



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 327**

51 Int. Cl.:
C12P 17/04 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04023458 .5**
86 Fecha de presentación : **02.08.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1498489**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2005**

54 Título: **Producción de ácido ascórbico en levaduras.**

30 Prioridad: **02.08.2000 US 630983**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **Tate & Lyle Ingredients Americas, Inc.**
2200 E. Eldorado Street
Decatur, Illinois 62521, US

72 Inventor/es: **Porro, Danilo y**
Sauer, Michael

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 285 327 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 de ácido ascórbico en levaduras.

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

La presente invención hace referencia al campo de la producción de ácido ascórbico. En particular hace referencia a un proceso de producción de ácido ascórbico en levaduras, incluyendo levaduras recombinantes.

2. Descripción del campo relacionado

El ácido ascórbico (Vitamina C) es un potente antioxidante hidrosoluble vital para el crecimiento y el mantenimiento de todos los tejidos en seres humanos (Padh H., 1990, Biochem. Cell Biol. 68, 1166-1173). El ácido ascórbico juega un papel importante en la producción de colágeno, un componente celular esencial para los tejidos conectivos, los músculos, los tendones, los huesos, los dientes y la piel. El colágeno también es necesario para la reparación de vasos sanguíneos, hematomas y huesos rotos. El ácido ascórbico ayuda a regular la presión sanguínea, contribuye a mantener bajos los niveles de colesterol, y ayuda a la eliminación de depósitos de colesterol de las paredes arteriales. El ácido ascórbico también ayuda a la metabolización del ácido fólico, regula el transporte de hierro al interior de las células y es necesario para la conversión de los aminoácidos L-tirosina y L-fenilalanina a noradrenalina. La conversión de triptófano a serotonina, la neurohormona responsable del sueño, del control del dolor y del bienestar, también requiere un aporte adecuado de ácido ascórbico.

Una deficiencia en L-ácido ascórbico puede impedir la síntesis de colágeno llevando a dolor en las articulaciones, anemia, nerviosidad y retardo en el crecimiento. Otros efectos son una respuesta inmune reducida y un aumento de la susceptibilidad a las infecciones. La más severa de las deficiencias en ácido ascórbico es el escorbuto, una condición en la que se observa una inflamación de las articulaciones, sangrado de las encías y hemorragias en los capilares bajo la superficie de la piel. De no ser tratado, el escorbuto es fatal.

A pesar de que el intestino absorbe fácilmente el ácido ascórbico, éste es excretado en la orina dentro de las dos horas después de su ingestión. Por tanto, no se puede almacenar en el organismo. El L-ácido ascórbico se produce en todas las plantas superiores y en el hígado o en el riñón de la mayoría de animales superiores, pero no en los humanos, los murciélagos, algunas aves y en una variedad de peces. Por lo tanto, los humanos deben tener acceso a suficientes cantidades de ácido ascórbico de fuentes alimenticias adecuadas o suplementos para mantener una salud óptima.

Los cítricos, las patatas, los pimientos, los vegetales de hoja verde, los tomates y las frutas silvestres son fuentes de ácido ascórbico. El ácido ascórbico también está disponible comercialmente como suplemento en forma de pastillas, tabletas, polvos, láminas y jarabes.

L-Ácido ascórbico tiene aprobación de la U.S. Food and Drug Administration para su uso como suplemento de la dieta y como sustancia conservante; además está en la lista de las sustancias generalmente reconocidas como seguras de la FDA. El L-Ácido ascórbico se puede utilizar en refrescos como antioxidante para ingredientes que aportan sabor, en carnes y en productos que contienen carne, para la curación y la conservación, en harinas para aumentar la calidad de la cocción en el horno, como estabilizante en cervezas, como antioxidante en aceites y grasas y en una gran variedad de alimentos para su enriquecimiento en ácido ascórbico. El L-Ácido ascórbico también puede ser útil en los productos quitamanchas, los productos de cuidado del cabello, la producción de plásticos, la fotografía y el tratamiento del agua.

Las enzimas de las vías biosintéticas que llevan al ácido ascórbico no han sido completamente identificadas. El conocimiento actual de las vías fisiológicas en plantas y animales se muestra en la Figura. 1.

En animales, la D-glucosa sirve como precursor inicial y el último paso se cataliza por la L-gulono-1,4-lactona oxidasa microsomal. El enzima se ha aislado y se ha caracterizado de diferentes fuentes. El gen de rata ha sido clonado y secuenciado (Koshizaka T. y col., 1988, J. Biol. Chem. 263,1619-1621).

Se ha descrito en plantas dos vías discretas para la síntesis de ácido ascórbico. En una vía, el L-ácido ascórbico se sintetiza a partir de D-glucosa vía L-sorbose (Loewus M.W. y col., 1990, Plant Physiol. 94, 1492-1495). Existen evidencias que sugieren que la principal vía fisiológica va desde la D-glucosa vía L-galactosa y L-galactono-1,4-lactona a L-ácido ascórbico (Wheeler G.L. y col. 1998, Nature, 393, 365-369). Los últimos dos pasos se catalizan por las enzimas L-galactosa deshidrogenasa y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa. También en este caso, se ha aislado y caracterizado el último enzima, y se ha clonado y secuenciado el gen de *Brassica oleracea* (Ostergaard J. y col. 1997, J. Biol. Chem., 272, 30009-30016).

Para su uso como aditivo alimentario, el ácido ascórbico se puede aislar de fuentes naturales o se puede sintetizar químicamente por oxidación de L-sorbose como en las variaciones del proceso Reichstein (U.S. Pat. No. 2,265,121).

ES 2 285 327 T3

Es deseable disponer de métodos para la producción de ácido ascórbico mediante procesos convenientes. Dos requerimientos principales en la producción de ácido ascórbico son que la síntesis debe ser enantio-selectiva, ya que sólo el L-enantiómero del ácido ascórbico es biológicamente activo y que el ambiente en los últimos pasos del proceso deben ser no-oxidantes, ya que el ácido ascórbico se oxida muy fácilmente.

5

Una posible aproximación es la producción de L-ácido ascórbico en microorganismos. Los microorganismos se pueden cultivar fácilmente a escala industrial. A pesar de que la producción de L-ácido ascórbico en microorganismos y hongos ha sido ya descrita en el pasado, evidencias recientes demuestran que se producen análogos del L-ácido ascórbico, y no el propio L-ácido ascórbico (Hub W.K. y col. 1998, Mol. Microbiol. 30, 895-903) (Hancock R.D. y col., 2000, FEMS Microbiol. Lett. 186, 245-250) (Dumbrava V.A. y col. 1987, BBA 926, 331-338). En levaduras (las especies *Candida* y *Saccharomyces*), se ha descrito la producción de ácido eritroascórbico (Huh W.K. y col., 1994, Eur. J. Biochem, 225, 1073-1079) (Huh W.K. y col., 1998, Mol. Microbiol. 30, 4, 895-903). En tales levaduras, se ha propuesto la existencia de una vía fisiológica a partir de la D-glucosa vía D-arabinosa y D-arabinono-1,4-lactona a ácido eritroascórbico (Kim S.T. y col., 1996, BBA, 1297, 1-8). Se han caracterizado Las enzimas D-arabinosa deshidrogenasa y D-arabinono-1,4-lactona oxidasa de *Candida albicans* así como de *S. cerevisiae*. Interesantemente, L-galactosa y L-galactono-1,4-lactona son sustratos para estas actividades *in vitro*.

15

La producción de L-ácido ascórbico *in vivo* se ha conseguido cultivando células de *Candida* salvaje con L-galactono-1,4-lactona (International Patent Application WO85/01745). Recientemente se ha mostrado que las células de *S. cerevisiae* salvaje acumulan L-ácido ascórbico intracelular cuando se incuban con L-galactosa, L-galactono-1,4-lactona, o L-gulono-1,4-lactona (Hancock y col., 2000, FEMS Microbiol. Lett. 186, 245-250) (Spickett C.M. y col., 2000, Free Rad. Biol. Med. 28, 183-192).

20

Las células salvajes de *Candida* incubadas con L-galactono-1,4-lactona acumulan L-ácido ascórbico en el medio, sugiriendo que esta levadura tiene un mecanismo biológico para la secreción del L-ácido ascórbico acumulado en el interior de la célula; de hecho, el L-ácido ascórbico es una molécula compleja y es científicamente razonable que su acumulación en el medio no esté relacionada con un proceso de simple difusión sino que dependa de un transportador activo. Esta conclusión se basa en la identificación y la caracterización de transportadores de L-ácido ascórbico en células de organismos eucariotas más complejos (mamíferos) (Daruwala R. y col., 1999, FEBS Letters. 460, 480-484). A pesar de esto, los transportadores de L-ascorbato no se han descrito en géneros de levaduras. Sin embargo, mientras que las células de *Candida* que crecen en un medio que contiene L-galactono-1,4-lactona acumulan L-ácido ascórbico en el medio, la acumulación en el medio de L-ácido ascórbico utilizando células de *S. cerevisiae* incubadas en presencia de precursores de ácido ascórbico no se ha descrito, sorprendentemente.

25

30

Un método deseable para la producción a gran escala de ácido ascórbico comprende la utilización de microorganismos ingenieros genéticamente (es decir, microorganismos recombinantes). Tanto los microorganismos eucarióticos como los procarióticos están siendo utilizados en la actualidad para la producción de proteínas heterólogas así como para la producción de metabolitos heterólogos. Entre los procariotas *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* se utilizan frecuentemente. Entre los eucariotas, las levaduras *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis* se utilizan frecuentemente. A pesar del gran éxito de estos huéspedes, tan sólo se ha descrito un ejemplo para la producción de L-ácido ascórbico a partir de células transformadas. Debido a que solamente las células eucariotas son productoras naturales de L-ácido ascórbico, es todavía más sorprendente que sólo un huésped microbiótico procariótico transformado haya sido descrito que lleve a la acumulación intracelular de L-ácido ascórbico. Lee y col. (Appl. Environment. Microbiol., 1999, 65, 4685-4687), mostraron que la clonación del gen de *S. cerevisiae* que codifica para la D-arabinono-1,4-lactona oxidasa en *E. coli* permite la producción de L-ácido ascórbico en células de *E. coli* incubadas con L-galactono-1,4-lactona. La acumulación de L-ácido ascórbico sólo se observó a nivel intracelular.

35

40

45

No se ha descrito datos experimentales acerca de la producción de L-ácido ascórbico a partir de microorganismos eucarióticos transformados. Ostergaard y col. clonaron el gen que codifica para la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa de la coliflor en la levadura de *S. cerevisiae* (J. Biol. Chem., 1997, 272, 30009-30016). Mientras que los autores encontraron actividad L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa en extractos de levadura *in vitro* (ensayo de citocromo c, ver Ostergaard y col.), no pudieron demostrar la producción de L-ácido ascórbico *in vivo*.

50

Berry y col., solicitud de patente internacional. WO 99/64618 discuten el uso potencial de la vía biosintética de ácido ascórbico en plantas; se da un énfasis especial a la actividad que cataliza la conversión de GDP-D-manosa a GDP-L-galactosa. No obstante, la caracterización del enzima que cataliza este paso no se ha presentado en detalle. La sobreexpresión de un homólogo de *E. coli* resultó ser inactiva.

55

Smirnoff y col., WO 99/33995, discuten el uso de la L-galactosa deshidrogenasa para la producción de ácido ascórbico. El enzima fue purificado de semillas de guisante y se determinó la secuencia N-terminal de la proteína. La secuencia completa se desconoce, todavía no se ha publicado. La secuencia parcial de la enzima L-galactosa deshidrogenasa es el 72% idéntica en los aminoácidos 5-22 de una secuencia putativamente codificante de *Arabidopsis thaliana*, número de acceso 3549669.

60

Roland y col., números de patentes U.S. 4,595,659 y 4,916,068, discuten el uso de cepas de *Candida* no recombinantes para la conversión de sustratos L-galactónicos a L-ácido ascórbico. Roland y col. describen el enzima responsable como L-galactono-1,4-lactona oxidasa.

65

Kumar, WO 00/34502, discute la producción de L-ácido ascórbico en *Candida blankii* y *Cryptococcus dimennae*, levadura capaz de utilizar ácido 2-ceto-L-gulónico como única fuente de carbono en la producción. Kumar excluye específicamente la producción en levadura por una vía que implica a la L-galactonolactona oxidasa o por la conversión de precursores L-galactónicos.

Es deseable disponer de métodos para la producción de ácido ascórbico a través de procesos de fermentación.

Resumen de la invención

En una primera realización, esta invención hace referencia a un método para generar ácido ascórbico o una de sus sales, como se define aquí en las reivindicaciones 1 a 33.

En una segunda realización, la presente invención hace referencia a un método para estabilizar ácido ascórbico o una sal del mismo en un medio, como se define aquí en las reivindicaciones 34 a 36.

Otras realizaciones están dirigidas a levaduras recombinantes como se define aquí en las reivindicaciones 37 a 39.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona una representación esquemática del conocimiento actual sobre las vías biosintéticas fisiológicas que llevan de la D-glucosa al L-ácido ascórbico en plantas o animales, respectivamente. Los siguientes enzimas están implicados: A, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (1.3.2.3); B, L-galactosa deshidrogenasa; C, azúcar fosfatasa (3.1.3.23, putativa); D, hidrolasa (putativa); E, GDP-manosa-3,5-epimerasa (5.1.3.18); F, manosa-1-fosfato guaniltransferasa (2.7.7.22); G, fosfomanomutasa (5.4.2.8); H, manosa-6-fosfato isomerasa (5.3.1.8); I, glucosa-6-fosfato isomerasa (5.3.1.9); J, hexoquinasa (2.7.1.1); 1, L-gulono-1,4-lactona oxidasa (1.1.3.8); 2, aldolactonasa (3.1.1.17); 2a, glucurono lactona reductasa (1.1.1.20); 3, D-glucuronato reductasa (1.1.1.19); 3a, uronolactonasa (3.1.1.19) o espontáneo; 4, D-glucurono quinasa (2.7.1.43); 5, glucuronato-1-fosfato uridiltransferasa (2.7.7.44); 6, UDP-D-glucosa dehidrogenasa (1.1.1.22); 7, UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa (2.7.7.9); 8, fosfoglucomutasa (5.4.2.2), 9, hexoquinasa (2.7.1.1). Sin embargo, se debe acentuar que en el ámbito de la presente invención para producir L-ácido ascórbico, los enzimas útiles no están limitados a los de vías fisiológicas.

La Figura 2 muestra la estabilidad del ácido ascórbico en las condiciones de cultivo. Se añadió ácido ascórbico al medio mineral (glucosa al 2%, YNBal 0.67%) y se incubó en condiciones estándar durante 7 días. El frascón del panel A fue inoculado a tiempo cero con GRF18U de *S. cerevisiae* a una OD⁶⁶⁰ inicial de 0.05, mientras que el matraz del panel B se mantuvo estéril. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se determinó la concentración de ácido ascórbico. A pesar de que el ácido ascórbico era estable en este medio, en presencia de levaduras viables se degradaba completamente en 7 días en medio estéril. Esto demuestra que la incubación de levaduras viables en un medio con ácido ascórbico se puede utilizar como método para estabilizar ácido ascórbico.

La Figura 3 muestra la habilidad endógena de las levaduras para convertir los precursores L-galactono-1,4-lactona (Gal) o L-gulono-1,4-lactona (Gul) a ácido ascórbico. Las células de levadura no transformadas (GRF18U de *S. cerevisiae*, W3031B y ATCC 60483 de *Z. bailii*) fueron cultivadas en medio mineral (glucosa al 2%, YNB al 0.67%) en presencia de L-galactono-1,4-lactona o L-gulono-1,4-lactona 100 mM, respectivamente, durante 72 hr. (la OD⁶⁶⁰ inicial fue de 0.05); “-” significa que no se añadió ningún precursor. Mientras el ácido ascórbico se acumulaba en la célula, no se detectó ácido ascórbico en el caldo de cultivo.

La Figura 4 muestra la habilidad endógena de las levaduras para convertir la L-galactosa en ácido ascórbico. *S. cerevisiae* no transformados (GRF18U y W3031B), *Z. bailii* ATCC 60483 y *K. lactis* PM6-A fueron cultivados en medio mineral (glucosa al 2%, YNB al 0.67%) empezando con una OD⁶⁶⁰ de 0.05 durante toda la noche. Luego, se añadió 250 mg l⁻¹ de L-galactosa y los cultivos se mantuvieron bajo condiciones estándar otras 24 horas antes de la determinación del ácido ascórbico. Todas las cepas acumularon ácido ascórbico intracelularmente mientras que el ácido ascórbico fue indetectable en el caldo de cultivo excepto para *Z. bailii*, que acumuló una pequeña cantidad. (Se cree que el alto fondo de partículas en *K. lactis* se debe al ácido eritroascórbico, presente de manera natural en esta especie de levadura a concentraciones más altas que en *S. cerevisiae*).

La Figura 5 muestra la conversión de L-galactono-1,4-lactona a ácido ascórbico por levaduras recombinantes de GRF18U de *S. cerevisiae* salvaje (control), o transformadas con una región codificante para AGD o ALO, respectivamente, se cultivaron en medio vegetal (glucosa al 2%, YNB al 0.67%) empezando a partir de una OD⁶⁶⁰ de 0.05 en presencia de L-galactono-1,4-lactona (Gal) 50 mM durante 72 horas. Mientras que las células control no acumularon ácido ascórbico en el medio de cultivo, las células transformadas con la región codificante para AGD o ALO inesperadamente acumularon cantidades considerables (es decir por encima de los niveles de ruido de fondo) de ácido ascórbico en el medio de cultivo. No se detectó ácido ascórbico en cultivos sin la adición de L-galactono-1,4-lactona (marcada -).

La Figura 6 muestra la conversión de L-galactosa en ácido ascórbico por levaduras recombinantes de GRF18U de *S. cerevisiae* salvajes (control), transformadas con la región que codifica para LGDH; AGD; ALO; AGD y LGDH; ALO y LGDH; o ARA y ALO, respectivamente, fueron cultivadas en medio mineral (glucosa al 2%, YNB al 0.67%) empezando a partir de una OD⁶⁶⁰ de 0.05 durante toda la noche. Luego se añadieron 250 mg l⁻¹ de L-galactosa y

ES 2 285 327 T3

los cultivos se mantuvieron bajo condiciones estándar durante otras 24 horas antes de la determinación del ácido ascórbico. Las células control o las células transformadas con sólo una región codificante que codifica LGDH no acumularon ácido ascórbico en el medio de cultivo. Las células transformadas con regiones codificantes que codifican LGDH y cualquiera de las AGD o ALO, así como las células transformadas con regiones codificantes que codifican ARA y ALO, acumularon cantidades considerables (es decir superiores a los niveles del fondo de partículas) de ácido ascórbico en el medio.

La Figura 7 muestra la conversión de L-galactosa a ácido ascórbico en un cultivo de elevada densidad celular de levadura recombinante de GRF18U de *S. cerevisiae* salvaje (control) o GRF18U transformada con una región codificante que codifica ALO, o regiones codificantes que codifican LGDH y ALO, respectivamente, creciendo en un medio mineral (glucosa al 2%, YNB al 0.67%) empezando a partir de una DO^{660} de 0.05 toda la noche. A tiempo 0, las células se concentraron 10 veces y se añadieron 250 mg l^{-1} de L-galactosa al cultivo, se mantuvo bajo condiciones estándar durante 6 días. A los tiempos indicados, se tomaron las concentraciones de ácido ascórbico en el medio de cultivo de las muestras. Mientras que las células control no acumularon ácido ascórbico en el medio de cultivo, las células transformadas con una región codificante que codifica ALO sola o con regiones codificantes que codifican ALO y LGDH acumularon cantidades considerables (es decir superiores a los niveles del fondo de partículas) de ácido ascórbico en el medio.

La Figura 8 muestra la conversión de L-galactosa a ácido ascórbico con la levadura recombinante de ATCC 36947 de *Z. bailii* (control), *Z. bailii* transformada con un vector vacío (pZ3); una región codificante que codifica LGDH; una región codificante que codifica ALO; o regiones codificantes que codifican ALO y LGDH; respectivamente, se hicieron crecer en un medio mineral (glucosa al 2%, YNB al 0.67%) empezando a partir de una DO^{660} de 0.05 toda la noche en presencia de antibióticos selectivos apropiados (G418 para pZ3, higromicina para pAG26TPI, o ambos). Después se añadieron a los cultivos 250 mg l^{-1} de L-galactosa y se llevaron bajo condiciones estándar durante otras 24 horas antes de la determinación del ácido ascórbico. Las células salvajes de ATCC 36947 de *Z. bailii* acumularon menores cantidades de ácido ascórbico en el medio después de la incubación con L-galactosa. Las células transformadas con el vector vacío o el vector comprendiendo la región codificante que codifica LGDH no acumularon ácido ascórbico en el medio de cultivo. Las células transformadas con sólo la región codificante que codifica ALO, o con regiones codificantes que codifican LGDH y ALO acumularon cantidades considerables (es decir mayores que los niveles del fondo de partículas) de ácido ascórbico en el medio. La expresión de la resistencia a antibiótico usada para la selección del plásmido o los antibióticos usados para esta selección pueden interferir con la acumulación o la determinación de ácido ascórbico en los cultivos. Esto correlaciona con los datos, en el hecho que las células que expresan ALO sin expresar resistencia a higromicina sin higromicina en el medio, acumulan más ácido ascórbico que las células que expresan ALO así como resistencia a higromicina, las cuales crecieron en un medio que contenía higromicina.

La Figura 9 muestra la conversión de ácido L-gulónico y L-gulono-1,4-lactona a ácido ascórbico con las GRF18U recombinantes de *S. cerevisiae*. Las células GRF18U se transformaron con un plásmido vacío (pL, control); plásmidos pL-RGLO; plásmidos pL y pH-AL; o plásmidos pL-RGLO (RGLO es una forma aislada de GLO de *R. norvegicus*) y pH-AL, respectivamente. La levadura recombinante se creció en un medio mínimo (glucosa al 2%, YNB al 0.67%) empezando por una DO^{660} de 0.05 toda la noche. Luego se añadieron de ácido L-gulónico o L-gulono-1,4-lactona 66 mM. Después de 48 horas, las células se retiraron y se determinó la concentración intracelular de ácido ascórbico. El ácido ascórbico no se determinó en el sobrenadante (no mostrado). Las células transformadas con la región codificante que codifica AL acumularon ácido ascórbico con unos niveles más altos que los del fondo de partículas con ácido L-gulónico presente como sustrato. Las células transformadas con RGLO sólo acumularon unas tres veces la cantidad de ácido ascórbico observadas en el control (por ejemplo, GRF18U/pL) con L-gulono-1,4-lactona presente como sustrato.

La Figura 10 muestra la conversión intracelular de L-gulono-1,4-lactona (por ejemplo, gul) a ácido ascórbico en el cultivo de *Z. bailii*. Recombinante, ATCC de 36947 *Z. bailii* y ATCC 60483 de *Z. bailii* se transformaron con ambos plásmidos, el plásmido de expresión vacío pZ3 de *Z. bailii* o con pZ3-RGLO (RGLO es GLO aislado de *R. norvegicus*). La levadura se creció en un medio mineral (glucosa al 2%, YNB al 0.67%) a partir de una DO^{660} de 0.05 toda la noche en presencia de G418. Luego se añadieron de ácido L-gulónico-1,4-lactona 100 mM y el cultivo se mantuvo a condiciones estándar otras 48 horas antes de la determinación de ácido ascórbico. Ambas cepas de *Z. bailii* que expresan RGLO produjeron niveles intracelulares relativamente altos de ácido ascórbico en presencia de L-gulono-1,4-lactona.

Descripción de los ejemplos de realización ilustrativos

El medio en el cual la levadura se cultiva puede ser cualquier medio conocido en el campo que sea útil para este propósito. Las técnicas de cultivo y el medio se conocen bien en el campo. Normalmente, pero no de forma limitada, el cultivo se realiza mediante una fermentación acuosa en un recipiente apropiado. Los ejemplos de recipientes típicos para la fermentación de levadura incluyen un frasco agitado o un bioreactor.

El medio comprende cualquier compuesto que se necesite para el crecimiento de las levaduras y uno o más precursores para la producción de ácido ascórbico. Los componentes para el crecimiento de la levadura y los precursores para la producción del ácido ascórbico pueden o no ser idénticos.

ES 2 285 327 T3

El medio comprende una fuente de carbono, como la glucosa u otros carbohidratos (como la sacarosa, la fructosa, la arabinosa, la lactosa, la galactosa, la maltosa, la rafinosa, etanol, metanol glicerol, o hidrolizados de materia vegetal, entre otros). Normalmente, el medio también comprende una fuente de nitrógeno, ya sea orgánica o inorgánica, y el medio debe también comprender componentes como aminoácidos; purinas; pirimidinas; licor de maíz empapado; extracto de levadura; hidrolizados de proteína; vitaminas solubles en agua, como las vitaminas del complejo B; o sales inorgánicas como cloruros, hidroccloruros, fosfatos, o sulfatos de Ca, Mg, Na, K, Fe, Ni, Co, Cu, Mn, Mo, o Zn, entre otros. También se pueden utilizar componentes adicionales conocidos por aquellos especialistas que puedan ser útiles en el campo del cultivo de la levadura o la fermentación. El medio se puede tamponar o no.

El medio también comprende un precursor de ácido ascórbico. El precursor de ácido ascórbico es cualquier compuesto que, en la levadura, se puede convertir, ya sea de forma directa o a través de pasos intermedios, a L-ácido ascórbico. Los precursores de ácido ascórbico se pueden seleccionar del grupo que consiste en monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, alcoholes de C₁-C₆, polioles de C₂-C₆, ácidos orgánicos incluyendo aminoácidos y ácidos grasos, y lactonas de C₅-C₆. Los sacáridos y los ácidos orgánicos pueden incluir sacáridos y ácidos orgánicos que se hayan fosforilados y/o modificado con UDP o GDP. Preferentemente el precursor del ácido ascórbico se selecciona del grupo que consiste en trealosa; xilosa; xilulosa; rafinosa; etanol; maltosa; glicerol; fructosa; arabinosa; D-glucosa-6-P; D-glucosa-1-P; UDP-D-glucosa; UDP-ácido glucurónico; D-ácido glucurónico-1-P; D-ácido glucurónico; D-glucuronolactona; L-ácido gulónico; D-fructosa-6-P; D-manosa-6-P; D-manosa-1-P; GDP-D-manosa; GDP-L-galactosa; L-galactosa-1-P; lactosa; sucrosa; almidón; celulosa; citrato; metanol; formaldehído; formato; metilamina; alanina; ácido oleico; L-galactono-1,4-lactona; D-glucosa; L-gulonono-1,4-lactona; L-galactosa; y L-ácido gulónico, entre otros. Es más preferible que el precursor de ácido ascórbico se seleccione de entre L-galactono-1,4-lactona; D-glucosa; L-gulonono-1,4-lactona; L-galactosa; y L-ácido gulónico. Dos o más precursores de ácido ascórbico también se pueden utilizar. Además, en ciertas realizaciones, como precursor del ácido ascórbico también puede ser útil una fuente de carbono para cultivar la levadura.

Durante el curso de la fermentación, la levadura convierte el precursor del ácido ascórbico a L-ácido ascórbico con uno o más pasos. Un medio preferido que comprenda glucosa, YNB (Base de nitrógeno de Levadura), y al menos uno de L-ácido gulónico; L-galactono-1,4-lactona; L-gulonono-1,4-lactona; o L-galactosa.

Después que el cultivo haya progresado durante un tiempo suficiente para producir la concentración deseada de L-ácido ascórbico en el medio de cultivo, se aísla el L-ácido ascórbico. "Aislamiento", se utiliza aquí refiriéndose al ácido ascórbico, significa llevar el cultivo a un estado de mayor pureza mediante la separación del ácido ascórbico de otros componentes de la levadura o del medio que no sean ácido ascórbico. Se prefiere el aislamiento del ácido ascórbico como mínimo a un 95% de pureza, y más preferible a un 99% de pureza.

Para aislar el L-ácido ascórbico de la levadura, el primer paso del aislamiento, después que la levadura se haya separado del medio, normalmente es mediante la lisis de la levadura con tratamientos químicos o enzimáticos, con cuentas de vidrio, sonicación, ciclos de congelación/descongelación, u otras técnicas conocidas. El L-ácido ascórbico puede ser purificado de entre membranas, proteínas, ácidos nucleicos y otras fracciones de la levadura lisada con técnicas apropiadas, como la centrifugación, la filtración, la microfiltración, la ultrafiltración, la nanofiltración, la extracción líquido-líquido, la cristalización, los tratamientos enzimáticos con nucleasas o proteasas, o la cromatografía, entre otros.

Para aislar el L-ácido ascórbico acumulado en el medio, el aislamiento comprende purificar el ácido ascórbico del medio. La purificación puede ser realizada con técnicas conocidas, como el uso de resinas de intercambio iónico, carbón activado, microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, extracción líquido-líquido, cristalización, o cromatografía, entre otros.

El L-ácido ascórbico se puede aislar de la levadura y del medio.

La levadura acumula L-ácido ascórbico en el medio durante la etapa de cultivo, y preferentemente la concentración de L-ácido ascórbico se estabilizará o se le permitirá incrementar. Es más preferible que el L-ácido ascórbico en el medio se estabilice con la presencia de levaduras variables.

En una realización, la presente invención relata un método para generar ácido ascórbico, comprendiendo (i) el cultivo de la levadura recombinante en un medio que comprenda como mínimo un precursor de ácido ascórbico, que en consecuencia forme ácido ascórbico, y (ii) el aislamiento del ácido ascórbico.

Una levadura "recombinante" es una levadura que contiene una secuencia de ácido nucleico no natural de la levadura o una o varias copias adicionales de una secuencia endógena de ácido nucleico, esta secuencia de ácido nucleico se introduce dentro la levadura o de una célula ancestral mediante la acción del hombre. Las técnicas de ADN recombinantes conocen bien, como en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, que aporta más información respecto a varias técnicas conocidas en el campo y que se discuten aquí. En esta realización, una región codificante de un gen homólogo y/o heterólogo se aísla de un organismo, el cual posee el gen. El organismo puede ser una bacteria, un procariota, un eucariota, un microorganismo, un hongo, una planta o un animal.

ES 2 285 327 T3

El material genético que comprende la región codificante se puede extraer de células del organismo con cualquier técnica conocida. A partir de entonces, la región codificante se puede aislar con cualquier técnica apropiada. En una técnica conocida, la región codificante se aísla con, primero, la preparación de una librería genómica de ADN o una librería de cADN, y segundo, la identificación de la región codificante en la librería de ADN o la librería de cADN, como con la prueba de la librería con nucleótidos etiquetados, seleccionada por ser o presumir de ser como mínimo parcialmente homóloga con la región codificante, determinando dónde la región codificante imparte un fenotipo detectable a un microorganismo de librería que incluye la región codificante, o amplificando la secuencia deseada con PCR. Otras técnicas conocidas para el aislamiento de la región codificante también de pueden utilizar.

Las levaduras se describen en N. J. W. Kreger-van Rij, "Las Levaduras" Vol. 1 de Biology of Yeasts, Ch. 2, A. H. Rose and J. S. Harrison, Eds. Academic Press, London, 1987. Las levaduras recombinantes utilizadas de acuerdo con la invención son *S. cerevisiae* y *Z. bailii*. Preferiblemente se trata de la levadura de la cepa GRF18U o W3031B de *S. cerevisiae* o ATCC 60483 de *Z. bailii* o ATCC 36947 de *Z. bailii*.

Preferentemente, una levadura recombinante de la presente invención no es capaz de producir L-ácido ascórbico a partir del ácido 2-ceto-L-gulónico.

Preferentemente, la levadura recombinante comprende como mínimo una región codificante que codifica una enzima, con lo cual la levadura recombinante, que ha sido funcionalmente transformada, es capaz de convertir un precursor de ácido ascórbico a ascorbato en uno o más pasos.

El medio en el cual la levadura recombinante es cultivada puede ser cualquier medio conocido en el campo que sea adecuado para este propósito. Las técnicas de cultivo y el medio son bien conocidas en el campo. Normalmente, pero sin limitarlo, el cultivo tiene lugar mediante una fermentación acuosa en un recipiente apropiado. Ejemplos típicos de recipientes para la fermentación de la levadura comprenden frascos agitados o un bioreactor.

El medio comprende cualquier compuesto requerido para el crecimiento de la levadura y uno o más precursores para la producción de ácido ascórbico. Los componentes para el crecimiento de la levadura y los precursores para la producción de ácido ascórbico pueden o no ser idénticos, y los componentes adecuados del medio y los precursores de ácido ascórbico han sido descritos anteriormente. Durante el curso de la fermentación, el precursor del ácido ascórbico se internaliza por la levadura recombinante y se convierte, mediante uno o más pasos, a L-ácido ascórbico. El L-ácido ascórbico producido por la levadura recombinante puede ser contenido dentro de la levadura, o puede ser acumulado en el medio en unos niveles similares a los del fondo de partículas.

Después que el cultivo haya progresado un tiempo suficiente para producir la concentración deseada de L-ácido ascórbico en el medio de cultivo, se aísla el L-ácido ascórbico, como se describe arriba. El L-ácido ascórbico puede ser aislado de la levadura y del medio. Como se explica arriba, preferentemente la concentración de L-ácido ascórbico se estabiliza o se le permite que incremente. Todavía es más preferible que el L-ácido ascórbico en el medio se estabilice con la presencia de una levadura viable.

En el método de la presente invención, una región codificante introducida dentro de una levadura recombinante codifica como mínimo un primer enzima D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO). En una realización preferida, la región codificante de D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO) se aísla de *S. cerevisiae*. Debe notarse que el término "aislado", como se usa aquí en referencia a una secuencia de ácido nucleico, hace referencia a la última fuente, no a la fuente inmediata, de la región codificante. Así, una región codificante "se aísla" de un organismo si este codifica una secuencia de una proteína sustancialmente idéntica a la misma proteína purificada de las células del organismo.

En ciertas realizaciones, la levadura recombinante es capaz de convertir como mínimo un 25% en el medio en el que se cultiva la levadura a ácido ascórbico. Más preferiblemente, la levadura recombinante cultivada es capaz de convertir como mínimo un 35% de al menos un precursor de ácido ascórbico del medio de cultivo a ácido ascórbico, y es más preferible que la levadura sea capaz de convertir como mínimo un 40% del precursor de ácido ascórbico a ácido ascórbico.

Preferentemente el ácido ascórbico se acumula en el medio a la concentración final de como mínimo unos 20 mg de ácido ascórbico/l de medio de cultivo, es más preferible si la concentración final es como mínimo unos 40 mg de ácido ascórbico/l medio de cultivo, y es todavía más preferible si la concentración final es de unos 70 mg ácido ascórbico/l medio de cultivo.

En ciertas realizaciones, la levadura recombinante se transforma funcionalmente con una región codificante que codifica un segundo enzima más que un primer enzima, en el que el segundo enzima se selecciona del grupo que consiste en L-galactosa deshidrogenasa (LGDH), L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (AGD) y D-arabinono deshidrogenasa (ARA).

En una realización todavía más preferida, las regiones codificantes que codifican LGDH y AGD se han aislado de *A. thaliana*, y la región codificante que codifica ARA se ha aislado de *S. cerevisiae*.

En una realización preferida, la levadura se transforma funcionalmente con la región codificante que codifica una proteína que presenta actividad D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO) y se transforma más funcionalmente con una región codificante que codifica una proteína que presenta actividad L-galactosa deshidrogenasa (LGDH).

ES 2 285 327 T3

En otra realización aún más preferida, la levadura se transforma funcionalmente con la región codificante que codifica una proteína que tiene actividad D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO) y la región codificante que codifica una proteína que presenta actividad D-arabinono deshidrogenasa (ARA).

5 En una realización más preferida, la levadura recombinante además comprende como mínimo una región codificante que codifica una enzima asociada con la conversión de una fuente de carbono a L-galactosa. La enzima es preferentemente seleccionada del grupo que consiste en hexoquinasas, glucosa-6-fosfato isomerasa, manosa-6-fosfato isomerasa, fosfomanomutasa, manosa-1-fosfato guanililtransferasa, GDP-mansosa-3,5-epimerasa, GDP-L-galactosa hidrolasa, y L-galactosa fosfato fosfatasa.

10 En una realización más preferida, la levadura recombinante además comprende como mínimo una región codificante que codifica una enzima asociada con la conversión de una fuente de carbono a ácido L-gulónico. El enzima se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en hexoquinasa, fosfoglucomutasa, UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, UDP-D-glucosa deshidrogenasa, glucuronato-1-fosfato uridililtransferasa, D-glucurono quinasa y D-glucuronato reductasa.

15 En otra realización preferida, la levadura recombinante además comprende como mínimo una región codificante que codifica una enzima asociada con la conversión de una fuente de carbono a L-gulono-1,4-lactona. La enzima es preferentemente seleccionada del grupo que consiste en hexol ADNsa, fosfoglucomutasa, UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, UDP-D-glucosa deshidrogenasa, glucuronato-1-fosfato uridililtransferasa, D-glucurono quinasa, uronolactonasa, D-glucuronato reductasa y glucurono lactona reductasa.

20 En otra realización más preferida, la secuencia de aminoácidos del enzima LGDH o una proteína que tiene actividad LGDH tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de similitud con SEQ ID NO:11; la secuencia de aminoácidos del enzima AGD o una proteína que tenga actividad AGD tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de similitud con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:3; la secuencia de aminoácidos del enzima ARA o una proteína que tenga actividad ARA tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de similitud con la SEQ ID NO:20; la secuencia de aminoácidos del enzima ALO o una proteína que tenga actividad ALO tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de similitud con la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:7; donde la “similitud” se determina con un alineamiento de secuencia realizado con el programa CLUSTAL.

25 En otra realización más preferida, la secuencia de aminoácidos del enzima LGDH o una proteína que tenga actividad LGDH tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de identidad con la SEQ ID NO:11; la secuencia de aminoácidos del enzima AGD o una proteína que tenga actividad AGD tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de identidad con la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:3; la secuencia de aminoácidos del enzima ARA o una proteína que tenga actividad ARA tiene como mínimo un 70%, más preferiblemente un 80%, y más preferiblemente un 90% de identidad con la SEQ ID NO:20; la secuencia de aminoácidos del enzima ALO o una proteína que tenga actividad ALO tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de identidad con la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:7; donde la “identidad” se determina mediante el alineamiento de secuencia realizado con el programa CLUSTAL.

30 En otra realización más preferida, la región codificante que codifica el enzima LGDH o una proteína con actividad LGDH tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de identidad con la SEQ ID NO 12; la región codificante que codifica la enzima AGD o una proteína con actividad AGD tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de identidad con la SEQ ID NO 2 o los nucleótidos entre el 56 al 1858 de la SEQ ID NO 4; la región codificante codificando el enzima ARA o una proteína con actividad ARA tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de identidad con los nucleótidos entre el 285 al 1319 de la SEQ ID NO 21; la región codificante codificando el enzima ALO o una proteína con actividad ALO tiene como mínimo un 70%, más preferible un 80%, y más preferible un 90% de identidad con la SEQ ID NO 6 o los nucleótidos entre el 4 al 1584 de la SEQ ID NO 8; donde la “identidad” se determina con un alineamiento de secuencia realizado con el programa CLUSTAL.

35 La presente invención también relata los polipéptidos que se codifican con secuencias de ácidos nucleicos que son capaces de hibridar bajo condiciones estándar con un oligonucleótido prueba que hibrida bajo las mismas condiciones con la secuencia de ácidos nucleicos explicados en la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:2, nucleótidos del 56 al 1858 de la SEQ ID NO:4, nucleótidos del 285 al 1319 de la SEQ ID NO:21, la SEQ ID NO:6, y nucleótidos del 4 al 1584 de la SEQ ID NO:8, así como la cadena complementaria de la misma o una subsecuencia de la misma (J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York). El oligonucleótido prueba puede consistir en la región codificante en si misma o en una subsecuencia de la misma. La hibridación indica que existe una secuencia análoga de ácidos nucleicos, en ambas la secuencia de nucleótidos aportada se muestra en la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:2, los nucleótidos del 56 al 1858 de la SEQ ID NO:4, nucleótidos del 285 al 1319 de la SEQ ID NO:21, la SEQ ID NO:6, y los nucleótidos del 4 al 1584 de la SEQ ID NO:8, o una subsecuencia de la misma.

40 Así, en otra realización preferida, la levadura recombinante se transforma funcionalmente con una región codificante que se selecciona de una región codificante que codifica una proteína que tiene actividad LGDH que hibrida con una cadena complementaria al polinucleótido descrito en la SEQ ID NO:12; una región codificante que codifica una

ES 2 285 327 T3

5 proteína con actividad AGD que hibrida con la cadena complementaria del polinucleótido descrito en la SEQ ID NO:2 o los nucleótidos del 56 al 1858 de la SEQ ID NO:4; una región codificante que codifica una proteína con actividad ARA que hibrida con la cadena complementaria del polinucleótido descrito en los nucleótidos del 285 al 1319 de la SEQ ID NO:21; y una región codificante que codifica una proteína con actividad ALO que hibrida con la cadena
10 complementaria del polinucleótido descrito en la SEQ ID NO:6 o los nucleótidos del 4 al 1584 de la SEQ ID NO:8; donde la región codificante hibrida con la cadena complementaria del polinucleótido bajo condiciones astringentes de hibridación. Las condiciones astringentes de hibridación pueden ser del medio o de elevada astringencia. Bajo condiciones astringentes del medio, por ejemplo, ocurre prehibridación y hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0.3%, ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizada a 200 µg/ml, y formamida al 35%, seguido de unos procesos
15 de transferencia estándar de Southern. Bajo condiciones de alta astringencia, por ejemplo, ocurre prehibridación y hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0.3%, ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizada a 200 µg/ml, y formamida al 50%.

15 Las secuencias de ácido nucleico descritas en la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:2, los nucleótidos del 56 al 1858 de la SEQ ID NO:4, los nucleótidos del 285 al 1319 de la SEQ ID NI:21, la SEQ ID NO:6, y los nucleótidos del 4 al 1584 de la SEQ ID NO:8, o una subsecuencia de la misma se pueden utilizar para identificar y clonar ADN que codifica proteínas homologas de otras cepas de diferentes géneros o especies que se pueden utilizar para producir ácido ascórbico de acuerdo con los métodos bien conocidos en el campo. Así, una librería genómica o de ADNc preparada de otros organismos se puede investigar para ADN que hibrida con las SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:2, nucleótidos del
20 56 al 1858 de la SEQ ID NO:4, nucleótidos del 285 al 1319 de la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO:6, y los nucleótidos de la 4 al 1584 de la SEQ ID NO:8, o las subsecuencias de las mismas.

25 El ADN genómico u otro de otros organismos se puede separar con una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de librerías o el ADN aislado se puede transferir para inmovilizarlo en nitrocelulosa u otro material transportador conveniente. Para la identificación de clones o ADN que sea homólogo con la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:2, los nucleótidos del 56 al 1858 de la SEQ ID NO:4, los nucleótidos del 285 al 1319 de la SEQ ID NO:21, la SEQ ID NO:6, y los nucleótidos del 4 al 1584 de la SEQ ID NO:8, o subsecuencias de las mismas, el ADN inmovilizado se hibrida con una prueba que hibrida con una de esas secuencias. Seguidamente a la hibridación, se lava el material transportador. Por ejemplo, un Southern blot que ha tenido una prueba hibridando
30 con un ADN inmovilizado sobre él, con un lavado en tres periodos de 30 minutos cada uno utilizando 0.2XSSC, SDS al 0.1% a 40°C, más preferiblemente no superior a 45°C, más preferiblemente no superior a 50°C, más preferiblemente no superior a 55°C, aún más preferiblemente no superior a 60°C, especialmente no superior a 65°C. Las moléculas con las que hibrida la prueba bajo estas condiciones se detectan utilizando métodos conocidos en el campo. Estas moléculas se pueden clonar y se pueden transformar funcionalmente para determinar que presentan la actividad enzimática deseada, y para determinar la secuencia de nucleótidos de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:12, la SEQ ID
35 NO:2, los nucleótidos del 56 al 1858 de la SEQ ID NO:4, los nucleótidos del 285 al 1319 de la SEQ ID NO:21, la SEQ ID NO:6, y los nucleótidos del 4 al 1584 de la SEQ ID NO:8.

40 En otra realización preferida, las levaduras recombinantes se transforman funcionalmente con una región codificante que se selecciona de una región codificante que codifica una proteína que presenta actividad LGDH y propiedades inmunológicas de una enzima que presenta la SEQ. ID 11; las enzimas que presentan actividad AGD y propiedades inmunológicas de un enzima que presenta la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:3; las enzimas que presentan actividad ARA y propiedades inmunológicas de una enzima que presenta la SEQ ID NO:20; y enzimas que presentan actividad ALO y propiedades inmunológicas de un enzima que presenta la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:7.

45 Así, la presente invención también relata un polipéptidos que presenta (1) actividad LGDH, AGD, ARA o ALO e (2) identidad inmunoquímica o identidad inmunoquímica parcial a los polipéptidos que presentan las secuencias aminoácidas (a) SEQ. ID 11, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7 y (b) actividad enzimática similar. Un polipéptido que presenta propiedades inmunológicas de una enzima que presenta una SEQ ID particular significa que un antisuero que contiene anticuerpos contra los antígenos del polipéptido nativo que presenta el número de SEQ ID particular reacciona con los antígenos de la otra proteína que presenta una actividad enzimática similar pero una secuencia aminoácida diferente de una forma idéntica como la fusión total de los precipitados, la morfología de precipitado idéntica, y/o la movilidad electroforética idéntica utilizando una técnica inmunoquímica específica. Una explicación adicional de la identidad inmunoquímica se describe por Axelsen,
50 Bock, and Kroll, en N. H. Axelsen, J. Kroll, y B. Weeks, editores, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 10.

55 La identidad inmunoquímica parcial significa que un antisuero que contiene anticuerpos contra los antígenos del enzima nativo (por ejemplo, las enzimas que presentan secuencias aminoácidas de SEQ. ID 11, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:7) reacciona con los antígenos de un polipéptido que presenta actividad enzimática similar al enzima nativo en una forma idéntica parcialmente como la fusión parcial de los precipitados, la morfología del precipitado idéntico, y/o la movilidad electroforética idéntica parcial utilizando una técnica inmunoquímica específica. Una mayor explicación de la identidad parcial de la inmunoquímica se describe por Bock and Axelsen, en N. H. Axelsen, J. Kroll, y B. Weeks, editores, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis,
60 Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 11.

Las propiedades inmunológicas se determinan mediante pruebas de identidad de reacción cruzada inmunológicas mediante el procedimiento de inmunodifusión doble Ouchterlon bien conocido. De forma específica, un antisuero

contra el polipéptido de la invención se consigue mediante conejos que inmunizan (o los roedores de acuerdo con el procedimiento descrito por Harboe and Ingild, en N. H. Axelsen, J. Kroll, and B. Weeks, editores, A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 23, o Johnstone and Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (de forma más específica las páginas 27-31)).

5 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con los métodos de E. Harlow and D. Lane, editores, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York. Las inmunoglobulinas purificadas se pueden obtener del antisuero, por ejemplo, mediante precipitación de sulfato de amonio, seguido por diálisis y cromatografía de intercambio (por ejemplo, DEAE-Sephadex). Los polipéptidos homólogos y los polipéptidos que presentan propiedades inmunológicas idénticas o parcialmente idénticas se pueden

10 obtener de los microorganismos de cualquier género, preferiblemente de una fuente de planta, un animal o un hongo.

En otra realización preferida, en la que un segundo enzima ARA se codifica, el enzima ARA comprende el motivo I y el motivo II de la superfamilia de la aldo-ceto reductasa (AKR), específicamente las secuencias de aminoácidos GXXXXXAXXXXXXG (SEQ ID NO:13) y GXXN (SEQ ID NO:26), respectivamente (Kim S.T. y otros 1998, BBA, 1429, 29-39).

15

Preferiblemente, una región codificante que codifica un enzima deseado se incorpora a la levadura de tal forma que la enzima deseada se produce en la levadura y es sustancialmente funcional. Esta levadura se ha referido aquí como que ha sido “transformada funcionalmente.”

20

Una vez se ha aislado la región codificante, se puede preparar para la transformación y la expresión en la levadura útil de la presente invención. Como mínimo, esto implica la inserción de la región codificante a un vector y la unión operable a un promotor que se encuentra sobre el vector y que es activo en el organismo objetivo (es decir, en la presente invención, una levadura). Se puede utilizar cualquier vector (integrativo, cromosomal o episomal).

25

Se puede utilizar cualquier promotor activo en el organismo huésped (homólogo o heterólogo, constitutivo, inducible o reprimible). Esta inserción a menudo implica el uso de endonucleasas de restricción para “abrir” el vector en un punto deseado donde es posible la unión operable al promotor, seguido por la ligación de la región codificante en el punto deseado. Si se desea, antes de la inserción al vector, se puede preparar la región codificante para su uso en el organismo objetivo. Esto puede implicar alterar los codones utilizados en la región codificante a una mayor correspondencia del uso del codón en el organismo objetivo; el cambio de las secuencias en la región codificante que puede perjudicar la transcripción o la traducción de la región codificante o la estabilidad del transcrito de mRNA de la región codificante; o la adición o la eliminación de porciones que codifican el péptido señal (regiones de la proteína codificadas por la región codificante que dirige la proteína a localizaciones específicas (por ejemplo un orgánulo, la membrana de una célula o de un orgánulo, o la secreción extracelular)), entre otras posibles preparaciones conocidas en el campo.

30

35

En una realización de la presente invención, la proteína L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (AGD) como segundo enzima, comprende un péptido señal y la región codificante que codifica la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa también codifica el péptido señal. En otra realización de la presente invención, la proteína L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (AGD) como segundo enzima, no comprende un péptido señal y la región codificante que codifica L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa tampoco no codifica el péptido señal. De forma específica, la secuencia AGD que se da en la SEQ ID NO:1 comprende un péptido señal de 1-100 aminoácidos, y la secuencia AGD que se da en la SEQ ID NO:2 comprende un péptido señal de 1-90 aminoácidos. Tal y como aquellos especialistas en el campo reconocerán, la eliminación de una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal de una secuencia más larga de ácidos nucleicos que codifican una enzima deseada puede requerir la adición de codones ATG en la pauta para permitir la iniciación correcta de la traducción del enzima deseado.

40

45

Independientemente que se modifique la región codificante, cuando la región codificante se inserta a un vector, se une de forma operable a un promotor activo en la levadura. Un promotor, tal y como se conoce, es una secuencia de ADN que puede dirigir la transcripción de una región codificante cercana. Tal y como ya se ha descrito, el promotor puede ser constitutivo, inducible o reprimible. Los promotores inducibles se pueden inducir mediante la adición al medio de un inductor de molécula apropiado o mediante un cambio apropiado de un entorno de crecimiento químico o físico (como la temperatura, los valores de pH), que se determinará mediante la identidad del promotor. Los promotores reprimibles se pueden reprimir mediante la adición al medio de una molécula represora adecuada o mediante un cambio apropiado de entorno de crecimiento químico o físico (como la temperatura, los valores de pH), que se determinarán mediante la identidad del promotor. Se prefieren los promotores constitutivos, ya que el uso de una molécula inductora o represora o un cambio en el entorno de crecimiento químico o físico no se requiere. Un promotor constitutivo preferido en el promotor *S. cerevisiae* de triosefosfatoisomerasa (TPI).

50

55

60

El vector que comprende la región codificante unido de forma operable al promotor puede ser un plásmido, un cósmido, o un cromosoma artificial de levadura, entre otros que se conocen en el campo por ser apropiados para su uso en el género de la levadura. Además de la región codificante unida de forma operable al promotor, el vector también puede comprender otros elementos genéticos. Por ejemplo, si el vector no se espera que se integre al genoma de la levadura, el vector de forma deseable comprende un origen de replicación, que permite que el vector se pase a células descendientes de una levadura que comprende el vector. Si se desea la integración del vector al genoma de la levadura, el vector puede comprender secuencias homólogas a las secuencias que se encuentran en el genoma de la levadura, y también pueden comprender regiones codificantes que pueden facilitar la integración. Para determinar qué células de

65

ES 2 285 327 T3

levadura se transforman, el vector preferiblemente comprende un marcador que se selecciona que imparte un fenotipo a la levadura que la distinga de la levadura no transformada, por ejemplo sobrevivir en un medio que comprende un antibiótico fatal a la levadura no transformada o metabolizar un componente del medio a un producto que la levadura no transformada no metaboliza, entre otros fenotipos. Además, el vector puede comprender otros elementos genéticos, como sitios de endonucleasas de restricción y otros que normalmente se encuentran en vectores.

Después que se haya preparado el vector, con la región codificante unida de forma operable al promotor, se transforman la levadura con el vector (es decir se introduce el vector a al menos una de las células de una población de levadura). Las técnicas para la transformación de levadura están bien establecidas, e incluyen electroporación, bombardeo de microproyectiles, y el método LiAc/ss ADN/PEG, entre otros. Las células de levadura, que se transforman, después se pueden detectar mediante el uso de marcador que se selecciona sobre el vector. Se debe remarcar que la frase “levadura transformada” tiene en esencia el mismo significado que “levadura recombinante”, tal y como se ha definido anteriormente. La levadura transformada puede ser una que haya recibido el vector en una técnica de transformación, o puede ser un descendiente de esta levadura.

Ciertas realizaciones se dirigen a una levadura recombinante que se transforma funcionalmente con una región codificante que codifica una proteína que presenta una actividad ALO, y opcionalmente, además, una región codificante que codifica la L-galactosa deshidrogenasa (LGDH), L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (AGD), o D-arabinono deshidrogenasa (ARA), tal y como se he descrito anteriormente.

Después de que se haya obtenido la levadura recombinante, la levadura se cultiva en un medio. El medio se ha descrito anteriormente.

Un medio preferido comprende glucosa, YNB y L-galactosa. Una levadura transformada preferida en particular que se puede cultivar en este medio es una cepa de *S. cerevisiae* (preferiblemente GRF18U) o una cepa de *Z. bailii* (preferiblemente ATCC 36947) que comprende (i) un promotor TPI unido de forma operable a una región codificante que codifica D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO) de *S. cerevisiae* y (ii) un promotor TPI unido de forma operable a una región codificante que codifica L-galactosa deshidrogenasa (LGDH) de *A. thaliana*. Una segunda levadura transformada preferida en particular que se puede cultivar en este medio es una cepa de *S. cerevisiae* (preferiblemente GRF18U) o una cepa de *Z. bailii* (preferiblemente ATCC 36947) que comprende (i) un promotor TPI unido de forma operable a una región codificante que codifica D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO) de *S. cerevisiae* y (ii) un promotor TPI unido de forma operable a una región codificante que codifica D-arabinono deshidrogenasa (ARA) de *S. cerevisiae*.

Tal y como se ha descrito para la levadura no-recombinante, anteriormente, durante el curso de la fermentación, se convierte el precursor del ácido ascórbico, a través de uno o más pasos, a L-ácido ascórbico.

Mientras que las células de levaduras no recombinantes (descritas anteriormente) incubadas en un medio similar normalmente no acumulan ácido ascórbico por encima de niveles de fondo de partículas en el medio, sorprendentemente, las cepas recombinante descritas aquí son capaces de acumular cantidades considerables de L-ácido ascórbico por encima de niveles del fondo de partículas. Una levadura transformada con sólo LGDH no acumula L-ácido ascórbico por encima de los niveles del fondo de partículas. Una levadura transformadas con RGLO y/o AL no acumula L-ácido ascórbico por encima de los niveles del fondo de partículas. La levadura recombinante utilizada de acuerdo a la presente invención acumula L-ácido ascórbico en el medio por encima de niveles del fondo de partículas.

El aislamiento del ácido ascórbico del medio es tal y como se ha descrito anteriormente. Se han observado rendimientos de ácido ascórbico superiores a alrededor del 25% y del 35%, tal y como se describirá en los ejemplos de más adelante. Así pues, en una realización preferida adicional, la levadura recombinante produce ácido ascórbico con un mayor rendimiento que el 25% del precursor. El término “rendimiento” se refiere a la cantidad de ácido ascórbico (molar así como peso/volumen) producido dividido por la cantidad de precursor consumido (molar así como peso/volumen) multiplicado por 100.

Las siguientes definiciones se proporcionan para ayudar a aquellos especialistas en el campo a comprender los detalles de la descripción detallada de la presente invención. El término “acumulación de ácido ascórbico por encima del nivel del fondo de partículas” se refiere a la acumulación de un ácido ascórbico por encima de niveles no detectables tal y como se determina utilizando los procedimientos descritos aquí.

“Ácido ascórbico” así como “ascorbato” tal y como se utiliza aquí, se refiere a la vitamina C, a L-ácido ascórbico y a sus sales o sus iones.

“Precursor de ácido ascórbico” es un compuesto que se puede convertir mediante una levadura de la presente invención, directamente o a través de uno o más intermediarios, a L-ácido ascórbico o a una de sus sales.

“Amplificación” se refiere a aumentar el número de copias de una molécula de ácido nucleico deseada o aumentar la actividad de una enzima, de cualquier manera.

ES 2 285 327 T3

“Fuente de carbono” se refiere a un compuesto orgánico utilizado por la levadura en el cultivo como fuente de carbono para producir metabolismo celular de biomasa nueva.

“Codón” se refiere a una secuencia de tres nucleótidos que especifican un aminoácido particular.

“ADN ligasa” se refiere a una enzima que une de forma covalente dos piezas de DNA de doble cepa.

“Electroporación” se refiere a un método que introduce ADN ajeno a las células que utilizan una carga de DC corta, de alto voltaje para permeabilizar las células huéspedes, provocando que acepten ADN extra-cromosómico.

“Endonucleasa” se refiere a una enzima que hidroliza un ADN de doble cadena a localizaciones internas.

La enzima 1.1.3.37, D-arabinono-1,4-lactona oxidasa, se refiere a una proteína que cataliza la conversión de D-arabinono-1,4-lactona + O₂ a D-eritroascorbato + H₂O₂. El mismo enzima debido a la amplitud del rango de sustrato cataliza la conversión de L-galactono-1,4-lactona + O₂ a L-ácido ascórbico + H₂O₂. De forma errónea, el mismo enzima se refiere como L-galactono-1,4-lactona oxidasa (enzima 1.1.3.24) (véase Huh, W.K. *et al*, 1998, Mol. Microbiol. 30, 895-903) (Nishikimi, M., y col., 1978, Arch. Biochem. Biophys. 191, 479-486) (Bleeg, H.S. and Christensen, F., 1982, Eur. J. Biochem. 127, 391-96).

La enzima 1.3.2.3, L-galactono-1,4-lactona dehidrogenasa, se refiere a una proteína que cataliza la conversión de L-galactono-1,4-lactona + 2 ferricitocromo C a L-ácido ascórbico + 2 ferrocitocromo C.

La enzima 1.1.3.8, L-gulono-1,4-lactona oxidasa, se refiere a una proteína que cataliza la oxidación de L-gulono-1,4-lactona a L-xilo-hexulonolactona, que de forma espontánea isomeriza a L-ácido ascórbico.

Otros enzimas de interés, y sus números de clasificación, son tal y como se muestran a continuación:

Hexoquinasa	2.7.1.1
Glucosa-6-P isomerasa	5.3.1.9
Manosa-6-P isomerasa	5.3.1.8
Fosfomanomutasa	5.4.2.8
Manosa-1-P guanililtransferasa	2.7.7.22
GDP-Manosa 3,5-epimerasa	5.1.3.18
Azúcar fosfatasa	3.1.3.23
L-Galactosa-dehidrogenasa	*)
L-Galactono-1,4-lactona dehidrogenasa	1.3.2.3
D-Manosa quinasa	2.7.1.1
Fosfoglucomutasa	5.4.2.2
UTP-Glucosa-1-P uridilil transferasa	2.7.7.9
UDP-D-Glucosa dehidrogenasa	1.1.1.22
UDP-Glucuronato 4-epimerasa	5.1.3.6
Glucuronato-1-P uridililtransferasa	2.7.7.44
D-Glucuronoquinasa	2.7.1.43
D-Glucuronato reductasa	1.1.1.19
Aldonolactonasa	3.1.1.17
L-Gulono-1,4-lactona oxidasa	1.1.3.8
Uronolactonasa	3.1.1.19
Actividad Glucuronolactona reductasa	1.1.1.20
L-Galactono-1,4-lactona 3-epimerasa	*)
Galacturonato-1-P uridililtransferasa	*)
Galacturonoquinasa	2.7.1.44
Hexuronato (D-galacturonato) reductasa	*)
Mioinositol 1-P sintasa	5.5.1.4
Mioinositol 1-P monofosfatasa	3.1.3.25
Mioinositol oxigenasa	1.13.99.1
D-Galactoquinasa	2.7.1.6
UTP-Hexosa 1-P uridililtransferasa	2.7.7.10
UDP-Glucosa 4-epimerasa	5.1.3.2
Suc sintasa	2.4.1.13
Fructoquinasa	2.7.1.4

*) Número de clasificación no disponible en las bases de datos.

ES 2 285 327 T3

El término “expresión” se refiere a la transcripción de un gen para producir el mRNA correspondiente y la traducción de este mRNA para producir el producto génico correspondiente, es decir, un péptido, polipéptido, o proteína.

5 La frase “unido funcionalmente” o “unido de forma operable” se refiere a un promotor o una región promotora y a una secuencia que codifica o estructural en tal orientación y distancia que la transcripción de la secuencia que codifica o estructural de puede dirigir por el promotor o la región promotora.

10 El término “gen” se refiere a ADN cromosómico, ADN plásmido, cADN, ADN sintético, u otros ADN que codifican un péptido, un polipéptido, una proteína, o una molécula de RNA, y las regiones que flanquean las secuencias codificantes implicadas en la regulación de la expresión.

15 El término “genoma” implica los cromosomas y los plásmidos dentro de una célula huésped. Los ADNs codificantes de la presente invención introducidas en las células huésped pueden ser integrados cromosómicamente o localizados en plásmido.

“ADN Heterólogo” se refiere a ADN de una fuente distinta que el de la célula receptora.

“ADN Homólogo” se refiere a ADN de la misma fuente que la célula receptora.

20 “Hibridización” se refiere a la habilidad de una cepa de ácido nucleico de unirse con una cadena complementaria vía el apareamiento de bases. La hibridización ocurre cuando las secuencias complementarias en las dos cadenas de ácido nucleico se unen la una con la otra.

25 El término “medio” se refiere al entorno químico de la levadura que comprende cualquier componente que se requiere para el crecimiento de la levadura o de la levadura recombinante y uno o más precursores para la producción de ácido ascórbico. Los componentes para el crecimiento de la levadura y los precursores para la producción de ácido ascórbico pueden ser o no idénticos.

30 “Pauta de lectura abierta (ORF)” se refiere a una región de ADN o RNA que codifica un péptido, polipéptido, o proteína.

“Plásmido” se refiere a una pieza de DNA circular, extra cromosómico, replicable.

35 “Reacción en cadena por polimerasa (PCR)” se refiere a una técnica enzimática para crear copias múltiples de una secuencia de ácido nucleico. Las copias de la secuencia de ADN entre dos amplímeros se amplifican mediante una ADN polimerasa. La base de este método de amplificación son los ciclos múltiples de cambios de temperatura para desnaturalizar, después re-hibridar los amplímeros, seguido por la extensión para sintetizar nuevas cadenas de ADN en la región localizada entre los amplímeros.

40 El término “promotor” o “región promotora” se refiere a una secuencia de ADN, que normalmente se encuentra en la región (5') a una secuencia codificante, que controla la expresión de la secuencia codificante mediante el control de la producción de RNA mensajero (mRNA) mediante la proporción del sitio de reconocimiento para la RNA polimerasa y/o otros factores necesarios para que empiece la transcripción al sitio correcto.

45 Una “célula recombinante” o “célula transformada” es una célula que contiene una secuencia de ácido nucleico de origen no natural en la célula o una copia adicional o copias de una secuencia de ácido nucleico endógena, donde la secuencia de ácido nucleico se introduce a la célula o su antecesor mediante la acción humana.

50 El término “vector recombinante” o “construcción de ADN o RNA recombinante” se refiere a cualquier agente como un plásmido, cósmido, virus, secuencia que se replica de forma autónoma, fago, o secuencia de nucleótido de ADN o RNA lineal o circular de una cadena o de doble cadena, derivada de cualquier fuente, capaz de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula de ácido nucleico en la que una o más secuencias se han unido de forma funcionalmente operativa. Estas construcciones recombinantes o vectores son capaces de introducir una secuencia 5' reguladora o una región promotora y una secuencia de ADN para un producto de gen seleccionado a una célula de tal forma que la secuencia de ADN se transcribe a mRNA funcional, que se pueden traducir o no y como consecuencia expresar.

60 “Enzima de restricción” se refiere a una enzima que reconoce una secuencia específica de nucleótidos en ADN de doble cadena y que corta ambas cadenas; también se llama una endonucleasa de restricción. El corte normalmente ocurre dentro del sitio de restricción o cerca de él.

65 “El marcador seleccionable” se refiere a una secuencia de ácido nucleico la expresión de la cual confiere un fenotipo que facilita la identificación de células que contienen la secuencia de ácido nucleico. Los marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a los químicos tóxicos (por ejemplo ampicilina, canamicina, G418, higromicina) o complementan una deficiencia nutricional (por ejemplo uracil, histidina, leucina).

“Los marcadores visuales” se refiere a una secuencia de ácido nucleico la expresión de la cual imparte una característica de distinción visual (por ejemplo cambios de color, fluorescencia).

ES 2 285 327 T3

“Transcripción” se refiere al proceso de producir una copia de RNA a partir del patrón de ADN.

5 “Transformación” se refiere a un proceso de introducción de una secuencia de ácido nucleico exógena (por ejemplo, un vector, un plásmido, o una molécula de ácido nucleico recombinante) a una célula en la que el ácido nucleico exógeno se incorpora a un cromosoma o es capaz de replicarse de forma autónoma. Una célula que ha experimentado una transformación, o un descendiente de este tipo de célula, es “transformada” o “recombinante.” Si el ácido nucleico exógeno comprende una región codificante que codifica una proteína deseada, y la proteína deseada se produce en la levadura transformada y es sustancialmente funcional, esta levadura transformada es “funcionalmente transformada”.

10 “Traducción” se refiere a la producción de proteína a partir de RNA mensajero. El término “rendimiento” se refiere a la cantidad de ácido ascórbico producida (molar o peso/volumen) dividido por la cantidad de precursor consumido (molar o peso/volumen) multiplicado por 100.

15 “Unidad” de enzima se refiere a la actividad enzimática e indica la cantidad de micromoles de sustrato convertidos por mg de proteínas totales de célula por minuto.

20 “Vector” se refiere a una molécula de ADN o RNA (como un plásmido, cósmido, bacteriofago, cromosoma artificial de levadura, o virus, entre otros) que lleva las secuencias de ácido nucleico a la célula huésped. El vector o una porción del vector se puede insertar al genoma de la célula huésped.

Lista de abreviaciones

Asc	L-ácido ascórbico (vitamina C) o una de sus sales
25 AGD	L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa
AL	aldonolactonasa
ALO	D-arabinono-1,4-lactona oxidasa
30 ARA	D-arabinosa deshidrogenasa
Gal	L-galactono-1,4-lactona
35 Gul	L-gulono-1,4-lactona
LGDH	L-galactosa deshidrogenasa
GLO	L-gulono-1,4-lactona oxidasa
40 RGLO	L-gulono-1,4-lactona oxidasa aislada de <i>R. norvegicus</i>
TCA	ácido tricloroacético
45 TPI	triosefosfatoisomerasa
OD ⁶⁶⁰	densidad óptica a 660 nm

50 Se debe apuntar que las abreviaciones para las actividades enzimáticas se refieren a las actividades respectivas y no a una enzima específica.

Ejemplos

55 Los siguientes ejemplos se incluyen para evidenciar las realizaciones preferidas de la invención. Se debería apreciar por aquellos especialistas en el campo que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan las técnicas descubiertas por aquellos inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y así se puede considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos especialistas en el campo, a la luz de la presente divulgación, deberían apreciar que se pueden hacer varios cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aun obtener resultados iguales o similares sin alejarse de la invención.

Materiales y métodos

1. Determinación de ácido ascórbico

65 Se determinó ácido ascórbico espectrofotométricamente siguiendo un método de Sullivan y col. (1955, Assoc. Off. Agr. Chem., 38, 514-518). Se mezclaron 135 μ l de muestra en una cubeta con 40 μ l de H₃PO₄ (85%). Después se añadieron 675 μ l de α,α -Bipiridilo (0.5%) y 135 μ l de FeCl₃ (1%). Después de 10 minutos se midió la absorbancia a

ES 2 285 327 T3

525 nm. Se confirmó la identidad del ácido ascórbico mediante HPLC (Columna de extrasilio trazas C8, 5 μ M, 15 x 0.46 cm, Teknokroma, S. Coop. C. Ltda. # TR-016077; Eluyente: bromuro de cetiltrimetilamonio 5 μ M, KH_2PO_4 50 mM en H_2O /Acetonitrilo al 95/5; velocidad de flujo: 1 ml min^{-1} , Detección de UV @ 254 nm) con L-ácido ascórbico puro (Aldrich, A9,290-2) como patrón.

2. Determinación de la concentración de proteína

Se determinaron las concentraciones de proteína siguiendo el método de Lowry's (Lowry O.H. y col., 1951, J. Biol. Chem. 193, 265-275), utilizando el kit de ensayo de proteína Bio-Rad DC II (Cat. Nr. 500-0112) con BSA como patrón.

3. Amplificación de la secuencia de gen específico

Para amplificar las secuencias de gen específicas, se utilizó polimerasa de DNA PfuTurbo (Stratagene #600252) sobre un Sistema de PCR de GeneAmp 9700 (PE Appl. Biosystems, Inc.). Se utilizaron condiciones estándar donde: dNTP 400 mM, primers 0.5 μ M, MgCl_2 0.5 μ M (además del tampón), y 3.75 U Pfu por 100 ml de reacción.

Las secuencia de los genes utilizados se han comunicado públicamente mediante Genbank, tal y como se muestra.

Gen	Número(s) de acceso al Genbank	Secuencia de Nucleótidos que incluyen la región codificante SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO
LGDH	AL031394(Gen no. T16L.160)	12	11
AGD	AL049658(Gen no. T17F15.200)	2	1
AGD homólogo de Brassica	Z97060	4	3
AL	X67189; S53050	30	29
ALO	U40390; AB009401	6,8	5,7
RGLO	J03536	10	9
ARA	Y13134; Z36018 (ORF YBR149w)	21	20

Se utilizó el siguiente programa para la amplificación de AGD:

94°C	5 min	
94°C	45 s	
53.5°C	30 s	}33 ciclos
72°C	1 min 40 s	
72°C	7 min	
4°C	∞	

ES 2 285 327 T3

Se utilizó el siguiente programa para la amplificación de AL:

	94°C	5 min	
5	94°C	45 s	
	53.5°C	30 s	}33 ciclos
	72°C	1 min 40 s	
10	72°C	7 min	
	4°C	∞	

15 Se utilizó el siguiente programa para la amplificación de ALO:

	94°C	5 min	
20	94°C	45 s	
	53.5°C	30 s	}33 ciclos
	72°C	1 min 40 s	
25	72°C	7 min	
	4°C	∞	

30 Se utilizó el siguiente programa para la amplificación de ARA:

	94°C	5 min	
35	94°C	45 s	
	53.5°C	30 s	}33 ciclos
	72°C	1 min 40 s	
40	72°C	7 min	
	4°C	∞	

45 Se utilizó el siguiente programa para la amplificación de LGDH:

	94°C	5 min	
50	94°C	45 s	
	56°C	30 s	}33 ciclos
	72°C	1 min 40 s	
55	72°C	7 min	
	4°C	∞	

60 Se utilizó el siguiente programa para la amplificación de RGLO:

	94°C	30 s	
65	94°C	5 s	
	72°C	4 min	}33 ciclos
	72°C	5 min	
	4°C	∞	

ES 2 285 327 T3

Patrón de ADN para AGD y LGDH: 50 ng de plásmido de cADN de librería pFL61 *Arabidopsis* (ATCC #77500 (Minet M. *et al*, 1992, Plant J., 2,417-422)). Patrón de ADN para RGLO: 0.5 ng de hígado de rata de marathon-ready cADN de librería (Clontech #7471-1). Patrón de ADN para AL: 50 ng de ADN genómico de *Zymomonas mobilis* (ATCC #10988), extraído utilizando un método estándar. Patrón de ADN para ALO y ARA: 50 ng de ADN genómico de *S. cerevisiae* GRF18U, extraído utilizando un método estándar. Los productos de la PCR se clonaron al sitio EcoRV de pSTBlue-1 utilizando el kit de clonación para extremos romos de Novagen Inc. (#70191-4).

<u>Oligonucleótidos utilizados</u>	<u>Gen amplificado</u>
10 SEQ ID NO:14: caagaaggcctaaatgttccgttacgctcc	
SEQ ID NO:15: atgggccccttaagcagtggaggagactggg	AGD
15 SEQ ID NO:16: tgaggggtcaggggtggtttgtttcca	
20 SEQ ID NO:17: tggaatcatggtccatgggtacaaaggg	RGLO
SEQ ID NO:18: tttcaccatagtctactatcc	
25 SEQ ID NO:19: aaggatcctagtcggacaactc	ALO
SEQ ID NO:22: atgacgaaaatagagcttcgagc	
30 SEQ ID NO:23: ttagtctgatggattccacttgg	LGDH
35 SEQ ID NO:24: atgtctcttcagtagcctcaacc	
SEQ ID NO:25: ttaatactttaaattgtccaagtttggtc	ARA
40 SEQ ID NO:27: atgaccactggtcgtatgtctcg	
45 SEQ ID NO:28: ttaccagaaaataagaccaagca	AL

4. Construcción del plásmido

El modo de nombramiento que se ha utilizado aquí es que pSTBlue-1 que contiene, por ejemplo, AGD en la dirección sentido respecto el sitio de clonación múltiple (MCS) se designó pSTB AGD-1. En un ejemplo más, el pSTBlue-1 que contiene AGD en la dirección antisentido respecto su MCS se designó pSTB AGD-2, y así sucesivamente.

Se utilizaron procedimientos estándar para todas las proposiciones de clonación (Sambrook J. y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

ES 2 285 327 T3

Inserto derivado de	Inserto cortado con		Plásmido Diana	Plásmido diana cortado con	Nombre del plásmido de expresión resultante
pSTB AGD-1	EcoRI		pYX042	EcoRI	pL-AGD
pSTB LGDH-1	EcoRI		pYX022	EcoRI	pH-LGDH
pSTB ALO-1	EcoRI		pYX042	EcoRI	pL-ALO
pSTB AL-1	EcoRI		pYX022	EcoRI	pH-AL
pSTB ALO-1	EcoRI		pZ3	EcoRI	pZ3-ALO
pH-LGDH	AatII/PvuII/romo		pAG26	ApaI/romo	pAG26TPI-LGDH
pSTB ARA-2	SacI romo	BamHI	pYX022	EcoRI romo BamHI	pH-ARA
pSTB RGLO-1	NotI romo	KpnI romo	pYX042	EcoRI romo	pL-RGLO
pSTB RGLO-1	NotI romo	KpnI romo	pZ3	EcoRI romo	pZ3-RGLO

Construcción del plásmido de expresión

Los plásmido pYX son unas series de vectores de expresión de levaduras disponibles comercialmente (R&D Systems, Inc.).

pAG26TPI:

El cassette de expresión (que consiste en el promotor de TPI, sitio de clonación múltiple y terminador) de pYX022 se cortó con enzimas de restricción AatII/PvuII, extremos romos y se clonaron a pAG26 (Goldstein A.L. and McCusker J.H., 1999, Yeast 15, 1541-1553) que se había cortado con enzima de restricción ApaI y se habían hecho extremos romos.

pZ3:

Se cortó la región ARS/CEN de YCplac33 (Gietz R.D. y Sugino A., 1988, Gene 74, 527-534) mediante el corte con enzima de restricción ClaI, haciendo los extremos romos, y se cortó con el enzima de restricción SpeI y se clonó a pYX022, que se había cortado con el enzima de restricción DraIII, se trató para hacer los extremos romos, y se cortó con el enzima de restricción SpeI. El plásmido resultante se abrió con el enzima de restricción KpnI y los extremos romos, para recibir el cassette de resistencia G418, cortado de pFA6-KanMX4 (Wach y col., 1994, Yeast 10, 1793-1808) con los enzimas de restricción SphI/SacI y los extremos romos.

ES 2 285 327 T3

5. Cultivo y examen de la Levadura

Se utilizaron las cepas de levadura de *S. cerevisiae* GRF18U, W3031B, *Z. bailii* ATCC 60483, *Z. bailii* ATCC 36947 y *K. lactis* PM6-7A (Wésolowski-Louvel, M. y col., 1992, Yeast 8, 711-719). Se ha depositado el GRF18U con el Agricultural Research Service Culture Collection y presenta el siguiente número de catálogo NRRL Y-30320. Se cultivaron todas las cepas en frascos de agitación en un medio mínimo (YNB al 0.67% peso/volumen (Difco Laboratories, Detroit, MI #919-15), glucosa al 2% peso/volumen, la adición de los aminoácidos apropiados o adenina o uracil, respectivamente, a 50 mg l⁻¹) bajo condiciones estándar (se agitó a 30°C). La densidad óptica inicial a 660 nm era de alrededor de 0.05.

Para la incubación con L-galactosa, se crecieron las células toda la noche, después se añadió L-galactosa a 250 mg l⁻¹ y se incubaron las células durante 24 horas. Para la incubación con sustratos distintos a L-galactosa, se crecieron las células en presencia de los sustratos respectivos a 50 mM o 100 mM durante 72 horas si no se indica lo contrario. Para la determinación del ácido ascórbico intracelular, se trataron las células tal y como se indica a continuación: se recuperaron las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se levaron una vez con H₂O fría destilada, se resuspendió en aproximadamente 3 veces el volumen del gránulo en TCA al 10% frío, se agitó de forma vigorosa, se mantuvo en hielo durante 20 minutos, y después se aclaró el sobrenadante de los restos de la célula por centrifugación.

6. Transformación de la levadura

Se llevó a cabo la transformación de las células de levadura siguiendo el método de LiAc/ss- ADN/PEG estándar (Agatep, R., y col., 1998). Se depositaron GRF18U de *S. cerevisiae* y varias levaduras transformadas con NRRL. La tabla de a continuación lista las cepas y sus números de NRRL.

Cepa	Número de NRRL	Fecha de Depósito
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U	NRRL Y-30320	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pl-ALO]	NRRL Y-30321	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pl-AGD]	NRRL Y-30322	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pH-LGDH]	NRRL Y-30323	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pH-LGDH][pl-ALO]	NRRL Y-30324	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pl-AGD]	NRRL Y-30325	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pH-ARA] [pL-ALO]	NRRL Y-30326	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> W3031B [pl-ALO]	NRRL Y-30327	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> W3031B [pH-LGDH] [pl-ALO]	NRRL Y-30328	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> W3031B [pH-ARA] [pl-ALO]	NRRL Y-30329	31 de julio del 2000
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pL]	NRRL Y-30490	20 de julio del 2001
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pL-RGLO]	NRRL Y-30491	20 de julio del 2001
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pH-AL] [pL]	NRRL Y-30492	20 de julio del 2001
<i>S. cerevisiae</i> GRF18U [pH-AL] [pL-RGLO]	NRRL Y-30493	20 de julio del 2001
<i>Z. bailii</i> ATCC 36947 [pZ3]	NRRL Y-30494	20 de julio del 2001
<i>Z. bailii</i> ATCC 36947 [pZ3-RGLO]	NRRL Y-30495	20 de julio del 2001

<i>Z. bailii</i> ATCC 60483 [pZ3]	NRRL Y-30496	20 de julio del 2001
<i>Z. bailii</i> ATCC 60483 [pZ3-RGLO]	NRRL Y-30497	20 de julio del 2001
<i>Z. bailii</i> ATCC 36947 [pZ3-ALO]	NRRL Y-30498	20 de julio del 2001
<i>Z. bailii</i> ATCC 36947 [pAG25TPI] [pZ3-ALO]	NRRL Y-30499	20 de julio del 2001
<i>Z. bailii</i> ATCC 36947 [pAG26TPI-LGDH]	NRRL Y-30500	20 de julio del 2001
<i>Z. bailii</i> ATCC 36947 [pAG26TPI-LGDH] [pZ3-ALO]	NRRL Y-30501	20 de julio del 2001

Se depositaron las cepas con el Agricultural Research Service Culture Collection, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA. Se llevó a cabo este depósito bajo la normativa del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de Microorganismos con el propósito del Procedimiento de Patentes y sus regulaciones (Tratado de Budapest). Las cepas de levadura estarán disponibles mediante el NRRL bajo los términos del tratado de Budapest sobre la cuestión de una patente de E.E.U.U. con las reivindicaciones pertinentes. La disponibilidad de las levaduras depositadas no se interpreta como una licencia para practicar la invención en infracción de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Resultados experimentales

1. Estabilidad del L-ácido ascórbico

Para determinar la estabilidad del ácido ascórbico bajo condiciones de cultivo, se añadió ácido ascórbico a nuestro medio estándar (glucosa al 2%, YNB al 0.67%) y se incubó la solución en frascos en agitación a 30°C. La Figura 2 muestra los resultados respectivos. En un medio estéril, el ácido ascórbico se degrada rápidamente (véase el panel B), mientras que es completamente estable si se encuentra presente levadura viable (véase el panel A). Este resultado muestra que el cultivo de levadura en un medio es un método para estabilizar ácido ascórbico.

En consecuencia, el ácido ascórbico potencialmente producido por la levadura se estabiliza mediante la presencia de la levadura, haciendo que los métodos de la presente invención sean adecuados para la producción de ácido ascórbico.

2. Producción de ácido ascórbico a partir de levaduras no-transformadas

De acuerdo con la literatura, la levadura salvaje (wt) comprende una actividad D-arabinono-1,4-lactona oxidasa con un amplia especificidad de sustrato (Huh W.K. y col., 1994, Eur. J. Biochem. 225, 1073-1079). Se ha demostrado esta actividad *in vitro*. Para determinar si los sustratos o el producto puede atravesar la membrana celular, incubamos tres tipos distintos de cepas de levadura (*S. cerevisiae* GRF18U y W3031B, así como *Z. bailii* ATCC 60483) con L-galactono-1,4-lactona (el último precursor de la ruta de biosíntesis de la planta que lleva a ácido ascórbico) o L-gulono-1,4-lactona (el último precursor de la ruta metabólica animal). Tal y como se muestra en la Figura 3, ambas sustancias se pueden internalizar a las células de levadura y se pueden convertir a ácido ascórbico. No se acumuló ácido ascórbico en el cultivo (no se muestra) pero se midieron cantidades significativas en los extractos de la célula entera.

El siguiente precursor anterior en la ruta de la planta es L-galactosa. La Figura 4 muestra los resultados de las incubaciones de células de levadura con este sustrato. *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, y *K. lactis* son capaces de producir ácido ascórbico a partir de este compuesto, y en el caso de ácido ascórbico se acumula dentro de la célula en una cantidad significativa (Fig. 4).

3. Producción y Acumulación de ácido ascórbico en el medio a partir de levaduras transformadas

Clonamos los genes que codifican para D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO), D-arabinosa deshidrogenasa (ARA), L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (AGD), L-galactosa deshidrogenasa (LGDH), L-gulono-1,4-lactona oxidasa (RGLO) y aldonolactonasa (AL). Estos genes se clonaron a vectores de expresión de levaduras disponibles tal y como ya se ha remarcado en los materiales y métodos. De forma resumida, el promotor de TPI, un promotor fuertemente natural y constitutivo de *S. cerevisiae*, deriva la expresión de los genes en cuestión. Después de la incubación de *S. cerevisiae* GRF18U transformada con AGD o ALO con L-galactono-1,4-lactona, las células no sólo acumularon ácido ascórbico de forma intracelular (no se muestra), sino que también, de forma sorprendente, acumularon cantidades considerables de ácido ascórbico en el extracto de cultivo (Figura 5). Esto también fue correcto para las mismas células transformadas incubadas con L-galactosa (Figura 6). La cotransformación de L-galactosa deshidrogenasa o D-arabinosa deshidrogenasa incrementó de forma significativa la habilidad de la cepa de levadura respectiva de convertir L-galactosa a ácido ascórbico (Figura 6). Se observaron resultados similares a aquellos que se describen más adelante

para GRF18U recombinante que expresa (a) ALO; (b) LGDH y ALO; o (c) ARA y ALO, cultivado en un medio que comprende L-galactosa, con W3031B de *S.cerevisiae* recombinante que expresa los enzimas correspondientes y cultivado en un medio que comprende L-galactosa. (resultados no mostrados). La Figura 7 muestra los datos de un cultivo de alta densidad que convierte L-galactosa a ácido ascórbico. Las cepas de levaduras respectivas se crecieron toda la noche en un medio mínimo estándar. El siguiente día, se centrifugaron de forma aséptica las células y el gránulo se resuspendió en 1/10 del sobrenadante para concentrar las células 10 veces. Después, se añadieron 250 mg l⁻¹ de L-galactosa y los cultivos se incubaron bajo condiciones estándar durante 6 días. Después de 6 días las cepas transformadas con ALO y LGDH acumularon más de 70 mg de ácido ascórbico por litro de medio de cultivo. Se acumularon de forma intracelular 30 mg l⁻¹ de ácido ascórbico (no se muestra). Si se toman estos dos valores juntos corresponden a la conversión de alrededor del 40% de la L-galactosa añadida.

Para probar la habilidad de producir ácido ascórbico a partir de una levadura distinta, se transformó *Z. bailii* ATCC 36947 con ALO y/o LGDH. Las células transformadas se incubaron con L-galactosa bajo las mismas condiciones que se describen para *S. cerevisiae* transformado (Figura 8). Tal y como en los ejemplos referentes a *S. cerevisiae*, que se han descrito anteriormente, se observó la acumulación de ascorbato en el cultivo. Las células de *Z. bailii* salvaje fueron capaces de acumular una cantidad de ácido ascórbico menor sobre la incubación con L-galactosa. La transformación de las células con un plásmido que confiere resistencia al antibiótico G418 o higromicina y la incubación de las células con el antibiótico respectivo parecen haber eliminado esta habilidad endógena. La expresión funcional de ALO, o ALO y LGDH resulta en una pronunciada acumulación de ácido ascórbico en el cultivo. La acumulación inferior de ascorbato mediante las células que expresan ALO incubado con ambos antibióticos comparado con las células que expresan ALO incubado con sólo G418, indica que la presencia de higromicina o la expresión del gen de resistencia a la higromicina interfieren significativamente con la acumulación o detección de ácido ascórbico. La mayor acumulación de ascorbato en los cultivos de células que expresan ALO y LGDH comparado con los niveles de ascorbato en los cultivos de células que sólo expresan ALO, cuando las células en ambos casos se cultivan en presencia de G418 e higromicina indica que LGDH se expresa funcionalmente en *Z. bailii*.

Con la incubación de GRF18U de *S. cerevisiae* transformada con RGLO en presencia de L-gulono-1,4-lactona, las células acumularon ácido ascórbico de forma intracelular (Figura 9), pero no en el cultivo (los datos no se muestran). Las células no transformadas convirtieron una cierta cantidad de L-gulono-1,4-lactona debido a la reactividad cruzada de ALO endógeno, tal y como se ha discutido anteriormente. Con la expresión de RGLO en las células la cantidad de ácido ascórbico acumulado aumentó de forma significativa. La expresión adicional de AL resultó en niveles más bajos de acumulación de ácido ascórbico. Debido a la hidrólisis, L-gulono-1,4-lactona se encuentra en equilibrio con ácido L-gulónico cuando se encuentra en un entorno acuoso. Este equilibrio favorece fuertemente los ácidos libres, pero se alcanza el equilibrio de forma muy lenta (días). Las células incubadas con L-gulono-1,4-lactona son capaces de internalizar el compuesto y convertirlo a ácido ascórbico. Con la co-expresión funcional de AL y las enzimas RGLO y ALO, las tres enzimas compiten por el sustrato a partir de la misma reacción de equilibrio entre L-gulono-1,4-lactona y ácido L-gulónico. El equilibrio con ácido L-gulónico, que no es un sustrato para ALO o para RGLO, se consigue de forma mucho más rápida, así la cantidad de lactona que se convierte por ALO/RGLO a ácido ascórbico se reduce. La reacción inversa (la lactonización de ácido L-gulónico a L-gulono-1,4-lactona) apenas tiene lugar en un entorno acuoso sin catalización por ningún enzima. Así GRF18U de *S. cerevisiae* que no sobreexpresa una proteína o GRF18U que expresa RGLO incubado con ácido L-gulónico no acumuló ácido ascórbico, ni intracelularmente (Figura 9) ni extracelularmente (los datos no se muestran). Con la expresión de AL en GRF18U de *S. cerevisiae* una pequeña cantidad de ácido L-gulónico se convirtió a L-gulono-1,4-lactona, que sirvió como sustrato para ALO o ALO y RGLO. Así estas células fueron capaces de convertir ácido L-gulónico a ácido ascórbico. Esto dio el enzima AL además de ALO y/o RGLO utilidad para la producción de ácido ascórbico a partir de levaduras.

Con la incubación de ATCC36947 o ATCC60483 de *Z.bailii* transformados con RGLO con L-gulono-1,4-lactona, las células acumularon ácido ascórbico de forma intracelular (Figura 10), pero no en el cultivo (los datos no se muestran). Así, los datos obtenidos a partir de estas cepas de levaduras de *Z. bailii* fueron comparables a las que se observaron a partir de la levadura de *S. cerevisiae*.

La siguiente tabla resume los ejemplos descritos en esta invención. Nótese que “No determ.” en la tabla de más abajo pretende indicar “no determinado”.

55

60

65

ES 2 285 327 T3

Ejemplos de Levadura	Ejemplos de Gen sobreexpresado	Ejemplos de precursores convertidos	Producción de Ácido ascórbico	
			intracelular	extracelular
	No	L-galactono-1,4-lactona L-gulono-1,4-lactona L-galactosa Ácido L-gulónico	Si Si Si no	No No No No
<i>S. cerevisiae</i>	No	L-galactono-1,4-lactona L-gulono-1,4-lactona L-galactosa	si no si	No no si
<i>K. lactis</i>	AGD	L-galactono-1,4-lactona	Si	Si
<i>S. cerevisiae</i>	LGDH	L-galactosa	Si	No
<i>S. cerevisiae</i>	LGDH +ALO o AGD	L-galactosa	Si	Si
<i>S. cerevisiae</i>	ARA +ALO	L-galactosa	Si	Si
<i>S. cerevisiae</i>	RGLO	L-gulono -1,4-lactona Ácido L-gulónico	si no	no no
<i>S. cerevisiae</i>	AL	L-gulono -1,4-lactona Ácido L-gulónico	si si	no no
<i>S. cerevisiae</i>	RGLO+ AL	L-gulono-1,4-lactona Ácido L-gulónico	si si	no no
<i>Z. bailii</i>	RGLO	L-gulono -1,4-lactona	Si	No
<i>Z. bailii</i>	LGDH	L-galactosa	No determ	No
<i>Z. bailii</i>	ALO	L-galactosa	No determ.	Si
<i>Z. bailii</i>	LGDH + ALO	L-galactosa	No determ.	Si

Referencias

[1] **Agatep, R., R.D. Kirkpatrick, D.L. Parchaliuk, R.A. Woods, and R.D. Gietz, 1998**, Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier ADN/polyethylene glycol (LiAc/ss- ADN/PEG) protocol. *Technical Tips Online* (<http://tto.trends.com>).

[2] **Axelsen, Bock, and Kroll**, In N. H. Axelsen, J. Kroll, B. Weeks, editors, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, *Blackwell Scientific Publications, 1973*, Chapter 10.

[3] **Berry, A., Running, J., Severson, D.K. and Burlingame, R.P., 1999**, Vitamin C Production in Microorganisms and Plants, *International Patent Application, WO99/64618*.

[4] **Bleeg, H.S. and Christensen, F., 1982**, Biosynthesis of Ascorbate in Levadura, Purification of L-Galactono-1,4-lactona oxidasa with Properties Different from Mammalian L-Gulonolactona oxidasa , *Eur. J. Biochem.* 127, 391-96.

ES 2 285 327 T3

- [5] **Bock and Axelsen**, In N. H. **Axelsen**, J. **Kroll**, and B. **Weeks**, editors, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, *Blackwell Scientific Publications*, 1973, Chapter 11.
- [6] **Daruwala**, R., **Song**, J., **Koh**, W.S., **Rumsey**, S.C. and **Levine**, M., 1999, Cloning of functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett.* 460,480-484.
- [7] **Dumbrava**, V.A. and **Pall**, M.L., 1987, Control of nucleotide and erythroascorbic acid pools by cyclic AMP in *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta.* 926, 331-338.
- [8] **Gietz**, R.D. and **Sugino**, A., 1988, New levedura-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.
- [9] **Goldstein**, A.L. and **McCusker**, J.H., 1999, Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Levadura* 15,1541-1553.
- [10] **Hancock**, R.D., **Galpin**, J.R., and **Viola**, R., 2000, Biosynthesis of L-ácido ascórbico (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 245-250.
- [11] **Harboe** and **Ingild**, In N. H. **Axelsen**, J. **Kroll**, and B. **Weeks**, editors, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, *Blackwell Scientific Publications*, 1973, Chapter 23.
- [12] **Harlow**, E. and **Lane**, D., editors, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, *Cold Spring Harbor*, New York.
- [13] **Huh**, W.K., **Lee**, B.H., **Kim**, S.T., **Kim**, Y.R., **Rhie**, G.E., **Baek**, Y.W., **Hwang**, C.S., **Lee**, S.J. and **Kang**, S.O., 1998, D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *S. cerevisiae*, *Mol. Microb.* 30, 895-903.
- [14] **Huh**, W.K., **Kim**, S.T., **Yang**, K.S., **Seok**, Y.J., **Hah**, Y.C. and **Kang**, S.O., 1994, Characterisation of D-arabinono-1,4-lactona oxidasa from *Candida albicans* ATCC 10231, *Eur. J. Biochem.* 225, 1073-1079.
- [15] **Johnstone** and **Thorpe**, *Immunochemistry in Practice*, *Blackwell Scientific Publications*, 1982, 27-31.
- [16] **Kim**, S.T., **Huh**, W.K., **Kim**, J.Y., **Hwang**, S.W. and **Kang**, S.O., 1996, D-Arabinose dehidrogenasa and biosynthesis of erythroascorbic acid in *Candida albicans*, *BBA* 1297, 1-8.
- [17] **Kim**, S.T., **Huh**, W.K., **Lee**, B.H. and **Kang**, S.O., 1998, D-Arabinose dehidrogenasa and its gene from *Saccharomyces cerevisiae*, *BBA* 1429, 29-39.
- [18] **Koshizaka T.**, **Nishikimi M.**, **Ozawa T.** y **Yagi K.**, 1988, Isolation y sequence analysis of a complementary ADN encoding rat liver L-gulonono-gamma-lactona oxidasa, a key enzima for L-ácido ascórbico biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 263, 1619-1621.
- [19] **Kreger-van Rij**, N. J. W., 1987, Yeast, Vol. 1 of Biology of Yeasts, Ch. 2, A. H. **Rose** and J. S. **Harrison**, Eds. *Academic Press*, London.
- [20] **Kumar**, M. 2000 Producton of ascorbic acid using yeast, *International patent application*, WO 00/34502.
- [21] **Lee**, B.H., **Huh**, W.K., **Kim**, S.T., **Lee**, J.S. and **Kang**, S.O., 1999, Bacterial Production of D-Erythroascorbic acid and L-ascorbic acid through Functional Expression of *Saccharomyces cerevisiae* D-Arabinono-1,4-Lactona oxidasa in *Escherichia coli*, *App. Env. Microb.* 65, 4685-4687.
- [22] **Loewus** M.W. y col., 1990, *Plant. Physiol.* 94, 1492-1495.
- [23] **Lowry**, O.H., **Rosebrough**, N.J., **Farr**, A.L. and **Randall**, R.J., 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- [24] **Minet**, M., **Dufour**, M.E. and **Lacroute**, F., 1992, Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* c ADNs. *Plant J.* 2, 417-422.
- [25] **Nishikimi**, M., **Noguchi**, E. and **Yagi**, K., 1978, Occurrence in Levadura of L-Galactonolactona oxidasa Which is Similar to a Key enzyme for ascorbic acid Biosynthesis in Animals, L-Gulonolactona oxidasa, *Arch. Biochem. Biophys.* 191, 479-486.
- [26] **Ostergaard**, J., **Persiau**, G., **Davey**, M.W., **Bauw**, G. and Van **Montagu**, M., 1997, Isolation of a c ADN Coding for L-Galactono-Lactona Dehidrogenasa, an enzyme involved in the Biosynthesis of ascorbic acid in Plants, *J. Biol. Chem.* 272, 30009-30016.
- [27] **Padh**, H., 1990, Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol.* 68, 1166-1173.

ES 2 285 327 T3

[28] **Reichstein**, T., Process for the Manufacture of Levoascorbic acid (Vitamin C), *United States Pat.* No. 2,265,121.

[29] **Roland**, J.F., **Cayle**, T., **Dinwoodie**, R.C. and **Mehnert**, D.W., 1986, fermentation Production of ascorbic acid from L-Galactonic Substrate, *United States Patent* 4,595,659.

[30] **Roland**, J.F., **Cayle**, T., **Dinwoodie**, R.C. and **Mehnert**, D.W., 1990, Bioconversion Production of ascorbic acid with L-Galactono-1,4-Oxidase, *United States Patent* 4,916,068.

[31] **Roland**, J.F., **Cayle**, T., **Dinwoodie**, R.C. and **Mehnert**, D.W., 1986, fermentation production of ascorbic acid from L-galactonic substrate, *International Patent Application*, WO85/01745.

[32] **Spickett**, C.M., **Smirnoff**, N. and **Pitt**, A.R. 2000, The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* yits role as an antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 183-192.

[33] **Sambrook**, J., **Fritsch**, E. F., and **Maniatus** T., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, *Cold Spring Harbor*, New York.

[34] **Smirnoff**, N. and **Wheeler**, G., 1999, Plant Galactosa Dehidrogenasa, International Patent Application, WO99/33995.

[35] **Sullivan**, M.X. and **Clarke**, H.C.N., 1955, A highly specific procedure for ascorbic acid, *Assoc. Off. Agr. Chem.* 38, 514-518.

[36] **Wach**, A., **Brachat**, A., **Pohlmann**, R., and **Philippsen**, P., 1994, New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.

[37] **Wésolowski-Louvel**, M., **Prior**, C., **Bomecque**, D. and **Fukuhara**, H., 1992, Rag- mutations involved in glucose metabolism in yeast: isolation and genetic characterization. *Yeast* 8, 711-719.

[38] **Wheeler**, G.L., **Jones**, M.A. and **Smirnoff**, N., 1998, The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants, *Nature* 393, 365-369.

ES 2 285 327 T3

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar ácido ascórbico o una de sus sales, que comprende:

5 a) obtener una levadura de *Saccharomyces cerevisiae* o de *Zygosaccharomyces bailii* recombinante funcionalmente transformada con una región codificante que codifica un primer enzima D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO), donde la levadura es capaz de convertir un precursor de ácido ascórbico a ácido ascórbico o a una de sus sales,

10 b) cultivar la levadura recombinante en un medio que comprenda un precursor de ácido ascórbico, por lo tanto que forme ácido ascórbico o una de sus sales, donde la levadura acumula ácido ascórbico en el medio a niveles superiores que en el fondo de partículas, y

c) el aislamiento de ascórbico o de una de sus sales.

15 2. El método de la reivindicación 1, donde la levadura se selecciona de la cepa de *S. cerevisiae*: NRRL Y-30321, NRRL Y-30324, NRRL Y-30327, NRRL Y-30328, NRRL Y-30329, o de la cepa de *Z. bailii*: NRRL Y-30498, NRRL Y-30499, NRRL Y-30501, donde NRRL se refiere al Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service, Departamento de Agricultura de Estados Unidos.

20 3. El método de la reivindicación 1, donde el enzima ALO presenta al menos el 70% de identidad con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO:7 o al menos el 70% de identidad con SEQ ID NO: 6 o los nucleótidos del 4 al 1584 de SEQ ID NO:8.

25 4. El método de la reivindicación 1, donde la levadura se transforma además funcionalmente con una región codificante que codifica a un segundo enzima seleccionado de L-galactosa deshidrogenasa (LGDH), L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (AGD) y D-arabinosa deshidrogenasa (ARA).

30 5. El método de la reivindicación 4, donde el enzima LGDH presenta al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 11 o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 12.

6. El método de la reivindicación 4, donde el enzima AGD presenta al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 12 o los nucleótidos del 56 al 1858 de SEQ ID NO:4.

35 7. El método de la reivindicación 4, donde el enzima ARA presenta al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 20 o al menos un 70% de identidad con los nucleótidos del 285 al 1319 de SEQ ID NO:21.

40 8. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el segundo enzima está unido al promotor activo en la levadura.

9. El método de la reivindicación 8, donde el promotor es el promotor de triosefosfatisomerasa (TPI) de *S. cerevisiae*.

45 10. El método de la reivindicación 1, donde la región codificante que codifica el enzima ALO se ha aislado de *S. cerevisiae*.

11. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el enzima LGDH se ha aislado de *A. thaliana*.

50 12. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el enzima AGD se ha aislado de *A. thaliana*.

55 13. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el enzima ARA se ha aislado de *S. cerevisiae*.

14. El método de la reivindicación 1, donde la región codificante que codifica el primer enzima codifica un enzima ALO que hibrida a una cadena complementaria del set de polinucleótido en la SEQ ID NO:6; y donde la región codificante hibrida a la cadena complementaria del polinucleótido bajo condiciones de hibridación estrictas.

60 15. El método de la reivindicación 1, donde la región codificante que codifica el primer enzima codifica una enzima ALO que presenta las mismas propiedades inmunológicas de una enzima que presenta la SEQ. ID NO:5 o la SEQ. ID NO: 7.

65 16. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el segundo enzima codifica un enzima LGDH que hibrida a cadena complementaria del set de polinucleótidos en SEQ ID NO: 12; y donde la región codificante hibrida a la cadena complementaria del polinucleótido bajo condiciones de hibridación estrictas.

ES 2 285 327 T3

17. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el segundo enzima codifica un enzima LGDH que presenta las mismas propiedades inmunológicas de un enzima que presenta SEQ ID NO: 11.
18. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el segundo enzima codifica un enzima AGD que hibrida a cadena complementaria del set de polinucleótidos en SEQ ID NO: 2; y donde la región codificante hibrida a la cadena complementaria del polinucleótido bajo condiciones de hibridación estrictas.
19. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el segundo enzima codifica un enzima AGD que presenta las mismas propiedades inmunológicas de un enzima que presenta SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.
20. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el segundo enzima codifica un enzima ARA que hibrida a cadena complementaria del set de polinucleótidos en los nucleótidos del 285 al 1319 de SEQ ID NO: 21; y donde la región codificante hibrida a la cadena complementaria del polinucleótido bajo condiciones de hibridación estrictas.
21. El método de la reivindicación 4, donde la región codificante que codifica el segundo enzima codifica un enzima ARA que presenta las mismas propiedades inmunológicas de un enzima que presenta SEQ ID NO:20.
22. El método de la reivindicación 1, donde el precursor de ácido ascórbico se selecciona del grupo que consiste en monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, alcoholes de C1-C6, polioles de C2-C6, ácidos orgánicos, y lactonas de C5-C6.
23. El método de la reivindicación 1, donde el precursor del ácido ascórbico se selecciona del grupo que consiste en trehalosa; rafinosa; etanol; xilosa; xilulosa; maltosa; glicerol; fructosa; arabinosa; D-glucosa-6-P; D-glucosa-1-P; UDP-D-glucosa; ácido UDP-glucurónico; ácido 1-P-D-glucurónico; ácido D-glucurónico; D-glucurono lactona; ácido L-gulónico; D-fructosa-6-P; D-manosa-6-P; D-manosa-1-P; GDP-D-manosa; GDP-L-galactosa; L-galactosa-1-P; lactosa; sucrosa; almidón; celulosa; citrato; metanol; formaldehído; formato; metilamina; alanina; ácido oleico; L-galactono-1,4-lactona; D-glucosa; L-gulono-1,4-lactona; L-galactosa; y ácido L-gulónico.
24. El método de la reivindicación 1, donde el precursor de ácido ascórbico se selecciona de L-galactono-1,4-lactona; D-glucosa; L-gulono-1,4-lactona; L-galactosa; y ácido L-gulónico.
25. El método de la reivindicación 1, donde el precursor de ácido ascórbico también es una fuente de carbono para la levadura recombinante.
26. El método de la reivindicación 1, donde el paso de aislamiento comprende disolver la levadura.
27. El método de la reivindicación 26, donde el paso de aislamiento además comprende la centrifugación, filtración, micro filtración, ultra filtración, nano filtración, extracción líquido-líquido, carbono activado, cristalización, tratamiento enzimático con nucleasa o proteasa, o cromatografía.
28. El método de la reivindicación 1, donde el paso de cultivo comprende acumular ácido ascórbico en el medio a una concentración final de al menos 20 mg/l.
29. El método de la reivindicación 1, donde el paso de cultivo comprende acumular ácido ascórbico en el medio a una concentración final de al menos 40 mg/l.
30. El método de la reivindicación 1, donde el paso de cultivo comprende acumular ácido ascórbico en el medio a una concentración final de al menos 70 mg/l.
31. El método de la reivindicación 1, donde la levadura recombinante es capaz de convertir al menos el 25% del precursor a ácido ascórbico.
32. El método de la reivindicación 1, donde la levadura recombinante es capaz de convertir al menos el 35% del precursor a ácido ascórbico.
33. El método de la reivindicación 1, donde la levadura recombinante es capaz de convertir al menos el 40% del precursor a ácido ascórbico.
34. Un método para estabilizar ácido ascórbico o una de sus sales en un medio, que comprende: cultivar una levadura de *Saccharomyces cerevisiae* o *Zygosaccharomyces bailii* recombinante funcionalmente transformada con una región codificante que codifica un primer enzima D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO) en un medio que comprende ácido ascórbico o una de sus sales, donde el ácido ascórbico en el medio se produce mediante la levadura, la levadura produce ácido ascórbico mediante la conversión de al menos un precursor de ácido ascórbico a ácido ascórbico, y el medio comprende el precursor de ácido ascórbico.
35. El método de la reivindicación 34, donde el ácido ascórbico o una de sus sales se añade al medio.

ES 2 285 327 T3

36. El método de la reivindicación 34, donde la levadura se transforma además funcionalmente con una región codificante que codifica a un segundo enzima seleccionado de L-galactosa deshidrogenasa (LGDH), L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (AGD) y D-arabinosa deshidrogenasa (ARA).

5 37. Un *Saccharomyces cerevisiae*, donde el *S. cerevisiae* se transforma funcionalmente con una región codificante que codifica D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO), y una región codificante que codifica L-galactosa deshidrogenasa (LGDH), L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (AGD) o D-arabinosa deshidrogenasa (ARA).

10 38. Un *Zygosaccharomyces bailii*, donde el *Z. bailii* se transforma funcionalmente con una región codificante que codifica D-arabinono-1,4-lactona oxidasa (ALO).

15 39. Un *Z. bailii*, de acuerdo con la reivindicación 38, donde el *Z. bailii* se transforma además funcionalmente con una región codificante que codifica L-galactosa deshidrogenasa (LGDH), L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (AGD) o D-arabinosa deshidrogenasa (ARA).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

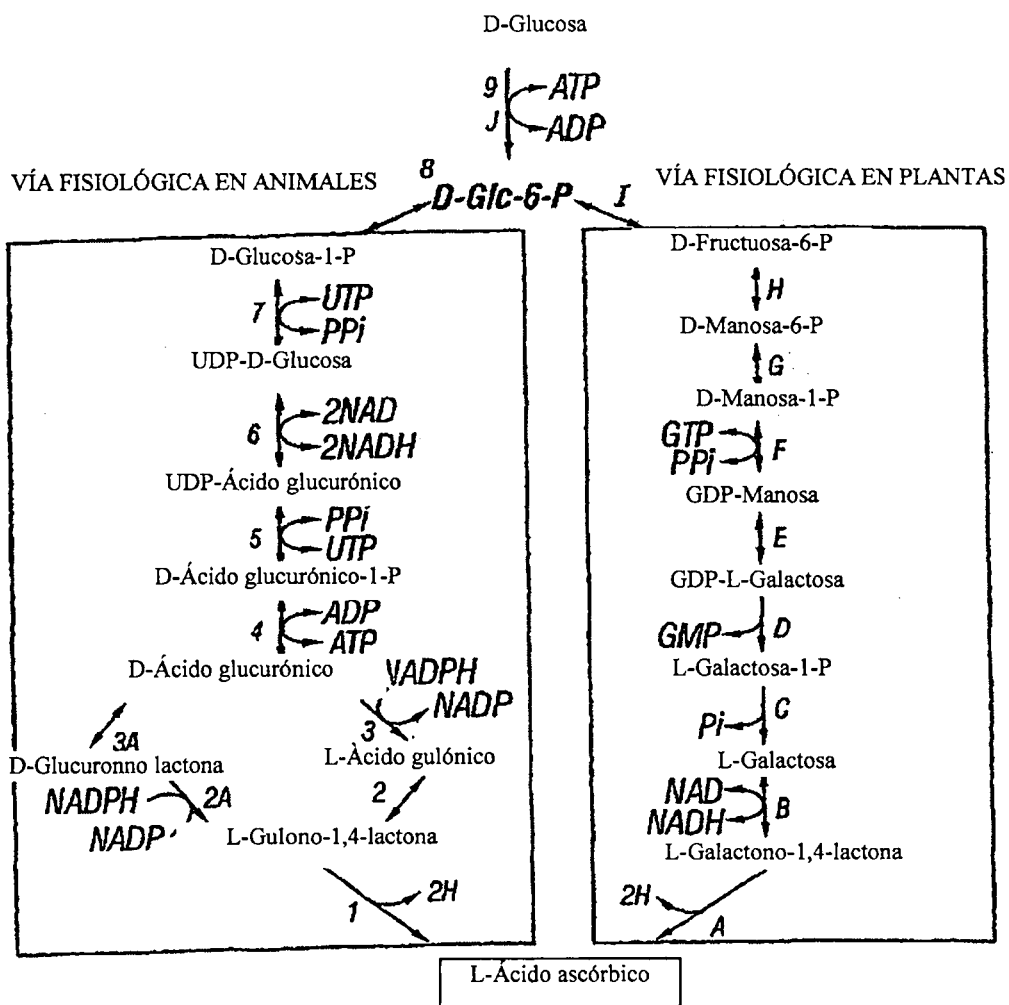


FIG. 1

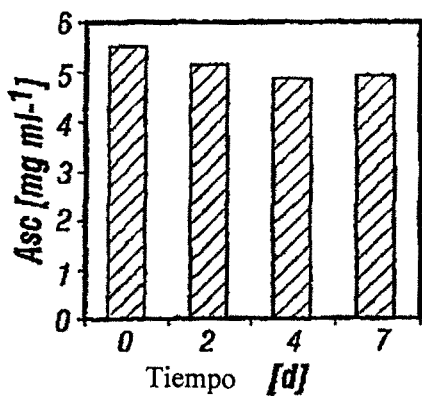


FIG. 2A

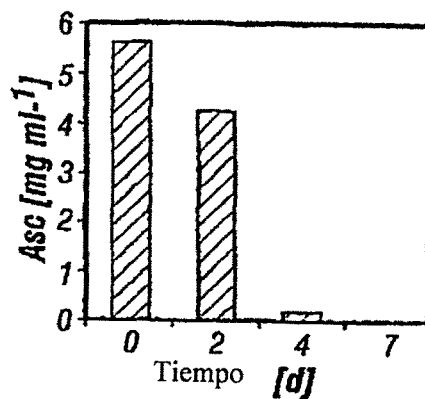


FIG. 2B

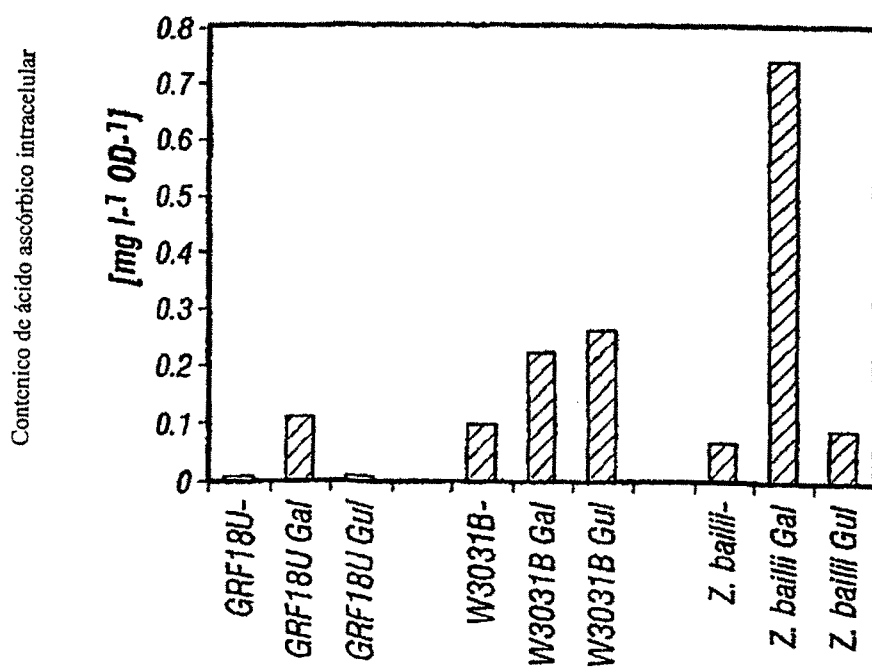


FIG. 3

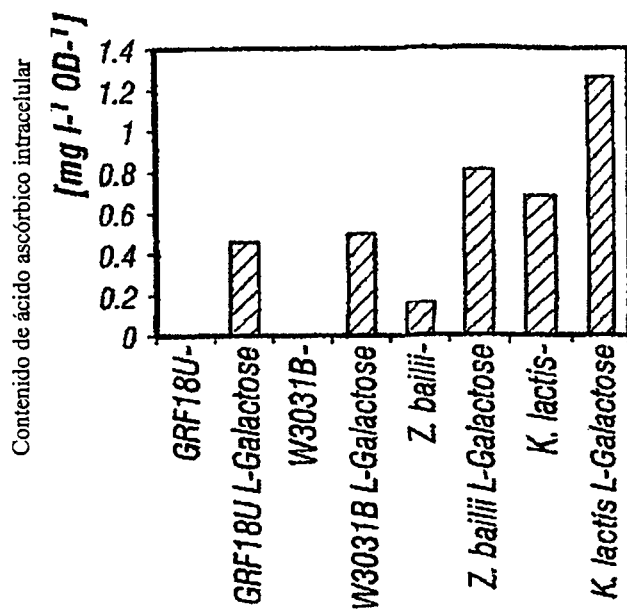


FIG. 4

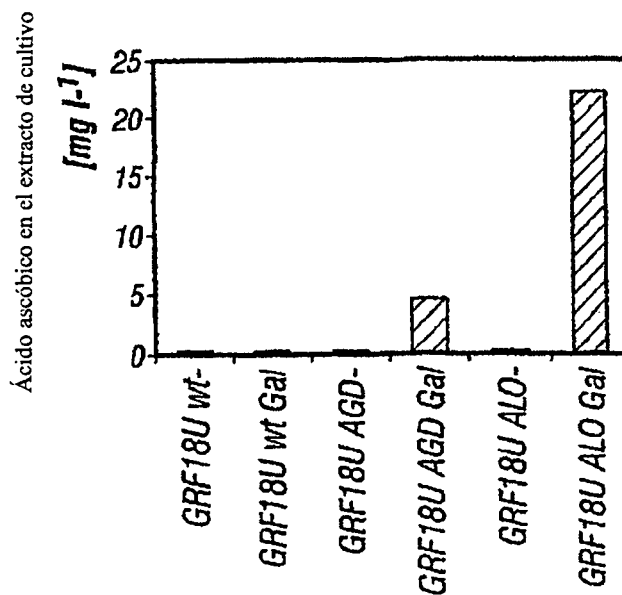


FIG. 5

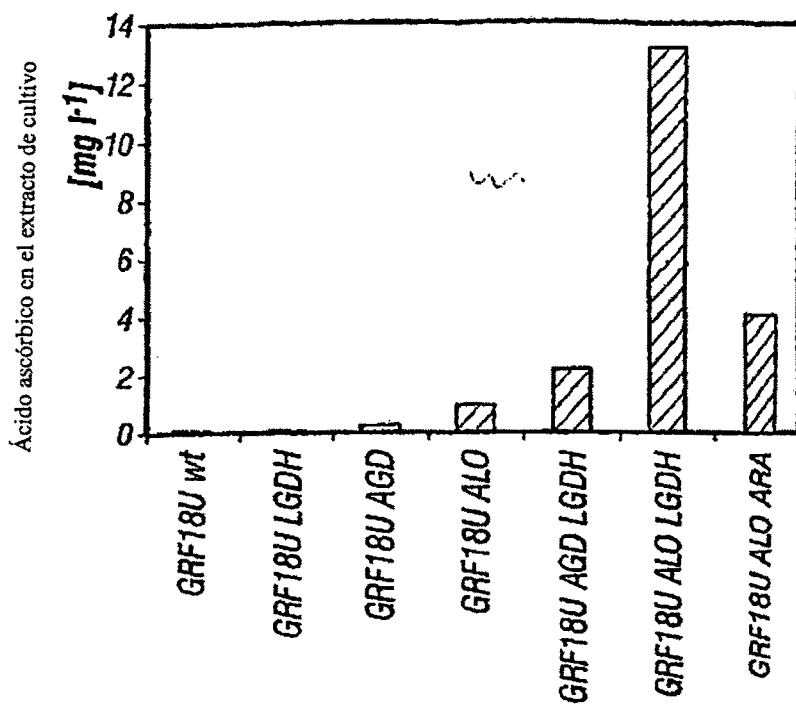


FIG. 6

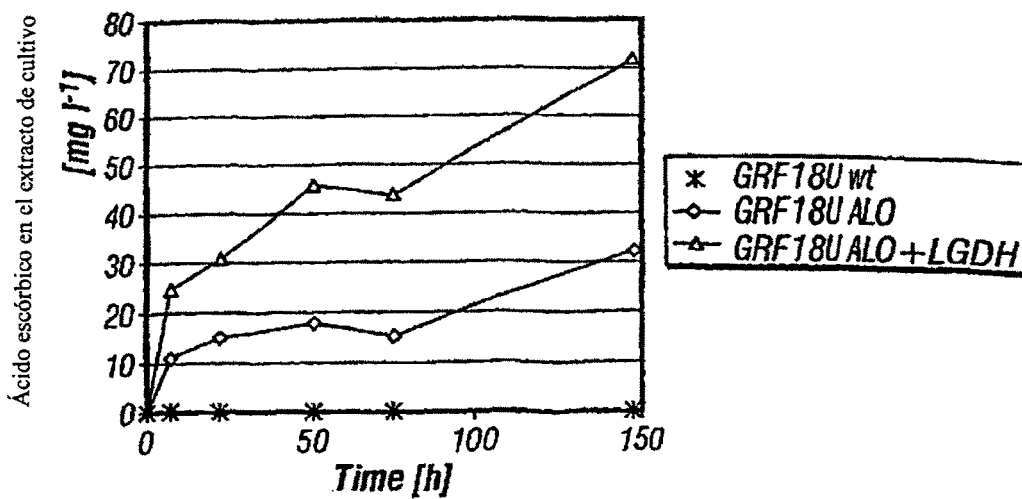


FIG. 7

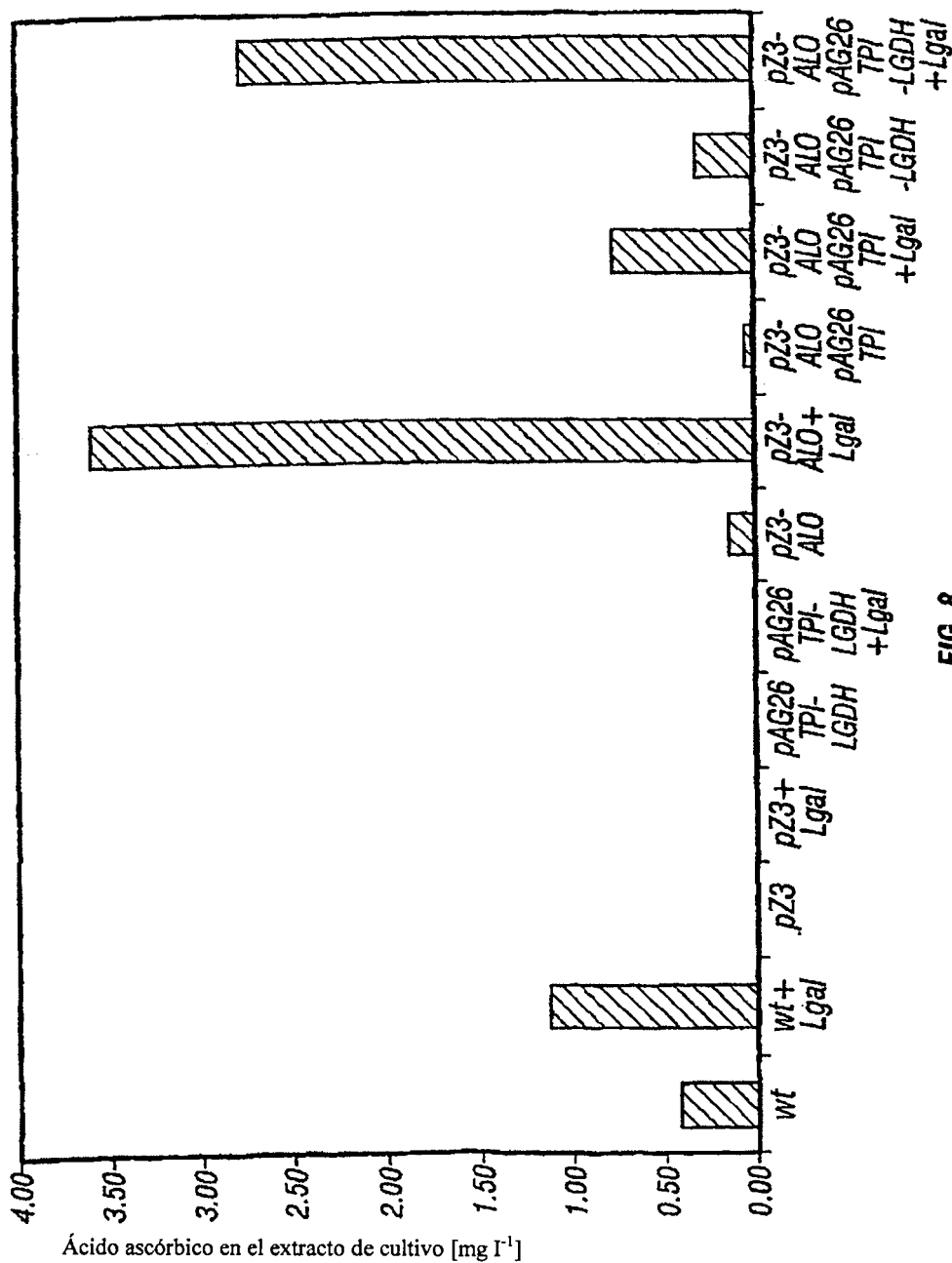


FIG. 8

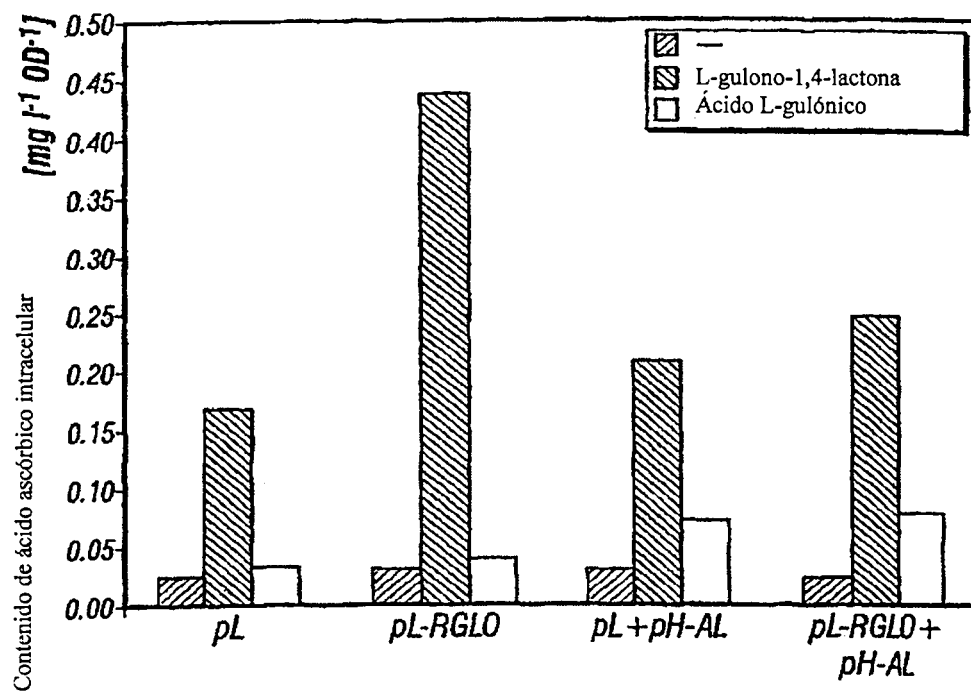


FIG. 9

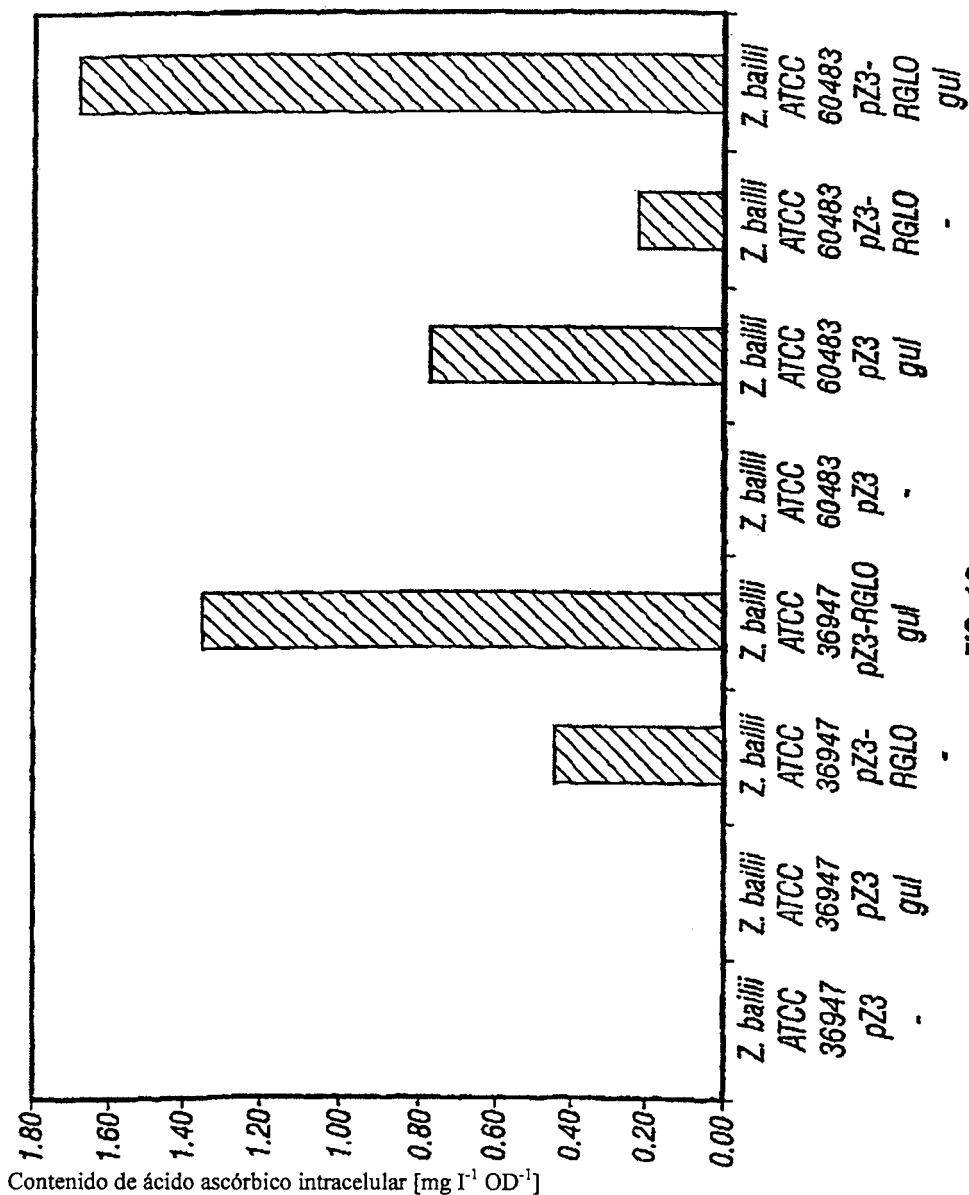


FIG. 10

ES 2 285 327 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BIPOLO S.C.a.R.L.

5 <120> Producción de ácido ascórbico en levaduras

<130> WPP84333

10 <140>

<141>

<150> US 09/630,983

15 <151> 2000-08-02

<160> 30

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 610

25 <212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

30

Met Leu Arg Ser Leu Leu Leu Arg Arg Ser Val Gly His Ser Leu Gly
1 5 10 15

35

Thr Leu Ser Pro Ser Ser Ser Thr Ile Arg Ser Ser Phe Ser Pro His
20 25 30

Arg Thr Leu Cys Thr Thr Gly Gln Thr Leu Thr Pro Pro Pro Pro
35 40 45

40

Pro Pro Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Thr Ala Ser Glu Ala Gln
50 55 60

45

Phe Arg Lys Tyr Ala Gly Tyr Ala Ala Leu Ala Ile Phe Ser Gly Val
65 70 75 80

Ala Thr Tyr Phe Ser Phe Pro Phe Pro Glu Asn Ala Lys His Lys Lys
85 90 95

50

Ala Gln Ile Phe Arg Tyr Ala Pro Leu Pro Glu Asp Leu His Thr Val
100 105 110

Ser Asn Trp Ser Gly Thr His Glu Val Gln Thr Arg Asn Phe Asn Gln
115 120 125

55

Pro Glu Asn Leu Ala Asp Leu Glu Ala Leu Val Lys Glu Ser His Glu
130 135 140

60

Lys Lys Leu Arg Ile Arg Pro Val Gly Ser Gly Leu Ser Pro Asn Gly
145 150 155 160

65

ES 2 285 327 T3

Ile Gly Leu Ser Arg Ser Gly Met Val Asn Leu Ala Leu Met Asp Lys
 165 170 175
 5 Val Leu Glu Val Asp Lys Glu Lys Lys Arg Val Thr Val Gln Ala Gly
 180 185 190
 Ile Arg Val Gln Gln Leu Val Asp Ala Ile Lys Asp Tyr Gly Leu Thr
 195 200 205
 10 Leu Gln Asn Phe Ala Ser Ile Arg Glu Gln Gln Ile Gly Gly Ile Ile
 210 215 220
 Gln Val Gly Ala His Gly Thr Gly Ala Arg Leu Pro Pro Ile Asp Glu
 225 230 235 240
 Gln Val Ile Ser Met Lys Leu Val Thr Pro Ala Lys Gly Thr Ile Glu
 245 250 255
 20 Leu Ser Arg Glu Lys Asp Pro Glu Leu Phe His Leu Ala Arg Cys Gly
 260 265 270
 Leu Gly Gly Leu Gly Val Val Ala Glu Val Thr Leu Gln Cys Val Ala
 275 280 285
 25 Arg His Glu Leu Val Glu His Thr Tyr Val Ser Asn Leu Gln Glu Ile
 290 295 300
 Lys Lys Asn His Lys Lys Leu Leu Ser Ala Asn Lys His Val Lys Tyr
 305 310 315 320
 Leu Tyr Ile Pro Tyr Thr Asp Thr Val Val Val Val Thr Cys Asn Pro
 325 330 335
 35 Val Ser Lys Trp Ser Gly Pro Pro Lys Asp Lys Pro Lys Tyr Thr Thr
 340 345 350
 Asp Glu Ala Val Gln His Val Arg Asp Leu Tyr Arg Glu Ser Ile Val
 355 360 365
 40 Lys Tyr Arg Val Gln Asp Ser Gly Lys Lys Ser Pro Asp Ser Ser Glu
 370 375 380
 Pro Asp Ile Gln Glu Leu Ser Phe Thr Glu Leu Arg Asp Lys Leu Leu
 385 390 395 400
 Ala Leu Asp Pro Leu Asn Asp Val His Val Ala Lys Val Asn Gln Ala
 405 410 415
 50 Glu Ala Glu Phe Trp Lys Lys Ser Glu Gly Tyr Arg Val Gly Trp Ser
 420 425 430
 Asp Glu Ile Leu Gly Phe Asp Cys Gly Gly Gln Gln Trp Val Ser Glu
 435 440 445
 55
 60
 65

ES 2 285 327 T3

Ser Cys Phe Pro Ala Gly Thr Leu Ala Asn Pro Ser Met Lys Asp Leu
 450 455 460
 5
 Glu Tyr Ile Glu Glu Leu Lys Lys Leu Ile Glu Lys Glu Ala Ile Pro
 465 470 475 480
 Ala Pro Ala Pro Ile Glu Gln Arg Trp Thr Ala Arg Ser Lys Ser Pro
 485 490 495
 10
 Ile Ser Pro Ala Phe Ser Thr Ser Glu Asp Asp Ile Phe Ser Trp Val
 500 505 510
 Gly Ile Ile Met Tyr Leu Pro Thr Ala Asp Pro Arg Gln Arg Lys Asp
 515 520 525
 15
 Ile Thr Asp Glu Phe Phe His Tyr Arg His Leu Thr Gln Lys Gln Leu
 530 535 540
 Trp Asp Gln Phe Ser Ala Tyr Glu His Trp Ala Lys Ile Glu Ile Pro
 545 550 555 560
 Lys Asp Lys Glu Glu Leu Glu Ala Leu Gln Ala Arg Ile Arg Lys Arg
 565 570 575
 25
 Phe Pro Val Asp Ala Tyr Asn Lys Ala Arg Arg Glu Leu Asp Pro Asn
 580 585 590
 Arg Ile Leu Ser Asn Asn Met Val Glu Lys Leu Phe Pro Val Ser Thr
 595 600 605
 30
 Thr Ala
 610

- 35 <210> 2
- <211> 1833
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: *A. thaliana*
- 45 <400> 2

atgctccggc cacttcttct cgcagcctcc gtcggccatt ctctcggaac cctatctccg 60
 tcttcatcca ccatecggtc ctcatcttct cctcatcgta ctctctgca caccggtaaa 120
 50 acattgacac caccaccgcc gccaccgcca cgtcctccac ctccgcctcc ggccaccgcc 180
 tcagaagctc aattccgtaa atacgccgga tacgcagcac tcgctatctt ctctggagtt 240
 gctacctatt tctcatttcc attccctgag aatgctaaac acaagaaggc tcaaattctc 300
 cgttacgctc ctttacctga agatcttca actgtctcta attggagtgg tactcatgag 360
 gtacagacta ggaacttta tcaaccggag aatcttgctg atctcgaagc tcttgtaag 420
 55 gaatctcatg agaagaagtt aaggattcgt cccgttggat cgggtctctc gcctaattggg 480
 attggtttgt ctcgctctgg gatgggtaat ctggcgctta tggataaagt tctagaggtg 540
 gataaagaga agaagagat tacggtgcag gctgggatta ggtccagca attggttgac 600
 gccattaaag actatggtct tactcttcag aacttgcct ccattagaga gcagcagatt 660

60

65

ES 2 285 327 T3

5 ggtgggtatta ttcaggttgg ggcacatggg acaggtgcta gattgctccc lattgatgag 720
 caggtgatca gtatgaagct ggttaetccct gcgaagggaa caattgaact ttcaagagag 780
 aaagatccgg agctccttca tctagctcga tgtggccttg gtggacttgg agttggttgc 840
 gaggtcacc tccaatgcgt tgcaagacat gaacttgtgg aacacacata cgtctcaaac 900
 ttgcaagaaa tcaagaaaaa tcacaaaaaa ttgctctctg caaacaagca tgttaagtac 960
 ctatatattc cttataaccga cacagtcgtg gttgtaacat gcaatcctgt atcaaaatgy 1020
 agtggggccac ctaaggacaa accaaagtac actacagatg aggetgtaca gcatgtccgt 1080
 gatctctaca gagagagcat tgtgaagtat agggccagg actctggtaa gaagtctcct 1140
 10 gacagcagtg agccagacat acaggagctt tcatttacag agttgagaga caaactactt 1200
 gcccttgatc ctctcaatga cgttcacggtt gcaaaagtaa atcaagctga ggcagagttt 1260
 tggaaaaaat cagaaggata tagagttagg tggagtgatg aaattctggg ctttgactgt 1320
 ggtgggtcagc agtgggtgtc agaatcttgt tttcctgctg gaaccctcgc caaccctage 1380
 atgaaagacc ttgaatcacat agaagagctg aaaaaactaa tagaaaagga agcaatacca 1440
 gcacctgctc caatagagca gcgatggaca gctcgaagta agagcccat tagtcctgca 1500
 15 ttcagcactt cagaggatga tattttctca tgggttggtg taatcatgta cctcccagca 1560
 gcagaccctc gcccgagaaa ggacatcaca gatgaatctt tccactatag acatttgaca 1620
 cagaacaat tgtgggatca attttctgcg tatgaacatt gsgctaaaat tgagatacca 1680
 aaagacaaag aagaacttga agccttacag gcaagaataa gaaaacgttt cccagtggat 1740
 20 gcatacaaca aagcacgtag ggagctggac ccaaatagaa tcctctccaa caacatggtg 1800
 gaaaagctct tcccagctc caccactgct taa 1833

<210> 3
 <211> 600
 <212> PRT
 <213> *Brassica oleracea*
 <400> 3

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

ES 2 285 327 T3

Gly Leu Ser Pro Asn Gly Ile Gly Leu Ser Arg Ser Gly Met Val Asn
 145 150 155 160
 5 Leu Ala Leu Met Asp Lys Val Leu Glu Val Asp Lys Glu Lys Lys Arg
 165 170 175
 Val Arg Val Gln Ala Gly Ile Arg Val Gln Gln Leu Val Asp Ala Ile
 10 180 185 190
 Gln Glu Tyr Gly Leu Thr Leu Gln Asn Phe Ala Ser Ile Arg Glu Gln
 15 195 200 205
 Gln Ile Gly Gly Ile Ile Gln Val Gly Ala His Gly Thr Gly Ala Arg
 210 215 220
 Leu Pro Pro Ile Asp Glu Gln Val Ile Gly Met Lys Leu Val Thr Pro
 20 225 230 235 240
 Ala Lys Gly Thr Ile Glu Leu Ser Lys Asp Asn Asp Pro Glu Leu Phe
 245 250 255
 His Leu Ala Arg Cys Gly Leu Gly Gly Leu Gly Val Val Ala Glu Val
 25 260 265 270
 Thr Leu Gln Cys Val Glu Arg Gln Glu Leu Leu Glu His Thr Tyr Val
 275 280 285
 Ser Thr Leu Glu Glu Ile Lys Lys Asn His Lys Lys Leu Leu Ser Thr
 30 290 295 300
 Asn Lys His Val Lys Tyr Leu Tyr Ile Pro Tyr Thr Asp Thr Val Val
 35 305 310 315 320
 Val Val Thr Cys Asn Pro Val Ser Lys Trp Ser Gly Ala Pro Lys Asp
 325 330 335
 Lys Pro Lys Tyr Thr Thr Glu Glu Ala Leu Lys His Val Arg Asp Leu
 40 340 345 350
 Tyr Arg Glu Ser Ile Val Lys Tyr Arg Val Gln Asp Ser Ser Lys Lys
 355 360 365
 45 Thr Pro Asp Ser Arg Glu Pro Asp Ile Asn Glu Leu Ser Phe Thr Glu
 370 375 380
 Leu Arg Asp Lys Leu Ile Ala Leu Asp Pro Leu Asn Asp Val His Val
 50 385 390 395 400
 Gly Lys Val Asn Gln Ala Glu Ala Glu Phe Trp Lys Lys Ser Glu Gly
 405 410 415
 55 Tyr Arg Val Gly Trp Ser Asp Glu Ile Leu Gly Phe Asp Cys Gly Gly
 420 425 430

60

65

ES 2 285 327 T3

Gln Gln Trp Val Ser Glu Thr Cys Phe Pro Ala Gly Thr Leu Ala Lys
 435 440 445

5 Pro Ser Met Lys Asp Leu Glu Tyr Ile Glu Gln Leu Lys Glu Leu Ile
 450 455 460

Gln Lys Glu Ala Ile Pro Ala Pro Ser Pro Ile Glu Gln Arg Trp Thr
 465 470 475 480

10 Gly Arg Ser Lys Ser Pro Met Ser Pro Ala Phe Ser Thr Ala Glu Glu
 485 490 495

15 Asp Ile Phe Ser Trp Val Gly Ile Ile Met Tyr Leu Pro Thr Ala Asp
 500 505 510

Pro Arg Gln Arg Lys Asp Ile Thr Asp Glu Phe Phe His Tyr Arg His
 515 520 525

20 Leu Thr Gln Ala Lys Leu Trp Asp Gln Tyr Ser Ala Tyr Glu His Trp
 530 535 540

Ala Lys Ile Glu Ile Pro Lys Asp Lys Glu Glu Leu Glu Ala Leu Gln
 545 550 555 560

25 Glu Arg Leu Arg Lys Arg Phe Pro Val Asp Ala Tyr Asn Lys Ala Arg
 565 570 575

30 Arg Glu Leu Asp Pro Asn Arg Ile Leu Ser Asn Asn Met Val Glu Lys
 580 585 590

Leu Phe Pro Val Ser Lys Thr Ala
 595 600

35 <210> 4
 <211> 2064
 <212> ADN
 40 <213> *Brassica oleracea*
 <400> 4

45 aattcggcac gagctttcgc tggctcaggt ttcagatcgc ctgaaactaaa acaaaatgct 60
 ccgatcactt ctctctcggc gtcccaacgc ccgttcgctt cgacccccat ttccccctct 120
 ccgcactcta tgcacttccg gtcagacctt gactccagcc cctccaccgc cgcctcctcc 180
 tccaccgcgc atttcatcct ccgcctcaga aaaggagtcc cgtaaatacg ccggatacgc 240
 agcactcgcct ctcttctcgc gcgcgcgaac ttaacttctcc ttccccctcc ccgagaacgc 300
 50 caaacacaag aaggctcaga tcttccgata cgctcctctc cccgaagatc tccacaccgt 360
 ctctaactgg agtgggtactc acgaggtcca gaccaggaac ttaaccagc cggagactct 420
 cgccgatctc gaagctctcg tcaaggagc tcatgagaag aagaacagga tccgaccctg 480
 tggatccggt ctttccccca atgggatcgg tttgtctcgc tcggggatgg tgaatttggc 540
 gctcatggac aaggctcctcg aggtggataa agagaagaag agagtccgtg tgcaggctgg 600
 55 gattagggtt cagcagcttg ttgacgccat tcaagagtat ggtctcactc tccagaactt 660
 tgcttccatt agagagcagc agattgggtg catcattcag gttggggcac atgggacagc 720
 tgctagattg cctcctatcg atgagcaagt gattggcatg aagcttgtca ctctgtctaa 780

60
 65

ES 2 285 327 T3

gggaaactatt gagctttcta aggataatga tccggagctc tttcatcttg ctcgargtgg 840
 ccttgggtgga cttggagttg ttgctgaggt cacctccag tgcgttgaaa gacaggagct 900
 tttggagcac acttacgtct ccaccttggg agagatcaag aaaaatcaca aaaagtgtct 960
 5 ctctacaaat aagcatgtca agtacctgta tattccatat actgacacgg tcgtggttgt 1020
 tacatgcaac cctgtatcaa aatggagtgg ggcacctaa gacaaacca agtacactac 1080
 agaggaggct ttaaagcatg tccgtgacct gtatagagag agcattgtta agtatagggt 1140
 ccaggactct agtaagaaga ctctgacag tagggagcca gacattaacg agctttcatt 1200
 tacagagttg agagataagc tgattgccct agatcctctc aatgacgttc acgttggaag 1260
 10 agtgaatcaa gctgaggctg agttttggaa aaaatcagaa ggatacagag taggggtggg 1320
 tgatgaaatc ctgggctttg actgtggtgg tcaacagtgg gtatcagaaa cttgttttcc 1380
 tgctggaact ctgcgtaaac ctagcatgaa agaccttgag tacatagaac agctgaaaga 1440
 gttgatacaa aaagaagcaa taccagcacc ttctccata gaggagcgtt ggacaggccg 1500
 aagtaagagc cctatgagtc ctgcattcag cactgcagag gaggacattt tctcatgggt 1560
 15 tggtataatc atgtatctcc cgacagcaga cctcgccag agaaaggaca tcacggatga 1620
 atttttccac tatagacatt tgacacaggc aaaattgtgg gaccagtatt ctgcgtatga 1680
 acattgggct aaattgaga taccaaagga taaagaggaa cttgaagccc tacaagsaag 1740
 actcagaaaa cgattcccgg tggatgcata caacaaagca cgaagggagc tggaccctaa 1800
 cagaattctc tcaacaaca tgggtgaaaa gctcttccct gtctccaaga ctgcttaaaa 1860
 20 acattttcat caatagtttt tttgctcctt gaagtaccac ttttggaatc ctataacgtt 1920
 gcatctacaa gtgtttgtaa gaagagtgaa gccgatatat tggtcacaaa aaaagtttac 1980
 attgagtttt actactattt ttttttctgc agttcccctg aataaatata cttgttgttc 2040
 tattccaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2064

25 <210> 5
 <211> 526
 <212> PRT
 30 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 5

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

60
 65

ES 2 285 327 T3

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

ES 2 285 327 T3

Ala Thr Ile Tyr Arg Pro Phe Gly Cys Asn Thr Pro Ile His Lys Trp
 420 425 430

5 Phe Thr Leu Phe Glu Asn Thr Met Met Val Ala Gly Gly Lys Pro His
 435 440 445

Trp Ala Lys Asn Phe Leu Gly Ser Thr Thr Leu Ala Ala Gly Pro Val
 450 455 460

10 Lys Lys Asp Thr Asp Tyr Asp Asp Phe Glu Met Arg Gly Met Ala Leu
 465 470 475 480

15 Lys Val Glu Glu Trp Tyr Gly Glu Asp Leu Lys Lys Phe Arg Lys Ile
 485 490 495

Arg Lys Glu Gln Asp Pro Asp Asn Val Phe Leu Ala Asn Lys Gln Trp
 500 505 510

20 Ala Ile Ile Asn Gly Ile Ile Asp Pro Ser Glu Leu Ser Asp
 515 520 525

25 <210> 6
 <211> 1581
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

30 <400> 6

atgtctacta tcccathtag aaagaactat gtgttcasaaa actgggcogg aatttattct 60
 35 gcaaaaccag aacgttactt ccaaccaagt tcaattgatg aggttgcoga gttagtaaag 120
 agtgccaggc tagctgaaaa aagcttagtt actgttgggt cgggccattc tectagtaac 180
 atgtgcgcta ctgatgaatg gcttgtaaac ttagacagat tggacaaagt acaaaagttt 240
 gttgaatata ctgagttaca ttatgcogat gtcacagttg atgcccgtat gaggetttac 300
 caattgaatg aatttttggg tgcgaaaggt tactctatcc aaaatttagg ctctatctca 360
 40 gaacaaagtg ttgctggcat aatctctact ggtagtcatg gttcctcacc ttatcacoggt 420
 ttgatttctt ctcaatacgt aaacttgact attgtaaatg gtaagggcga attgaagttc 480
 ttggatgcog aaaaacgatcc agaagtcttt aaagctgctt tactttcagt tggaaaaaatt 540
 ggtatcattg tctctgctac tatcagggtt gttcccggct tcaatattaa atccactcaa 600
 gaagtgatta cttttgaaaa cttttgaaag caatgggata ccctatggac ttcatctgaa 660
 45 tttatcagag ttgtgtggta cccttatact agaaaatgtg ttctatggag gggtaacaaa 720
 actacagatg cccaaaatgg tccagccaag tcatgggtgg gtaccaagct gggtagattt 780
 ttctacgaaa ctctattatg gatctctacc aaaatctatg cgccattaac cccatttgg 840
 gaaaagttag tttcaacag gcaatattgg aaattggaga agagctctac tgggtgatgtt 900
 aatgttaccg attctatcag cggattlaat atggactgtt tgttttcaca atttgttgat 960
 50 gaatgggggt gccctatgga taatggtttg gaagtcttac gttcattgga tcattctatt 1020
 ggcagagctg ccataaasca agaattttat gtccacgtgc ctatggaagt ccgttgctca 1080
 aatactacat taccttctga acccttggat actagcaaga gaacaaacac cagtcccggg 1140
 cccgtttatg gcaatgtgtg ccgcccattc ctggataaca caccatccca ttgcagattt 1200
 gctecgttgg aaaatgttac caacagtcag ttgacgttgt acataaatgc taccatttat 1260
 55 atggtagcgg gaggtaaagc acattgggac aagaacttcc taggctcaac cactctagct 1380
 gctggaccag tgaaaaagga tactgattac gatgacttgg aaatgagggg gatggcattg 1440
 aaggttgaag aatgggatgg cgaggatttg aaaaagttcc ggaaaataag aaaggagcaa 1500
 gatcccagata atgtattctt ggcaaacaaa cagtgggcta tcataaatgg tattatagat 1560
 60 cctagtgagt tgtccgacta g 1581

<210> 7
 <211> 526
 65 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

ES 2 285 327 T3

<400> 7

5 Met Ser Thr Ile Pro Phe Arg Lys Asn Tyr Val Phe Lys Asn Trp Ala
1 5 10 15

Gly Ile Tyr Ser Ala Lys Pro Glu Arg Tyr Phe Cln Pro Scr Ser Ile
20 25 30

10 Asp Glu Val Val Glu Leu Val Lys Ser Ala Arg Leu Ala Glu Lys Ser
35 40 45

Leu Val Thr Val Gly Ser Gly His Ser Pro Ser Asn Met Cys Val Thr
50 55 60

15 Asp Glu Trp Leu Val Asn Leu Asp Arg Leu Asp Lys Val Gln Lys Phe
65 70 75 80

20 Val Glu Tyr Pro Glu Leu His Tyr Ala Asp Val Thr Val Asp Ala Gly
85 90 95

Met Arg Leu Tyr Gln Leu Asn Glu Phe Leu Gly Ala Lys Gly Tyr Ser
100 105 110

25 Ile Gln Asn Leu Gly Ser Ile Ser Glu Gln Ser Val Ala Gly Ile Ile
115 120 125

Ser Thr Gly Ser His Gly Ser Ser Pro Tyr His Gly Leu Ile Ser Ser
130 135 140

30 Gln Tyr Val Asn Leu Thr Ile Val Asn Gly Lys Gly Glu Leu Lys Phe
145 150 155 160

Leu Asp Ala Glu Asn Asp Pro Glu Val Phe Lys Ala Ala Leu Leu Ser
165 170 175

35 Val Gly Lys Ile Gly Ile Ile Val Ser Ala Thr Ile Arg Val Val Pro
180 185 190

40 Gly Phe Asn Ile Lys Ser Thr Gln Glu Val Ile Thr Phe Glu Asn Leu
195 200 205

Leu Lys Gln Trp Asp Thr Leu Trp Thr Ser Ser Glu Phe Ile Arg Val
210 215 220

45 Trp Trp Tyr Pro Tyr Thr Arg Lys Cys Val Leu Trp Arg Gly Asn Lys
225 230 235 240

50

55

60

65

ES 2 285 327 T3

Thr Thr Asp Ala Gln Asn Gly Pro Ala Lys Ser Trp Trp Gly Thr Lys
 245 250 255
 5
 Leu Gly Arg Phe Phe Tyr Glu Thr Leu Leu Trp Ile Ser Thr Lys Ile
 260 265 270
 Tyr Ala Pro Leu Thr Pro Phe Val Glu Lys Phe Val Phe Asn Arg Gln
 275 280 285
 10
 Tyr Gly Lys Leu Glu Lys Ser Ser Thr Gly Asp Val Asn Val Thr Asp
 290 295 300
 15
 Ser Ile Ser Gly Phe Asn Met Asp Cys Leu Phe Ser Gln Phe Val Asp
 305 310 315 320
 Glu Trp Gly Cys Pro Met Asp Asn Gly Leu Glu Val Leu Arg Ser Leu
 325 330 335
 20
 Asp His Ser Ile Ala Gln Ala Ala Ile Asn Lys Glu Phe Tyr Val His
 340 345 350
 Val Pro Met Glu Val Arg Cys Ser Asn Thr Thr Leu Pro Ser Glu Pro
 355 360 365
 25
 Leu Asp Thr Ser Lys Arg Thr Asn Thr Ser Pro Gly Pro Val Tyr Gly
 370 375 380
 30
 Asn Val Cys Arg Pro Phe Leu Asp Asn Thr Pro Ser His Cys Arg Phe
 385 390 395 400
 Ala Pro Leu Glu Asn Val Thr Asn Ser Gln Leu Thr Leu Tyr Ile Asn
 405 410 415
 35
 Pro Thr Ile Tyr Arg Pro Phe Gly Cys Asn Thr Pro Ile His Lys Trp
 420 425 430
 40
 Phe Thr Leu Phe Glu Asn Thr Met Met Val Ala Gly Gly Lys Pro His
 435 440 445
 Trp Ala Lys Asn Phe Leu Gly Ser Thr Thr Leu Ala Ala Gly Pro Val
 450 455 460
 45
 Lys Lys Asp Thr Asp Tyr Asp Asp Phe Glu Met Arg Gly Met Ala Leu
 465 470 475 480
 50
 Lys Val Glu Glu Trp Tyr Gly Glu Asp Leu Lys Lys Phe Arg Lys Ile
 485 490 495
 Arg Lys Glu Gln Asp Pro Asp Asn Val Phe Leu Ala Asn Lys Gln Trp
 500 505 510
 55
 Ala Ile Ile Asn Gly Ile Ile Asp Pro Ser Glu Leu Ser Asp
 515 520 525
 60

<210> 8

<211> 2138

65 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

ES 2 285 327 T3

<400> 8

```

5      cccatgtcta ctatcccatt tagaaagaac tatgtgttca aaaactgggc cggaaatztat 60
      tctgcaaaac cagaacgtta cttccaacca agttcaattg atgaggttgt ogagttagta 120
      aagagtgcc aagctagctga aaaaagctta gttactgttg gttcgggcca ttctcctagt 180
      aacatgtgcg ttactgatga atggcttggt aacttagaca gattggacaa agtacaaaag 240
      tttgttgaat atcctgagtt acattatgcc gatgtcacag ttgatgccgg tatgaggctt 300
10     taccaattga atgaattttt ggggtgcgaaa ggttactcta tccaaaatft aggtctctac 360
      tcagaacaaa gtgttgctgg cataatctct actggtagtc atggttcctc accttatcac 420
      ggtttgattt cttctcaata cgtaaacttg actattgtta atggtaaggg cgaattgaag 480
      ttcttgatg ccgaaaacga tccagaagtc tttaaagctg ctttactttc agttggaaaa 540
      atcggtatca ttgtctctgc tactatcagg gttgttcccg gcttcaatat taaatccact 600
15     caagaagtga ttacttttga aaaccttttg aagcaatggg atacctatg gacttcatct 660
      gaatztatca gagtttggtg gtaccttat actagaaaaat gtgttctatg gaggggtaac 720
      aaaactacag atgccccaaa tgggccagcc aagtcatggg ggggtaccaa gctgggtaga 780
      tttttctacg aaactctatt atggatctct accaaaatct atgcgccatt aacccccatt 840
      gtggaaaagt tcgttttcaa caggcaatac gggaaattgg agaagagctc tactggtgat 900
20     gttaatgtta ccgattctat cagcggattt aatatggact gtttgttttc acaatttgtt 960
      gatgaatggg ggtgcccctat ggataatggt ttggaagtct tacgttcatt ggatcattct 1020
      attgcgcagg ctgccataaa caaagaatft tatgtccacg tgcctatgga agtccgctgc 1080
      tcaaaacta cattaccttc tgaaccttg gatactagca agagaacaaa caccagctcc 1140
      ggtcccgttt atggcaatgt gtgcccacca ttcttgata acacaccatc ccattgcaga 1200
25     tttgctccgt tggaaaatgt taccaacagt cagttgacgt tgtacataaa tccctaccatt 1260
      tataggcctt ttggctgtaa tactccaatt cataaatggg ttacctttt tgaaaatact 1320
      atgatggtag cgggaggtaa gccacattgg gccagaact tcttaggctc aaccactcta 1380
      gctgctggac cagtgaaaaa ggatactgat tacgatgact ttgaaatgag ggggatggca 1440
      ttgaaggttg aagaatggta tggcgaggat ttgaaaaagt tccggaaaat aagaaaggag 1500
30     caagatcccg ataatgtatt ctggcaaac aaacagtggg ctatcataaa tggattata 1560
      gatcctagtg agttgtccga ctagtctctt tttgtctcaa taatctctat attttactaa 1620
      aaaagaatat atatatatat atttatatat agcagtgtga tgactgttca tgtacattct 1680
      aataactatt cctagctgcc tatcaaagac ttttttttga attagagctt tttagtaatc 1740
      atgggaccct tttttctttt cattatcctt actatagttt ttttttggaa aagcogaacg 1800
35     cggtaatgat tggtcgtata agcaaaaacg aaacatcggc atggcataac gtagatccta 1860
      tctacagggg agttttttaga aatcagatag aaatgtattt tgagtgtctg atatatgca 1920
      gtactttttt tctctctagg atttaagtat gtttagtatt aactcatatc acattttttc 1980
      tttgtaaaaa gcaaccattc gcaacaatgt cgatagtaga gacatgcata tcgtttgttt 2040
40     cgacaaatcc gttttatcca tttgtactg gattgcttct gaattgtgtg gttacaccgc 2100
      tttacttttg gaaaacgcaa aatggtagaa tctgtgtc 2138

```

<210> 9

45 <211> 440

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

50 <400> 9

```

      Met Val His Gly Tyr Lys Gly Val Gln Phe Gln Asn Trp Ala Lys Thr
      1             5             10            15

```

55

60

65

ES 2 285 327 T3

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

65

ES 2 285 327 T3

His Val Gln Asp Trp Ala Ile Pro Arg Glu Lys Thr Lys Glu Ala Leu
 305 310 315 320
 5 Leu Glu Leu Lys Ala Met Leu Glu Ala His Pro Lys Val Val Ala His
 325 330 335
 Tyr Pro Val Glu Val Arg Phe Thr Arg Gly Asp Asp Ile Leu Leu Ser
 340 345 350
 10 Pro Cys Phe Gln Arg Asp Ser Cys Tyr Met Asn Ile Ile Met Tyr Arg
 355 360 365
 15 Pro Tyr Gly Lys Asp Val Pro Arg Leu Asp Tyr Trp Leu Ala Tyr Glu
 370 375 380
 Thr Ile Met Lys Lys Phe Gly Gly Arg Pro His Trp Ala Lys Ala His
 385 390 395 400
 20 Asn Cys Thr Gln Lys Asp Phe Glu Glu Met Tyr Pro Thr Phe His Lys
 405 410 415
 Phe Cys Asp Ile Arg Glu Lys Leu Asp Pro Thr Gly Met Phe Leu Asn
 420 425 430
 Ser Tyr Leu Glu Lys Val Phe Tyr
 435 440
 30
 <210> 10
 <211> 2120
 <212> ADN
 35 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 10
 40 ggatcctcct gatcactgga atcatggtec atgggtacaa aggggtccag ttccaaaatt 60
 gggcaagac ctatggttgc agtccagagg tgtactacca gccacctcc gtggaggagg 120
 tcagagaggt gctggccctg gcccgggagc agaagaagaa agtgaaggtg gtgggtggtg 180
 45 gccactcgcc ttcagacatt gectgcactg acggtttcat gatccacatg ggcaagatga 240
 accgggttet ccaggtggac aaggagaaga agcagataac agtgyaagcc ggtatcctcc 300
 tggctgacct gcacccacag ctggatgagc atggcctggc catgtccaat ctgggagcag 360
 tgtctgatgt gacagttgct ggtgtcattg gatccggaac acataacaca gggatcaagc 420
 acggcatcct ggcactcag gtggtggccc tgaccctgat gacagctgat ggagaagttc 480
 tggaaatgtc tgagtcaaga aatgcagatg tgttccaggc tgcacgggtg cacctggggt 540
 50 gcctgggcat catcctcacc gtcaccctgc agtgtgtgcc tcagtttcag cttcaggaga 600
 cacccttccc ttcgaccctc aaagaggtcc ttgacaacct agacagccac ctgaagaggt 660
 ctgagtaact ccgcttctc tggtttctc aactgagaa cgtcagcate atctaccaag 720
 accacaccaa caaggcccc tectctgcat ctaactggtt ttgggactat gccatcgggt 780
 55 tctacctact ggagttcttg ctctggacca gcacctacct gccatgcctc gtgggctgga 840
 tcaaccgett cttcttctgg atgctgttca actgcaagaa ggagagcagc aacctcagtc 900
 acaagatctt cacctacgag tgtcgettca agcagcatgt acaagactgg gccatcccta 960
 gggagaagac caaggaggcc ctactggagc taaaggccat gctggaggcc caccocaaag 1020
 tggtagccca ctaccccgtg gaggtcgctg tcacccgagg cgatgacatt ctgctgagcc 1080
 60 cctgcttcca gagggacagc tgctacatga acatcattat gtacaggccc tatggaaagg 1140
 acgtgcctcg gctagactac tggctggcct atgagacct catgaagaag tttggaggaa 1200
 65

ES 2 285 327 T3

```

gaccccactg ggcaaaggcc cacaattgca cccagaagga ctttgaggaa atgtaccca 1260
cctttcacia gtictgtgac atccgtgaga agctggaccc cactggaatg ttcttgaatt 1320
cgtacctgga gaaagtcttc tactaaagca ggagtggaaa caaacccacc tgacccctca 1380
5 cacttetget gccccggggg gtctggggag cagagaagtg cctcacaagc acaatgggaa 1440
ctgacctctc ctctgacca caaagaaagg ctgggctctg ggccgggtcc tctctgcctt 1500
cggcatcatt tcccttacct ccaggcgaag aagtggcctc tcaactcaat tctgttagc 1560
atttccatgg gtcacacata aactgcaatc ctctcaggag aagggggatc cctgatacat 1620
10 catatctatc cagactaagg atgtggttct tcttagatc tatggctcca ccaggtatag 1680
agagattcct ggggctgca gttctccatc cctcttcaga agggaggat cccttggcga 1740
gagtttgget cagaggtggc atgaagcatg ctctgctctc tcttaccctt gaaggtcctt 1800
cggatgcccc gagatgtctg ctggctctgg gcaagccatc attcaaaccg gtccaacctg 1860
gccttctgtc tgccatggcc tgacctcgc agtgtctctt ccagaggtgt ttagagtgga 1920
15 actcgttca acctcttaac cagttgctga tccctgtgtt tctctccctt ctcttggag 1980
actactcttg gagggggatc ccaccatgct cttggctttc cctgggtatt gttctctct 2040
tcctcttcac aaatatgatt tcagtttgat ttgtggcctt tctggagtgt tccctggaga 2100
accaagatgt tccagctacc 2120

```

<210> 11

<211> 319

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 11

```

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

```

ES 2 285 327 T3

Leu Asp Ile Phe Thr Tyr Val Leu Asp Arg Val Pro Pro Gly Thr Val
 165 170 175
 5 Asp Val Ile Leu Ser Tyr Cys His Tyr Gly Val Asn Asp Ser Thr Leu
 180 185 190
 Leu Asp Leu Leu Pro Tyr Leu Lys Ser Lys Gly Val Gly Val Ile Ser
 195 200 205
 10 Ala Ser Pro Leu Ala Met Gly Leu Leu Thr Glu Gln Gly Pro Pro Glu
 210 215 220
 Trp His Pro Ala Ser Pro Glu Leu Lys Ser Ala Ser Lys Ala Ala Val
 225 230 235 240
 Ala His Cys Lys Ser Lys Gly Lys Lys Ile Thr Lys Leu Ala Leu Gln
 245 250 255
 20 Tyr Ser Leu Ala Asn Lys Glu Ile Ser Ser Val Leu Val Gly Met Ser
 260 265 270
 Ser Val Ser Gln Val Glu Glu Asn Val Ala Ala Val Thr Glu Leu Glu
 275 280 285
 Ser Leu Gly Met Asp Gln Glu Thr Leu Ser Glu Val Glu Ala Ile Leu
 290 295 300
 30 Glu Pro Val Lys Asn Leu Thr Trp Pro Ser Gly Ile His Gln Asn
 305 310 315

35 <210> 12
 <211> 960
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 40 <400> 12

45 atgacgaaaa tagagcttcg agctttgggg aacacagggc ttaaggtag cgccgttggg 60
 tttgggtgcct ctccgctcgg aagtgtcttc ggtccagtcg ccgaagatga tgccgctcgc 120
 accgtgegeg aggccttccg tctcgggtatc aacttcttcg acacctcccc gtattatgga 180
 ggaacactgt ctgagaaaaat gcttggttaag ggactaaagg ctttgcaagt ccctagaagt 240
 gactacattg tggctactaa gtgtggtaga tataaagaag gttttgattt cagtgetgag 300
 agagtaagaa agagtattga cgagagcttg gagaggcttc agcttgatta tgttgacata 360
 50 cttcattgcc atgacattga gtccgggtct cttgatcaga ttgtgagtga acaattcct 420
 gctcttcaga aactgaaaca agaggggaag acccggttca ttggtatcac tggctctccg 480
 ttagatattt tcacttatgt tcttgatcga gtgcctccag ggactgtcga tgtgatattg 540
 tcatactgtc attacggcgt taatgattcg acgttgctgg atttactacc ttacttgaag 600
 agcaaagggtg tgggtgtgat aagtgccttc ccattagcaa tgggctcct tacagaacaa 660
 55 ggtcctcctg aatggcacc cgttccct gagctcaagt ctgcaagcaa agccgcagtt 720
 gctcactgca aatcaaagg caagaagatc acaaagttag ctctgcaata cagttagca 780
 aacaaggaga ttcgctcggg gttgggtggg atgagctctg tctcacaggt agaagaaat 840
 gttgcagcag ttacagagct tgaagtctg gggatggatc aagaaactct gtctgaggtt 900
 60 gaagctattc tcgagcctgt aaagaatctg acatggccaa gtggaatcca tcagaactaa 960

<210> 13
 <211> 18
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 285 327 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: motivo I de la superfamilia de la aldo-ceto reductasa

5 <220> VARIANTE

<221>

<222> (2)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

10

<220> VARIANTE

<221>

<222> (4)..(5)

15

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<220> VARIANTE

20

<221>

<222> (7)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

25

<220> VARIANTE

<221>

<222> (9)..(13)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

30

<220> VARIANTE

<221>

<222> (15)..(17)

35

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 13

40

Gly Xaa Arg Xaa Xaa Asp Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa
1
5
10
15

Xaa Gly

45

<210> 14

<211> 30

<212> ADN

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

55

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR avanzado para la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa de *A. thaliana*

<400> 14

60

caagaaggcc taaatgttcc gttacgctcc

30

<210> 15

<211> 30

65

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 285 327 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR reverso para la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa de <i>A. thaliana</i>	
5	<400> 15	
	atgggccctt aagcagtggg ggagactggg	30
10	<210> 16	
	<211> 26	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR avanzado para la L-gulono-1,4-lactona oxidasa de <i>R. norvegicus</i>	
20	<400> 16	
	tgaggggtca ggggtggttg ttcca	26
25	<210> 17	
	<211> 28	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR reverso para la L-gulono-1,4-lactona oxidasa de <i>R. norvegicus</i>	
	<400> 17	
40	tggaatcatg gtccatgggt acaaagg	28
	<210> 18	
45	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR avanzado para la D-arabinono-1,4-lactona oxidasa de <i>S. cerevisiae</i>	
	<400> 18	
55	tttcaccata tgtctactat cc	22
	<210> 19	
60	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65		

ES 2 285 327 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR reverso para la D-arabinono-1,4-lactona oxidasa de *S. cerevisiae*

5

<400> 19

aaggatccta gtcggacaac tc

22

10

<210> 20

<211> 344

<212> PRT

15

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 20

20

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

His Pro Lys Thr Thr Glu Ile Tyr Phe Ser Leu Asn Asn Gly Val Arg
20 25 30

25

Ile Pro Ala Leu Gly Leu Gly Thr Ala Asn Pro His Glu Lys Leu Ala
35 40 45

30

Glu Thr Lys Gln Ala Val Lys Ala Ala Ile Lys Ala Gly Tyr Arg His
50 55 60

Ile Asp Thr Ala Trp Ala Tyr Glu Thr Glu Pro Phe Val Gly Glu Ala
65 70 75 80

35

Ile Lys Glu Leu Leu Glu Asp Gly Ser Ile Lys Arg Glu Asp Leu Phe
85 90 95

Ile Thr Thr Lys Val Trp Pro Val Leu Trp Asp Glu Val Asp Arg Ser
100 105 110

40

Leu Asn Glu Ser Leu Lys Ala Leu Gly Leu Glu Tyr Val Asp Leu Leu
115 120 125

Leu Gln His Trp Pro Leu Cys Phe Glu Lys Ile Lys Asp Pro Lys Gly
130 135 140

45

Ile Ser Gly Leu Val Lys Thr Pro Val Asp Asp Ser Gly Lys Thr Met
145 150 155 160

50

55

60

65

ES 2 285 327 T3

Tyr Ala Ala Asp Gly Asp Tyr Leu Glu Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Lys
 165 170 175
 5 Ile Tyr Leu Asp Pro Asn Asp His Arg Val Arg Ala Ile Gly Val Ser
 180 185 190
 Asn Phe Ser Ile Glu Tyr Leu Glu Arg Leu Ile Lys Glu Cys Arg Val
 195 200 205
 10 Lys Pro Thr Val Asn Gln Val Glu Thr His Pro His Leu Pro Gln Met
 210 215 220
 Glu Leu Arg Lys Phe Cys Phe Met His Asp Ile Leu Leu Thr Ala Tyr
 225 230 235 240
 15 Ser Pro Leu Gly Ser His Gly Ala Pro Asn Leu Lys Ile Pro Leu Val
 245 250 255
 20 Lys Lys Leu Ala Glu Lys Tyr Asn Val Thr Gly Asn Asp Leu Leu Ile
 260 265 270
 Ser Tyr His Ile Arg Gln Gly Thr Ile Val Ile Pro Arg Ser Leu Asn
 275 280 285
 25 Pro Val Arg Ile Ser Ser Ser Ile Glu Phe Ala Ser Leu Thr Lys Asp
 290 295 300
 Glu Leu Gln Glu Leu Asn Asp Phe Gly Glu Lys Tyr Pro Val Arg Phe
 305 310 315 320
 30 Ile Asp Glu Pro Phe Ala Ala Ile Leu Pro Glu Phe Thr Gly Asn Gly
 325 330 335
 35 Pro Asn Leu Asp Asn Leu Lys Tyr
 340

<210> 21
 <211> 1509
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 45 <400> 21

taacaatttc gtttactgaa aatgctacta gtatataatc attaagtatc taactatcac 60
 tcaataaaaa tattatagat cgcttaaaaa ctcgtttatt gccgattata aatccaccaa 120
 50 aagccgctct acccttacct ccgcctggaa aaattataat atataaagtg agcctcgtaa 180
 tacaggggta aaaaggaaag agggggatat caagcatctg gacttatttg cactatctcc 240
 gccttcaatt gataaaagcg tcttgatttt aatcaactgc tatcatgtct tcttcagtag 300
 cctcaaccga aaacatagtc gaaaatatgt tgcattccaaa gactacagaa atatactttt 360
 55 cactcaacaa tgggtgttcgt atcccagcac tgggtttggg gacagcaaat cctcacgaaa 420
 agtttagctga aacaaaacaa gccgtaaaag ctgcaatcaa agctggatac aggcacattg 480
 atactgcttg ggcttacgag acagagccat tcgtagggtga agccatcaag gagttattag 540
 aagatggatc tatcaaaaag gaggatcttt tcataaccac aaaagtgtgg ccggttctat 600

60

65

ES 2 285 327 T3

```

5   gggacgaagt ggacagatca ttgaatgaat ctttgaaagc tttaggcttg gaatacgtcg 660
    acttgctctt gcaacattgg ccgctatggt ttgaaaagat taaggacct aaggggatca 720
    gcggaactgg gaagactcgg gttgatgatt ctggaaaaac aatgtatgct gccgaacggg 780
10  actatttaga aacttacaag caattggaaa aaatttacct tgatectaac gatcatcggt 840
    tgagagccat tgggtgtctca aatTTTTcca ttgagtattt ggaacgtctc attaaggaat 900
    gcagagttaa gccaacgggt aaccaagtgg aaactcaccc tcaactacca caaatggaac 960
    taagaaagt ctgctttatg cacgacattc tgtaaacagc atactacca ttaggttccc 1020
    atggcgcacc aaacttgaaa atcccactag tgaaaagct tgccgaaaag tacaatgtca 1080
15  caggaaatga cttgctaatt tcttaccata ttagacaagg cactatcgta attccgagat 1140
    ccttgaatcc agttaggatt tctctgagta ttgaattcgc atctttgaca aaggatgaat 1200
    tacaagagt gaacgacttc ggtgaaaaat accoagtgag attcatcgat gagccatttg 1260
    cagccatcct tccagagttt actggtaacg gaccaaactt ggacaattta aagtatttag 1320
    acaacgactt tattttcact ttatttagtt cgcttcttaa tcttgtcaaa aacaagatat 1380
20  tgtgtaateg cctcaagtaa acaatatggt ttccatacgt gatttgaagt ttttaagtat 1440
    ctgaaataca tacgcgcgcg tatgcatatg tattagttaa attactcgaa tgtcctttat 1500
    ataataatta
    
```

<210> 22

20 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR avanzado para la L-galactosa deshidrogenasa de *A. thaliana*

30 <400> 22

atgacgaaa tagagcttcg agc

23

35 <210> 23

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR reverso para la L-galactosa deshidrogenasa de *A. thaliana*

45 <400> 23

ttagttctga tggattccac ttgg

24

50 <210> 24

<211> 24

<212> ADN

<223> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: *Saccharomyces cerevisiae*

60

<400> 24

atgtctctt cagtagcatc aacc

24

65 <210> 25

<211> 29

ES 2 285 327 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR reverso para la D-arabinosa deshidrogenasa de <i>S. cerevisiae</i>	
10	<400> 25	
	ttaatacttt aaattgtcca agtttggtc	29
15	<210> 26	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<221> VARIANTE	
	<222> (2)..(3)	
25	<223> Xaa = Cualquier aminoácido	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Motivo II de la Superfamilia de la aldo-ceto reductasa	
30	<404> 26	
	Gly Xaa Xaa Asn	
35	1	
	<210> 27	
	<211> 23	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR avanzado para la aldonolactonasa de <i>Z. mobilis</i>	
	<400> 27	
50	atgaccactg gtcgtatgtc tcg	23
	<210> 28	
	<211> 24	
55	<222> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primero PCR reverso para la aldonolactonasa de <i>Z. mobilis</i>	
	<400> 28	
65	ttaccagaaa ataagacca agca	24
	<210> 29	

ES 2 285 327 T3

<211> 320

<212> PRT

<213> *Zymomonas mobilis*

5

<400> 29

Met Thr Thr Gly Arg Met Ser Arg Arg Glu Cys Leu Ser Ala Ala Val
 1 5 10 15

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

Ala Glu Ala Ala Lys Asn Asn Met Asn Gly Ser Thr Ile Gly Lys Ile
 35 40 45

Thr Lys Phe Ser Pro Arg Leu Asp Ala Ile Leu Asp Val Ser Thr Pro
 50 55 60

Ile Glu Val Ile Ala Ser Asp Ile Gln Trp Ser Glu Gly Pro Val Trp
 65 70 75 80

Val Lys Asn Gly Asn Phe Leu Leu Phe Ser Asp Pro Pro Ala Asn Ile
 85 90 95

Met Arg Lys Trp Thr Pro Asp Ala Gly Val Ser Ile Phe Leu Lys Pro
 100 105 110

Ser Gly His Ala Glu Pro Ile Pro Ala Gly Gln Phe Arg Glu Pro Gly
 115 120 125

Ser Asn Gly Met Lys Val Gly Pro Asp Gly Lys Ile Trp Val Ala Asp
 130 135 140

Ser Gly Thr Arg Ala Ile Met Lys Val Asp Pro Val Thr Arg Gln Arg
 145 150 155 160

Ser Val Val Asp Asn Tyr Lys Gly Lys Arg Phe Asn Ser Pro Asn Asp
 165 170 175

Leu Phe Phe Ser Lys Ser Gly Ala Val Tyr Phe Thr Asp Pro Pro Tyr
 180 185 190

Gly Leu Thr Asn Leu Asp Glu Ser Asp Ile Lys Glu Met Asn Tyr Asn
 195 200 205

50

55

60

65

ES 2 285 327 T3

Gly Val Phe Arg Leu Ser Pro Asp Gly Arg Leu Asp Leu Ile Glu Ala
 210 215 220
 5 Gly Leu Ser Arg Pro Asn Gly Leu Ala Leu Ser Pro Asp Glu Thr Lys
 225 230 235 240
 10 Leu Tyr Val Ser Asn Ser Asp Arg Ala Ser Pro Asn Ile Trp Val Tyr
 245 250 255
 15 Ser Leu Asp Ser Asn Gly Leu Pro Thr Ser Arg Thr Leu Leu Arg Asn
 260 265 270
 Phe Arg Lys Glu Tyr Phe Asp Gln Gly Leu Ala Gly Leu Pro Asp Gly
 275 280 285
 20 Met Asn Ile Asp Lys Gln Gly Asn Leu Phe Ala Ser Ala Pro Gly Gly
 290 295 300
 Ile Tyr Ile Phe Ala Pro Asp Gly Glu Cys Leu Gly Leu Ile Phe Trp
 305 310 315 320

25 <210> 30
 <211> 963
 <212> ADN
 <213> *Zymomonas mobilis*
 30 <400> 30

35 atgaccactg gtcgtatgtc tcgtcgagaa tgcctttccg cagctgttat ggtgcctatc 60
 gccgctatga cagcaaccgc cactattaca ggatcagctg aggctgcaaa gaataatatg 120
 aacggatcta ccatcggtaa gattaccaaa ttttcacctc gccttgatgc tatttttagat 180
 gtctctacc ccaattgaggc cattgcatct gatattcaat ggtcagaagg ccctgtatgg 240
 gtcaaaaatg gcaatttccct gctgtttagt gatccgccc ccaatattat gcgtaaatgg 300
 40 acgocctgatg ccggtgtcag catcttccctg aaaccttcag gtcatgccga acccattccg 360
 gccggtcagt tccgtgaacc gggttccaac ggtatgaaag ttggccccga tggcaasatc 420
 tgggttgag acagtggcac gcgcgcgatc atgaaagtgg atccggtcac ccgtcagcgc 480
 agtgttgtcg ataactataa agycaaaccg tttaacagcc cgaatgacct cttcttctcg 540
 aagtcaggcg ctgtttattt caccgatccg ccctatggtc tgaccaatct tgatgaatcc 600
 gacatcaaag agatgaacta caatggtgtg ttccgtctct ctcccgatgg tcgttttagat 660
 45 ttgatogaag ctggctcttag ccgcccgaat ggtttggctc tgtccccgga tgaaacgaaa 720
 ctttatgttt ctaactcaga ccgcgccagc ccgaatatct gggtttattc tttggatagc 780
 aatggcttgc caaccagccg gactttgctg ccggaacttc gcaaggaata tttcgatcag 840
 ggtctcgccg gtcttccctga tggatgaat atcgacaaac agggcaatct ttttgcctct 900
 50 gctccggggcg gtatctatat ttttgcacca gatggcgaat gcttgggtct tattttctgg 960
 taa 963

55
 60
 65