



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 156 510**

② Número de solicitud: 009802352

⑤ Int. Cl.⁷: C12P 7/42

C12N 15/52

C12N 15/31

/(C12P 7/42

C12R 1:40)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **11.11.1998**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2001**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.2001

⑦ Solicitante/s: **Universidad de León**
Avda. de la Facultad, 25
24071 León, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

⑦ Inventor/es: **Miñambres Rodríguez, Baltasar;**
Rodríguez Olivera, Elías;
García Alonso, Belén;
García López, José Luis;
Ferrández Barca, Abel;
Díaz Fernández, Eduardo y
Luengo Rodríguez, José María

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Un procedimiento para la producción de ácido 2-hidroxifenilacético utilizando mutantes de la bacteria *Pseudomonas putida* U así como una cepa recombinante de *E.Coli* en la que se han introducido genes aislados de *Pseudomonas putida*.**

⑤ Resumen:

Un procedimiento para la producción de ácido 2-hidroxifenilacético utilizando mutantes de la bacteria *Pseudomonas putida* U así como una cepa recombinante de *E. coli* en la que se han introducido genes aislados de *Pseudomonas putida*.

La invención que se presenta, describe un procedimiento para la biotransformación del ácido fenilacético (al que en adelante denominaremos PA) en ácido 2-hidroxifenilacético (abreviadamente indicado como 2-HPA), utilizando mutantes de la bacteria *Pseudomonas putida* U interrumpidos en uno de los genes (*phl*) que compone la ruta catabólica de ácido fenilacético, así como el empleo de una cepa de *E. coli* recombinante en la que se han introducido, y se expresan, los genes aislados de *Pseudomonas putida* que codifican las enzimas responsables de esa biotransformación.

ES 2 156 510 A1

DESCRIPCION

Un procedimiento para la producción de ácido 2-hidroxifenilacético utilizando mutantes de la bacteria *Pseudomonas putida* U así como una cepa recombinante de *E. coli* en la que se han introducido genes aislados de *Pseudomonas putida*.

Sector de la técnica

La invención reivindica un procedimiento de biotransformación y por tanto se incluye en el área de Biotecnología y Biología Molecular de Microorganismos. En ella se describe la utilización de genes y enzimas de origen bacteriano para llevar a cabo la conversión, con microorganismos, del ácido fenilacético en ácido 2-hidroxifenilacético que es liberado al medio de cultivo. Este proceso presenta considerables ventajas respecto al procedimiento químico habitual ya que evita la contaminación ambiental generada como consecuencia de la utilización de disolventes y de reactivos que pueden ser tóxicos para los seres vivos.

Estado de la técnica

Las rutas degradativas de ciertos compuestos aromáticos (feniletilamina, estireno, diversos ácidos fenilalcanoicos de cadena par, etc) pueden generar como intermediario catabólico ácido fenilacético (PA) o ciertos derivados hidroxilados (Mohamed M. y Fuchs, G. Arch. Microbiol. 159, 554-562, 1993; Martínez-Blanco, H. Reglero, A. Rodríguez-Aparicio, L. B. y Luengo J. M., J.Biol. Chem. 265, 7084-7090, 1990; Prieto, M. A. y García, J. L. J.Biol. Chem. 269, 22823-22829, 1994). Sin embargo, el catabolismo del ácido fenilacético no ha sido aun totalmente esclarecido. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la bacteria *Pseudomonas putida* U asimila este compuesto mediante la utilización de una ruta catabólica nueva, constituida por catorce genes, que codifican otras tantas proteínas, y que se encuentran organizados en tres operones contiguos bajo el control de cinco promotores diferentes (Olivera, E. R., Miñambres, B., García, B., Muñiz, C., Moreno, M. A., Ferrández, A. Díaz E., García, J. L. y Luengo, J. M. PNAS 95, 6419-6424, 1998). Dentro de este sistema se agrupan 12 genes catabólicos y dos reguladores (Fig1). Las proteínas catabólicas están agrupadas en cinco unidades funcionales diferentes que a continuación se detallan. La primera unidad está constituida por un promotor (P₁) y cinco genes estructurales. Los cuatro primeros codifican dos enoil-CoA hidratasas (genes *phaA* y *phaB*), una acil-CoA-deshidrogenasa (gen *phaC*) y una cetotiolasa (gen *phaD*). El último gen (*phaE*) codifica una enzima con actividad fenilacetyl-CoA ligasica que cataliza el primer paso de la ruta y que rinde como producto fenilacetyl-CoA (Martínez-Blanco, H. Reglero, A. Rodríguez-Aparicio, L. B. y Luengo J. M., J.Biol. Chem. 265, 7084-7090, 1990). La segunda unidad se compone de varias proteínas, denominadas complejo de hidroxilación (genes *phaF* a *phaI*), que catalizan la introducción de un grupo hidroxilo en el anillo bencénico del fenilacetyl-CoA, generando 2-hidroxifenilacetyl-CoA que es hidrolizado a ácido 2-hidroxifenilacético (2-HPA). Todas ellas están bajo el control del promotor P₂ y constituyen el segundo operon. La tercera unidad (tercer operon), gobernada por el promotor P₃, está integrada por los genes *phaJ* y *phaK*, que codifican un sistema de transporte constituido por una permeasa y por una porina y por una tercera proteína (producto del gen *phaL*) que cataliza la apertura del anillo aromático y su transformación en un derivado acíclico. El producto así generado, es transformado en catabolitos generales por acción de las cuatro enzimas β -oxidativas incluidas en el primer operon. La regulación de la ruta parece estar ejercida por dos genes adicionales (*phaM* y *phaN*). El producto del gen *phaN* actúa como represor interaccionando con el promotor P₁, de modo que mutaciones en este gen implican la expresión constitutiva de la ruta y la pérdida del control mediado por represión catabólica. Al producto del gen *phaM* aun o ha podido serle atribuida ninguna función concreta (Olivera, E. R., Miñambres, B., García, B., Muñiz, C., Moreno, M. A., Ferrández, A. Díaz, E., García, J. L. y Luengo, J. M. PNAS 95, 6419-6424, 1998). Las secuencias correspondientes a todos estos genes están depositadas en el GenBank Database con el código de acceso AF029714. A pesar de ser numerosas las descripciones sobre la formación de derivados hidroxilados como consecuencia del catabolismo de compuestos aromáticos (Harayama S. y Timmis K.N. Genetics of Bacterial Diversity. Hopwood, D. A. y Chater, K. F.(eds) pp151-174. Academic Press; Kuge, Y. Mochida K. y Uwajima, T. Agric. Biol. Chem. 55, 1099-1104, 1991), las evidencias sobre existencia de 2-HPA como intermediario catabólico son escasas. Cooper y colbes (Cooper, R. A., Jones, D. C. N. y Parrot S. J.Gen Microbiol. 131, 2753-2757, 1985) pusieron de manifiesto la existencia de 2-HPA en caldos de cultivo de mutantes que habían sido alterados en la ruta degradativa del ácido fenilacético. Otras descripciones corresponden al acúmulo de este mismo compuesto en caldos de fermentación de *P. chrysogenum*, de *Aspergillus nidulans* y de otros microorganismos (Sujumaran M. y Vaidyanathan, C. S. FEMS Microbiol. Letters 5, 427-430. 1979; Lein, J. Overproduction of microbial metabolites: Strain improvement and process control strategies. Wanek, Z. y Hostalek, Z.(eds.) Butterworth Publish. 1986; Staudenmayer, H. R, Hauer, B., Ladner, W., Pressler, U. Y Meyer, J. Patente Alemana no. 4232522, 1994; Fernández-Cañón, J. M. y Peñalva, M. A. J. Biol. Chem. 270, 21199-21205, 1995). Sin embargo,

la obtención mediante síntesis química de 2-HPA está perfectamente establecida (Vallejos, J.C. y Yani C. Patente francesa no. 2686877, 1993) y se utiliza para la producción de este compuesto.

5 Parece, por tanto, interesante desarrollar sistemas bacterianos capaces de acumular naturalmente 2-HPA, o bien obtener cepas modificadas mediante ingeniería genética, capaces de catalizar la biotransformación del PA en 2-HPA. Este es el objeto de esta patente.

Descripción de la invención

10 Breve descripción de la invención

La presente invención describe un procedimiento mediante el cual se pueden obtener cepas productoras de 2-HPA tras mutar alguno de los genes implicados en el catabolismo de ácido fenilacético en la bacteria *Pseudomonas putida* U. Además, se reivindica la utilización de alguno de esos genes para transformar
15 otras bacterias con el objeto de obtener, por fermentación, 2-HPA a partir de PA o de precursores que conduzcan, por diversas rutas metabólicas, a este compuesto.

Descripción detallada de la invención

20 *Pseudomonas putida* U CECT 4848 (que posee resistencia natural a rifampicina) es capaz de asimilar eficientemente el ácido fenilacético cuando se cultiva en medios de cultivo que contienen como única fuente de carbono este compuesto (Martínez-Blanco, H. Reglero, A. Rodríguez-Aparicio, L. B. y Luengo J. M., J. Biol. Chem. 265, 7084-7090, 1990). Se procedió al aislamiento de mutantes de esta cepa incapaces de degradar este compuesto mediante mutagénesis insercional utilizando el transposon Tn5
25 (Selvaraj, G. Y Iyer, V. N. J. Bacteriol. 156, 1292-1300, 1983; Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. J. Bacteriol. 172, 6557-6567, 1990). Para ello se seleccionaron aquellos transconjugantes que cumplían los siguientes requisitos: (i) poseían la resistencia natural a rifampicina (Rif); (ii) habían adquirido la resistencia a kanamicina (Km) presente en el transposon y (iii) eran incapaces de crecer en medios de composición definida que contenían ácido fenilacético como única fuente de carbono, mientras que si lo hacían en aquellos otros medios que contenían como fuentes de carbono compuestos tales como glucosa,
30 ácido glucónico o ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA). En todos ellos se analizó el punto de inserción del transposón y posteriormente se construyeron diferentes sondas nucleotídicas que permitieron identificar las secuencias de los genes en los que este transposón se había insertado. Siguiendo técnicas habituales de Biología Molecular (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1989) se secuenciaron todos los genes necesarios para el catabolismo de PA y se identificaron los distintos marcos abiertos de lectura. Las secuencias obtenidas están depositadas en la Gen Bank/EMBL Data Bank tal y como se indicó anteriormente. Una vez establecidas las secuencias de los distintos genes y proteínas, así como su organización, procedimos al estudio de su análisis por separado, identificando los intermediarios acumulados cuando se expresaban grupos aislados de genes y combinaciones de los mismos. Comprobamos que mutaciones en alguno de los genes que componían el segundo operon, no modificaban el ácido fenilacético cuando esos mutantes se cultivaban en medios de composición definida (Martínez-Blanco, H. Reglero, A. Rodríguez-Aparicio, L. B. y Luengo J. M., J. Biol. Chem. 265, 7084-7090, 1990) que contenían PA (como fuente de posibles intermediarios) y 4-HPA (que soporta el crecimiento celular). Las rutas de degradación de PA y 4-HPA son diferentes (Olivera, E. R., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Fernández-Medarde, A., Moreno, M. A. y Luengo, J. M. Eur. J. Biochem. 221, 375-381, 1994) y por tanto mutaciones en la específica de PA no afectan al crecimiento en 4-HPA. Además, observamos que cuando el PA se substituía por diferentes compuestos tales como los ácidos 6-fenilhexanoico, 8-feniloctanoico o por la feniletilamina se acumulaba en los caldos de cultivo PA, lo que sugería que todos esos componentes eran catabolizados, por diferentes vías, hasta PA. Sin embargo, cuando se utilizaron como fuentes de carbono, ácido benzoico, tirosina, fenilalanina o los ácidos 5-fenilvalérico, 7-fenilheptanoico o 9-fenilnonanoico no se detectó acumulo extracelular de PA. Aquellos otros mutantes alterados en alguno de los genes del tercer operon, acumulaban 2-HPA cuando se cultivaban en medios mínimos que contenían como fuentes de carbono PA, feniletilamina o ácidos fenilacéticos que poseían un número par de átomos de carbonos. La mayor cantidad de 2-HPA acumulada se observó cuando se mutó en gen *phaL*. Comprobamos también que mutaciones en el gen *phaE*, que codifica la fenilacetil-CoA ligasa, impedía la degradación de feniletilamina pero si permitía el crecimiento de esos mutantes en aquellos medios en los que la fuente de carbono eran ácido 6-fenilhexanoico u 8-feniloctanoico. Estos resultados sugerían que la ligasa era necesaria solo para el catabolismo de aquellos compuestos que conducen a PA mientras que no para aquellos otros que, por alguna vía, llegasen a fenilacetil-CoA. Todos los resultados anteriormente expuestos permitieron concluir (i) que la ruta de PA comienza con la activación de este compuesto a fenilacetil-CoA; (ii) que posteriormente, este compuesto se hidroxila a
60

2-HPA, y (iii) que finalmente se produce la apertura del anillo bencénico, generando un intermediario acíclico que se transforma en metabolitos generales.

Además, identificamos los genes responsables de la síntesis de 2-HPA; concluyendo que el gen *phaE* (que codifica la ligasa) y todos los incluidos en el segundo operon (*phaF* a *phaI*) eran requeridos para la síntesis de este metabolito.

Descripción de las figuras

Figura 1. Organización genética y mapa de restricción de la ruta catabólica de ácido fenilacético en *Pseudomonas putida* U. P₁-P₅. promotores; *phaA-phaL*, genes catabólicos; *phaN*, gen regulador; *phaM* gen sin función conocida.

Figura 2. Esquema de las diferentes construcciones genéticas realizadas para lograr la síntesis de ácido 2-hidroxifenilacético en *Escherichia coli*. pKB y pKB2, plásmidos derivados de pBluescript II KS modificados para facilitar la correcta expresión de genes de *Pseudomonas putida* U bajo efecto del promotor de la β -galactosidasa. pKBSBLig, construcción realizada en el plásmido de expresión pKB que contiene el gen *phaE* que codifica la enzima fenilacetil-CoA ligasa. pKB2Ox, construcción realizada en el plásmido pKB2 que contiene los genes que codifican las enzimas implicadas en la oxidación del fenilacetil-CoA a 2-hidroxifenilacetil-CoA. pLOx, construcción realizada en el plásmido pKB2 que contiene los genes que codifican la fenilacetil-CoA ligasa y el complejo enzimático responsable de la oxidación del fenilacetil-CoA.

Ejemplos de realización de la invención

En los ejemplos detallados a continuación, se exponen las investigaciones realizadas para desarrollar esta patente.

Ejemplo 1

Secuenciación de la ruta catabólica para ácido fenilacético de Pseudomonas putida U (CECT 4348)

A partir de los distintos mutantes incapaces de degradar el ácido fenilacético por inserción del Tn5 se constituyeron genotecas que nos permitieron la secuenciación ulterior de todos los genes de la ruta. La técnica utilizada se basa en la utilización de oligonucleótidos sintéticos cebadores descrita por Sanger y colbes (Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson A. R. PNAS, 74, 5463-5467, 1977). Para ello se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante del Taq DNA polymerase initiated cycle sequencing kit (Applied Biosystem Inc.). Las reacciones de secuencia fueron analizadas en un secuenciador automático, modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystem Inc.). La secuencia de los genes que componen la ruta requerida para la degradación de PA se describe en la SEQ ID NO 1 de la siguiente forma:

- pha N, secuencia codificante en la cadena complementaria entre el nucleótido 1025-1948,
- pha M, secuencia codificante en la cadena complementaria entre el nucleótido 2026-2625,
- pha A, secuencia codificante entre el nucleótido 2869-3750.
- pha B, secuencia codificante entre el nucleótido 3785-4576.
- pha C, secuencia codificante entre el nucleótido 4579-6096.
- pha D, secuencia codificante entre el nucleótido 6249-7742.
- pha E, secuencia codificante entre el nucleótido 7864-9183.
- pha F, secuencia codificante entre el nucleótido 9399-10388.
- pha G, secuencia codificante entre el nucleótido 10703-11461.
- pha H, secuencia codificante entre el nucleótido 11448-12047.
- pha I, secuencia codificante entre el nucleótido 12047-12982.
- pha J, secuencia codificante entre el nucleótido 13457-15019.
- pha K, secuencia codificante entre el nucleótido 15038-16291.
- pha L, secuencia codificante entre el nucleótido 16316-18382.

Ejemplo 2

Disrupción de gen phaL en P. putida U y análisis del producto acumulado en los caldos de cultivo

5 A partir de un fragmento interno del gen *phaL* obtenido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando dos oligos degenerados (5'-CGCCCGGAATTTCGCCGAAGCCGTCGAC-3' y 5'-CAGGTCGAATTCTTCGCTGTCTGG-3' se obtuvo un fragmento EcoRI-EcoRI de 704 pares de bases (SEQ ID NO 2) que se clonó en el plásmido pk18::mob (Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Tierbach, G. y Pühler A. Gene 145, 69-73, 1994). Esta construcción fue empleada para disrupir el gen *phaL* en *P. putida* U por recombinación homóloga mediante "mating" triparental (Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K.N. J. Bacteriol. 172, 6557-6567, 1990). Los transconjugantes se seleccionaron en medio complejo (Luria-Bertani) (Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1989) al que se suplementaban los antibióticos Km (25 µg/ml) y Rif (20 µg/ml). Todas aquellas colonias que eran resistentes a ambos antibióticos se replicaron en medio complejo y en medio mínimo (Martínez-Blanco, H. Reglero, A. Rodríguez-Aparicio, L. B. y Luengo J. M., J. Biol. Chem. 265, 7084-7090, 1990) que contenía como fuente de carbono 4-HPA (5mM) y en una tercera placa que contenía el mismo medio mínimo pero en el que el 4-HPA se había substituido por PA (5 nM). Todos los medios llevaban los antibióticos descritos a la concentración indicada. Las colonias que no crecían en el medio que llevaba PA, se analizaron mediante técnicas de ingeniería genética (Sambrook, J., Fritsch E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1989) para corroborar que la construcción se había insertado en el lugar correcto. Más del 90% de las colonias aisladas contenían un gen *phaL* disrupto por el plásmido pk18::mob. Uno de estos mutantes (*P. putida*: pk18::mob CECT 5058) fue utilizada para comprobar el intermediario acumulado.

25 Esta bacteria se cultivó en medio de composición definida (Martínez-Blanco, H. Reglero, A. Rodríguez-Aparicio, L. B. y Luengo J.M., J. Biol. Chem. 265, 7084-7090, 1990) al que se suplementaba ácido fenilacético (5 mM) como precursor de intermediario y 4-HPA (5 mM) para soportar el crecimiento celular. A los medios se añadieron siempre los antibióticos Km y Rif a las concentraciones indicadas. Los anóculos se realizaron con 1 ml de suspensión bacteriana ($DO_{540nm} = 1.0$) y se procedió a su incubación en un agitador orbital (200 rpm) a 30°C, en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad que contenían 100 ml del medio requerido. Posteriormente, se procedió a tomar muestras de los caldos de cultivo en distintas etapas de la curva de crecimiento. En estas condiciones la DO_{540nm} alcanzada por el cultivo fue 1,5-1,8 a las 40 h. El análisis de los caldos de cultivo (de los que se habían eliminado las células por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min a 4°C) reveló la presencia de PA y 2-HPA. La determinación de estos compuesto se realizó mediante cromatografía líquida de alta definición (HPLC) utilizando el equipo y metodología indicado por Olivera y colbes. (Olivera, E. R., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Fernández-Medarde, A., Moreno, M.A. y Luengo, J. M. Eur. J. Biochem. 221, 375-381, 1994) así como por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando como revelador vapores de yodo (Sujumaran M. y Vaidyanathan, C. S. FEMS Microbiol. Letters 5, 427-430, 1979). En estas condiciones los hidroxí-derivados del PA adquieren temporalmente una coloración amarilla mientras que no lo hacen aquellos otros derivados de este compuesto que no poseen grupos hidroxilo en el anillo. Para este último método (TLC) utilizamos placas de Silica-Gel (HPTLC Fertiglplatten Kieselgel 60, 10 x 10, Merck) y como sistema de desarrollo eter saturado de H₂O (que contenía sulfato amónico 28% -p/p-) y metanol en proporciones relativas 50:25:5. En estas condiciones los R_fs para 4-HPA, 3-HPA, PA, 2-HPA, 3,4-diH-PA y 2,5-diH-PA fueron 0,72, 0,68, 0,67, 0,60, 0,55 y 0,302 respectivamente. El PA, que no se tiñe con vapores de yodo, se identificó tras cromatografiar una muestra marcada con ¹⁴C (Sigma). Las cantidades de PA y 2-HPA presentes en los caldos se cuantificaron por HPLC (Olivera, E. R., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Fernández-Medarde, A., Moreno, M.A. y Luengo, J. M. Eur. J. Biochem. 221, 375-381, 1994) frente a patrones comerciales. Observamos que las proporciones de ambos compuestos iban variando a lo largo de la curva de crecimiento. A tiempo cero de cultivo solo había PA mientras que a las 40 h (o a tiempos superiores) más del 70% del PA se había transformado en 2-HPA. Estos resultados indicaban que la disrupción del gen *phaL* tenía como consecuencia inmediata la transformación de PA en 2-HPA, producto que se acumulaba en los caldos de cultivo debido a que la bacteria es incapaz de utilizar este compuesto como fuente de carbono. La identidad del 2-HPA fue confirmada mediante espectroscopía de masas utilizando un equipo Q-Mass (Perkin-Elmer) acoplado a un cromatógrafo de gases modelo Autosystem (Perkin-Elmer). Las muestras obtenidas de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos, se ajustaron a pH 3.0 con HCl y la disolución resultante se extrajo con un volumen equivalente de acetato de etilo. La fase orgánica se separó y se secó con sulfato sódico anhidro bajo corriente de N₂. El residuo obtenido se disolvió en 0,05 ml de piridina suplementada con 3-etilvanilina (a una concentración de 4mg/ml) como patrón interno. Alicuotas de 0.0125 ml de esta solución se trataron durante 30 min. a 80°C con 0.020 ml de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida como agente derivatizante. Las muestras así preparadas fueron inmediatamente utilizadas, revelándose la existencia de 2-HPA.

Ejemplo 3

Estudio de la producción de ácido 2-HPA por una cepa de *E. coli* en la que se han introducido los genes de *P. putida* U necesarios para la síntesis de este compuesto

3.1. Construcciones genéticas realizadas

Utilizando los oligos degenerados correspondientes a la zona del ATG y del TGA del gen *phaE*, que a continuación se detallan, se procedió a amplificar, utilizando DNA genómico de *Pseudomonas putida*, por PCR este gen. Los oligos utilizados fueron:

Oligonucleótido correspondiente a la zona del ATG

5'-ACGAATTCGAGGTGAAGCCATGAACAGGATCCATGATG. Este oligonucleótido lleva la secuencia Shine-Dalgarno GAGG, el ATG del gen y la secuencia modificada que permite generar un corte BamHI. Además, existe una secuencia de corte EcoRI: GAATTC. Todas esas secuencias se han subrayado.

Oligonucleótido correspondiente a la zona del TGA

5'-CGAGAATTCAGCCGAATGAATCAGCTGGCC-3' (tanto las secuencias inversa y complementaria correspondiente al triplete TGA como la secuencia modificada para introducir un corte EcoRI, se han subrayado).

El fragmento amplificado (SEQ ID NO 3), se dirigió con la enzima de restricción EcoRI y se clonó en el plásmido comercial pBluescriptKS (pBSKS) (adquirido de la casa comercial Stratagene). La construcción obtenida fue usada para transformar la bacteria *E. coli* DH5 α . En esa construcción el gen *phaE*, que codifica la enzima fenilacetil-CoA ligasa (SEQ ID NO 4), está bajo el control del promotor del gen que codifica la β -galactosidasa. Se comprobó la orientación correcta del gen *phaE* valorando actividad fenilacetil-CoA ligásica en diversos transformantes (Martínez-Blanco, H. Reglero, A. Rodríguez-Aparicio, L. B. y Luengo J. M., J.Biol. Chem. 265, 7084-7090, 1990) crecidos en medio LB + ampicilina (100 μ g/ml). De aquellas cepas que mostraban actividad ligásica, se extrajo plásmido, y una vez comprobada que la construcción era correcta, se utilizó para las etapas siguientes. A este plásmido se le denominó pKSBLig (ver Fig. 2). A continuación, el plásmido pKSBLig se dirigió con la enzima Bam HI y se religó (Sambrook, J., Fritsch E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning (SHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). Al plásmido resultante, que ya no contiene el gen *phaE*, pero que mantiene una secuencia de corte EcoRI la secuencia Shine Dalgarno del gen *phaE* y la reconocida por la enzima BamHI, se le denominó pKB (Fig. 2). Este se dirigió con la enzima SpeI, los extremos cohesivos generados se hicieron extremos romos utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Amersham) y, finalmente, se religó la construcción con la DNA ligasa del fago T4 (Amersham). El plásmido resultante denominado pKB2 (ver Fig. 2) posee: (i) la secuencia Shine-Dalgarno del gen *phaE*; (ii) el ATG de ese mismo gen y (iii) permite seleccionar colonias con color blanco o azul cuando los transformantes que lo contienen crecen en medios que contienen X-gal (Sambrook J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1989) ya que el péptido α de la β -galactosidasa se expresa desde el ATG del gen *phaE*, utilizando la secuencia Shine-Dalgarno de ese mismo gen. Esta construcción se utilizó posteriormente para clonar, en los sitios de restricción BamHI-XbaI, el producto obtenido por PCR que contiene la información genética requerida en *P. putida* U para la hidroxilación del anillo bencénico presente en el ácido fenilacético.

Los genes que integran el complejo de hidroxilación que introduce un hidroxilo en la posición 2 del anillo del PA, se obtuvieron por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos degenerados:

Oligonucleótido correspondiente a la zona de ATG del primer gen

5' CGCATCGGATCCACGCACAGCTAG 3' (que contiene una secuencia de corte BamHI en el oligo degenerado. Ver secuencia subrayada).

Oligonucleótido correspondiente a la zona del TGA del último gen

5' GGTGCCTCTAGAAGCGGGG 3' (subrayado se indica un corte XbaI).

Se amplificó un fragmento de 3,6 kilopares de bases (kb) (SEQ ID NO 5), que comprende los genes *phaF*, *phaG*, *phaH* y *phaI* que codifican para las enzimas respectivas (SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 Y SEQ ID NO 9) y este producto se digirió con las enzimas de restricción BamHI y XbaI (Sambrook J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y se clonó en el plásmido pKB2 antes indicado (ver Fig. 2). Esta construcción genética se denominó pKB2Ox.

Por otra parte el plásmido pKSBLig se digirió con la enzima EcoRI y se recuperó el fragmento de 1,3 Kb que contiene el gen *phaE*. Este fragmento se clonó en el plásmido pKB2Ox digiriendo previamente este último con EcoRI. El plásmido obtenido se denominó pLOx y contiene el gen *phaE* y los genes que codifican las enzimas responsables de la hidroxilación en posición 2 del anillo aromático del PA (ver Fig. 2) comprendidos en la SEQ ID NO 10. Con él se transformaron células de *E. coli* DH5 α '. Los distintos transformantes que contenían el gen *phaE* en la orientación correcta, se identificaron valorando la actividad fenilacetil-CoA ligasica (Martínez-Blanco, H. Reglero, A. Rodríguez-Aparicio, L. B. y Luengo J. M., J.Biol. Chem. 265, 7084-7090, 1990). Estos transformantes se utilizaron posteriormente (ver mas adelante) para estudiar *in vivo* la biotransformación de PA en 2-HPA.

3.2. Estudio de la producción de 2-HPA por células de *E. coli* DH5 α ' transformadas con el plásmido pLOx

Una suspensión acuosa de *E. coli* DH5 α ' transformada con el plásmido pLOx CECT 5059) (DO_{540nm} = 1) se utilizó para sembrar los distintos medios de cultivo. Un ml de suspensión bacteriana se utilizó para sembrar matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 50 ml de los siguientes medios:

- a) Luria-Bertani (Sambrook J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) + Ampicilina (100 μ g/ml) + 2.5 mM PA
- b) Un medio con la siguiente composición (g/l): glicerol, 5; casaminoácidos (Difco) 1; NaH₂PO₄, 6; K₂HPO₄ 3; NH₄Cl, 2.14; NaCl, 0.5; ZnCl₂ 0.125 10⁻³; CoCl₂ 0.5 10⁻³; NiCl₂ 6H₂O 0.05 10⁻³; HBO₃ 0.75 10⁻³; MnCl₂4H₂O 0.075 10⁻³; CuCl₂ 2H₂O 0.025 10⁻³; NaMoO₄ 2H₂O 0.075 10⁻³; MgSO₄ 0.12; ampicilina 1.10⁻³ y ácido fenilacético 0.34.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un agitador orbital modelo Gallemkamp, a 250 rpm, a 37°C, durante diferentes tiempos (0-60 h). A diferentes intervalos se tomaron muestras y se analizaron por HPLC y TLC, cuantificándose por HPLC las cantidades de PA y 2-HPA presentes en los caldos de cultivo. Comprobamos que en los dos medios se producía 2-HPA.

Lista de secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE LEON, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> Un procedimiento para la producción de ácido 2-hidroxifenilacético utilizando mutantes de la bacteria *Pseudomona putida* U así como una cepa recombinante de *E. coli* en la que se han introducido genes a

<130> 2-HPA

<140> 9802352

<141> 1998-11-11

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20255

<212> ADN

<213> *Pseudomonas putida* U

ES 2 156 510 A1

<220>
<221> gene
<222> Complement((1025)..(1948))

5 <220>
<221> gene
<222> Complement((2026)..(2625))

10 <220>
<221> gene
<222> (2869)..(3750)

15 <220>
<221> gene
<222> (3785)..(4576)

20 <220>
<221> gene
<222> (4579)..(6096)

25 <220>
<221> gene
<222> (6249)..(7742)

30 <220>
<221> gene
<222> (7864)..(9183)

35 <220>
<221> gene
<222> (9399)..(10388)

40 <220>
<221> gene
<222> (10704)..(11462)

45 <220>
<221> gene
<222> (11449)..(12048)

50 <220>
<221> gene
<222> (12048)..(12983)

55 <220>
<221> gene
<222> (13457)..(15019)

60 <220>
<221> gene
<222> (15038)..(16291)

ES 2 156 510 A1

<220>
<221> gene
<222> (16316)..(18382)

5 <220>
<221> gene
<222> Complement((18828)..(20195))

10 <400> 1

15 gatcacccecc tggccctcgc gcactggatg cagggacccc tttgtttgca tcgttccgca 60
gttttcttgc ccatgcatgc tcttggactg gtcaccccgcc ccagttgccc agactcgggc 120
tgatttccga tgcgcgaagg aggcctgaac atgtctggcc aactgaaagt cacgctgctc 180
20 gaacagcctg cttcgcctcc gggtcacctg aaaccgctgg cgacgctgtg ccgtgattgt 240
cgggtcagcg gcttgtgcct gccaccgggt ttgccctcgc acgacaatag ctgcctgggc 300
tcgctgatcg ggccgcgat gcgcatccgc aaaggcacgg cgctgttcaa tgccaatgat 360
25 cccttgacca tgctctatgc cgtgcgctgc ggcagtttca agaccagcct caacagcgtc 420
gagggccagg gtgtcgtgat caacttctgg atgccgggcg acgtgctcgg gctggatgcc 480
30 atcgctacag atcaccatgt ctgcgacgcg atcgcctcgg aagatagcga agtctgcccg 540
gtcccctatc gtcgcctgca agcgctggcg cgcgactttc cggccttgca gcaaagcctg 600
35 aaccgcttga tgagccggga gatcgtacgt gaacacgagc gcgtgctgat gttgtgcaac 660
ctcaccgccc aacagcgcct ggccagtttt ctgatcgggc tgtcccggcg cttcgtcaac 720
cgtggetact ccgcccattg cttcatgtta cgcattgccc gcgaggacat agcatcctac 780
40 ctgggcctgc gcctggagac cgtatgccga tcggctgccc gattgcgtgc gcaagacgtc 840
gtcagcctgc acggcaggct ggtggaaata ctcgacatgc cagcattgat ggcggtcgag 900
45 caaggcggcc ttgacgggta acgcaagcac tccccgaaag caccatgctc gacaccctga 960
agccctgccg ccgcccggct gagaacctc gccatcaccg acctgcaggg tgtagcattt 1020

50

55

60

ES 2 156 510 A1

ttgttcaggc cagcccgcca aagcgtggt agaaaccctc gttcacatcc ggcaaaggcc 1080
 5 cgtcggcogt ctccagggct gcattcagcc actcctctgc cttggcaaac accagccgat 1140
 acaggttgcg gcacaactgc cgcgcagccc ttccctccca gtcccctggc agcagctcgt 1200
 10 ctggcagttg cgggtcgcgc aacagcagge ggcggtactc gtgaatcagc aggggtgcgcg 1260
 ccaggaaaca atcttgcgca tcgagcagtt gctgctcttt caggctctgc cacagcggcc 1320
 tgaacagctg gatgaactcg ctgtactgct gcccagctc atcgatacgc cagctctccc 1380
 15 gcacctgggc gcgcatggcc ttggacgcga gcacttctct ggtgtgggtt tcgaagacga 1440
 tactgtcgtc gctggcttcc aggtcacgca aggttgcggt cagatcagcg cggctctgcc 1500
 gtgggcagcc aagcaggttc ggcgccataa cgccaaacc ctgccattcc agctcttcac 1560
 20 gcaaggcctt gcgcttgccg gcctcaagct gcgacagcaa caccagcgtc caggcgccat 1620
 cccaggccgg ttggtcggg ctgtagacac gtttgaaggc tttttcgaaa cggcggcggc 1680
 25 cagtgcccggt caggctgtag taactgcgtc ggccaacttt ttcagcgggtg agccaaccct 1740
 ctttggtgag gcgaaagatc gacgtgcgga tcagtcgttc gttgatgccg atcggctcca 1800
 gcaggttgat caggctaccc agccagaccg gtcccccatg gggctcgatg gcacgcogt 1860
 30 acaaggtgat gatcagtgag ctggcgcgga ttggcgtctg ctctgaaag cgagtgatca 1920
 ggttgttcag tggggcaaga ttgctcatgg gcgaaactgt cgcggatcaa gcaccgacta 1980
 35 tacctgtcgc gcgggcccgc tgaccattgc gtgacgctac caggctcatg ccgaagcctg 2040
 gcctttgggc cgtacaccgg tatcttccat gcgcgggcgc cctggttcgg cttcgcccaa 2100
 tggcgggcat tcgaccatgc tgttcatgca gcgctgcgcc aggtgctyat actccgcagt 2160
 40 accgcgctgc ttccaggcca actcctgttc gctcaagggc cgtttgacct gggccggoga 2220
 ccccatcacc aggctctgcg cttcacatgc gaagccggct ttgacgaacg ccgtcgccgc 2280
 gacgatgcag cgtggtgcga catgggcgcc atocatcacc acagcgttca tgccgatcaa 2340
 45 ggcgtctcgg cccactttgc agccgtgcaa caccgcgcca tgaccaacat gcccgtttcg 2400
 ttcgaccacc gtgtcgccac ccggaaaacc atgcattaca cagggtctct gcaagttggc 2460
 50 gccctcttcc agcagatgc ggcgaaaatc acccctgagc gatgccaagg gccctatgta 2520
 gcaacgtggg ccgacgatga cgtcgccaat cagtactgcg cttgggtgca cgtaggctgt 2580
 ggggtgaacc acaggcgtca agccgtccag tcgatagcaa ggcataaag ctccagaaat 2640
 55 gatttgaaat ggcacccgat cttgtatcaa aaaatatttc gtcgtcaatc ggcgtagtcg 2700
 tgtatcgctt tctcatggct aagatcctcc tgaaaaccta gcaacaaat cagcaatctc 2760
 60 gccattatca gcgctgaata cggcatttgc actgcacgac agcaacacta tcattgacac 2820

ES 2 156 510 A1

tatgagatac acgaaacaat ttctgatggt gcatttccgt atcgcgtaat gcatatactc 2880
5 accccacctg gtcgtgatcc atcgtcacgc ccctgcaaac aattccaaga aatgccggcc 2940
cacgatgtgc cgtgcgtgca gccagaggaa cccgacatgc cgcgatatct cgacgtgcag 3000
gcccggaaa acggcgttca gctcattacc ctgcaacggc ccgaggcact gaatgccctg 3060
10 tgtaccgagt tactggcaga gctggccact gcgctcgacg cagccgcccg ggatgaccag 3120
ataggcgttg ttgtgctcac cggcagccgc aaggcgttcg ccgaggcgc tgacatccgt 3180
15 gaaatggccg agcgcgacct ggtcggcatc ctcaacgacc ctcgagtagc cactggcaa 3240
cgcatcgccg cctttgcaa gccgctgatt gctgcggtca acggtacgc cctgggtggc 3300
ggttgccaat tggatgatgtg tgccgacatc gtcacgcccg gcagcgacgc ccgcttcggc 3360
20 cagccggaga tcaacctcgg catcatcccc ggtgctggcg gcacacagcg cctggtgcgt 3420
gccgtcggca agccgctggc catgcagatg gtgctgaccg gcgaagccat caccgcccgt 3480
25 cacgcccagc aagccggcct ggtcagcga ataaccagc ccgaattcac cgtagaacgc 3540
gccatgcaga tcgcccga catcgccgc aaggcgccgc tggcagtgcg cctggcaaaa 3600
gaggcgctgc tcaaggccgg tgataccgac ctggccagtg gcctgcgctt cgaacgccat 3660
30 gcattcacc cgtctggccgg caccgcccgc cgtgacgaag gcattcagge ctttcaggaa 3720
aagcggccgg cgcgctcca aggcgctga tcatttacc ctcgactgac ggagcgagtc 3780
35 tgtcatgact ttccagca tctctgttct catcgaggac ggcgtggcct tctctctctt 3840
gaaccgcccc gagcagctga acagcttcaa cgcgccatg caccttgaag tgcggaagc 3900
cctcaagcaa gttcgccaga gcagtgatgc acgggtgctg ttgctgacgg ctgagggccg 3960
40 cggcttttgc gccggccagg acctgtccga ccgtaacgtc gctccagacg ccgaggtgcc 4020
agacctgggc gaatcgatcg acaagttcta caaccgctg gtgcgaccc tgcgcgacct 4080
gocgctgccc gtgatctgtg cggtaaatgg tgtggccgc gcgcccgtg ccaacatccc 4140
45 actggcctgc gacctggtg tggccggggc atcggccagc ttcattcagg cattttgcaa 4200
gatcggcctg gtgcccgact ctggtggtac ctggttgctg ccgcccctgg tcggcatggc 4260
50 gggggctaaa gactggcca tgctgggca gcggcttggg gccgaacagg cccagcaatg 4320
ggggctgatc caccgctgg tggacgatgc gcacctgcgc gacgaagccc tcaccctcgc 4380
togccagctc gccagccagc ccacctatgg cctcgcgctg atcaagcgca gcctcaatgc 4440
55 cagtttcgac aacggcttcg atgaacaact ggaactcgag cgcgacctgc aacgcttggc 4500
cgggcgcagc gaggactacc gtgaaggcgt gaggccttc atgaacaagc gcacaccgc 4560
60 attcaagggg cgctgaacat gggcgactc gcaagcacag tgcaagtagc ggtgatcggc 4620

ES 2 156 510 A1

gccggtgcca tggggcggcgg catcgcccag gtcgcccgcc aggccggtca cccggtaaag 4680
 5 ctttacgaca accgcccggg ggctgcccgc caggcagtgg ccggtataga acggcaactc 4740
 gcccggtctg tggaaaaagg caagctgctg gccgtagagc gcgaaatgat cagccttcgg 4800
 ctatgcccgg tcgacacgct cgaagcattg gctgatgccg gcctggtgat cgaagccatc 4860
 10 gtcgagaacc tgcaggtcaa gcaggcgtc ttcagccagc tagaagccct gtgcacggct 4920
 gattgcataa ttgccagcaa cacttcgtcg ctgtccatta ccagcctggc tgcaggcctt 4980
 15 gcacgcccgc agcaggtggt gggcatgcac ttcttcaacc cggcaccgct gatggcgtg 5040
 gtcgaggtgg tgtcaggcct ggcaaccgaa ccggccgtgg ccgctgtat ctacgacacc 5100
 gcccaggcct ggggcaaaca gccggtgcac acgogctcga caccgggctt tatcgtcaac 5160
 20 cgtgtggcac ggccttteta tgccgagagc ctgcccctgc tacaggaagg agcagcggac 5220
 tgcgccagcc ttgatgcgct gcttcgcat gccgggtggt tccgcatggg ggcgttcgag 5280
 cttaccgact tgatcggcca cgacgtcaac tacgccgta cgtgctcagt gttcgtatcg 5340
 25 ttctatgggg acttcgctt ccagccttca ctggtgcaaa aagagctggt ggatgccggc 5400
 cgctcggcc gcaagactgg gcaaggcttc tatagctacg ccgaaggcgc cgagcgcct 5460
 30 gcaccggctg aattgcacag ctccaccaag gccgaagcct gcgttatcga ggggcaactg 5520
 ggtgtacttc agccactggt cgagcgcctg cgcagaacg gcatcgtcgt gaccagcgt 5580
 gccggtagcg gcgtgatcca ggtcggtgat gccaccctgg cattgtccga tggccgctc 5640
 35 gccagccagc gcgcccgtga agatgggctg cgcaacctgg tgctgctcga tctcgcgtg 5700
 gactacagca ctgctcgcg gatggccatc agctggctgg gcgataccac cgaaagcgc 5760
 40 cgcgaccagg cggtgccct gctgcagcgg gccggcctca aggtcactgc ggtcgcgcac 5820
 ctgcccggcc tgggtgtact gcgcacagtg gcaatgctcg ccaacgaagc cgctgatgca 5880
 gtgctgcagg gcgtcggcag cgccgcccac atcgacctgg ccctgcgcgc cgggtgcaat 5940
 45 taccctcgcg gcccgctggc ctggggcagc aacatcggta ttgccacac cctgcgcgtg 6000
 ctcgacaacc tgcagcgcag ctatggcgag agccgctacc gcccttcct gttgttacgt 6060
 50 cgctgcgagg ccaaaggagg caccctgcat gactgaacte gaactggcac acgctgtgc 6120
 cgacgccatg tatgcccgcg acccgccac tcagggcctg ggcatcagcc tgctggatgc 6180
 cggcccgggc cgggcaagcc tgcgtatgac ggtacgcgcc gacatgatcc agggccacgg 6240
 55 cacgtgccat ggggggttc tottcgctc cgccgactcg gcgtttgctt ttgctgtaa 6300
 cagctatgac caggccaccg tggcgctggg ctgcagcatt gactacctgg ccccgcgctt 6360
 60 gcgcatgac gtgctcaccg ccgacgccag cgaggtcagc cgcaaaggcc gcaccggcct 6420

ES 2 156 510 A1

gtacgacgtg cgcatccaca accagcgcgg tgagctggtg gcgatgttcc atggcaaate 6480
 5 ctacaaagtg cgcggcaccg tgctggcgca ggagacacaa catgactgaa cccaccctcg 6540
 ccgatgcctt gatcatcgac gccgtgcgca ccccatcgg ccgctatgcc ggggccttga 6600
 gcggcgtacg tgccgacgac ctcgcccgca tcccactgaa ggccttgatc cagcgccacc 6660
 10 ccgagcttga ctggaagcg atcgacgacg tgatcctcgg ctgtgccaac caggccggcg 6720
 aagacaaccg caacgtggcg cacatggcca gctgctggc cgggctgccg atggaagtgc 6780
 15 cggggaccac gatcaaccga ctgtgtggtt cgggcctgga cgccatcggc aacgcgccc 6840
 gcgccctcgg ctgcygtgaa gccgggctga tgctggctgg cggcgtagag tcgatgtcgc 6900
 gtgcccatt cgtgatgggt aagtcggagc aggcgttcgg ccgcgacgcy gagttgttcg 6960
 20 acaccacat cggttggcg ttcgtcaacc cactgatgaa ggetgcctac ggcaccgatt 7020
 cgatgccgga aaccgccgag aacgtggctg aacagtttg catttcccgc gtcgatcagg 7080
 25 atgcottcgc cctgcgcagc cagcacaagg cggctgcagc tcaggcctgc ggcgcctgg 7140
 cgcaagaaat cgtaccggtc gagatcccgc agcgtaaagg accggccaaa cgggtggagc 7200
 acgacgagca tccgcgcggc gacacgacgc tggaaact ggcccgcctc ggcacgccat 7260
 30 tccgtgaggg cggcagcgtc accgccggca atgcctcgg cytcaacgac ggcgcctgtg 7320
 ccctgctgct ggcagcagc gccgctgccc ggcgccatgg cctgaaagcc cgcggccgta 7380
 tcgtcggcat ggcggtggcc ggggttgagc cgcgctgat gggcatcggc ccggtaccgc 7440
 35 caaccoggaa ggtgcttgag cttacgggat tgctggtggc cgacctcagc gtcacgaac 7500
 tcaacgaagc gttcgcgcc cagggcttg cagtgttgcy cgagctggc ctggccgacg 7560
 40 acgacccccg ggtcaaccgc aacggcggag ccacgcctc cggccatccg ctgggcatga 7620
 gtggtgcgcy gctggttaca accgcctcc acgagctgga agcaaccgcc gggcctatg 7680
 ccctttgac catgtgcatc ggggttgcc aaggcatagc catggtcatc gagcgcctct 7740
 45 gagcggatca gaccatcagc ctgttaccga accgaacgca gccgtatatg ctgcgctcat 7800
 gacactcacc gcgtggcttg caaccgctgg cgcgcggcgt acaagaacaa ttcgagtga 7860
 50 gccatgaaca tgtaccatga tgccgaccgt gccctgttg acccgatgga aaccgccagt 7920
 gtcgacgccc tgcgccagca ccagctggag cgcctgcgct ggagcctgaa gcacgcctac 7980
 gacaatgtgc cgtgtaccg ccagcgttt gccgaatgcy ggcgccacc cgcacacctc 8040
 55 acgtgcctgg aagacctgcy gaagttcccc ttcaccggca agaacgacct ggcgcacaac 8100
 taccctacg ggatgttcgc cgtccccag gaagagtgcy tgcgctgca tgcttcagc 8160
 60 ggcaccaccg gcaagccgac ggtggtcgggt tacaccaga atgacatcaa cacctgggcc 8220

ES 2 156 510 A1

aatgtcgtgg cgcgctcgat ccggtcggcc ggcgggcgca agggtgacaa agtgcattgt 8280
 5 tcctacggct atgggctttt cactggcggg cttggtgccc actacggcgc cgagcgcctg 8340
 ggctgtacgg taatcccgat gtcgggtggc cagaccgaga agcaggtgca gctgatccgc 8400
 gaacttcagc ccgacatcat catggtcaca ccgtcctaca tgctcaacct ggccgacgag 8460
 10 atcgagcgc agggcatcga cccgcatgac ctcaagctac gcctgggcat tttcggtgcc 8520
 gaaccttga ccgatgaact acgtcgtcgc atcgagcagc gcctgggcat caatgccctc 8580
 15 gacatctatg gtttgcgga aatcatgggc cccggggtgg ccatggaatg catcgaaacc 8640
 aaggacggcc cgaccatatt ggaagaccac ttctaccccg aaatcatcga cccggtcacc 8700
 ggcgaagtat tgccagacgg tcagctgggc gaactggtgt tcacctcgt aagcaaagag 8760
 20 gcgcttcgga ttgtgcgcta ccgcaccgt gacctaccc gcctgctgcc cggcaccgcc 8820
 aggccgatgc ggcggatcgg caagattacc gggcgcagt acgacatgct gatcattcgc 8880
 25 ggcgtcaacg tgttcccagc ccagatcgag gaacaggtat taaaaataaa acagctttcc 8940
 gagatgtatg agattcattt gtatcgcaat ggcaacctgg acagcgtaga ggtgcatgta 9000
 gagttgcgtg cggagtgcc aacacctgat gaaggccagc gcaagctggt tatcggggag 9060
 30 ctgagcaaac agatcaagac ctacatcggc atcagcacc aggtgcacct gcaggcttgc 9120
 ggcacgctca agcgttcgga gggcaaggcg tgccacgtgt acgacaaacg gttggccagc 9180
 35 tgattcattc ggctgcctct tcggcccgg catagtccgg ggctttttt tgcgttttat 9240
 gcgcttctgc aggtgcccgc caaccctgt ggcagcgggt ttacctgca agggccgaa 9300
 aagcgataca caaatcttat ttgatacacc taaaactgtt tgacgttgtg ttttgtatcg 9360
 40 cttacaaatg actcatgcct tagcaggagt cgcagcaca gtacgcacag ctagtggaaa 9420
 ccggagtcaa gcgcgtaaag tcgctggaag aatgtccc cgaggaacgc aacttccagg 9480
 45 aaaagatcga cgccgaaatc aagatcgaag ccaagaactg gatgcccag gcctaccgcc 9540
 agaccttgat ccggcagatt tcccagcag cccactcgg aatcgtcggc atgctgcccg 9600
 aaggcaactg ggtcaccgc gcgcctagcc tcaagcga gctgcaactg atggcaaaga 9660
 50 tccaggacga ggccggccac ggctgtacc tgtacagcgc catggagacc ctgggcccgc 9720
 accgcgacga ggagatcgc aagctgcaca gcggcaaggc gaagtattcg agcatcttca 9780
 actacccac cctcagctgg gccgacatgg gcgcagtgg ctggctggtg gatggggccg 9840
 55 ctatcgtcaa ccaggtggtg ctgcagcga cctcctatg cccctactc cgcgcaatg 9900
 ttcgtatctg caaggaagag agctttcacc agcgcaggc ctacgaaatc ctctgacca 9960
 60 tgatgcgtca cggcacacag gccagcgcg acatggtcca ggacgcgatc aatgcctgt 10020

ES 2 156 510 A1

ggtggccatc gctgatgatg ttcggcccca gcgacgaaca ctccccgaac agcgcacagt 10080
 5 ccatggcctg gaagatcaag cgccagacca acgatgaact gcgccagcgt ttcacgcacc 10140
 agaccgtgcc gcagctcgaa ctgctcggtt gcaccgcccc cgaccctgaa ctgaagtgga 10200
 acgccgagcg cggtcactac gacttcggcg aatccagtg ggacgagttc tacgaagtga 10260
 10 tcaagggcaa cggcccgtgc aaccaggaac gtgtcgccac ccgccgcaag gccatcgagg 10320
 acggcgctg ggtacgcgag gccgcgtgg cctacgcgcy caagcaacag aacaagaacg 10380
 15 cgcctgagc ggcgattgat gcggagatcg aaaatgtctg tctggaccct ctacgaagtg 10440
 ttcgtgcyca gcaagcacgg ccttaaccac aagcatgtcg gcagcgtgca cgcgccgac 10500
 gccccatgg ccatcgaaaa tgcccgcgag ctgtacacc gccgcagcga gggcgtcagc 10560
 20 ctgtgggtag tgccctcggc gctgatcacc gcctcctccc ccgacgagaa agaccgcctg 10620
 ttcgctcctt cggacgacaa ggtctaccgc catgccagct tctacgagct gcccgatgaa 10680
 gtccgacaca tgtgaggttg gtcacgaca acgaagcct gatcccttac ctggtgctgc 10740
 25 tcggcgacag tgccctggtc caaggccagc gcctctgcga atggtgtggc cagccccctg 10800
 ccatcgaaga agagctggcc ctgatgaacg ttggcctgga cctggtcggc caggccccga 10860
 30 actggctgga atacgcagcc gaactgcttg acgacggtcg cgacgccgac gccctggcct 10920
 tccgccgaga cgagcgcgcc taccgcaacc tgctgctggt cgagcaacc aacggtgatt 10980
 tcgccgtgac catgaccaag cagttcctt acgacgcctg gcacttcgcc gtgctacagg 11040
 35 gcctggtcgg gtcccgcgac gacgctatcg ccggtatcgc cgccaaggca ctcaaggaag 11100
 tcacctacca cctgcgccgt tccagcgagt gggtagcgc tatggggggc ggtacagaac 11160
 40 aaagccgcca acgcatgctc gccgccatc cggcactgtg gcgcttcacc gtcgaactga 11220
 cggccgccag cgacaacgag gtgcggttg ccgaagcggg tattgccgct gccccggcaa 11280
 ctgtgggtgc cgcgtggctc aacaggtga gcgagactt cgcttcggtc gagctgccc 11340
 45 tgcccaaggc tgccagccac ttctacctgg acagtcgcaa aggcctgcac accgagcacc 11400
 tgggcctgct gctggccgag atgcagtcc tgccaagggc ttaccccgat gcaacctggt 11460
 50 gagctgattg ccggcgaccg tggcgcgcg ccgccacgc gcgacgacct ggccccggcc 11520
 tgggaggtcc ttgccaggt catggaccgc gaagtgcctg tggtcagcgt ggtcgacctg 11580
 ggaatagtcc gcgacctga ctggcgccc gccacctgc acctggtggt cacgccgacc 11640
 55 tactccggtt gcccgccac cgaggtgatc gagggtgata tccgccaggc gctggagcag 11700
 gcgggcttcc ccgcaaccga tcttgagcgc cggttgacct cggcctggag caccgactgg 11760
 60 atcagcgagc tgggcccgca gcgcctgcgc ctctacggca tcgctccgcc gcaaggcagc 11820

ES 2 156 510 A1

gccagcaagc gcagcctgct aggtgaaaca ccccaggtgt gctgcccagc tgcccagtg 11880
 5 cccataccga attgctcagc cagttcggct ccaccgcttg caaggcgctg tacgctgccg 11940
 cgagtgcctg gagccgttcg actatttcaa atgcatttga gccgtggaga acgcatgag 12000
 ccagtttcac agcctgacca tcaagcaagt gcgcaacgaa acccgtgatg cggtttcgat 12060
 10 tgccttcgac gtgcccgagc acctgcagcg ccgtgcagga cggcgagctg cgcgtggccc 12120
 tcaagcgcgt gccaggcggg cgtttctcgg cgtttgcaa tgaagtgctc aaggccggcc 12180
 15 agcaactgga ggtgatgccc ccagcgggca gcttcttcgt gccgtggac getgcccgcc 12240
 agggcaatta cctgggcgtg gccgctggtg gcggcattac cccaatcctg tcgattattg 12300
 gcaccaccct ggacagtgag ccgcacagct gcttcacctt gctgtacggc aaccgctcca 12360
 20 gctctggcgc gctgttccgc gacaagctcg aagacctgaa aaaccgctac etcgaccggc 12420
 tgaacctgat tttcgtgttc agccgcgagc agcaggatgt cgacctgtac aacggtcgcg 12480
 25 tcgatgcgga caaatgcggc cagctgttct cccgttggct ggatgtgcca ggccctggacg 12540
 ccgccttcat ctgcggcccg caggcgatga ccgaaaccgt gcgtgacagc ctgcaggcca 12600
 atggcctggg caaggagcgc attcatttcg agctgttcgc cgcgcggcgc agcgaaaccc 12660
 30 gccgcgaagc ccgtgaggcc gcgcaccagg tggattccgc gctcagccac atcaaccgtga 12720
 tcagcgacgg ccgtgccttc accttcgact tgccacgcaa caccagaac gtgctggacg 12780
 ctggcaatgc catcgggtgc gaactgcctt actcgtgcaa ggccggcgtg tgctcgacct 12840
 35 gcaaatgccg ggtgatcgag ggggaagtgg aaatggacag caaccatgcc ttggaagact 12900
 acgaagtggc agccgggtat gtgctgtcgt gccagaccta cccggtgagc gacaaggtgg 12960
 40 tgctcgactt cgaccagctt taagaccgcc ccgcctgctt cgcggggccc cccgctccca 13020
 caggcaccgc acaaaggctg aggacaacat cctccctgtg ggagcgggca tgcccgcgaa 13080
 gaggcccttt gcaataccgc aacaccgcg tgacctcaac aaaacaatta caaaaccaag 13140
 45 agatcgcttg ccatgacacc cgaacacata gaaagcatcg ccaaccaccc cgatttccaa 13200
 cacctggtgc ggcgtaaacg ccgcctcaac ggcagcctga ccctggccat gctggtgatc 13260
 50 tactacggct tcgtcctggt ggtggcgttc tctcccagca cgcttgcca atcccttagc 13320
 ggcggtgtga ccacagtccg catgctggtg ggggtgctga tgggtgctgct gtccttcgcc 13380
 ctgaccggca tctacgtaca ccgcgccaac aatgtgctcg acccgtcaa cgaaaaggtc 13440
 55 aagcaggagt gcgcacaatg aactggaccg ccatctcgat gttcatggtg ttcgtctgct 13500
 tcaccctgct ggtcaccgcg tggcgggcct tgcgaccccg ttcggccagc gacttctata 13560
 60 ccgcccgtgg gggcctgacc ggcattgcaga acggcctggc gattgccggc gacatgatca 13620

ES 2 156 510 A1

gcgccgctc cttcctgggc atttccgcga tgatgttcat gaacggctat gacggcctgt 13680
 5 tgtatgccct gggcgtgctg gccggctggc cgatcattct gttcctgatc gccgaacgcc 13740
 tgcgcaacct gggcaagtac acctttgccg acgtagttag ttaccgcctg gcacaaacct 13800
 cggtgcgcct gacttcggcg ttccggcacc ttggtcgtggc gctgatgtac ctggtggcgc 13860
 10 agatggtcgg cgccggcaag ctgatcgagc tgctgttcgg catcagctac ctgtacgccg 13920
 tgatgctggg cgggtgactg atggttgect atgtcacctt cggcggcatg ctgccacca 13980
 15 cctgggtgca gatcatcaag gcggtgatgt tgctgtcggg caccagcttc atggccttca 14040
 tgggtgctca gcacttcggc ttcagcaccg aagccatggt cggcagcgcc gtcgccgtgc 14100
 atgccaaggg ccaggccatc atggccccgg ggggcttgct gtccaatccg gtggatgcca 14160
 20 tttccctggg cttgggcatg atgttcggca ccgccggcct gccgcatatc ctgatgcgct 14220
 tctttaccgt cagtgcgcc aaggaagccc gcaagagcgt gttctacgcc actggtttca 14280
 25 tcggttactt ctacctgctg ctgatcgta tcggctttgg tgccatcgtg atggtcggca 14340
 ccgagccgct ctaccgcgac gcgaccggtg caatcattgg cggcggcaac atgatcgccg 14400
 tgcacctggc ccaggctgct ggtggcaacc tgttccttgg cttcatctcc gctgtggcct 14460
 30 ttgccaccat cctagccgct gtcgccggcc tggcgtgctc cggcgcctcg gcggtctccc 14520
 acgacctgta tgccctgctg atccgccaag gcaaggccac cgagcaggaa gaaatgcgcy 14580
 35 tatecgtat cgccaccctg ctgatcggcc tgctggcggg gctgcttggc ctgatgttcg 14640
 agtcgcagaa catgccttc ctgtccggcc tgggtgctggc ggtggctgcc tcggtcaact 14700
 tcccggtaet gtcctttctg atgttctgga agggcctgac cactcgcggc gcggtgtgcy 14760
 40 gcagcatggc cggcctggcg tcggcggctg tgctggtggg attgggcccg gcagtgtggg 14820
 tcaacgtgct gcatcacgag aaagcgtgct tcccgtacag caaccggcg ttgttctcca 14880
 tgagcctggc attcctcagt gcgtgggtgt tctcggttac cgacagctcc gaacgtgcca 14940
 45 gtgaagaacg aggcgcctac ctggcccagt tcatccgctc catgaccggt atcggcgtg 15000
 ccggcgccag caagcactga cctcaaggac gaacaacct gtcgggtaaa acaacaaca 15060
 50 tgaaccgcac tcacttcatg tcagctgcct gcctggccac ccttgcgctg ccagtgcgg 15120
 cgatggccga tttcatcggc gacagccacg cacgcctgga gctgcgcaac cactacatca 15180
 accgcgactt tcgccagagc aacgccccgc aggccaaggc agaggaatgg ggccagggat 15240
 55 ttaccgcaa gctggagtcc ggcttcaccg agggcccggg cggctttggc gttgacgcca 15300
 tgggccaagc gggatcaag ctcgactcca gccgcgaccg ccgcaatacc gggctgctgc 15360
 60 ccttcggccc gaacagccac gaaccggtg atgattacg cgaactgggc ctgaccggca 15420

ES 2 156 510 A1

5 aaatccgctg gtccaaaagc accctgcgcc tgggcacctt gcagccaate ttgccggtgg 15480
 10 tgggtctaaa cgacacccgc ctgctggcgt ccaccttcca gggcggcctg ctgaccagcc 15540
 15 aggatgtcga tggcctgacc ttcaacgccg gccgcctgac caaggccaac ctgcgcgact 15600
 20 cctcggggccg cgacgacatc ggctacggcg ctgccagcag tgaccacctg gactttggcg 15660
 25 gtggcagcta cgccatcacc ccgcaaacca gcgtcageta ctactacgcc aagctcgaag 15720
 30 acatctaccg ccagcagttc gtcggcctga tcgatacccg ccccttgagc gaaggcgtga 15780
 35 gcctgcgcag cgacctgogc tacttcgaca gccgcaacga cggcgcgag cgtgccggca 15840
 40 acatcgaaa ccgcaacttc aacgccatgt tcaccctggg cgtgcgcgcg cacaagttca 15900
 45 ccgccacctg gcaacaaatg tccggcgaca gtgccttccc gttcgtcaac ggcggcgacc 15960
 50 cgttcaccgt caacctgggtg acctacaaca ctttcaccgg cgccgggctg gactcctggc 16020
 55 aagtgcgcta tgactacgac tttgtcgcga tgggcatccc cggcctgagc ttcattgacc 16080
 60 gctacaccga cggccgccac gccgaaaccg cactgtcag caatggccgc gagcgcgagc 16140
 65 gcgacaccga catcacctac gtcattccaga gccggccggt caaggacgtg agcctgcgct 16200
 70 ggcgcaacgt caccttcctg tccggcaatg gcctgaccaa cgccgtggac gaaaaccgcc 16260
 75 tgatcatcgg ctacaccctg gcgctgtggt aacagcggcc cttaaatttg aacagcatgg 16320
 80 agaacagcat gtctgccgcc cctaccctgc aaagcttcat cgcggccgc tggctcggcc 16380
 85 agcacggcgc ccaggccctg cgcacggccc ttgacggcca cgtactggcc tacagccacg 16440
 90 aagagcggcc ggacttcgcc gaagccgtcg acttcgcccg tgctcgcggc ctggccagcc 16500
 95 tgatggccat ggacttcag caacgcgctg cagcctgaa agcgtcggcc ctgtacctgg 16560
 100 ccgaacgcaa ggagcagctg tacaccctgt cgcaccatag cggcgccacc cgtgccgaca 16620
 105 gctggatcga catcgaaggc ggcaacacca cgttgttcgc ctatgccggc atcggcagcc 16680
 110 gcgagctgcc gtcgggcaac ctgggtgcac agggcccggc catcccgtg gccaaagcaag 16740
 115 gtcactttgc cggtagccac atcctgggtc cgcgcgccgg ggtggcggtg cacatcaacg 16800
 120 ccttcaactt ccccatctgg ggcattctgg aaaagtctgc cccgacctc ctggcgggca 16860
 125 tgccgtgcat cgtcaagcca gccacttcca ccagctacct gaccgaagcc gtcgtacgcc 16920
 130 tgatgaacgc ctccggcctg ctgccagagg gcagcctgca actggtgatc ggcagcaccg 16980
 135 gcgacctgct cgaccgcctg caaggccagg acgtggtgac cttcaccggt tccgccgata 17040
 140 ccgccgcaa attgcgcgtc acgccgaacc tgatacgtaa ttcggtaccg ttcaccgccc 17100
 145 aagccgactc gctgaactgc gccatcctcg gcccgacgt aacgccagac agcgaagagt 17160
 150 tcgacctgta catcaaggag gtgggtgcgtg aaatgaccac caaggccggg cagaagtgca 17220

ES 2 156 510 A1

ccgccatecg ccgcgccatc gtgccggcca agcacatcga cgcagttgcc acgcgcttgc 17280
 5 gcgagcgggt gagcaagggt gtagtgggtg acccgtcgct ggaaggcgta cgcagggcg 17340
 ccctggcctc tcacgaccag cagcacgacg tggccgagcg ggtgcgcagc ctgctaaaca 17400
 10 gttgtgatca gctgttcggc gccagcgatg gctttgctcc gcgtggcgag ggcgtggccg 17460
 aaggtgcatt ctttgcccca accctgctgc aggcccgca cccgcatgcc gaagcggcgg 17520
 cccacgatat cgaagcgttc ggcccgtca gcacgctgat ggcctatgag gatctcgacg 17580
 15 aagctttggc gctggccgcg cgaggcaaa ggcagcctgtt ggcgacactg gtcaccgccc 17640
 accgcagcat cgctgccaa ggcattccgg tggcggctgc ctggcatggc cgcctgctgg 17700
 tactcgacag cgaagccgcc aaggaatcca ccggccacgg ctgcctctg ccgcagctca 17760
 20 agcatggcgg cccgggcagg gccggtggcg gcgaaaaact gggtggttg cgcgcggtca 17820
 agcactacct gcaacgcgcc gccgtacagg gctcgccaag catgcttacg gcagtcaccg 17880
 25 gcgaatacgt acgcggtggt gaagtgatcg agaccgaagt gcaccgctc cgcgcgctact 17940
 tcgagcagct gcgcatcggg gaatccctgc tcaccatcg ccgcaccgtc accgaagcag 18000
 atctggtcaa ctccggctgc ctgtcgggtg accacttcta catgcacttc gacgaaatcg 18060
 30 ccgccaagca atcgcagttc ggtaaacgca ttgctcacgg ctatttcggt ctgtcggcag 18120
 ctgccggcct gttcgtatcg cctggcgcgg gcccagctact ggccaactat ggcctggaca 18180
 ccctgcgttt catcaaccgg gtgggcacgc gcgataccat tcaggcgcgc ctcacctgca 18240
 35 agcgcgaagat cgaccagggc aagaccagcc cgctgggcca gccgcagggg gtgggtggcgt 18300
 gggatgtaaa ggtgaccaac cagctgggtg agctggtagc cagctatgac atcctgacct 18360
 40 tgggtctgaa acagcctgag tgacttgtt acctcccgtg cttcttcgcg ggtacatcga 18420
 accgcgaaga agcagcaca ggttacataa aggccaaagg ccacctcgta catctgcct 18480
 aatcgcaccac ctgcgccctc ggcgttatag tccagcgata acaacgcca ggaagctccc 18540
 45 atcatgcacg ccctcaagct cgtctcagt gccgcctcc tggccggcgt cgcggcgtgc 18600
 cagaccatca aaccctccga agacacgctc aagcagcgca ccgagttcat tctgaacacc 18660
 50 aaggtttcca acgtcgccga cgtgcgcagt gacagacca tcacctacta cacagccacc 18720
 accgcaaaag gccggtacga gtgccagatg cccagcgggt gcacgtcgc ggtggccggc 18780
 atgggcctgt acgagcccac gccctcctgc atgaaggaag gccagggcgt catcctgca 18840
 55 taaccacgc acaaccctg cgccttgcg ccggtctaaa gcgccggcgc cgcaggtccc 18900
 tcgcgcaatg cgcgcagggc cgctcgcagt tcagctgggc gtaccgctt ggaaagcagc 18960
 60 gcgatattgc gctcatgcac cgctgcctga atcttctccg ggtcgtgcc ggtcatgatc 19020

ES 2 156 510 A1

aacgcgggta cgtcccagcc gcgctgggcc cgcaaccggt cgatgcagtc gactccggtt 19080
 5 gcctcctgcc ccaagtcata atcggcaacg atcaactcac aatcaactgcg caaatcagca 19140
 ggcgaaactgt gcgcctctac ttcacaacccc cagecgtgca gcagcgccga ggtcgccccg 19200
 agcacattgt ggtcgtcttc taccaggcat acccgcaagc cgccaagcag gccggccgct 19260
 10 gccggcaagc gctcgccac aaccagggtt ggctgagcgc tgaggcgcgg caagccttgc 19320
 aggctgaccg ccgtgccgtg gcctggccgc aaacgcagct ttactttcag gcccatcaga 19380
 tgccccagcc gccgcacaat cgacaaaccc aggccacac cctcgaate gttgtcgcgt 19440
 15 acctggcgta cccggtagaa ctcttcgaac accaaccgct gatgcgcttc gtctatgcct 19500
 cgcccctggt cataaacgac gatggcaagg ccttcgccgc agcgccgtac cgccagcagc 19560
 20 agcgggggat gcgccgata tttgaagcag ttggacagta cgttctgcac catggctcgtc 19620
 agcatgccac ggtcgggtgca cgtccagtac gcgcagggcc gcaagcgtat ctccaccccg 19680
 gccagcggg cgggctcgtt gttctgacgc accagctccg ccagaaatcc ggccagggcg 19740
 25 aatgtctcgc tgcgcgggtg cacgcgcccg ttgtccaggg tgtaaaggtc gagaatcgag 19800
 cgaaaaagct gcgatacatt gagcagcgag cggtcgatgc tatccaccag tcgccgctcc 19860
 30 tcgtcgcca gctgcgcctc gcgcaggcat gccgtgaaca ggccgataga gtgaatcggg 19920
 tggcgcaggt cgtggctggc ctgcgccagg aagcgggatt tctcgcggtt ggccgcgcga 19980
 gcctgttcag aggcttgcg cgtgcgctcc agcagcaggt gcgcatacac cgggatgacc 20040
 35 gtgctggtgg taagcaacat caacaccatg aacgggttgg cctgccagta aggcgtgatc 20100
 tggtacacaa ccagcaacgc cgccagcgcc agcaccgtgg caatcgccag gttagcgcgag 20160
 40 ccgaagcgca tgccgttgcc caggttcacc cacaccatca ccgcatagat cggcaacgcc 20220
 gcctcgccac ctaccaccag gccgaagcag gtacc 20255

<210> 2

<211> 704

45 <212> ADN

<213> Pseudomonas putida U

<400> 2

50

ttccgccaag ccgtcgactt cgcccgtgct cgcggcctgg ccagcctgat ggccatggac 60
 ttccagcaac gcgctgcacg cctgaaagcg ctggccctgt acctggccga acgcaaggag 120
 55 cagctgtaca ccctgtcgca ccatagcggc gccaccctgt ccgacagctg gatcgacatc 180
 gaaggcggca acaccacggt gttcgctat gccggcatcg gcagccgga gctgccgtcg 240
 60 ggcaacctgg tgcaagagg cccggccatc ccgctggcca agcaaggta ctttgccggt 300
 agccacatcc tgggtccgcg cgccggggtg gcggtgcaca tcaacgcctt caacttcccc 360

ES 2 156 510 A1

atctggggca tgctggaaaa gttcggccccg accttctctgg cgggcatgcc gtgcatcgtc 420
 5 aagccagcca cttccaccag ctacctgacc gaagcctctg tacgctgat gaacgcctcc 480
 ggctgctgc cagagggcag cctgcaactg gtgatcggca gcaccggcga cctgctcgac 540
 cgctgcaag gccaggacgt ggtgaccttc accggttccg ccgataccgc cgccaaattg 600
 10 cgcgtcacgc cgaacctgat acgtaattcg gtaccgttca ccgccgaagc cgactcgtctg 660
 aactgcgcca tctcggccc ggacgtaacg ccagacagcg aaga 704

<210> 3
 15 <211> 1354
 <212> ADN
 <213> Pseudomonas putida U
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (18)..(1334)
 25 <400> 3

gaattcgagg tgaagcc atg aac agg atc cat gat gcc gac cgt gcc ctg 50
 Met Asn Arg Ile His Asp Ala Asp Arg Ala Leu
 1 5 10
 30 ttg gac ccg atg gaa acc gcc agt gtc gac gcc ctg cgc cag cac cag 98
 Leu Asp Pro Met Glu Thr Ala Ser Val Asp Ala Leu Arg Gln His Gln
 15 20 25
 35 ctg gag cgc ctg cgc tgg agc ctg aag cac gcc tac gac aat gtg ccg 146
 Leu Glu Arg Leu Arg Trp Ser Leu Lys His Ala Tyr Asp Asn Val Pro
 30 35 40
 40 ctg tac cgc cag cgc ttt gcc gaa tgc ggc gcc cac ccc gac gac ctc 194
 Leu Tyr Arg Gln Arg Phe Ala Glu Cys Gly Ala His Pro Asp Asp Leu
 45 50 55
 45 acg tgc ctg gaa gac ctg gcg aag ttc ccc ttc acc ggc aag aac gac 242
 Thr Cys Leu Glu Asp Leu Ala Lys Phe Pro Phe Thr Gly Lys Asn Asp
 60 65 70 75
 50 ctg cgc gac aac tac ccc tac ggg atg ttc gcc gtc ccc cag gaa gag 290
 Leu Arg Asp Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Phe Ala Val Pro Gln Glu Glu
 80 85 90
 55 gtg gtg cgc ctg cat gct tcc agc ggc acc acc ggc aag ccg acg gtg 338
 Val Val Arg Leu His Ala Ser Ser Gly Thr Thr Gly Lys Pro Thr Val
 95 100 105
 60 gtc ggt tac acc cag aat gac atc aac acc tgg gcc aat gtc gtg gcg 386
 Val Gly Tyr Thr Gln Asn Asp Ile Asn Thr Trp Ala Asn Val Val Ala
 110 115 120
 65 cgc tgc atc cgt gcg gcc ggc ggg cgc aag ggt gac aaa gtg cat gtt 434
 Arg Ser Ile Arg Ala Ala Gly Gly Arg Lys Gly Asp Lys Val His Val
 125 130 135

ES 2 156 510 A1

5	tcc tac ggc tat ggg ctt ttc act ggc ggc ctt ggt gcg cac tac ggc Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Phe Thr Gly Gly Leu Gly Ala His Tyr Gly 140 145 150 155	482
10	gcc gag cgc ctg ggc tgt acg gta atc ccg atg tcg ggt ggc cag acc Ala Glu Arg Leu Gly Cys Thr Val Ile Pro Met Ser Gly Gly Gln Thr 160 165 170	530
15	gag aag cag gtg cag ctg atc cgc gac ttt cag ccc gac atc atc atg Glu Lys Gln Val Gln Leu Ile Arg Asp Phe Gln Pro Asp Ile Ile Met 175 180 185	578
20	gtc aca ccg tcc tac atg ctc aac ctg gcc gac gag atc gag cgc cag Val Thr Pro Ser Tyr Met Leu Asn Leu Ala Asp Glu Ile Glu Arg Gln 190 195 200	626
25	ggc atc gac ccg cat gac ctc aag cta cgc ctg ggc att ttc ggt gcc Gly Ile Asp Pro His Asp Leu Lys Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Ala 205 210 215	674
30	gaa cct tgg acc gat gaa cta cgt cgc tcg atc gag cag cgc ctg gcc Glu Pro Trp Thr Asp Gln Leu Arg Arg Ser Ile Glu Gln Arg Leu Gly 220 225 230 235	722
35	atc aat gcc ctc gac atc tat ggt ttg tcg gaa atc atg ggc ccc ggg Ile Asn Ala Leu Asp Ile Tyr Gly Leu Ser Glu Ile Met Gly Pro Gly 240 245 250	770
40	gtg gcc atg gaa tgc atc gaa acc aag gac ggc ccg acc ata tgg gaa Val Ala Met Glu Cys Ile Glu Thr Lys Asp Gly Pro Thr Ile Trp Glu 255 260 265	818
45	gac cac ttc tac ccc gaa atc atc gac ccg gtc acc ggc gaa gta ttg Asp His Phe Tyr Pro Glu Ile Ile Asp Pro Val Thr Gly Glu Val Leu 270 275 280	866
50	cca gac ggt cag ctg ggc gaa ctg gtg ttc acc tcg cta agc aaa gag Pro Asp Gly Gln Leu Gly Glu Leu Val Phe Thr Ser Leu Ser Lys Glu 285 290 295	914
55	gcg ctt ccg atg gtg cgc tac cgc acc cgt gac ctc acc cgc ctg ctg Ala Leu Pro Met Val Arg Tyr Arg Thr Arg Asp Leu Thr Arg Leu Leu 300 305 310 315	962
60	ccc ggc acc gcc agg ccg atg cgg cgg atc ggc aag att acc ggg cgc Pro Gly Thr Ala Arg Pro Met Arg Arg Ile Gly Lys Ile Thr Gly Arg 320 325 330	1010
65	agt gac gac atg ctg atc att cgc ggc gtc aac gtg ttc ccg acc cag Ser Asp Asp Met Leu Ile Ile Arg Gly Val Asn Val Phe Pro Thr Gln 335 340 345	1058
70	atc gag gaa cag gta tta aaa ata aaa cag ctt tcc gag atg tat gag Ile Glu Glu Gln Val Leu Lys Ile Lys Gln Leu Ser Glu Met Tyr Glu 350 355 360	1106
75	att cat ttg tat cgc aat ggc aac ctg gac agc gta gag gtg cat gta Ile His Leu Tyr Arg Asn Gly Asn Leu Asp Ser Val Glu Val His Val 365 370 375	1154

ES 2 156 510 A1

gag ttg cgt gcg gag tgc cag cac ctc gat gaa ggc cag cgc aag ctg 1202
 Glu Leu Arg Ala Glu Cys Gln His Leu Asp Glu Gly Gln Arg Lys Leu
 5 380 385 390 395

 gtt atc ggg gag ctg agc aaa cag atc aag acc tac atc ggc atc agc 1250
 Val Ile Gly Glu Leu Ser Lys Gln Ile Lys Thr Tyr Ile Gly Ile Ser
 400 405 410

 10 acc cag gtg cac ctg cag gct tgc ggc acg ctc aag cgt tcc gag ggc 1298
 Thr Gln Val His Leu Gln Ala Cys Gly Thr Leu Lys Arg Ser Glu Gly
 415 420 425

 15 aag gcg tgc cac gtg tac gac aaa cgg ttg gcc agc tgattcattc 1344
 Lys Ala Cys His Val Tyr Asp Lys Arg Leu Ala Ser
 430 435

 ggctgaattc 1354

 20 <210> 4
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U
 25 <400> 4

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

ES 2 156 510 A1

Met Leu Asn Leu Ala Asp Glu Ile Glu Arg Gln Gly Ile Asp Pro His
 195 200 205

5 Asp Leu Lys Leu Arg Leu Gly Ile Phe Gly Ala Glu Pro Trp Thr Asp
 210 215 220

Glu Leu Arg Arg Ser Ile Glu Gln Arg Leu Gly Ile Asn Ala Leu Asp
 225 230 235 240

10 Ile Tyr Gly Leu Ser Glu Ile Met Gly Pro Gly Val Ala Met Glu Cys
 245 250 255

Ile Glu Thr Lys Asp Gly Pro Thr Ile Trp Glu Asp His Phe Tyr Pro
 260 265 270

Glu Ile Ile Asp Pro Val Thr Gly Glu Val Leu Pro Asp Gly Gln Leu
 275 280 285

20 Gly Glu Leu Val Phe Thr Ser Leu Ser Lys Glu Ala Leu Pro Met Val
 290 295 300

Arg Tyr Arg Thr Arg Asp Leu Thr Arg Leu Leu Pro Gly Thr Ala Arg
 305 310 315 320

25 Pro Met Arg Arg Ile Gly Lys Ile Thr Gly Arg Ser Asp Asp Met Leu
 325 330 335

Ile Ile Arg Gly Val Asn Val Phe Pro Thr Gln Ile Glu Glu Gln Val
 340 345 350

Leu Lys Ile Lys Gln Leu Ser Glu Met Tyr Glu Ile His Leu Tyr Arg
 355 360 365

35 Asn Gly Asn Leu Asp Ser Val Glu Val His Val Glu Leu Arg Ala Glu
 370 375 380

Cys Gln His Leu Asp Glu Gly Gln Arg Lys Leu Val Ile Gly Glu Leu
 385 390 395 400

Ser Lys Gln Ile Lys Thr Tyr Ile Gly Ile Ser Thr Gln Val His Leu
 405 410 415

45 Gln Ala Cys Gly Thr Leu Lys Arg Ser Glu Gly Lys Ala Cys His Val
 420 425 430

Tyr Asp Lys Arg Leu Ala Ser
 435

50

<210> 5

<211> 3650

<212> ADN

55

<213> Pseudomonas putida U

<220>

<221> CDS

60

<222> (18)..(1013)

ES 2 156 510 A1

<220>
 <221> gene
 <222> (1332)..(2087)

5 <220>
 <221> gene
 <222> (2077)..(2673)

10 <220>
 <221> gene
 <222> (2675)..(3607)

15 <400> 5

15	gaattcgagg tgaagcc atg aac agg atc cac gca cag cta gtg gaa acc	50
	Met Asn Arg Ile His Ala Gln Leu Val Glu Thr	
	1 5 10	
20	gga gtc aag cgc gta aag tcg ctg gaa gaa atg tcc ccc gag gaa cgc	98
	Gly Val Lys Arg Val Lys Ser Leu Glu Glu Met Ser Pro Glu Glu Arg	
	15 20 25	
25	aac ttc cag gaa aag atc gac gcc gaa atc aag atc gaa gcc aag aac	146
	Asn Phe Gln Glu Lys Ile Asp Ala Glu Ile Lys Ile Glu Ala Lys Asn	
	30 35 40	
30	tgg atg ccc gag gcc tac cgc cag acc ttg atc cgg cag att tcc cag	194
	Trp Met Pro Glu Ala Tyr Arg Gln Thr Leu Ile Arg Gln Ile Ser Gln	
	45 50 55	
35	cac gcc cac tcg gaa atc gtc ggc atg ctg ccc gaa ggc aac tgg gtc	242
	His Ala His Ser Glu Ile Val Gly Met Leu Pro Glu Gly Asn Trp Val	
	60 65 70 75	
40	acc cgc gcg cct agc ctc aag cgc aag ctg caa ctg atg gca aag atc	290
	Thr Arg Ala Pro Ser Leu Lys Arg Lys Leu Gln Leu Met Ala Lys Ile	
	80 85 90	
45	cag gac gag gcc ggc cac ggc ctg tac ctg tac agc gcc atg gag acc	338
	Gln Asp Glu Ala Gly His Gly Leu Tyr Leu Tyr Ser Ala Met Glu Thr	
	95 100 105	
50	ctg ggc gcc gac cgc gac gag gag atc gcc aag ctg cac agc ggc aag	386
	Leu Gly Ala Asp Arg Asp Glu Glu Ile Ala Lys Leu His Ser Gly Lys	
	110 115 120	
55	gcg aag tat tcg agc atc ttc aac tac ccc acc ctc agc tgg gcc gac	434
	Ala Lys Tyr Ser Ser Ile Phe Asn Tyr Pro Thr Leu Ser Trp Ala Asp	
	125 130 135	
60	atg ggc gca gtg ggc tgg ctg gtg gat ggg gcc gct atc gtc aac cag	482
	Met Gly Ala Val Gly Trp Leu Val Asp Gly Ala Ala Ile Val Asn Gln	
	140 145 150 155	
65	gtg gtg ctg cag cgc acc tcc tat ggc ccc tac tcc cgc gca atg gtt	530
	Val Val Leu Gln Arg Thr Ser Tyr Gly Pro Tyr Ser Arg Ala Met Val	
	160 165 170	
70	cgt atc tgc aag gaa gag agc ttt cac cag cgc cag ggc tac gaa atc	578
	Arg Ile Cys Lys Glu Glu Ser Phe His Gln Arg Gln Gly Tyr Glu Ile	
	175 180 185	

ES 2 156 510 A1

5 ctc ctg acc atg atg cgt cac ggc aca cag gcc cag cgc gac atg gtc 626
 Leu Leu Thr Met Met Arg His Gly Thr Gln Ala Gln Arg Asp Met Val
 190 195 200

 cag gac gcg atc aat cgc ctg tgg tgg cca tcg ctg atg atg ttc ggc 674
 Gln Asp Ala Ile Asn Arg Leu Trp Trp Pro Ser Leu Met Met Phe Gly
 205 210 215

10 ccc agc gac gaa cac tcc ccg aac agc gca cag tcc atg gcc tgg aag 722
 Pro Ser Asp Glu His Ser Pro Asn Ser Ala Gln Ser Met Ala Trp Lys
 220 225 230 235

15 atc aag cgc cag acc aac gat gaa ctg cgc cag cgt ttc atc gac cag 770
 Ile Lys Arg Gln Thr Asn Asp Glu Leu Arg Gln Arg Phe Ile Asp Gln
 240 245 250

20 acc gtg ccg cag ctc gaa ctg ctc ggc tgc acc gcc ccc gac cct gaa 818
 Thr Val Pro Gln Leu Glu Leu Leu Gly Cys Thr Ala Pro Asp Pro Glu
 255 260 265

 ctg aag tgg aac gcc gag cgc ggt cac tac gac ttc gcc gaa atc cag 866
 Leu Lys Trp Asn Ala Glu Arg Gly His Tyr Asp Phe Gly Glu Ile Gln
 270 275 280

25 tgg gac gag ttc tac gaa gtg atc aag ggc aac gcc ccg tgc aac cag 914
 Trp Asp Glu Phe Tyr Glu Val Ile Lys Gly Asn Gly Pro Cys Asn Gln
 285 290 295

30 gaa cgt gtc gcc acc cgc cgc aag gcc atc gag gac gcc gcc tgg gta 962
 Glu Arg Val Ala Thr Arg Arg Lys Ala Ile Glu Asp Gly Ala Trp Val
 300 305 310 315

35 cgc gag gcc gcc gtg gcc tac gcg cgc aag caa cag aac aag aac gcc 1010
 Arg Glu Ala Ala Val Ala Tyr Ala Arg Lys Gln Gln Asn Lys Asn Ala
 320 325 330

 gcc tgagcggcga ttgatgcgga gatcgaaaat gtctgtctgg accctctacg 1063
 Ala

40 aagtgttcgt gcgcagcaag cacggcctta accacaagca tgtcggcagc gtgcacgccg 1123
 ccgacgccgc catggccatc gaaaatgccc gcgagctgta caccgccgc agcgagggcg 1183

45 tcagcctgtg ggtagtgctt tcggcgctga tcaccgctc ctccccgcac gagaaagacc 1243
 cgctgttcgc tccttcggac gacaaggtct accgccatgc cagcttctac gagctgcccg 1303
 atgaagtccg acacatgtga ggttggtcat gcacaacgaa gcocctgatcc cttacctgtt 1363

50 gctgctcggc gacagtgcc tggccaagg ccagcgctc tgcgaatggt gtggccacgc 1423
 ccctgccatc gaagaagagc tggccctgat gaacgttggc ctggacctgg tcggccaggc 1483

55 ccgcaactgg ctggaatacg cagccgaact gcttgacgac ggtcgcgacg ccgacgccct 1543
 ggccttcgc cgagacgagc gcgcctaccg caacctgctg ctggctcgagc aacccaacgg 1603
 tgatttcgcc gtgacctga ccaagcagtt cctctacgac gcctggcact tcgccgtgct 1663

60 acagggcctg gtcgggtccc gcgacgagcg tatcgccggt atcgccgcca aggcactcaa 1723

ES 2 156 510 A1

ggaagtcacc taccacctgc gccgttccag cgagtgggta cagcgtatgg ggggcggtac 1783
 5 agaacaaagc cgccaacgca tgctcgccgc cattccggca ctgtggcgct tcaccgtcga 1843
 actgacggcc gccagcgaca acgaggtgcg gttggccgaa gcgggtattg ccgtgcccc 1903
 10 ggcaactgtg ggtgccgctt ggctcaaaca ggtgagcgag actttcgctt cggtcgagct 1963
 gccgctgccc aaggetgcca gccacttcta cctggacagt cgcaaaggcc tgcacaccga 2023
 gcacctgggc ctgctgctgg ccgagatgca gttcctgcca agggcttacc ccgatgcaac 2083
 15 ctggtgagct gattgccggc gacctggcg cgcgcccgcc acgcgcgac gacctggccc 2143
 gggcctggga ggtccttggc caggtcatgg acccggaagt gcctgtggtc agcgtggctg 2203
 acctgggaat agtcgcgac ctcgactggc gcgccggcca cctgcacctg gtggtcacgc 2263
 20 cgacctactc cggctgcccg gccaccgagg tgatcgaggg tgatatccgc caggcgctgg 2323
 agcaggcggg cttccccgca ccggatcttg agcgcgggtt gaccccgcc tggagcaccg 2383
 25 actggatcag cgagctgggc cgcgagcgc tcgcctcta cggcatcgct ccgccgaag 2443
 gcagcgccag caagcgcagc ctgctaggtg aaacaccca ggtgtgctgc cgcagtgcg 2503
 cagtgcccat accgaattgc tcagccagtt cggctccacc gcttgcaagg cgctgtacgc 2563
 30 tgccgcgagt gcctggagcc gttcgactat ttcaaagca tttgagccgt ggagaacgcc 2623
 atgagccagt ttcacagcct gaccatcaag caagtgcgca acgaaaccg tgatgcggtt 2683
 tcgattgcct tcgacgtgcc cgagcacctg cagcgcctg caggacggcg agctgcgctg 2743
 35 ggccgtcaag cgcgtgccag gcgggcggtt ctcggcggtt gccaatgaag tgctcaaggc 2803
 cggccagcaa ctggaggtga tgccgccagc gggcagcttc ttcgtgccgc tggacgctgc 2863
 40 ccgccagggc aattacctgg gcgtggccgc tggtagcggc attacccaa tcctgtcgat 2923
 tattggcacc accctggaca gtgagccgca cagctgcttc accttgcgt acggcaaccg 2983
 ctccagctct ggcgcgctgt tccgcgacaa gctcgaagac ctgaaaaacc gctacctcga 3043
 45 ccggtgaac ctgattttcg tgttcagccg cgagcagcag gatgtcgacc tgtacaacgg 3103
 tcgcgtcgat gcggacaaat gcggccagct gttctcccgt tggttgatg tgccaggcct 3163
 50 ggacgccgcc ttcactctgc gcccgaggc gatgaccgaa accgtgcgtg acagcctgca 3223
 ggccaatggc ctgggcaagg agcgcattca tttegagctg ttcgccgccc ccggcagcga 3283
 aacccgccgc gaagcccgtg aggccgcgca ccaggtgat tccgcgctca gccacatcac 3343
 55 cgtgatcagc gacggccgtg ccctcacctt cgacttgcca cgcaacaccc agaacgtgct 3403
 ggacgctggc aatgccatcg gtgcggaact gccctactcg tgcaaggccc gcgtgtgctc 3463
 60 gacctgaaa tgccgggtga tcgaggggga agtggaatg gacagcaacc atgccttggga 3523

ES 2 156 510 A1

agactacgaa gtggcagccg ggtatgtgct gtcgtgccag acctaccggtgagcgacaa 3583

ggtaggtgctc gacttcgacc agctttaaga cggccccgcc tgettcgagg gggccccccgc 3643

5 ttctaga 3650

<210> 6

<211> 332

10 <212> PRT

<213> Pseudomonas putida U

<400> 6

15

Met Asn Arg Ile His Ala Gln Leu Val Glu Thr Gly Val Lys Arg Val
1 5 10 15

20

Lys Ser Leu Glu Glu Met Ser Pro Glu Glu Arg Asn Phe Gln Glu Lys
20 25 30

Ile Asp Ala Glu Ile Lys Ile Glu Ala Lys Asn Trp Met Pro Glu Ala
35 40 45

25

Tyr Arg Gln Thr Leu Ile Arg Gln Ile Ser Gln His Ala His Ser Glu
50 55 60

Ile Val Gly Met Leu Pro Glu Gly Asn Trp Val Thr Arg Ala Pro Ser
65 70 75 80

30

Leu Lys Arg Lys Leu Gln Leu Met Ala Lys Ile Gln Asp Glu Ala Gly
85 90 95

35

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

Asp Glu Glu Ile Ala Lys Leu His Ser Gly Lys Ala Lys Tyr Ser Ser
115 120 125

40

Ile Phe Asn Tyr Pro Thr Leu Ser Trp Ala Asp Met Gly Ala Val Gly
130 135 140

Trp Leu Val Asp Gly Ala Ala Ile Val Asn Gln Val Val Leu Gln Arg
145 150 155 160

45

Thr Ser Tyr Gly Pro Tyr Ser Arg Ala Met Val Arg Ile Cys Lys Glu
165 170 175

Glu Ser Phe His Gln Arg Gln Gly Tyr Glu Ile Leu Leu Thr Met Met
180 185 190

50

Arg His Gly Thr Gln Ala Gln Arg Asp Met Val Gln Asp Ala Ile Asn
195 200 205

55

Arg Leu Trp Trp Pro Ser Leu Met Met Phe Gly Pro Ser Asp Glu His
210 215 220

Ser Pro Asn Ser Ala Gln Ser Met Ala Trp Lys Ile Lys Arg Gln Thr
225 230 235 240

60

Asn Asp Glu Leu Arg Gln Arg Phe Ile Asp Gln Thr Val Pro Gln Leu

ES 2 156 510 A1

				245					250					255			
5	Glu	Leu	Leu	Gly	Cys	Thr	Ala	Pro	Asp	Pro	Glu	Leu	Lys	Trp	Asn	Ala	
				260					265					270			
	Glu	Arg	Gly	His	Tyr	Asp	Phe	Gly	Glu	Ile	Gln	Trp	Asp	Glu	Phe	Tyr	
			275					280					285				
10	Glu	Val	Ile	Lys	Gly	Asn	Gly	Pro	Cys	Asn	Gln	Glu	Arg	Val	Ala	Thr	
		290					295					300					
	Arg	Arg	Lys	Ala	Ile	Glu	Asp	Gly	Ala	Trp	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Val	
	305				310						315					320	
15	Ala	Tyr	Ala	Arg	Lys	Gln	Gln	Asn	Lys	Asn	Ala	Ala					
				325						330							
	<210> 7																
	<211> 252																
20	<212> PRT																
	<213> Pseudomonas putida U																
	<400> 7																
25	Met	His	Asn	Glu	Ala	Leu	Ile	Pro	Tyr	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Ser	
	1				5					10					15		
30	Ala	Leu	Val	Gln	Gly	Gln	Arg	Leu	Cys	Glu	Trp	Cys	Gly	His	Ala	Pro	
				20					25					30			
	Ala	Ile	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Leu	Met	Asn	Val	Gly	Leu	Asp	Leu	Val	
			35					40					45				
35	Gly	Gln	Ala	Arg	Asn	Trp	Leu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Glu	Leu	Leu	Asp	Asp	
		50					55					60					
	Gly	Arg	Asp	Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	Phe	Arg	Arg	Asp	Glu	Arg	Ala	Tyr	
40	65				70					75						80	
	Arg	Asn	Leu	Leu	Leu	Val	Glu	Gln	Pro	Asn	Gly	Asp	Phe	Ala	Val	Thr	
					85					90					95		
45	Met	Thr	Lys	Gln	Phe	Leu	Tyr	Asp	Ala	Trp	His	Phe	Ala	Val	Leu	Gln	
				100					105					110			
	Gly	Leu	Val	Gly	Ser	Arg	Asp	Glu	Arg	Ile	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Lys	
			115					120					125				
50	Ala	Leu	Lys	Glu	Val	Thr	Tyr	His	Leu	Arg	Arg	Ser	Ser	Glu	Trp	Val	
		130					135					140					
	Gln	Arg	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Gln	Ser	Arg	Gln	Arg	Met	Leu	Ala	
	145					150					155					160	
55	Ala	Ile	Pro	Ala	Leu	Trp	Arg	Phe	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Ala	Ala	Ser	
				165						170					175		
	Asp	Asn	Glu	Val	Arg	Leu	Ala	Glu	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	
60				180					185					190			

ES 2 156 510 A1

Thr Val Gly Ala Ala Trp Leu Lys Gln Val Ser Glu Thr Phe Ala Ser
 195 200 205
 5 Val Glu Leu Pro Leu Pro Lys Ala Ala Ser His Phe Tyr Leu Asp Ser
 210 215 220
 Arg Lys Gly Leu His Thr Glu His Leu Gly Leu Leu Ala Glu Met
 225 230 235 240
 10 Gln Phe Leu Pro Arg Ala Tyr Pro Asp Ala Thr Trp
 245 250
 15 <210> 8
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U
 20 <400> 8
 Met Gln Pro Gly Glu Leu Ile Ala Gly Asp Arg Gly Ala Arg Pro Pro
 1 5 10 15
 25 Arg Gly Asp Asp Leu Ala Arg Ala Trp Glu Val Leu Ala Gln Val Met
 20 25 30
 Asp Pro Glu Val Pro Val Val Ser Val Val Asp Leu Gly Ile Val Arg
 35 40 45
 Asp Leu Asp Trp Arg Ala Gly His Leu His Leu Val Val Thr Pro Thr
 50 55 60
 35 Tyr Ser Gly Cys Pro Ala Thr Glu Val Ile Glu Gly Asp Ile Arg Gln
 65 70 75 80
 Ala Leu Glu Gln Ala Gly Phe Pro Ala Pro Asp Leu Glu Arg Arg Leu
 40 85 90 95
 Thr Pro Ala Trp Ser Thr Asp Trp Ile Ser Glu Leu Gly Arg Glu Arg
 100 105 110
 45 Leu Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Pro Pro Gln Gly Ser Ala Ser Lys Arg
 115 120 125
 Ser Leu Leu Gly Glu Thr Pro Gln Val Cys Cys Arg Ser Ala Ala Val
 130 135 140
 50 Pro Ile Pro Asn Cys Ser Ala Ser Ser Ala Pro Pro Leu Ala Arg Arg
 145 150 155 160
 Cys Thr Leu Pro Arg Val Pro Gly Ala Val Arg Leu Phe Gln Met His
 55 165 170 175
 Leu Ser Arg Gly Glu Arg His Glu Pro Val Ser Gln Pro Asp His Gln
 180 185 190
 60 Ala Ser Ala Gln Arg Asn Pro
 195

ES 2 156 510 A1

<210> 9

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas putida U

<400> 9

10 Met Arg Phe Arg Leu Pro Ser Thr Cys Pro Ser Thr Cys Ser Ala Val
1 5 10 15

Gln Asp Gly Glu Leu Arg Val Ala Val Lys Arg Val Pro Gly Gly Arg
20 25 30

15 Phe Ser Ala Phe Ala Asn Glu Val Leu Lys Ala Gly Gln Gln Leu Glu
35 40 45

Val Met Pro Pro Ala Gly Ser Phe Phe Val Pro Leu Asp Ala Ala Arg
50 55 60

20 Gln Gly Asn Tyr Leu Gly Val Ala Ala Gly Ser Gly Ile Thr Pro Ile
65 70 75 80

25 Leu Ser Ile Ile Gly Thr Thr Leu Asp Ser Glu Pro His Ser Cys Phe
85 90 95

Thr Leu Leu Tyr Gly Asn Arg Ser Ser Ser Gly Ala Leu Phe Arg Asp
100 105 110

30 Lys Leu Glu Asp Leu Lys Asn Arg Tyr Leu Asp Arg Leu Asn Leu Ile
115 120 125

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

35 Val Asp Ala Asp Lys Cys Gly Gln Leu Phe Ser Arg Trp Leu Asp Val
145 150 155 160

40 Pro Gly Leu Asp Ala Ala Phe Ile Cys Gly Pro Gln Ala Met Thr Glu
165 170 175

Thr Val Arg Asp Ser Leu Gln Ala Asn Gly Leu Gly Lys Glu Arg Ile
180 185 190

45 His Phe Glu Leu Phe Ala Ala Ala Gly Ser Glu Thr Arg Arg Glu Ala
195 200 205

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

50 Ile Ser Asp Gly Arg Ala Leu Thr Phe Asp Leu Pro Arg Asn Thr Gln
225 230 235 240

Asn Val Leu Asp Ala Gly Asn Ala Ile Gly Ala Glu Leu Pro Tyr Ser
245 250 255

55 Cys Lys Ala Gly Val Cys Ser Thr Cys Lys Cys Arg Val Ile Glu Gly
260 265 270

60 Glu Val Glu Met Asp Ser Asn His Ala Leu Glu Asp Tyr Glu Val Ala
275 280 285

Ala Gly Tyr Val Leu Ser Cys Gln Thr Tyr Pro Val Ser Asp Lys Val

ES 2 156 510 A1

	290		295		300
	Val Leu Asp Phe Asp		Gln Leu		
5	305		310		
	<210> 10				
	<211> 4998				
	<212> ADN				
10	<213> Pseudomonas putida U				
	<220>				
	<221> gene				
15	<222> (18).. (1337)				
	<220>				
	<221> gene				
20	<222> (1365)..(2363)				
	<220>				
	<221> gene				
	<222> (2680)..(3438)				
25	<220>				
	<221> gene				
	<222> (3425)..(4024)				
30	<220>				
	<221> gene				
	<222> (4024)..(4959)				
35	<400> 10				
	gaattcgagg tgaagccatg aacaggatcc atgatgcoga ccgtgccctg ttggacccga 60				
	tggaaaccgc cagtgtcgac gccctgcgcc agcaccagct ggagcgcctg cgctggagcc 120				
40	tgaagcacgc ctacgacaat gtgccgctgt accgccagcg ctttgccgaa tgcggcgcgc 180				
	accccgacga cctcacgtgc ctggaagacc tggcgaagtt ccccttcacc ggcaagaacg 240				
45	acctgcgcga caactacccc tacgggatgt tcgccgtccc ccaggaagag gtggtgcgcc 300				
	tgcatgcttc cagcggcacc accggcaagc cgacggtggt cggttacacc cagaatgaca 360				
	tcaacacctg ggccaatgtc gtggcgcgct cgatccgtgc ggccggcggg cgcaagggtg 420				
50	acaaagtgca tgtttcctac ggctatgggc ttttcaactgg cgggcttggg gcgcactacg 480				
	gcgccgagcg cctgggctgt acggtaatcc cgatgtcggg tggccagacc gagaagcagg 540				
55	tgcagctgat ccgcgacttt cagcccgaca tcatcatggt cacaccgtcc tacatgctca 600				
	acctggccga cgagatcgag cgccagggca tcgaccgcga tgacctcaag ctacgcctgg 660				
	gcattttcgg tgccgaacct tggaccgatg aactacgtcg ctcgatcgag cagcgcctgg 720				
60	gcatcaatgc cctcgacatc tatggtttgt cggaaatcat gggccccggg gtggccatgg 780				
	aatgcatcga aaccaaggac ggccccacca tatgggaaga ccacttctac cccgaaatca 840				

ES 2 156 510 A1

tcgacccggg caccggcgaa gtattgccag acggtcagct gggcgaactg gtgttcacct 900
 5 cgctaagcaa agagggcgctt ccgatggtgc gctaccgcac ccgtgacctc acccgctctc 960
 tgcccggcac cgccaggccg atgcgggcga tcggcaagat taccggggcg agtgacgaca 1020
 10 tgctgatcat tcgcggtc aacgtgttcc cgaccagat cgaggaacag gtattaataaa 1080
 taaaacagct ttccgagatg tatgagatte atttgtatcg caatggcaac ctggacagcg 1140
 tagaggtgca tgtagagttg cgtgctggagt gccagcacct cgatgaaggc cagcgcaagc 1200
 15 tggttatcgg ggagctgagc aaacagatca agacctacat cggcatcagc acccaggtgc 1260
 acctgcaggc ttgctggcac ctcaagcggt ccgagggcaa ggcgtgccac gtgtacgaca 1320
 aacggttggc cagctgattc attcggctga attcagagtg aagccatgaa caggatccac 1380
 20 gcacagctag tggaaaccgg agtcaagcgc gtaaagtcgc tggagaagaat gtcccccgag 1440
 gaacgcaact tccaggaaaa gatcgacgcc gaaatcaaga tcgaagccaa gaactggatg 1500
 25 cccgaggcct accgccagac cttgatccgg cagatttccc agcacgcca ctcggaaatc 1560
 gtcggcatgc tgcccgaagg caactgggtc acccgcgcg ctagcctcaa gcgcaagctg 1620
 caactgatgg caaagatcca ggacgaggcc ggccaaggcc tgtacctgta cagcgccatg 1680
 30 gagaccctgg gcgccgaccg cgacgaggag atcgccaagc tgcacagcgg caaggcgaag 1740
 tattcgagca tcttcaacta ccccacctc agctgggccc acatgggccc agtgggctgg 1800
 ctggtggatg gggccgctat cgtcaaccag gtggtgctgc agcgcacctc ctatggcccc 1860
 35 tactcccggc caatggttcg tatctgcaag gaagagagct ttcaccagcg ccagggctac 1920
 gaaatcctcc tgacctgat gcgtcacggc acacaggccc agcgcgacat ggtccaggac 1980
 40 gcgatcaatc gcctgtggtg gccatcgctg atgatgttcg gccccagcga cgaactcctc 2040
 ccgaacagcg cacagtccat ggcctggaag atcaagcggc agaccaacga tgaactgccc 2100
 cagcgtttca tcgaccagac cgtgccgcag ctcgaactgc tcggctgcac ccccccgac 2160
 45 cctgaactga agtggaaacgc cgagcggcgt cactacgact tcggcgaat ccagtgggac 2220
 gagttctacg aagtgatcaa gggcaacggc ccgtgcaacc aggaacgtgt cgccaccgac 2280
 50 cgcaaggcca tcgaggacgg gcctgggta cgcgaggccg ccgtggccta cgcgcgcaag 2340
 caacagaaca agaacgcccgc ctgagcggcg attgatgagg agatcgaaaa tgtctgtctg 2400
 gaccctctac gaagtgttcg tgcgcagcaa gcacggcctt aaccacaagc atgtcggcag 2460
 55 cgtgcacgcc gccgacggc ccatggccat cgaaaatgcc cgcgagctgt acaccggccg 2520
 cagcggggc gtcagcctgt gggtagtgcc ttccggcgtg atcaccgcct cctccccga 2580
 60 cgagaaagac ccgctgttcg ctccttcgga cgacaaggtc taccgcatg ccagcttcta 2640

ES 2 156 510 A1

cgagctgccc gatgaagtgc gacacatgtg aggttggtca tgcacaacga agccctgatc 2700
 5 ccttacctgt tgctgctcgg cgacagtgcc ctggtccaag gccagcgctt ctgcgaatgg 2760
 tgtggccacg cccctgccat cgaagaagag ctggccctga tgaacgttgg cctggacctg 2820
 gtcggccagg cccgcaactg gctggaatac gcagccgaac tgcttgacga cggtcgcgac 2880
 10 gccgacgccc tggccttccg ccgagacgag cgcgcctacc gcaacctgct gctggtcgag 2940
 caacccaacg gtgatttcgc cgtgacctg accaagcagt tcctctacga cgcttggcac 3000
 15 ttcgccgtgc tacagggcct ggtcgggtcc cgcgacgagc gtatcgccgg tatcgccgcc 3060
 aaggcactca aggaagtcac ctaccacctg cgccgttcca gcgagtgggt acagcgtatg 3120
 gggggcggta cagaacaaag ccgccaacgc atgctcgcgc ccattccggc actgtggcgc 3180
 20 ttcaccgtcg aactgacggc cgcagcgcac aacgaggtgc ggttgccga agcgggtatt 3240
 gccgctgccc cggcaactgt gggtgccgcg tggtcaaac aggtgagcga gactttcgtt 3300
 25 tcggtcgagc tgccgtgcc caaggctgcc agccacttct acctggacag tcgcaaaggc 3360
 ctgcacaccg agcacctggg cctgctgctg gccgagatgc agttcctgcc aagggttac 3420
 cccgatgcaa cctggtgagc tgattgccgg cgaccgtggc gcgcgccgc cacgcggcga 3480
 30 cgacctggcc cgggctggg aggtccttgc ccaggtcagt gacctggaag tgacctgtgt 3540
 cagcgtggtc gacctgggaa tagtccgcga cctcgactgg cgcgcccggc acctgcacct 3600
 35 ggtggtcagc ccgacctact ccggtgccc ggcaccgag gtgatcgagg gtgatatecg 3660
 ccaggcgtg gagcaggcgg gcttccccgc accggatctt gagcgcgggt tgaccccggc 3720
 ctggagcacc gactggatca gcgagctggg ccgcgagcgc ctgcgcctet acggcategc 3780
 40 tccgccgcaa ggcagcgcga gcaagcgcag cctgctaggt gaaacacccc aggtgtgctg 3840
 ccgcagtgcc gcagtgccca taccgaattg ctcagccagt tcggctccac cgcttgcaag 3900
 gcgctgtacg ctgccgcgag tgacctggagc cgttcgacta tttcaaatgc atttgagccg 3960
 45 tggagaacgc catgagccag tttcacagcc tgaccatcaa gcaagtgcgc aacgaaacc 4020
 gtgatgcggg ttcgattgcc ttcgacgtgc ccgagcacct gcagcgcgt gcaggacggc 4080
 50 gagctgcgcg tggccgtcaa gcgctgcca ggcggcggtt tctcggcgtt tgccaatgaa 4140
 gtgctcaagg ccggccagca actggaggtg atgccgccag cgggcagctt cttcgtgccg 4200
 ctggacgctg cccgccaggg caattacctg ggcgtggccg ctggtagcgg cattaccca 4260
 55 atcctgtcga ttattggcac caccctggac agtgagccgc acagctgctt caccttctg 4320
 tacggcaacc gctccagctc tggcgcgctg ttcgcgcaca agctcgaaga cctgaaaaac 4380
 60 cgctacctcg accggctgaa cctgattttc gtgttcagcc gcgagcagca ggatgtcgac 4440

ES 2 156 510 A1

ctgtacaacg gtcgcgtcga tgcggacaaa tgcggccagc tgttctcccg ttggctggat 4500
5 gtgccaggcc tggacgccgc cttcatctgc ggccccgagg cgatgaccga aaccgtgcgt 4560
gacagcctgc aggccaatgg cctgggcaag gagcgcattc atttcgagct gttcgccgcc 4620
10 gccggcagcg aaacccgccg cgaagcccgt gaggccgcgc accaggtgga ttccgcgctc 4680
agccacatca ccgtgatcag cgacggccgt gccctcacct tcgacttgcc acgcaacacc 4740
cagaacgtgc tggacgctgg caatgccatc ggtgcggaac tgcctactc gtgcaaggcc 4800
15 ggcgtgtgct cgacctgcaa atgccgggtg atcgaggggg aagtggaaat ggacagcaac 4860
catgccttgg aagactacga agtggcagcc ggtatgtgc tgcgtgcca gacctaccg 4920
20 gtgagcgaca agtggtgct cgacttcgac cagctttaag accgccccgc ctgcttcgcg 4980
ggcgcccccg cttctaga 4998

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir ácido 2-hidroxifenilacético (2-HPA) **caracterizado** por la utilización de las secuencias de nucleótidos que codifican las enzimas necesarias para el catabolismo del ácido fenilacético (PA) en la bacteria *Pseudomonas putida* U, **caracterizado** por las siguientes operaciones:

- a) Aislar el fragmento de DNA que codifica en *P. putida* U para esas enzimas y que es responsable de la hidroxilación en posición 2 del anillo bencénico presente en el ácido fenilacético y de la apertura del anillo aromático del 2-HPA,
- b) Establecimiento de las secuencias de nucleótidos de los genes de dichas enzimas,
- c) Construcción de plásmidos conteniendo estas secuencias,
- d) Transformación de células con dichos plásmidos, y
- e) Uso de dichas células para producir 2-HPA

2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque:

- a) El fragmento de DNA contiene el phaE y los genes de los enzimas responsables de la hidroxilación en posición 2 del anillo bencénico presente en el PA: phaF, phaG, phaH y phaI,
- b) La secuencia de nucleótidos de estos genes está contenida en la SEQ ID NO 3 (phaE) y en la SEQ ID NO 5 (phaF, phaG, phaH y phaI) y conjuntamente en la SEQ ID NO 10.
- c) Los plásmidos construidos son el pKSBLig, pKB2Ox y pLOx.
- d) La transformación con dichos plásmidos de células *E. coli* DH5 α y que se corresponde con la célula CECT 5059, y
- e) El uso de dicha célula CECT 5059 para producir 2-HPA.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque:

- a) El fragmento de ADN aislado contiene una parte del gen phaL que codifica la enzima responsable de la biodegradación del 2-HPA,
- b) La secuencia de nucleótidos de este fragmento de ADN está contenida en la SEQ ID NO 2.
- c) El plásmido construido es el plásmido pk18::mob.
- d) La transformación con dicho plásmido de la bacteria *Pseudomonas putida* U en la se ha interrumpido el gen *phaL* por mutagénesis y que, por tanto, no dispone de este gen funcional y que se corresponde con la célula CECT 5058, y
- e) El uso de dicha célula CECT 5058 para producir 2-HPA.

4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque las secuencias de nucleótidos son secuencias homólogas de microorganismos distintos de *P. putida* U.

5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque las secuencias de nucleótidos son fragmentos de estos genes que codifican para proteínas funcionantes.

6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque las secuencias de nucleótidos presentan mutaciones, inserciones o deleciones que mantienen o incrementan su función.

7. Un procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque la mutación del gen *phaL* pueda hacerse por otros métodos conocidos.

8. Un procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque la la mutación afecta la normal función del gen *phaL*.

9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque las células transformadas con los plásmidos descritos son distintas de *P. putida* U y *E. coli* DH5 α .

ES 2 156 510 A1

10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque se utiliza las proteínas codificadas por el gen *phaE* y por la secuencia de nucleótidos que codifica el complejo responsable de la hidroxilación del anillo bencénico presente en el ácido fenilacético (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 Y SEQ ID NO 9).

5

11. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque las células transformadas se cultivan en un medio que permita la conversión de PA en 2-HPA.

10

12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 2 **caracterizado** porque las células transformadas se cultivan en medios que permitan la expresión de las proteínas (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 Y SEQ ID NO 9) y porque estas proteínas se utilizan, tanto como células en suspensión como en forma de extractos celulares, para la transformación del PA en 2-HPA.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

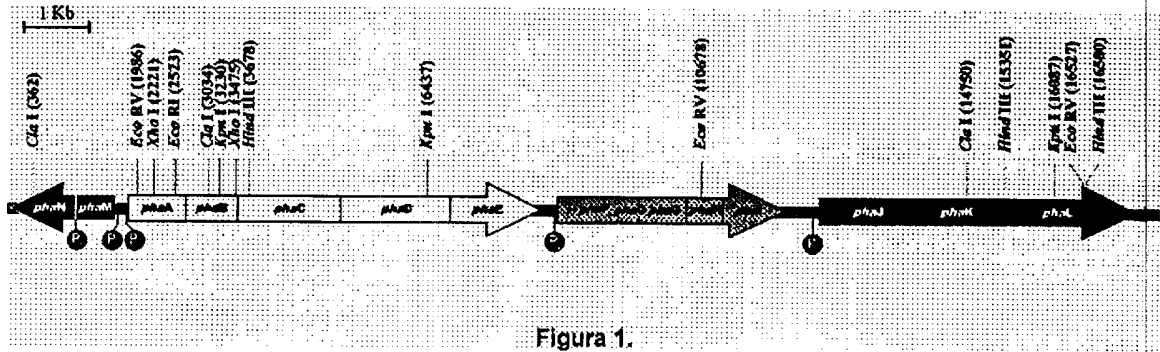


Figura 1.

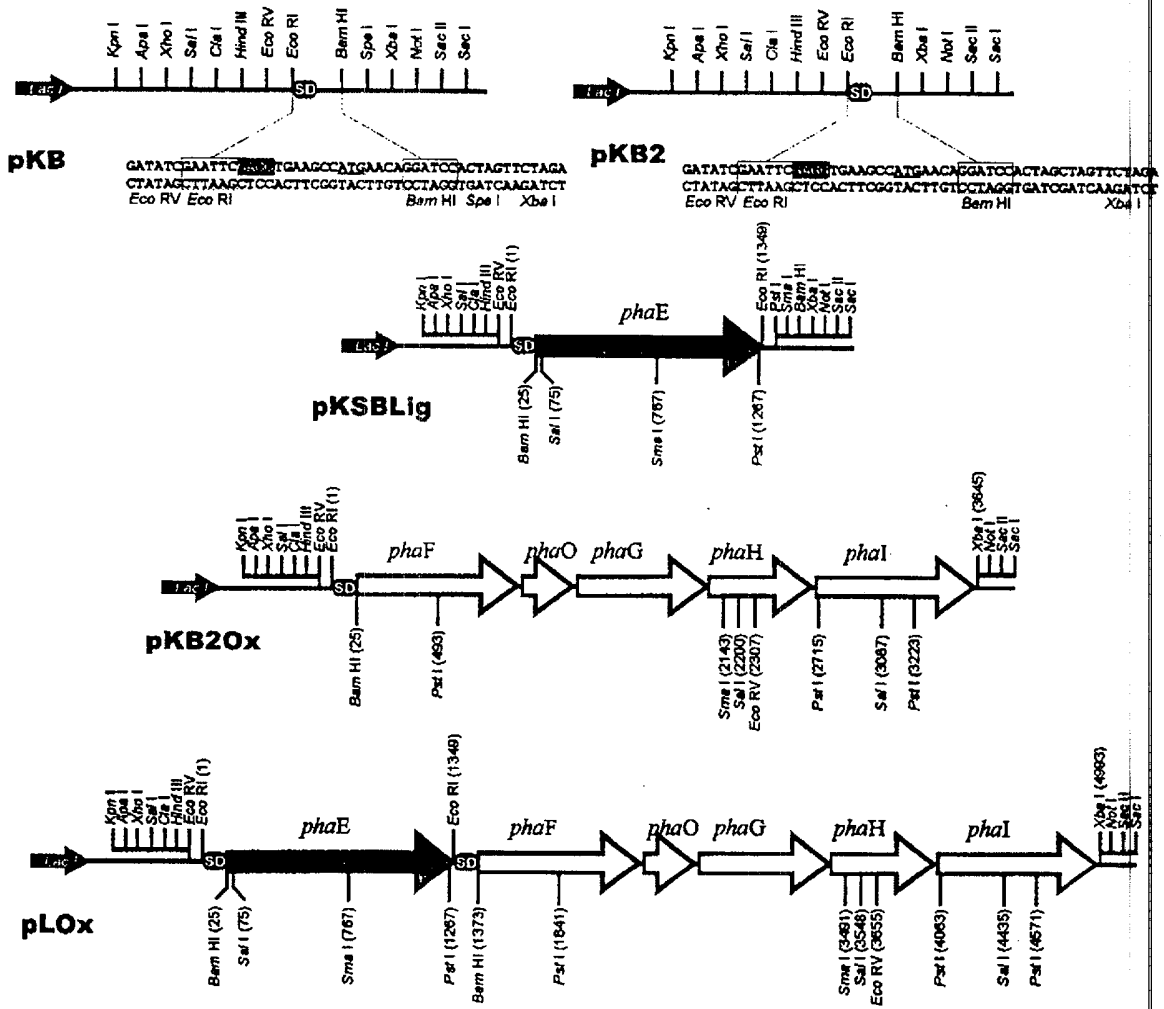


Figura 2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12P 7/42, C12N 15/52, 15/31 // (C12P 7/42, C12R 1:40)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2093984 T3 (BASF AG) 01.01.1997, todo el documento.	1-12
A	OLIVERA, E.R. et al. "Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in Pseudomonas putida U: The phenylacetyl CoA catabolon", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 1998, Vol. 95, nº 11, páginas 6419-6424.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud.

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.04.2001

Examinador
A. Lázaro Andrés

Página
1/1