil-CoA).

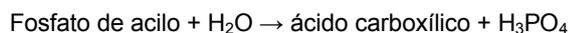
15 La conversión de un fosfato de acilo en el ácido carboxílico correspondiente puede producirse mediante hidrólisis que funciona de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH y C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> en la que si R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> no puede ser H.

5 La hidrólisis de un fosfato de acilo, como se define en el presente documento anteriormente, en un ácido carboxílico correspondiente *in vitro* puede producirse espontáneamente ya que los fosfatos de acilo son bastante inestables.

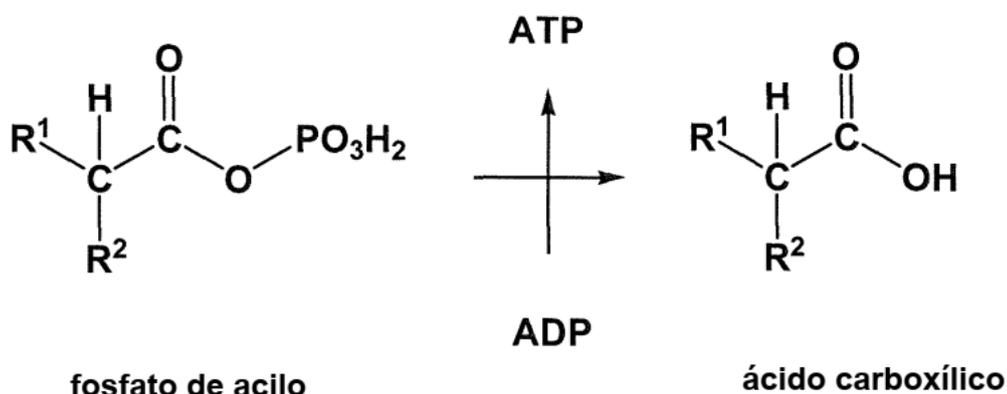
También es posible lograr la conversión mediante una reacción catalizada enzimáticamente. La hidrólisis enzimática de un fosfato de acilo en el correspondiente ácido carboxílico y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> puede lograrse, por ejemplo, utilizando una acilfosfatasa (Documento EC 3.6.1.7). La acilfosfatasa (AcP, de sus siglas en inglés; Documento EC 3.6.1.7) es una enzima citosólica (con un peso molecular de aproximadamente 10 kDa) ampliamente expresada en organismos eucariotas y procariotas (tanto mesófilos como extremófilos). La AcP se puede encontrar en muchos tejidos de especies de vertebrados en los músculos esqueléticos y en el corazón como AcP de tipo muscular (MT-AcP, de sus siglas en inglés) y en los eritrocitos, el cerebro y los testículos como AcP de tipo (órgano) común (CT-AcP, de sus siglas en inglés) (Zuccotti y col., Acta Cryst. 61 (2005), 144-146). Las acilfosfatasas catalizan la siguiente reacción:



15 Esta enzima se ha descrito en una gran variedad de organismos. Preferentemente, una acilfosfatasa empleada en un procedimiento de acuerdo con la presente invención procede de Gallus gallus, Cavia porcellus (Liguri y col., Biochem. J. 217 (1984), 499-505), Homo sapiens, Sus scrofa, Bos taurus, Oryctolagus cuniculus, Equus caballus o Pyrococcus hirokoshii (Miyazoo y col., Acta Crystallographica D60 (2004), 1135-1136).

20 Las características estructurales y funcionales de estas enzimas ya se han estudiado en detalle y se describen, por ejemplo, en Liguri y col. (Biochem. J. 217 (1984), 499-505), Miyazoo y col. (Acta Crystallographica D60 (2004), 1135-1136) y en Taddei y col. (FEBS Letters 362 (1995), 175-179).

Como alternativa, puede producirse mediante una reacción enzimática que implica la generación de ATP a partir de ADP de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



25 En particular, un fosfato de acilo también puede convertirse, *in vitro* o *in vivo*, enzimáticamente en un ácido carboxílico correspondiente, por ejemplo, mediante el uso de una enzima que se clasifica como el Documento EC 2.7.2.-, es decir, una fosfotransferasa. Dichas enzimas usan un grupo carboxilo como aceptor. Por lo tanto, la conversión de un fosfato de acilo en el correspondiente ácido carboxílico puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de una enzima con un grupo carboxi como aceptor (Documento EC 2.7.2.-). Ejemplos de dichas enzimas son las enzimas que se clasifican como una acetato cinasa (Documento EC 2.7.2.1), como una butirato cinasa (Documento EC 2.7.2.7), como una acetato cinasa (difosfato) (Documento EC 2.7.2.12), como una cinasa de ácido graso de cadena ramificada (Documento EC 2.7.2.14) o como una propionato cinasa (Documento EC 2.7.2.15).

La acetato cinasa (Documento EC 2.7.2.1) es una enzima que cataliza la siguiente reacción:



Como esta reacción es reversible, la enzima puede emplearse para convertir un fosfato de acilo en el ácido carboxílico correspondiente. La reacción puede empujarse en la dirección del ácido carboxílico mediante la eliminación continua del ATP de la reacción, por ejemplo, mediante la conversión enzimática adicional o mediante la eliminación de la reacción por medios y procedimientos conocidos por el experto en la materia. Esta enzima se produce en una gran variedad de organismos, en particular, en procariontes, eucariontes y arqueas. Es una enzima importante en la glucólisis y los niveles de enzima normalmente aumentan en presencia de un exceso de glucosa. Esta enzima, por ejemplo, se ha descrito que se produce en varios organismos, en particular, bacterias y eucariontes. En una realización preferida, la enzima es de una bacteria, preferentemente de una bacteria del género *Methanosarcina*, *Cryptococcus*, *Ethanoligenens*, *Propionibacterium*, *Roseovarius*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Acholeplasma*, *Acinetobacter*, *Ajellomyces*, *Bacillus*, *Borrelia*, *Chaetomium*, *Clostridium*, *Coccidioides*, *Coprinopsis*, *Cryptococcus*, *Cupriavidus*, *Desulfovibrio*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Ethanoligenes*, *Geobacillus*, *Helicobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Mesoplasma*, *Moorella*, *Mycoplasma*, *Oceanobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhodospseudomonas*, *Roseovarius*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Thermotoga* o *Veillonella*, más preferentemente de una bacteria de la especie *Methanosarcina thermophila*, *Cryptococcus neoformans*, *Ethanoligenens harbinense*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus enterica*, *Streptococcus pyogenes*, *Acholeplasma laidlawii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Ajellomyces capsulatus*, *Bacillus subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Chaetomium globosum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium thermocellum*, *Coccidioides immitis*, *Coprinopsis cinerea*, *Cryptococcus neoformans*, *Cupriavidus necator*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Ethanoligenes harbinense*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Mesoplasma florum*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina mazei*, *Moorella thermoacetica*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Rhodospseudomonas palustris*, *Salmonella enteric*, *Staphylococcus aureus*, *Thermotoga maritima* o *Veillonella parvula*.

En otra realización preferida, la enzima es una enzima de un hongo, preferentemente de un hongo del género *Aspergillus*, *Gibberella*, *Hypocrea*, *Magnaporthe*, *Phaeosphaeria*, *Phanerochaete*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Uncinocarpus*, *Ustilago* o *Neurospora* incluso más preferentemente de un hongo de la especie *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Gibberella zeae*, *Hypocrea jecorina*, *Magnaporthe grisea*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phytophthora ramorum*, *Phytophthora sojae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Uncinocarpus reesii*, *Ustilago maydis* o *Neurospora crassa*.

En una realización preferida adicional, la enzima es una enzima de una planta o un alga, preferentemente del género *Chlamydomonas*, incluso más preferentemente de la especie *Chlamydomonas reinhardtii*.

En otra realización, la enzima es de un organismo del género *Entamoeba*, más preferentemente de la especie *Entamoeba histolytica*.

En principio, puede usarse cualquier acetato cinasa (Documento EC 2.7.2.1) que sea capaz de convertir un fosfato de acilo en el ácido carboxílico correspondiente en un procedimiento de acuerdo con la invención.

La conversión de un fosfato de acilo en el correspondiente ácido carboxílico también se puede lograr mediante el uso de una butirato cinasa (Documento EC 2.7.2.7). Las butirato cinasas son enzimas que catalizan la siguiente reacción:

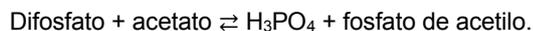


Se ha descrito, por ejemplo, por Hartmanis (J. Biol. Chem. 262 (1987), 617-621) que la butirato cinasa puede usar varios sustratos además del butirato, por ejemplo, valerato, isobutirato, isovalerato y acetato de vinilo. La enzima se ha descrito en una variedad de organismos, en particular bacterias. En una realización preferida, la enzima es de una bacteria, preferentemente de una bacteria del género *Lactobacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Thermotoga* o *Enterococcus*. Se prefiere *Clostridium*, *Lactobacillus* o *Geobacillus*. Más preferentemente, la enzima es de una bacteria de la especie *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium proteoclasticum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tetanomorphum*, *Butyrivibrio fibrosolvens*, *Butyrivibrio hungatei*, *Thermotoga maritima* o *Enterococcus durans*. Se prefiere *Clostridium acetobutylicum*. Para este organismo, se han descrito dos butirato cinasas: butirato cinasa I (número de referencia de Uniprot: Q45829) y butirato cinasa II (número de referencia de Uniprot: Q97II 19). En otra realización preferida, la butirato cinasa es una butirato cinasa de *Lactobacillus casei*, por ejemplo, *Lactobacillus casei* W56 (número de referencia de Uniprot: K0N529) o de *Geobacillus* sp, por ejemplo, *Geobacillus* sp. GHH01 (número de referencia de Uniprot: L8A0E1). Las secuencias de aminoácidos de dichas proteínas se muestran en las SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente.

Por supuesto, no solo es posible usar una enzima que muestre exactamente el aminoácido de SEQ ID NO: 13 o 14. También es posible usar una enzima que comprende una secuencia que es al menos un 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 13 o 14. Preferentemente, la identidad de secuencia es al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, 85 % o 90 %, incluso más preferentemente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y particularmente preferido al menos un 99 % a la SEQ ID NO: 13 o 14 y la enzima

tiene la actividad enzimática de convertir un fosfato de acilo como se define en el presente documento anteriormente en el ácido carboxílico correspondiente. Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se aplica lo mismo que se ha establecido anteriormente.

- 5 Además, la conversión de un fosfato de acilo en el correspondiente ácido carboxílico también se puede lograr mediante el uso de una acetato cinasa (difosfato) (Documento EC 2.7.2.12). Las acetato cinasas (difosfato) (Documento EC 2.7.2.12) son enzimas que catalizan de manera natural la siguiente reacción:



Se ha descrito que esta enzima se produce en *Entamoeba histolytica*.

- 10 Además, la conversión de un fosfato de acilo en el ácido carboxílico correspondiente también se puede lograr mediante el uso de una cinasa de ácido graso de cadena ramificada (Documento EC 2.7.2.14). Las cinasas de ácidos grasos de cadena ramificada (Documento EC 2.7.2.14) catalizan de manera natural la siguiente reacción:



- 15 en la que "alquil" puede ser 2-metilbutanoato, butanoato, isobutanoato, pentanoato o propionato. La última reacción con propionato se ha descrito para una cinasa de ácido graso de cadena ramificada de un espiroqueta (*J. Bacteriol.* 152 (1982), 246-54).

Se ha descrito que esta enzima se produce en una variedad de bacterias. Por lo tanto, en una realización preferida, la enzima es una enzima de una bacteria, preferentemente del género *Spirochaeta* o *Thermotoga*, más preferentemente *Thermotoga maritima*.

- 20 También se puede usar una propionato cinasa (Documento EC 2.7.2.15) para la conversión de un fosfato de acilo como se define en el presente documento anteriormente en el ácido carboxílico correspondiente. Las propionato cinasas (Documento EC 2.7.2.15) catalizan de manera natural la siguiente reacción:



- 25 Se ha descrito que esta enzima se produce en una variedad de bacterias, en particular, *Enterobacteriaceae*. Por lo tanto, en una realización preferida, la enzima es una enzima de una bacteria, preferentemente del género *Salmonella* o *Escherichia*, más preferentemente de la especie *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*.

- 30 En una realización preferida, la conversión de un fosfato de acilo como se define anteriormente en el presente documento en el ácido carboxílico correspondiente se logra utilizando una propionato cinasa de *Salmonella typhimurium*, preferentemente de *Salmonella typhimurium* cepa ATCC 700720. La secuencia de aminoácidos de dicha proteína se muestra en la SEQ ID NO: 9.

- 35 Por supuesto, no solo es posible usar una enzima que muestre exactamente este aminoácido de SEQ ID NO: 9. También es posible usar una enzima que comprende una secuencia que es al menos un 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 9. Preferentemente, la identidad de secuencia es al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, 85 % o 90 %, incluso más preferentemente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y particularmente preferido al menos un 99 % a la SEQ ID NO: 9 y la enzima tiene la actividad enzimática de convertir un fosfato de acilo como se define en el presente documento anteriormente en el ácido carboxílico correspondiente. Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se aplica lo mismo que se ha establecido anteriormente.

- 40 En otra realización preferida, la conversión de un fosfato de acilo como se define anteriormente en el presente documento en el ácido carboxílico correspondiente se logra utilizando una propionato cinasa de *Escherichia coli*, preferentemente de la cepa K12 de *Escherichia coli*. La secuencia de aminoácidos de dicha proteína se muestra en la SEQ ID NO: 10.

- 45 Por supuesto, no solo es posible usar una enzima que muestre exactamente el aminoácido de SEQ ID NO: 10. También es posible usar una enzima que comprende una secuencia que es al menos un 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 10. Preferentemente, la identidad de secuencia es al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, 85 % o 90 %, incluso más preferentemente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y particularmente preferido al menos un 99 % a la SEQ ID NO: 10 y la enzima tiene la actividad enzimática de convertir un fosfato de acilo como se define en el presente documento anteriormente en el ácido carboxílico correspondiente. Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se aplica lo mismo que se ha establecido anteriormente.

Como es evidente en la base de datos PROSITE (<http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/prosite-search-ac?PDOC00826#ref1>), las acetato cinasas, las butirato cinasas y las propionato cinasas están relacionadas evolutivamente.

Hay dos patrones característicos para estas enzimas; el primero está ubicado en la sección N-terminal y el segundo

en la sección central. Ambos son ricos en glicina y se sospecha que están implicados en la unión a ATP o el sustrato. El primer patrón consenso (característica 1) es:

[LIVMFANT]-[LIVM]-x-[LIVMA]-N-x-G-S-[ST](2)-x-[KE]

La referencia para esta característica en PROSITE DATABASE es PS01075

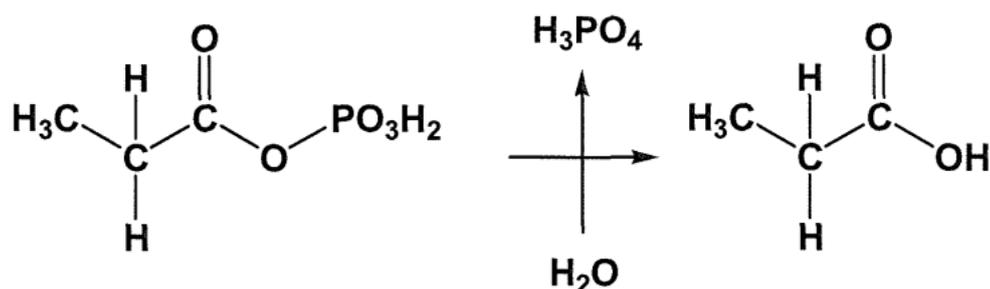
5 El segundo patrón consenso (característica 2) es:

[LIVMFATQ]-[LIVMA]-x(2)-H-x-G-x-[GT]-x-[ST]-[LIVMA]-x-[TAVC]-x(3)-G

La referencia para esta característica en PROSITE DATABASE es PS01076

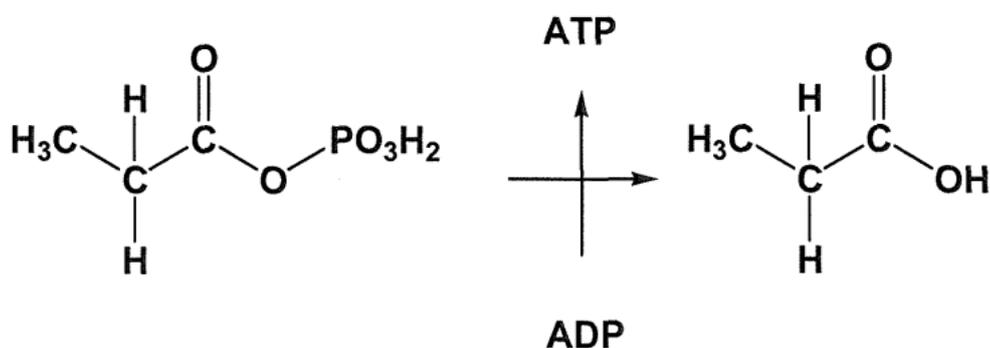
Como se ha descrito anteriormente, en una realización preferida, el 2-hidroxialdehído que se convierte, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, es 2-hidroxiopropanal y se convierte en fosfato de propionilo. En

10 una realización preferida, el fosfato de propionilo se convierte adicionalmente en el ácido carboxílico correspondiente, es decir, ácido propanoico, como se describe anteriormente en el presente documento. La reacción correspondiente puede, por ejemplo, producirse de acuerdo con uno de los siguientes esquemas de reacción:



**fosfato de propionilo**

**ácido propiónico**



**fosfato de propionilo**

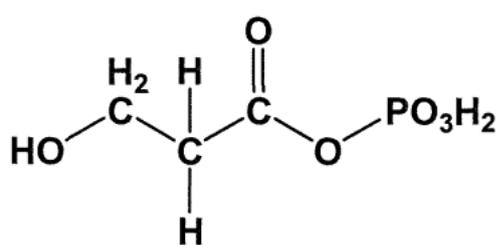
**ácido propiónico**

15 La conversión de fosfato de propionilo en ácido propanoico se logra preferentemente mediante el uso de una propionato cinasa (Documento EC 2.7.2.15) como se describió anteriormente.

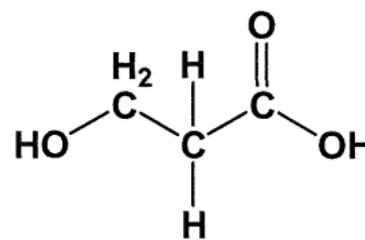
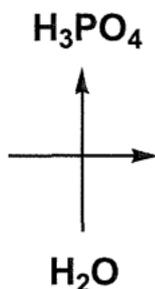
El ácido propanoico (también conocido como ácido propiónico) es de interés comercial porque puede emplearse en varios campos técnicos. Se fabrica principalmente para su uso como agente conservante y antimoho en piensos y granos. También se usa como agente conservante y aromatizante en alimentos envasados como productos horneados y queso. Por ejemplo, el propionato de calcio y el propionato de sodio, las formas de sal del ácido propanoico, se usan en pan y tortillas para prevenir el moho. Además, el ácido propanoico se utiliza como componente químico para la producción de herbicidas, productos farmacéuticos, tintes, productos textiles y de caucho, plásticos, plastificantes, cosméticos y perfumes.

20 Además, como se ha descrito anteriormente, en una realización preferida, el 2-hidroxialdehído que se convierte, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, es 2,3-dihidroxiopropanal y se convierte en fosfato de 3-hidroxiopropanilo. En una realización preferida, el fosfato de 3-hidroxiopropanilo se convierte adicionalmente en el ácido carboxílico correspondiente, es decir, ácido 3-hidroxiopropanoico, como se describe anteriormente en el presente documento. La reacción correspondiente puede producirse, por ejemplo, de acuerdo con uno de los siguientes esquemas de reacción:

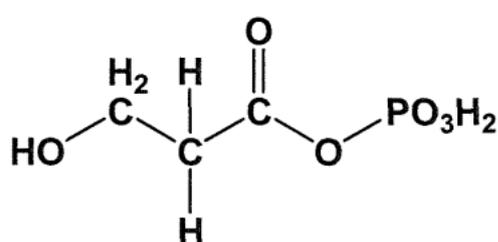
25



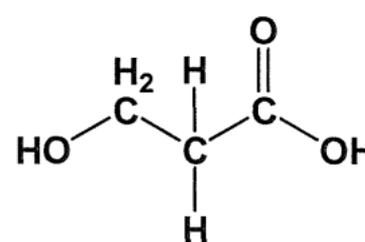
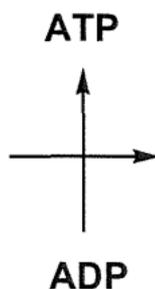
fosfato de 3-hidroxiopropionilo



ácido 3-hidroxiopropiónico



fosfato de 3-hidroxiopropionilo



ácido 3-hidroxiopropiónico

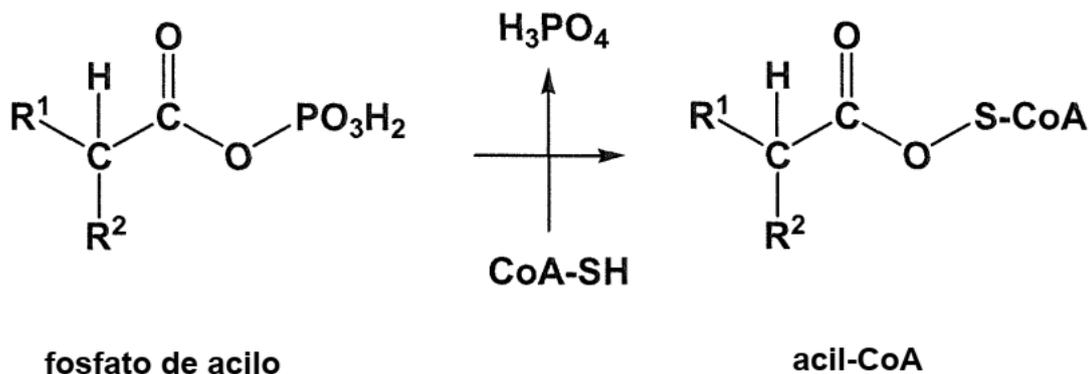
La conversión de fosfato de propionilo en ácido propanoico se logra preferentemente mediante el uso de una propionato cinasa (Documento EC 2.7.2.7) como se describió anteriormente. Se prefieren las enzimas de *Lactobacillus casei* W56 (número de referencia de Uniprot: K0N529) o de *Geobacillus* sp, por ejemplo, *Geobacillus* sp. GHH01 (número de referencia de Uniprot: L8A0E1). Las secuencias de aminoácidos de dichas proteínas se muestran en las SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente.

Por supuesto, no solo es posible usar una enzima que muestre exactamente el aminoácido de SEQ ID NO: 13 o 14. También es posible usar una enzima que comprende una secuencia que es al menos un 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 13 o 14. Preferentemente, la identidad de secuencia es al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, 85 % o 90 %, incluso más preferentemente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y particularmente preferido al menos un 99 % a la SEQ ID NO: 13 o 14 y la enzima tiene la actividad enzimática de convertir fosfato de propionilo o fosfato de 3-hidroxiopropionilo anterior en ácido propanoico o ácido 3-hidroxiopropiónico.

Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se aplica lo mismo que se ha establecido anteriormente.

El ácido 3-hidroxiopropanoico (también denominado ácido 3-hidroxiopropiónico; 3-HP), como ácido propanoico, también tiene relevancia comercial. Es una plataforma química se puede convertir en ácido acrílico, 1,3-propanodiol, ácido malónico, poliésteres biodegradables y otras sustancias químicas valiosas. Los productos procedentes del ácido acrílico incluyen polímeros superabsorbentes utilizados en pañales para bebés y productos para la incontinencia, plásticos, recubrimientos, adhesivos, elastómeros y pinturas. En la actualidad, el ácido acrílico se produce principalmente mediante oxidación catalítica de propeno. La posibilidad de proporcionar el precursor 3-HP a partir de glucosa u otros recursos renovables proporcionaría una alternativa biosostenible de la producción de ácido acrílico a partir de recursos fósiles.

Como se ha mencionado anteriormente, el fosfato de acilo producido por un procedimiento de la presente invención también se puede convertir adicionalmente en una acil-Coenzima A (acil-CoA) correspondiente. Dicha conversión se produce a través del siguiente esquema de reacción:



en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH y C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> en la que si R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> no puede ser H.

5 La conversión de un fosfato de acilo en un acil-CoA correspondiente (*in vitro* o *in vivo*) se puede lograr enzimáticamente, por ejemplo, mediante el uso de una fosfato acetiltransferasa (Documento EC 2.3.1.8) o mediante el uso de una fosfato butiriltransferasa (Documento EC 2.3.1.19).

Las fosfato acetiltransferasas (Documento EC 2.3.1.8) catalizan de manera natural la siguiente reacción:



10 Se ha descrito por Veit y col. (J. Biotechnol.140 (2009), 75-83) que la fosfato acetiltransferasa también puede usar como sustrato butiril-CoA o propionil-CoA.

Los números de acceso para esta familia de enzimas en la base de datos InterPro son IPR012147 e IPR002505, "<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR002505>"

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR002505>

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR012147>

Véase también <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF01515>

15 La enzima se ha descrito en una variedad de organismos, en particular, bacterias y hongos. Por lo tanto, en una realización preferida, la enzima es una enzima de una bacteria, preferentemente del género Escherichia, Chlorogonium, Clostridium, Veillonella, Methanosarcina, Corynebacterium, Ruegeria, Salmonella, Azotobacter, Bradorhizobium, Lactobacillus, Moorella, Rhodopseudomonas, Sinorhizobium, Streptococcus, Thermotoga o Bacillus, más preferentemente de la especie Escherichia coli, Chlorogonium elongatum, Clostridium kluyveri, Clostridium acetobutylicum, Clostridium acidurici, Veillonella parvula, Methanosarcina thermophila, Corynebacterium glutamicum, Ruegeria pomeroyi, Salmonella enterica, Azotobacter vinelandii, Bradyrhizobium japonicum, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus sanfranciscensis, Moorella thermoacetica, Rhodopseudomonas palustris, Sinorhizobium meliloti, Streptococcus pyogenes, Thermotoga maritima o Bacillus subtilis. En otra realización preferida, la enzima es una enzima de un hongo, preferentemente del género Saccharomyces, más preferentemente de la especie Saccharomyces cerevisiae.

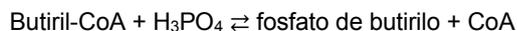
En una realización preferida, la conversión de fosfato de acilo en acil-CoA se logra mediante el uso de una fosfato acetiltransferasa de Corynebacterium glutamicum, preferentemente de Corynebacterium glutamicum cepa ATCC 13032. La secuencia de aminoácidos de dicha proteína se muestra en la SEQ ID NO: 11.

Por supuesto, no solo es posible usar una enzima que muestre exactamente el aminoácido de SEQ ID NO: 11.

30 También es posible usar una enzima que comprende una secuencia que es al menos un 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 11. Preferentemente, la identidad de secuencia es al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, 85 % o 90 %, incluso más preferentemente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y particularmente preferido al menos un 99 % a la SEQ ID NO: 11 y la enzima tiene la actividad enzimática de convertir fosfato de acilo en acil-CoA. Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se aplica lo mismo que se ha establecido anteriormente.

Como se ha mencionado anteriormente, La conversión de un fosfato de acilo en el correspondiente acil-CoA (*in vitro* o *in vivo*) también se puede lograr mediante el uso de una fosfato butiriltransferasa (Documento EC 2.3.1.19).

Las fosfato butiriltransferasas (Documento EC 2.3.1.19) catalizan de manera natural la siguiente reacción



40 Se ha descrito por Wiesenborn y col. (Appl. Environ. Microbiol. 55 (1989), 317-322) y por Ward y col. (J. Bacteriol. 181 (1999), 5433-5442) que las fosfato butiriltransferasas (Documento EC 2.3.1.19) pueden usar varios sustratos además de la butiril coenzima A (butiril-CoA), en particular, acetil-CoA, propionil-CoA, isobutilil-CoA, valerilo-CoA e isovalerilo-CoA.

Se ha descrito que la enzima se produce en una variedad de organismos, en particular, en bacterias y en protozoos.

En una realización, la enzima es de los protozoos *Dasytricha ruminantium*. En una realización preferida, la fosfato butiriltransferasa es una fosfato butiriltransferasa de una bacteria, preferentemente de una bacteria del género *Bacillus*, *Butyrivibrio*, *Enterococcus* o *Clostridium*, más preferentemente *Enterococcus* o *Clostridium*, e incluso más preferentemente de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium saccharoacetobutylicum*, *Clostridium sporogenes* o *Enterococcus faecalis*. Más preferentemente, la enzima es de *Clostridium acetobutylicum*, en particular, la enzima codificada por el gen *ptb* (número de referencia de Uniprot F0K6W0; Wiesenborn y col. (Appl. Environ. Microbiol. 55 (1989), 317-322)), de *Enterococcus faecalis* (número de referencia de Uniprot K4YRE8); Ward y col. (J. Bacteriol. 181 (1999), 5433-5442)) o de *Bacillus subtilis*, en particular de la cepa 168 (número de referencia de Uniprot P54530).

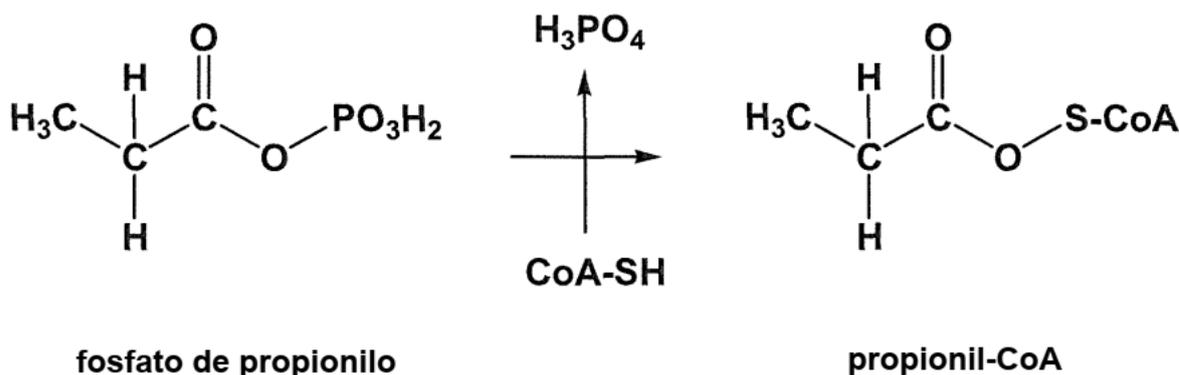
En una realización preferida, la conversión de un fosfato de acilo en un acil-CoA correspondiente se logra mediante el uso de una fosfato butiriltransferasa de *Clostridium acetobutylicum*, preferentemente de *Clostridium acetobutylicum* cepa ATCC 824. La secuencia de aminoácidos de dicha proteína se muestra en la SEQ ID NO: 12.

Por supuesto, no solo es posible usar una enzima que muestre exactamente el aminoácido de SEQ ID NO: 12. También es posible usar una enzima que comprende una secuencia que es al menos un 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 12. Preferentemente, la identidad de secuencia es al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, 85 % o 90 %, incluso más preferentemente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y particularmente preferido al menos un 99 % a la SEQ ID NO: 12 y la enzima tiene la actividad enzimática de convertir un fosfato de acilo en un acil-CoA correspondiente. Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se aplica lo mismo que se ha establecido anteriormente.

En otra realización preferida, la conversión de un fosfato de acilo en un acil-CoA correspondiente se logra mediante el uso de una fosfato butiriltransferasa de *Bacillus subtilis*, en particular de la cepa 168 (número de referencia de Uniprot P54530). La secuencia de aminoácidos de dicha proteína se muestra en la SEQ ID NO: 15.

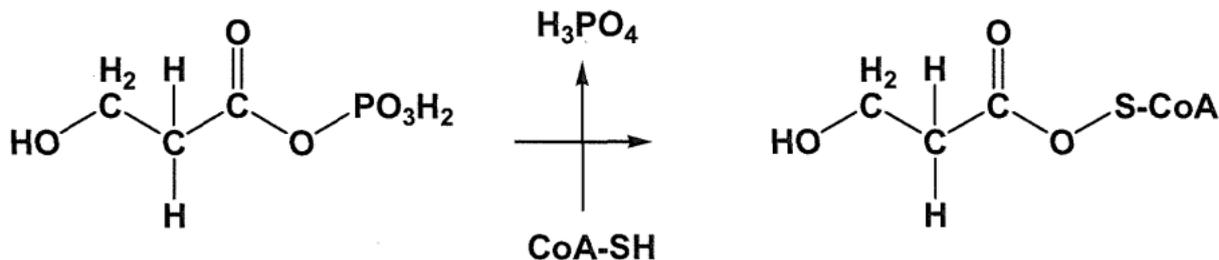
Por supuesto, no solo es posible usar una enzima que muestre exactamente el aminoácido de SEQ ID NO: 15. También es posible usar una enzima que comprende una secuencia que es al menos un 60 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 15. Preferentemente, la identidad de secuencia es al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, 85 % o 90 %, incluso más preferentemente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y particularmente preferido al menos un 99 % a la SEQ ID NO: 15 y la enzima tiene la actividad enzimática de convertir un fosfato de acilo en un acil-CoA correspondiente. Con respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se aplica lo mismo que se ha establecido anteriormente.

Como se ha descrito anteriormente, en una realización preferida, el 2-hidroxialdehído que se convierte, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, es 2-hidroxiopropanal y se convierte en fosfato de propionilo. En una realización preferida, el fosfato de propionilo se convierte adicionalmente en la correspondiente acil-CoA, es decir, propionil-CoA, como se describe anteriormente en el presente documento. La reacción correspondiente puede, por ejemplo, producirse de acuerdo con uno de los siguientes esquemas de reacción:



La conversión de fosfato de propionilo en propionil-CoA de acuerdo con este esquema se logra preferentemente mediante el uso de una fosfato butiriltransferasa, más preferentemente una fosfato butiriltransferasa de *Clostridium acetobutylicum*, *Bacillus subtilis* o *Enterococcus faecalis*, incluso más preferentemente las enzimas correspondientes como se describió anteriormente.

Además, como se ha descrito anteriormente, en una realización preferida, el 2-hidroxialdehído que se convierte, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, es 2,3-dihidroxiopropanal y se convierte en fosfato de 3-hidroxiopropionilo. En una realización preferida, el fosfato de 3-hidroxiopropionilo se convierte adicionalmente en la correspondiente acil-CoA, es decir, 3-hidroxiopropionil-CoA, como se describe anteriormente en el presente documento. La reacción correspondiente puede, por ejemplo, producirse de acuerdo con uno de los siguientes esquemas de reacción:



### fosfato de 3-hidroxiopropionilo

### 3-hidroxiopropionil-CoA

La conversión de fosfato de 3-hidroxiopropionilo en 3-hidroxiopropionil-CoA de acuerdo con este esquema se logra preferentemente mediante el uso de una fosfato butiriltransferasa, más preferentemente una fosfato butiriltransferasa de *Bacillus subtilis* o *Enterococcus faecalis*, incluso más preferentemente las enzimas correspondientes como se describió anteriormente.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. Se entiende que una reacción *in vitro* es una reacción en la que no se emplean células, es decir, una reacción acelular. Por lo tanto, *in vitro* significa preferentemente en un sistema libre de células. El término "*in vitro*" en una realización significa en presencia de enzimas aisladas (o sistemas enzimáticos que opcionalmente comprenden cofactores posiblemente necesarios).

En una realización, las enzimas empleadas en el procedimiento se usan en forma purificada.

Para llevar a cabo el procedimiento *in vitro*, los sustratos para la reacción y las enzimas se incuban en condiciones (tampón, temperatura, cosustratos, cofactores, etc.) que permiten que las enzimas estén activas y se produzca la conversión enzimática. Se deja que la reacción continúe durante un tiempo suficiente para producir el producto respectivo. La producción de los productos respectivos se puede medir mediante procedimientos conocidos en la materia, tal como la cromatografía líquida (HPLC, de sus siglas en inglés) posiblemente vinculada a la detección de espectrometría de masas.

Las enzimas pueden estar en cualquier forma adecuada que permita que tenga lugar la reacción enzimática. Pueden estar purificados o parcialmente purificados o en forma de extractos celulares sin purificar o extractos parcialmente purificados. También es posible que las enzimas se inmovilicen en un vehículo adecuado.

Los ejemplos ilustran reacciones *in vitro* de acuerdo con la invención utilizando fosfoacetilasas de diferentes orígenes.

En otra realización, el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo en cultivo, en presencia de un organismo, preferentemente un microorganismo, que produce al menos una fosfoacetilasa o una sulfoacetilaldehído acetiltransferasa y, opcionalmente, enzimas que son necesarias para proporcionar el 2-hidroxiacetaldehído o para convertir aún más el fosfato de acilo producido en otros compuestos, tales como un ácido carboxílico o el acil-CoA, como se describe anteriormente en el presente documento. Un procedimiento que emplea un microorganismo para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con la invención se denomina procedimiento "*in vivo*". El 2-hidroxiacetaldehído puede proporcionarse externamente o puede producirse por el microorganismo empleado que expresa la fosfoacetilasa o la sulfoacetilaldehído acetiltransferasa misma. Dicho microorganismo expresa al menos una enzima necesaria para la producción enzimática del 2-hidroxiacetaldehído.

También es posible cultivar conjuntamente un microorganismo que sea capaz de producir un 2-hidroxiacetaldehído y un microorganismo que exprese una fosfoacetilasa y/o una sulfoacetilaldehído acetiltransferasa para convertir el 2-hidroxiacetaldehído producido por el primer microorganismo.

Por lo tanto, en dichas realizaciones de la invención, se usa un microorganismo que produce al menos una fosfoacetilasa o una sulfoacetilaldehído acetiltransferasa como se describe anteriormente. Es posible utilizar un microorganismo que produce de manera natural la fosfoacetilasa o la sulfoacetilaldehído acetiltransferasa o un microorganismo que se haya modificado genéticamente para que exprese (o sobreexpres) una fosfoacetilasa y/o la sulfoacetilaldehído acetiltransferasa. Por lo tanto, el microorganismo puede ser un microorganismo que expresa de manera natural una fosfoacetilasa y/o una sulfoacetilaldehído acetiltransferasa, es decir, que tiene de manera natural en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoacetilasa o una sulfoacetilaldehído acetiltransferasa y que la/las expresa. La expresión puede producirse constitutivamente o de manera inducida o regulada. Los microorganismos que inherentemente, es decir, de manera natural, tienen actividad fosfoacetilasa o actividad sulfoacetilaldehído acetiltransferasa son conocidos en la materia y cualquiera de ellos puede usarse en el contexto de la presente invención.

En otra realización, el microorganismo puede ser un microorganismo que se ha modificado genéticamente mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoacetilasa o una sulfoacetilaldehído acetiltransferasa. La molécula de ácido nucleico puede integrarse de manera estable en el genoma del microorganismo o puede estar presente de manera extracromosómica, por ejemplo, en un plásmido.

Dicho microorganismo modificado genéticamente puede, por ejemplo, ser un microorganismo que no tiene actividad fosfoacetolasa o actividad sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa de manera natural y se ha modificado genéticamente para expresar una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa o un microorganismo que tiene actividad fosfoacetolasa o actividad sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa de manera natural y que ha sido genéticamente modificado, por ejemplo, mediante transformación con un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, que codifica una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa para aumentar la actividad fosfoacetolasa o la actividad sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa en dicho microorganismo y/o mediante la inserción de un promotor frente a la secuencia de nucleótidos endógena que codifica la enzima para aumentar la actividad respectiva en dicho microorganismo.

Sin embargo, la invención excluye preferentemente los microorganismos de origen natural como los que se encuentran en la naturaleza que expresan una enzima como se describió anteriormente a los niveles que existen en la naturaleza. En cambio, el microorganismo de la presente invención y empleado en un procedimiento de la presente invención es preferentemente un microorganismo de origen no natural, ya sea que se haya modificado genéticamente para expresar (incluida la sobreexpresión) una enzima exógena de la invención que normalmente no existe en su genoma o si se ha genomanipulado para sobreexpresar una enzima exógena.

Por lo tanto, las enzimas y (micro)organismos empleados en relación con la presente invención son preferentemente enzimas o (micro)organismos de origen no natural, es decir, son enzimas o (micro)organismos que difieren significativamente de las enzimas o microorganismos de origen natural y que no se producen en la naturaleza. Con respecto a las enzimas, son preferentemente variantes de enzimas de origen natural que, como tales, no se producen en la naturaleza. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, mutantes, en particular preparados mediante procedimientos de biología molecular, que muestran propiedades mejoradas, tales como una mayor actividad enzimática, mayor especificidad de sustrato, mayor resistencia a la temperatura y similares. Con respecto a los (micro)organismos, son preferentemente organismos genéticamente modificados como se describe anteriormente en el presente documento que difieren de los organismos de origen natural debido a una modificación genética. Los organismos genéticamente modificados son organismos que no se producen de manera natural, es decir, que no se pueden encontrar en la naturaleza, y que difieren sustancialmente de los organismos de origen natural debido a la introducción de una molécula de ácido nucleico extraña.

Mediante la sobreexpresión de una enzima exógena o endógena como se describe anteriormente en el presente documento, la concentración de la enzima es sustancialmente más alta que la que se encuentra en la naturaleza, lo que puede forzar inesperadamente la reacción de la presente invención que utiliza una enzima no natural para la enzima respectiva. Preferentemente, la concentración de la enzima sobreexpresada es al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 % de la proteína total de la célula hospedadora.

Se entiende que un sustrato "no natural" es una molécula sobre la que no actúa la enzima respectiva en la naturaleza, aunque en realidad puede coexistir en el microorganismo junto con la enzima endógena. Este sustrato "no natural" no se convierte mediante el microorganismo en la naturaleza ya que se prefieren otros sustratos (por ejemplo, el "sustrato natural"). Por lo tanto, la presente invención contempla la utilización de un sustrato no natural con las enzimas descritas anteriormente en un entorno no encontrado en la naturaleza.

Por lo tanto, también es posible en el contexto de la presente invención que el microorganismo sea un microorganismo que, de manera natural, no tiene actividad fosfoacetolasa o actividad sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa, pero que está genéticamente modificado para comprender una secuencia de nucleótidos que permita la expresión de una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa. De forma similar, el microorganismo también puede ser un microorganismo que, de manera natural, tiene actividad fosfoacetolasa o actividad sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa pero que está genéticamente modificado para mejorar la actividad fosfoacetolasa o actividad sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa, por ejemplo, mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos exógena que codifica una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa o mediante la introducción de un promotor para el gen endógeno que codifica la enzima para aumentar la producción endógena a niveles sobreexpresados (no naturales).

Si se usa un microorganismo que expresa de manera natural una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa, es posible modificar dicho microorganismo para que la actividad respectiva se sobreexpresen en el microorganismo. Esto puede, por ejemplo, lograrse mediante la relación de mutaciones en la región promotora del gen correspondiente o la introducción de un promotor de alta expresión para conducir a un promotor que asegure una mayor expresión del gen. Como alternativa, también es posible mutar el gen como tal para conducir a una enzima que muestre una mayor actividad.

Mediante el uso de microorganismos que expresan una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa, es posible llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención directamente en el medio de cultivo, sin la necesidad de separar o purificar las enzimas.

En una realización, el organismo empleado en el procedimiento de acuerdo con la invención es un microorganismo que se ha modificado genéticamente para contener una molécula de ácido nucleico extraña que codifica una fosfoacetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa. El término "extraña" o "exógena" en este contexto significa que la molécula de ácido nucleico no se produce de manera natural en dicho microorganismo. Esto significa que no se produce en la misma estructura o en la misma ubicación en el microorganismo. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico extraña es una molécula recombinante que comprende un promotor y una secuencia codificante que codifica la enzima respectiva en la que el promotor que dirige la expresión de la secuencia codificante

es heterólogo con respecto a la secuencia codificante. "Heterólogo" en este contexto significa que el promotor no es el promotor que dirige de manera natural la expresión de dicha secuencia codificante, sino que es un promotor que dirige de manera natural la expresión de una secuencia codificante diferente, es decir, procede de otro gen, o es un promotor sintético o un promotor quimérico. Preferentemente, el promotor es un promotor heterólogo al microorganismo, es decir, un promotor que, de manera natural, no se produce en el microorganismo respectivo. Incluso más preferentemente, el promotor es un promotor inducible. Los promotores para impulsar la expresión en diferentes tipos de organismos, en particular en microorganismos, son bien conocidos por el experto en la materia.

En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico es extraña al microorganismo porque la enzima codificada no es endógena al microorganismo, es decir, el microorganismo no la expresa de manera natural cuando no está genéticamente modificada. En otras palabras, la enzima codificada es heteróloga con respecto al microorganismo. La molécula de ácido nucleico extraña puede estar presente en el microorganismo en forma extracromosómica, por ejemplo, como un plásmido, o integrada de forma estable en el cromosoma. Se prefiere una integración estable. Por lo tanto, la modificación genética puede consistir, por ejemplo, en la integración del gen(es) correspondiente(s) que codifica(n) la(s) enzima(s) en el cromosoma, o en la expresión de la(s) enzima(s) a partir de un plásmido que contiene un promotor cadena arriba de la secuencia que codifica la enzima, originándose el promotor y la secuencia codificante preferentemente de diferentes organismos, o cualquier otro procedimiento conocido por un experto en la materia.

El término "microorganismo" en el contexto de la presente invención se refiere a bacterias, así como a hongos, tales como levaduras, y también a algas y arqueas. En una realización preferida, el microorganismo es una bacteria. En principio se puede usar cualquier bacteria. Las bacterias preferidas para ser empleadas en el procedimiento de acuerdo con la invención son bacterias del género *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Zymomonas* o *Escherichia*. En una realización particularmente preferida, la bacteria pertenece al género *Escherichia* y aún más preferida a la especie *Escherichia coli*. En otra realización preferida, la bacteria pertenece a la especie *Pseudomonas putida* o a la especie *Zymomonas mobilis* o a la especie *Corynebacterium glutamicum* o a la especie *Bacillus subtilis*. También es posible emplear una bacteria extremófila tal como *Thermus thermophilus* o bacterias anaeróbicas de la familia *Clostridiaceae*.

En otra realización preferida, el microorganismo es un hongo, más preferentemente un hongo del género *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Kluyveromyces* o *Pichia* e incluso más preferentemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Pichia torula* o *Pichia utilis*.

En otra realización, el procedimiento de acuerdo con la invención hace uso de un microorganismo fotosintético que expresa al menos una fosfocetolasa y/o una sulfoacetaldehído acetiltransferasa. Preferentemente, el microorganismo es una bacteria fotosintética, o una microalga. En otra realización adicional, el microorganismo es un alga, más preferentemente un alga que pertenece a las diatomeas.

También es concebible usar en el procedimiento de acuerdo con la invención una combinación de microorganismos en los que diferentes microorganismos expresan diferentes enzimas como se describe anteriormente.

En una realización particularmente preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención hace uso de un microorganismo que es capaz de producir un 2-hidroxiacetaldehído como se define anteriormente. Dicho microorganismo puede ser capaz de producir dicho 2-hidroxiacetaldehído de manera natural o debido a una modificación genética que permite al microorganismo convertir un metabolito o sustrato externamente provisto en dicho 2-hidroxiacetaldehído. Se ha descrito que algunos organismos son capaces de producir un 2-hidroxiacetaldehído. Por ejemplo, se ha descrito que algunas bacterias arqueas, como *Methanocaldococcus jannaschii*, producen 2-hidroxiacetaldehído (lactaldehído; véase Grochowski y col, *J. Bacteriol.* 188 (2006), 2836-2844; White, RH, *Biochemistry* 47, (2008), 5037-5046). Además, se sabe que el lactaldehído es un intermediario metabólico en la ruta del 1,2-propandiol y se produce, por ejemplo, en el metabolismo de L-fucosa y R-ramnosa de *E. coli* (véase, por ejemplo, Boronat y Aguilar, *J. Bacteriol.* 147 (1981), 181-185; Bennet y San, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55 (2001), 1-9).

La modificación genética de los microorganismos para expresar una enzima de interés también se describirá más detalladamente a continuación.

La fosfocetolasa y/o sulfoacetaldehído acetiltransferasa utilizada en el procedimiento de acuerdo con la invención puede ser una fosfocetolasa o sulfoacetaldehído acetiltransferasa de origen natural o puede ser una fosfocetolasa/sulfoacetaldehído acetiltransferasa que procede de una fosfocetolasa/sulfoacetaldehído acetiltransferasa de origen natural, por ejemplo, mediante la introducción de mutaciones u otras alteraciones que, por ejemplo, alteran o mejoran la actividad enzimática, la estabilidad, etc.

La expresión "fosfocetolasa" o "una proteína/enzima que tiene la actividad de una fosfocetolasa" también cubre enzimas que proceden de una fosfocetolasa, que son capaces de producir un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxiacetaldehído como se definió anteriormente, pero que solo tienen una baja afinidad con su sustrato natural o ya no acepta su sustrato natural. Dicha modificación de la fosfocetolasa con respecto al sustrato preferido permite mejorar la conversión de un 2-hidroxiacetaldehído en un fosfato de acilo y reducir la producción de subproductos no deseados.

La expresión "sulfoacetaldehído acetiltransferasa" o "una proteína/enzima que tiene la actividad de una sulfoacetaldehído acetiltransferasa" también cubre enzimas que proceden de una sulfoacetaldehído acetiltransferasa, que son capaces de producir un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxiacetaldehído como se definió anteriormente, pero que solo tienen una baja afinidad con su sustrato natural o ya no acepta su sustrato natural. Dicha modificación de la

sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa con respecto al sustrato preferido permite mejorar la conversión de un 2-hidroxialdehído en un fosfato de acilo y reducir la producción de subproductos no deseados.

Los procedimientos para modificar y/o mejorar las actividades enzimáticas deseadas de las proteínas son bien conocidos por la persona experta en la materia e incluyen, por ejemplo, mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida al sitio y la posterior selección de enzimas que tienen las propiedades o enfoques deseados de la llamada "evolución dirigida".

Por ejemplo, para la modificación genética en células procariotas, se puede introducir una molécula de ácido nucleico que codifica fosfocetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa en plásmidos que permiten la mutagénesis o la modificación de la secuencia mediante recombinación de secuencias de ADN. Los procedimientos estándar (véase Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.) permiten realizar intercambios de bases o agregar secuencias naturales o sintéticas. Los fragmentos de ADN pueden unirse usando adaptadores y enlazadores complementarios a los fragmentos. Además, se pueden usar medidas de genomanipulación que proporcionan sitios de restricción adecuados o eliminan el exceso de ADN o sitios de restricción. En esos casos, en los que son posibles las inserciones, deleciones o sustituciones, se puede utilizar mutagénesis *in vitro*, "reparación del cebador", restricción o unión. En general, un análisis de secuencia, análisis de restricción y otros procedimientos de bioquímica y biología molecular se llevan a cabo como procedimientos de análisis. Las variantes de fosfocetolasa/sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa resultantes se prueban luego para la actividad deseada, por ejemplo, actividad enzimática, con un ensayo como se describe anteriormente y, en particular, para su actividad enzimática aumentada.

Como se ha descrito anteriormente, el microorganismo empleado en un procedimiento de la invención o contenido en la composición de la invención puede ser un microorganismo que ha sido genéticamente modificado mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica una fosfocetolasa y/o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa. Por lo tanto, en una realización preferida, el microorganismo es un microorganismo recombinante que se ha modificado genéticamente para tener una mayor actividad fosfocetolasa y/o una mayor actividad sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la transformación del microorganismo con un ácido nucleico que codifica una fosfocetolasa y/o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa. Una descripción detallada de la modificación genética de microorganismos se proporcionará más adelante. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico introducida en el microorganismo es una molécula de ácido nucleico que es heteróloga con respecto al microorganismo, es decir, no se produce de manera natural en dicho microorganismo.

En el contexto de la presente invención, una "actividad aumentada" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular, de la fosfocetolasa o la sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa, en el microorganismo genéticamente modificado es al menos un 10 %, preferentemente al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 30 % o un 50 %, incluso más preferentemente al menos un 70 % o un 80 % y particularmente preferido al menos un 90 % o un 100 % más que en el microorganismo no modificado correspondiente. En realizaciones aún más preferidas, el aumento en la expresión y/o actividad puede ser al menos un 150 %, al menos un 200 % o al menos un 500 %. En realizaciones particularmente preferidas, la expresión es al menos 10 veces, más preferentemente al menos 100 veces e incluso más preferentemente al menos 1000 veces mayor que en el microorganismo no modificado correspondiente.

El término expresión/actividad "aumentada" también cubre la situación en la que el microorganismo no modificado correspondiente no expresa una enzima correspondiente, por ejemplo, una fosfocetolasa o una sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa, de modo que la expresión/actividad correspondiente en el microorganismo no modificado es cero.

Preferentemente, la concentración de la enzima sobreexpresada es al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 % de la proteína total de la célula hospedadora.

Los expertos en la materia conocen bien los procedimientos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula. En una realización, la medición del nivel de expresión se realiza mediante la medición de la cantidad de la proteína correspondiente. Los procedimientos correspondientes son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen transferencia Western, ELISA, etc. En otra realización la medición del nivel de expresión se realiza mediante la medición de la cantidad del ARN correspondiente. Los procedimientos correspondientes son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen, por ejemplo, transferencia Northern.

Los procedimientos para medir la actividad enzimática de la fosfocetolasa o la sulfoacetaldéhidó acetiltransferasa son conocidos en la materia y ya se han descrito anteriormente.

En el contexto de la presente invención, el término "recombinante" significa que el microorganismo se modifica genéticamente para contener una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se definió anteriormente en comparación con un microorganismo de tipo silvestre o no modificado. Una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima como se definió anteriormente puede usarse sola o como parte de un vector.

Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además secuencias de control de expresión unidas operativamente al polinucleótido comprendido en la molécula de ácido nucleico. La expresión "unido operativamente" o "unido operablemente", como se usa a lo largo de la presente descripción, se refiere a un enlace entre una o más secuencias de control de expresión y la región codificante en el polinucleótido para expresarse de tal manera que la expresión se logre bajo condiciones compatible con la secuencia de control de expresión.

La expresión comprende la transcripción de la secuencia de ADN heterólogo, preferentemente en un ARNm traducible. Los expertos en la materia conocen bien los elementos reguladores que aseguran la expresión tanto en hongos como en bacterias. Abarcan promotores, potenciadores, señales de terminación, señales de direccionamiento y similares. A continuación se dan ejemplos en relación con explicaciones sobre vectores.

Los promotores para su uso en relación con la molécula de ácido nucleico pueden ser homólogos o heterólogos con respecto a su origen y/o con respecto al gen a expresar. Promotores adecuados son, por ejemplo, promotores que se prestan a la expresión constitutiva. Sin embargo, también se pueden utilizar promotores que solo se activan en un momento determinado por influencias externas. Los promotores artificiales y/o químicamente inducibles pueden usarse en este contexto.

Los vectores pueden comprender además secuencias de control de expresión unidas operativamente a dichos polinucleótidos contenidos en los vectores. Estas secuencias de control de la expresión pueden ser adecuadas para garantizar la transcripción y síntesis de un ARN traducible en bacterias u hongos.

Además, es posible insertar diferentes mutaciones en los polinucleótidos mediante procedimientos habituales en biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.), lo que lleva a la síntesis de polipéptidos que posiblemente tengan propiedades biológicas modificadas. La introducción de mutaciones puntuales es concebible en posiciones en las que una modificación de la secuencia de aminoácidos influye, por ejemplo, en la actividad biológica o la regulación del polipéptido.

Además, se pueden preparar mutantes que poseen una especificidad de producto o sustrato modificado. Preferentemente, dichos mutantes muestran una actividad aumentada. Como alternativa, se pueden preparar mutantes cuya actividad catalítica se elimina sin perder la actividad de unión al sustrato.

Además, la introducción de mutaciones en los polinucleótidos que codifican una enzima como se definió anteriormente permite reducir o aumentar la velocidad de expresión génica y/o la actividad de las enzimas codificadas mediante dichos polinucleótidos.

Para la modificación genética de bacterias u hongos, los polinucleótidos que codifican una enzima como se definió anteriormente o partes de estas moléculas pueden introducirse en plásmidos que permiten la mutagénesis o la modificación de la secuencia mediante recombinación de secuencias de ADN. Los procedimientos estándar (véase Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.) permiten realizar intercambios de bases o agregar secuencias naturales o sintéticas. Los fragmentos de ADN se pueden conectar entre sí mediante la aplicación de adaptadores y enlazadores a los fragmentos. Además, se pueden usar medidas de genomanipulación que proporcionan sitios de restricción adecuados o eliminan el exceso de ADN o sitios de restricción. En esos casos, en los que son posibles las inserciones, deleciones o sustituciones, se puede utilizar mutagénesis *in vitro*, "reparación del cebador", restricción o unión. En general, un análisis de secuencia, análisis de restricción y otros procedimientos de bioquímica y biología molecular se llevan a cabo como procedimientos de análisis.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se puede producir un microorganismo recombinante mediante modificación genética de hongos o bacterias que comprende introducir los polinucleótidos, moléculas de ácido nucleico o vectores descritos anteriormente en un hongo o bacteria.

El polinucleótido que codifica la enzima respectiva, en particular, una fosfocetolasa o una sulfoacetaldehído acetiltransferasa, se expresa para conducir a la producción de un polipéptido que tenga cualquiera de las actividades descritas anteriormente, por ejemplo, actividad fosfocetolasa o actividad sulfoacetaldehído acetiltransferasa. Una visión general de los diferentes sistemas de expresión se encuentra, por ejemplo, en *Methods in Enzymology* 153 (1987), 385-516, en Bitter y col. (*Methods in Enzymology* 153 (1987), 516-544) y en Sawers y col. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 46 (1996), 1-9), Billman-Jacobe (*Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 500-4), Hockney (*Trends in Biotechnology* 12 (1994), 456-463), Griffiths y col., (*Methods in Molecular Biology* 75 (1997), 427-440). Una visión general de los sistemas de expresión de levadura se da, por ejemplo, por Hensing y col., (*Antonie van Leeuwenhoek* 67 (1995), 261-279), Bussineau y col. (*Developments in Biological Standardization* 83 (1994), 13-19), Gellissen y col. (*Antonie van Leeuwenhoek* 62 (1992), 79-93), Fleer (*Current Opinion in Biotechnology* 3 (1992), 486-496), Vedvick (*Current Opinion in Biotechnology* 2 (1991), 742-745) y Buckholz (*Bio/Technology* 9 (1991), 1067-1072).

Los vectores de expresión han sido ampliamente descritos en las referencias. Como norma, contienen no solo un gen marcador de selección y un origen de replicación que garantiza la replicación en el hospedador seleccionado, sino también un promotor bacteriano o vírico, y en la mayoría de los casos una señal de terminación para la transcripción.

Entre el promotor y la señal de terminación hay en general al menos un sitio de restricción o un polienlazador que permite la inserción de una secuencia codificante de ADN. La secuencia de ADN que controla de manera natural la transcripción del gen correspondiente puede usarse como secuencia promotora, si está activa en el organismo hospedador seleccionado. Sin embargo, esta secuencia también se puede intercambiar por otras secuencias promotoras. Es posible utilizar promotores que garanticen la expresión constitutiva del gen y promotores inducibles que permitan un control deliberado de la expresión del gen. Las secuencias promotoras bacterianas y víricas que poseen estas propiedades se describen en detalle en las referencias. Las secuencias reguladoras para la expresión en microorganismos (por ejemplo, *E. coli*, *S. cerevisiae*) se describen suficientemente en las referencias. Los promotores que permiten una expresión particularmente alta de una secuencia cadena abajo son, por ejemplo, el promotor T7 (Studier y col., *Methods in Enzymology* 185 (1990), 60-89), lacUV5, trp, trp-lacUV5 (DeBoer y col., en Rodríguez y Chamberlin (Eds), *Promoters, Structure and Function*; Praeger, Nueva York, (1982), 462-481; DeBoer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), 21-25), Ip1, rac (Boros y col., *Gene* 42 (1986), 97-100). Los promotores inducibles se usan preferentemente para la síntesis de polipéptidos. Estos promotores a menudo conducen a mayores rendimientos de polipéptidos que los promotores constitutivos. Para obtener una cantidad óptima de polipéptido, a menudo se usa un proceso de dos etapas. Primero, se cultivan las células hospedadoras en condiciones óptimas hasta una densidad celular relativamente alta. En la segunda etapa, se induce la transcripción dependiendo del tipo de promotor utilizado. A este respecto, un promotor tac es particularmente adecuado que se puede inducir por lactosa

o IPTG (= isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) (deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 21-25). Las señales de terminación para la transcripción también se describen en las referencias.

La transformación de la célula hospedadora con un polinucleótido o vector como se describe anteriormente se puede llevar a cabo mediante procedimientos estándar, como por ejemplo se describe en Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. La célula hospedadora se cultiva en medios nutritivos que cumplen los requisitos de la célula hospedadora particular utilizada, en particular con respecto al valor de pH, temperatura, concentración de sal, aireación, antibióticos, vitaminas, oligoelementos, etc.

Cuando el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo *in vivo* mediante el uso de un organismo/microorganismo que proporciona las actividades enzimáticas respectivas, el organismo, preferentemente microorganismo, se cultiva en condiciones de cultivo adecuadas que permiten la reacción enzimática. Las condiciones de cultivo específicas dependen del organismo/microorganismo específico empleado, pero son bien conocidas por el experto en la materia. Las condiciones de cultivo generalmente se eligen de tal manera que permitan la expresión de los genes que codifican las enzimas para las reacciones respectivas. El experto en la materia conoce varios procedimientos para mejorar y ajustar la expresión de determinados genes en determinadas etapas del cultivo, tales como la inducción de la expresión génica mediante inductores químicos o mediante un cambio de temperatura.

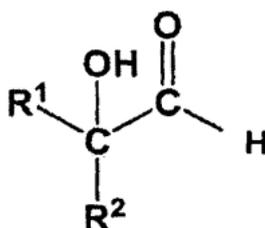
En otra realización, el procedimiento de la invención comprende la etapa de proporcionar el organismo, preferentemente el microorganismo que lleva la actividad o actividades enzimáticas respectivas en forma de un cultivo (celular), preferentemente en forma de un cultivo celular líquido, una etapa posterior de cultivo del organismo, preferentemente el microorganismo en un fermentador (a menudo también denominado biorreactor) en condiciones adecuadas que permitan la expresión de la enzima respectiva y que además comprenda la etapa de efectuar una conversión enzimática de un procedimiento de la invención como se describió anteriormente en el presente documento. Los dispositivos fermentadores o biorreactores adecuados y las condiciones de fermentación son conocidas por el experto en la materia. Un biorreactor o un fermentador se refiere a cualquier dispositivo o sistema fabricado o diseñado conocido en la materia que soporta un entorno biológicamente activo. Por lo tanto, un biorreactor o un fermentador puede ser un recipiente en el que se lleva a cabo una reacción química como el procedimiento de la presente invención que implica un organismo, preferentemente microorganismos y/o sustancias activas, es decir, la enzima(s) descrita anteriormente procedente de dichos organismos u organismos que albergan las enzimas descritas anteriormente. En un biorreactor o un fermentador, este procedimiento puede ser aeróbico o anaeróbico. Estos biorreactores son comúnmente cilíndricos, y pueden variar en tamaño desde litros hasta metros cúbicos, y a menudo están hechos de acero inoxidable. A este respecto, sin quedar ligados a teoría alguna, el fermentador o biorreactor puede diseñarse de manera que sea adecuado para cultivar los organismos, preferentemente microorganismos, en, por ejemplo, un cultivo discontinuo, cultivo discontinuo de alimentación, cultivo de perfusión o cultivo de quimiostato, todos los cuales son generalmente conocidos en la materia.

El medio de cultivo puede ser cualquier medio de cultivo adecuado para cultivar el organismo o microorganismo respectivo.

La presente invención también se refiere a una composición que contiene

- (a) un 2-hidroxialdehído y una fosfocetolasa; o
- (b) un 2-hidroxialdehído y una sulfoacetaldehído acetiltransferasa; o
- (c) un 2-hidroxialdehído y una fosfocetolasa y una sulfoacetaldehído acetiltransferasa; o
- (d) un 2-hidroxialdehído y un microorganismo que expresa una fosfocetolasa; o
- (e) un 2-hidroxialdehído y un microorganismo que expresa una sulfoacetaldehído acetiltransferasa; o
- (f) un 2-hidroxialdehído y un microorganismo que expresa una fosfocetolasa y una sulfoacetaldehído acetiltransferasa,

en el que el 2-hidroxialdehído responde a la siguiente fórmula:



### 2-hidroxialdehído

en la que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se seleccionan independientemente de H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$  y  $\text{C}_2\text{H}_5$  en la que si  $\text{R}^1$  es H,  $\text{R}^2$  no puede ser H, en la que el microorganismo mencionado en los artículos (d), (e) y (f) es un microorganismo que ha sido genéticamente modificado mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica una fosfocetolasa (artículo (d)), o de un ácido nucleico que codifica un sulfoacetaldehído acetiltransferasa (artículo (e)) o de un ácido nucleico que

codifica una fosfocetolasa y de un ácido nucleico que codifica una sulfoacetaldehído acetiltransferasa (artículo (f)).

La fosfocetolasa/sulfoacetaldehído acetiltransferasa puede ser una fosfocetolasa/sulfoacetaldehído acetiltransferasa como se definió anteriormente en relación con el procedimiento de acuerdo con la invención. El microorganismo contenido en la composición puede ser cualquier microorganismo adecuado que exprese una fosfocetolasa y/o una sulfoacetaldehído acetiltransferasa, en particular, un microorganismo como se describe anteriormente en el presente documento en relación con el procedimiento de acuerdo con la invención, siempre que se presente la condición adicional en caso de (d-f) anterior; esta condición se aplica a la composición reclamada, pero no al procedimiento o uso reclamado.

La presente invención se refiere además al uso de una fosfocetolasa o de una sulfoacetaldehído acetiltransferasa o de un microorganismo que expresa una fosfocetolasa y/o sulfoacetaldehído acetiltransferasa para la producción de un fosfato de acilo a partir de 2-hidroxiacetaldehído como se definió anteriormente en el presente documento. Con respecto a la fosfocetolasa/sulfoacetaldehído acetiltransferasa y al microorganismo, se aplica lo mismo que se ha expuesto anteriormente en relación con un procedimiento de acuerdo con la invención.

La **Figura 1** muestra esquemáticamente la conversión de un 2-hidroxiacetaldehído en el fosfato de acilo correspondiente.

La **Figura 2** muestra esquemáticamente la conversión de fosfato de acilo en el ácido carboxílico correspondiente.

La **Figura 3** muestra esquemáticamente la conversión de fosfato de acilo en el acil-CoA correspondiente.

La **Figura 4** muestra esquemáticamente la conversión de 2-hidroxiacetona en ácido propanoico o propionil-CoA.

La **Figura 5** muestra esquemáticamente la conversión de 2,3-dihidroxiacetona en ácido 3-hidroxiacetona o 3-hidroxiacetona-CoA.

## **Ejemplos**

### **Ejemplo 1: Clonación, expresión y purificación de fosfocetolasas Síntesis génica, clonación y expresión de enzimas recombinantes**

Las secuencias de fosfocetolasas inferidas de los genomas de organismos procariontes se generaron mediante concatenación de oligonucleótidos para adaptarse al uso de codones de *E. coli* (los genes se sintetizaron comercialmente por GeneArt®). Se insertó un tramo de 6 codones de histidina después del codón de iniciación de metionina para proporcionar un marcador de afinidad para la purificación. Los genes así sintetizados se clonaron en un vector de expresión pUC18 modificado (New England Biolabs) que contenía un Sitio de Clonación Múltiple (MCS, de sus siglas en inglés) modificado. Los genes de interés se clonaron en los sitios de restricción PacI y NotI.

Las células competentes de *E. coli* MG1655 se transformaron con estos vectores usando un procedimiento estándar de choque térmico. Las células transformadas se cultivaron en medio LB-ampicilina durante 24 h a 30 °C, agitación a 160 rpm.

Las células se recogieron mediante centrifugación a 4 °C, 10.000 rpm durante 20 min y los sedimentos se almacenaron a -80 °C.

### **Purificación y concentración de proteínas**

Los sedimentos de 200 ml de células cultivadas se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 3 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 que contenía NaCl 300 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM e imidazol 10 mM. Se añadieron 10 µl de lisonasa (Merck). Las células se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y luego se volvieron a enfriar durante 20 minutos. La lisis celular se completó mediante sonicación durante 2 x 30 segundos. Los extractos bacterianos se aclararon mediante centrifugación a 4 °C, 10.000 rpm durante 20 min. Los lisados bacterianos aclarados se cargaron en la columna PROTINO-1000 Ni-TED (Macherey-Nagel) permitiendo la adsorción de proteínas marcadas con 6-His. Las columnas se lavaron y las enzimas de interés se eluyeron con 4 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 que contenía NaCl 300 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM, imidazol 250 mM. Luego, los eluidos se concentraron, se desalaron en una unidad de filtro Amicon Ultra-4 de 10 kDa (Millipore) y las enzimas se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. La preparación de la enzima se complementó con glicerol al 10 % antes del almacenamiento a largo plazo. Las concentraciones de proteínas se cuantificaron mediante medición directa de UV a 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). La pureza de las proteínas así purificadas variaba de un 70 % a un 90 %.

### **Ejemplo 2: Estudio de la formación de fosfato de 3-hidroxiacetona a partir de 2,3-dihidroxiacetona, catalizado por fosfocetolasa**

#### *Reacciones enzimáticas*

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

Tris-HCl 50 mM pH 7,5  
 Fosfato de potasio 25 mM pH 7,5  
 Pirofosfato de tiamina (TPP) 5 mM  
 MgCl<sub>2</sub> 5 mM Fluoruro de sodio 23 mM Yodoacetato de sodio 8 mM

Clorhidrato de L-cisteína 1,9 mM  
2,3-dihidroxiopropanal (D,L-gliceraldehído) 50 mM (Sigma)

El pH se ajustó a 7,5

5 Cada reacción enzimática se inició mediante la adición de 3 mg/ml de fosfocetolasa (PKT, de sus siglas en inglés) recombinante purificada.

Se realizaron ensayos de control en los que no se añadió enzima o no se añadió sustrato.

10 Las incubaciones se realizaron durante la noche con agitación a 37 °C. La formación de fosfato de 3-hidroxiopropionilo se estudió mediante la detección de 3-hidroxiopropionil-hidroxiato de hierro (III) mediante el siguiente procedimiento (Racker E., Methods Enzymol. 5, 1962, 276-280): Se añadieron 0,1 ml de hidrocloreuro de hidroxilamina (2 M, pH 6,5) a 0,1 ml de mezcla de reacción. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las muestras se acidificaron con 35 µl de ácido tricloroacético al 30 %. Luego se añadieron 35 µl de HCl 8 M y 35 µl de reactivo FeCl<sub>3</sub> (FeCl<sub>3</sub> al 10 % en HCl 0,1 M). Las muestras se aclararon adicionalmente mediante centrifugación y la absorbancia del complejo férrico 3-hidroxiopropionil-hidroxiato se midió a 505 nm.

15 Se observó una baja señal de absorbancia en los ensayos de control en los que no se añadió fosfocetolasa o no se añadió 2,3-dihidroxiopropanal. Los valores de absorbancia de las muestras enzimáticas corregidas por sustracción del ensayo de control sin enzima, se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1**

Ensayo enzimático con fosfocetolasa (PKT)	Número de referencia de Uniprot	Absorbancia a 505 nm
PKT de <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Q6R2Q6 (SEQ ID NO: 1)	0,024
PKT de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> cepa KF147	A9QST6 (SEQ ID NO: 3)	0,012
PKT de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824	Q97JE3 (SEQ ID NO: 2)	0,120
PKT de <i>Bifidobacterium gallicum</i> DSM 20093	D1NS90 (SEQ ID NO: 16)	0,020
PKT de <i>Leuconostoc citreum</i> (cepa KM20)	B1MWV8 (SEQ ID NO: 17)	0,014
PKT de <i>Streptococcus gordonii</i> (cepa Challis / ATCC 35105 / CH1 / DL1 / V288)	A8AV21 (SEQ ID NO: 18)	0,088

**Ejemplo 3: Estudio de la formación de fosfato de propionilo a partir de 2-hidroxiopropanal catalizado por fosfocetolasa**

20 Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 2. Se usó 2-hidroxiopropanal (lactaldehído) como sustrato en lugar de 2,3-dihidroxiopropanal.

*Ensayo colorimétrico a base de hidroxamato*

25 La formación de fosfato de propionilo se estudió a través de la detección de propionil-hidroxiato de hierro (III) utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Se observó una baja señal de absorbancia en los ensayos de control en los que no se añadió fosfocetolasa o no se añadió 2-hidroxiopropanal. Los valores de absorbancia de las muestras enzimáticas corregidas por sustracción del ensayo de control sin enzima, se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2**

Ensayo enzimático con fosfocetolasa (PKT)	Número de referencia de Uniprot	Absorbancia a 505 nm
PKT de <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Q6R2Q6 (SEQ ID NO: 1)	0,006
PKT de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824	Q97JE3 (SEQ ID NO: 2)	0,004
PKT de <i>Thiobacillus denitrificans</i> (cepa ATCC 25259)	Q3SKJ7 (SEQ ID NO: 19)	0,008

Por lo tanto, se demostró que diferentes fosfocetolasas catalizan la conversión de un 2-hidroxialdehído en el correspondiente fosfato de acilo.

30 **Ejemplo 4: Clonación, expresión y purificación de sulfoacetaldehído acetiltransferasas**

*Síntesis génica, clonación y expresión de proteínas recombinantes*

Las secuencias de las enzimas estudiadas inferidas de los genomas de organismos procariontes se generaron mediante concatenación de oligonucleótidos para adaptarse al uso de codones de *E. coli* (los genes se sintetizaron comercialmente por GeneArt®). Se insertó un tramo de 6 codones de histidina después del codón de iniciación de

metionina para proporcionar un marcador de afinidad para la purificación. Los genes así sintetizados se clonaron en un vector de expresión pET-25b(+) (los vectores fueron construidos por GeneArt®).

5 Las células competentes de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) se transformaron con estos vectores de acuerdo con el procedimiento estándar de choque térmico. Las células transformadas se cultivaron con agitación (160 rpm) usando medio de autoinducción ZYM-5052 (Studier FW, Prot. Exp. Pur. 41, (2005), 207-234) durante 7 h a 30 °C y la expresión de proteínas continuó a 18 °C durante la noche (aproximadamente 16 h). Las células se recogieron mediante centrifugación a 4 °C, 10.000 rpm durante 20 min y los sedimentos se almacenaron a -80 °C.

#### Purificación y concentración de proteínas

10 Los sedimentos de 200 ml de células cultivadas se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 que contenía NaCl 300 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, imidazol 10 mM y DTT 1 mM. Se añadieron veinte microlitros de lisonasa (Novagen). Las células se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y luego se volvieron a enfriar durante 20 minutos. La lisis celular se completó mediante sonicación durante 2 x 30 segundos. Los extractos bacterianos se aclararon mediante centrifugación a 4 °C, 4000 rpm durante 40 min. Los lisados bacterianos aclarados se cargaron en una columna PROTINO-2000 Ni-TED (Macherey-Nagel) permitiendo la adsorción de proteínas  
15 marcadas con 6-His. Las columnas se lavaron y las enzimas de interés se eluyeron con 6 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 que contenía NaCl 300 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM e imidazol 250 mM. Luego, los eluidos se concentraron, se desalaron en una unidad de filtro Amicon Ultra-4 de 10 kDa (Millipore) y las enzimas se resuspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. La pureza de las proteínas así purificadas varió de un 70 % a un 90 % según lo estimado por el análisis SDS-PAGE. Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante  
20 medición directa de UV a 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) o mediante el ensayo de Bradford (BioRad).

#### **Ejemplo 5: Análisis basado en HPLC de la conversión de D, L-lactaldehído (2-hidroxiopropanal) en fosfato de propionilo y luego en ácido propiónico**

25 Las fosfocetolasas se expresaron y purificaron como se describe en el **Ejemplo 1**. Las sulfoacetaldehído acetiltransferasas se expresaron como se describe en el **Ejemplo 4**.

#### *Reacción enzimática*

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

30 Tris-HCl 50 mM pH 7,5  
Con o sin fosfato de sodio 25 mM pH 7,5  
Pirofosfato de tiamina (TPP) 0,6 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1 mM  
Clorhidrato de L-cisteína 1,9 mM  
D,L-lactaldehído (Sigma-Aldrich) 50 mM  
2,8 mg/ml de enzima purificada  
35 Volumen total 150 µl.

Se realizó un ensayo de control en el que no se añadió enzima. Los ensayos enzimáticos se realizaron durante la noche a 37 °C. La formación de ácido propiónico se estudió mediante análisis basado en HPLC.

#### *Procedimiento basado en HPLC*

40 Las reacciones enzimáticas se detuvieron mediante una incubación de 5 minutos a 80 °C. Luego, se añadieron 150 µl de MeCN en el medio, y los tubos de ensayo se centrifugaron. Se filtraron 100 µl del sobrenadante aclarado y se transfirieron a un vial limpio.

Los análisis de HPLC se realizaron usando un sistema 1260 Infinity LC (Agilent), equipado con un detector de refractómetro y un módulo de calentamiento de columna. Se separaron 5 µl de muestra en una columna Hi-Plex H (100 x 7,7 mm, tamaño de partícula de 8 µm, temp. de la columna 65 °C) equipada con una columna de protección PL  
45 Hi-Plex H (50 x 7,7 mm). La fase móvil consistió en ácido sulfúrico acuoso (1 mM) y se ejecutó con un caudal de 0,8 ml/min. El tiempo de retención de D, L-lactaldehído y ácido propiónico en estas condiciones fue de 4,94 y 6,62 min, respectivamente.

50 Varias fosfocetolasas o sulfoacetaldehído acetiltransferasas fueron capaces de catalizar la conversión de D,L-lactaldehído en ácido propiónico (**Tabla 3**). La formación de ácido propiónico se mejoró en presencia de fosfato inorgánico, lo que indica que la conversión tiene lugar a través de un fosfato de acilo como intermedio. El fosfato de acilo, que es bastante inestable, se convierte en ácido propiónico mediante una ruta de hidrólisis espontánea.

#### **Tabla 3**

	enzima	organismo	número de referencia de Uniprot	ácido propiónico mM
Con fosfato 50 mM	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Castellaniella defragans (SEQ ID NO: 4)	Q84H44	1,1
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Alcaligenes xyloxydans (SEQ ID NO: 5)	Q84H41	0,5
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Roseovarius nubinhibens (SEQ ID NO: 8)	A3SR25	1,8
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Desulfonispota thiosulfatigenes (SEQ ID NO: 6)	Q93PS3	0,4
	Fosfocetolasa	Streptococcus gordonii (SEQ ID NO: 18)	A8AV21	5,1
	Fosfocetolasa	Lactococcus lactis (SEQ ID NO: 3)	A9QST6	6,9
	Fosfocetolasa	Lactococcus crispatus (SEQ ID NO: 20)	D5H215	0,8
	control sin enzima			
Sin fosfato 50 mM	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Castellaniella defragans	Q84H44	0,2
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Alcaligenes xyloxydans	Q84H41	0,2
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Roseovarius nubinhibens	A3SR25	2,1
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Desulfonispota thiosulfatigenes	Q93PS3	0,3
	Fosfocetolasa	Streptococcus gordonii	A8AV21	0,6
	Fosfocetolasa	Lactococcus lactis	A9QST6	1,6
	Fosfocetolasa	Lactococcus crispatus	D5H215	0,4
	control sin enzima			

**Ejemplo 6: Análisis basado en HPLC de la conversión de D, L-gliceraldehído (2,3-hidroxiopropanal) en fosfato de 3-hidroxiopropionilo y luego en ácido 3-hidroxiopropiónico**

Todas las fosfocetolasas se expresaron y purificaron como se describe en el **Ejemplo 1**. Las sulfoacetaldehído acetiltransferasas se expresaron como se describe en el **Ejemplo 4**.

5 **Reacción enzimática**

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

- 10 Tris-HCl 50 mM pH 7,5  
 Con o sin fosfato de sodio 25 mM pH 7,5  
 0. Pirofosfato de tiamina (TPP) 6 mM  
 MgCl<sub>2</sub> 1 mM  
 Clorhidrato de L-cisteína 1,9 mM  
 D,L-gliceraldehído 50 mM (Sigma)  
 2,8 mg/ml de enzima purificada  
 El volumen total de la reacción fue de 150 µl.

- 15 Se realizó un ensayo de control en el que no se añadió enzima. Los ensayos enzimáticos se realizaron durante la noche a 37 °C. La formación de ácido 3-hidroxiopropiónico se estudió mediante análisis basado en HPLC.

**Procedimiento basado en HPLC**

- 20 Las reacciones enzimáticas se detuvieron mediante una incubación de 5 minutos a 80 °C. Luego, se añadieron 150 µl de MeCN en el medio, y los tubos de ensayo se centrifugaron. Se filtraron 100 µl del sobrenadante aclarado y se transfirieron a un vial limpio.

La cantidad de ácido 3-hidroxiopropiónico producida se midió usando un procedimiento basado en HPLC. El análisis de HPLC se realizó usando un sistema Agilent 1260 Infinity LC, equipado con módulo de calentamiento de columna y refractómetro. Se separaron 5 µl de muestras usando 3 columnas conectadas en serie de la siguiente manera:

1. Columna de protección Hi-Plex (50 x 7,7 mm, tamaño de partícula de 8 µm) (Agilent)
2. Columna Hi-Plex (100 x 7,7 mm, tamaño de partícula de 8 µm) (Agilent)
3. Columna Zorbax SB-Aq (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm, temp. de la columna 65 °C) (Agilent).

5 La fase móvil consistió en ácido sulfúrico acuoso (1 mM), el caudal de la fase móvil fue de 0,5 ml/min. El tiempo de retención de D,L-gliceraldehído y ácido 3-hidroxiopropiónico en estas condiciones fue de 12,12 y 14,67 min, respectivamente.

10 Varias fosfocetolasas o sulfoacetaldehído acetiltransferasas fueron capaces de catalizar la conversión de D, L-gliceraldehído en ácido 3-hidroxiopropiónico (**Tabla 4**). Se considera que la conversión tiene lugar a través del fosfato de 3-hidroxiopropionilo intermedio, que es bastante inestable y se hidroliza espontáneamente a ácido 3-hidroxiopropiónico.

**Tabla 4**

	enzima	organismo	número de referencia de Uniprot	ácido 3-hidroxiopropiónico mM
con fosfato 50 mM	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Castellaniella defragans	Q84H44	0,2
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Alcaligenes xyloxydans	Q84H41	0,1
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Roseovarius nubinhibens	A3SR25	0,3
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Desulfonispora thiosulfatigenes	Q93PS3	0,1
	Fosfocetolasa	Streptococcus gordonii	A8AV21	2,1
	Fosfocetolasa	Lactococcus lactis	A9QST6	0,8
	Fosfocetolasa	Lactococcus crispatus	D5H215	0,3
	control sin enzima			
sin fosfato 50 mM	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Castellaniella defragans	Q84H44	0,1
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Alcaligenes xyloxydans	Q84H41	0,1
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Roseovarius nubinhibens	A3SR25	0,4
	Sulfoacetaldehído acetiltransferasa	Desulfonispora thiosulfatigenes	Q93PS3	0,2
	Fosfocetolasa	Streptococcus gordonii	A8AV21	1,1
	Fosfocetolasa	Lactococcus lactis	A9QST6	1,3
	Fosfocetolasa	Lactococcus crispatus	D5H215	1,2
	control sin enzima			

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Scientist of Fortune S.A.
- <120> Producción enzimática de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído
- 15 <130> Y2058 PCT S3
- <150> EP 15 18 4678.9
- <151> 10/09/2015
- <150> EP 16 15 7821.6
- <151> 29/02/2016
- 20 <160> 20
- <170> BiSSAP 1.2
- <210> 1
- <211> 825
- <212> PRT

ES 2 763 824 T3

<213> Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum

<400> 1

```

Met Thr Asn Pro Val Ile Gly Thr Pro Trp Gln Lys Leu Asp Arg Pro
1      5      10
Val Ser Glu Glu Ala Ile Glu Gly Met Asp Lys Tyr Trp Arg Val Thr
20     25     30
Asn Tyr Met Ser Ile Gly Gln Ile Tyr Leu Arg Ser Asn Pro Leu Met
35     40     45
Lys Glu Pro Phe Thr Arg Asp Asp Val Lys His Arg Leu Val Gly His
50     55     60
Trp Gly Thr Thr Pro Gly Leu Asn Phe Leu Leu Ala His Ile Asn Arg
65     70     75     80
Leu Ile Ala Asp His Gln Gln Asn Thr Val Phe Ile Met Gly Pro Gly
85     90     95
His Gly Gly Pro Ala Gly Thr Ser Gln Ser Tyr Val Asp Gly Thr Tyr
100    105    110
Thr Glu Tyr Tyr Pro Asn Ile Thr Lys Asp Glu Ala Gly Leu Gln Lys
115    120    125
Phe Phe Arg Gln Phe Ser Tyr Pro Gly Gly Ile Pro Ser His Phe Ala
130    135    140
Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly Glu Leu Gly Tyr Ala
145    150    155    160
Leu Ser His Ala Tyr Gly Ala Val Met Asn Asn Pro Ser Leu Phe Val
165    170    175
Pro Cys Ile Ile Gly Asp Gly Glu Ala Glu Thr Gly Pro Leu Ala Thr
180    185    190
Gly Trp Gln Ser Asn Lys Leu Val Asn Pro Arg Thr Asp Gly Ile Val
195    200    205
Leu Pro Ile Leu His Leu Asn Gly Tyr Lys Ile Ala Asn Pro Thr Ile
210    215    220
Leu Ala Arg Ile Ser Asp Glu Glu Leu His Asp Phe Phe Arg Gly Met
225    230    235    240
Gly Tyr His Pro Tyr Glu Phe Val Ala Gly Phe Asp Asn Glu Asp His
245    250    255
Met Ser Ile His Arg Arg Phe Ala Glu Leu Phe Glu Thr Ile Phe Asp
260    265    270
Glu Ile Cys Asp Ile Lys Ala Ala Ala Gln Thr Asp Asp Met Thr Arg
275    280    285
Pro Phe Tyr Pro Met Leu Ile Phe Arg Thr Pro Lys Gly Trp Thr Cys
290    295    300

```

ES 2 763 824 T3

Pro Lys Phe Ile Asp Gly Lys Lys Thr Glu Gly Ser Trp Arg Ala His  
 305 310 315 320  
 Gln Val Pro Leu Ala Ser Ala Arg Asp Thr Glu Glu His Phe Glu Val  
 325 330 335  
 Leu Lys Gly Trp Leu Glu Ser Tyr Lys Pro Glu Glu Leu Phe Asn Ala  
 340 345 350  
 Asp Gly Ser Ile Lys Asp Asp Val Thr Ala Phe Met Pro Lys Gly Asp  
 355 360 365  
 Leu Arg Ile Gly Ala Asn Pro Asn Ala Asn Gly Gly Val Ile Arg Glu  
 370 375 380  
 Asp Leu Lys Leu Pro Glu Leu Asp Gln Tyr Glu Val Thr Gly Val Lys  
 385 390 395 400  
 Glu Tyr Gly His Gly Trp Gly Gln Val Glu Ala Pro Arg Ser Leu Gly  
 405 410 415  
 Ala Tyr Cys Arg Asp Ile Ile Lys Asn Asn Pro Asp Ser Phe Arg Ile  
 420 425 430  
 Phe Gly Pro Asp Glu Thr Ala Ser Asn Arg Leu Asn Ala Thr Tyr Glu  
 435 440 445  
 Val Thr Asp Lys Gln Trp Asp Asn Gly Tyr Leu Ser Ser Leu Val Asp  
 450 455 460  
 Glu His Met Ala Val Thr Gly Gln Val Thr Glu Gln Leu Ser Glu His  
 465 470 475 480  
 Gln Cys Glu Gly Phe Leu Glu Ala Tyr Leu Leu Thr Gly Arg His Gly  
 485 490 495  
 Ile Trp Ser Ser Tyr Glu Ser Phe Val His Val Ile Asp Ser Met Leu  
 500 505 510  
 Asn Gln His Ala Lys Trp Leu Glu Ala Thr Val Arg Glu Ile Pro Trp  
 515 520 525  
 Arg Lys Pro Ile Ser Ser Val Asn Leu Leu Val Ser Ser His Val Trp  
 530 535 540  
 Arg Gln Asp His Asn Gly Phe Ser His Gln Asp Pro Gly Val Thr Ser  
 545 550 555 560  
 Val Leu Ile Asn Lys Thr Phe Asn Asn Asp His Val Thr Asn Ile Tyr  
 565 570 575  
 Phe Ala Thr Asp Ala Asn Met Leu Leu Ala Ile Ser Glu Lys Cys Phe  
 580 585 590  
 Lys Ser Thr Asn Lys Ile Asn Ala Ile Phe Ala Gly Lys Gln Pro Ala  
 595 600 605  
 Pro Thr Trp Ile Thr Leu Asp Glu Ala Arg Ala Glu Leu Glu Ala Gly  
 610 615 620  
 Ala Ala Glu Trp Lys Trp Ala Ser Asn Ala Glu Asn Asn Asp Glu Val  
 625 630 635 640  
 Gln Val Val Leu Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Thr Gln Glu Ile Met  
 645 650 655  
 Ala Ala Ser Asp Ala Leu Asn Lys Met Gly Ile Lys Phe Lys Val Val  
 660 665 670  
 Asn Val Val Asp Leu Leu Lys Leu Gln Ser Arg Glu Asn Asn Asp Glu  
 675 680 685  
 Ala Leu Thr Asp Glu Glu Phe Thr Asp Leu Phe Thr Ala Asp Lys Pro  
 690 695 700  
 Val Leu Phe Ala Tyr His Ser Tyr Ala Gln Asp Val Arg Gly Leu Ile  
 705 710 715 720  
 Tyr Asp Arg Pro Asn His Asp Asn Phe Asn Val Val Gly Tyr Lys Glu  
 725 730 735  
 Gln Gly Ser Thr Thr Thr Pro Phe Asp Met Val Arg Val Asn Asp Met  
 740 745 750  
 Asp Arg Tyr Ala Leu Gln Ala Ala Ala Leu Lys Met Ile Asp Ala Asp  
 755 760 765  
 Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Asp Glu Leu Asn Ala Phe Arg Gln Lys Ala  
 770 775 780  
 Phe Gln Phe Ala Val Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Pro Glu Phe Thr Asp  
 785 790 795 800  
 Trp Val Tyr Pro Asp Val Lys Val Asp Glu Thr Gln Met Leu Ser Ala

ES 2 763 824 T3

805 810 815  
 Thr Ala Ala Thr Ala Gly Asp Asn Glu  
 820 825

<210> 2  
 <211> 796  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium acetobutylicum  
 <400> 2

5

Met Gln Ser Ile Ile Gly Lys His Lys Asp Glu Gly Lys Ile Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Glu Tyr Leu Lys Lys Ile Asp Ala Tyr Trp Arg Ala Ala Asn Phe Ile  
 20 25 30  
 Ser Val Gly Gln Leu Tyr Leu Leu Asp Asn Pro Leu Leu Arg Glu Pro  
 35 40 45  
 Leu Lys Pro Glu His Leu Lys Arg Lys Val Val Gly His Trp Gly Thr  
 50 55 60  
 Ile Pro Gly Gln Asn Phe Ile Tyr Ala His Leu Asn Arg Val Ile Lys  
 65 70 75 80  
 Lys Tyr Asp Leu Asp Met Ile Tyr Val Ser Gly Pro Gly His Gly Gly  
 85 90 95  
 Gln Val Met Val Ser Asn Ser Tyr Leu Asp Gly Thr Tyr Ser Glu Val  
 100 105 110  
 Tyr Pro Asn Val Ser Arg Asp Leu Asn Gly Leu Lys Lys Leu Cys Lys  
 115 120 125  
 Gln Phe Ser Phe Pro Gly Gly Ile Ser Ser His Met Ala Pro Glu Thr  
 130 135 140  
 Pro Gly Ser Ile Asn Glu Gly Gly Glu Leu Gly Tyr Ser Leu Ala His  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Gly Ala Val Phe Asp Asn Pro Asp Leu Ile Thr Ala Cys Val  
 165 170 175  
 Val Gly Asp Gly Glu Ala Glu Thr Gly Pro Leu Ala Thr Ser Trp Gln  
 180 185 190  
 Ala Asn Lys Phe Leu Asn Pro Val Thr Asp Gly Ala Val Leu Pro Ile  
 195 200 205  
 Leu His Leu Asn Gly Tyr Lys Ile Ser Asn Pro Thr Val Leu Ser Arg  
 210 215 220  
 Ile Pro Lys Asp Glu Leu Glu Lys Phe Phe Glu Gly Asn Gly Trp Lys  
 225 230 235 240  
 Pro Tyr Phe Val Glu Gly Glu Asp Pro Glu Thr Met His Lys Leu Met  
 245 250 255  
 Ala Glu Thr Leu Asp Ile Val Thr Glu Glu Ile Leu Asn Ile Gln Lys  
 260 265 270  
 Asn Ala Arg Glu Asn Asn Asp Cys Ser Arg Pro Lys Trp Pro Met Ile  
 275 280 285  
 Val Leu Arg Thr Pro Lys Gly Trp Thr Gly Pro Lys Phe Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Pro Asn Glu Gly Ser Phe Arg Ala His Gln Val Pro Leu Ala Val  
 305 310 315 320  
 Asp Arg Tyr His Thr Glu Asn Leu Asp Gln Leu Glu Glu Trp Leu Lys  
 325 330 335  
 Ser Tyr Lys Pro Glu Glu Leu Phe Asp Glu Asn Tyr Arg Leu Ile Pro  
 340 345 350  
 Glu Leu Glu Glu Leu Thr Pro Lys Gly Asn Lys Arg Met Ala Ala Asn  
 355 360 365  
 Leu His Ala Asn Gly Gly Leu Leu Leu Arg Glu Leu Arg Thr Pro Asp  
 370 375 380  
 Phe Arg Asp Tyr Ala Val Asp Val Pro Thr Pro Gly Ser Thr Val Lys  
 385 390 395 400  
 Gln Asp Met Ile Glu Leu Gly Lys Tyr Val Arg Asp Val Val Lys Leu  
 405 410 415

ES 2 763 824 T3

Asn Glu Asp Thr Arg Asn Phe Arg Ile Phe Gly Pro Asp Glu Thr Met  
 420 425 430  
 Ser Asn Arg Leu Trp Ala Val Phe Glu Gly Thr Lys Arg Gln Trp Leu  
 435 440 445  
 Ser Glu Ile Lys Glu Pro Asn Asp Glu Phe Leu Ser Asn Asp Gly Arg  
 450 455 460  
 Ile Val Asp Ser Met Leu Ser Glu His Leu Cys Glu Gly Trp Leu Glu  
 465 470 475 480  
 Gly Tyr Leu Leu Thr Gly Arg His Gly Phe Ala Ser Tyr Glu Ala  
 485 490 495  
 Phe Leu Arg Ile Val Asp Ser Met Ile Thr Gln His Gly Lys Trp Leu  
 500 505 510  
 Lys Val Thr Ser Gln Leu Pro Trp Arg Lys Asp Ile Ala Ser Leu Asn  
 515 520 525  
 Leu Ile Ala Thr Ser Asn Val Trp Gln Gln Asp His Asn Gly Tyr Thr  
 530 535 540  
 His Gln Asp Pro Gly Leu Leu Gly His Ile Val Asp Lys Lys Pro Glu  
 545 550 555 560  
 Ile Val Arg Ala Tyr Leu Pro Ala Asp Ala Asn Thr Leu Leu Ala Val  
 565 570 575  
 Phe Asp Lys Cys Leu His Thr Lys His Lys Ile Asn Leu Leu Val Thr  
 580 585 590  
 Ser Lys His Pro Arg Gln Gln Trp Leu Thr Met Asp Gln Ala Val Lys  
 595 600 605  
 His Val Glu Gln Gly Ile Ser Ile Trp Asp Trp Ala Ser Asn Asp Lys  
 610 615 620  
 Gly Gln Glu Pro Asp Val Val Ile Ala Ser Cys Gly Asp Thr Pro Thr  
 625 630 635 640  
 Leu Glu Ala Leu Ala Ala Val Thr Ile Leu His Glu His Leu Pro Glu  
 645 650 655  
 Leu Lys Val Arg Phe Val Asn Val Val Asp Met Met Lys Leu Leu Pro  
 660 665 670  
 Glu Asn Glu His Pro His Gly Leu Ser Asp Lys Asp Tyr Asn Ala Leu  
 675 680 685  
 Phe Thr Thr Asp Lys Pro Val Ile Phe Ala Phe His Gly Phe Ala His  
 690 695 700  
 Leu Ile Asn Gln Leu Thr Tyr His Arg Glu Asn Arg Asn Leu His Val  
 705 710 715 720  
 His Gly Tyr Met Glu Glu Gly Thr Ile Thr Thr Pro Phe Asp Met Arg  
 725 730 735  
 Val Gln Asn Lys Leu Asp Arg Phe Asn Leu Val Lys Asp Val Val Glu  
 740 745 750  
 Asn Leu Pro Gln Leu Gly Asn Arg Gly Ala His Leu Val Gln Leu Met  
 755 760 765  
 Asn Asp Lys Leu Val Glu His Asn Gln Tyr Ile Arg Glu Val Gly Glu  
 770 775 780  
 Asp Leu Pro Glu Ile Thr Asn Trp Gln Trp His Val  
 785 790 795

<210> 3

<211> 822

<212> PRT

5 <213> Lactococcus lactis subsp. lactis

<400> 3

ES 2 763 824 T3

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

ES 2 763 824 T3

50					55						60					
Leu	Tyr	Ala	His	Ala	Asn	Arg	Leu	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	Gln	Lys	Met	
65					70					75					80	
Phe	Tyr	Met	Gly	Gly	Pro	Gly	His	Gly	Gly	Gln	Ala	Met	Val	Val	Pro	
				85					90					95		
Ser	Tyr	Leu	Asp	Gly	Ser	Tyr	Thr	Glu	Ala	Tyr	Pro	Glu	Ile	Thr	Gln	
			100					105					110			
Asp	Leu	Glu	Gly	Met	Ser	Arg	Leu	Phe	Lys	Arg	Phe	Ser	Phe	Pro	Gly	
			115				120					125				
Gly	Ile	Gly	Ser	His	Met	Thr	Ala	Gln	Thr	Pro	Gly	Ser	Leu	His	Glu	
						135					140					
Gly	Gly	Glu	Leu	Gly	Tyr	Val	Leu	Ser	His	Ala	Thr	Gly	Ala	Ile	Leu	
145					150					155					160	
Asp	Gln	Pro	Glu	Gln	Ile	Ala	Phe	Ala	Val	Val	Gly	Asp	Gly	Glu	Ala	
				165					170					175		
Glu	Thr	Gly	Pro	Leu	Met	Thr	Ser	Trp	His	Ser	Ile	Lys	Phe	Ile	Asn	
			180					185					190			
Pro	Lys	Asn	Asp	Gly	Ala	Ile	Leu	Pro	Ile	Leu	Asp	Leu	Asn	Gly	Phe	
			195				200					205				
Lys	Ile	Ser	Asn	Pro	Thr	Leu	Phe	Ala	Arg	Thr	Ser	Asp	Val	Asp	Ile	
					215						220					
Arg	Lys	Phe	Phe	Glu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Ser	Pro	Arg	Tyr	Ile	Glu	Asn	
225					230					235					240	
Asp	Asp	Ile	His	Asp	Tyr	Met	Ala	Tyr	His	Lys	Leu	Ala	Ala	Glu	Val	
				245					250					255		
Phe	Asp	Lys	Ala	Ile	Glu	Asp	Ile	His	Gln	Ile	Gln	Lys	Asp	Ala	Arg	
			260					265					270			
Glu	Asp	Asn	Arg	Tyr	Gln	Asn	Gly	Glu	Ile	Pro	Ala	Trp	Pro	Ile	Val	
			275				280					285				
Ile	Ala	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Trp	Gly	Gly	Pro	Arg	Tyr	Asn	Asp	Trp	
			290			295					300					
Ser	Gly	Pro	Lys	Phe	Asp	Gly	Lys	Gly	Met	Pro	Ile	Glu	His	Ser	Phe	
305					310					315					320	
Arg	Ala	His	Gln	Val	Pro	Leu	Pro	Leu	Ser	Lys	Asn	Met	Gly	Thr		
				325						330				335		
Leu	Pro	Glu	Phe	Val	Lys	Trp	Met	Thr	Ser	Tyr	Gln	Pro	Glu	Thr	Leu	
			340				345						350			
Phe	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Leu	Lys	Glu	Glu	Leu	Arg	Asp	Phe	Ala	Pro	
			355				360					365				
Lys	Gly	Glu	Met	Arg	Met	Ala	Ser	Asn	Pro	Val	Thr	Asn	Gly	Gly	Val	
			370			375						380				
Asp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Val	Leu	Pro	Asp	Trp	Gln	Glu	Phe	Ala	Asn	Pro	
385					390					395					400	
Ile	Ser	Glu	Asn	Asn	Arg	Gly	Lys	Leu	Leu	Pro	Asp	Thr	Asn	Asp	Asn	
			405						410					415		
Met	Asp	Met	Asn	Val	Leu	Ser	Lys	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ile	Val	Lys	Leu	
			420					425					430			
Asn	Pro	Thr	Arg	Phe	Arg	Leu	Phe	Gly	Pro	Asp	Glu	Thr	Met	Ser	Asn	
			435				440						445			
Arg	Phe	Trp	Glu	Met	Phe	Lys	Val	Thr	Asn	Arg	Gln	Trp	Met	Gln	Val	
			450			455					460					
Ile	Lys	Asn	Pro	Asn	Asp	Glu	Phe	Ile	Ser	Pro	Glu	Gly	Arg	Ile	Ile	
465					470					475					480	
Asp	Ser	Gln	Leu	Ser	Glu	His	Gln	Ala	Glu	Gly	Trp	Leu	Glu	Gly	Tyr	
				485					490					495		
Thr	Leu	Thr	Gly	Arg	Thr	Gly	Val	Phe	Ala	Ser	Tyr	Glu	Ser	Phe	Leu	
			500					505					510			
Arg	Val	Val	Asp	Ser	Met	Leu	Thr	Gln	His	Phe	Lys	Trp	Ile	Arg	Gln	
			515				520						525			
Ala	Ala	Asp	Gln	Lys	Trp	Arg	His	Asp	Tyr	Pro	Ser	Leu	Asn	Val	Ile	
			530			535					540					
Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Phe	Gln	Gln	Asp	His	Asn	Gly	Tyr	Thr	His	Gln	
545					550					555					560	

ES 2 763 824 T3

Asp Pro Gly Met Leu Thr His Leu Ala Glu Lys Lys Ser Asp Phe Ile  
565 570 575  
Arg Gln Tyr Leu Pro Ala Asp Gly Asn Thr Leu Leu Ala Val Phe Asp  
580 585 590  
Arg Ala Phe Gln Asp Arg Ser Lys Ile Asn His Ile Val Ala Ser Lys  
595 600 605  
Gln Pro Arg Gln Gln Trp Phe Thr Lys Glu Glu Ala Glu Lys Leu Ala  
610 615 620  
Thr Asp Gly Ile Ala Thr Ile Asp Trp Ala Ser Thr Ala Lys Asp Gly  
625 630 640  
Glu Ala Val Asp Leu Val Phe Ala Ser Ala Gly Ala Glu Pro Thr Ile  
645 650 655  
Glu Thr Leu Ala Ala Leu His Leu Val Asn Glu Val Phe Pro Gln Ala  
660 665 670  
Lys Phe Arg Tyr Val Asn Val Val Glu Leu Gly Arg Leu Gln Lys Lys  
675 680 685  
Lys Gly Ala Leu Asn Gln Glu Arg Glu Leu Ser Asp Glu Glu Phe Glu  
690 695 700  
Lys Tyr Phe Gly Pro Ser Gly Thr Pro Val Ile Phe Gly Phe His Gly  
705 710 720  
Tyr Glu Asp Leu Ile Glu Ser Ile Phe Tyr Gln Arg Gly His Asp Gly  
725 730 735  
Leu Ile Val His Gly Tyr Arg Glu Asp Gly Asp Ile Thr Thr Thr Tyr  
740 745 750  
Asp Met Arg Val Tyr Ser Glu Leu Asp Arg Phe His Gln Ala Ile Asp  
755 760 765  
Ala Met Gln Val Leu Tyr Val Asn Arg Lys Val Asn Gln Gly Leu Ala  
770 775 780  
Lys Ala Phe Ile Asp Arg Met Glu Arg Thr Leu Val Lys His Phe Glu  
785 790 800  
Val Thr Arg Asn Glu Gly Val Asp Ile Pro Glu Phe Thr Glu Trp Val  
805 810 815  
Trp Ser Asp Leu Lys Lys  
820

<210> 4  
<211> 598  
<212> PRT  
5 <213> CasteNaniella defragrans  
<400> 4

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

ES 2 763 824 T3

				165					170				175		
Gly	Lys	Ile	Lys	Cys	Glu	Ile	Pro	Leu	Pro	Gln	Pro	Leu	Asp	Arg	Gly
			180					185					190		
Pro	Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	Glu
		195					200					205			
Ala	Lys	Phe	Pro	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Met	Gly	Asp
	210					215					220				
Ala	Val	Glu	Glu	Cys	Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Gly	Ala	Pro	Val
225					230					235					240
Val	Asn	Ser	Tyr	Leu	His	Asn	Asp	Ser	Phe	Pro	Ala	Ser	His	Pro	Leu
				245					250					255	
Trp	Cys	Gly	Pro	Leu	Gly	Tyr	Gln	Gly	Ser	Lys	Ala	Ala	Met	Lys	Leu
			260					265					270		
Leu	Ala	Asp	Ala	Asp	Val	Val	Leu	Ala	Leu	Gly	Thr	Arg	Leu	Gly	Pro
		275					280					285			
Phe	Gly	Thr	Leu	Pro	Gln	His	Gly	Leu	Asp	Tyr	Trp	Pro	Lys	Asn	Ala
	290					295					300				
Arg	Ile	Ile	Gln	Val	Asp	Ala	Asp	Ser	Lys	Met	Leu	Gly	Leu	Val	Lys
305					310					315					320
Lys	Ile	Thr	Val	Gly	Val	Cys	Gly	Asp	Ala	Lys	Ala	Ser	Ala	Ala	Glu
				325					330					335	
Ile	Ser	Arg	Arg	Ile	Asp	Gly	Met	Lys	Leu	Ala	Cys	Asp	Ala	Asn	Lys
			340					345					350		
Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Arg	Ile	Gln	Ala	Glu	Lys	Asp	Ala	Trp	Glu	Gln
		355					360					365			
Glu	Leu	Thr	Asp	Trp	Thr	His	Glu	Arg	Asp	Pro	Phe	Ser	Leu	Asp	Met
	370					375					380				
Ile	Glu	Glu	Gln	Ser	Lys	Glu	Glu	Gly	Asn	Trp	Leu	His	Pro	Arg	Gln
385					390					395					400
Val	Leu	Arg	Glu	Leu	Glu	Lys	Ala	Met	Pro	Glu	Asp	Val	Met	Val	Ser
				405					410					415	
Thr	Asp	Ile	Gly	Asn	Ile	Asn	Ser	Val	Ala	Asn	Ser	Tyr	Leu	Arg	Phe
			420					425					430		
Glu	Lys	Pro	Arg	Ser	Phe	Phe	Ala	Ala	Met	Ser	Trp	Gly	Asn	Cys	Gly
		435				440						445			
Tyr	Ala	Phe	Pro	Thr	Ile	Ile	Gly	Ala	Lys	Val	Ala	Ala	Pro	His	Arg
	450					455					460				
Pro	Ala	Val	Ser	Tyr	Ala	Gly	Asp	Gly	Ala	Trp	Gly	Met	Ser	Met	Ser
465					470					475					480
Glu	Ile	Met	Thr	Cys	Val	Arg	His	Asp	Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Val	Val
				485					490					495	
Phe	His	Asn	Arg	Gln	Trp	Gly	Ala	Glu	Lys	Lys	Asn	Gln	Val	Asp	Phe
			500					505					510		
Tyr	Asn	Arg	Arg	Phe	Val	Ala	Gly	Glu	Leu	Glu	Ser	Glu	Ser	Phe	Ala
	515						520					525			
Gly	Ile	Ala	Arg	Ala	Met	Gly	Ala	Glu	Gly	Val	Val	Val	Asp	Arg	Ile
	530					535						540			
Glu	Asp	Val	Gly	Pro	Ala	Leu	Lys	Lys	Ala	Ile	Asp	Ala	Gln	Met	Asn
545					550					555					560
Asp	Arg	Lys	Thr	Thr	Val	Ile	Glu	Ile	Met	Cys	Thr	Arg	Glu	Leu	Gly
				565					570					575	
Asp	Pro	Phe	Arg	Arg	Asp	Ala	Leu	Ser	Lys	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Glu
			580					585					590		
Lys	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Thr										
			595												

<210> 5  
 <211> 603  
 <212> PRT  
 <213> Alcaligenes xylosoxidans xylosoxidans  
 <400> 5

ES 2 763 824 T3

Met Ala Ala Thr Asp Asn Arg Lys Val Val Glu Gly Val His Lys Met  
1 5 10 15  
Thr Pro Ser Glu Ala Phe Val Glu Thr Cys Val Ala Asn Gly Val Ser  
20 25 30  
Glu Met Phe Gly Ile Met Gly Ser Ala Phe Met Asp Ala Met Asp Ile  
35 40 45  
Phe Ala Pro Ala Gly Ile Arg Leu Ile Pro Val Val His Glu Gln Gly  
50 55 60  
Ala Ala His Met Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Val Ser Gly Arg His Gly  
65 70 75 80  
Val Val Ile Gly Gln Asn Gly Pro Gly Ile Ser Asn Cys Val Thr Gly  
85 90 95  
Ile Ala Ala Ala Tyr Trp Ala His Ser Pro Val Val Ile Val Thr Pro  
100 105 110  
Glu Thr Gly Thr Met Gly Met Gly Leu Gly Gly Phe Gln Glu Ala Asn  
115 120 125  
Gln Leu Pro Met Phe Gln Glu Phe Thr Lys Tyr Gln Gly His Val Cys  
130 135 140  
Asn Pro Lys Arg Met Ala Glu Phe Thr Gly Arg Val Phe Asp Arg Ala  
145 150 155 160  
Met Ser Glu Met Gly Pro Thr Gln Leu Asn Ile Pro Arg Asp Tyr Phe  
165 170 175  
Tyr Gly Glu Ile Glu Cys Glu Ile Pro Lys Pro Met Arg Val Asp Arg  
180 185 190  
Gly His Gly Gly Glu Ala Ser Leu Gln Ala Ala Val Glu Leu Leu Lys  
195 200 205  
Thr Ala Lys Phe Pro Val Ile Leu Ala Gly Gly Gly Val Val Met Gly  
210 215 220  
Asp Ala Val Glu Glu Ala Lys Gln Leu Ala Glu Arg Leu Gly Ala Pro  
225 230 235 240  
Val Ala Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Asp Ala Phe Pro Ala Lys His Pro  
245 250 255  
Leu Trp Ala Gly Pro Leu Gly Tyr Gln Gly Ser Lys Ala Ala Met Lys  
260 265 270  
Leu Ile Ala Gln Ala Asp Val Val Ile Ala Leu Gly Ser Arg Met Gly  
275 280 285  
Pro Phe Gly Thr Leu Pro Gln His Gly Met Asp Tyr Trp Pro Lys Ala  
290 295 300  
Ala Lys Ile Ile Gln Ile Glu Ala Asp His Thr Asn Leu Gly Leu Val  
305 310 315 320  
Lys Lys Ile Ala Val Gly Ile Asn Gly Asp Ala Lys Ala Val Ala Ala  
325 330 335  
Glu Leu Ser Arg Arg Leu Ala Asp Val Thr Leu Gly Cys Asp Ala Thr  
340 345 350  
Lys Ala Ala Arg Ala Asp Thr Ile Ala Thr Glu Lys Ala Ala Trp Glu  
355 360 365  
Lys Glu Leu Asp Gly Trp Thr His Glu Arg Asp Pro Tyr Ser Leu Asp  
370 375 380  
Met Ile Glu Glu Ala Lys Gly Glu Arg Thr Pro Thr Gly Gly Ser Tyr  
385 390 395 400  
Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Glu Leu Glu Lys Ala Met Pro Ala  
405 410 415  
Arg Val Met Val Ser Thr Asp Ile Gly Asn Ile Asn Ser Val Ala Asn  
420 425 430  
Ser Tyr Leu Arg Phe Asp Glu Pro Arg Ser Phe Phe Ala Pro Met Ser  
435 440 445  
Phe Gly Asn Cys Gly Tyr Ala Leu Pro Thr Ile Ile Gly Ala Lys Cys  
450 455 460  
Ala Ala Pro Asp Arg Pro Ala Ile Ala Tyr Ala Gly Asp Gly Ala Trp  
465 470 475 480  
Gly Met Ser Met Met Glu Ile Met Thr Ala Val Arg His Asp Ile Pro  
485 490 495  
Val Thr Ala Val Val Phe His Asn Arg Gln Trp Gly Ala Glu Lys Lys



ES 2 763 824 T3

Lys Ala Lys Gly Asp Val Lys Pro Asn Ala Glu Arg Leu Ala Lys Ile  
 340 345 350  
 Gln Glu Arg Arg Asn Asp Trp Phe Lys Glu Ile Glu Glu Met Ala Met  
 355 360 365  
 Met Pro Gly Asn Pro Ile Asn Pro Arg Arg Val Leu Phe Glu Val Ala  
 370 375 380  
 Lys Leu Met Pro Glu Asp Ala Ile Leu Thr Thr Asp Ile Gly Asn Val  
 385 390 395 400  
 Ala Ser Thr Ala Asn Ser Tyr Phe Lys Phe Thr Lys Pro Lys Lys His  
 405 410 415  
 Ile Ala Ala Leu Thr Phe Gly Asn Thr Gly Phe Ala Tyr Gln Ala Gly  
 420 425 430  
 Leu Gly Ala Gln Met Ala Glu Pro Asp Ser Pro Val Val Ala Ile Val  
 435 440 445  
 Gly Asp Gly Ala Trp Gly Gln Ser Leu His Glu Ile Ser Thr Ala Val  
 450 455 460  
 Gln Tyr Lys Leu Pro Val Ile Ala Cys Val Phe Arg Asn Met Ala Trp  
 465 470 475 480  
 Cys Ala Glu Lys Lys Asn Gln Ile Asp Phe Tyr Asn Asn Arg Phe Val  
 485 490 495  
 Gly Thr Glu Ile Pro Asn Pro Ile Ser Phe Ile Pro Ala Ala Glu Ala  
 500 505 510  
 Phe Gly Ala Lys Gly Ile Arg Val Glu Lys Pro Glu Asp Ile Ala Asp  
 515 520 525  
 Ala Phe Lys Gln Gly Leu Ala Trp Arg Ala Glu Gly His Pro Val Val  
 530 535 540  
 Leu Glu Phe Val Val Asp Gly Thr Ile Leu Ala Pro Pro Phe Arg Lys  
 545 550 555 560  
 Asp Ala Leu Ala Leu Pro Thr Arg Tyr Leu Pro Lys Tyr Glu His Leu  
 565 570 575  
 Asp Ala Lys Tyr Phe Pro Lys Asn  
 580

- <210> 7
- <211> 591
- <212> PRT
- <213> Rhizobium meliloti (cepa 1021)
- <400> 7

5

ES 2 763 824 T3

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

ES 2 763 824 T3

```

180                               185                               190
Leu Leu Ser Glu Ala Lys Phe Pro Val Ile Leu Asn Gly Ala Gly Val
195                               200                               205
Val Ile Gly Asn Ala Ile Gln Glu Ser Met Ala Leu Ala Glu Lys Leu
210                               215                               220
Asp Ala Pro Val Cys Cys Gly Tyr Gln His Asn Asp Ala Phe Pro Gly
225                               230                               235
Ser His Arg Leu Ser Val Gly Pro Leu Gly Tyr Asn Gly Ser Lys Ala
245                               250                               255
Ala Met Glu Leu Ile Ser Lys Ala Asp Val Val Leu Ala Leu Gly Thr
260                               265                               270
Arg Leu Asn Pro Phe Ser Thr Leu Pro Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr Trp
275                               280                               285
Pro Lys Asp Ala Ala Ile Ile Gln Val Asp Ile Asn Ala Asp Arg Ile
290                               295                               300
Gly Leu Thr Lys Lys Val Thr Val Gly Ile Cys Gly Asp Ala Lys Gln
305                               310                               315
Val Ala Gln Gln Ile Leu Gln Gln Leu Ala Pro Ala Ala Gly Asp Ala
325                               330                               335
Ser Arg Glu Glu Arg Lys Ala Leu Val His Gln Thr Arg Ser Ala Trp
340                               345                               350
Leu Gln Gln Leu Ser Ser Met Asp His Glu Asp Asp Asp Pro Gly Thr
355                               360                               365
Glu Trp Asn Val Gly Ala Arg Gln Arg Glu Pro Asp Arg Met Ser Pro
370                               375                               380
Arg Gln Val Trp Arg Ala Ile Gln Ala Val Leu Pro Lys Glu Ala Ile
385                               390                               395
Ile Ser Thr Asp Ile Gly Asn Asn Cys Ala Ile Gly Asn Ala Tyr Pro
405                               410                               415
Ser Phe Glu Gln Gly Arg Lys Tyr Leu Ala Pro Gly Met Phe Gly Pro
420                               425                               430
Cys Gly Tyr Gly Phe Pro Ser Ile Val Gly Ala Lys Ile Gly Cys Pro
435                               440                               445
Asp Val Pro Val Val Gly Phe Ala Gly Asp Gly Ala Phe Gly Ile Ser
450                               455                               460
Met Asn Glu Met Thr Ser Ile Gly Arg Glu Gly Trp Pro Ala Ile Thr
465                               470                               475
Met Val Ile Phe Arg Asn Tyr Gln Trp Gly Ala Glu Lys Arg Asn Thr
485                               490                               495
Thr Leu Trp Tyr Asp Asn Asn Phe Val Gly Thr Glu Leu Asn Pro Asn
500                               505                               510
Leu Ser Tyr Ala Lys Val Ala Asp Gly Cys Gly Leu Lys Gly Val Thr
515                               520                               525
Val Asp Thr Pro Ala Ala Leu Thr Glu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Glu
530                               535                               540
Asp Gln Ala Lys Gly Ile Thr Thr Phe Val Glu Val Val Leu Asn Gln
545                               550                               555
Glu Leu Gly Glu Pro Phe Arg Arg Asp Ala Met Lys Lys Pro Val Ala
565                               570                               575
Val Ala Gly Ile Asp Arg Ala Asp Met Arg Thr Gln Arg Arg Met
580                               585                               590

```

<210> 8  
 <211> 603  
 <212> PRT  
 5 <213> Roseovarius nubinhibens  
 <400> 8

```

Met Leu Phe Arg Ala Ser Gln Pro Glu Asp Lys Pro Met Lys Met Thr
1                               5                               10                               15
Thr Glu Glu Ala Phe Val Lys Thr Leu Gln Met His Gly Ile Gln His
20                               25                               30

```

ES 2 763 824 T3

Ala Phe Gly Ile Ile Gly Ser Ala Met Met Pro Ile Ser Asp Ile Phe  
35 40 45  
Gly Lys Ala Gly Ile Thr Phe Trp Asp Cys Ala His Glu Gly Ser Gly  
50 55 60  
Gly Met Met Ala Asp Gly Tyr Thr Arg Ala Thr Gly Lys Met Ser Met  
65 70 75 80  
Met Ile Ala Gln Asn Gly Pro Gly Ile Thr Asn Phe Val Thr Ala Val  
85 90 95  
Lys Thr Ala Tyr Trp Asn His Thr Pro Leu Leu Leu Val Thr Pro Gln  
100 105 110  
Ala Ala Asn Lys Thr Met Gly Gln Gly Gly Phe Gln Glu Val Glu Gln  
115 120 125  
Met Ala Ala Phe Lys Asp Met Val Cys Tyr Gln Glu Glu Val Arg Asp  
130 135 140  
Pro Thr Arg Met Ala Glu Val Leu Asn Arg Val Ile Leu Asn Ala Lys  
145 150 155 160  
Arg Tyr Ser Ala Pro Ala Gln Ile Asn Val Pro Arg Asp Tyr Phe Thr  
165 170 175  
Gln Val Ile Asp Ile Glu Leu Pro Lys Ile Val Asp Phe Glu Arg Pro  
180 185 190  
Ser Gly Gly Glu Glu Ala Leu Asp Glu Ala Ala Lys Leu Leu Ser Glu  
195 200 205  
Ala Lys Phe Pro Val Ile Leu Asn Gly Ala Gly Val Ile Leu Ala Gly  
210 215 220  
Ala Ile Pro Ala Thr Ala Glu Leu Ala Glu Arg Leu Asp Ala Pro Val  
225 230 235 240  
Cys Cys Gly Tyr Gln His Asn Asp Ala Phe Pro Gly Ser His Pro Leu  
245 250 255  
His Ala Gly Pro Leu Gly Tyr Asn Gly Ser Lys Ala Gly Met Glu Leu  
260 265 270  
Ile Ser Lys Ala Asp Val Val Leu Ala Leu Gly Thr Arg Leu Asn Pro  
275 280 285  
Phe Ser Thr Leu Pro Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr Trp Pro Lys Asp Ala  
290 295 300  
Lys Ile Ile Gln Val Asp Val Lys Pro Glu Arg Ile Gly Leu Thr Lys  
305 310 315 320  
Pro Val Ala Val Gly Ile Val Gly Asp Ala Lys Lys Val Ala Lys Thr  
325 330 335  
Ile Leu Ala Lys Leu Ser Asp Thr Ala Gly Asp Ala Asp Arg Glu Glu  
340 345 350  
Arg Lys Ala Thr Ile Ala Lys Thr Lys Ser Ala Trp Ala Gln Glu Leu  
355 360 365  
Ser Ser Met Asp His Glu Gln Asp Asp Pro Gly Thr Thr Trp Asn Glu  
370 375 380  
Arg Ala Arg Gly Ala Lys Pro Asp Trp Met Ser Pro Arg Met Ala Trp  
385 390 395 400  
Arg Ala Ile Gln Ala Ala Leu Pro Lys Glu Ala Ile Ile Ser Ser Asp  
405 410 415  
Ile Gly Asn Asn Cys Ala Ile Gly Asn Ala Tyr Pro Ser Phe Glu Glu  
420 425 430  
Gly Arg Lys Tyr Leu Ala Pro Gly Leu Phe Gly Pro Cys Gly Tyr Gly  
435 440 445  
Leu Pro Ala Val Val Gly Ala Lys Ile Gly Cys Pro Asp Thr Pro Val  
450 455 460  
Val Gly Phe Ser Gly Asp Gly Ala Phe Gly Ile Ala Val Asn Glu Leu  
465 470 475 480  
Thr Ala Ile Gly Arg Gly Glu Trp Pro Ala Val Thr His Val Val Phe  
485 490 495  
Arg Asn Tyr Gln Trp Gly Ala Glu Lys Arg Asn Ser Thr Leu Trp Phe  
500 505 510  
Asp Asp Asn Phe Val Gly Thr Glu Leu Asp Glu Gln Val Ser Tyr Ala  
515 520 525  
Gly Ile Ala Lys Ala Cys Gly Leu Lys Gly Val Val Ala Arg Thr Met

ES 2 763 824 T3

	530					535					540					
	Asp	Glu	Leu	Thr	Asp	Ala	Leu	Asp	Gln	Ala	Ile	Lys	Asp	Gln	Lys	Ala
545						550					555					560
Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Ile	Glu	Ala	Met	Ile	Asn	Gln	Glu	Leu	Gly	Glu	
				565					570					575		
Pro	Phe	Arg	Arg	Asp	Ala	Met	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Val	Ala	Gly	Ile	
			580					585					590			
Asp	Pro	Ala	Asp	Met	Arg	Glu	Gln	Gln	Val	Asp						
		595					600									

<210> 9

<211> 402

<212> PRT

5 <213> Salmonella typhimurium (cepa LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)

<220>

<223> Propionato cinasa salada

<400> 9

ES 2 763 824 T3

Met Asn Glu Phe Pro Val Val Leu Val Ile Asn Cys Gly Ser Ser Ser  
1 5 10 15  
Ile Lys Phe Ser Val Leu Asp Val Ala Thr Cys Asp Val Leu Met Ala  
20 25 30  
Gly Ile Ala Asp Gly Met Asn Thr Glu Asn Ala Phe Leu Ser Ile Asn  
35 40 45  
Gly Asp Lys Pro Ile Asn Leu Ala His Ser Asn Tyr Glu Asp Ala Leu  
50 55 60  
Lys Ala Ile Ala Phe Glu Leu Glu Lys Arg Asp Leu Thr Asp Ser Val  
65 70 75 80  
Ala Leu Ile Gly His Arg Ile Ala His Gly Gly Glu Leu Phe Thr Gln  
85 90 95  
Ser Val Ile Ile Thr Asp Glu Ile Ile Asp Asn Ile Arg Arg Val Ser  
100 105 110  
Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Tyr Ala Asn Leu Ser Gly Ile Asp Ala  
115 120 125  
Ala Arg His Leu Phe Pro Ala Val Arg Gln Val Ala Val Phe Asp Thr  
130 135 140  
Ser Phe His Gln Thr Leu Ala Pro Glu Ala Tyr Leu Tyr Gly Leu Pro  
145 150 155 160  
Trp Glu Tyr Phe Ser Ser Leu Gly Val Arg Arg Tyr Gly Phe His Gly  
165 170 175  
Thr Ser His Arg Tyr Val Ser Arg Arg Ala Tyr Glu Leu Leu Asp Leu  
180 185 190  
Asp Glu Lys Asp Ser Gly Leu Ile Val Ala His Leu Gly Asn Gly Ala  
195 200 205  
Ser Ile Cys Ala Val Arg Asn Gly Gln Ser Val Asp Thr Ser Met Gly  
210 215 220  
Met Thr Pro Leu Glu Gly Leu Met Met Gly Thr Arg Ser Gly Asp Val  
225 230 235 240  
Asp Phe Gly Ala Met Ala Trp Ile Ala Lys Glu Thr Gly Gln Thr Leu  
245 250 255  
Ser Asp Leu Glu Arg Val Val Asn Lys Glu Ser Gly Leu Leu Gly Ile  
260 265 270  
Ser Gly Leu Ser Ser Asp Leu Arg Val Leu Glu Lys Ala Trp His Glu  
275 280 285  
Gly His Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ile Lys Thr Phe Val His Arg Ile  
290 295 300  
Ala Arg His Ile Ala Gly His Ala Ala Ser Leu His Arg Leu Asp Gly  
305 310 315 320  
Ile Ile Phe Thr Gly Gly Ile Gly Glu Asn Ser Val Leu Ile Arg Gln  
325 330 335  
Leu Val Ile Glu His Leu Gly Val Leu Gly Leu Thr Leu Asp Val Glu  
340 345 350

Met Asn Lys Gln Pro Asn Ser His Gly Glu Arg Ile Ile Ser Ala Asn  
355 360 365  
Pro Ser Gln Val Ile Cys Ala Val Ile Pro Thr Asn Glu Glu Lys Met  
370 375 380  
Ile Ala Leu Asp Ala Ile His Leu Gly Asn Val Lys Ala Pro Val Glu  
385 390 395 400  
Phe Ala

<210> 10

<211> 402

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli (cepa K12)

<220>

<223> Propionato cinasa

<400> 10

ES 2 763 824 T3

Met Asn Glu Phe Pro Val Val Leu Val Ile Asn Cys Gly Ser Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Lys Phe Ser Val Leu Asp Ala Ser Asp Cys Glu Val Leu Met Ser  
 20 25 30  
 Gly Ile Ala Asp Gly Ile Asn Ser Glu Asn Ala Phe Leu Ser Val Asn  
 35 40 45  
 Gly Gly Glu Pro Ala Pro Leu Ala His His Ser Tyr Glu Gly Ala Leu  
 50 55 60  
 Lys Ala Ile Ala Phe Glu Leu Glu Lys Arg Asn Leu Asn Asp Ser Val  
 65 70 75 80  
 Ala Leu Ile Gly His Arg Ile Ala His Gly Gly Ser Ile Phe Thr Glu  
 85 90 95  
 Ser Ala Ile Ile Thr Asp Glu Val Ile Asp Asn Ile Arg Arg Val Ser  
 100 105 110  
 Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Tyr Ala Asn Leu Ser Gly Ile Glu Ser  
 115 120 125  
 Ala Gln Gln Leu Phe Pro Gly Val Thr Gln Val Ala Val Phe Asp Thr  
 130 135 140  
 Ser Phe His Gln Thr Met Ala Pro Glu Ala Tyr Leu Tyr Gly Leu Pro  
 145 150 155 160  
 Trp Lys Tyr Tyr Glu Glu Leu Gly Val Arg Arg Tyr Gly Phe His Gly  
 165 170 175  
 Thr Ser His Arg Tyr Val Ser Gln Arg Ala His Ser Leu Leu Asn Leu  
 180 185 190  
 Ala Glu Asp Asp Ser Gly Leu Val Val Ala His Leu Gly Asn Gly Ala  
 195 200 205  
 Ser Ile Cys Ala Val Arg Asn Gly Gln Ser Val Asp Thr Ser Met Gly  
 210 215 220  
 Met Thr Pro Leu Glu Gly Leu Met Met Gly Thr Arg Ser Gly Asp Val  
 225 230 235 240  
 Asp Phe Gly Ala Met Ser Trp Val Ala Ser Gln Thr Asn Gln Ser Leu  
 245 250 255  
 Gly Asp Leu Glu Arg Val Val Asn Lys Glu Ser Gly Leu Leu Gly Ile  
 260 265 270  
 Ser Gly Leu Ser Ser Asp Leu Arg Val Leu Glu Lys Ala Trp His Glu  
 275 280 285  
 Gly His Glu Arg Ala Gln Leu Ala Ile Lys Thr Phe Val His Arg Ile  
 290 295 300  
 Ala Arg His Ile Ala Gly His Ala Ala Ser Leu Arg Arg Leu Asp Gly  
 305 310 315 320  
 Ile Ile Phe Thr Gly Gly Ile Gly Glu Asn Ser Ser Leu Ile Arg Arg  
 325 330 335  
 Leu Val Met Glu His Leu Ala Val Leu Gly Leu Glu Ile Asp Thr Glu  
 340 345 350  
 Met Asn Asn Arg Ser Asn Ser Cys Gly Glu Arg Ile Val Ser Ser Glu  
 355 360 365  
 Asn Ala Arg Val Ile Cys Ala Val Ile Pro Thr Asn Glu Glu Lys Met  
 370 375 380  
 Ile Ala Leu Asp Ala Ile His Leu Gly Lys Val Asn Ala Pro Ala Glu  
 385 390 395 400  
 Phe Ala

<210> 11  
 <211> 329  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

5

<220>  
 <223> Fosfato acetiltransferasa

<400> 11

ES 2 763 824 T3

Met Ser Ala Glu Leu Phe Glu Asn Trp Leu Leu Lys Arg Ala Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Glu His Ser His Ile Val Leu Pro Glu Gly Asp Asp Asp Arg Ile Leu  
 20 25 30  
 Met Ala Ala His Gln Leu Leu Asp Gln Asp Ile Cys Asp Ile Thr Ile  
 35 40 45  
 Leu Gly Asp Pro Val Lys Ile Lys Glu Arg Ala Thr Glu Leu Gly Leu  
 50 55 60  
 His Leu Asn Thr Ala Tyr Leu Val Asn Pro Leu Thr Asp Pro Arg Leu  
 65 70 75 80  
 Glu Glu Phe Ala Glu Gln Phe Ala Glu Leu Arg Lys Ser Lys Ser Val  
 85 90 95  
 Thr Ile Asp Glu Ala Arg Glu Ile Met Lys Asp Ile Ser Tyr Phe Gly  
 100 105 110  
 Thr Met Met Val His Asn Gly Asp Ala Asp Gly Met Val Ser Gly Ala  
 115 120 125  
 Ala Asn Thr Thr Ala His Thr Ile Lys Pro Ser Phe Gln Ile Ile Lys  
 130 135 140  
 Thr Val Pro Glu Ala Ser Val Val Ser Ser Ile Phe Leu Met Val Leu  
 145 150 155 160  
 Arg Gly Arg Leu Trp Ala Phe Gly Asp Cys Ala Val Asn Pro Asn Pro  
 165 170 175  
 Thr Ala Glu Gln Leu Gly Glu Ile Ala Val Val Ser Ala Lys Thr Ala  
 180 185 190  
 Ala Gln Phe Gly Ile Asp Pro Arg Val Ala Ile Leu Ser Tyr Ser Thr  
 195 200 205  
 Gly Asn Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Asp Arg Ala Ile Asp Ala Leu  
 210 215 220  
 Ala Glu Ala Arg Arg Leu Asn Pro Glu Leu Cys Val Asp Gly Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Gln Phe Asp Ala Ala Val Asp Pro Gly Val Ala Arg Lys Lys Met Pro  
 245 250 255  
 Asp Ser Asp Val Ala Gly Gln Ala Asn Val Phe Ile Phe Pro Asp Leu  
 260 265 270  
 Glu Ala Gly Asn Ile Gly Tyr Lys Thr Ala Gln Arg Thr Gly His Ala  
 275 280 285  
 Leu Ala Val Gly Pro Ile Leu Gln Gly Leu Asn Lys Pro Val Asn Asp  
 290 295 300  
 Leu Ser Arg Gly Ala Thr Val Pro Asp Ile Val Asn Thr Val Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Thr Ala Ile Gln Ala Gly Gly Arg Ser  
 325

<210> 12

<211> 301

<212> PRT

5 <213> Clostridium acetobutylicum (cepa ATCC 824 / DSM 792 / JCM 1419 / LMG 5710 / VKM B-1787

<220>

<223> Fosfato butiriltransferasa

<400> 12

ES 2 763 824 T3

Met Ile Lys Ser Phe Asn Glu Ile Ile Met Lys Val Lys Ser Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Met Lys Lys Val Ala Val Ala Val Ala Gln Asp Glu Pro Val Leu Glu  
 20 25 30  
 Ala Val Arg Asp Ala Lys Lys Asn Gly Ile Ala Asp Ala Ile Leu Val  
 35 40 45  
 Gly Asp His Asp Glu Ile Val Ser Ile Ala Leu Lys Ile Gly Met Asp  
 50 55 60  
 Val Asn Asp Phe Glu Ile Val Asn Glu Pro Asn Val Lys Lys Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Ala Val Glu Leu Val Ser Thr Gly Lys Ala Asp Met Val Met  
 85 90 95  
 Lys Gly Leu Val Asn Thr Ala Thr Phe Leu Arg Ser Val Leu Asn Lys  
 100 105 110  
 Glu Val Gly Leu Arg Thr Gly Lys Thr Met Ser His Val Ala Val Phe  
 115 120 125  
 Glu Thr Glu Lys Phe Asp Arg Leu Leu Phe Leu Thr Asp Val Ala Phe  
 130 135 140  
 Asn Thr Tyr Pro Glu Leu Lys Glu Lys Ile Asp Ile Val Asn Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Val Lys Val Ala His Ala Ile Gly Ile Glu Asn Pro Lys Val Ala Pro  
 165 170 175  
 Ile Cys Ala Val Glu Val Ile Asn Pro Lys Met Pro Ser Thr Leu Asp  
 180 185 190  
 Ala Ala Met Leu Ser Lys Met Ser Asp Arg Gly Gln Ile Lys Gly Cys  
 195 200 205  
 Val Val Asp Gly Pro Leu Ala Leu Asp Ile Ala Leu Ser Glu Glu Ala  
 210 215 220  
 Ala His His Lys Gly Val Thr Gly Glu Val Ala Gly Lys Ala Asp Ile  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Met Pro Asn Ile Glu Thr Gly Asn Val Met Tyr Lys Thr Leu  
 245 250 255  
 Thr Tyr Thr Thr Asp Ser Lys Asn Gly Gly Ile Leu Val Gly Thr Ser  
 260 265 270  
 Ala Pro Val Val Leu Thr Ser Arg Ala Asp Ser His Glu Thr Lys Met  
 275 280 285  
 Asn Ser Ile Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Asn Lys  
 290 295 300

<210> 13  
 <211> 384  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus casei W56

5

<400> 13

Met Arg Asp Cys Thr Thr Glu Arg Arg Cys Leu Met Thr Met His Pro  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Asp Val Val Ile Val Ile Asn Pro Gly Ser Thr Ser Ser Lys  
 20 25 30  
 Ile Ala Leu Phe Lys Ala Gly Lys Met Val Ala Glu Arg Thr Leu Asn  
 35 40 45  
 His Ser Leu Ala Glu Leu Ser Gln Phe Asp Ser Val Ile Ala Gln Lys  
 50 55 60  
 Asp Phe Arg Met Gln Ala Ile Gln Glu Phe Leu Ala Asp Gln Asp Phe  
 65 70 75 80

ES 2 763 824 T3

Ser	Ala	Ser	Glu	Val	Leu	Ala	Val	Ala	Gly	Arg	Gly	Gly	Leu	Leu	Lys
				85					90					95	
Pro	Ile	Pro	Gly	Gly	Thr	Tyr	Ala	Val	Asn	Glu	Ala	Met	Leu	Asp	Asp
			100					105					110		
Leu	Thr	Ala	Ala	Lys	Arg	Asn	Glu	His	Ala	Ser	Asn	Leu	Gly	Ala	Gly
		115					120					125			
Leu	Ala	Gln	Gln	Val	Ala	Asp	Gln	Tyr	Gly	Val	Lys	Ala	Tyr	Val	Val
		130				135					140				
Asp	Pro	Pro	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Arg	Ile	Ser	Gly
145					150					155					160
Leu	Lys	Gly	Ile	Glu	Arg	His	Ser	Ala	Ala	His	Val	Leu	Asn	Gln	Lys
				165					170					175	
Ala	Met	Ala	Arg	Gln	Val	Leu	Ala	Thr	Met	Gly	Lys	Thr	Tyr	Ala	Thr
			180					185					190		
Ser	Arg	Val	Ile	Val	Ala	His	Ile	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Ile	His	Ala
		195					200					205			
His	Glu	Asn	Gly	Arg	Met	Ile	Asp	Gly	Asn	Asn	Gly	Ile	Asp	Gly	Glu
	210					215					220				
Gly	Pro	Tyr	Ser	Pro	Glu	Arg	Ala	Gly	Ser	Leu	Pro	Leu	Val	Asp	Phe
225					230					235					240
Val	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Val	Lys	Lys
				245					250					255	
Leu	Leu	Ala	Ser	Gln	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ile	Ser
			260					265					270		
Ile	Lys	Asn	Ile	Val	Thr	Arg	Ile	Ala	Glu	Gly	Asp	Glu	Thr	Ala	Lys
		275					280					285			
Phe	Tyr	Leu	Asp	Gly	Met	Ile	Tyr	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Ile	Ala	Glu
	290					295					300				
Met	Ala	Gly	Val	Leu	Asn	Gly	Gln	Val	Asp	Val	Ile	Ile	Leu	Thr	Gly
305					310					315					320
Gly	Ala	Ala	Tyr	Ala	Thr	Ala	Val	Thr	Val	Pro	Leu	Gln	His	Asp	Leu
				325					330					335	
Ala	Trp	Ile	Ala	Pro	Val	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Glu	Met	Glu	Met	Gln
			340					345					350		
Ala	Leu	Tyr	Glu	Gly	Val	Met	Arg	Val	Leu	Asn	His	Glu	Glu	Pro	Val
		355					360					365			
Arg	Val	Tyr	Gln	Ser	Asp	Ala	Ser	Thr	Ile	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Arg
	370					375						380			

<210> 14

<211> 370

<212> PRT

5 <213> Geobacillus sp. GHH01

<400> 14

Met Glu Glu Gln Lys Phe Arg Ile Leu Thr Ile Asn Pro Gly Ser Thr  
1 5 10 15  
Ser Thr Lys Ile Gly Val Phe Glu Asn Glu Arg Pro Leu Leu Glu Lys  
20 25 30  
Thr Ile Arg His Glu Ala Asp Val Leu Arg Gln Tyr Lys Thr Ile Ala  
35 40 45  
Asp Gln Tyr Glu Phe Arg Lys Gln Thr Ile Leu Gln Ala Leu Asp Glu  
50 55 60  
Glu Gly Ile Asn Leu Ser Lys Leu Ser Ala Val Cys Gly Arg Gly Gly  
65 70 75 80  
Leu Leu Arg Pro Ile Glu Gly Gly Thr Tyr Arg Val Asn Glu Ala Met  
85 90 95  
Leu Glu Asp Leu Arg Arg Gly Tyr Ser Gly Gln His Ala Ser Asn Leu  
100 105 110  
Gly Gly Ile Leu Ala His Glu Ile Ala Ser Ala Leu Asn Ile Pro Ala  
115 120 125  
Phe Ile Val Asp Pro Val Val Val Asp Glu Leu Asp Pro Ile Ala Arg  
130 135 140  
Ile Ser Gly Phe Pro Leu Ile Glu Arg Arg Ser Ile Phe His Ala Leu  
145 150 155 160  
Asn Gln Lys Ala Val Ala Arg Arg Val Ala Lys Gln Leu Gly Lys Arg  
165 170 175  
Tyr Asp Glu Leu Asn Leu Ile Val Ala His Met Gly Gly Gly Ile Thr  
180 185 190  
Val Gly Ala His Lys Gln Gly Arg Val Val Asp Val Asn Asn Gly Leu  
195 200 205  
Asp Gly Glu Gly Pro Phe Ser Pro Glu Arg Ala Gly Thr Val Pro Ala  
210 215 220  
Gly Asp Leu Val Ala Leu Cys Phe Ser Gly Glu Tyr Tyr Arg Glu Glu  
225 230 235 240  
Ile Met Asn Met Leu Val Gly Gly Gly Gly Leu Val Gly Tyr Leu Gly  
245 250 255  
Thr Asn Asp Ala Val Lys Val Glu Asn Met Ile Glu Ala Gly Asp Glu  
260 265 270  
Lys Ala Lys Leu Val Tyr Glu Ala Met Ala Tyr Gln Val Ala Lys Glu  
275 280 285  
Ile Gly Ala Ala Ser Ala Val Leu Ser Gly Lys Val Asp Ala Ile Ile  
290 295 300  
Leu Thr Gly Gly Leu Ala Tyr Gly Lys Ser Phe Val Glu Gln Ile Thr  
305 310 315 320  
Arg Arg Val Gln Trp Ile Ala Asp Val Ile Val His Pro Gly Glu Asn  
325 330 335  
Glu Leu Gln Ala Leu Ala Glu Gly Ala Leu Arg Val Leu Arg Gly Glu  
340 345 350  
Glu Glu Glu Lys Val Tyr Pro Gly Glu Ala Val Ser Pro Ile Pro Ala  
355 360 365  
Arg Arg  
370

<210> 15  
<211> 299  
<212> PRT  
5 <213> Bacillus subtilis (cepa 168)

<400> 15

ES 2 763 824 T3

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

Glu Thr Val Asn Pro Lys Met Glu Ala Thr Val Asn Ala Ala Ala Leu  
180 185 190  
Ala Gln Met Tyr Lys Arg Gly Gln Ile Lys Gly Cys Ile Val Asp Gly  
195 200 205  
Pro Leu Ala Leu Asp Asn Ala Val Ser Gln Ile Ala Ala Ala Gln Lys  
210 215 220  
Lys Ile Ser Gly Asp Val Ala Gly Asn Ala Asp Ile Leu Leu Val Pro  
225 230 235 240  
Thr Ile Glu Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Lys Ser Leu Ile Tyr Phe Ala  
245 250 255  
Lys Ala Ser Val Ala Ala Val Ile Thr Gly Ala Lys Ala Pro Ile Ala  
260 265 270  
Leu Thr Ser Arg Ala Asp Ser Ala Glu Asn Lys Leu Tyr Ser Ile Ala  
275 280 285  
Leu Ala Ile Cys Ala Ser Glu Glu Tyr Thr His  
290 295

<210> 16

<211> 826

<212> PRT

5 <213> Bifidobacterium gallicum DSM 20093 = LMG 11596

<400> 16

ES 2 763 824 T3

Met Thr Ser Pro Val Ile Gly Thr Pro Trp Gln Lys Leu Asn Arg Pro  
 1 5 10 15  
 Val Ser Glu Glu Ala Ile Glu Gly Met Asp Lys Tyr Trp Arg Ala Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Met Ser Ile Gly Gln Ile Tyr Leu Arg Ser Asn Pro Leu Met  
 35 40 45  
 Lys Glu Pro Phe Thr Arg Asp Asp Val Lys Tyr Arg Leu Val Gly His  
 50 55 60  
 Trp Gly Thr Thr Pro Gly Leu Asn Phe Leu Leu Ala His Ile Asn Arg  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Ala Asp His Gln Gln Asn Thr Val Phe Ile Met Gly Pro Gly  
 85 90 95  
 His Gly Gly Pro Ala Gly Thr Ala Gln Ser Tyr Leu Asp Gly Thr Tyr  
 100 105 110  
 Thr Glu Tyr Tyr Pro Asn Ile Thr Lys Asp Glu Glu Gly Leu Gln Lys  
 115 120 125  
 Phe Phe Arg Gln Phe Ser Tyr Pro Gly Gly Ile Pro Ser His Phe Ala  
 130 135 140  
 Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly Glu Leu Gly Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Ser His Ala Tyr Gly Ala Val Met Asn Asn Pro Ser Leu Phe Val  
 165 170 175  
 Pro Cys Ile Val Gly Asp Gly Glu Ala Glu Thr Gly Pro Leu Ala Thr  
 180 185 190  
 Gly Trp Gln Ser Asn Lys Leu Val Asn Pro Arg Thr Asp Gly Ile Val  
 195 200 205  
 Leu Pro Ile Leu His Leu Asn Gly Tyr Lys Ile Ala Asn Pro Thr Ile  
 210 215 220  
 Leu Ala Arg Val Ser Asp Glu Glu Leu His Asp Phe Phe Arg Gly Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Tyr His Pro Tyr Glu Phe Val Ala Gly Phe Asp Asn Glu Asp His  
 245 250 255  
 Leu Ser Ile His Arg Arg Phe Ala Glu Leu Phe Glu Thr Ile Phe Asp  
 260 265 270  
 Glu Ile Cys Asp Ile Lys Ala Ala Ala Asn Thr Asp Asp Met Thr Arg  
 275 280 285  
 Pro Phe Tyr Pro Met Leu Ile Phe Arg Thr Pro Lys Gly Trp Thr Cys  
 290 295 300  
 Pro Lys Phe Ile Asp Gly Lys Lys Thr Glu Gly Ser Trp Arg Ala His

ES 2 763 824 T3

305					310						315				320
Gln	Val	Pro	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	Asp	Thr	Glu	Ala	His	Phe	Glu	Val
				325					330					335	
Leu	Lys	Asn	Trp	Met	Ala	Ser	Tyr	Lys	Pro	Glu	Glu	Leu	Phe	Asp	Asp
			340					345					350		
Lys	Gly	Ala	Ile	Lys	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Phe	Met	Pro	Lys	Gly	Asp
		355					360					365			
Leu	Arg	Ile	Gly	Ala	Asn	Pro	Asn	Ala	Asn	Gly	Gly	Val	Ile	Arg	Glu
	370					375					380				
Glu	Leu	Asp	Leu	Pro	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Lys
	385				390					395					400
Glu	Phe	Gly	His	Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Glu	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	Gly
				405					410					415	
Glu	Tyr	Thr	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Asn	Asn	Pro	Asp	Ser	Phe	Arg	Ile
			420					425					430		
Phe	Gly	Pro	Asp	Glu	Thr	Ala	Ser	Asn	Arg	Leu	Gln	Ala	Ser	Tyr	Glu
		435					440					445			
Val	Thr	Asn	Lys	Gln	Trp	Asp	Asn	Gly	Tyr	Leu	Ser	Lys	Asp	Leu	Val
	450					455					460				
Asp	Glu	His	Met	Ala	Val	Thr	Gly	Gln	Val	Thr	Glu	Gln	Leu	Ser	Glu
	465				470					475					480
His	Gln	Cys	Glu	Gly	Phe	Leu	Glu	Ala	Tyr	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	His
				485					490					495	
Gly	Ile	Trp	Ser	Ser	Tyr	Glu	Ser	Phe	Val	His	Val	Ile	Asp	Ser	Met
		500						505					510		
Leu	Asn	Gln	His	Ala	Lys	Trp	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	Arg	Glu	Ile	Pro
		515					520					525			
Trp	Arg	Lys	Pro	Ile	Ser	Ser	Met	Asn	Leu	Leu	Val	Ser	Ser	His	Val
	530					535					540				
Trp	Arg	Gln	Asp	His	Asn	Gly	Phe	Ser	His	Gln	Asp	Pro	Gly	Val	Thr
	545				550					555					560
Ser	Val	Leu	Leu	Asn	Lys	Thr	Phe	Asn	Asn	Asp	His	Val	Ile	Gly	Leu
				565				570						575	
Tyr	Phe	Ala	Thr	Asp	Ala	Asn	Val	Leu	Leu	Ala	Ile	Ala	Glu	Lys	Cys
		580						585					590		
Tyr	Lys	Ser	Thr	Asn	Met	Ile	Asn	Ala	Ile	Val	Ala	Gly	Lys	Gln	Pro
		595					600					605			
Ala	Ala	Thr	Trp	Thr	Thr	Leu	Asp	Glu	Ala	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Lys
	610					615					620				
Gly	Ala	Gly	Glu	Phe	Glu	Trp	Ala	Ser	Asn	Val	Lys	Thr	Asn	Asp	Glu
	625				630					635					640
Ala	Glu	Ile	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Gly	Asp	Val	Pro	Thr	Gln	Glu	Leu
				645					650					655	
Met	Ala	Ala	Ala	Asp	Arg	Leu	Asn	Lys	Leu	Gly	Val	Lys	Phe	Lys	Val
		660						665					670		
Val	Asn	Val	Val	Asp	Leu	Ile	Lys	Leu	Gln	Ser	Ala	Lys	Glu	Asn	Asp
	675						680					685			
Gln	Ala	Leu	Ser	Asp	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Leu	Phe	Thr	Glu	Asp	Lys
	690					695					700				
Pro	Val	Leu	Phe	Ala	Tyr	His	Ser	Tyr	Ala	His	Asp	Val	Arg	Gly	Leu
	705				710					715					720
Ile	Phe	Asp	Arg	Pro	Asn	His	Asp	Asn	Phe	Asn	Val	Val	Gly	Tyr	Lys
				725					730					735	
Glu	Gln	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Tyr	Asp	Met	Val	Arg	Val	Asn	Asp
			740					745					750		
Ile	Asp	Arg	Tyr	Glu	Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Met	Ile	Asp	Ala
		755					760					765			
Asp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Glu	Ile	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Phe	Arg	Ile	Glu
	770					775					780				
Ala	Tyr	Gln	Phe	Ala	Val	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Thr
	785					790				795					800
Asp	Trp	Val	Trp	Pro	Gly	Val	Lys	Thr	Asp	Leu	Pro	Gly	Ala	Val	Ser
				805					810					815	

Ala Thr Ala Ala Thr Ala Gly Asp Asn Glu  
820 825

<210> 17  
 <211> 817  
 <212> PRT  
 <213> Leuconostoc citreum (cepa KM20)

5 <400> 17

Met	Ala	Asp	Phe	Asp	Ser	Lys	Glu	Tyr	Leu	Glu	Leu	Val	Asp	Lys	Trp
1				5					10					15	
Trp	Arg	Ala	Thr	Asn	Tyr	Leu	Ser	Ala	Gly	Met	Ile	Phe	Leu	Lys	Ser
			20					25					30		
Asn	Pro	Leu	Phe	Ser	Val	Thr	Asn	Thr	Pro	Ile	Gln	Ala	Glu	Asp	Val
		35					40					45			
Lys	Val	Lys	Pro	Ile	Gly	His	Trp	Gly	Thr	Ile	Ser	Gly	Gln	Thr	Phe
	50					55					60				
Leu	Tyr	Ala	His	Ala	Asn	Arg	Leu	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asp	Leu	Asn	Met
65					70					75					80
Phe	Tyr	Ile	Gly	Gly	Pro	Gly	His	Gly	Gly	Gln	Val	Met	Val	Thr	Asn
				85					90					95	
Ala	Tyr	Leu	Asp	Gly	Glu	Tyr	Thr	Glu	Asp	Tyr	Pro	Glu	Ile	Thr	Gln
			100					105					110		
Asp	Leu	Glu	Gly	Met	Ser	Arg	Leu	Phe	Lys	Arg	Phe	Ser	Phe	Pro	Gly
		115					120					125			
Gly	Ile	Gly	Ser	His	Met	Thr	Ala	Gln	Thr	Pro	Gly	Ser	Leu	His	Glu
	130					135					140				
Gly	Gly	Glu	Leu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Ser	His	Ala	Phe	Gly	Ala	Val	Leu
145					150					155					160
Asp	Asn	Pro	Asp	Gln	Ile	Ala	Phe	Ala	Val	Val	Gly	Asp	Gly	Glu	Ala
				165					170					175	
Glu	Thr	Gly	Pro	Ser	Met	Thr	Ser	Trp	His	Ser	Thr	Lys	Phe	Leu	Asn
			180					185					190		
Ala	Lys	Asn	Asp	Gly	Ala	Val	Leu	Pro	Ile	Leu	Asp	Leu	Asn	Gly	Phe
		195					200					205			
Lys	Ile	Ser	Asn	Pro	Thr	Ile	Phe	Ser	Arg	Met	Ser	Asp	Glu	Glu	Ile
	210					215						220			
Thr	Lys	Phe	Phe	Glu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Ser	Pro	Arg	Phe	Ile	Glu	Asn
225					230					235					240
Asp	Asp	Ile	His	Asp	Tyr	Ala	Ala	Tyr	His	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Val
				245					250					255	
Leu	Asp	Gln	Ala	Ile	Glu	Asp	Ile	Gln	Ala	Ile	Gln	Lys	Asp	Ala	Arg
			260					265					270		
Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Glu	Asp	Gly	Thr	Ile	Pro	Ala	Trp	Pro	Val	Ile
		275					280					285			
Ile	Ala	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Trp	Gly	Gly	Pro	Thr	His	Asp	Glu	Asp
	290					295					300				
Gly	Asn	Pro	Ile	Glu	Asn	Ser	Phe	Arg	Ala	His	Gln	Val	Pro	Leu	Pro
305					310					315					320
Leu	Ala	Gln	Asn	Lys	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser	Gln	Phe	Glu	Asp	Trp	Met
				325					330					335	
Asn	Ser	Tyr	Lys	Pro	Glu	Glu	Leu	Phe	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Leu	Lys
			340					345					350		
Asp	Glu	Leu	Lys	Ala	Ile	Ala	Pro	Lys	Gly	Asp	Lys	Arg	Met	Ser	Ala
		355					360					365			
Asn	Pro	Ile	Ala	Asn	Gly	Gly	Arg	Arg	Arg	Gly	Glu	Glu	Ala	Thr	Asp
	370					375					380				
Leu	Thr	Leu	Pro	Asp	Trp	Arg	Gln	Phe	Thr	Asn	Asp	Ile	Thr	Asn	Glu
385					390					395					400
Asn	Arg	Gly	His	Glu	Leu	Pro	Lys	Val	Thr	Gln	Asn	Met	Asp	Met	Thr
				405					410					415	
Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Leu	Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	Asn	Pro	Thr	Ser

ES 2 763 824 T3

			420						425				430			
Phe	Arg	Val	Phe	Gly	Pro	Asp	Glu	Thr	Met	Ser	Asn	Arg	Leu	Trp	Ser	
		435					440					445				
Leu	Phe	Asn	Thr	Thr	Asn	Arg	Gln	Trp	Met	Glu	Glu	Val	Lys	Glu	Pro	
	450					455						460				
Asn	Asp	Gln	Tyr	Val	Gly	Pro	Glu	Gly	Arg	Ile	Ile	Asp	Ser	Gln	Leu	
465					470					475					480	
Ser	Glu	His	Gln	Ala	Glu	Gly	Trp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Thr	Leu	Thr	Gly	
				485					490					495		
Arg	Val	Gly	Ile	Phe	Ala	Ser	Tyr	Glu	Ser	Phe	Leu	Arg	Val	Val	Asp	
			500					505					510			
Thr	Met	Val	Thr	Gln	His	Phe	Lys	Trp	Leu	Arg	His	Ala	Ser	Glu	Gln	
		515					520					525				
Ala	Trp	Arg	Asn	Asp	Tyr	Pro	Ser	Leu	Asn	Leu	Ile	Ala	Thr	Ser	Thr	
	530					535					540					
Ala	Phe	Gln	Gln	Asp	His	Asn	Gly	Tyr	Thr	His	Gln	Asp	Pro	Gly	Met	
545					550					555					560	
Leu	Thr	His	Leu	Ala	Glu	Lys	Lys	Ser	Asn	Phe	Ile	Arg	Glu	Tyr	Leu	
				565					570					575		
Pro	Ala	Asp	Gly	Asn	Ser	Leu	Leu	Ala	Val	Gln	Asp	Arg	Ala	Phe	Ser	
			580					585					590			
Glu	Arg	His	Lys	Val	Asn	Leu	Ile	Ala	Ser	Lys	Gln	Pro	Arg	Gln		
		595					600					605				
Gln	Trp	Phe	Thr	Ala	Asp	Glu	Ala	Asp	Glu	Leu	Ala	Asn	Glu	Gly	Leu	
	610					615					620					
Lys	Ile	Ile	Asp	Trp	Ala	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Gly	Asp	Val	Asp	Ile	
625					630					635					640	
Thr	Phe	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Glu	Pro	Thr	Ile	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala	
				645					650					655		
Leu	Trp	Leu	Ile	Asn	Gln	Ala	Phe	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Arg	Tyr	Val	
			660					665					670			
Asn	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Leu	Gln	Lys	Lys	Ser	Glu	Ser	His	Met	
		675					680					685				
Asn	Asp	Glu	Arg	Glu	Leu	Ser	Asp	Ala	Glu	Phe	Asn	Lys	Phe	Phe	Gln	
	690					695					700					
Ala	Asp	Lys	Pro	Val	Ile	Phe	Gly	Phe	His	Ala	Tyr	Glu	Asp	Leu	Ile	
705					710					715					720	
Glu	Ser	Phe	Phe	Phe	Glu	Arg	Lys	Phe	Lys	Gly	Asp	Val	Tyr	Val	His	
				725					730					735		
Gly	Tyr	Arg	Glu	Asp	Gly	Asp	Ile	Thr	Thr	Thr	Tyr	Asp	Met	Arg	Val	
			740					745					750			
Tyr	Ser	Lys	Leu	Asp	Arg	Phe	His	Gln	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	Ile	
		755					760					765				
Leu	Ser	Ala	Asn	Ser	Thr	Ile	Asp	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Thr	Phe	Ile	
	770					775						780				
Glu	Lys	Met	Asp	Ala	Thr	Leu	Ala	Lys	His	Phe	Glu	Val	Thr	Arg	Asn	
785					790					795					800	
Glu	Gly	Arg	Asp	Ile	Glu	Glu	Phe	Thr	Asp	Trp	Asn	Trp	Ser	Ala	Leu	
				805					810					815		

Lys

<210> 18

<211> 794

<212> PRT

5 <213> Streptococcus gordonii (cepa Challis / ATCC 35105 / CH1 / DL1 / V288)

<400> 18

Met	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Lys	Ala	Tyr	Leu	Glu	Lys	Val	Asp	Ala
1			5						10					15	
Trp	Trp	Arg	Ala	Ala	Asn	Tyr	Ile	Ser	Ala	Ala	Gln	Met	Tyr	Leu	Lys
			20					25					30		

ES 2 763 824 T3

Asp Asn Pro Leu Leu Lys Arg Asp Val Val Ala Asn Asp Leu Lys Ala  
 35 40 45  
 His Pro Ile Gly His Trp Gly Thr Val Pro Gly Gln Asn Phe Ile Tyr  
 50 55 60  
 Ala His Leu Asn Arg Thr Ile Asn Lys Tyr Asp Leu Asp Met Phe Tyr  
 65 70 75 80  
 Ile Glu Gly Pro Gly His Gly Gly Gln Val Met Val Ser Asn Ser Tyr  
 85 90 95  
 Leu Asp Gly Ser Tyr Thr Glu Leu Asn Pro Asn Ile Pro Gln Asn Glu  
 100 105 110  
 Glu Gly Phe Lys His Leu Cys Lys Ile Phe Ser Phe Pro Gly Gly Ile  
 115 120 125  
 Ala Ser His Ala Ala Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly  
 130 135 140  
 Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser His Ala Ala Gly Ala Ile Leu Asp Asn  
 145 150 155 160  
 Pro Asp Val Ile Ala Ala Thr Val Ile Gly Asp Gly Glu Gly Glu Thr  
 165 170 175  
 Gly Pro Leu Met Ala Gly Trp Leu Ser Asn Thr Phe Ile Asn Pro Val  
 180 185 190  
 Asn Asp Gly Ala Ile Leu Pro Ile Phe Tyr Leu Asn Gly Gly Lys Ile  
 195 200 205  
 His Asn Pro Thr Ile Phe Glu Arg Lys Thr Asp Glu Glu Leu Thr Leu  
 210 215 220  
 Phe Phe Glu Gly Leu Gly Trp Lys Pro Ile Phe Ala Asp Val Thr Ala  
 225 230 235 240  
 Ile Ser Glu Asn His Glu Ala Ala His Ala Leu Phe Ala Ala Lys Leu  
 245 250 255  
 Asp Glu Ala Ile Glu Glu Ile Lys Lys Val Gln Ala Glu Ala Arg Lys  
 260 265 270  
 Gly Ser Ala Glu Glu Ala Thr Gln Ala Ile Phe Pro Val Leu Val Ala  
 275 280 285  
 Arg Ile Pro Lys Gly Trp Thr Gly Pro Lys Ser Trp Glu Gly Thr Pro  
 290 295 300  
 Ile Glu Gly Gly Phe Arg Ala His Gln Val Pro Ile Pro Val Asp Ala  
 305 310 315 320  
 His His Met Glu His Val Asp Ala Leu Leu Asn Trp Leu Lys Ser Tyr  
 325 330 335  
 Arg Pro Glu Glu Leu Phe Asp Glu Ser Gly Lys Val Leu Pro Glu Ile  
 340 345 350  
 Ala Ala Ile Gly Pro Lys Gly Asp Arg Arg Met Ala Met Asn Pro Ile  
 355 360 365  
 Thr Asn Ala Gly Val Ile Lys Pro Met Asp Thr Ala Asp Trp Lys Lys  
 370 375 380  
 His Ala Leu Lys Phe Gly Thr Pro Gly Glu Ile Val Ala Gln Asp Met  
 385 390 395 400  
 Ile Glu Phe Gly Lys Tyr Ala Thr Asp Leu Val Asp Ala Asn Pro Asp  
 405 410 415  
 Asn Phe Arg Ile Phe Gly Pro Asp Glu Thr Lys Ser Asn Arg Leu Gln  
 420 425 430  
 Glu Val Phe Thr Arg Thr Ser Arg Gln Trp Leu Gly Arg Met Arg Pro  
 435 440 445  
 Glu Tyr Asp Glu Ala Leu Ser Pro Ala Gly Arg Val Ile Asp Ser Gln  
 450 455 460  
 Leu Ser Glu His Gln Ala Glu Gly Met Leu Glu Gly Tyr Val Leu Thr  
 465 470 475 480  
 Gly Arg His Gly Phe Ala Ser Tyr Glu Ser Phe Leu Arg Val Val  
 485 490 495  
 Asp Ser Met Val Thr Gln His Phe Lys Trp Leu Arg Lys Cys Lys Thr  
 500 505 510  
 His Thr Thr Trp Arg Lys Asn Tyr Pro Ala Leu Asn Leu Ile Ala Thr  
 515 520 525  
 Ser Thr Val Phe Gln Gln Asp His Asn Gly Tyr Thr His Gln Asp Pro

ES 2 763 824 T3

530						535						540					
Gly	Ile	Leu	Thr	His	Leu	Ala	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Phe	Ile	Arg	Glu		
545					550					555					560		
Tyr	Leu	Pro	Ala	Asp	Thr	Asn	Ser	Leu	Leu	Ala	Val	Met	Asp	Lys	Ala		
				565						570					575		
Phe	Lys	Ala	Glu	Asp	Lys	Val	Asn	Leu	Ile	Val	Thr	Ser	Lys	His	Pro		
			580						585					590			
Arg	Pro	Gln	Phe	Tyr	Ser	Ala	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Val	Arg	Glu		
		595							600					605			
Gly	Tyr	Lys	Val	Ile	Asp	Trp	Ala	Ser	Thr	Val	Ser	Asn	Asn	Glu	Glu		
610						615								620			
Pro	Asp	Val	Val	Phe	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Glu	Pro	Asn	Leu	Glu	Ala		
625					630									635			640
Leu	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Leu	His	Lys	Ala	Phe	Pro	Glu	Leu	Lys	Ile		
				645						650					655		
Arg	Phe	Val	Asn	Val	Val	Asp	Ile	Leu	Lys	Leu	Arg	His	Pro	Ser	Val		
			660							665					670		
Asp	Ala	Arg	Gly	Leu	Ser	Asp	Glu	Glu	Phe	Asp	Gln	Val	Phe	Thr	Thr		
		675								680					685		
Asp	Lys	Pro	Val	Ile	Phe	Ala	Phe	His	Gly	Tyr	Glu	Gly	Met	Ile	Arg		
690						695								700			
Asp	Ile	Phe	Phe	Asn	Arg	His	Asn	His	Asn	Leu	Arg	Val	His	Gly	Tyr		
705					710									715			720
Arg	Glu	Asn	Gly	Asp	Ile	Thr	Thr	Pro	Phe	Asp	Met	Arg	Val	Met	Ser		
				725						730					735		
Glu	Leu	Asp	Arg	Phe	His	Leu	Ala	Gln	Asp	Ala	Ala	Asn	Ala	Ala	Leu		
			740						745						750		
Gly	Glu	Asp	Ala	Ala	Val	Phe	Ser	Ala	Lys	Met	Asp	Glu	Thr	Val	Ala		
		755							760						765		
Tyr	His	Asn	Ala	Tyr	Ile	Arg	Glu	Asn	Gly	Asp	Asp	Ile	Pro	Glu	Val		
770						775									780		
Gln	Asn	Trp	Lys	Trp	Glu	Asn	Ile	Asn	Lys								
785						790											

<210> 19

<211> 812

<212> PRT

5 <213> Thiobacillus denitrificans (cepa ATCC 25259)

<400> 19

ES 2 763 824 T3

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

Ser Leu Leu His Ala Tyr Gly Ala Val Phe Asp Asn Pro Asp Leu Ile  
 180 185 190  
 Ala Cys Cys Val Ile Gly Asp Gly Glu Ala Glu Thr Gly Ala Leu Ala  
 195 200 205  
 Thr Ser Trp His Ser Asn Lys Phe Leu Asp Pro Arg Gly Asp Gly Ala  
 210 215 220  
 Val Leu Pro Val Leu His Leu Asn Gly Tyr Lys Ile Ala Asn Pro Ala  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Ala Arg Ile Pro Arg His Glu Leu Glu Ser Leu Leu Thr Gly  
 245 250 255  
 Tyr Gly Tyr Arg Pro Ile Phe Val Glu Gly Asp Glu Pro Ser Asp Met  
 260 265 270  
 His Gln Lys Met Ala Ala Ala Val Asp Gln Ala Leu Ala Glu Ile Arg  
 275 280 285  
 Gly Ile Gln Arg Arg Ala Arg Asp Gly Gly Glu Thr Thr Arg Pro Thr  
 290 295 300  
 Trp Pro Met Ile Val Leu Asp Ser Pro Lys Gly Trp Thr Gly Pro Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Val Asp Gly Lys Lys Thr Glu Asp Tyr Trp Arg Ser His Gln Val  
 325 330 335  
 Pro Phe Gly Asp Leu Asp Asn Pro Ala His Val Arg Leu Leu Asp Asp  
 340 345 350  
 Trp Met Arg Ser Tyr Arg Pro Glu Glu Leu Phe Asp Ala Gly Gly Ala  
 355 360 365  
 Leu Lys Pro Glu Leu Ala Ala Leu Ala Pro Thr Gly Glu Arg Arg Met  
 370 375 380  
 Gly Ala Asn Pro His Ala Asn Gly Gly Lys Leu Leu Arg Asp Leu Arg  
 385 390 395 400  
 Leu Pro Asp Phe Arg Asp Tyr Arg Val Glu Leu Asp Ala Pro Gly Ser  
 405 410 415  
 Val Val Ser Glu Thr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Arg Asp Val  
 420 425 430  
 Val Arg Asp Asn Pro Asp Asn Phe Arg Leu Phe Gly Pro Asp Glu Thr  
 435 440 445  
 His Ser Asn Arg Leu Ser Ala Val Phe Glu Val Thr Asp Arg Thr Trp  
 450 455 460  
 Val Ala Glu Arg Tyr Pro Tyr Asp Asp His Leu Ala Ala Asp Gly Arg  
 465 470 475 480  
 Val Met Glu Ile Leu Ser Glu His Ala Cys Glu Gly Trp Leu Glu Gly  
 485 490 495  
 Tyr Leu Leu Ser Gly Arg His Gly Leu Phe Ser Cys Tyr Glu Ala Phe  
 500 505 510  
 Ile His Ile Ile Gly Ser Met Phe Asn Gln His Ala Lys Trp Leu Lys  
 515 520 525  
 Val Cys Asn Glu Ile Pro Trp Arg Val Pro Val Ala Ser Leu Asn Ile  
 530 535 540  
 Leu Leu Thr Ser His Val Trp Arg Gln Asp His Asn Gly Phe Ser His  
 545 550 555 560  
 Gln Asp Pro Gly Phe Ile Asp His Val Val Asn Lys Lys Ala Asp Val  
 565 570 575  
 Ile Arg Val Tyr Leu Pro Pro Asp Ala Asn Thr Leu Leu Val Val Ala  
 580 585 590  
 Asp Lys Cys Leu Arg Ser Arg Asn Leu Val Asn Val Ile Val Ala Gly  
 595 600 605  
 Lys Gln Pro Glu Gln Gln Trp Leu Asp Met Asp Ala Ala Val Thr His  
 610 615 620  
 Ala Gly Val Gly Val Gly Ile Trp Asp Trp Ala Cys Asn Asp Gln Gly  
 625 630 635 640  
 Gly Glu Pro Asp Ile Val Leu Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Thr Met  
 645 650 655  
 Glu Met Leu Ala Ala Ile Asp Leu Leu Arg Thr Leu Val Pro Asp Leu  
 660 665 670  
 Lys Ile Arg Phe Ile Asn Val Val Asp Leu Met Thr Leu Gln Pro Ala

ES 2 763 824 T3

		675				680					685				
Glu	Glu	His	Pro	His	Gly	Leu	Pro	Asp	Glu	Glu	Phe	Asp	Leu	Leu	Phe
	690					695					700				
Thr	Thr	Asp	Lys	Pro	Ile	Leu	Phe	Gly	Tyr	His	Gly	Tyr	Pro	Trp	Leu
705					710					715				720	
Ile	His	Arg	Leu	Thr	Tyr	Arg	Arg	Thr	Asn	His	Asp	Asn	Leu	His	Val
				725					730					735	
Arg	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Pro	Phe	Asp	Met	Val
			740					745					750		
Val	Leu	Asn	Glu	Leu	Asp	Arg	Phe	His	Leu	Val	Ile	Asp	Val	Ala	Arg
		755					760					765			
Arg	Val	Pro	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Ala	Ala	His	Leu	Gln	Gln	Gln	Met
	770					775					780				
Leu	Asp	Lys	Leu	Gly	Ala	His	Thr	Gln	Tyr	Ile	His	Ala	His	Gly	Glu
785					790					795					800
Asp	Met	Pro	Glu	Ile	Arg	Asp	Trp	Lys	Trp	Ala	Arg				
				805					810						

<210> 20

<211> 799

<212> PRT

5 <213> Lactobacillus crispatus ST1

<400> 20

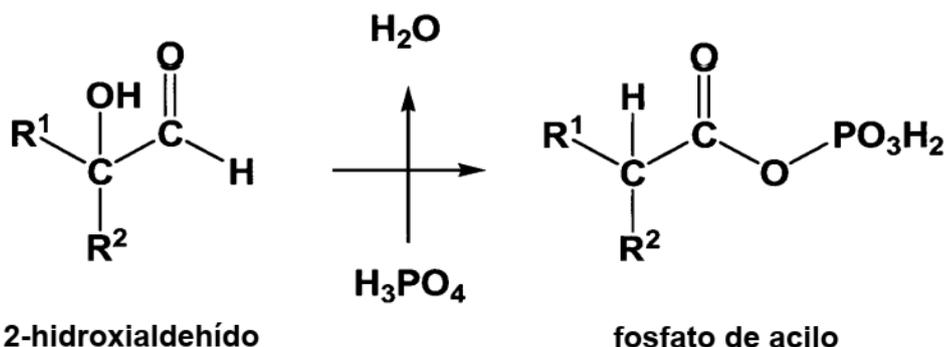
ES 2 763 824 T3

Met Ala Val Asp Tyr Asp Ser Lys Asp Tyr Leu Lys Ser Val Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Tyr Trp Arg Ala Ala Asn Tyr Leu Ser Val Gly Gln Leu Phe Leu Met  
 20 25 30  
 Lys Asn Pro Leu Leu Lys Thr Pro Leu Val Ala Glu Asp Val Lys Pro  
 35 40 45  
 Lys Pro Ile Gly His Trp Gly Thr Ile Ala Pro Gln Asn Phe Ile Tyr  
 50 55 60  
 Ala His Leu Asn Arg Val Leu Lys Lys Tyr Asp Leu Asn Met Phe Tyr  
 65 70 75 80  
 Ile Glu Gly Ser Gly His Gly Gly Gln Val Met Val Ser Asn Ser Tyr  
 85 90 95  
 Leu Asp Gly Ser Tyr Thr Glu Arg Tyr Pro Glu Ile Thr Gln Asp Glu  
 100 105 110  
 Lys Gly Met Ala Lys Leu Phe Lys Arg Phe Ser Phe Pro Gly Gly Val  
 115 120 125  
 Ala Ser His Ala Ala Pro Glu Thr Pro Gly Ser Ile His Glu Gly Gly  
 130 135 140  
 Glu Leu Gly Tyr Ser Leu Ser His Gly Thr Gly Ala Val Leu Asp Asn  
 145 150 155 160  
 Pro Asp Val Ile Ala Ala Val Glu Ile Gly Asp Gly Glu Ala Glu Thr  
 165 170 175  
 Gly Pro Leu Ala Ala Ser Trp Phe Ser Asp Lys Phe Ile Asn Pro Ile  
 180 185 190  
 Lys Asp Gly Ala Val Leu Pro Ile Leu Gln Ile Asn Gly Phe Lys Ile  
 195 200 205  
 Ser Asn Pro Thr Ile Val Ser Arg Met Ser Asp Gln Glu Leu Thr Glu  
 210 215 220  
 Tyr Phe Arg Gly Met Gly Trp Asp Pro His Phe Val Ser Val Phe Lys  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Arg Phe Asp Gly Glu Lys Asp Pro Met Gln Val His Glu Glu  
 245 250 255  
 Met Ala Lys Thr Met Asp Glu Val Ile Glu Glu Ile Lys Ala Ile Gln  
 260 265 270  
 Lys His Ala Arg Glu Asn Asn Asp Ala Thr Leu Pro His Trp Pro Met  
 275 280 285  
 Ile Ile Phe Gln Cys Pro Lys Gly Trp Thr Gly Pro Lys Lys Asp Leu  
 290 295 300

Asp Gly Asn Pro Ile Glu Asn Ser Phe Arg Ala His Gln Ile Pro Ile  
 305 310 315 320  
 Pro Val Ala Gln Gly Asp Met Glu His Ala Asp Met Leu Thr Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Glu Ser Tyr Lys Pro Glu Glu Leu Phe Asn Glu Asp Gly Ser Pro  
 340 345 350  
 Lys Glu Ile Val Thr Glu Asn Thr Ala Lys Gly Asp His Arg Met Ala  
 355 360 365  
 Met Asn Pro Ile Thr Asn Gly Gly Ile Asp Pro Lys Arg Leu Asn Leu  
 370 375 380  
 Pro Asp Tyr Arg Lys Phe Ala Leu Lys Phe Asp Lys Pro Gly Ser Val  
 385 390 395 400  
 Glu Ala Gln Asp Met Val Glu Trp Ala Lys Tyr Leu Asp Glu Val Ala  
 405 410 415  
 Lys Leu Asn Pro Thr Thr Phe Arg Gly Phe Gly Pro Asp Glu Ser Lys  
 420 425 430  
 Ser Asn Arg Leu Phe Gln Leu Leu Asp Asp Gln Lys Arg Gln Trp Glu  
 435 440 445  
 Pro Glu Val His Glu Pro Asn Asp Glu Asn Leu Ala Pro Ser Gly Arg  
 450 455 460  
 Val Ile Asp Ser Gln Leu Ser Glu His Gln Asp Glu Gly Phe Leu Glu  
 465 470 475 480  
 Gly Tyr Val Leu Thr Gly Arg His Gly Phe Phe Ala Thr Tyr Glu Ala  
 485 490 495  
 Phe Gly Arg Val Val Asp Ser Met Leu Thr Gln His Met Lys Trp Leu  
 500 505 510  
 Arg Lys Ala Lys Glu Gln Tyr Trp Arg His Asp Tyr Pro Ser Leu Asn  
 515 520 525  
 Phe Val Ala Thr Ser Thr Val Phe Gln Gln Asp His Asn Gly Tyr Thr  
 530 535 540  
 His Gln Asp Pro Gly Ile Leu Thr His Leu Tyr Glu Lys Asn Arg Pro  
 545 550 555 560  
 Asp Leu Val His Glu Tyr Leu Pro Ser Asp Thr Asn Thr Leu Leu Ala  
 565 570 575  
 Val Gly Asp Lys Ala Leu Gln Asp Arg Glu Cys Ile Asn Val Leu Val  
 580 585 590  
 Thr Ser Lys Gln Pro Arg Pro Gln Trp Phe Ser Ile Glu Glu Ala Lys  
 595 600 605  
 Lys Leu Val Asp Lys Gly Leu Gly Tyr Ile Asp Trp Ala Ser Thr Asp  
 610 615 620  
 Lys Gly Ala Lys Pro Asp Val Val Phe Ala Ser Thr Glu Thr Glu Pro  
 625 630 635 640  
 Thr Ile Glu Thr Leu Ala Ala Ile Asp Ile Leu His Lys Lys Phe Pro  
 645 650 655  
 Asp Leu Lys Ile Arg Tyr Ile Asn Val Val Asp Val Met Lys Leu Met  
 660 665 670  
 Asp Pro Lys Asp Asn Lys Asn Gly Leu Ser Thr Glu Glu Phe Asp Arg  
 675 680 685  
 Leu Phe Pro Lys Asp Val Pro Val Ile Phe Ala Trp His Gly Tyr Lys  
 690 695 700  
 Ser Met Met Glu Ser Ile Trp Phe Ala Arg Lys Arg Tyr Asn Val His  
 705 710 715 720  
 Ile His Cys Tyr Glu Glu Asn Gly Asp Ile Thr Thr Pro Phe Asp Met  
 725 730 735  
 Arg Val Leu Asn His Leu Asp Arg Phe Asp Leu Ala Lys Asp Ala Val  
 740 745 750  
 Glu Ser Ile Asp Lys Leu Lys Gly Lys Asn Ala Asp Phe Ile Ser His  
 755 760 765  
 Met Asp Asp Leu Leu Glu Lys His His Gln Tyr Ile Arg Asp Asn Gly  
 770 775 780  
 Lys Asp Met Pro Glu Val Thr Glu Trp Gln Trp Ser Gly Leu Lys  
 785 790 795

REIVINDICACIONES

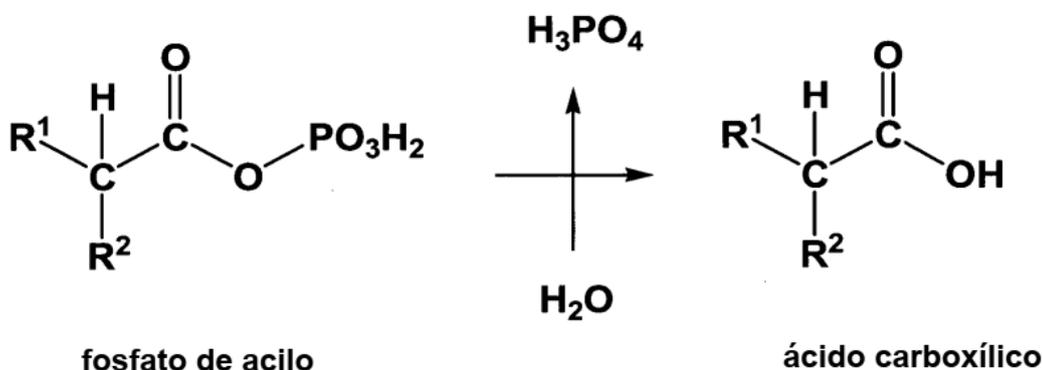
1. Un procedimiento para la producción enzimática de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído y fosfato en el que la producción de un fosfato de acilo a partir de un 2-hidroxialdehído y fosfato se logra mediante el uso de una fosfocetolasa o de una sulfoacetaldehído acetiltransferasa (Documento EC 2.3.3.15) de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH y C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> en la que si R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> no puede ser H.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fosfocetolasa es
- 10 (a) una fosfocetolasa (Documento EC 4.1.2.9), o  
 (b) una fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (Documento EC 4.1.2.22).

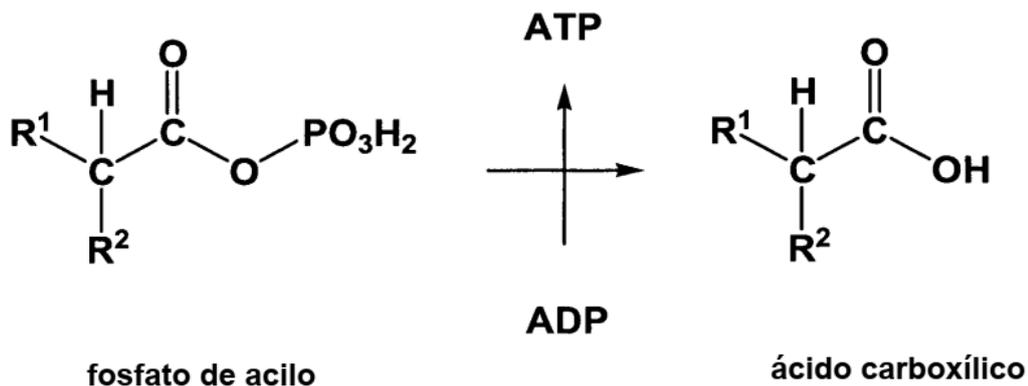
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende además la etapa de convertir el fosfato de acilo producido en un ácido carboxílico de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



- 15 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH y C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> en la que si R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> no puede ser H.

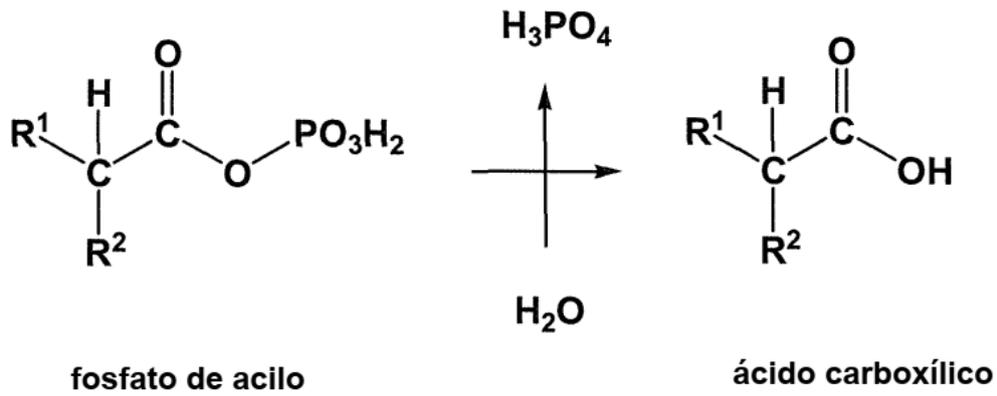
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la conversión de un fosfato de acilo en un ácido carboxílico se logra mediante el uso de una acilfosfatasa (Documento EC 3.6.1.7).

- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende además la etapa de convertir el fosfato de acilo producido en un ácido carboxílico de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:

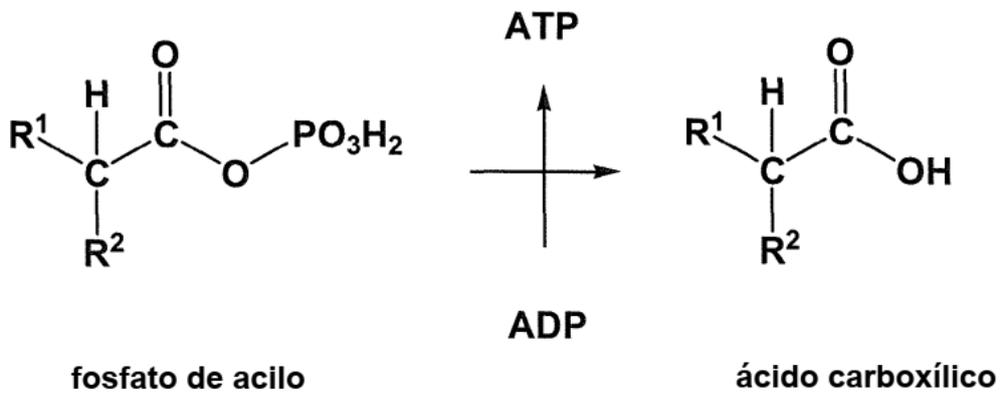








o



en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OH y C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> y en el que si R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> no puede ser H.

**Figura 2**



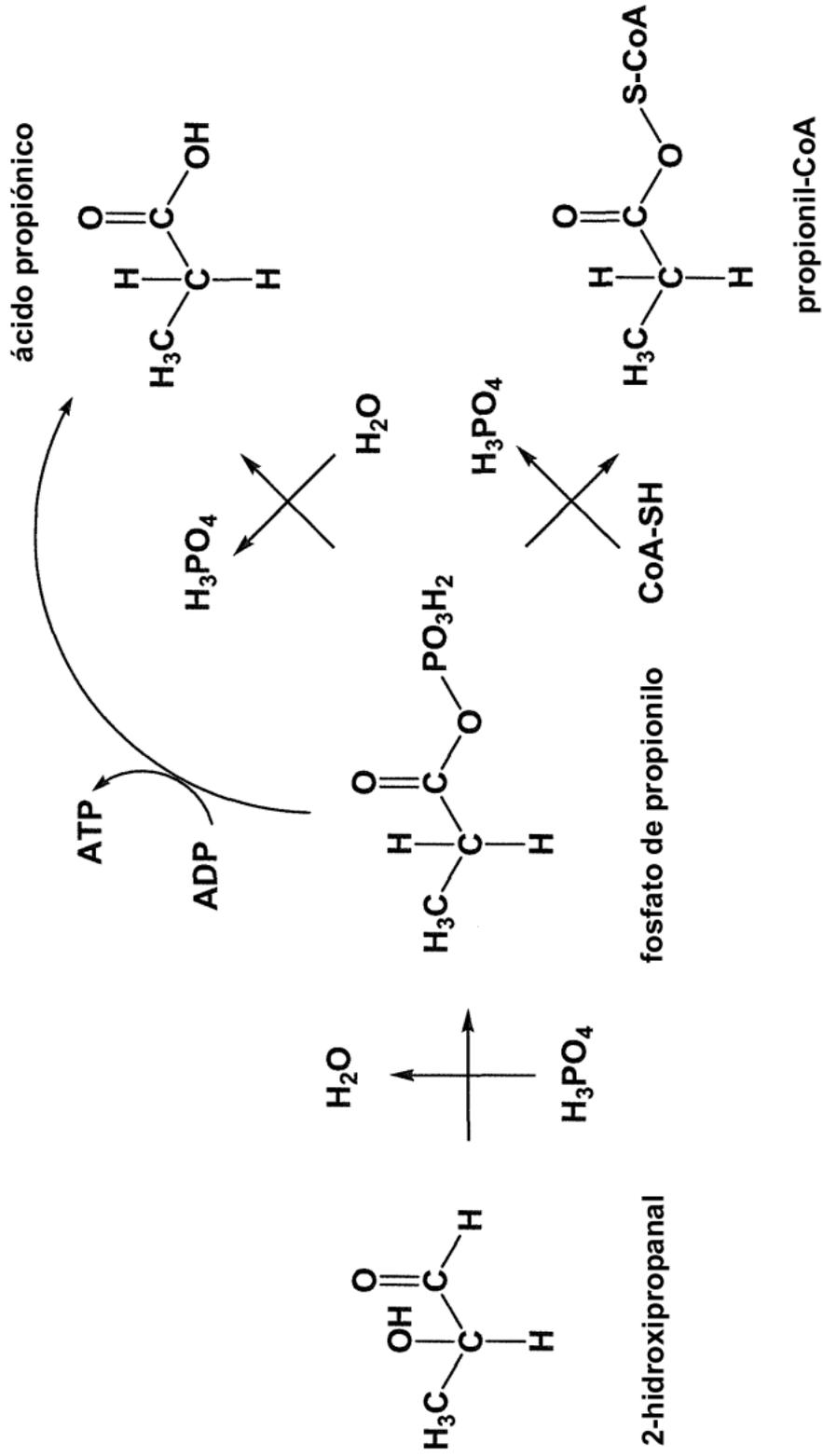


Figura 4

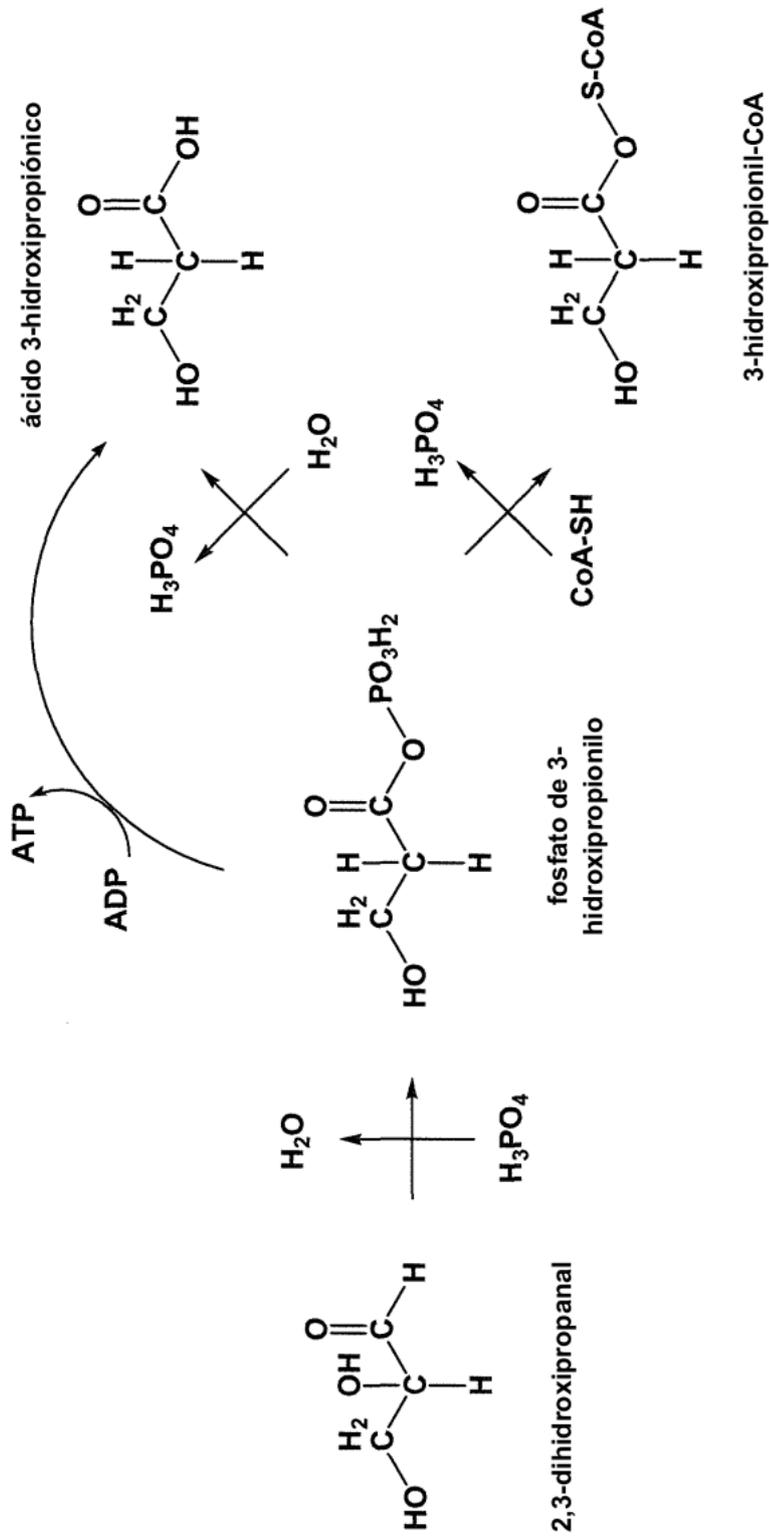


Figura 5