



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

② Número de solicitud: 009802352

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C12P 7/42

C12N 15/52

C12N 15/31

//(C12P 7/42

C12R 1:40)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **11.11.1998**

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

Fecha de concesión: **13.12.2001**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.01.2002**

④ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.01.2002**

⑦ Titular/es: **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 (*phaL*) 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.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## 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 (P<sub>1</sub>) 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 fenilacétil-CoA ligasica que cataliza el primer paso de la ruta y que rinde como producto fenilacetil-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 fenilacetil-CoA, generando 2-hidroxifenilacetil-CoA que es hidrolizado a ácido 2-hidroxifenilacético (2-HPA). Todas ellas están bajo el control del promotor P<sub>2</sub> y constituyen el segundo operon. La tercera unidad (tercer operon), gobernada por el promotor P<sub>3</sub>, 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  $\beta$ -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 P<sub>1</sub>, 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* aún 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 cumplieran 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 acúmulo 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

## ES 2 156 510 B1

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. P<sub>1</sub>-P<sub>5</sub>, 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  $\beta$ -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 4848)*

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'-CGCCCGGAATTCGCCGAAGCCGTCGAC-3' y 5'-CAGGTCTGAATTCTTCGCTGTCTGG-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 disrumpir 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 Fertigplatten Kieselgel 60, 10 x 10, Merck) y como sistema de desarrollo eter saturado de H<sub>2</sub>O (que contenía sulfato amónico 28 % -p/p-) y metanol en proporciones relativas 50:25:5. En estas condiciones los R<sub>f</sub>s para 4-HPA, 3-HPA, PA, 2-HPA, 3,4-diH-PA y 2,5-diHPA 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 <sup>14</sup>C (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 N<sub>2</sub>. El residuo obtenido se disolvió en 0,05 ml de piridina suplementada con 3-etilvanilina (a una concentración de 4mg/ml) como patrón interno. Alícuotas 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

5 *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

10 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*

15 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.

20 *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 coste EcoRI, se han subrayado).

25 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 $\alpha$ '. 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  $\beta$ -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  $\mu$ 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 digirió con la enzima Bam HI y se religó (Sambrook, J., Fritsch E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning CSHL 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 digirió 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  $\alpha$  de la  $\beta$ -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.

50 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*

55 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*

60 5' GGTGCCTCTAGAAAGCGGGG 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 $\alpha$ '. 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 $\alpha$ ' transformadas con el plásmido pLOx

Una suspensión acuosa de *E. coli* DH5 $\alpha$ ' transformada con el plásmido pLOx CECT 5059) (DO<sub>540nm</sub>=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  $\mu$ g/ml) + 2.5 mM PA
- b) Un medio con la siguiente composición (g/l): glicerol, 5; casaminoácidos (Difco) 1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3; NH<sub>4</sub>Cl, 2.14; NaCl, 0.5; ZnCl<sub>2</sub> 0.125 10<sup>-3</sup>; CoCl<sub>2</sub> 0.5 10<sup>-3</sup>; NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.05 10<sup>-3</sup>; HBO<sub>3</sub> 0.75 10<sup>-3</sup>; MnCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O 0.075 10<sup>-3</sup>; CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.025 10<sup>-3</sup>; NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.075 10<sup>-3</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0.12; ampicilina 1.10<sup>-3</sup> 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

60

## ES 2 156 510 B1

<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 B1

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

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

10 <400> 1

15 gatcaccccc tggccctcgc gcaactggatg cagggacccc tttgtttgca tcgttccgca 60  
gttttcttgc ccatgcatgc tcttggactg gtcaccccgcc ccagttgcgcc agactcgggc 120  
tgatttccga tgcgcgaagg aggcctgaac atgtctggcc aactgaaagt cacgctgctc 180  
20 gaacagcctg cttcgcctcc ggttcacctg aaaccgctgg cgacgctgtg ccgtgattgt 240  
cgggtcagcg gcttgtgcct gccacccggt ttgccctcgc acgacaatag ctgcctgggc 300  
tcgctgatcg ggccgcgcat gcgcatccgc aaaggcacgg cgctgttcaa tgccaatgat 360  
25 cccttgacca tgctctatgc cgtgcgctgc ggcagtttca agaccagcct caacagcgtc 420  
gagggccagg gtgtcgtgat caacttctgg atgccgggcg acgtgctcgg gctggatgcc 480  
30 atcgctacag atcaccatgt ctgcgacgcg atcgccctgg aagatagcga agtctgcccg 540  
gtcccctatc gtcgcctgca agcgcctggcg cgcgacttcc cggccttgca gcaaagcctg 600  
35 aaccgcttga tgagccggga gatcgtacgt gaacacgagc gcgtgctgat gttgtgcaac 660  
ctcaccgccc aacagcgcct ggccagtttt ctgatcgggc tgtcccggcg cttcgtcaac 720  
cgtggctact ccgcccattg cttcatgtta cgcattgctgc gcgaggacat agcatcctac 780  
40 ctgggcctgc gcctggagac cgtatgccga tcggtcgccc gattgctgctc gcaagacgtc 840  
gtcagcctgc acggcaggct ggtggaaata ctgcacatgc cagcattgat ggcggtcgag 900  
45 caaggcggcc ttgacggtga acgcaagcac tccccgaaag caccatgctc gacaccctga 960  
agccctgccc ccgcccggct gagaaccttc gccatcaccg acctgcaggg tgtagcattt 1020

50

55

60

ES 2 156 510 B1

ttgttcaggc cagcccgcc aagcgctggt agaaaccctc gttcacatcc ggcaaaggcc 1080  
 5 cgctggccgt ctccagggct gcattcagcc actcctctgc cttggcaaacc accagccgat 1140  
 acaggttgcg gcacaactgc cgcgcagccc ttcctcccca gtcccctggc agcagctcgt 1200  
 ctggcagttg cgggtcgcgc aacagcaggc ggcggtactc gtgaatcagc aggggtgcgcg 1260  
 10 ccaggaaaca atcttgcgca tcgagcagtt gctgctcttt caggetctgc cacagcggcc 1320  
 tgaacagctg gatgaactcg ctgtactgct gccccagctc atcgatacgc cagctctccc 1380  
 15 gcacctgggc gcgcatggcc ttggacgcga gcacttcctg ggtgtgggtt tcgaagacga 1440  
 tactgtcgtc gctggcttcc aggtcacgca aggttgccgt cagatcagcg cggctctgcc 1500  
 gtgggcagcc aagcaggttc ggcgccataa cgccaaacc ctgccattcc agctcttcac 1560  
 20 gcaaggcctt gcgcttgccg gcctcaagct gcgacagcaa caccagcgtc caggcgccat 1620  
 cccaggccgg ttggctcggg ctgtagacac gtttgaaggc ttttctgaaa cggcggcggc 1680  
 cagtgcccggt caggctgtag taactgcgtc ggccaacttt ttcagcggtg agccaaccct 1740  
 25 ctttggtgag gcgaaagatc gacgtgcgga tcagtcgttc gttgatgccg atcggctcca 1800  
 gcaggttgat caggctaccc agccagaccg gtcccccatg gggctcgtg gcatcgccgt 1860  
 30 acaaggatgat gatcagtgag ctggcgcgga ttggcgtctg ctctgaaaag cgagtgatca 1920  
 ggttgttcag tggggcaaga ttgctcatgg gcgaactgtg cgcggatcaa gcaccgacta 1980  
 tacctgtgog gcgggcccgc tgaccattgc gtgacgctac caggctcatg ccgaagcctg 2040  
 35 gcctttgggc cgtacaccgg tatcttccat gcgcgggggc cctgggttcg cttcggccaa 2100  
 tggcgggcat tcgaccatgc tgttcatgca gcgctgcgcc aggtgctgat actccgcagt 2160  
 40 accgcgctgc ttccaggcca actcctgttc gctcaagggc cgtttgacct gggccggcga 2220  
 ccccatcacc aggctctgog cttccatgac gaagccggct ttgacgaacg ccgctcggcc 2280  
 gacgatgcag cgtggtgcga catgggcgcc atccatcacc acagcgttca tgccgatcaa 2340  
 45 ggcgtctcgg ccactttgc agccgtgcaa caccgcgcca tgaccaacat gcccgtttcg 2400  
 ttcgaccacc gtgtcggcac ccggaaaacc atgcattaca caggtgtcct gcaagttggc 2460  
 50 gccctcttcc agcacgatgc ggcgaaaac acccctgagc gatgccaagg gccctatgta 2520  
 gcaacgtggg ccgacgatga cgtcgccaat cagtactgcg cttgggtgca cgtaggctgt 2580  
 ggggtgaacc acaggcgtca agccgtccag tcgatagcaa ggcatgaaag ctccagaaat 2640  
 55 gatttgaaat ggcacccgat cttgtatcaa aaaatatttc gtcgtcaatc ggcgtagtgc 2700  
 tgtatcgctt tctcatggct aagatcctcc tgaaaaccta gcaacaaat cagcaatctc 2760  
 60 gccattatca gcgctgaata cggcatttgc actgcacgac agcaacacta tcattgacac 2820

ES 2 156 510 B1

tatgagatac acgaaacaat ttctgatggt gcatttccgt atcgcgtaat gcatatactc 2880  
5 accccacctg gtcgtgatcc atcgtcacgc ccctgcaaac aattccaaga aatgccggcc 2940  
cacgatgtgc cgtgcgtgca gccagaggaa cccgacatgc cgcgatatct cgacgtgcag 3000  
gcgccggaaa acggcggtca gctcattacc ctgcaacggc ccgaggcact gaatgccctg 3060  
10 tgtaccgagt tactggcaga gctggccact gcgctcgacg cagccgcccg ggatgaccag 3120  
ataggcggtg ttgtgctcac cggcagccgc aaggcggtcg ccgcaggcgc tgacatccgt 3180  
15 gaaatggccg agcgcgacct ggtcggcatc ctcaacgacc ctcgagtagc ccaactggcaa 3240  
cgcacgcgag cctttgcaa gccgctgatt gctgcgggta acggctacgc cctgggtggc 3300  
ggttgcgaat tggatgatgtg tgccgacatc gtcacgcccg gcagcgacgc ccgcttcggc 3360  
20 cagccggaga tcaacctcgg catcatcccc ggtgctggcg gcacacagcg cctggtgctg 3420  
gccgtcggca agccgctggc catgcagatg gtgctgaccg gcgaagccat caccgcccgt 3480  
cagccccagc aagccggcct ggtcagcga ataaccagc ccgaattcac cgtagaacgc 3540  
25 gccatgcaga tcgcccgcaa catcgccgcc aaggcgccgc tggcagtgcg cctggcaaaa 3600  
gaggcgctgc tcaaggccgg tgataccgac ctggccagtg gcctgcgctt cgaacgccat 3660  
30 gcattcacc tgctggccgg caccgcccgc cgtgacgaag gcattcaggc ctttcaggaa 3720  
aagcgcgccg cgcgcttcca aggccgctga tcatttacc ctcgactgac ggagcgagtc 3780  
tgtcatgact ttccagcaca tctgttttc catcgaggac ggctggtcct tcctctcctt 3840  
35 gaaccgcccc gagcagctga acagcttcaa cgccgccatg caccttgaag tgcgcgaagc 3900  
cctcaagcaa gttogccaga gcagtgatgc acgggtgctg ttgctgacgg ctgagggccg 3960  
40 cggcttttgc gccggccagg acctgtccga ccgtaacgtc gctccagacg ccgaggtgcc 4020  
agacctgggc gaatcgatcg acaagttcta caaccggtg gtgcgcaccc tgcgcgacct 4080  
gccgctgccg gtgatctgtg cggtaaattg tgtggccgcc ggcgccggtg ccaacatccc 4140  
45 actggcctgc gacctggtgc tggccgggag atcggccagc ttcattcagg cattttgcaa 4200  
gatcggcctg gtgcccggact ctggtggtac ctggttgctg ccgcgccctg tcggcatggc 4260  
50 gcgggctaaa gcaactggca tgctgggcca gcggcttggg gccgaacagg cccagcaatg 4320  
ggggctgatc caccgctggtg tggacgatgc cgccctgcgc gacgaagccc tcaccctcgc 4380  
tcgccagctc gccagccagc ccacctatgg cctcgcgctg atcaagcgca gcctcaatgc 4440  
55 cagtttcgac aacggcttcg atgaacaact ggaactcgag cgcgacctgc aacgcttggc 4500  
cgggcgcagc gaggactacc gtgaaggcgt gagcgccttc atgaacaagc gcacaccgcg 4560  
60 attcaagggg cgctgaacat gggcgcactc gcaagcacag tgcaagtagc ggtgatcggg 4620

ES 2 156 510 B1

gccggtgcca tgggcccgg 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 gcaggcgctc ttcagccagc tagaagccct gtgcacggct 4920  
 gattgcataa ttgccagcaa cacttcgctg ctgtccatta ccagcctggc tgcaggcctt 4980  
 15 gcacgcccgc agcaggtggt gggcatgcac ttettcaacc cggcaccgct gatggcgctg 5040  
 gtcgaggtgg tgtcaggcct ggcaaccgaa ccggccgtgg ccgctgtgat ctacgacacc 5100  
 gcccaggcct ggggcaaaca gccggtgcac acgcgctcga caccgggctt tatcgtcaac 5160  
 20 cgtgtggcac ggccttteta tgccgagagc ctgcccctgc tacaggaagg agcagcggac 5220  
 tgcgccagcc ttgatgcgct gcttcgcat gctgggtggt tccgcatggg ggcgttcgag 5280  
 cttaccgact tgatcggcca cgacgtcaac tacgccgta cgtgctcagt gttcgatgcg 5340  
 25 ttctatgggg acttccgctt ccagccttca ctggtgcaaa aagagctggt ggatgccggc 5400  
 cgccctcggc gcaagactgg gcaaggcttc tatagctacg ccgaaggcgc cgagcgcctc 5460  
 30 gcaccggctg aattgcacag ctccaccaag gccgaagcct gcgttatcga ggggcaactg 5520  
 ggtgtacttc agccactggt cgagcgcctg cgccagaacg gcatcgtcgt gaccagcgt 5580  
 gccggtagcg gcgtgatcca ggtcgggtgat gccaccctgg cattgtccga tggccgcctc 5640  
 35 gccagccagc gcgcccgtga agatgggctg cgcaacctgg tgctgctcga tctcgcgctg 5700  
 gactacagca ctgcctcgcg gatggccatc agctggtcgg gcgataccac cgaaagcgc 5760  
 40 cgcgaccagg cggtagccct gctgcagcgg gccggcctca aggtcactgc ggtcgcggac 5820  
 ctgcccggcc tggtagtact gcgcacagtg gcaatgctcg ccaacgaagc cgctgatgca 5880  
 gtgctgcagg gcgtcggcag cgccgcccgc atcgacctgg ccatgcgcgc cgggtgcaat 5940  
 45 taccctcgcg gcccgctggc ctggggcgac aacatcggta ttgccacac cctgcgcgctg 6000  
 ctcgacaacc tgcagcgcag ctatggcgag agccgctacc gcccttcctt gttgttacgt 6060  
 50 cgctgcgagg ccaaggagg caccctgcat gactgaactc gaactggcac acgcctgtgc 6120  
 cgacgccatg tatgcccgcg acccgccac tcagggcctg ggcatcagcc tgctggatgc 6180  
 cggcccgggc cgggcaagcc tgcgtatgac ggtacgcgcc gacatgatcc agggccacgg 6240  
 55 cacgtgccat ggcgggttcc tcttcgcctc cgccgactcg gcgtttgctt ttgcctgtaa 6300  
 cagctatgac caggccaccg tggcgctggg ctgcagcatt gactacctgg ccccgcgctt 6360  
 60 gcgcatgac gtgctcaccg ccgacgccag cgaggtcagc cgcaaaggcc gcaccggcct 6420

ES 2 156 510 B1

gtacgacgtg cgcattccaca accagcgcgg tgagctggtg gcgatgttcc atggcaaate 6480  
 5 ctacaaagtg cgcggcaccg tgctggcgca ggagacacaa catgactgaa cccaccctcg 6540  
 ccgatgcctt gatcatcgac gccgtgcgca ccccatcgg ccgctatgcc ggggccttga 6600  
 10 gggcgctacg tgccgacgac ctcgccgcca tccactgaa ggccttgatc cagcgccacc 6660  
 ccgagcttga ctggaaagcg atcgacgacg tgatcctcgg ctgtgccaac caggccggcg 6720  
 aagacaaccg caacgtggcg cacatggcca gcctgctggc cgggctgccg atggaagtgc 6780  
 15 ccgggaccac gatcaaccga ctgtgtggtt cgggcctgga cgccatcggc aacgcggccc 6840  
 gcgccctgcg ctgctgtgaa gccgggctga tgctggctgg cggcgtagag tcgatgtcgc 6900  
 gtgcccatt cgtgatgggt aagtcggagc aggcgttcgg ccgcgacgag gagttgttcg 6960  
 20 acaccacat cggttggcgc ttcgtcaacc cactgatgaa ggctgcctac ggcaccgatt 7020  
 cgatgccgga aaccgccgag aacgtggctg aacagtttg catttccgc gtcgatcagg 7080  
 atgccttcgc cctgcgcagc cagcacaagg cgctgcagc tcaggcctgc ggccgcctgg 7140  
 25 cgcaagaaat cgtaccggtc gagatcccgc agcgtaaagg accggccaaa cgggtggagc 7200  
 acgacgagca tccgcgcggc gacacgacgc tggaaact ggccgcctc ggcacgcat 7260  
 30 tccgtgaggg cggcagcgtc accgccgga atgcctcgg cgtcaacgac ggcgcctgtg 7320  
 ccctgctgct ggccagcagc gccgctgcc ggcccatgg cctgaaagcc cgcggccgta 7380  
 tcgtcggcat ggcggtggcc ggggttgagc cgcgctgat gggcatcggc ccggtaccg 7440  
 35 caaccggaa ggtgcttgag cttacgggat tgcgcttggc cgacctgac gtcacgaaac 7500  
 tcaacgaagc gttcgcgcc cagggcttgg cagtgttgcg cgagctggg ctggccgacg 7560  
 40 acgacccccg ggtcaaccgc aacggcgag ccatcgcct cggccatccg ctgggcatga 7620  
 gtggtgcgcg gctggttaca accgccctcc acgagctgga agcaaccgcc gggcgctatg 7680  
 ccctttgac catgtgcatc ggggttggcc aaggcatagc catggtcatc gagcgctct 7740  
 45 gagcggatca gaccatcagc ctgttaccga accgaacgca gccgtatatg ctgcgctcat 7800  
 gacactcacc gcgtggcttg caaccgctgg cgcgcggcgt acaagaaca ttcgagtga 7860  
 50 gccatgaaca tgtaccatga tgccgaccgt gccctgttg acccgatgga aaccgccagt 7920  
 gtcgacgccc tgcgccagca ccagctggag gcctgcgct ggagcctgaa gcacgcctac 7980  
 gacaatgtgc cgctgtaccg ccagcgcttt gccgaatgcg gcgcccacc cgacgacctc 8040  
 55 acgtgcctgg aagacctggc gaagttcccc ttcaccggca agaacgacct gcgcgacaac 8100  
 taccctacg ggatgttcgc cgtccccag gaagaggtgg tgcgctgca tgctccagc 8160  
 60 ggcaccaccg gcaagccgac ggtggtcggg tacaccaga atgacatcaa cacctgggcc 8220

ES 2 156 510 B1

aatgtcgtgg cgcgctcgat ccgtagcgcc ggcgggcgca agggtgacaa agtgcattgt 8280  
 5 tcctacggct atgggctttt cactggcggg cttggtgagc actacggcgc cgagcgctg 8340  
 ggctgtacgg taatcccgat gtcgggtggc cagaccgaga agcaggtgca gctgatccgc 8400  
 gactttcagc ccgacatcat catggtcaca ccgtcctaca tgctcaacct ggccgacgag 8460  
 10 atcgagcgcc agggcatcga cccgcatgac ctcaagctac gcctgggcat ttctggtgcc 8520  
 gaaccttga ccgatgaact acgtcgctcg atcgagcagc gcctgggcat caatgccctc 8580  
 15 gacatctatg gtttgtcgga aatcatgggc cccggggtgg ccatggaatg catcgaacc 8640  
 aaggacggcc cgaccatag ggaagaccac ttctacccc aaatcatcga cccggtcacc 8700  
 ggcaagtat tgccagacgg tcagctgggc gaactggtgt tcacctcgct aagcaaagag 8760  
 20 gcgcttccga tgggtgcgta ccgcaccggt gacctaccc gcctgctgcc cggcaccgcc 8820  
 agccgatgc ggcgatcgg caagattacc gggcgcagtg acgacatgct gatcattcgc 8880  
 ggcgtcaacg tgttcccagc ccagatcgag gaacaggtat taaaaataaa acagctttcc 8940  
 25 gagatgtatg agattcattt gtatcgcaat ggcaacctgg acagcgtaga ggtgcatgta 9000  
 gatttgcgtg cggagtgcc aacacctgat gaagccagc gcaagctggt tatcggggag 9060  
 30 ctgagcaaac agatcaagac ctacatcgcc atcagcacc aggtgcacct gcaggcttgc 9120  
 ggcacgctca agcgttccga gggcaaggcg tgccacgtgt acgacaaacg gttggccagc 9180  
 tgattcattc ggctgcctct tcggccccgg catagtccgg ggcttttttt tgcgttttat 9240  
 35 gcgcttgc aggtgccgca caaccctgt ggcagcgggt ttacctgca aggggcccga 9300  
 aagcgataca caaatcttat ttgatacacc taaaactggt tgacgttgtg ttttgtatcg 9360  
 40 cttacaaatg actcatgcct tagcaggagt cgcagcaca gtacgcacag ctagtggaaa 9420  
 ccggagtcaa gcgctgaaag tcgctggaag aatgtcccc cgaggaacgc aacttccagg 9480  
 aaaagatcga cgccgaaatc aagatcgaag ccaagaactg gatgcccag gctaccgcc 9540  
 45 agacctgat ccggcagatt tcccagcac cccactcgga aatcgctggc atgctgcccg 9600  
 aaggcaactg ggtcaccgc gcgcctagcc tcaagcgca gctgcaactg atggcaaaga 9660  
 50 tccaggacga ggccggccac ggctgtacc tgtacagcgc catggagacc ctgggcccgc 9720  
 accgcgacga ggagatcgc aagctgcaca gcggcaaggc gaagtattcg agcatctca 9780  
 actacccac cctcagctgg gccgacatgg gcgcagtgg ctggctggtg gatggggccg 9840  
 55 ctatcgtaa ccaggtggtg ctgacgcga cctcctatg cccctactcc cgcgcaatgg 9900  
 ttcttatctg caaggaagag agcttccacc agcgcaggg ctacgaaatc ctctgacca 9960  
 60 tgatgcgtca cggcacacag gccagcgcg acatggtcca ggacgcgatc aatcgctgt 10020

ES 2 156 510 B1

ggtggccatc gctgatgatg ttcggeccca gcgacgaaca ctccccgaac agcgcacagt 10080  
 5 ccatggcctg gaagatcaag cgccagacca acgatgaact gcgccagcgt ttcacgcgacc 10140  
 agaccgtgcc gcagctcgaa ctgctcggct gcaccgcccc cgaccctgaa ctgaagtgga 10200  
 acgccgagcg cggtcactac gacttcggcg aatccagtg ggacgagttc tacgaagtga 10260  
 10 tcaagggcaa cggcccgtgc aaccaggaac gtgtcgccac ccgccgcaag gccatcgagg 10320  
 acggcgcctg ggtacgcgag gccgccgtgg cctacgcgcg caagcaacag aacaagaacg 10380  
 15 ccgcctgagc ggcgattgat gcggagatcg aaaatgtctg tctggaccct ctacgaagtg 10440  
 ttcgtgcgca gcaagcacgg ccttaaccac aagcatgtcg gcagcgtgca cgccgcgac 10500  
 gccgccatgg ccatcgaaaa tgcccgcgag ctgtacaccc gccgcagcga gggcgtcagc 10560  
 20 ctgtgggtag tgccttcggc gctgatcacc gcctcctccc ccgacgagaa agaccgcctg 10620  
 ttcgctcctt cggacgacaa ggtctaccgc catgccagct tctacgagct gcccgatgaa 10680  
 25 gtcggacaca tgtgaggttg gtcatgcaca acgaagccct gatcccttac ctggtgctgc 10740  
 tcggcgacag tgccctggtc caaggccagc gcctctgcga atggtgtggc cacgcccctg 10800  
 ccatcgaaga agagctggcc ctgatgaacg ttggcctgga cctggtcggc caggcccgca 10860  
 30 actggctgga atacgcagcc gaactgcttg acgacggtcg cgacgccgac gccctggcct 10920  
 tccgccgaga cgagcgcgcc taccgcaacc tgctgctggt cgagcaaccc aacggtgatt 10980  
 tcgccgtgac catgaccaag cagttcctct acgacgcctg gcacttcgcc gtgctacagg 11040  
 35 gcctggtcgg gtcccgcgac gagcgtatcg ccggtatcgc cgccaaggca ctcaaggaag 11100  
 tcacctacca cctgcgccgt tccagcgagt ggttacagcg tatggggggc ggtacagaac 11160  
 40 aaagccgcca acgcatgctc gccgccattc cggcactgtg gcgcttcacc gtcgaactga 11220  
 cggccgcccag cgacaacgag gtgcggttg ccgaagcggg tattgccgct gcccggcaa 11280  
 ctgtgggtgc cgcgtggctc aaacaggtga gcgagacttt cgcttcggtc gagctgccgc 11340  
 45 tgcccaaggc tgccagccac ttctacctgg acagtgcgaa aggcctgcac accgagcacc 11400  
 tgggcctgct gctggccgag atgcagttcc tgccaagggc ttaccccgat gcaacctggt 11460  
 50 gagctgattg ccggcgaccg tggcgcgcg ccgccacgcg gcgacgacct ggcccgggcc 11520  
 tgggaggtcc ttgcccaggt catggaccgg gaagtgcctg tggtcagcgt ggtcgacctg 11580  
 ggaatagtcc gcgacctega ctggcgcgcc ggccacctgc acctggtggt cacgccgacc 11640  
 55 tactccggct gcccgccac cgaggtgatc gagggtgata tccgccaggc gctggagcag 11700  
 gcgggcttcc ccgaccgga tcttgagcgc cggttgacct cggcctggag caccgactgg 11760  
 60 atcagcgagc tgggccgca gcgcctgcgc ctctacggca tcgctccgcc gcaaggcagc 11820

ES 2 156 510 B1

gccagcaagc gcagcctgct aggtgaaaca cccaggtgt gctgccgcag tgccgcagtg 11880  
 5 cccataccga attgctcagc cagttcggct ccaccgcttg caaggcgctg tacgctgccg 11940  
 cgagtgcctg gagccgttcg actatttcaa atgcatttga gccgtggaga acgccatgag 12000  
 ccagtttcac agcctgacca tcaagcaagt gcgcaacgaa acccgtgatg cggtttcgat 12060  
 10 tgccttcgac gtgcccgagc acctgcagcg ccgtgcagga cggcgagctg cgcgtggccg 12120  
 tcaagcgcgt gccaggcggg cgtttctcgg cgtttgccaa tgaagtgctc aaggccggcc 12180  
 15 agcaactgga ggtgatgccg ccagcgggca gtttcttcgt gccgctggac gctgcccgcc 12240  
 agggcaatta cctgggcgtg gccgctggta gcggcattac cccaatcctg tcgattattg 12300  
 gcaccaccct ggacagtgag ccgcacagct gttcacctt gctgtacggc aaccgctcca 12360  
 20 gctctggcgc gctgttccgc gacaagctcg aagacctgaa aaaccgctac ctcgaccggc 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 cgccgccggc agcgaaacc 12660  
 30 gccgcgaagc ccgtgaggcc ggcaccagc tggattccgc gctcagccac atcacctgta 12720  
 tcagcgacgg ccgtgccctc accttcgact tgccacgcaa caccagaac gtgctggacg 12780  
 ctggcaatgc catcggtgcg gaactgcctt actcgtgcaa ggccggcgtg tgctcgacct 12840  
 35 gcaaatgccg ggtgatcgag ggggaagtgg aaatggacag caaccatgcc ttggaagact 12900  
 acgaagtggc agccgggtat gtgctgtcgt gccagacctt cccggtgagc gacaaggtgg 12960  
 40 tgctcgactt cgaccagctt taagaccgcc ccgcctgctt cgcgggcgcc cccgctocca 13020  
 caggcaccgc acaaaggctg aggacaacat cctccctgtg ggagcgggca tgcccgcgaa 13080  
 gaggcccttt gcaataccgc aacaccgcg tgacctcaac aaaacaatta caaaaccaag 13140  
 45 agatcgcttg ccatgacacc cgaacacata gaaagcatcg ccaaccacc cgatttccaa 13200  
 cacctggtgc ggcgtaaacy ccgcctcaac ggcagcctga ccctggccat gctggtgatc 13260  
 50 tactacggct tcgtcctgtt ggtggcgctt tctcccagca cgcttggeca atcccttagc 13320  
 ggcggtgtga ccacagtcgg catgctggtg ggggtgctga tgggtgctgct gtccttcgcc 13380  
 ctgaccggca tctacgtaca ccgcgccaac aatgtgctcg acccgctcaa cgaaaaggtc 13440  
 55 aagcaggagt gcgcacaatg aactggaccg ccattctgat gttcatggtg ttcgtctgct 13500  
 tcacctgct ggtcaccgcg tggcgggcct tgcgacccg ttcggccagc gacttctata 13560  
 60 ccgcgggtgg gggcctgacc ggcattgcaga acggcctggc gattgccggc gacatgatca 13620



ES 2 156 510 B1

ggcgcgcctc cttcctgggc atttccgcga tgatgttcat gaacggctat gacggcctgt 13680  
 5   tgtatgccct gggcgtgctg gccggctggc cgatcattct gttcctgac gccgaacgcc 13740  
 tgcgcaacct gggcaagtac acctttgccg acgtagtacg ttaccgcctg gcacaaacct 13800  
 cgggtgcgcct gacttcggcg ttcggcaccg tggcgtggc gctgatgtac ctggtggcgc 13860  
 10   agatggtcgg cgccggcaag ctgatcgagc tgctgttcgg catcagctac ctgtacgccg 13920  
 tgatgctggc cgggtgactg atggttgctt atgtcacctt cggcggcatg ctgccacca 13980  
 15   cctgggtgca gatcatcaag gcggtgatgt tgctgtcggg caccagcttc atggccttca 14040  
 tgggtgetcaa gcacttcggc ttcagcaccg aagccatggt cggcagcgcc gtcgccgtgc 14100  
 atgccaaggg ccaggccatc atggccccgg ggggcttgct gtccaatccg gtggatgcca 14160  
 20   tttccctggg cttgggcatg atgttcggca ccgccggcct gccgcatac ctgatgcgct 14220  
 tctttaccgt cagtgcgcc aaggaagccc gcaagagcgt gttctacgcc actggttca 14280  
 25   tcggttactt ctacctgctg ctgatcgta tcggctttgg tgccatcgtg atggtcggca 14340  
 ccgagccgtc ctaccgcgac gcgaccggtg caatcattgg cggcggcaac atgatcgccg 14400  
 tgcacctggc ccaggctgtc ggtggcaacc tgttccttgg cttcatctcc gctgtggcct 14460  
 30   ttgccaccat cctagccggt gtcgcggccc tggcgctgtc cggcgcacgc gcggtctccc 14520  
 acgacctgta tgcctgctg atccgccaa gcaaggccac cgagcaggaa gaaatgcgcg 14580  
 35   tatcgcgtat cgccacctg ctgatcggcc tgctggcggc gctgcttggc ctgatgttcg 14640  
 agtcgcagaa catcgccttc ctgtccggcc tgggtgctggc ggtggctgcc tcggtcaact 14700  
 tcccggtact gctcctttcg atgttctgga agggcctgac cactcgcggc gcggtgtgcg 14760  
 40   gcagcatggc cggcctggcg tcggcgggtg tgctggtggt attgggcccg gcagtgtggg 14820  
 tcaacgtgct gcatcacgag aaagcgtgt tcccgtacag caaccggcg ttgttctcca 14880  
 45   tgagcctggc attcctcagt gcgtgggtgt tctcggttac cgacagctcc gaacgtgcca 14940  
 gtgaagaacg aggccgctac ctggcccagt tcatccgctc catgaccggt atcggcgtg 15000  
 ccggcgccag caagcactga cctcaaggac gaacaacct gtcgggtaaa acaacaaca 15060  
 50   tgaaccgcac tcacttcagt tcagctgcct gectggccac ccttgcggtg ccagtgcgg 15120  
 cgatggccga tttcatcggc gacagccacg cacgcctgga gctgcgcaac cactacatca 15180  
 accgcgactt tcgccagagc aacgccccgc aggccaaggc agaggaatgg ggccagggat 15240  
 55   ttaccgcaa gctggagtcc ggcttcaccg agggcccggc cggctttggc gttgacgcca 15300  
 tgggcccagc gggatcaag ctcgactcca gccgcgaccg ccgcaatacc gggctgctgc 15360  
 60   ccttcggccc gaacagccac gaaccggtt atgattacag cgaactgggc ctgaccggca 15420

ES 2 156 510 B1

5     aaatccgcgt gtccaaaagc accctgcgce tgggcacctt gcagccaatc ttgccggtgg 15480  
 10     5     tggctctaca cgacacccgc ctgctggcgt ccaccttcca gggcggcctg ctgaccagcc 15540  
        aggatgtcga tggcctgacc ttcaacgccg gccgcctgac caaggccaac ctgcgcgact 15600  
        cctcggggccg cgacgacatc ggctacggcg ctgccagcag tgaccacctg gactttggcg 15660  
        10     gtggcagcta cgccatcacc ccgcaaacca gcgctcagcta ctactacgcc aagctcgaag 15720  
        acatctaccg ccagcagttc gtcggcctga tcgatacccg ccccttgagc gaaggcgtga 15780  
        15     gcctgcgcag cgacctgcgc tacttcgaca gccgcaacga cggcgccgag cgtgccggca 15840  
        acatcgacaa ccgcaacttc aacgccatgt tcaccctggg cgtgcgcgcg cacaagttca 15900  
        ccgccacctg gcaacaaatg tccggcgaca gtgccttccc gttcgtcaac ggcggcgacc 15960  
        20     cgttcacctg caacctgggt acctacaaca ctttcacctg cgccgggctg gactcctggc 16020  
        aagtgcgcta tgactacgac tttgtcgcga tgggcatccc cggcctgagc ttcattgaccc 16080  
        25     gctacaccga cggccgccac gccgaaaccg ccaactgtcag caatggccgc gagcgcgagc 16140  
        gcgacaccga catcacctac gtcattccaga gcggccctgt caaggacgtg agcctgcgct 16200  
        ggcgcaacgt caccttccgt tccggcaatg gcctgaccaa cgccgtggac gaaaaccgcc 16260  
        30     tgatcatcgg ctacaccctg gcgctgtggt aacagcgccc cttaaatttg aacagcatgg 16320  
        agaacagcat gtctgccgcc cctaccctgc aaagcttcat cgccggccgc tggctcggcc 16380  
        35     agcacggcgc ccaggccctg cgcacggccc ttgacggcca cgtactggcc tacagccacg 16440  
        aagagcgcgc ggacttcgcc gaagccgtcg acttcgcccg tgctcgcggc ctggccagcc 16500  
        tgatggccat ggacttccag caacgcgctg cacgcctgaa agcgcctggc ctgtacctgg 16560  
        40     ccgaacgcaa ggagcagctg tacaccctgt cgcaccatag cggcgccacc cgtgccgaca 16620  
        gctggatcga catcgaaggc ggcaacacca cgttgttcgc ctatgccggc atcggcagcc 16680  
        45     gcgagctgcc gtcgggcaac ctggtgcaag agggcccggc catcccgtg gccaaagcaag 16740  
        gtcactttgc cggtagccac atcctggtgc cgcgcgccgg ggtggcggtg cacatcaacg 16800  
        ccttcaactt ccccatctgg ggcatgctgg aaaagttcgc cccgacctc ctggcgggca 16860  
        50     tgccgtgcat cgtcaagcca gccacttcca ccagctacct gaccgaagcc gtcgtacgcc 16920  
        tgatgaacgc ctccggcctg ctgccagagg gcagcctgca actggtgatc ggcagcaccg 16980  
        gcgacctgct cgaccgcctg caaggccagg acgtggtgac cttcaccggt tccgccgata 17040  
        55     ccgccgcaa attgcgcgtc acgccgaacc tgatacgtaa ttcgggtaccg ttcaccgccg 17100  
        aagccgactc gctgaactgc gccatcctcg gccgggacgt aacgccagac agcgaagagt 17160  
        60     tcgacctgta catcaaggag gtggtgcgctg aatgaccac caaggccggg cagaagtgca 17220

ES 2 156 510 B1

ccgcatccg cgcgccatc gtgccggcca agcacatcga cgcagttgcc acgcgcttgc 17280  
 5 gcgagcgggt gagcaagggt gtagtgggtg acccgtcgct ggaaggcgta cgcattggcg 17340  
 ccctggcctc tcacgaccag cagcacgacg tggccgagcg ggtgcgcagc ctgctaaaca 17400  
 gttgtgatca gctgttcggc gccagcgatg gctttgctcc gcgtggcgag ggcgtggccg 17460  
 10 aaggtgcatt ctttgcccca accctgctgc aggcccgca cccgcatgcc gaagcggcgg 17520  
 cccacgatat cgaagcgctc ggcccggta gcacgctgat ggcctatgag gatctcgacg 17580  
 15 aagctttggc gctggccgcg cgaggcaaag gcagcctggt ggcgacactg gtcaccgccc 17640  
 accgcagcat cgctgccaaag gccattccg tggcggctgc ctggcatggc cgcctgctgg 17700  
 tactcgacag cgaagccgcc aaggaatcca ccggccacgg ctgcctctg ccgcagctca 17760  
 20 agcatggcgg cccgggcagg gccggtggcg gcgaaaaact ggggtggctt cgcgcgggtca 17820  
 agcactacct gcaacgcgcc gccgtacagg gctcgccaag catgcttacg gcagtcaccg 17880  
 25 gcgaatacgt acgcgggtgg gaagtgatcg agaccgaagt gcacccgttc cgcgcctact 17940  
 tcgagcagct gcgcatcggg gaatccctgc tcacccatcg ccgcaccgtc accgaagcag 18000  
 atctggtcaa cttcggctgc ctgtcgggtg accacttcta catgcacttc gacgaaatcg 18060  
 30 ccgccaagca atcgcagttc ggtaaacgca ttgctcaccg ctatttcggt ctgtcggcag 18120  
 ctgccggcct gttcgtatcg cctggcgccg ggccagtact ggccaactat ggcctggaca 18180  
 ccctgcgttt catcaaccgg gtgggcatcg gcgataccat tcaggcgcgc ctcacctgca 18240  
 35 agcgaagat cgaccagggc aagaccagcc cgctgggcca gccgcagggt gtggtggcgt 18300  
 gggatgtaaa ggtgaccaac cagctgggtg agctggtagc cagctatgac atcctgacct 18360  
 40 tgggtgctgaa acagcctgag tgacttggtg acctcccggt cttcttcgcg ggtacatcga 18420  
 accgcaaga agcacgcaca ggttacataa aggccaagg ccacctcgta catctgcct 18480  
 aatcgcccac ctgcccctc ggcgttatag tccagcgata acaacgcca ggaagctccc 18540  
 45 atcatgcacg ccctcaagct cgctcctcag gccgcctcc tggccggcgt cgcggctgc 18600  
 cagaccatca aacctccga agacagctc aagcagcgca ccgagttcat tctgaacacc 18660  
 50 aaggtttcca acgtcgccga cgtgcgcagt gacagcacca tcacctacta cacagccacc 18720  
 accgcaaaag gccggtacga gtgccagatg cccagcgggt gcatcgtcgc ggtggccggc 18780  
 atggcctgt acgagcccac gccctcctgc atgaaggaag gccaggcgggt catcctgcaa 18840  
 55 taaccacgc acaaccctg cgccttgcg ccggtctaaa gcgccggcgc cgcaggctcc 18900  
 tcgcaaatg cgcgcagggc cgctcgcagt tcagctgggc gtaccggctt ggaaagcagc 18960  
 60 gcgatattgc gctcatgcac cgctgcctga atcttctccg ggtcgtgccc ggtcatgatc 19020

ES 2 156 510 B1

aacgcgggta cgtcccagcc gcgctgggcc cgcaaccggt cgatgcagtc gactccgggt 19080  
 5 gcctcctgcc ccaagtcata atcggcaacg atcacttcac aatcactgcg caaatcagca 19140  
 ggcgaaactgt gcgcctctac ttcacacccc cagcgctgca gcagcgccga ggtcgcccgc 19200  
 agcacattgt ggtcgtcttc taccaggcat acccgcaagc cgccaagcag gccggccgct 19260  
 10 gccggcaagc gctcgccac aaccagggct ggctgagcgc tgaggcgcg caagccttgc 19320  
 aggctgaccg ccgtgccgtg gcctggccgc aaacgcagct ttactttcag gcccatcaga 19380  
 tgccccagcc gccgcacaat cgacaaaccc aggccacac cctcgagatc gttgtcgcgt 19440  
 15 acctggcgta cccggtagaa ctcttcgaac accaaccgct gatgcgcttc gtctatgcct 19500  
 cgcccctggt cataaacgac gatggcaagg ccttcgccgc agcgccgtac cgccagcagc 19560  
 20 agcgggggat gcgccgata tttgaagcag ttggacagta cgttctgcac catggctgctc 19620  
 agcatgccac ggtcgggtgca cgtccagtac gcgcagggcc gcaagcgtat ctccaccccg 19680  
 gccagcggg cgggctcggg gttctgacgc accagctccg ccagaaatcc ggccagggcg 19740  
 25 aatgtctcgc tgcgcggttg cacgcgcccg ttgtccaggg tgtaaaggtc gagaatcgag 19800  
 cgaaaaagct gcgatacatt gagcagcgag cggtcgatgc tatccaccag tcgccgctcc 19860  
 30 tcgtcgccca gctgcgcctc gcgcaggcat gccgtgaaca ggccgataga gtgaatcggg 19920  
 tggcgcaggt cgtggctggc ctgcgccagg aagcgggatt tctcgcgggt ggccgccgca 19980  
 gcctgttcag aggccttgcg cgtgcgctcc agcagcaggt gcgcatacac cgggatgacc 20040  
 35 gtgctggtgg taagcaacat caacaccatg aacgggttgg cctgccagta aggcgtgatc 20100  
 tggtaacaaa ccagcaacgc cgccagcgcc agcaccgtgg caatcgccag gtagcgcgag 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 ttcgccgaag ccgtcgactt cgcccgtgct cgcggcctgg ccagcctgat ggccatggac 60  
 ttccagcaac gcgctgcacg cctgaaagcg ctggccctgt acctggccga acgcaaggag 120  
 55 cagctgtaca ccctgtcgca ccatagcggc gccaccctg cgcagcagctg gatcgacatc 180  
 gaaggcggca acaccacggt gttcgcctat gccggcatcg gcagccgcga gctgccgctc 240  
 60 ggcaacctgg tgcaagagg cccggccatc ccgctggcca agcaaggtca ctttgccggg 300  
 agccacatcc tgggtccgcg cgccgggggtg gcggtgcaca tcaacgcctt caacttcccc 360

ES 2 156 510 B1

atctggggca tgctggaaaa gttcgccccg accttctctg cgggcatgcc gtgcatcgtc 420  
 5 aagccagcca cttccaccag ctacctgacc gaagccgtcg tacgcctgat gaacgcctcc 480  
 ggctgtgtgc cagagggcag cctgcaactg gtgatcggca gcaccggcga cctgctcgac 540  
 cgcctgcaag gccaggacgt ggtgaccttc accggttccg ccgataccgc cgccaaattg 600  
 10 cgcgtcacgc cgaacctgat acgtaattcg gtaccgttca ccgccgaagc cgactcgctg 660  
 aactgcgcca tcctcggccc 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 tcg 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 B1

5	tcc tac ggc tat ggg ctt ttc act ggc ggg 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 ggc Glu Pro Trp Thr Asp Glu 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 B1

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  
 380 385 390 395

5

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 B1

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

15 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

30 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

40 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 B1

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

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

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

15 <400> 5

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 B1

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 ggc 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 ggc 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 ggc 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 gaaaatgcc gcgagctgta caccgccgc agcgagggcg 1183

45     tcagcctgtg ggtagtgcct tcggcgctga tcaccgcctc ctccccgac gagaagacc 1243  
       cgctgttcgc tccttcggac gacaaggctt accgccatgc cagcttctac gagctgcccg 1303  
       atgaagtgg acacatgtga ggttggtcat gcacaacgaa gccctgatcc cttacctgtt 1363

50     gctgctcggc gacagtgcc tggccaagg ccagcgcctc tgccaatggt gtggccacgc 1423  
       ccctgccatc gaagaagagc tggcctgat gaacgttggc ctggacctgg tcggccaggc 1483

55     ccgcaactgg ctggaatacg cagccgaact gcttgacgac ggtcgcgac ccgacgccct 1543  
       ggccttccgc cgagacgagc gcgcctaccg caacctgctg ctggtcgagc aaccaacgg 1603  
       tgatttcgcc gtgaccatga ccaagcagtt cctctacgac gcctggcact tcgccgtgct 1663

60     acagggcctg gtcgggtccc gcgacgagcg tatcgcgggt atcgccgcca aggcactcaa 1723

ES 2 156 510 B1

ggaagtcacc taccacctgc gccgttccag cgagtgggta cagcgtatgg ggggcggtac 1783  
 5 agaacaaagc cgccaacgca tgctcgccgc cattccggca ctgtggcgct tcaccgtcga 1843  
 actgacggcc gccagcgaca acgaggtgcg gttggccgaa gcgggtattg ccgctgcccc 1903  
 ggcaactgtg ggtgccgctg ggctcaaaca ggtgagcgag actttcgctt cggtcgagct 1963  
 10 gccgctgccc aaggctgcca gccacttcta cctggacagt cgcaaaggcc tgcacaccga 2023  
 gcacctgggc ctgctgctgg ccgagatgca gttcctgcca agggcttacc ccgatgcaac 2083  
 ctggtgagct gattgccggc gaccgtggcg cgcggccgcc acgcggcgac gacctggccc 2143  
 15 gggcctggga ggtccttgcc caggtcatgg acccggaagt gcctgtggtc agcgtggtcg 2203  
 acctgggaat agtccgcgac ctcgactggc ggcgccgcca cctgcacctg gtggtcacgc 2263  
 20 cgacctactc cggctgcccc gccaccgagg tgatcgaggg tgatatccgc caggcgctgg 2323  
 agcaggcggg cttccccgca ccggatcttg agcgcgggtt gaccccgcc tggagcaccg 2383  
 actggatcag cgagctgggc cgcgagcgcc tgcgcctcta cggcatcgct ccgccgcaag 2443  
 25 gcagcgccag caagcgcagc ctgctaggtg aaacacccca ggtgtgctgc cgcagtgccg 2503  
 cagtgcccat accgaattgc tcagccagtt cggctccacc gcttgcaagg cgctgtacgc 2563  
 30 tgccgcgagt gcctggagcc gttcgactat ttcaaatgca tttgagccgt ggagaacgcc 2623  
 atgagccagt ttcacagcct gaccatcaag caagtgcgca acgaaaccgg tgatgcgggt 2683  
 tcgattgctt tcgacgtgcc cgagcacctg cagcgcctg caggacggcg agctgcgcgt 2743  
 35 ggccgtcaag cgcgtgccag gcgggcgctt ctcggcgctt gccaatgaag tgctcaaggc 2803  
 cggccagcaa ctggaggtga tgccgccagc gggcagctt ttcgtgccc tggacgctgc 2863  
 40 ccgccagggc aattacctgg gcgtggccgc tggtagcggc attaccccaa tcctgtcgat 2923  
 tattggcacc accctggaca gtgagccgca cagctgctt accttgctgt acggcaaccg 2983  
 ctccagctct ggcgcgctgt tccgcgacaa gctcgaagac ctgaaaaacc gctacctcga 3043  
 45 ccggctgaac ctgattttcg tgttcagccg cgagcagcag gatgtcgacc tgtacaacgg 3103  
 tcgcgtcgat gcggacaaat gcggccagct gttctcccgt tggttgatg tgccaggcct 3163  
 50 ggacgcccgc ttcatctgcg gcccgcagge gatgaccgaa accgtgcgtg acagcctgca 3223  
 ggccaatggc ctgggcaagg agcgcattca tttcgagctg ttcgccgccc ccggcagcga 3283  
 aacccgcccgc gaagcccgtg aggcgcgcga ccaggtggat tccgcgctca gccacatcac 3343  
 55 cgtgatcagc gacggccgtg cctcacctt cgacttgcca cgcaacaccc agaacgtgct 3403  
 ggacgctggc aatgccatcg gtgcggaact gccctactcg tgcaaggccc gcgtgtgctc 3463  
 60 gacctgcaaa tgccgggtga tcgaggggga agtggaaatg gacagcaacc atgccttgga 3523

ES 2 156 510 B1

agactacgaa gtggcagccg ggtatgtgct gtcgtgccag acctaccgg tgagcgacaa 3583  
 ggtgggtgctc gacttcgacc agctttaaga cgcctccgcc tgcttcgcyg gcgccccgcg 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 B1

				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	Ala	Pro
60				180					185							190

ES 2 156 510 B1

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 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  
 85 90 95  
 40 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  
 165 170 175  
 55 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 B1

<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 B1

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



ES 2 156 510 B1

tcgacccggt caccggcgaa gtattgccag acggtcagct gggcgaactg gtgttcacct 900  
 5 cgctaagcaa agagggcgtt ccgatgggtc gctaccgcac ccgtgacctc acccgacctgc 960  
 tgcccggcac cgccaggccg atgcggcgga tcggcaagat taccgggccc agtgacgaca 1020  
 tgctgatcat tcgcggcgtc aacgtgttcc cgaccagat cgaggaaacag gtattaaaaa 1080  
 10 taaaacagct ttccgagatg tatgagattc atttgtatcg caatggcaac ctggacagcg 1140  
 tagagggtgca tgtagagttg cgtgcccagt gccagcacct cgatgaaggc cagcgcaagc 1200  
 15 tggttatcgg ggagctgagc aaacagatca agacctacat cggcatcagc acccaggtgc 1260  
 acctgcaggc ttgcggcacg ctcaagcgtt ccgagggcaa ggcgtgccac gtgtacgaca 1320  
 aacggttggc cagctgattc attcggctga attcagagtg aagccatgaa caggatccac 1380  
 20 gcacagctag tggaaaccgg agtcaagcgc gtaaagtcgc tggaagaaat gtcccccgag 1440  
 gaacgcaact tccaggaaaa gatcgacgcc gaaatcaaga tcgaagcaa gaactggatg 1500  
 25 cccgaggcct accgccagac cttgatccgg cagatttccc agcacgcca ctcggaaatc 1560  
 gtcggcatgc tgcccgaagg caactgggtc acccgcgccc ctagcctcaa gcgcaagctg 1620  
 caactgatgg caaagatcca ggacgaggcc ggccacggcc tgtacctgta cagcgccatg 1680  
 30 gagaccctgg gcgcccagcg cgacgaggag atcgccaagc tgcacagcgg caaggcgaag 1740  
 tattcgagca tcttcaacta ccccaccctc agctgggccc acatgggccc agtgggctgg 1800  
 ctggtggatg gggccgctat cgtcaaccag gtggtgctgc agcgcacctc ctatggcccc 1860  
 35 tactccccgc caatggttcg tatctgcaag gaagagagct ttcaccagcg ccaggggctac 1920  
 gaaatcctcc tgacatgat gcgtcacggc acacaggccc agcgcgacat ggtccaggac 1980  
 40 gcgatcaatc gcctgtggtg gccatcgctg atgatgttcg gccccagcga cgaacactcc 2040  
 ccgaacagcg cacagtccat ggctggaag atcaagcgc agaccaacga tgaactgcgc 2100  
 cagcgtttca tcgaccagac cgtgccgag ctcgaactgc tcggctgcac cgccccgac 2160  
 45 cctgaactga agtggaaagc cgagcgggt cactacgact tcggcgaat ccagtgggac 2220  
 gagttctacg aagtgatcaa gggcaacggc ccgtgcaacc aggaacgtgt cgccaccgc 2280  
 50 cgcaaggcca tcgaggacgg cgctgggta cgcgaggccg ccgtggccta cgcgcgcaag 2340  
 caacagaaca agaacgcccg ctgagcggcg attgatgagg agatcgaaaa tgtctgtctg 2400  
 gaccctctac gaagtgttcg tgcgagcaa gcacggcctt aaccacaagc atgtcggcag 2460  
 55 cgtgcacgcc gccgacggc ccatggccat cgaaaatgcc cgcgagctgt acaccgcccg 2520  
 cagcgagggc gtcagcctgt gggtagtgcc ttcggcgctg atcaccgcct cctccccga 2580  
 60 cgagaaagac ccgctgttcg ctccttcgga cgacaaggtc taccgcatg ccagcttcta 2640

ES 2 156 510 B1

cgagctgccc gatgaagtcg gacacatgtg aggttggtca tgcacaacga agccctgadc 2700  
 5 ccttacctgt tgctgctcgg cgacagtgcc ctggtccaag gccagcgcct ctgccaatgg 2760  
 tgtggccacg cccctgccat cgaagaagag ctggccctga tgaacgttgg cctggacctg 2820  
 gtcggccagg cccgcaactg gctggaatac gcagccgaac tgcttgacga cggtcgagac 2880  
 10 gccgacgccc tggccttcgg ccgagacgag cgcgcctacc gcaacctgct gctggctgag 2940  
 caacccaacg gtgatttcgc cgtgacctg accaagcagt tcctctacga cgcctggcac 3000  
 15 ttcgccgtgc tacagggcct ggtcgggtcc cgcgacgagc gtatcgccgg tatcgccgcc 3060  
 aaggcactca aggaagtcac ctaccacctg cgccttcca gcgagtgggt acagcgtatg 3120  
 gggggcggta cagaacaaag ccgccaacgc atgctcgcgg ccattccggc actgtggcgc 3180  
 20 ttcaccgtcg aactgacggc cgcagcgcac aacgaggtgc ggttggccga agcgggtatt 3240  
 gccgctgccc cggcaactgt gggtgccgcg tggctcaaac aggtgagcga gactttcgtc 3300  
 25 tcggtcgagc tgccgctgcc caaggctgcc agccacttct acctggacag tcgcaaaggc 3360  
 ctgcacaccg agcacctggg cctgctgctg gccgagatgc agttcctgcc aagggttac 3420  
 ccgatgcaa cctggtgagc tgattgccgg cgaccgtggc gcgcgccgc cacgcggcga 3480  
 30 cgacctggcc cgggctggg aggtccttgc ccaggtcatg gaccgggaag tgctgtggt 3540  
 cagcgtggtc gacctggaa tagtccgcga cctcgactgg cgcgccggcc acctgcacct 3600  
 ggtggtcacg ccgacctact ccggtgccc ggccaccgag gtgatcgagg gtgatatccg 3660  
 35 ccaggcgtg gagcagggcg gcttccccgc accggtcct gagcggcggg tgacccccgc 3720  
 ctggagcacc gactggatca gcgagctggg ccgcgagcgc ctgcgcctct acggcatcgc 3780  
 40 tccgccgcaa ggcagcgcga gcaagcgcag cctgctaggt gaaacacccc aggtgtgctg 3840  
 ccgagtgcc gcagtgccca taccgaattg ctacagccagt tcggctccac cgcttgcaag 3900  
 gcgctgtacg ctgccgagc tgcttgagc cgttcgacta tttcaaatgc atttgagccg 3960  
 45 tggagaacgc catgagccag tttcacagcc tgaccatcaa gcaagtgcgc aacgaaacc 4020  
 gtgatgcggg ttcgattgcc ttcgacgtgc ccgagcacct gcagcgcctg gcaggacggc 4080  
 50 gagctgcgcg tggccgtcaa gcgctgcca ggcggcggt tctcggcgtt tgccaatgaa 4140  
 gtgctcaagg ccggccagca actggaggtg atgccgccag cgggcagctt cttcgtgccg 4200  
 ctggacgctg cccgccagg caattacctg ggcgtggccg ctggtagcgg cattaccca 4260  
 55 atcctgtcga ttattggcac caccctggac agtgagccgc acagctgctt caccttgcgt 4320  
 tacggcaacc gctccagctc tggcgcgctg ttccgcgaca agctcgaaga cctgaaaaac 4380  
 60 cgctacctcg accggctgaa cctgattttc gtgttcagcc gcgagcagca ggatgtcgac 4440

ES 2 156 510 B1

ctgtacaacg gtcgcgctga tgcggacaaa tgcggccagc tgttctcccg ttggtggat 4500  
5 gtgccaggcc tggacgccgc cttcatctgc ggcccgcagg cgatgaccga aaccgtgcgt 4560  
gacagcctgc aggccaatgg cctgggcaag gagcgcattc atttcgagct gttcgccgcc 4620  
gcccggcagcg aaaccgccg cgaagcccgt gaggccgcgc accaggtgga ttccgcgctc 4680  
10 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 gggatatgtc tgtcgtgcca gacctaccg 4920  
gtgagcgaca aggtggtgct cgacttcgac cagctttaag accgccccgc ctgcttcgcg 4980  
20 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 $\alpha$ ' 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 $\alpha$ .

## ES 2 156 510 B1

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.

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

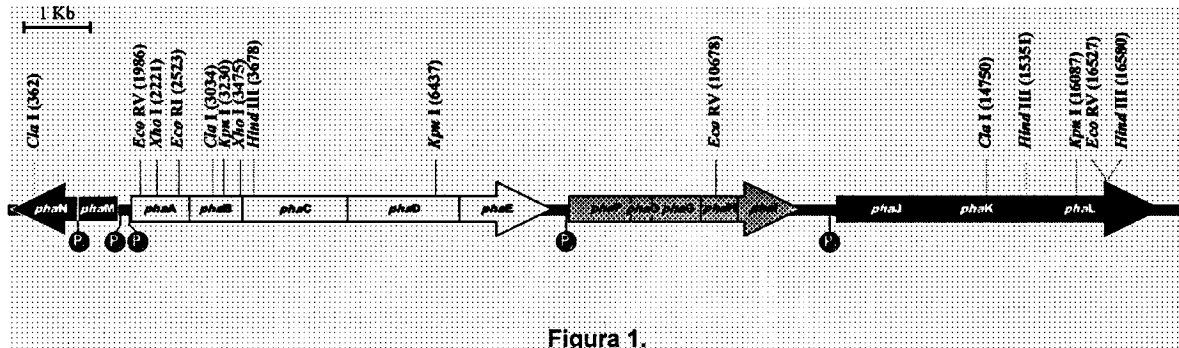


Figura 1.

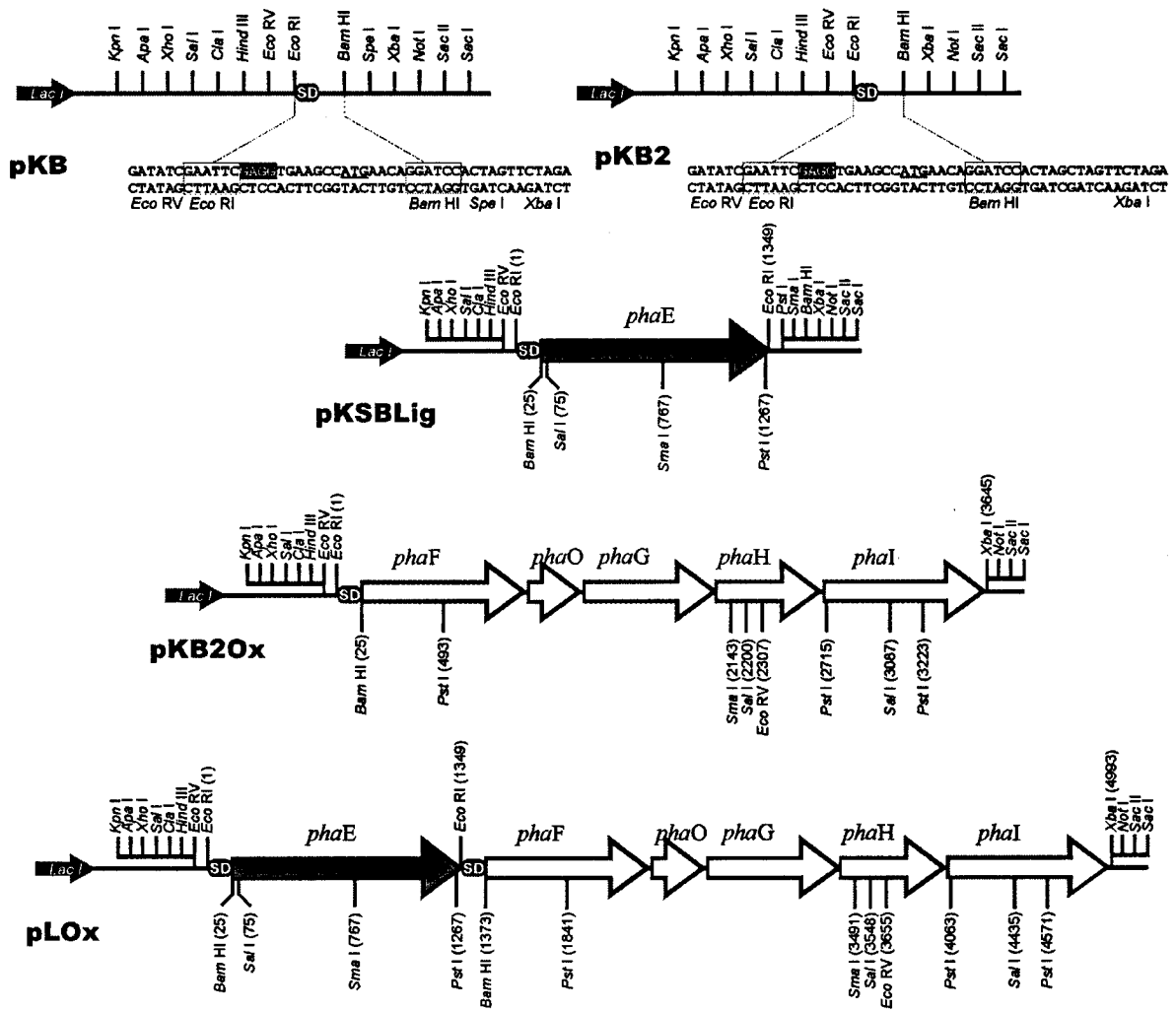


Figura 2



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: 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, n° 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 n°:

Fecha de realización del informe

30.04.2001

Examinador

A. Lázaro Andrés

Página

1/1