

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 639**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C08G 69/14 (2006.01)

C08G 69/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008** **E 08860867 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015** **EP 2222844**

54 Título: **Células recombinantes productoras de ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o sus lactamas**

30 Prioridad:

17.12.2007 DE 102007060705

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

27.05.2015

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**KARAU, ANDREAS;
SIEBER, VOLKER;
HAAS, THOMAS;
HÄGER, HARALD;
GRAMMANN, KATRIN;
BÜHLER, BRUNO;
BLANK, LARS;
SCHMID, ANDREAS;
JACH, GUIDO;
LALLA, BERND;
MÜLLER, ANDREAS;
WELTERS, PETER;
SCHULLEHNER, KATRIN;
EGGERT, THORSTEN y
WECKBECKER, ANDREA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 536 639 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células recombinantes productoras de ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o sus lactamas

5 La presente invención se refiere a células modificadas por tecnología genética con respecto a su tipo salvaje, a un procedimiento para la preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, y a un procedimiento para la preparación de poliamidas basadas en ácidos ω -aminocarboxílicos o en lactamas.

10 Las poliamidas son polímeros cuyas unidades repetitivas (monómeros) poseen como rasgo característico el grupo amida. La denominación "poliamida" se utiliza habitualmente como denominación para materiales sintéticos termoplásticos técnicamente utilizables, y con ello delimita esta clase de sustancias de las proteínas químicamente emparentadas. Casi todas las poliamidas importantes se derivan de aminas primarias, es decir, en sus unidades repetitivas se presenta el grupo funcional $-\text{CO}-\text{NH}-$. Junto a ellas existen también poliamidas de aminas secundarias ($-\text{CO}-\text{NR}-$, R = radical orgánico). En calidad de monómeros para las poliamidas encuentran aplicación, en particular, ácidos aminocarboxílicos, lactamas y/o diaminas y ácidos dicarboxílicos.

15 Particular importancia se le otorga, en especial, a la preparación de poliamidas a base de lactamas. Así, mediante polimerización mediante apertura del anillo de ϵ -caprolactama se obtiene el producto "poliamida 6" técnicamente utilizado a menudo, mientras que mediante polimerización por apertura del anillo de laurina-lactama se obtiene la "poliamida 12" técnicamente asimismo importante. También copolímeros a base de lactamas tales como, por ejemplo, copolímeros a base de ϵ -caprolactama y laurina-lactama ("poliamida 6/12") son de gran importancia técnica.

20 La preparación de ϵ -caprolactama tiene lugar habitualmente mediante reacción de ciclohexanona con el hidrógeno-sulfato o el hidrocloreto de la hidroxilamina bajo formación de ciclohexanonoxima. Ésta se transforma en ϵ -caprolactama mediante la reacción de transposición de Beckmann, empleándose a menudo ácido sulfúrico concentrado en calidad de catalizador. La preparación de la ciclohexanona tiene lugar habitualmente mediante oxidación catalítica de ciclohexano con oxígeno del aire, obteniéndose ciclohexano de nuevo mediante hidrogenación de benceno.

30 Particularmente compleja es la preparación de laurina-lactama. Esta tiene lugar a gran escala, debido a que primeramente se trimeriza butadieno bajo formación de ciclododecatrieno. A continuación, el ciclododecatrieno se hidrogena bajo formación de ciclododecano, y el ciclododecano, así obtenido, se oxida con formación de ciclododecanona. La ciclododecanona obtenida de esta manera se hace reaccionar acto seguido con hidroxilamina para dar ciclododecanoxima, que luego se transforma en laurina-lactama en una reacción de transposición de Beckmann.

El inconveniente de estos procedimientos conocidos del estado de la técnica para la preparación de lactamas mediante transposición de Beckmann de oximas estriba, entre otros, en que como producto secundario se forman grandes cantidades de sales tales como, por ejemplo, sulfato de sodio, que deben ser eliminadas. Por lo tanto, en el estado de la técnica se describen también otros procedimientos para la preparación de lactamas que no presentan estos inconvenientes. Así, el documento EP-A-0 748 797 describe un procedimiento para la preparación de lactamas a partir de dinitrilos, en el que el dinitrilo se hidrogena para formar aminonitrilo y el aminonitrilo se hace reaccionar mediante hidrólisis ciclante para formar lactama. Como catalizador para la hidrólisis ciclante se dan a conocer tamices moleculares tales como zeolitas de carácter ácido, silicatos y tamices moleculares no zeolíticos, fosfatos de metales y óxidos de metales u óxidos mixtos de metales. Este procedimiento presenta, sin embargo, entre otros, el inconveniente de que la selectividad de la reacción del aminonitrilo mediante la hidrólisis ciclante es más bien escasa y, por lo tanto, se forman grandes cantidades de productos secundarios. Además de ello, en el caso de los procedimientos para la preparación de lactamas, descritos de este estado de la técnica, se emplean hidrocarburos tales como benceno o butadieno que se obtienen mediante craqueo de bencina o petróleo y que, por lo tanto, no se derivan de materias primas renovables. La preparación de poliamidas que se basan en lactamas preparadas de este modo se ha de considerar, por lo tanto, como desventajosa desde un punto de vista ecológico.

La presente invención tenía por misión superar los inconvenientes que resultan del estado de la técnica.

50 En particular, la presente invención tenía por misión indicar un procedimiento con el que se puedan formar lactamas, en particular laurina-lactama, en el menor número posible de etapas de procedimiento y bajo formación de los menos productos secundarios posibles.

Además, era misión de la presente invención indicar un procedimiento con el que se puedan preparar lactamas, en particular laurin-lactama a partir de materias primas renovables.

Una contribución para resolver los problemas precedentemente mencionados la ofrece una célula que ha sido modificada mediante tecnología genética con respecto a su tipo salvaje de modo que, en comparación con su tipo salvaje, es capaz de producir más ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o más lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos a partir de ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos, presentando la célula una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de las enzimas E_I y E_{III} o de las enzimas E_I, E_{II} y E_{III}:

- i) de una enzima E_I que cataliza la reacción de ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -hidroxicarboxílicos o ésteres de ácidos ω -hidroxicarboxílicos, elegida del grupo consistente en las alcanos monooxigenasas: alcanos monooxigenasa codificada por *alkBGT* de *Pseudomonas putida* GPo1 y citocromo-P450-monooxigenasas de *Candida tropicalis*;
- ii) de una enzima E_{II} que cataliza la reacción de ácidos ω -hidroxicarboxílicos o ésteres de ácidos ω -hidroxicarboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -oxocarboxílicos o ésteres de ácidos ω -oxocarboxílicos, elegida del grupo consistente en las alcoholdehidrogenasas codificadas por el gen *alkJ*;
- ii) de una enzima E_{III} que cataliza la reacción de ácidos ω -oxocarboxílicos o ésteres de ácidos ω -oxocarboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -aminocarboxílicos o ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos, elegida del grupo de las ω -transaminasas.

Una célula de este tipo se puede emplear con el fin de producir ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o bien lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos por vía fermentativa a partir de ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos, por ejemplo a partir de ácido láurico o ésteres del ácido láurico.

La formulación “que, en comparación con su tipo salvaje, es capaz de producir más ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o más lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos a partir de ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos” se refiere también al caso de que el tipo salvaje de la célula modificada por tecnología genética no sea capaz de formar en absoluto ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, pero al menos ninguna cantidad detectable de estos compuestos, y sólo después de la modificación por tecnología genética, se pueden formar cantidades detectables de estos componentes.

Por un “tipo salvaje” de una célula se designa preferiblemente una célula, cuyo genoma se presenta en un estado como el que se ha formado de modo natural por la evolución. La expresión se utiliza tanto para la célula completa como también para genes individuales. Por lo tanto, bajo la expresión “tipo salvaje” no están incluidas, en particular, aquellas células o bien aquellos genes cuyas secuencias génicas han sido modificadas, al menos en parte, por el hombre mediante procedimientos recombinantes.

En este caso, de acuerdo con la invención se prefiere que la célula modificada por tecnología genética sea modificada por tecnología genética de manera que en un intervalo de tiempo definido, preferiblemente en el espacio de 2 horas, todavía más preferiblemente en el espacio de 8 horas y lo más preferiblemente en el espacio de 24 horas, forme al menos 2 veces, de manera particularmente preferida al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 100 veces, aún más preferiblemente al menos 1.000 veces y lo más preferiblemente al menos 10.000 veces más ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o lactamas derivadas de ácidos ω -carboxílicos que el tipo salvaje de la célula. El aumento de la formación de producto puede determinarse en este caso, por ejemplo, debido a que la célula de acuerdo con la invención y la célula de tipo salvaje son cultivadas, en cada caso por separado, bajo las mismas condiciones (misma densidad celular, mismo medio nutritivo, mismas condiciones de cultivo) para un determinado intervalo de tiempo en un medio nutritivo adecuado y, a continuación, se determina la cantidad de producto diana (ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos) en el medio nutritivo.

Las células de acuerdo con la invención pueden ser procariotas o eucariotas. En este caso, se puede tratar de células de mamíferos (tales como, por ejemplo, células de seres humanos), de células vegetales o de microorganismos tales como levaduras, hongos o bacterias, siendo particularmente preferidos microorganismos y siendo las más preferidas bacterias y levaduras.

Como bacterias, levaduras u hongos son adecuados, en particular, aquellas bacterias, levaduras u hongos tal como están depositados en la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ – Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Braunschweig, Alemania, como cepas de bacterias, levaduras u hongos. Bacterias adecuadas de acuerdo con la invención pertenecen a los géneros que están recogidos bajo

<http://www.dsmz.de/species/bacteria.htm>

levaduras adecuadas de acuerdo con la invención pertenecen a aquellos géneros que están recogidos bajo

<http://www.dsmz.de/species/yeasts.htm>

y, de acuerdo con la invención, hongos adecuados son aquellos que están recogidos bajo

5 <http://www.dsmz.de/species/fungi.htm>

Células particularmente preferidas de acuerdo con la invención se derivan de células de los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactotoccus*, *Candida*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Escherichia*, *Zymomonas*, *Yarrowia*, *Methylobacterium*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Clostridium*, siendo particularmente preferidas *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* y *Pseudomonas putida*,
10 y siendo la más preferida *Escherichia coli*.

La expresión “*actividad incrementada de una enzima*”, tal como se utiliza precedentemente en relación con la enzima E_I y en las explicaciones que siguen más adelante en relación con las enzimas E_{II}, etc., se ha de entender preferiblemente como actividad intracelular incrementada.

15 Las explicaciones que siguen ahora para aumentar la actividad enzimática en células son válidas tanto para el aumento de la actividad de la enzima E_I como también para todas las enzimas mencionadas a continuación, cuya actividad pueda ser eventualmente incrementada.

Básicamente, un aumento de la actividad enzimática se puede conseguir aumentando el número de copias de la secuencia génica o bien de las secuencias génicas que codifican la enzima, utilizando un promotor fuerte o utilizando un gen o alelo que codifica una correspondiente enzima con una actividad incrementada, y eventualmente
20 combinando estas medidas. Células modificadas por tecnología genética de acuerdo con la invención se generan, por ejemplo, mediante transformación, transducción, conjugación o una combinación de estos métodos con un vector que contiene el gen deseado, un alelo de este gen o partes del mismo y un vector que posibilita la expresión del gen. La expresión heteróloga se alcanza en particular mediante la integración del gen o de los alelos en el cromosoma de la célula o en un vector que replica fuera del cromosoma.

25 Una perspectiva sobre las posibilidades para aumentar la actividad enzimática en células en el ejemplo de la piruvato-carboxilasa lo proporciona el documento DE-A-100 31 999, que con ello se incorpora como referencia, y cuyo contenido divulgatorio forma, en relación con las posibilidades para el aumento de la actividad enzimática en células, una parte de la divulgación de la presente invención.

La expresión de las enzimas o bien genes mencionados precedentemente y todos los citados más adelante se
30 puede detectar con ayuda de una separación monodimensional y bidimensional en gel de proteínas y subsiguiente identificación óptica de la concentración de proteínas con un correspondiente software de evaluación en el gel. Cuando el aumento de una actividad enzimática se basa exclusivamente en un aumento de la expresión del gen correspondiente, entonces la cuantificación del aumento de la actividad enzimática puede determinarse de una manera sencilla mediante una comparación de las separaciones monodimensionales o bidimensionales de proteínas
35 entre célula de tipo salvaje y célula modificada por tecnología genérica. Un método habitual para la preparación de los geles de proteínas en bacterias corineformes y para la identificación de las proteínas es el modo de proceder descrito por Hermann et al. (*Electrophoresis*, 22: 1712-23 (2001)). La concentración de proteínas puede también analizarse mediante hibridación mediante transferencia Western con un anticuerpo específico para la proteína a detectar (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
40 Spring Harbor, N.Y. EE.UU., 1989) y subsiguiente evaluación óptica con el correspondiente software para la determinación de la concentración (Lohaus y Meyer (1989) *Biospektrum*, 5: 32-39; Lottspeich (1999), *Angewandte Chemie* 111: 2630-2647). La actividad de proteínas fijadoras de ADN puede medirse mediante el ensayo de desplazamiento de banda de ADN (también denominado retardo del gel) (Wilson et al. (2001) *Journal of Bacteriology*, 183: 2151-2155). El efecto de proteínas fijadoras de ADN sobre la expresión de otros genes puede
45 detectarse por diferentes métodos de ensayo del gen informador bien descritos (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. EE.UU., 1989). Las actividades enzimáticas intracelulares pueden determinarse según diferentes métodos descritos (Donahue et al. (2000) *Journal of Bacteriology* 182 (19): 5624-5627; Ray et al. (2000) *Journal of Bacteriology* 182 (8): 2277-2284; Freedberg et al. (1973) *Journal of Bacteriology* 115 (3): 816-823). En la medida en que en las siguientes explicaciones no se indiquen métodos concretos para la determinación de la actividad de una enzima determinada, la determinación del aumento de la actividad enzimática y también la determinación de la disminución de una actividad enzimática tiene lugar preferiblemente mediante los métodos descritos en Hermann et al., *Electrophoresis*,
50

22: 1712-23 (2001), Lohaus et al., *Biospektrum* 5 32-39 (1998), Lottspeich, *Angewandte Chemie* 111: 2630-2647 (1999) y Wilson et al., *Journal of Bacteriology* 183: 2151-2155 (2001).

Si el aumento de la actividad enzimática se consigue mediante mutación del gen endógeno, entonces mutaciones de este tipo pueden generarse de manera no orientada según métodos clásicos tales como, por ejemplo, mediante irradiación UV o mediante productos químicos desencadenantes de mutaciones, o de forma preestablecida mediante métodos de tecnología genética tales como delección o delecciones, inserción o inserciones y/o intercambio o intercambios de nucleótidos. Mediante estas mutaciones se obtienen células modificadas por tecnología genética. Mutantes de enzimas particularmente preferidos son, en particular, también aquellas enzimas que ya no pueden ser inhibidas por retroalimentación o lo son al menos de manera reducida en comparación con la enzima de tipo salvaje.

Si el aumento de la actividad enzimática se consigue mediante el aumento de la expresión de una enzima, entonces se aumenta, por ejemplo, el número de copias de los genes correspondientes o se muta la región de promotor y de regulación o el lugar de unión al ribosoma que se encuentra aguas arriba del gen estructural. De igual manera actúan las casetas de expresión que son incorporadas aguas arriba del gen estructural. Mediante promotores inducibles es adicionalmente posible aumentar la expresión en cualquier momento arbitrario. Además de ello, al gen de la enzima pueden asociarse como secuencias reguladoras sin embargo también los denominados "potenciadores" que, a través de una interacción mejorada entre la ARN-polimerasa y el ADN determinan asimismo una expresión del gen incrementada. Mediante medidas para la prolongación de la vida útil del ARNm se mejora asimismo la expresión. Además, mediante el impedimento de la degradación de la proteína enzimática se refuerza asimismo la actividad enzimática. En este caso, los genes o las construcciones de genes se presentan en plásmidos con un número de copias diferentes o están integrados y amplificados en el cromosoma. Alternativamente, se puede alcanzar, además, una sobre-expresión de los genes correspondientes mediante la modificación de la composición de los medios y mediante cultivo. Instrucciones para ello las encuentra el experto en la materia, entre otros, en Martin et al. (*Bio/Technology* 5, 137-146 (1987)), en Guerrero et al. (*Gene* 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya y Morinaga (*Bio/Technology* 6, 428-430 (1988)), en Eikmanns et al. (*Gene* 102, 93-98 (1991)), en el documento EP-A-0 472 869, en el documento US 4.601.893, en Schwarzer y Pühler (*Bio/Technology* 9, 84-87 (1991)), en Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 126-132 (1994)), en LaBarre et al. (*Journal of Bacteriology* 175, 1001-1007 (1993)), en el documento WO-A-96/15246, en Malumbres et al. (*Gene* 134, 15-24 (1993)), en el documento JP-A-10-229891, en Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58, 191-195 (1998)) y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular. Las medidas precedentemente descritas conducen, al igual que las mutaciones, a células modificadas por tecnología genética.

Para el aumento de la expresión de los genes respectivos se emplean, por ejemplo, plásmidos episomales. Como plásmidos se adecúan, en particular, aquellos que se replican en bacterias corineformes. Numerosos vectores de plásmidos conocidos tales como, por ejemplo, pZ1 (Menkel et al., *Applied and Environmental Microbiology* 64: 549-554 (1989)), pEKEx1 (Eikmanns et al., *Gene* 107: 69-74 (1991)) o pHS2-1 (Sonnen et al., *Gene* 107: 69-74 (1991)) se basan en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. De igual manera pueden emplearse otros vectores de plásmidos tales como aquellos que se basan en pCG4 (documento US 4.489.160) o pNG2 (Serwold-Davis et al., *FEMS Microbiology Letters* 66: 119-124 (1990)) o pAG1 (documento US 5.158.891).

Además, también se adecúan aquellos vectores de plásmidos con cuya ayuda se puede aplicar el procedimiento de la amplificación del gen mediante integración en el cromosoma, tal como se describió, por ejemplo, por Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60: 126-132 (1994)) para la duplicación o bien amplificación del operón *hom-thrB*. En el caso de este método, todo el gen se clona en un vector de plásmido que puede replicarse en un huésped (típicamente *Escherichia coli*) pero no en *Corynebacterium glutamicum*. Como vectores entran en consideración, por ejemplo, pSUP301 (Simon et al., *Bio/Technology* 1: 784-791 (1983)), pK18mob o pK19mob (Schäfer et al., *Gene* 145: 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.), pCR2.1-TOPO (Shuman, *Journal of Biological Chemistry* 269: 32678-84 (1994)), pCR[®]Blunt (Invitrogen, Groningen, Holanda), pEM1 (Schrumpf et al., *Journal of Bacteriology* 173: 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., *Gene* 41: 337-342 (1986)). El vector de plásmido que contiene el gen a amplificar se transforma, a continuación, mediante conjugación o transformación, en la cepa deseada de *Corynebacterium glutamicum*. El método de conjugación se describe, por ejemplo, en Schäfer et al., *Applied and Environmental Microbiology* 60: 756-759 (1994). Métodos para la transformación están descritos, por ejemplo, en Thierbach et al., *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 356-362 (1988), Dunican y Shivan, *Bio/Technology* 7: 1067-1070 (1989) y Tauch et al., *FEMS Microbiology Letters* 123: 343-347 (1994). Después de recombinación homóloga mediante un evento de "sobre-cruzamiento", la cepa resultante contiene al menos dos copias del gen respectivo.

Por la formulación "una actividad de una enzima E_x incrementada con respecto a su tipo salvaje", utilizada en las explicaciones que anteceden y en las que siguen se ha de entender preferiblemente siempre una actividad de la respectiva enzima E_x incrementada en un factor de al menos 2, de manera particularmente preferida de al menos 10, más preferiblemente de al menos 100, aún más preferiblemente de al menos 1.000 y lo más preferiblemente de al menos 10.000. Además, la célula de acuerdo con la invención, que presenta "una actividad de una enzima E_x

incrementada con respecto a su tipo salvaje", comprende en particular también una célula cuyo tipo salvaje no presenta actividad alguna o al menos actividad detectable alguna de esta enzima E_x y sólo después de aumentar la actividad enzimática, por ejemplo mediante sobre-expresión, muestra una actividad detectable de esta enzima E_x. A este respecto, el término "sobre-expresión" o la expresión "aumento de la expresión" utilizado en las explicaciones posteriores, comprende también el caso de que una célula de partida, por ejemplo una célula de tipo salvaje, no presente expresión alguna o al menos expresión detectable alguna y sólo, mediante procedimientos recombinantes, se pueda inducir una expresión detectable de la enzima E_x.

Una enzima E_I preferida es la alcano monooxigenasa codificada por el gen *alkBGT* de *Pseudomonas putida* GPO1. El aislamiento de la secuencia del gen *alkBGT* se describe, por ejemplo, por van Beilen et al. en "Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria", *Journal of Bacteriology*, Vol. 184 (6), páginas 1.733-1.742 (2002). Además, en calidad de alcano monooxigenasas pueden emplearse también citocromo-P450-monooxigenasas de *Candida tropicalis*. Las secuencias génicas de citocromo-P450-monooxigenasas de *Candida tropicalis* adecuadas se dan a conocer, por ejemplo, en el documento WO-A-00/20566.

Una enzima E_{II} preferida es, en particular, la alcohol-deshidrogenasa codificada por el gen *alkJ* de *Pseudomonas putida* GPO1. Las secuencias génicas de la alcohol deshidrogenasa codificada por el gen *alkJ* de *Pseudomonas putida* GPO1, *Alcanivorax borkumensis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* o de *Roseobacter denitrificans* pueden tomarse, por ejemplo, del banco de datos de genes KEGG.

ω -transaminasas adecuadas son, por ejemplo, aquellas ω -transaminasas que se caracterizan en el documento US-A-2007/0092957 por los números de secuencia 248, 250, 252 y 254. Una enzima E_{III} preferida, en particular una ω -transaminasa preferida, es en particular la ω -transaminasa de *Chromobacterium violaceum* DSM30191 (Kaulmann et al, 2007; "Substrate spectrum of ω -transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 41, páginas 628-637), que es codificada por la secuencia génica conforme a SEQ.-ID.-NO 01.

Puede ser ventajoso emplear como enzima E_{III} ω -transaminasas que se pueden aislar de vegetales. Preferiblemente, en este caso se eligen ω -transaminasas de vegetales del grupo que contiene *Arabidopsis thaliana*, *Avena sativa*, *Beta vulgaris*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Lotus japonicus*, *Solanum lycopersicum*, *Manihot esculenta*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Spinacia oleracea*, *Arum maculatum*, *Mercurialis perennis* y *Urtica dioica*, siendo particularmente preferida *Arabidopsis thaliana*. Como ω -transaminasas se adecúan, en particular, enzimas que son codificadas por ácidos nucleicos que presentan una identidad del 90%, preferiblemente del 95%, de manera particularmente preferida del 99 y de manera muy particularmente preferida del 100% con la secuencia conforme a SEQ.-ID.-NO 39. La "identidad de nucleótidos" con relación a la SEQ.-ID.-NO 39 se determina en este caso con ayuda de procedimientos conocidos. En general, se utilizan programas de ordenador particulares con algoritmos teniendo en cuenta los requisitos especiales. Procedimientos preferidos para la determinación de la identidad crean primeramente la mayor coincidencia entre las secuencias a comparar. Programas de ordenador para la determinación de la identidad comprenden, pero no se limitan al paquete de programas GCG, incluido

- GAP (Deveroy, J. et al., *Nucleic Acid Research* 12 (1984), página 387, Genetics Computer Group University of Wisconsin, Medicine (Wi), y
- BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. et al., *Journal of Molecular Biology* 215 (1990), páginas 403-410.

El programa BLAST puede obtenerse de National Center For Biotechnology Information (NCBI) y de otras fuentes (manual BLAST, Altschul S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda ND 22894; Altschul S. et al., supra). El algoritmo de Smith-Waterman conocido puede también utilizarse para la determinación de la identidad de nucleótidos.

Parámetros preferidos para la comparación de nucleótidos comprenden los siguientes:

- Algoritmo de Needleman y Wunsch, *Journal of Molecular Biology* 48 (1970), páginas 443-453
- Matriz comparativa

Apareamientos	=	+10
Desapareamientos	=	0
Penalización por hueco	=	50
Penalización por longitud de hueco	=	3

El programa GAP es asimismo adecuado para uso con los parámetros precedentes. Los parámetros precedentes son los parámetros por defecto en la comparación de secuencias de nucleótidos.

Además, son adecuadas enzimas del subgrupo de las β -Ala:piruvato-transaminasas. A ellas pertenecen, p. ej., transaminasas de *Pseudomonas putida* W619 (gi: 119860707, gi: 119855857, gi: 119856278), de *Pseudomonas putida* KT2440 (gi: 24984391), de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (gi: 15595330, gi: 15600506, gi: 15595418, gi: 9951072); *Streptomyces coelicolor* A3(2) (gi: 3319731), *Streptomyces avermitilis* MA 4680 (gi: 29831094, gi: 29829154) y *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (gi: 34102747). Las secuencias de aminoácidos de las transaminasas precedentemente mencionadas están reproducidas en las secuencias SEQ.-ID.-NO 19 a SEQ.-ID.-NO 30.

Para el caso de que las células de acuerdo con la invención deban emplearse con el fin de preparar ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o lactamas basadas en ácidos ω -aminocarboxílicos partiendo de ésteres de ácidos carboxílicos es, además, ventajoso que la célula de acuerdo con la invención presente, junto a la actividad incrementada de las enzimas E_I y E_{III} o E_I , E_{II} y E_{III} , también una actividad incrementada de una enzima E_{IV} , la cual cataliza la reacción de ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -aminocarboxílicos, en donde en el caso de esta enzima E_{IV} se trata preferiblemente de una esterasa que es secretada preferiblemente por la célula. La secreción de la esterasa por parte de la célula tiene la ventaja de que el enlace éster sólo se disocia fuera de la célula. De esta manera se puede asegurar que, como consecuencia de la mejor permeabilidad de la membrana del éster del ácido ω -aminocarboxílico en comparación con el ácido ω -aminocarboxílico abandone la célula suficiente producto diana y pueda transferirse al medio nutricio que rodea a la célula.

Esterasas preferidas de acuerdo con la invención son, en particular, lipasas, debiéndose mencionar como ejemplo de una lipasa adecuada la lipasa LipA de *Pseudomonas fluorescens* HU380 (Código ACC Q76D26, Kojima Shimizu, "Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volumen 96 (3), páginas 219-226 (2003)). Con el fin de garantizar que las esterases sean segregadas, éstas pueden proveerse de correspondientes secuencias señal de una manera conocida por el experto en la materia que garantiza una secreción. Por ejemplo, si se sobre-expresa en *E. coli* la lipasa LipA de *Pseudomonas fluorescens* HU380 precedentemente mencionada, entonces la misma puede proveerse ventajosamente de secuencias señal de EstA, una esterasa que se presenta de forma natural sobre la superficie de la célula de *Pseudomonas aeruginosa* (Becker et al., "A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes", *FEBS Letters*, Vol. 579, páginas 1177-1182 (2005)). Otras enzimas adecuadas son lipasas de *C. antarctica*, *M. miehei* y *P. cepacia* (Vaysse et al., "Enzyme and Microbial Technology", Vol. 31, páginas 648-655 (2002)). Alternativamente, el éster del ácido ω -aminocarboxílico segregado puede disociarse también de forma convencional con el fin de obtener el ácido ω -aminocarboxílico, así, p. ej., mediante saponificación, es decir, hidrólisis del éster del ácido ω -aminocarboxílico mediante la disolución acuosa de un hidróxido, p. ej., mediante hidróxido de sodio.

Además, conforme a la invención, puede manifestarse ventajoso que la célula de acuerdo con la invención presente, junto a la actividad incrementada de las enzimas E_I y E_{III} o E_I , E_{II} y E_{III} , y, eventualmente también junto a una actividad incrementada de la enzima E_{IV} precedentemente mencionada, también una actividad incrementada de una enzima E_V que cataliza la reacción de ácidos ω -aminocarboxílicos para dar las correspondientes lactamas, pudiendo ser ventajoso aquí también que esta enzima E_V sea secretada por la célula. De este modo puede conseguirse que los ácidos ω -aminocarboxílicos formados directamente por la célula o bien el ácido ω -aminocarboxílico formado sólo después de la disociación extracelular de ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos sea transformado en la correspondiente lactama, con el fin de facilitar de esta forma eventualmente la purificación del producto diana.

De acuerdo con otra forma de realización particular de la célula de acuerdo con la invención, ésta presenta, junto a la actividad incrementada de una o varias de las enzimas E_I , E_{II} y E_{III} , así como, eventualmente la actividad incrementada de una enzima E_{IV} y/o E_V , también una actividad incrementada de una enzima E_{VI} que cataliza la reacción de un ácido α -cetocarboxílico para dar un aminoácido, tratándose en el caso de esta enzima E_{VI} preferiblemente de un aminoácido-deshidrogenasa. Una modificación de este tipo de la célula tendría la ventaja de que, en el caso de un empleo de aminoácidos como donantes, el grupo NH_2 , que es consumido mediante la reacción inducida por transaminasa (E_{III}) de un ácido ω -oxocarboxílico o de un éster de ácido ω -oxocarboxílico para dar el correspondiente ácido ω -aminocarboxílico, para dar el correspondiente éster de ácido ω -aminocarboxílico o bien para dar el correspondiente éster ácido ω -aminocarboxílico, pudiera ser correspondientemente regenerado. Como aminoácido-deshidrogenasa se prefiere la alanina-deshidrogenasa de *B. subtilis* (EC No. 1.4.1.1; Gene ID: 936557) que es codificada por la secuencia génica conforme a SEQ.-ID-NO 02. Otras aminoácido-deshidrogenasas adecuadas son serina-deshidrogenasas, aspartato-deshidrogenasas, fenilalanina-deshidrogenasas y glutamato-deshidrogenasas.

Otra contribución para la disolución de las células mencionadas al comienzo la ofrece un procedimiento para la preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos, de ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, que contiene las etapas de procedimiento:

- I) poner en contacto una célula de acuerdo con la invención con un medio de cultivo que contiene un ácido carboxílico o un éster de ácido carboxílico, o con un medio de cultivo contiguo a una fase orgánica que contiene un ácido carboxílico o un éster de ácido carboxílico bajo condiciones que posibilitan a la célula a formar, a partir del ácido carboxílico o a partir de los ésteres de ácido carboxílico, ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos;
- II) eventualmente, aislamiento de los ácidos ω -aminocarboxílicos, de los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos formados.

En la etapa I) del procedimiento de acuerdo con la invención, las células se ponen en contacto primeramente con un medio de cultivo que contiene un ácido carboxílico o un éster de ácido carboxílico, o con un medio de cultivo contiguo a una fase orgánica que contiene un ácido carboxílico o un éster de ácido carboxílico, en donde esta puesta en contacto tiene lugar bajo condiciones que posibilitan a la célula formar a partir del ácido carboxílico o a partir de los ésteres del ácido carboxílico, ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos.

Las células modificadas por tecnología genética, de acuerdo con la invención, pueden ponerse en contacto con el medio nutritivo y, por consiguiente, cultivarse, de forma continua o discontinua, en el procedimiento *batch* (procedimiento continuo o discontinuo) o en el procedimiento *fed-batch* (procedimiento alimentado discontinuo) o en el procedimiento *repeated-fed-batch* (procedimiento alimentado discontinuo repetitivo) con el fin de la producción de ácidos ω -aminocarboxílicos o de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos. Es imaginable también un procedimiento semi-continuo tal como se describe en el documento GB-A-1009370. Una recopilación sobre métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de von Chmiel ("*Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik*" (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas ("*Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*", editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994).

El medio de cultivo a utilizar debe satisfacer de manera adecuada los requisitos de las cepas respectivas. Descripciones de medios de cultivos de diferentes organismos están contenidos en el manual "*Manual of Methods for General Bacteriology*" de American Society for Bacteriology (Washington, D. C., EE.UU, 1981).

Como fuente de carbono pueden utilizarse, junto a los ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos, hidratos de carbono tales como, p. ej., glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa, aceites y grasas tales como, p. ej., aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos tales como, p. ej., ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como, p. ej., glicerol y metanol, hidrocarburos tales como metano, aminoácidos tales como L-glutamina o L-valina o ácidos orgánicos tales como p. ej., ácido acético. Estas sustancias pueden utilizarse individualmente o en forma de mezcla. Particularmente preferido es el empleo de hidratos de carbono, en particular de monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos tal como se describe en el documento US 6.01.494 y US 6.136.576, de azúcares C_5 o de glicerol.

Como fuente de nitrógeno pueden utilizarse compuestos nitrogenados orgánicos tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, agua de fuente del maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno pueden utilizarse individualmente o en forma de mezcla.

Como fuente de fósforo pueden utilizarse ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio o hidrógeno-fosfato dipotásico o las correspondientes sales con contenido en sodio. El medio de cultivo debe contener, además, sales de metales tales como, p. ej., sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, pueden emplearse, adicionalmente a las sustancias arriba mencionadas, sustancias de crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas. Al medio de cultivo pueden añadirse, además, precursores adecuados. Las sustancias de partida mencionadas pueden agregarse al cultivo en forma de una tanda única o pueden alimentarse de manera adecuada durante el cultivo.

Para el control del pH del cultivo se emplean de manera adecuada compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o bien agua amoniacal, o compuestos de carácter ácido tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control de la formación de espuma pueden emplearse agentes antiespumantes tales como, p. ej., ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para mantener la estabilidad de plásmidos pueden agregarse al medio sustancias de acción selectiva adecuadas tales como, p. ej., antibióticos. Con el fin de mantener las condiciones aerobias, se incorporan en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas con contenido en oxígeno tal como, p. ej., aire. La temperatura del cultivo se encuentra normalmente en 20°C a 45°C, y preferiblemente en 25°C hasta 40°C.

De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida del procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos, de ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, en el que como célula de acuerdo con la invención se emplea una célula recombinante que se deriva de una célula de *E. coli*, se emplea como medio nutritivo un medio de sales minerales suplementado con ampicilina, cloranfenicol y canamicina según Rosenberg et. al., "*High cell density fermentation of recombinant Escherichia coli expressing human interferon alpha 1*", *Appl Microbiol and Biotechnology*, Vol. 34 (1), páginas 77-82 (1990)).

La puesta en contacto de las células de acuerdo con la invención con el medio de cultivo en la etapa I) del procedimiento tiene lugar preferiblemente bajo condiciones que posibilitan a la célula a formar, a partir del ácido

carboxílico o a partir de ésteres del ácido carboxílicos, ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos. Como ácidos carboxílicos o bien ésteres de ácidos carboxílicos entran en consideración, en particular, ácidos carboxílicos con un número de carbonos en el intervalo de 6 a 20, de manera particularmente preferida de 6 a 15, en particular de 6 a 12, siendo particularmente preferido ácido láurico en calidad de ácido carboxílico. Como ésteres de ácido carboxílico entran en consideración, en particular, los ésteres metílico o etílico de los ácidos carboxílicos precedentemente mencionados, siendo particularmente preferido el éster metílico del ácido láurico como éster de ácido carboxílico.

En la preparación de los ácidos ω -aminocarboxílicos, de los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos en la etapa I) del procedimiento son imaginables diferentes modos de proceder.

De acuerdo con una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, las células se cultivan primeramente, con el fin de la producción de biomasa, en un medio nutricio que no contiene ácidos carboxílicos ni ésteres de ácidos carboxílicos, en particular ninguno de los ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos preferidos precedentemente mencionados. Sólo después de obtener una determinada biomasa se añaden entonces al medio nutricio los ácidos carboxílicos o los ésteres de ácido carboxílicos o bien las células se ponen en contacto con un nuevo medio nutricio que contiene los ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos. A este respecto, es particularmente preferido que el contenido de ácidos carboxílicos o bien de ésteres de ácidos carboxílicos durante la formación de ácidos ω -aminocarboxílicos, de ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos se encuentre preferiblemente en un intervalo de 1 a 200 g/l, de manera particularmente preferida en un intervalo de 20 a 200 g/l.

De acuerdo con otra forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, éste se lleva a cabo en un sistema bifásico que contiene

- A) una fase acuosa, así como
- B) una fase orgánica,

en donde la formación de los ácidos ω -aminocarboxílicos, de los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos por parte de las células en la etapa I) del procedimiento tiene lugar en la fase acuosa, y los ácidos ω -aminocarboxílicos formados, los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos formados o las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos formadas se acumulan en la fase orgánica. De este modo es posible extraer *in situ* los ácidos ω -aminocarboxílicos formados, los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos formados o las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos formadas.

También en el caso de esta forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención puede manifestarse ventajoso cultivar las células, con la finalidad de la producción de biomasa, primeramente en un medio nutricio que no contenga ácidos carboxílicos ni ésteres de ácidos carboxílicos, en particular ninguno de los ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos preferidos, precedentemente mencionados. Sólo después de obtener una determinada biomasa, se pone en contacto entonces la suspensión de células como fase acuosa A) con la fase orgánica B), conteniendo en particular la fase B) orgánica el ácido carboxílico o el éster de ácido carboxílico preferiblemente en una cantidad en un intervalo de 1 a 200 g/l, de manera particularmente preferida en un intervalo de 20 a 200 g/l. Sin embargo, si como ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos se emplean sustratos que no son tóxicos para las células utilizadas tales como, por ejemplo, éster metílico del ácido láurico, entonces el contenido de la fase orgánica de estos ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos también puede ser significativamente superior. En un caso de este tipo, puede proponerse también emplear como fase orgánica el ácido carboxílico puro o bien el éster de ácido carboxílico puro, por ejemplo éster metílico del ácido láurico puro.

Como fase orgánica pueden emplearse alcanos de longitud de cadena media, preferiblemente aquellos con un valor logP mayor que 4 (poca formación de espuma) o compuestos aromáticos o ésteres de compuestos aromáticos físicamente similares, pero preferiblemente, tal como se ha expuesto precedentemente, éster del ácido láurico, de manera particularmente preferida éster metílico del ácido láurico, BEHP (ftalato de bis(2-etilhexilo)) o ésteres de ácidos grasos de cadena larga (biodiesel).

Además, de acuerdo con la invención, se prefiere que el medio de cultivo empleado en la etapa I) del procedimiento contenga, al menos durante la fase de la formación de ácidos ω -aminocarboxílicos, de ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, donantes de grupos amino tales como, p. ej., amoníaco o bien iones amonio o bien aminoácidos, pero en particular alanina o aspartato que actúan como donantes de amina en la reacción, catalizada por transaminasas, de los ácidos ω -oxocarboxílicos o de los ésteres de ácidos ω -oxocarboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -aminocarboxílicos o ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos.

En la etapa II) del procedimiento de acuerdo con la invención, los ácidos ω -aminocarboxílicos formados, los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos formados o las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos formadas se aíslan eventualmente, prefiriéndose que este aislamiento tenga lugar a través de un procedimiento de purificación de al menos dos etapas, que comprende

- 5 a) una etapa de extracción, en la que se extraen del medio de cultivo los ácidos ω -aminocarboxílicos, los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, así como
- b) una etapa de purificación fina, en la que el extracto obtenido en la etapa a) del procedimiento se purifica adicionalmente a través de procedimientos de destilación o de una cristalización selectiva, obteniéndose una fase de ácido ω -aminocarboxílico, una fase de éster de ácido ω -aminocarboxílico o una fase de lactama con una pureza de al menos 99,8%.

La extracción en la etapa a) del procedimiento puede estar realizada, en particular, como la denominada extracción "*in situ*", en la que las etapas I) y II) del procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos, de ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos se llevan a cabo al mismo tiempo. Esta extracción "*in situ*" ya se describió precedentemente.

- 15 La purificación fina en la etapa II) del procedimiento puede tener lugar, por ejemplo, a través de una destilación o cristalización.

En una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos, de ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos formados en la etapa I) del procedimiento se hacen reaccionar, en una etapa del procedimiento adicional, con procedimientos químicos convencionales para formar ácidos ω -aminocarboxílicos; un procedimiento químico convencional lo representa la saponificación, en la que el éster de ácido ω -aminocarboxílico se hace reaccionar con una disolución acuosa de una base, preferiblemente de un hidróxido, preferiblemente hidróxido de sodio, para dar el ácido ω -aminocarboxílico.

Preferiblemente, este procedimiento se emplea para la preparación de ácido ω -aminoláurico a partir de ésteres del ácido láurico, preferiblemente el éster metílico del ácido láurico.

Una contribución para la solución de los problemas mencionados al comienzo la ofrece también un procedimiento para la preparación de poliamidas basadas en ácidos ω -aminocarboxílicos, que comprende las etapas de procedimiento:

- 30 ($\alpha 1$) preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos mediante uno de los procedimientos precedentemente descritos para la preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos, en particular mediante los procedimientos precedentemente descritos para la preparación de ácido ω -aminoláurico a partir de ácido láurico o ésteres del ácido láurico;
- ($\alpha 2$) polimerización del ácido ω -aminocarboxílico, obteniéndose una poliamida.

En la etapa ($\alpha 2$) del procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de poliamidas basadas en ácidos ω -aminocarboxílicos, los ácidos ω -aminocarboxílicos obtenidos en la etapa ($\alpha 1$) del procedimiento, en particular los ácidos ω -aminoláuricos obtenidos en la etapa ($\alpha 1$) del procedimiento se hacen reaccionar en una polimerización para formar una poliamida, pudiendo emplearse eventualmente también mezclas de diferentes ácidos ω -aminocarboxílicos, de los que al menos uno de los ácidos ω -aminocarboxílicos, pero eventualmente también todos los ácidos ω -aminocarboxílicos fueron preparados mediante el procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos.

La preparación de las poliamidas a partir de los ácidos ω -aminocarboxílicos puede tener lugar mediante procedimientos en sí conocidos tal como se describen, por ejemplo, en L. Notarbartolo, Ind. Plast. Mod. 10(1958)2, pág. 44, documentos JP 01-074224, JP 01-051433, JP63286428, JP5808324 o JP60179425.

Una contribución para la solución de los problemas mencionados al comienzo la ofrece también un procedimiento para la preparación de poliamidas basadas en lactamas, que comprende las etapas de procedimiento:

- ($\beta 1$) preparación de lactamas mediante el procedimiento precedentemente descrito para la preparación de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, en particular mediante el procedimiento precedentemente descrito para la preparación de laurin-lactama a partir de ácido láurico o ésteres del ácido láurico;
- 50 ($\beta 2$) polimerización con apertura del anillo o policondensación de la laurin-lactama, obteniéndose una poliamida.

- En la etapa (β 2) del procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de poliamidas basadas en lactamas, las lactamas obtenidas en la etapa (β 1) del procedimiento, en particular la laurin-lactama obtenida en la etapa (β 1) del procedimiento, se hacen reaccionar, en una polimerización con apertura del anillo o mediante policondensación, para formar una poliamida, pudiendo emplearse eventualmente también mezclas de diferentes lactamas, por ejemplo mezclas de laurin-lactama y ϵ -caprolactama, de las que al menos una de las lactamas, pero eventualmente también todas las lactamas fueron preparadas mediante el procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos.
- La preparación de las poliamidas a partir de las lactamas puede tener lugar mediante procedimientos en sí conocidos tal como se describen, por ejemplo, en los documentos DE-A-14 95 198, DE-A-25 58 480, EP-A-0 129 196, o bien en "*Polymerization Processes*", Interscience, Nueva York, 1977, páginas 424-467, particularmente en las páginas 444-446.
- La invención se explica ahora con mayor detalle con ayuda de Figuras y Ejemplos no limitantes.
- La Figura 1 muestra la representación esquemática de un plásmido recombinante para la integración cromosómica de los genes *alk* en *Escherichia coli* (tnp: gen transposasa; bla: gen de resistencia a ampicilina, oriT RP4: región de movilización; I y O marcan las "*repeticiones invertidas*" del mini-transposón Tn5).
- La Figura 2 muestra la representación esquemática de un plásmido recombinante para la expresión de la transaminasa y de la alanina-deshidrogenasa bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (bla: gen de resistencia a ampicilina; CV2025: gen para ω -transaminasa de *Chromobacterium violaceum*, ald: gen para alanina-deshidrogenasa de *B. subtilis*, araC: regulador de la transcripción).
- La Figura 3 muestra la representación esquemática de un plásmido recombinante para la expresión de LipA en *E. coli* y la preparación de la enzima sobre la superficie de la célula (colE1, ColE1: origen de la replicación; *estA**, *estA*: gen con intercambio de aminoácidos alanina por serina (codón nº 38), cat: gen de resistencia a cloranfenicol; phoA: segmento de gen que codifica la secuencia conductora de la fosfatasa alcalina).
- La Figura 4 muestra la determinación de la actividad de transaminasa de *C. violaceum* a partir del ensayo con enzimas. La determinación de la actividad se llevó a cabo en determinación doble (activo 1, activo 2) en el fotómetro. Como controles negativos se utilizó una tanda sin el co-sustrato L-alanina (o.Cos), una tanda con enzima activada por calor (inactiva) y una tanda del cultivo de expresión de *E. coli* con vector vacío (vector vacío), purificada análogamente a omega-TA.
- La Figura 5 muestra los cromatogramas del sustrato éster metílico del ácido 12-aminoláurico al comienzo de la medición de referencia (arriba) y después de 2 h de incubación con la transaminasa purificada (abajo).
- La Figura 6 muestra los cromatogramas del sustrato éster metílico del ácido 12-aminoláurico después de 24 h (arriba) del ensayo con enzimas y después de la ampliación del sustrato (control, abajo).
- La Figura 7 muestra 6 cromatogramas del sustrato éster metílico del ácido 12-aminoláurico después de activación por calor de la enzima (arriba) y después de 0 h (abajo).
- La Figura 8 muestra el plásmido de partida pGEc47 que se empleó como molde para la amplificación de alkBGS.
- La Figura 9 muestra los cebadores empleados y los productos de la PCR resultante de ello alkBFG y alkT.
- La Figura 10 muestra el vector recombinante pBT10 que se empleó para la síntesis de éster metílico del ácido hidroxiláurico y éster metílico del ácido oxoláurico.
- La Figura 11 muestra un cromatograma por CG del patrón éster metílico del ácido 12-oxo-láurico.
- La Figura 12 muestra un cromatograma por CG del patrón de éster metílico del ácido 12-hidroxi-láurico.
- La Figura 13 muestra un cromatograma de la fase orgánica de una biotransformación de célula en reposo en un bio-reactor de éster metílico de ácido láurico, instante 0 min.
- La Figura 14 muestra un cromatograma de la fase orgánica de una biotransformación de célula en reposo en un bio-reactor de éster metílico de ácido láurico, instante 150 min.

La Figura 15 muestra el vector de expresión pGJ3130 con AT3G22200.

La Figura 16 muestra la detección de la actividad enzimática a través del ensayo con enzimas acoplado (inactivo, proteína inactivada por calor; o Cos, sin adición de alanina; akt, la enzima purificada activa).

La Figura 17 muestra la detección de la proteína expresada de forma heteróloga AT3G22200 a través de HPLC. Arriba: producto después de incubación durante 20 min a 10,8 min; abajo: sustancia de referencia a 10,8 min.

La Figura 18 muestra el mapa de plásmidos de los vectores de expresión pET-21a(+) con el gen transaminasa ppta5 (pPPTA5).

La Figura 19 muestra el mapa de plásmidos de los vectores de expresión pET-21a(+) con el gen transaminasa psta (pPSTA).

La Figura 20 muestra la aminación de éster metílico del ácido 12-oxoláurico 5 mM con las transaminasas PPTA5. Para la evaluación se sumaron las superficies pico de éster metílico del ácido 12-oxo- y 12-amino-láurico a partir de los cromatogramas obtenidos de la extracción neutra y ácida y se calculó la proporción porcentual de educto o bien de producto.

La Figura 21 muestra la aminación de éster metílico del ácido 12-oxoláurico 5 mM con las transaminasas PSTA. Para la evaluación se sumaron las superficies pico de éster metílico del ácido 12-oxo- y 12-amino-láurico a partir de los cromatogramas obtenidos de la extracción neutra y ácida y se calculó la proporción porcentual de educto o bien de producto.

EJEMPLOS

A. Reacción de ácido láurico o bien éster metílico del ácido láurico para formar laurin-lactama

Para la reacción del ácido láurico o bien del éster metílico del ácido láurico para dar laurin-lactama, *E. coli* se complementa con las enzimas necesarias monooxigenasa, alcohol-deshidrogenasa, ω -transaminasa, alanina-deshidrogenasa y una lipasa. Las enzimas se sobre-expresan en *E. coli*, siendo el nivel de expresión de las distintas enzimas función de la cinética de las reacciones individuales y debiendo adaptarse óptimamente entre sí. El ajuste del nivel de expresión tiene lugar mediante la adición de la correspondiente cantidad de inductor. La expresión de la monooxigenasa y de la alcohol-deshidrogenasa es inducida con n-octano, la transaminasa y la alanina-deshidrogenasa son inducidas con arabinosa y la lipasa con IPTG.

A1. Clonación de las distintas enzimas

Hidroxilación y formación de aldehído

Para la hidroxilación del ácido láurico o bien del éster metílico del ácido láurico se utiliza el sistema de alcohohidroxilasa *alkBGT* de *Pseudomonas putida* GPO1. La segunda etapa para formar el aldehído es catalizada mediante la alcohol-deshidrogenasa *alkJ*.

Los genes *alkBGJT* necesarios para estas reacciones se integran en *E. coli* mediante inserción en mini-transposón Tn5, cromosómicamente en el genoma de *E. coli* (de Lorenzo et al., *J. Bacteriol.*, Vol. 172 (11), páginas 6568-6572 y 6557-6567 (1990); Panke et al., *Appl and Environm. Microbiol.*, páginas 5619-5623 (1999). En este caso, los genes han de ser expresados bajo el control del promotor *alkB* y del regulador positivo *alkS*. La transferencia de la construcción Tn5-*alkBGFJST* al organismo diana de *E. coli* tiene lugar con ayuda del plásmido movilizable pUT-Km (Panke et al., 1999, véase arriba).

El locus *alkSt* con el regulador *alkS* relevante para la expresión está organizado fuera del operón *alkBGFHJKL* y está dispuesto en el genoma de *Pseudomonas putida* en dirección opuesta. La disposición de los genes se conserva durante la clonación en el plásmido portador del transposón. Los fragmentos *alkST* y *alkBFGJ* son integrados consecutivamente en el plásmido.

Los genes *alkB* (SEQ.-ID-NO 03), *alkG* (SEQ.-ID-NO 04) y *alkJ* (SEQ.-ID-NO 05) a clonar están organizados en *P. putida* ciertamente conjuntamente en el operón *alkBFGHJKL*, pero son separados por el gen *alkH* que codifica una aldehído-deshidrogenasa. Esta enzima degradaría de nuevo el producto diana pretendido, el aldehído del ácido láurico, y, por lo tanto, debe ser excluido de la clonación de los genes *alkBGJ*.

Para simplificar la clonación de *alkB* y *alkG*, el gen *alkF* situado entre medias se amplifica y clona conjuntamente con *alkB* y *alkG*. *AlkF* carece de importancia para la reacción a catalizar. Los genes *alkBFG* y *alkJ* se amplifican en dos tandas de PCR separadas y se fusionan entre sí a través de SOE-PCR (Horton et al., *Gene*, Vol. 77, páginas 61-68 (1989)). Como ADN diana sirve el plásmido OCT de *Pseudomonas putida* GPo1.

A.2 Estrategia de clonación:

Amplificación por PCR del fragmento *alkST* = 4077 pb (SEQ.-ID-NO 06 (*alkS*) y SEQ.-ID-NO 07 (*alkT*)) en el lugar de corte *NotI* aguas arriba de *alkT*:

Cebador

alkT-directo-*NotI* (SEQ.-ID-NO 08)

5' ACGTAGCGGCCGCCTAATCAGGTAATTTTATAC

alkS-inverso (SEQ.-ID-NO 09)

5' GAGCGAGCTATCTGGT

El fragmento de PCR es clonado en el vector pUT-Km portador del transposón. Para ello, el vector se corta dentro de *Tn5* con *NotI* y se liga mediante ligamiento en los extremos romos con el fragmento *alkST*. El plásmido recombinante tiene la denominación pUT-Km-*alkST*.

A3. Síntesis de la construcción *alkBFGJ* con la técnica SOE-PCR:

Síntesis del fragmento 1: *alkBFG* + promotor aguas arriba de *alkB* y lugar de corte *NotI* en el extremo 5' (tamaño de producto: 1409 pb):

Cebador

alkBFG-directo-*NotI* (SEQ.-ID.-NO 10)

5' TCGTAGCGGCCGCCCAGCAGACGACGGAGCAA

alkBFG-inverso-SOE (SEQ.-ID-NO 11)

5' ATTTTATCTTCTCGAGGCTTTTCCTCGTAGAGCACAT

Síntesis del fragmento 3, *alkJ* con extremo complementario a *alkG* en el extremo 5' y lugar de corte *NotI* en el extremo 3' (tamaño de producto: 1723 pb):

Cebador

alkJ-directo-SOE (SEQ.-ID-NO 12)

5' TGCTCTAACGAGGAAAAGCCTCGAGAAGATAAAATGTA

alkJ-inverso-*NotI* (SEQ.-ID-NO 13)

5' ATTGACGCGGCCGCTTACATGCAGACAGCTATCA

Los dos fragmentos individuales se fusionan entre sí a través de SOE-PCR. (Se requieren 3 reacciones PCR separadas). El plásmido pUT-Km-*alkST* recombinante y la construcción *alkBFGJ* se cortan con *NotI* y se ligan. El nuevo plásmido pUT-Km-*alkBGIST* recombinante (véase la Figura 1) se transforma en *E coli* HB101 y se transfiere a través de transferencia de plásmido conjugativa a *E. coli* JM101.

A4. Aminación y regeneración del donante de amino

Para la aminación para dar éster del ácido ω -aminoláurico y la regeneración del donante de amino, la cepa JM101 de *E. coli* portadora de Tn5:*alkBGJST* es transformada adicionalmente con el plásmido recombinante pBAD-CV2025-*ald*. Este plásmido se basa en el vector pBAD30 (Guzman et al., "Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose *P_{BAD}* Promotor", J. Bacteriol, Vol. 177 (14), páginas 4121-4130 (1995)). pBAD-CV2025-*ald* porta el gen para la transaminasa CV2025 de *Chromobacterium violaceum* DSM30191 (SEQ.-ID-NO 01; Kaulmann et al., *Enzyme and Microbial Technology* Vol. 41, páginas 628-637 (2007) y el gen *ald* que codifica una alanina-deshidrogenasa de *Bacillus subtilis subsp. Subtilis* (SEQ.-ID-NO 02; NP_391071). Los genes se encuentran bajo el control de un promotor inducible por arabinosa.

A5. Estrategia de clonación

Amplificación por PCR del gen transaminasa con ADN cromosómico de *Chromobacterium violaceum* DSM30191 (tamaño del producto: 1415 pb):

Cebador

CV2025-directo-*SacI* (SEQ.-ID-NO 14)

5' CGAGGAGCTCAGGAGGATCCAAGCATGCAGAAGCAACGTACG

CV2025-inverso-*KpnI* (SEQ.-ID-NO 15)

5' GTCATGTACCCCTAAGCCAGCCCGCGCGCCT

Para la clonación en el vector pBAD30, el cebador *directo* contiene, junto al lugar de corte *XbaI*, un sitio de unión al ribosoma. El ligamiento en el vector pBAD30 tiene lugar a través de los sitios de corte *SacI* y *KpnI*. El vector recombinante tiene la denominación pBAD-CV2025.

Amplificación por PCR del gen alanina-deshidrogenasa *ald* con ADN cromosómico de *B.subtilis subsp. Subtilis* (NP_391071) (tamaño del producto: 1171 pb).

Cebador

AlaDH-directo-*XbaI* (SEQ.-ID-NO 16)

5' ACCTATCTAGAAGGAGGACGCATATGATCATAGGGGTTTCCT

AlaDH-inverso-*PstI* (SEQ.-ID-NO 17)

5' AACCTCTGCAGTTAAGCACCCGCCAC

Para la clonación en el vector pBAD-CV2025 recombinante, el cebador *directo* contiene, junto al sitio de corte *XbaI*, un lugar de unión a ribosomas. La clonación en el vector tiene lugar a través de los lugares de corte *XbaI* y *PstI*. El plásmido resultante tiene la denominación pBAD-CV2025-*ald* (véase la Figura 2).

A6. Clonación alternativa del gen omega-transaminasa de *Chromobacterium violaceum* DSM 30191 para la expresión optimizada en codones en *E. coli*

El gen que codifica la omega-transaminasa se sintetizó en la razón social Geneart optimizado en el uso de codones para *E. coli* (SEQ.-ID-NO 42) y se clonó en el vector pGA15 (Geneart). En este caso, durante la síntesis del gen se incorporaron de manera flanqueante los lugares de corte *SacI* y *KpnI* y, después de la digestión con *SacI* y *KpnI*, se clonó en el vector pGA15 previamente linearizado con *SacI* y *KpnI*. El vector resultante se digirió con las endonucleasas de restricción *SacI* y *KpnI*, el fragmento (transaminasa) se purificó y se ligó en el vector de expresión paCYCDuet-1 (Novagen). Mediante el análisis de restricción se examinaron los plásmidos correctos. El vector resultante se denomina paCYCDuet-1::omega transaminasa.

A.7 Purificación de proteína expresada de forma heteróloga a través de la etiqueta 6xHis

Después de la transformación del vector (paCYCDuet-1::omega transaminasa) en *E. coli* XL1blue, la cepa transformada se cultivó medio YT doble (dYT) con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml) a 28°C hasta una densidad de DO600 nm = 0,3-0,4. La expresión tiene lugar bajo el control del promotor P_{lac} y es inducida con IPTG (concentración final 1 mM). Lisis del cultivo de expresión en bacterias: 50 ml de cultivo se separaron por centrifugación a 2360 x g, y a continuación se resuspendieron en 5 ml de tampón fosfato de Na (pH 8) con EDTA 5 mM, NaCl 300 mM y 1 mg/ml de lisozima y se incubaron durante 1 h a TA. El lisado se centrifugó a 2360 x g durante 10 min y el sobrenadante se purificó a través de una columna empaquetada Protino Ni-TED 2000 (de acuerdo con los datos del fabricante; Macherey-Nagel, Düren). La concentración de proteínas se determinó mediante Bradford.

A8. Detección de la actividad enzimática a través de un ensayo acoplado

La actividad se determinó en un ensayo acoplado, en el que como producto secundario se continúa haciendo reaccionar en una segunda etapa el piruvato que resulta de la reacción de transaminasa, oxidándose NADH en NAD⁺. La disminución de la concentración en NADH (principio: medición de la disminución de la extinción) se mide en el fotómetro a 340 nm y sirve como medida de la actividad.

Tanda	
50 mM	Fosfato de Na pH 7,5
50 mM	L-alanina
100 µM	Fosfato de piridoxal
250 µg	Éster metílico del ácido 12-oxododecanoico
1,25 mM	NADH
10 U	Lactato deshidrogenasa
10 µg	Proteína expresada de forma heteróloga
con H ₂ O _{bidest}	completar hasta 1 ml

El ensayo se inició mediante la adición de 5 µl de 12-ODME (50 mg/ml). La medición tiene lugar de forma continua cada minuto a 340 nm a TA hasta como máx. 20 minutos. Para el control se utilizó proteína inactivada y una tanda sin sustrato de Co. En la Figura 4 pudo vigilarse fotométricamente la variación de la extinción.

A9. Detección de la proteína expresada de forma heteróloga a través de HPLC

Tanda	
50 mM	Fosfato de Na pH 7,5
50 mM	L-alanina
100 µM	Fosfato de piridoxal
250 µg	Éster metílico del ácido 12-oxododecanoico
50 µg	Proteína expresada de forma heteróloga
con H ₂ O _{bidest}	completar hasta 500 µl

Después de incubación durante 4 h a TA, la reacción se detuvo con 1 vol. de MeOH. Para la analítica por HPLC, la tanda se derivatizó con o-ftaldialdehído (oPA) y de ello se analizaron 250 µl. Como eluyente A se utilizó NaAC 50 mM pH 4: acetonitrilo 4:1 (v:v).

El eluyente B era acetonitrilo con 5% de NaAC 50 mM pH 4. El gradiente discurría de 30% de B a 60% de B en 4 min, de 60% de B a 100% de B en 2 min. El caudal ascendió a 1,2 ml/min.

La separación tuvo lugar a través de una columna Agilent Zorbax RP18 (Agilent Technologies, EE.UU.), la temperatura de la columna ascendió a 40°C.

Las Figuras 5 y 6 muestran el patrón, así como la disminución del éster metílico del ácido 12-oxoláurico. Como control negativo sirve enzima inactivada por calor (Figura 7).

A.6 Disociación del éster

5 Para la disociación del éster metílico del ácido ω -aminoláurico en ácido ω -aminoláurico se emplea la lipasa LipA (Q76D26) de *Pseudomonas fluorescens* (Kojima y Shimizu, *J. of Bioscience and Bioengin.*, Vol. 96 (3), páginas 219-226 (2003)). El gen se amplifica con los cebadores LipA-Sfil-up y LipA-Sfil-down con ADN cromosómico de *Pseudomonas fluorescens* y se clona en el vector pEST100 a través de los lugares de corte Sfil. El plásmido recombinante se denomina pEST-lipA (véase la Figura 3).

10 Mediante la clonación, lipA (SEQ.-ID-NO 18) se fusiona a la secuencia señal de la fosfatasa alcalina phoA y los dominios autotransportadores de EstA, una esterasa de *P. aeruginosa*, de modo que la lipasa es transferida a través de la membrana del citoplasma y se representa sobre la superficie celular de *E. coli*. Para el modo de proceder, véase Becker et al, "A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes", *FEBS Letters* Vol. 579, páginas 1177-1182 (2005). La expresión tiene lugar a través del control del promotor P_{lac} y es inducida con IPTG (concentración final 1 mM) (tamaño del producto: 1894 pb).

Cebador

Cebador lipA-Sfi-up (SEQ.-ID-NO 19)

5' AACAA.AAGGGCCGCAATGGCCATGGGTGTGTATGACTAC

Cebador lipA-Sfi-down (SEQ.-ID-NO 20)

20 5' TACAGGGGCCACCACGGCCTCAGGCGATCACAATTCC

B. Síntesis de éster metílico del ácido 12-hidroxiláurico y éster metílico del ácido 12-oxoláurico partiendo de éster metílico del ácido láurico con el sistema de alcano-hidroxilasa alkBGT de *Pseudomonas putida* GPo1

B1. Construcción de los vectores de expresión alkBGT

Partiendo de pCOM

25 Partiendo de los sistemas pCOM (Smits et al., 2001 Plasmid 64: 16-24) se preparó la construcción pBT10 (Figura 10, SEQ.-ID-NO 31) que contiene los tres componentes necesarios para la oxidación en aldehído, alcano-hidroxilasa (AlkB), rubredoxina (AlkG) y rubredoxina-reductasa (AlkT) de *Pseudomonas putida*. Para la expresión de los tres genes, la secuencia génica alkBFG se puso bajo el control del promotor alkB y el gen alkT bajo la del promotor alkS.

30 B2. Estrategia de clonación:

Para simplificar la clonación de *alkB* y *alkG*, el gen *alkF* situado entremedias se amplificó conjuntamente con *alkB* y *alkG* y se clonó. AlkF carece de importancia para la reacción a catalizar.

Amplificación por PCR del fragmento *alkBFG* = 2524 pb (véase SEQ.-ID-NO 03 (*alkB*) y SEQ.-ID-NO 04 (*alkG*)) con el lugar de corte *NdeI* aguas arriba de *alkB* y el lugar de corte *Sall* aguas abajo de *alkG*:

35 Cebador: alkBFG directo (SEQ.-ID-NO 32)

AAGGGAATTCCATATGCTTGAGAAACACAGAGTTC

Cebador: alkBFG inverso (SEQ.-ID-NO 33)

AAAATTCGCGTCGACAAGCGCTGAATGGGTATCGG

Amplificación por PCR del fragmento *alkT* (2958 pb) (véase la Seq.ID-NO 07 (*alkT*))

Cebador *alkT* directo (SEQ.-ID-NO 34)

TGAGACAGTGGCTGTTAGAG

5 Cebador *alkT* inverso (SEQ.-ID-NO 35)

TAATAACCGCTCGAGAACGCTTACCGCCAACACAG

La amplificación de los fragmentos *alkBFG* y *alkT* tuvo lugar mediante PCR. Como molde se empleó el plásmido pGEc47 (Figura 12) (Eggink et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 17712-17718).

10 La clonación se llevó a cabo mediante el vector de subclonación pSMART® HCKan (Lucigen Corporation). Esta etapa adicional era necesaria, ya que una clonación directa no condujo a éxito alguno. Para el ello, el vector pSMART® HCKan (Lucigen) adquirible en el comercio y ya linearizado y provisto de extremos romos se ligó con el producto de PCR de extremos romos respectivo (Figura 9).

15 A continuación, el fragmento *alkBFG* se cortó con las enzimas de restricción *NdeI* y *Sall* y el fragmento *alkT* se separó por corte de los vectores de subclonación con las enzimas de restricción *PacI* y *XhoI*. Los fragmentos se separaron en gel de agarosa (al 1%), se separaron por corte del gel y se aislaron mediante el kit de extracción del gel. Los fragmentos se ligaron sucesivamente en el vector pCOM10 (Smits, T. H. M., Seeger, M. A., Witholt, B y van Beilen, J. B. (2001) Plasmid 46, 16-24). En la primera etapa, *alkBFG* se incorporó en el pCOM10 a través de los lugares de corte *NdeI* y *Sall*, y en una segunda etapa, *alkT* se clonó entonces a través de los lugares de corte *PacI* y *XhoI*.

20 El plásmido recombinante se transformó primeramente en *E. coli* DH5α. Los clones portadores de plásmidos se seleccionaron en medio LB con contenido en canamicina. El plásmido resultante de ello se controló a través de análisis de restricción y secuenciación. Se denomina pBT10 (Figura 10).

B3. Biotransformación en el bio-reactor del éster metílico del ácido láurico para dar éster metílico del ácido hidroxiláurico y éster metílico del ácido 12-oxoláurico

25 Para la biotransformación, el plásmido pBT10 se transformó mediante choque de calor a 42°C durante 2 min en la cepa de *E. coli* W3110 químicamente competente. Para la síntesis de éster metílico del ácido hidroxiláurico y éster metílico del ácido 12-oxoláurico, *E. coli* W3110-pBT10 se cultivó durante una noche a 30°C y 180 rpm en medio M9 y se recolectó. La biomasa se recogió en medio M9 con glucosa al 0,5% hasta una DO450 = 0,2. La expresión se indujo con un tiempo de crecimiento de 4 h con dicitlopropilcetona y se incubó durante otras 4 horas. Las células se separaron de nuevo por centrifugación, el sedimento de células se resuspendió en tampón KPi (50 mM, pH 7,4) y se añadió a un bio-reactor. Se ajustó una concentración de biomasa de aproximadamente 1,8 g de CDW/L. Bajo intensa agitación (1500 min⁻¹) se añadió el sustrato éster metílico del ácido láurico en la relación 1:3 a la suspensión de células (100 ml de suspensión de células, 50 ml de éster metílico del ácido láurico). La temperatura se mantuvo constante a 30°C. La formación de los productos éster metílico del ácido hidroxiláurico y éster metílico del ácido 12-oxoláurico se detectó mediante análisis por CG de la tanda de reacción. Para ello, después de 0 min como control negativo (Figura 13) y después de 150 min (Figura 14) se tomó una muestra de la fase orgánica de la tanda de reacción y se analizó mediante CG (Thermo Trace GC Ultra). Como columna servía una FactorFourTM VF-5m de Varian Inc., longitud: 30 m, grosor de la película: 0,25 µm, diámetro interno: 0,25 mm.

40 Condiciones de análisis:

Temperatura del horno	80 – 280°C
Rampa	15°C/min
Relación de disociación	15
45 Volumen de inyección	1 µl
Flujo de soporte	1,5 ml/min
Inyector PTV	80 – 280°C a 15°C/s
Temperatura base del detector	320°C

50 La detección de éster metílico del ácido 12-oxoláurico (Figura 11) y éster metílico del ácido 12-hidroxiláurico (Figura 12) se muestra mediante la inyección de las sustancias puras.

C Reacción de éster metílico del ácido 12-oxoláurico para dar éster metílico del ácido 12-aminoláurico

C1. Aislamiento y expresión de una aminotransferasa de *Arabidopsis thaliana*

5 Se analizó una aminotransferasa conocida de *Arabidopsis thaliana*. En este caso, sorprendentemente, la 4-aminobutirato-transaminasa (at3g22200, SEQ.-ID-NO 38) mostraba una actividad de aproximadamente 14 U/mg de proteína expresada de forma heteróloga frente al éster metílico del ácido 12-oxododecanoico. El producto éster metílico del ácido 12-aminododecanoico se confirmó mediante HPLC.

Si no se indica otra cosa, todos los métodos se realizaron según los protocolos en Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T (1989). Molecular cloning, 2ª ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Aislamiento de la 4-aminobutirotransaminasa de *A. thaliana* (at3g22200)

10 El ARN se aisló con el mini kit RNeasy a partir de una planta entera en flor de la especie *A. thaliana* según los datos del fabricante: QIAGEN GmbH, Hilden. A continuación, se llevó a cabo la síntesis de ADNc con el kit RT Skript (USB Europe GmbH, Staufien) según los datos del fabricante. La determinación de la calidad/cantidad de ARN se determinó mediante Nanodrop según los datos del fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham EE.UU.).

15 PCR de ADNc de *A. thaliana* para la introducción de lugares de corte

Con los cebadores siguientes, el ADN que codifica la 4-aminobutirotransaminasa con la SEQ.-ID-NO 39 se clonó en el vector digerido con NaeI, BamHI

El cebador directo introduce al lugar de corte de proteasa y NaeI, SEQ.-ID-NO 36
GCCGGCGAGAACCTGTACTTTCAGATGGCAAGTAAGTATGCCACTTG

20 El cebador inverso introduce BamHI, SEQ.-ID-NO 37
GGATCCTCACTTCTTGCTGAGCCTTG

La PCR se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

Tanda	Programa
2 µl de ADNc	95 °C 3 min
5 µl de tampón 10x Pfu MgSO4	94 °C 45 s
5 µl de dNTPs 2 mM	58 °C 1 min
2 µl de cebador directo 10 µM	72 °C 4 min
2 µl de cebador inverso 10 µM	72 °C 10 min
0,5 µl de Pfu	} 30 ciclos
36,5 µl de H2O	

25 El producto de la PCR resultante se purificó con el kit NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel, Alemania, según los datos del fabricante).

Expresión de la proteína heteróloga

30 Utilizando el producto de la PCR arriba descrito se preparó, mediante métodos de biología molecular estándares, el vector pGJ3130 (Figura 15, SEQ.-ID-NO 43) y se transformó en *E. coli* XL1blue. La cepa de *E. coli* transformada se cultivó en medio doble YT (dYt) con los antibióticos ampicilina (100 µg/ml) y la adición de IPTG 0,5 mM a 28 °C hasta una densidad de DO600 nm = 0,3-0,4.

Purificación de proteína expresada de forma heteróloga a través etiqueta 6xHis

- 5 Lisis del cultivo de expresión en bacterias: 50 ml de cultivo se separaron por centrifugación a 2360 x g, y a continuación se resuspendieron en 5 ml de tampón fosfato de Na (pH 8) con EDTA 5 mM, NaCl 300 mM y 1 mg/ml de lisozima y se incubaron durante 1 h a TA. El lisado se centrifugó a 2360 x g durante 10 min y el sobrenadante se purificó a través de una columna empaquetada Protino Ni-TED 2000 (de acuerdo con los datos del fabricante; Macherey-Nagel, Düren). La concentración de proteínas se determinó mediante Bradford.

Detección de la actividad enzimática a través de un ensayo acoplado

- 10 La actividad se determinó en un ensayo acoplado, en el que como producto secundario se continúa haciendo reaccionar en una segunda etapa el piruvato que resulta de la reacción de transaminasa, oxidándose NADH en NAD⁺. La disminución de la concentración en NADH (principio: medición de la disminución de la extinción) se mide en el fotómetro a 340 nm y sirve como medida de la actividad.

Tanda	
50 mM	Fosfato de Na pH 7,5
50 mM	L-alanina
100 µM	Fosfato de piridoxal
250 µg	Éster metílico del ácido 12-oxododecanoico
1,25 mM	NADH
10 U	Lactato deshidrogenasa
10 µg	Proteína expresada de forma heteróloga
con H ₂ O _{bidest}	completar hasta 1 ml

- 15 El ensayo se inició mediante la adición de 5 µl de 12-ODME (50 mg/ml). La medición tiene lugar de forma continua cada minuto a 340 nm a TA hasta como máx. 20 minutos. Para el control se utilizó proteína inactivada y una tanda sin sustrato de Co. En la Figura 16 pudo vigilarse fotométricamente la variación de la extinción.

Detección de la proteína expresada de forma heteróloga a través de HPLC

Tanda	
50 mM	Fosfato de Na pH 7,5
50 mM	L-alanina
100 µM	Fosfato de piridoxal
250 µg	Éster metílico del ácido 12-oxododecanoico
50 µg	Proteína expresada de forma heteróloga
con H ₂ O _{bidest}	completar hasta 500 µl

- 20 Después de incubación durante 4 h a TA, la reacción se detuvo con 1 vol. de MeOH. Para la analítica por HPLC, la tanda se derivatizó con o-ftaldialdehído (oPA) y de ello se analizaron 250 µl. Como eluyente A se utilizó NaAC 50 mM pH 4: acetonitrilo 4:1 (v:v).
- 25 El eluyente B era acetonitrilo con 5% de NaAC 50 mM pH 4. El gradiente discurría de 30% de B a 60% de B en 4 min, de 60% de B a 100% de B en 2 min. El caudal ascendió a 1,2 ml/min. La separación tuvo lugar a través de una columna Agilent Zorbax RP18 (Agilent Technologies, EE.UU.), la temperatura de la columna ascendió a 40°C.
- La Figura 17 (arriba) muestra la formación de éster metílico del ácido 12-aminoláurico. La muestra de referencia está representada abajo en la Figura 17.

D Aminación de éster metílico del ácido 12-oxoláurico con PPTA5 y PSTA de Pseudomonas

D1. Clonación de PPTA5 y PSTA

Para la aminación de éster metílico del ácido 12-oxoláurico se emplearon las cepas *E. coli* BL21(DE3)/PPTA5 y *E. coli* BL21(DE3)/PSTA. Estas cepas se construyeron como sigue. Para la clonación de los dos genes transaminasa se eligió el vector de expresión pET-21a(+) (Novagen). Para el gen ppta5, SEQ.-ID-NO 40 se construyeron cebadores que deberían añadir al gen los lugares de corte por restricción NdeI y XhoI en los extremos; cebador PPTA5_NdeI:

GGAATTCCATATGAGCGTCAACAACCCGCAACCCG (SEQ.-ID-NO 44) y cebador PPTA5_XhoI: CCGCTCGAGTTATCGAATCGCCTCAAGGGTCAGGTCC (SEQ.-ID-NO 45). Para el gen psta, SEQ.-ID-NO 41, cebador con NdeI y BamHI en los extremos; cebador PSTA_NdeI: GGAATTCCATATGAGCGATTGCGAAACCCTGCACTGGC (SEQ.-ID-NO 46) y cebador PSTA_BamHI: CGCGGATCCTCAGCCAGCACATCCTTGGCTGTGC (SEQ.-ID-NO 47)

Estos cebadores se emplearon en PCRs. Los productos de la PCR purificados, así como el vector pET-21a(+) se sometieron a continuación a una restricción con las enzimas de restricción NdeI y XhoI o bien NdeI y BamHI. El vector cortado se desfosforiló con fosfatasa alcalina de camarones. El vector cortado con NdeI y XhoI y el gen ppta5, así como el vector cortado con NdeI y BamHI y el gen psta se transformaron después del ligamiento con T4 ADN ligasa con la cepa de expresión competente *E. coli* XL1-blue. Después del cultivo de algunos clones tuvo lugar el aislamiento de los plásmidos con la subsiguiente restricción y análisis electroforético en gel. Las secuencias de transaminasa de los clones obtenidos (pPPTA5 o bien pPSTA) se confirmaron mediante análisis de la secuencia. La Figura 18 muestra los mapas de plásmidos de los vectores de expresión.

D2. Expresión de PPTA5 y PSTA

Para la expresión, los vectores pPPTA5 y pPSTA se transformaron en células BL21(DE3) de *E. coli* competentes. En cada caso, una colonia individual se sobre-inoculó en 5 ml de medio LB-Amp (concentración de ampicilina 100 µg/ml) y se agitó durante una noche a 37 °C. A continuación, se sobre-inoculó al 1% en 200 ml de medio LB-Amp, se agitó a 37 °C y, después de alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5, se indujo la expresión del gen con IPTG 0,5 mM. Después de agitar durante 20 horas a 30°C, se recolectaron las células y se almacenaron a -20°C.

Para la disgregación de las cepas *E. coli* BL21(DE3)/pPPTA5 y *E. coli* BL21(DE3)/pPSTA, se elaboraron en cada caso 0,4 g de células con tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,2 para formar suspensiones de células al 25% que fueron tratadas dos veces durante 90 s con ultrasonidos (Bandelin Sonoplus HD2070, sonda MS73; 50% de intensidad). Después de la centrifugación se retiraron los sobrenadantes. Los extractos brutos, así obtenidos, se emplearon en reacciones de éster metílico del ácido 12-oxoláurico. Las tandas de 400 µl contenían éster metílico del ácido 12-oxoláurico 5 mM disuelto en N,N-dimetilformamida, DL-alanina 500 mM, piridoxal-5'-fosfato 1 mM y 80 µl de extracto bruto en tampón Kpi 10 mM pH 7,0. Se agitó a 25°C. Después de tiempos determinados se recogieron muestras de en cada caso 20 µl, una parte con 1 µl de disolución de NaOH al 1% se llevó al intervalo de pH alcalino y se separó por agitación con 100 µl de éster etílico del ácido acético. Las fases orgánicas se examinaron mediante cromatografía de gases (cromatógrafo razón social Perkin Elmer, Clarus 500 con detector de ionización de llama). Para ello se utilizó una columna Optima 5 (0,25 µm, 30 m, 0,25 mm, Macherey Nagel), con el programa:

80°C	
25°C/min	180°C
5°C/min	215°C
20°C/min	280°C

Los tiempos de retención de éster metílico del ácido 12-oxo- y 12-amino-láurico se encuentran en 7,2 o bien 7,7 min.

Los resultados de las reacciones están representados en las Figuras 20 y 21. Para la evaluación se sumaron las superficies pico de éster metílico del ácido 12-oxo- y 12-amino-láurico a partir de los cromatogramas obtenidos de la extracción neutra y ácida y se calculó la porción porcentual de precursor o bien producto.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Evonik Degussa GmbH

<120> CÉLULAS RECOMBINANTES PRODUCTORAS DE ÁCIDOS omega-AMINOCARBOXÍLICOS O SUS LACTAMAS

5 <130> 200700667

<160> 47

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1380

10 <212> ADN

< 213> Chromobacterium violaceum

<400> 1

```

atgcagaagc aacgtacgac cagccaatgg cgcgaaactgg atgccgccc tcacctgcat   60
ccgttcaccg ataccgcatc gctgaaccag gcgggcgcgcg gcgtgatgac gcgcggagag  120
ggcgtctacc tgtgggattc ggaaggcaac aagatcatcg acggcatggc cggactgtgg   180
tgcgtgaacg tcggctacgg ccgcaaggac ttgccaag cggcgcgccg gcagatggaa   240
gagctgccgt tctacaacac ctcttcaag accaccatc cggcgggtgt cgagctgtcc   300
agcctgctgg ctgaagtac gccggccggt ttcgaccgcg tttctatac caattccggt   360
tccgaatcgg tggacacat gatccgcatg gtgcgccgct actgggacgt gcagggcaag   420
ccggagaaga agacgctgat cggccgctgg aacggctatc acggctccac catcggcggc   480
gccagcctgg gcggcatgaa gtacatgcac gagcagggcg acttgccgat tccgggcatg   540
gcccacatcg agcagccttg gtgttacaag cacggcaagg acatgacgcc ggacgagttc   600
ggcgtggtgg ccgcgcgctg gctggaagag aagattctgg aaatcggcg cgacaagggt   660
gccgccttcg tcggcgaacc catccagggc gccggcgggc tgategtccc gccggccacc   720
tactggccgg aaatcgagcg catttgccgc aagtacgacg tgctgctggt ggccgacgaa   780
gtgatctgcg gcttcgggcg taccggcgaa tggttcggcc atcagcattt cggttccag   840
cccgaacctg tcaccgccg caagggcctg tcctccggt atctccgat aggcgcggtc   900

```

15

ttgtcggca agcgcgtggc cgaaggcctg atcgccggcg gcgactcaa ccacggcttc 960
 acctactccg gccacccggg ctgcgccgcc gtcgccacg ccaacgtggc ggcgctgcgc 1020
 gacgagggca tcgtccagcg cgtcaaggac gacatcggcc cgtacatgca aaagcgctgg 1080
 cgtgaaacct tcagccgttt cgagcatgtg gacgacgtgc gcggcgctgg catggtgcag 1140
 gcgttcaccc tggtaagaa caaggcgaag cgcgagctgt tccccgattt cggcgagatc 1200
 ggcacgctgt gccgcgacat cttcttcgc aacaacctga tcatgcgggc atgcggcgac 1260
 cacatcgtgt cggcgccgcc gctggtgatg acgcggggcg aagtggacga gatgctggcg 1320
 gtggcggaac gctgtctgga ggaattcgag cagacgctga aggcgcgcgg gctggcttag 1380

<210> 2
 < 211> 1137
 < 212> ADN
 < 213> Bacillus subtilis

<400> 2

atgatcatag gggttcctaa agagataaaa aacaatgaaa accgtgtcgc attaacaccc 60
 gggggcggtt ctcagctcat tcaaacggc caccgggtgc tggttgaaac aggcgcgggc 120
 cttggaagcg gattgaaaa tgaagcctat gagtcagcag gagcggaaat cattgctgat 180
 ccgaagcagg tctgggacgc cgaaatggtc atgaaagtaa aagaaccgct gccggaagaa 240
 tatgtttatt ttgcmaaagg actgtgtctg ttacgtacc tcatttagc agctgagcct 300
 gagcttgac aggccttgaa ggataaagga gtaactgcca tcgcatatga aacggtcagt 360
 gaaggccgga cattgcctct tctgacgcca atgtcagagg ttgcgggcag aatggcagcg 420
 caaatcggcg ctcaattctt agaaaagcct aaaggcggaa aaggcattct gcttgccggg 480
 gtgcctggcg ttcccgcgg aaaagtaaca attatcgag gaggcgttgt cgggacaaac 540
 gcggcgaaaa tggctgtcgg cctcggtgca gatgtgacga tcattgactt aaacgcagac 600
 cgcttgccc agcttgatga catcttcggc catcagatta aaacgttaat ttctaaccg 660
 gtcaatattg ctgatgctgt ggcggaagcg gatctcctca ttgcgcggt attaattccg 720

gggtgctaaag ctccgactct tgcactgag gaaatggtaa aacaaatgaa acccggttca 780
 gttattgttg atgtagcgat cgaccaaggc ggcatcgctg aaactgtcga ccatatcaca 840
 acacatgatc agccaacata tgaaaaacac gggggtgtgc attatgctgt agcgaacatg 900
 ccaggcgcag tccctcgtae atcaacaatc gccctgacta acgttactgt tccatacgcg 960
 ctgcaaactg cgaacaaagg ggagtaaaa gcgctcgag acaatacggc actgagagcg 1020
 gggttaaaca ccgcaaacgg acacgtgacc tatgaagctg tagcaagaga tctaggctat 1080
 gagtatgttc ctgccgagaa agctttacag gatgaatcat ctgtggcggg tgcttaa 1137

<210> 3
 < 211> 1206
 < 212> ADN
 < 213> Pseudomonas putida

<400> 3

atgcttgaga aacacagagt tctggattcc gctccagagt acgtagataa aaagaaatat 60
 ctctggatac tatcaacttt gtggccggct actccgatga tcggaatctg gcttgcaaat 120
 gaaactgggt gggggatttt ttatgggctg gtattgctcg tatggtacgg cgcacttcca 180
 ttgcttgatg cgatgtttgg tgaggacttt aataatccgc ctgaagaagt ggtgccgaaa 240
 ctagagaagg agcggtaacta tcgagtttg acatatctaa cagttcctat gcattacgct 300
 gcattaattg tgcagcatg gtgggtcgga actcagccaa tgtcttggt tgaaattggt 360
 gcgcttgctt tgcactggg tatcgtgaac ggactagcgc tcaatacagg acacgaactc 420
 ggtcacaaga aggagacttt tgatcgttgg atggccaaaa ttgtgttggc tgcgtaggg 480
 tacggtcact tctttattga gcataataag ggtcatcacc gtgatgtcgc tacaccgatg 540
 gatcctgcaa catcccggat gggagaaagc atttataagt tttcaatccg tgagatccca 600
 ggagcattta ttcgtgcttg ggggcttgag gaacaacgcc ttcgcgccg tggccaaagc 660
 gtttgaggtt tcgataatga aatcctccaa ccaatgatca tcacagttat tctttacgcc 720
 gttctccttg ccttgtttg acctaagatg ctgggtgtcc tgccgattca aatggcttcc 780
 ggttggtggc agctgaccag tgcgaactat attgaacatt acggcttgct ccgtcaaaaa 840

atggaggacg gtcgatatga gcatcaaaag ccgcaccatt cttggaatag taatcacatc 900
 gtctctaate tagtgctgtt ccaccttcag cggcactcgg atcaccacgc gcatccaaca 960
 cgttctatc agtcacttcg ggattttccc ggccctgccg ctctccgac gggttaccct 1020
 ggtgcatttt tgatggcgat gattcctcag tggtttagat cagttatgga tcccaaggta 1080
 gtagattggg ctgggtggta ccttaataag atccaaattg atgattcgat gcgagaaacc 1140
 tatttgaana aatttggcac tagtagtgct ggtcatagtt cgagtaccte tgcggtagca 1200
 tcgtag 1206

5 <210> 4
 < 211> 519
 < 212> ADN
 < 213> Pseudomonas putida

10 <400> 4
 atggctagct ataatgccc ggattgtaat tatgtttatg atgagagtgc gggtaatgtg 60
 catgaggggt ttctccagg tacgccttg caccttattc ctgaggattg gtgctgcccc 120
 gattgcgccg ttcgagacaa gcttgacttc atgttaattg agagcggcgt aggtgaaaag 180
 ggcgctacct caaccatac ttcgccaat ttatccgagg ttagtggcac aagttaact 240
 gctgaagcag tgggtgcgcc gacaagctta gagaaattgc ctagtgccga cgtaaaggc 300
 caagatctat ataaaactca acctccaagg tctgatgccc aaggcgggaa agcatacttg 360
 aagtggatat gtattacttg tggccatata tatgatgagg cgttgggcca tgaggccgag 420
 ggtttactc caggctactg ctttgaggat attcctgatg actggtgctg tccggattgc 480
 ggggctacga aagaagacta tgtgctctac gaggaaaag 519

15 <210> 5
 < 211> 1677
 < 212> ADN
 < 213> Pseudomonas putida

<400> 5
 20 atgtacgact atataatcgt tgggtctgga tctgcaggat gtgtgcttgc taatcgtctt 60

tcggccgacc cctctaaaag agtttggtta cttgaagctg ggccgcgaga tacgaatccg 120
 ctaattcata tgccgttagg tattgcttg cttcaata gtaaaaagt gaattgggct 180
 ttcaaaactg cgccacagca aaatctcaac ggccggagcc tttctggcc acgaggaaaa 240
 acgttaggtg gttcaagctc aatcaacgca atggtctata tccgagggca tgaagacgat 300
 taccacgcat gggagcaggc ggccggccgc tactgggggtt ggtaccgggc tcttgagttg 360
 ttcaaaaggc ttgaatgcaa ccagcgattc gataagtccg agcaccatgg ggttgacgga 420
 gaattagctg ttagtgattt aaaatatatc aatccgctta gcaaagcatt cgtgcaagcc 480
 ggcatggagg ccaatattaa ttcaacgga gatttcaacg gcgagtagca ggacggcgta 540
 gggttctatc aagtaacca aaaaaatgga caacgctgga gctcggcgcg tgcattcttg 600
 cacgggtgtac ttccagacc aaatctagac atcattactg atgcgcatgc atcaaaaatt 660
 cttttgaag accgtaaggc ggttggtgtt tctatataa agaaaaatat gcaccatcaa 720
 gtcaagacaa cgagtgggtg tgaagtactt cttagtcttg gcgcagtcgg cacgcctcac 780
 cttctaagc tttctggtg tggggctgca gccgagctta aggaacatgg tgttctcta 840
 gtccatgac ttctgaggt ggggaaaaat ctcaagatc atttgacat cacattgatg 900
 tgcgcagcaa attcgagaga gccgataggt gttgctctt cttcatccc tctggtgtc 960
 tcgggttgtt ttcataigt gtttaagcg gaggggttc ttagtagtaa cgtggcagag 1020
 tcgggtggtt ttgtaaaaag ttctctgat cgtgatcgcc ccaattgca gttcatttc 1080
 cttccaact atcttaaga tcacggtcga aaaatagcgg gtggttatgg ttatagcta 1140
 catataigt atctttgcc taagagccga ggcagaattg gcctaaaaag cgccaatcca 1200
 ttacagccgc ctttaattga cccgaactat cttagcgatc atgaagatat taaaaccatg 1260
 attgcgggta ttaagatagg gcgcgctatt tgcaggccc catcgatggc gaagcattt 1320
 aagcatgaag tagtaccggg ccaggctgtt aaaactgatg atgaaataat cgaagatatt 1380
 cgtaggcgag ctgagactat ataccatccg gtaggtactt gtaggatggg taaagatcca 1440
 gcgtcagttg ttgatccgtg cctgaagatc cgtgggttg caaatattag agtcgttgat 1500
 gcgtcaatta tgccgcactt ggtcgcgggt aacacaaacg ctccaactat tatgattgca 1560
 gaaaatgcgg cagaaataat tatgcggaat cttgatgtgg aagcattaga ggctagcgct 1620
 gagtttgctc gcgaggggtc agagctagag ttggccatga tagctgtctg catgtaa 1677

5 <210> 6
 < 211> 2649
 < 212> ADN

< 213> Pseudomonas putida

<400> 6

atgaaaataa taataaataa tgatttcccg gtcgctaagg tcggagcgga tcaaattacg 60
actctagtaa gtgccaaagt tcatagtgc atatacggc caagattgag tatcgcgga 120
ggagccgctc ccagagtatg cctttacaga gccccacctg gatatgggaa aaccgttgct 180
cttgcgttcg agtggctacg ccacagaaca gccggacgct ctgcagtgtg gctttcttta 240
agagccagtt cttacagtga attgatatc tgcgcagaga ttattgagca gcttgaaact 300
ttcgaatgg taaaattcag ccgtgtgaga gaggggtgtga gcaagcctgc gctcttgca 360
gaccttgcat ctagtctttg gcagagcacc tcgaataacg agatagaaac gctagtgtg 420
ttggataata ttaatcatga cttagacttg ccgttggtgc acgcacttat ggagtttatg 480
ttaatacac caaaaaatat cagggttgca gttgcaggca atacaataaa aggggtctcg 540
cagcttaaac ttgcaggcgc tatgcgggag tacaccgaga aagactggc ctttagcgca 600
gaagaggcgg tggcgtagc ggaggcagag tctgttcttg gagttcctga agaacagata 660
gagaccttgg tgcaagaagt tgaggggtgg cctgtctctg tagtttttt gttaaagcgt 720
gagtgccgg ccaagcatat ttcagcagta gttgaagtag acaattactt tagggatgaa 780
atatttgagg cgattcccga gcgctatcgt gttttcttg caaattcttc attgctcgat 840
ttcgtgacgc ctgatcaata caattatgta ttcaaagcg tcaatggggg ctcattgatt 900
aagtatttaa gcactaatta catgttgctt cgccatgtga gcggtgagcc agcgcagtt 960
acactgcac cagtactgcg taatttcta cgagaaatta ctggactga aaatcctgct 1020

5

aaaagatcct acctgcttaa gcgtgcagct ttctggcatt ggcgtagagg tgaataccag 1080
 tatgcaatac gaatatccct acgggcgaat gactgtcgct gggcagtcag catgtctgag 1140
 agaataattt tagattgttc atttcgtcag ggcgaaatag atgcgctgag acagtggctg 1200
 ttagagctgc cgaagcaggc ctggcaccaa aaacccatag tgcttattag ttacgcgtgg 1260
 gtattgtatt tcagtcagca aggcgcgcga gcagagaagt taattaaaga cctatcttca 1320
 caatccgata aaaaaataa atggcaagaa aaggaatggc tgcagcttgt gcttgcaata 1380
 ggtaaagcaa ccaaagatga aatgctttcg agtgaggagc tctgtaataa gtggattagt 1440
 ttattggggg attcaaacgc agttggaaaa ggggccgcgc taacctgttt ggcttttatt 1500
 ttgccagtg agtatagatt tgcagagttg gagaagggtc tggctcaggc ccaagccgtg 1560
 aataaatttg caaaacaaaa tttgctttt ggttggctgt atgtcgcgag gtttcaacaa 1620
 gccctagcaa gcggaaaaat gggctgggcg aggcagatta taactcaagc acgcacagac 1680
 agtcgcgcgc agatgatgga atccgagttt acttcgaaaa tgttgacgc tctagagctt 1740
 gagttacatt atgaattgcg ctgcttggac acctcagaag aaaagctctc caaaatttta 1800
 gagttcattt ccaatcacgg ggtgacagac gtgtttttt ccgtatgccg tgctgtgtca 1860
 gcttggcggc ttggaaggag tgacctaaat ggctccattg agatattgga gtgggcgaag 1920
 gcgcatgcgg ttgaaaaaaa tctaccaaga ttggaagtta tgagccaaat tgagatctat 1980
 cagcgcttag tctgtcaagg cataacgggc ataaataatt taaaaactct tgaagatcat 2040
 aagattttct cggacagca ctacagcccc ctaaaagcac gcctgctgct tgttcaatca 2100
 ctagtgtttt cccgagatcg gaactttcat agtgccgcgc acagagcgtt attggctatt 2160
 cagcaagccc gtaaaattaa cgcgggccag ctggaagtcc gtggattatt gtgtttggcc 2220
 ggagcgcagg caggtgccgg tgatttaaaa aaggctcagc ttaacattgt ttatgcagtg 2280
 gagatagcaa aacagcttca atgctttcaa acagttcttg atgaagtatg ttaattgag 2340
 cgaataatac cggcttcatt tgaagccttc acagcagtta atttagatca agcgattggg 2400
 gcttttagtc ttccgcgaat agttgagatt ggaaagtccg cagagaataa agctgacgct 2460
 ttattgacac ggaagcagat tgctgtcttg aggcttgtaa aagaggggtg ctcaaacaaa 2520
 caaatagcaa caaatatgca tgtcaccgaa gatgctataa agtggcatat gaggaaaata 2580
 ttgccacct tgaatgtagt gaatcgcacg caagcaacaa ttgaagctga gcgtcaagga 2640
 attatctaa 2649

< 211> 1158
 < 212> ADN
 < 213> Pseudomonas putida

5 <400> 7

atggcaatcg ttgtgttgg cgctgggtaca gctggagtaa atgctgcgtt ctggcttcgt 60
caatatgggt ataaagggga aattaggatt ttagcaggg agtctgtggc gccttatcag 120
cggcctctc tatccaaggc tttctgaca agtgagattg cagaatccgc agtgccatta 180
aagccagaag gttttatc gaataacaat attaccattt cgtaaatac accgattgta 240
tcaatcgacg tggggcgtaa gatagttct tctaaagatg gaaaagaata cgcgtatgaa 300
aaattgattc ttgaacacc tgctagcgca cgtaggttaa cctgcgaggg gtctgaactg 360
tctgggtct gctatttac cagtatggaa gacgcaaaa attacgtag gaaactgtg 420
gagagtgcgt ctgtgttgt gtggggcggc ggagtaatcg ggcttgaagt cgcctcagct 480
gcggtgggt tagggaagag ggtcacagt atagaagcca cccgcgtgt aatggcgcgc 540
gtggttacgc cggcagcagc aaactagtc agagcccgcc tggaggctga aggaattgag 600
ttcaagctga atgcgaaatt aacgtctata aagggcagga atggccatgt tgaacaatgc 660
gtactgaaa gtggagaaga aatcaggcg gatctgattg tagttggaat cgggtctatc 720
ccagagctag agctggcaac tgaggcggcc ctgaagtga gtaatggtgt tgtggtcgat 780
gatcagatgt gtacatcgga tacaagtata tatgcaatcg gcgactgcgc aatggctaga 840
aatcctttt gggaacgat ggtacgtta gagacaattc ataatgcgtt tacacacgct 900
caaattgtcg caagtagcat ctgtggcaca tcaacaccag caccaacccc accacggttc 960
tggctgac ttaaagggat ggcgtgcaa ggacttggtg ctctaaagga ctacgataaa 1020
ctcgttgtg caattaataa cgaaactctt gaactagaag tccttgcgta caagcaggag 1080
cgactgattg caactgagac aataaatttg cctaaacgtc aaggtgcgt tgcagggagt 1140
ataaaattac ctgattag 1158

10

<210> 8
 < 211> 33
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial

15

<220>
 < 223> Cebador

20

<400> 8
 acgtagcggc cgcctaatac ggtaatttta tac
 <210> 9
 < 211> 16

33

< 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 < 223> Cebador

 <400> 9

 gagcgagcta tctggt 16
 10
 <210> 10
 < 211> 32
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 < 223> Cebador

 <400> 10
 20
 tcgtagcggc cgcccagcag acgacggagc aa 32

 <210> 11
 < 211> 37
 25 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial

 <220>
 < 223> Cebador
 30
 <400> 11

 attttatctt ctgaggctt ttctcgtag agcacat 37
 35
 <210> 12
 < 211> 38
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 40
 < 223> Cebador
 <400> 12

 tgctctaacg aggaaaagcc tcgagaagat aaaatgta 38
 45
 <210> 13
 < 211> 34
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 < 223> Cebador

 <400> 13
 55
 attgacgcgg ccgcttacat gcagacagct atca 34

 <210> 14
 < 211> 42
 60 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial

 <220>
 < 223> Cebador

<400> 14

5 cgaggagctc aggaggatcc aagcatgcag aagcaacgta cg 42

<210> 15
< 211> 31
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

10 <220>
< 223> Cebador

15 <400> 15

gtcatgtacc cctaagccag cccgcgcgcc t 31

<210> 16
< 211> 41
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

20 <220>
< 223> Cebador

25 <400> 16

acctatctag aaggaggacg catatgatca taggggttcc t 41

30 <210> 17
< 211> 26
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

35 <220>
< 223> Cebador

<400> 17

40 aacctctgca gtaagcacc cgccac 26

<210> 18
< 211> 1853
< 212> ADN
< 213> Pseudomonas fluorescens

45 <400> 18

atgggtgtgt atgactacaa aaacttcggc acggcggatt ccaaggcgtt gtcagcgat 60

gccatggcga tcacgctgta ttctaccac aacctcgata acggtttgc cgccggttat 120

agcacaacgg tttggcctt ggctgcccgc cgacgctggt cacggcggtg ctcggcggtta 180

ccgattccca gggcgctatc cccggcattc cgtggaatcc cgattcggaa aaactcgccc 240

tcgaagccgt gaaaaaggcc ggctggacgc cgatcacggc ctcgcaactg ggctacgacg 300

50

gcaagaccga cgcacgcgga acctctttg gcgagaaggc cggttactcg acagcgcagg 360
 tcgagattct cggcaagtac gacgcccagg gccatctcac agaaatcggc atcgcccttc 420
 gcggcaccag cggcccgcgc gagaacctga tccttgattc catcggcgac gtgatcaacg 480
 acttgctcgc cgcgttcggc cccaaggatt acgccaagaa ctacgtcggc gaagcgttcg 540
 gcaacctgct caatgacgtg gtcgccttg ccaaggccaa tggcctcagc ggcaaggacg 600
 tgctggtcag cggccacagc ctcgggcggc tggcgggtcaa cagcatggcg gatttgagcg 660
 gcggcaagtg gggcgggttc ttcgccgact ccaactacat cgcctatgcc tcgccgaccc 720
 agagcagcac cgacaaagtg ctcaacgtcg gctacgagaa cgaccgggtg ttccgcgccc 780
 tcgacgggtc gaatttcacc ggcgcctcga ttggcgtgca cgacgcgccg aaggaatcgg 840
 ccaccgacaa catcgtcagc ttcaacgac actacgcctc gacggcggtg aatctgctgc 900
 cgttciccat cctcaacatc ccgacctgga tctcgcacct gccaacctgt tacggcgacg 960
 gcatgaaccg ggtgatcgag tcgaagtct acgacctgac cagcaaggac tcgacgatca 1020
 tcgtcgccaa cctgtcggat ccggcgcggg ccaacacctg ggtgcaggat ctcaaccgca 1080
 acgccgaaac ccacaagggc agcaccttca tcacggcag cgacgccaac gatctgattc 1140
 agggctggcag cggcaatgac tatctggaag gtcgcgcggc caacgacacc ttctcgacaa 1200
 gcggcggtta caacatcatc ctgggcgggc agggcagcaa tacgctggac ttgcagaagt 1260
 cgggtgaatac ctctgacttc gccaacgacg gcgccggcaa tctgtacatt cgcgatgcca 1320
 acggcgggat cagcatcacc cgcgacatcg gcgccatcgt caccaaagag ccgggcttcc 1380
 tctgggtgtt gttcaaggac gacgtgaccc acagcgtcac ggccagtggc ttgaaggctg 1440
 gcaacaacct gaccgcctac gagtcgagcg tgaagggcag caacggcgcc gacacgtca 1500
 aggcgatgc cggcggcgac tgggtgttcg gcctcgacgg caacgatcat ctgatcgcg 1560
 gggcgggcaa cgatgtgtt gttggcggcg ccggtaacga tctgatggag tccgggggcg 1620
 gggcggtac gttcctgttc aacggcgctt tcggccagga tcgggtgggt ggattcacgt 1680
 ccaacgacaa actggtgtt ctggcgctgc aggggtgtgt gcctggcgat gacttccgag 1740
 cgcgtgcctc ggcagccggg caggataccg tgctgaagtt cggcggcgat tcggtgacat 1800
 tggttggcgt ttcgctgggg agtttgagt gcgatggaat tgtgatcgcc tga 1853

- 5 <210> 19
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida W619
 10 <400> 19

Met Ser Lys Ser Leu Thr Trp Ala Arg Gly Ser Gly Arg Arg Leu Ile
1 5 10 15

Ser Leu Val Leu Arg Tyr Leu Lys Ile Arg Asn Val Val Phe Phe Arg
20 25 30

Leu Tyr Pro Arg Ala Asn Leu Ala Ala Thr Thr Ser Ile Val Ala Tyr
35 40 45

Ser Phe Phe Glu Glu Pro Pro Met Asn Met Pro Glu Thr Ala Pro Ala
50 55 60

Gly Ile Ala Ser Gln Leu Lys Leu Asp Ala His Trp Met Pro Tyr Thr
65 70 75 80

Ala Asn Arg Asn Phe His Arg Asp Pro Arg Leu Ile Val Ala Ala Glu
85 90 95

Gly Asn Tyr Leu Val Asp Asp Lys Gly Arg Arg Ile Phe Asp Ala Leu
100 105 110

Ser Gly Leu Trp Thr Cys Gly Ala Gly His Thr Arg Lys Glu Ile Thr
115 120 125

Glu Ala Val Ala Arg Gln Leu Gly Thr Leu Asp Tyr Ser Pro Ala Phe
130 135 140

Gln Phe Gly His Pro Leu Ser Phe Gln Leu Ala Glu Lys Ile Thr Ala
145 150 155 160

Leu Thr Pro Gly Asp Leu Asn His Val Phe Tyr Thr Asn Ser Gly Ser
165 170 175

Glu Cys Ala Asp Thr Ala Leu Lys Met Val Arg Ala Tyr Trp Arg Leu
180 185 190

Lys Gly Gln Ala Thr Lys Thr Lys Ile Ile Gly Arg Ala Arg Gly Tyr
195 200 205

His Gly Val Asn Ile Ala Gly Thr Ser Leu Gly Gly Val Asn Gly Asn
210 215 220

Arg Lys Met Phe Gly Gln Leu Leu Asp Val Asp His Leu Pro His Thr
225 230 235 240

Val Leu Pro Val Asn Ala Phe Ser Lys Gly Leu Pro Glu Glu Gly Gly
245 250 255

Ile Ala Leu Ala Asp Glu Met Leu Lys Leu Ile Glu Leu His Asp Ala
260 265 270

Ser Asn Ile Ala Ala Val Ile Val Glu Pro Leu Ala Gly Ser Ala Gly
275 280 285

Val Leu Pro Pro Pro Lys Gly Tyr Leu Lys Arg Leu Arg Glu Ile Cys
290 295 300

Thr Gln His Asn Ile Leu Leu Ile Phe Asp Glu Val Ile Thr Gly Phe
305 310 315 320

Gly Arg Met Gly Ala Met Thr Gly Ala Glu Ala Phe Gly Val Thr Pro
325 330 335

Asp Leu Met Cys Ile Ala Lys Gln Val Thr Asn Gly Ala Ile Pro Met
340 345 350

Gly Ala Val Ile Ala Ser Ser Glu Ile Tyr Gln Thr Phe Met Asn Gln
355 360 365

Pro Thr Pro Glu Tyr Ala Val Glu Phe Pro His Gly Tyr Thr Tyr Ser
370 375 380

Ala His Pro Val Ala Cys Ala Ala Gly Ile Ala Ala Leu Asp Leu Leu
385 390 395 400

Gln Arg Glu Asn Leu Val Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Pro His Phe
405 410 415

Glu Lys Leu Leu His Gly Val Lys Gly Thr Lys Asn Val Val Asp Ile
420 425 430

Arg Asn Tyr Gly Leu Ala Gly Ala Ile Gln Ile Ala Ala Arg Asp Gly
435 440 445

Asp Ala Ile Val Arg Pro Tyr Glu Val Ala Met Lys Leu Trp Lys Ala
450 455 460

Gly Phe Tyr Val Arg Phe Gly Gly Asp Thr Leu Gln Phe Gly Pro Thr
465 470 475 480

Phe Asn Thr Thr Pro Gln Gln Leu Asp Arg Leu Phe Asp Ala Val Gly
485 490 495

Glu Asn Leu Asn Leu Ile Asp
500

<210> 20

< 211> 460

5 < 212> PRT

< 213> Pseudomonas aeruginosa PA01

<400> 20

Met Thr Ala Gln Leu Asn Pro Gln Arg Asp Thr Arg Asp Tyr Gln Gln
1 5 10 15

Leu Asp Ala Ala His His Ile His Ala Phe Leu Asp Gln Lys Ala Leu
20 25 30

Asn Arg Glu Gly Pro Arg Val Met Val Arg Gly Asp Gly Leu Gln Leu
35 40 45

Trp Asp Asn Asp Gly Lys Arg Tyr Leu Asp Gly Met Ser Gly Leu Trp
50 55 60

Cys Thr Asn Leu Gly Tyr Gly Arg Gln Asp Leu Ala Ala Ala Ala Ser
65 70 75 80

Arg Gln Leu Glu Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Phe Phe His Thr Thr
85 90 95

His Pro Ala Val Val Glu Leu Ser Glu Met Leu Phe Ser Leu Leu Pro
100 105 110

Asp His Tyr Ser His Ala Ile Tyr Thr Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn
115 120 125

Glu Val Leu Ile Arg Thr Val Arg Arg Tyr Trp Gln Ile Leu Gly Lys
130 135 140

Pro Gln Lys Lys Ile Met Ile Gly Arg Trp Asn Gly Tyr His Gly Ser
145 150 155 160

Thr Leu Gly Ser Thr Ala Leu Gly Gly Met Lys Phe Met His Glu Met
165 170 175

Gly Gly Met Leu Pro Asp Phe Ala His Ile Asp Glu Pro Tyr Trp Tyr

180	185	190
Ala Asn Gly Gly Glu Leu Ser Pro Ala Glu Phe Gly Arg Arg Ala Ala		
195	200	205
Leu Gln Leu Glu Glu Lys Ile Leu Glu Leu Gly Ala Glu Asn Val Ala		
210	215	220
Ala Phe Val Ala Glu Pro Phe Gln Gly Ala Gly Gly Met Ile Phe Pro		
225	230	240
Pro Gln Ser Tyr Trp Pro Glu Ile Gln Arg Ile Cys Arg Gln Tyr Asp		
245	250	255
Val Leu Leu Cys Ala Asp Glu Val Ile Gly Gly Phe Gly Arg Thr Gly		
260	265	270
Glu Trp Phe Ala His Glu His Phe Gly Phe Gln Pro Asp Thr Leu Ser		
275	280	285
Ile Ala Lys Gly Leu Thr Ser Gly Tyr Ile Pro Met Gly Gly Leu Val		
290	295	300
Leu Gly Lys Arg Ile Ala Glu Val Leu Val Glu Gln Gly Gly Val Phe		
305	310	320
Ala His Gly Leu Thr Tyr Ser Gly His Pro Val Ala Ala Val Ala		
325	330	335
Ile Ala Asn Leu Lys Ala Leu Arg Asp Glu Gly Val Val Thr Arg Val		
340	345	350
Arg Glu Glu Thr Gly Pro Tyr Leu Gln Arg Cys Leu Arg Glu Val Phe		
355	360	365
Gly Asp His Pro Leu Val Gly Glu Val Gln Gly Ala Gly Phe Val Ala		

370 375 380

Ala Leu Gln Phe Ala Glu Asp Lys Val Thr Arg Lys Arg Phe Ala Asn
385 390 395 400

Glu Asn Asp Leu Ala Trp Arg Cys Arg Thr Ile Gly Phe Glu Glu Gly
405 410 415

Val Ile Ile Arg Ser Thr Leu Gly Arg Met Ile Met Ala Pro Ala Leu
420 425 430

Val Ala Gly Arg Ala Glu Ile Asp Glu Leu Ile Asp Lys Thr Arg Ile
435 440 445

Ala Val Asp Arg Thr Ala Arg Glu Ile Gly Val Leu
450 455 460

<210> 21
< 211> 448
5 < 212> PRT
< 213> Pseudomonas aeruginosa PA01

<400> 21

Met Asn Gln Pro Leu Asn Val Ala Pro Pro Val Ser Ser Glu Leu Asn
1 5 10 15

Leu Arg Ala His Trp Met Pro Phe Ser Ala Asn Arg Asn Phe Gln Lys
20 25 30

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

Lys Gly Arg Lys Val Tyr Asp Ser Leu Ser Gly Leu Trp Thr Cys Gly
50 55 60

Ala Gly His Ser Arg Lys Glu Ile Gln Glu Ala Val Ala Arg Gln Leu
65 70 75 80

10

Gly Thr Leu Asp Tyr Ser Pro Gly Phe Gln Tyr Gly His Pro Leu Ser
85 90 95

Phe Gln Leu Ala Glu Lys Ile Ala Gly Leu Leu Pro Gly Glu Leu Asn
100 105 110

His Val Phe Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Cys Ala Asp Thr Ser Ile
115 120 125

Lys Met Ala Arg Ala Tyr Trp Arg Leu Lys Gly Gln Pro Gln Lys Thr
130 135 140

Lys Leu Ile Gly Arg Ala Arg Gly Tyr His Gly Val Asn Val Ala Gly
145 150 155 160

Thr Ser Leu Gly Gly Ile Gly Gly Asn Arg Lys Met Phe Gly Gln Leu
165 170 175

Met Asp Val Asp His Leu Pro His Thr Leu Gln Pro Gly Met Ala Phe
180 185 190

Thr Arg Gly Met Ala Gln Thr Gly Gly Val Glu Leu Ala Asn Glu Leu
195 200 205

Leu Lys Leu Ile Glu Leu His Asp Ala Ser Asn Ile Ala Ala Val Ile
210 215 220

Val Glu Pro Met Ser Gly Ser Ala Gly Val Leu Val Pro Pro Val Gly
225 230 235 240

Tyr Leu Gln Arg Leu Arg Glu Ile Cys Asp Gln His Asn Ile Leu Leu
245 250 255

Ile Phe Asp Glu Val Ile Thr Ala Phe Gly Arg Leu Gly Thr Tyr Ser
260 265 270

Gly Ala Glu Tyr Phe Gly Val Thr Pro Asp Leu Met Asn Val Ala Lys
275 280 285

Gln Val Thr Asn Gly Ala Val Pro Met Gly Ala Val Ile Ala Ser Ser
290 295 300

Glu Ile Tyr Asp Thr Phe Met Asn Gln Ala Leu Pro Glu His Ala Val
305 310 315 320

Glu Phe Ser His Gly Tyr Thr Tyr Ser Ala His Pro Val Ala Cys Ala
325 330 335

Ala Gly Leu Ala Ala Leu Asp Ile Leu Ala Arg Asp Asn Leu Val Gln
340 345 350

Gln Ser Ala Glu Leu Ala Pro His Phe Glu Lys Gly Leu His Gly Leu
355 360 365

Gln Gly Ala Lys Asn Val Ile Asp Ile Arg Asn Cys Gly Leu Ala Gly
370 375 380

Ala Ile Gln Ile Ala Pro Arg Asp Gly Asp Pro Thr Val Arg Pro Phe
385 390 395 400

Glu Ala Gly Met Lys Leu Trp Gln Gln Gly Phe Tyr Val Arg Phe Gly
405 410 415

Gly Asp Thr Leu Gln Phe Gly Pro Thr Phe Asn Ala Arg Pro Glu Glu
420 425 430

Leu Asp Arg Leu Phe Asp Ala Val Gly Glu Ala Leu Asn Gly Ile Ala
435 440 445

<210> 22

< 211> 444

5 < 212> PRT

< 213> Pseudomonas aeruginosa PA01

<400> 22

Met Thr Met Asn Asp Glu Pro Gln Ser Ser Ser Leu Asp Asn Phe Trp
1 5 10 15

Met Pro Phe Thr Ala Asn Arg Gln Phe Lys Ala Arg Pro Arg Leu Leu
20 25 30

Glu Ser Ala Glu Gly Ile His Tyr Ile Ala Gln Gly Gly Arg Arg Ile
35 40 45

Leu Asp Gly Thr Ala Gly Leu Trp Cys Cys Asn Ala Gly His Gly Arg
50 55 60

Arg Glu Ile Ser Glu Ala Val Ala Arg Gln Ile Ala Thr Leu Asp Tyr
65 70 75 80

Ala Pro Pro Phe Gln Met Gly His Pro Leu Pro Phe Glu Leu Ala Ala
85 90 95

Arg Leu Thr Glu Ile Ala Pro Pro Ser Leu Asn Lys Val Phe Phe Thr
100 105 110

Asn Ser Gly Ser Glu Ser Ala Asp Thr Ala Leu Lys Ile Ala Leu Ala
115 120 125

Tyr Gln Arg Ala Ile Gly Gln Gly Thr Arg Thr Arg Leu Ile Gly Arg
130 135 140

Glu Leu Gly Tyr His Gly Val Gly Phe Gly Gly Leu Ser Val Gly Gly
145 150 155 160

Met Val Asn Asn Arg Lys Ala Phe Ser Ala Asn Leu Leu Pro Gly Val
165 170 175

Asp His Leu Pro His Thr Leu Asp Val Ala Arg Asn Ala Phe Thr Val
180 185 190

Gly Leu Pro Glu His Gly Val Glu Lys Ala Glu Glu Leu Glu Arg Leu
195 200 205

Val Thr Leu His Gly Ala Glu Asn Ile Ala Ala Val Ile Val Glu Pro
210 215 220

Met Ser Gly Ser Ala Gly Val Val Leu Pro Pro Lys Gly Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Arg Leu Arg Glu Ile Thr Arg Lys His Gly Ile Leu Leu Ile Phe Asp
245 250 255

Glu Val Ile Thr Gly Phe Gly Arg Val Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gln
260 265 270

Arg Trp Gly Val Val Pro Asp Leu Leu Thr Cys Ala Lys Gly Leu Thr
275 280 285

Asn Gly Ser Ile Pro Met Gly Ala Val Phe Val Asp Glu Lys Ile His
290 295 300

Ala Ala Phe Met Gln Gly Pro Gln Gly Ala Ile Glu Phe Phe His Gly
305 310 315 320

Tyr Thr Tyr Ser Gly His Pro Val Ala Cys Ala Ala Ala Leu Ala Thr
325 330 335

Leu Asp Ile Tyr Arg Arg Asp Asp Leu Phe Gln Arg Ala Val Glu Leu
340 345 350

Glu Gly Tyr Trp Gln Asp Ala Leu Phe Ser Leu Arg Asp Leu Pro Asn
355 360 365

Val Val Asp Ile Arg Ala Val Gly Leu Val Gly Gly Val Gln Leu Ala
370 375 380

Pro His Ala Asp Gly Pro Gly Lys Arg Gly Tyr Asp Val Phe Glu Arg
385 390 395 400

Cys Phe Trp Glu His Asp Leu Met Val Arg Val Thr Gly Asp Ile Ile
405 410 415

Ala Met Ser Pro Pro Leu Ile Ile Asp Lys Pro His Ile Asp Gln Ile
420 425 430

Val Glu Arg Leu Ala Gln Ala Ile Arg Ala Ser Val
435 440

<210> 23
< 211> 468
5 < 212> PRT
< 213> Pseudomonas aeruginosa PA01

<400> 23

Met Asn Ala Arg Leu His Ala Thr Ser Pro Leu Gly Asp Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Arg Ala Asp Gln Ala His Tyr Met His Gly Tyr His Val Phe Asp
20 25 30

Asp His Arg Val Asn Gly Ser Leu Asn Ile Ala Ala Gly Asp Gly Ala
35 40 45

Tyr Ile Tyr Asp Thr Ala Gly Asn Arg Tyr Leu Asp Ala Val Gly Gly
50 55 60

Met Trp Cys Thr Asn Ile Gly Leu Gly Arg Glu Glu Met Ala Arg Thr
65 70 75 80

10

Val Ala Glu Gln Thr Arg Leu Leu Ala Tyr Ser Asn Pro Phe Cys Asp
85 90 95

Met Ala Asn Pro Arg Ala Ile Glu Leu Cys Arg Lys Leu Ala Glu Leu
100 105 110

Ala Pro Gly Asp Leu Asp His Val Phe Leu Thr Thr Gly Gly Ser Thr
115 120 125

Ala Val Asp Thr Ala Ile Arg Leu Met His Tyr Tyr Gln Asn Cys Arg
130 135 140

Gly Lys Arg Ala Lys Lys His Val Ile Thr Arg Ile Asn Ala Tyr His
145 150 155 160

Gly Ser Thr Phe Leu Gly Met Ser Leu Gly Gly Lys Ser Ala Asp Arg
165 170 175

Pro Ala Glu Phe Asp Phe Leu Asp Glu Arg Ile His His Leu Ala Cys
180 185 190

Pro Tyr Tyr Tyr Arg Ala Pro Glu Gly Leu Gly Glu Ala Glu Phe Leu
195 200 205

Asp Gly Leu Val Asp Glu Phe Glu Arg Lys Ile Leu Glu Leu Gly Ala
210 215 220

Asp Arg Val Gly Ala Phe Ile Ser Glu Pro Val Phe Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Val Ile Val Pro Pro Ala Gly Tyr His Arg Arg Met Trp Glu Leu Cys
245 250 255

Gln Arg Tyr Asp Val Leu Tyr Ile Ser Asp Glu Val Val Thr Ser Phe
260 265 270

Gly Arg Leu Gly His Phe Phe Ala Ser Gln Ala Val Phe Gly Val Gln
275 280 285

Pro Asp Ile Ile Leu Thr Ala Lys Gly Leu Thr Ser Gly Tyr Gln Pro
290 295 300

Leu Gly Ala Cys Ile Phe Ser Arg Arg Ile Trp Glu Val Ile Ala Glu
305 310 315 320

Pro Asp Lys Gly Arg Cys Phe Ser His Gly Phe Thr Tyr Ser Gly His
325 330 335

Pro Val Ala Cys Ala Ala Ala Leu Lys Asn Ile Glu Ile Ile Glu Arg
340 345 350

Glu Gly Leu Leu Ala His Ala Asp Glu Val Gly Arg Tyr Phe Glu Glu
355 360 365

Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asp Leu Pro Ile Val Gly Asp Val Arg Gly
370 375 380

Met Arg Phe Met Ala Cys Val Glu Phe Val Ala Asp Lys Ala Ser Lys
385 390 395 400

Ala Leu Phe Pro Glu Ser Leu Asn Ile Gly Glu Trp Val His Leu Arg
405 410 415

Ala Gln Lys Arg Gly Leu Leu Val Arg Pro Ile Val His Leu Asn Val
420 425 430

Met Ser Pro Pro Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Val Asp Thr Val Val
435 440 445

Arg Val Leu Arg Glu Ser Ile Glu Glu Thr Val Glu Asp Leu Val Arg
450 455 460

Ala Gly His Arg
465

- 5 <210> 24
< 211> 460
< 212> PRT
< 213> Pseudomonas putida W619

- 10 <400> 24

Met Asn Ala Pro Phe Gln Pro Gln Arg Asp Thr Arg Asp Tyr Gln Ala
1 5 10 15

Ser Asp Ala Ala His His Ile His Ala Phe Leu Asp Gln Lys Ala Leu
20 25 30

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

Trp Asp Asn Asp Gly Arg Arg Tyr Leu Asp Gly Met Ser Gly Leu Trp
50 55 60

Cys Thr Gln Leu Gly Tyr Gly Arg Lys Asp Leu Thr Ala Ala Ala Ala
65 70 75 80

Ala Gln Met Asp Gln Leu Ala Tyr Tyr Asn Met Phe Phe His Thr Thr
85 90 95

His Pro Ala Val Ile Glu Leu Ser Glu Leu Leu Phe Ser Leu Leu Pro
100 105 110

Gly His Tyr Ser His Ala Ile Tyr Thr Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn
115 120 125

Glu Val Leu Ile Arg Thr Val Arg Arg Tyr Trp Gln Val Val Gly Gln
130 135 140

Pro Asn Lys Lys Val Met Ile Gly Arg Trp Asn Gly Tyr His Gly Ser

145	150	155	160
Thr	Leu	Ala	Ala
	165	170	175
Thr	Ala	Leu	Gly
Gly	Met	Lys	Phe
Met	His	Glu	Met
Gly	Gly	Leu	Ile
	180	185	190
Pro	Asp	Val	Ala
His	Ile	Asp	Glu
Pro	Tyr	Trp	Tyr
Ala	Glu	Gly	Gly
	195	200	205
Glu	Leu	Thr	Pro
Ala	Glu	Phe	Gly
Arg	Arg	Cys	Ala
Leu	Gln	Leu	Glu
	210	215	220
Glu	Lys	Ile	Leu
Glu	Leu	Gly	Ala
Glu	Asn	Val	Ala
Gly	Phe	Val	Ala
	225	230	235
Pro	Phe	Gln	Gly
Ala	Gly	Gly	Met
Ile	Phe	Pro	
Pro	Glu	Ser	Tyr
	245	250	255
Trp	Pro	Glu	Ile
Gln	Arg	Ile	Cys
Arg	Gln	Tyr	Asp
Val	Leu	Leu	Cys
	260	265	270
Ala	Asp	Glu	Val
Ile	Gly	Gly	Phe
Gly	Arg	Thr	Gly
Glu	Trp	Phe	Ala
	275	280	285
His	Glu	Tyr	Phe
Gly	Phe	Glu	Pro
Asp	Thr	Leu	Ser
Ile	Ala	Lys	Gly
	290	295	300
Leu	Thr	Ser	Gly
Tyr	Val	Pro	Met
Gly	Gly	Leu	Val
Leu	Ser	Lys	Arg
	305	310	315
Ile	Ala	Glu	Ala
Leu	Val	Glu	Arg
Gly	Gly	Val	Phe
Ala	His	Gly	Leu
	325	330	335
Thr	Tyr	Ser	Gly
His	Pro	Val	Ala
Ala	Ala	Val	Ala
Ile	Ala	Asn	Leu
Lys	Ala	Leu	Arg
Asp	Glu	Gly	Ile
Val	Arg	Gln	Val

340 345 350

Lys Asp Asp Thr Gly Pro Tyr Leu Gln Arg Ile Leu Arg Glu Val Phe
355 360 365

Ala Asn His Pro Leu Ile Gly Gln Val Gln Gly Ala Gly Leu Val Ala
370 375 380

Ala Leu Gln Phe Ala Glu Asp Lys Gly Ser Arg Lys Arg Tyr Ala Asn
385 390 395 400

Glu Asn Asp Leu Ala Trp Gln Cys Arg Thr Tyr Gly Phe Glu Glu Gly
405 410 415

Val Ile Ile Arg Ser Thr Leu Gly Arg Met Ile Met Ala Pro Ala Leu
420 425 430

Val Ala Thr His Gly Glu Leu Asp Glu Leu Val Asp Lys Thr Arg Ile
435 440 445

Ala Val Asp Arg Thr Ala Arg Gly Leu Gly Ile Leu
450 455 460

<210> 25
< 211> 459
5 < 212> PRT
< 213> Pseudomonas putida KT2440

<400> 25

Met Ser Thr His Ser Ser Thr Val Gln Asn Asp Leu Ala Ala Leu Ile
1 5 10 15

His Pro Asn Thr Asn Leu Ala Gln His Arg Glu Val Gly Pro Leu Val
20 25 30

Ile Ala Arg Gly Asp Gly Val Arg Val Phe Asp Glu Gln Gly Asn Ala
35 40 45

10

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

Glu Gln Arg Leu Val Asp Ala Ala Val Glu Gln Phe Lys Gln Leu Pro
65 70 75 80

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

Ala Ala Lys Leu Ala Ala Leu Ala Pro Gly Asp Leu Asn His Val Phe
100 105 110

Phe Thr Asn Ser Gly Ser Glu Ala Asn Asp Ser Val Val Lys Met Val
115 120 125

Trp Tyr Val Asn Asn Ala Leu Gly Arg Pro Ala Lys Lys Lys Phe Ile
130 135 140

Ser Arg Gln Gln Ala Tyr His Gly Ala Thr Val Ala Ala Ala Ser Leu
145 150 155 160

Thr Gly Ile Pro Ser Met His Arg Asp Phe Asp Leu Pro Ala Ile Pro
165 170 175

Val His His Leu Thr Cys Pro Asn Phe Tyr Arg Phe Ala Arg Pro Gly
180 185 190

Glu Ser Gln Glu Ala Phe Thr Val Arg Leu Ala Asn Glu Leu Glu Arg
195 200 205

Tyr Ile Leu Ala Glu Gly Pro Glu Thr Ile Ala Ala Phe Ile Gly Glu
210 215 220

Pro Val Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Pro Pro Pro Thr Gly Tyr Trp
225 230 235 240

Ala Ala Ile Gln Ala Val Cys Lys Arg Tyr Asp Ile Leu Val Val Ile
245 250 255

Asp Glu Ile Ile Thr Gly Phe Gly Arg Leu Gly Thr Met Phe Gly Ser
260 265 270

Gln Leu Tyr Gly Ile Gln Pro Asp Ile Met Val Leu Ser Lys Gln Leu
275 280 285

Thr Ser Ser Tyr Gln Pro Leu Ala Ala Val Val Val Ser Asp Ala Met
290 295 300

Asn Asp Val Leu Val Ser Gln Ser Gln Arg Leu Gly Ala Phe Ala His
305 310 315 320

Gly Leu Thr Cys Thr Gly His Pro Val Ala Thr Ala Val Ala Leu Glu
325 330 335

Asn Ile Arg Ile Ile Glu Glu Arg Asp Leu Val Gly His Val Gln His
340 345 350

Leu Ala Pro Val Phe Gln Arg His Leu Arg Ala Phe Glu Asp His Pro
355 360 365

Leu Val Gly Asn Val Arg Gly Val Gly Leu Met Gly Gly Ile Glu Leu
370 375 380

Val Ala Asp Lys Ala Thr Arg Gln Pro Phe Ala Gln Pro Gly Thr Leu
385 390 395 400

Gly Gly Tyr Val Phe Lys Gln Ala His Lys His Gly Leu Ile Ile Arg
405 410 415

Ala Ile Tyr Asp Thr Ile Ala Phe Cys Pro Pro Leu Ile Thr Thr Gln
420 425 430

Asp Asp Ile Glu Ala Ile Phe Ser Ala Phe Glu Arg Thr Leu Ala Asp
435 440 445

Ala Thr Asp Trp Ala Arg Ser Gln His Leu Leu
450 455

5 <210> 26
<211> 490
<212> PRT

< 213> Pseudomonas putida W619

<400> 26

Met Arg Ile Ser Ser Val Ser Ser Ala Pro Gly Ser Val Ser Ser Cys
1 5 10 15

Cys Leu Leu Cys Asp Gln Pro Leu Arg Pro Pro Ala Gly Gly Leu Trp
20 25 30

Thr Leu Glu Lys His Met Ser Val Lys Asn Pro Gln Thr Arg Asp Trp
35 40 45

Gln Thr Leu Ser Gly Glu His His Leu Ala Pro Phe Ser Asp Tyr Lys
50 55 60

Gln Leu Lys Glu Lys Gly Pro Arg Ile Ile Thr Lys Ala Gln Gly Val
65 70 75 80

His Leu Trp Asp Ser Glu Gly His Lys Ile Leu Asp Gly Met Ala Gly
85 90 95

Leu Trp Cys Val Ala Val Gly Tyr Gly Arg Glu Glu Leu Val Gln Ala
100 105 110

Ala Glu Lys Gln Met Arg Glu Leu Pro Tyr Tyr Asn Leu Phe Phe Gln
115 120 125

5

Thr Ala His Pro Pro Ala Leu Glu Leu Ala Lys Ala Ile Thr Asp Val
130 135 140

Ala Pro Glu Gly Met Thr His Val Phe Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu
145 150 155 160

Gly Asn Asp Thr Val Leu Arg Met Val Arg His Tyr Trp Ala Leu Lys
165 170 175

Gly Lys Pro Gln Lys Gln Thr Ile Ile Gly Arg Ile Asn Gly Tyr His
180 185 190

Gly Ser Thr Val Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Met Ser Gly Met His
195 200 205

Glu Gln Gly Gly Leu Pro Ile Pro Gly Ile Val His Ile Pro Gln Pro
210 215 220

Tyr Trp Phe Gly Glu Gly Gly Asp Met Ser Pro Asp Asp Phe Gly Val
225 230 235 240

Trp Ala Ala Glu Gln Leu Glu Lys Lys Ile Leu Glu Val Gly Glu Asp
245 250 255

Asn Val Ala Ala Phe Ile Ala Glu Pro Ile Gln Gly Ala Gly Gly Val
260 265 270

Ile Ile Pro Pro Glu Thr Tyr Trp Pro Lys Val Lys Glu Ile Leu Ala
275 280 285

Lys Tyr Asp Ile Leu Phe Val Ala Asp Glu Val Ile Cys Gly Phe Gly
290 295 300

Arg Thr Gly Glu Trp Phe Gly Ser Asp Tyr Tyr Asp Leu Lys Pro Asp
305 310 315 320

Leu Met Thr Ile Ala Lys Gly Leu Thr Ser Gly Tyr Ile Pro Met Gly
325 330 335

Gly Val Ile Val Arg Asp Lys Val Ala Lys Val Leu Ser Glu Gly Gly
340 345 350

Asp Phe Asn His Gly Phe Thr Tyr Ser Gly His Pro Val Ala Ala Ala
355 360 365

Val Gly Leu Glu Asn Leu Arg Ile Leu Arg Glu Glu Lys Ile Val Glu
370 375 380

Lys Val Arg Thr Glu Val Ala Pro Tyr Leu Gln Lys Arg Leu Arg Glu
385 390 395 400

Leu Gln Asp His Pro Leu Val Gly Glu Val Arg Gly Leu Gly Leu Leu
405 410 415

Gly Ala Ile Glu Leu Val Lys Asp Lys Ala Ser Arg Ser Arg Tyr Glu
420 425 430

Gly Lys Gly Val Gly Met Val Cys Arg Asn Phe Cys Phe Asp Asn Gly
435 440 445

Leu Ile Met Arg Ala Val Gly Asp Thr Met Ile Ile Ala Pro Pro Leu
450 455 460

Val Ile Ser His Ala Glu Val Asp Glu Leu Val Glu Lys Ala Arg Lys
465 470 475 480

Cys Leu Asp Leu Thr Leu Glu Ala Ile Arg
485 490

<210> 27

< 211> 457

5 < 212> PRT

< 213> Streptomyces coelicolor A3(2)

<400> 27

Met Ser Thr Asp Ser Pro Lys Asp Leu Ser Arg Thr Ala Tyr Asp His
1 5 10 15

Leu Trp Met His Phe Thr Arg Met Ser Ser Tyr Glu Asn Ala Pro Val
20 25 30

Pro Thr Ile Val Arg Gly Glu Gly Thr His Ile Tyr Asp Asp Lys Gly
35 40 45

Arg Arg Tyr Leu Asp Gly Leu Ala Gly Leu Phe Val Val Gln Ala Gly
50 55 60

His Gly Arg Gln Glu Leu Ala Glu Thr Ala Ser Lys Gln Ala Gln Glu
65 70 75 80

Leu Ala Phe Phe Pro Val Trp Ser Tyr Ala His Pro Lys Ala Val Glu
85 90 95

Leu Ala Glu Arg Leu Ala Asn Glu Ala Pro Gly Asp Leu Asn Lys Val
100 105 110

Phe Phe Thr Thr Gly Gly Gly Glu Ala Val Glu Thr Ala Trp Lys Leu
115 120 125

Ala Lys Gln Tyr Phe Lys Leu Thr Gly Lys Pro Thr Lys Tyr Lys Val
130 135 140

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

Ile Thr Gly Leu Pro Ala Leu Lys Ala Pro Phe Glu Pro Leu Val Pro
165 170 175

Gly Ala His Lys Val Pro Asn Thr Asn Ile Tyr Arg Ala Pro Ile His
180 185 190

Gly Asp Asp Pro Glu Ala Tyr Gly Arg Trp Ala Ala Asp Gln Ile Glu
195 200 205

Gln Gln Ile Leu Phe Glu Gly Pro Glu Thr Val Ala Ala Val Phe Leu
210 215 220

Glu Pro Val Gln Asn Ala Gly Gly Cys Phe Pro Pro Pro Pro Gly Tyr
225 230 235 240

Phe Gln Arg Val Arg Glu Ile Cys Asp Gln Tyr Asp Val Leu Leu Val
245 250 255

Ser Asp Glu Val Ile Cys Ala Phe Gly Arg Leu Gly Thr Thr Phe Ala
260 265 270

Cys Asp Lys Phe Gly Tyr Val Pro Asp Met Ile Thr Cys Ala Lys Gly
275 280 285

Met Thr Ser Gly Tyr Ser Pro Ile Gly Ala Cys Val Ile Ser Asp Arg
290 295 300

Leu Ala Glu Pro Phe Tyr Lys Gly Asp Asn Thr Phe Leu His Gly Tyr
305 310 315 320

Thr Phe Gly Gly His Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Ile Ala Asn Leu
325 330 335

Asp Leu Phe Glu Arg Glu Gly Leu Asn Gln His Val Leu Asp Asn Glu
340 345 350

Gly Ala Phe Arg Ala Thr Leu Glu Lys Leu His Asp Leu Pro Ile Val
355 360 365

Gly Asp Val Arg Gly Asn Gly Phe Phe Tyr Gly Ile Glu Leu Val Lys
370 375 380

Asp Lys Ala Thr Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Glu Thr Glu Arg Val
385 390 395 400

Leu Tyr Gly Phe Leu Ser Lys Lys Leu Phe Glu Asn Gly Leu Tyr Cys
405 410 415

Arg Ala Asp Asp Arg Gly Asp Pro Val Ile Gln Leu Ala Pro Pro Leu
420 425 430

Ile Ser Asn Gln Glu Thr Phe Asp Glu Ile Glu Gln Ile Leu Arg Ala
435 440 445

Thr Leu Thr Glu Ala Trp Thr Lys Leu
450 455

<210> 28

< 211> 459

< 212> PRT

< 213> Streptomyces avermitilis MA 4680

<400> 28

Met Gly Asn Pro Ile Ala Val Ser Lys Asp Leu Ser Arg Thr Ala Tyr
1 5 10 15

Asp His Leu Trp Met His Phe Thr Arg Met Ser Ser Tyr Glu Asn Ala
20 25 30

Pro Val Pro Thr Ile Val Arg Gly Glu Gly Thr Tyr Ile Tyr Asp Asp
35 40 45

Lys Gly Lys Arg Tyr Leu Asp Gly Leu Ser Gly Leu Phe Val Val Gln
50 55 60

Ala Gly His Gly Arg Thr Glu Leu Ala Glu Thr Ala Phe Lys Gln Ala

65	70	75	80
Gln Glu Leu Ala Phe Phe Pro Val Trp Ser Tyr Ala His Pro Lys Ala			
	85	90	95
Val Glu Leu Ala Glu Arg Leu Ala Asn Tyr Ala Pro Gly Asp Leu Asn			
	100	105	110
Lys Val Phe Phe Thr Thr Gly Gly Gly Glu Ala Val Glu Thr Ala Trp			
	115	120	125
Lys Leu Ala Lys Gln Tyr Phe Lys Leu Gln Gly Lys Pro Thr Lys Tyr			
	130	135	140
Lys Val Ile Ser Arg Ala Val Ala Tyr His Gly Thr Pro Gln Gly Ala			
	145	150	155
Leu Ser Ile Thr Gly Leu Pro Ala Leu Lys Ala Pro Phe Glu Pro Leu			
	165	170	175
Val Pro Gly Ala His Lys Val Pro Asn Thr Asn Ile Tyr Arg Ala Pro			
	180	185	190
Leu Phe Gly Asp Asp Pro Glu Ala Phe Gly Arg Trp Ala Ala Asp Gln			
	195	200	205
Ile Glu Gln Gln Ile Leu Phe Glu Gly Pro Glu Thr Val Ala Ala Val			
	210	215	220
Phe Leu Glu Pro Val Gln Asn Ala Gly Gly Cys Phe Pro Pro Pro Pro			
	225	230	235
Gly Tyr Phe Gln Arg Val Arg Glu Ile Cys Asp Gln Tyr Asp Val Leu			
	245	250	255
Leu Val Ser Asp Glu Val Ile Cys Ala Phe Gly Arg Leu Gly Thr Met			

260 265 270

Phe Ala Cys Asp Lys Phe Gly Tyr Val Pro Asp Met Ile Thr Cys Ala
275 280 285

Lys Gly Met Thr Ser Gly Tyr Ser Pro Ile Gly Ala Cys Ile Val Ser
290 295 300

Asp Arg Ile Ala Glu Pro Phe Tyr Lys Gly Asp Asn Thr Phe Leu His
305 310 315 320

Gly Tyr Thr Phe Gly Gly His Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Val Ala
325 330 335

Asn Leu Asp Leu Phe Glu Arg Glu Gly Leu Asn Gln His Val Leu Asp
340 345 350

Asn Glu Ser Ala Phe Leu Thr Thr Leu Gln Lys Leu His Asp Leu Pro
355 360 365

Ile Val Gly Asp Val Arg Gly Asn Gly Phe Phe Tyr Gly Ile Glu Leu
370 375 380

Val Lys Asp Lys Ala Thr Lys Glu Thr Phe Thr Asp Glu Glu Ser Glu
385 390 395 400

Arg Val Leu Tyr Gly Phe Val Ser Lys Lys Leu Phe Glu Tyr Gly Leu
405 410 415

Tyr Cys Arg Ala Asp Asp Arg Gly Asp Pro Val Ile Gln Leu Ser Pro
420 425 430

Pro Leu Ile Ser Asn Gln Ser Thr Phe Asp Glu Ile Glu Ser Ile Ile
435 440 445

Arg Gln Val Leu Thr Glu Ala Trp Thr Lys Leu

450 455

- 5 <210> 29
< 211> 450
< 212> PRT
< 213> Streptomyces avermitilis MA 4680

- 10 <400> 29

Met Thr Pro Gln Pro Asn Pro Gln Val Gly Ala Ala Val Lys Ala Ala
1 5 10 15

Asp Arg Ala His Val Phe His Ser Trp Ser Ala Gln Glu Leu Ile Asp
20 25 30

Pro Leu Ala Val Ala Gly Ala Glu Gly Ser Tyr Phe Trp Asp Tyr Asp
35 40 45

Gly Arg Arg Tyr Leu Asp Phe Thr Ser Gly Leu Val Phe Thr Asn Ile
50 55 60

Gly Tyr Gln His Pro Lys Val Val Ala Ala Ile Gln Glu Gln Ala Ala
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Phe Ala Pro Ala Phe Ala Val Glu Ala Arg Ser Glu
85 90 95

Ala Ala Arg Leu Ile Ala Glu Arg Thr Pro Gly Asp Leu Asp Lys Ile
100 105 110

Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ala Asp Ala Ile Glu His Ala Val Arg Met
115 120 125

Ala Arg Ile His Thr Gly Arg Pro Lys Val Leu Ser Ala Tyr Arg Ser
130 135 140

Tyr His Gly Gly Thr Gln Gln Ala Val Asn Ile Thr Gly Asp Pro Arg
145 150 155 160

Arg Trp Ala Ser Asp Ser Ala Ser Ala Gly Val Val His Phe Trp Ala
165 170 175

Pro Tyr Leu Tyr Arg Ser Arg Phe Tyr Ala Glu Thr Glu Gln Gln Glu
180 185 190

Cys Glu Arg Ala Leu Glu His Leu Glu Thr Thr Ile Ala Phe Glu Gly
195 200 205

Pro Gly Thr Ile Ala Ala Ile Val Leu Glu Thr Val Pro Gly Thr Ala
210 215 220

Gly Ile Met Val Pro Pro Pro Gly Tyr Leu Ala Gly Val Arg Glu Leu
225 230 235 240

Cys Asp Lys Tyr Gly Ile Val Phe Val Leu Asp Glu Val Met Ala Gly
245 250 255

Phe Gly Arg Thr Gly Glu Trp Phe Ala Ala Asp Leu Phe Asp Val Thr
260 265 270

Pro Asp Leu Met Thr Phe Ala Lys Gly Val Asn Ser Gly Tyr Val Pro
275 280 285

Leu Gly Gly Val Ala Ile Ser Gly Lys Ile Ala Glu Thr Phe Gly Lys
290 295 300

Arg Ala Tyr Pro Gly Gly Leu Thr Tyr Ser Gly His Pro Leu Ala Cys
305 310 315 320

Ala Ala Ala Val Ala Thr Ile Asn Val Met Ala Glu Glu Gly Val Val
325 330 335

Glu Asn Ala Ala Asn Leu Gly Ala Arg Val Ile Glu Pro Gly Leu Arg
340 345 350

Glu Leu Ala Glu Arg His Pro Ser Val Gly Glu Val Arg Gly Val Gly
355 360 365

Met Phe Trp Ala Leu Glu Leu Val Lys Asp Arg Glu Thr Arg Glu Pro
370 375 380

Leu Val Pro Tyr Asn Ala Ala Gly Glu Ala Asn Ala Pro Met Ala Ala
385 390 395 400

Phe Gly Ala Ala Ala Lys Ala Asn Gly Leu Trp Pro Phe Ile Asn Met
405 410 415

Asn Arg Thr His Val Val Pro Pro Cys Asn Val Thr Glu Ala Glu Ala
420 425 430

Lys Glu Gly Leu Ala Ala Leu Asp Ala Ala Leu Ser Val Ala Asp Glu
435 440 445

Tyr Thr
450

<210> 30

< 211> 446

5 < 212> PRT

< 213> Chromobacterium violaceum ATCC 12472

<400> 30

Met Asn His Pro Leu Thr Thr Arg Ser Glu Phe Asp His Leu Asp Leu
1 5 10 15

Arg Ala His Trp Met Pro Phe Ser Ala Asn Arg Asn Phe Gln Arg Asp
20 25 30

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

10

Gly Arg Arg Ile Phe Asp Ser Leu Ser Gly Leu Trp Cys Cys Gly Ala
50 55 60

Gly His Ser Arg Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ala Tyr Arg Gln Leu Ser
65 70 75 80

Thr Leu Asp Tyr Ser Pro Gly Phe Gln Phe Gly His Pro Leu Ser Phe
85 90 95

Arg Leu Ala Glu Arg Val Ala Ala Met Ala Pro Gly Ala Leu Asn His
100 105 110

Val Phe Phe Thr Asn Ser Gly Ser Glu Cys Ala Asp Thr Ala Val Lys
115 120 125

Met Ala Arg Ala Tyr Trp Arg Leu Lys Gly Gln Ala Ser Lys Thr Lys
130 135 140

Leu Ile Gly Arg Ala Arg Gly Tyr His Gly Val Asn Ile Ala Gly Thr
145 150 155 160

Ser Leu Gly Gly Met Asn Gly Asn Arg Lys Leu Phe Gly Pro Leu Met
165 170 175

Asp Ala Asp His Leu Pro His Thr Leu Leu Pro Ala Asn Ala Phe Ser
180 185 190

Arg Gly Leu Pro Glu Gln Gly Ala Glu Leu Ala Asp Asp Leu Leu Arg
195 200 205

Leu Ile Glu Leu His Asp Ala Ser Asn Ile Ala Ala Val Ile Val Glu
210 215 220

Pro Met Ala Gly Ser Ala Gly Val Ile Val Pro Pro Gln Gly Tyr Leu
225 230 235 240

Gln Arg Leu Arg Glu Ile Cys Thr Gln His Gly Ile Leu Leu Ile Phe
245 250 255

Asp Glu Val Ile Thr Gly Phe Gly Arg Thr Gly Ser Leu Phe Gly Ala
260 265 270

Asp His Phe Gly Val Thr Pro Asp Ile Met Asn Leu Ala Lys Gln Leu
275 280 285

Thr Asn Gly Ala Val Pro Met Gly Ala Val Val Ala Ser Ser Glu Ile
290 295 300

Tyr Asp Ala Phe Met Ala Gln Ala Thr Pro Glu Tyr Ala Val Glu Phe
305 310 315 320

Ala His Gly Tyr Thr Tyr Ser Ala His Pro Val Ala Cys Ala Ala Ala
325 330 335

Leu Ala Ala Leu Asp Val Leu Glu Gln Glu Asn Leu Val Ala Arg Ala
340 345 350

Ala Glu Leu Ala Pro His Phe Glu Arg Gly Ile His Gly Leu Lys Gly
355 360 365

Leu Pro His Val Ile Asp Ile Arg Asn Cys Gly Leu Ala Gly Ala Val
370 375 380

Gln Ile Ala Pro Ser Gly Gly Asp Ala Ile Val Arg Pro Tyr Glu Ala
385 390 395 400

Ala Met Ala Leu Trp Arg Lys Gly Phe Tyr Val Arg Tyr Gly Gly Asp
405 410 415

Ala Leu Gln Phe Gly Pro Pro Phe Thr Ala Thr Pro Gln Glu Leu Asp
420 425 430

Ser Leu Phe Asp Ala Val Gly Glu Thr Leu Ala Lys Leu Ala
435 440 445

5 <210> 31
< 211> 11539
< 212> ADN
< 213> Artificial

10 <220>
< 223> Vector

<400> 31

gaaaaccgcc actgcgccgt taccaccgct gcgttcggtc aaggttctgg accagttgcg 60
 tgagcgcata cgctacttgc attacagttt acgaaccgaa caggcttatg tcaattcgcc 120
 tctcaggcgc cgctggtgcc gctggttgga cgccaagggt gaatccgcct cgataccctg 180
 attactcgct tctgcgccc tctcaggcgg cgatagggga ctggtaaaac ggggattgcc 240
 cagacgcctc ccccgccctc tcaggggcac aaatgcggcc ccaacggggc cacgtagtgg 300
 tgcgttttt gcgttccac cttttcttc ctttccctt taaacctt taggacgtct 360
 acaggccacg taatccgtgg cctgtagagt taaaaaggg acggatttgt tgccattaag 420
 ggacggattt gttgtaaga agggacggat ttgttgtgt aaagggacgg atttgttga 480
 ttgtgggacg cagatacagt gtcccttat acacaaggaa tgcgaacgt ggcctcacc 540
 ccaatggttt acaaaagcaa tgccctggtc gaggccgct atcgctcag tttcaggaa 600
 cagcggatcg ttctggcctg tattagccag gtgaagagga gcgagcctgt caccgatga 660
 gtgatgtatt cagtgcggc ggaggacata gcgacgatgg cgggtgtccc tatcgaatct 720
 tcctacaacc agctcaaaga agcggccctg cgctgaaac ggcgggaagt ccggttaacc 780
 caagagccca atggcaagg gaaaagaccg agtgtgatga ttaccggctg ggtgcaaaca 840
 atcatctacc gggagggtga gggccgtgta gaactcaggt tcaccaaaga catgctgccg 900
 tacctgacgg aactcacaa acagttcacc aaatacgctt tggctgacgt ggccaagatg 960
 gacagcacc acgcgatcag gctttacgag ctgctcatgc aatgggacag catcggccag 1020

5

cgcgaaatag aaattgacca gctgcgaaag tggtttcaac tggaaggccg gtatccctcg 1080
 atcaaggact tcaagttgcg agtgcttgat ccagccgtga cgcagatcaa cgagcacage 1140
 ccgctacagg tggagtgggc gcagcgaaag accggggcgca aggtcacaca tctgtgttc 1200
 agttttggac cgaagaagcc cgccaaggcg gtgggtaagg cccagcgaa gcgcaaggcc 1260
 gggaagattt cagatgctga gatcgcgaaa caggctcgcc ctggtgagac atgggaagcg 1320
 gcccgcgctc gactaacca gatgccgtg gatctggcct agaggccgtg gccaccacgg 1380
 cccggcctgc cttcaggct gcattattga agcattatc aggggtattg tctcatgagc 1440
 ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaaaga gttttagaa acgcaaaaag 1500
 gccatccgtc aggatggcct tctgcttaat ttgatgcctg gcagtttatg gcgggctcc 1560
 tgcccgccac cctccgggccc gttgcttcgc aacgttcaaa tccgctcccg gcggatttgt 1620
 cctactcagg agagcgttca ccgacaaaca acagataaaa cgaaaggccc agtctttcga 1680
 ctgagccttt cgttttattt gatgcctggc agttccctac tctcgcatgg ggagacccca 1740
 cactaccatc ggcgctacgg cgtttcactt ctgagttcgg catgggggtca ggtgggacca 1800
 ccgcgctact gccgccaggc aaattctgtt ttatcagacc gcttctgcgt tctgatttaa 1860
 tctgtatcag gctgaaaatc ttctctatc cgccaaaaca gaagcttggc tgcagggtga 1920
 caagcgctga atgggtatcg gcactagagt ttaacttggc taggctaatt ggtatgttca 1980
 tttttattt gtctgaatt acctagaatg acttgaagtt ttaatttca ctttctctcg 2040
 tagagcacat agtcttctt cgtagccccg caatccggac agcaccagtc atcaggaata 2100
 tcctcaaagc gagtacctgg agtaaaaccc tcggcctcat cgccaacgc ctcacatcat 2160
 atatggccac aagtaataca tatccactt aagtatgctt tccgccttg ggcacagac 2220
 ctggagggtt gagtttata tagatcttg ctttaacgt cggcactagg caatttctct 2280
 aagcttgtcg gcgcaaccac tgcttcagca gttaaacttg tgccactaac ctcggataaa 2340
 ttggcgaag tatgggttga ggtgacgccc ttccaccta cgccgctctc aattaacatg 2400
 aagtcaagct tgtctgaac ggcgcaatcg gggcagcacc aatcctcagg aataaggtgc 2460

caaggcgtag ctggagaaaa cccctcatgc acattaccgc cactctcatc ataaacataa 2520
 ttacaatccg ggcatttata gctagccata ctcatcacca tgtcaaattg ttattttgcg 2580
 ttgcggcaaa ttgcggtat ttattctca tcttcttct tgtggaagat ttctttacaa 2640
 cctgtggggg gctcgccctga tcaagaactt cagcttagc cgcacagccc tcattttat 2700
 ttcttgatt aagtgggatc actaattctg cggccaaaac tgccattcca gttggagtag 2760
 catctgaaat accactttcc gagttggcaa gctgactatt cacccttagc tgtgtttctt 2820
 tcgagggaga atccgcgaga aagataaagt ccacctgtc tcgaactgcg cagtccgggc 2880
 atgcccaatc ttgggggata tcattccagc tgggtgtcgg gtggaaacct tcgtgcggct 2940
 ccccttatt ttcatcatag atatactgac aatctggaca ctggtacctt gacattctcc 3000
 cactctccta ttaactcagc gttagtcgct gctccgacaa ctcatcaga gtgtaactat 3060
 cggagcaggt cgccttcaaa gcaattacag agaggcaatc aaccctcagc acttagcga 3120
 agtgactct ttgtgagagc ttcaacgcc gcacataaaa ttgaagcact tattgtaaat 3180
 atcgaccgcc gggctctgcg tgctcacata actacgatgc taccgcagag gtactcgaac 3240
 tatgaccagc actactagtg ccaaatttt tcaaataggt ttctcgcatc gaatcatcaa 3300
 ttggatctt attaaggtca ccaccagccc aatctactac ctgggatcc ataactgatc 3360
 taaaccactg aggaatcatc gccatcaaaa atgcaccagg gtaaccgctc ggaagagccg 3420
 gcaggccggg aaaatcccga agtgactgat aagaacgtgt tggatgcgcg tggatgatccg 3480
 agtgccgctg aagggtggaac agcactagat tagagacgat gtgattacta ttcaagaat 3540
 ggtgcggctt ttgatgtca tatcgaccgt cctccatttt ttgacggagc aagccgtaat 3600
 gttcaatata gttcgactg gtcagctgcc accaaccgaa agccattga atcggcagga 3660
 acaccagcat cttaggtcca aacaaggcaa ggagaacggc gtaaagaata actgtgatga 3720
 tcattggtg gaggatttca ttatcgaaac tcaaacgct ttggccacgg cgcgaaaggc 3780
 gttgttctc aagcccccaa gcacgaataa atgctcctgg gatctcacgg attgaaaact 3840
 tataaatgct ttctccatc cgggatgttg caggatccat cgggttagcg acatcacggt 3900

gatgaccctt attatgctca ataaagaagt gaccgtaccc tacgacagcc aacacaattt 3960
tggccatcca acgatcaaaa gtctccttct tgtgaccgag ttcgtgtcct gtattgagcg 4020
ctagtccgtt cacgataccc agtgacaagg caagcgcacc aattcaagc caagacattg 4080
gctgagttcc gaccacccat gctgacacaa ttaatgcagc gtaatgcata ggaactgtta 4140
gatatgtcaa aactcgatag taccgctcct tctctagttt cggcaccact tcttcaggcg 4200
gattattaa gtctcacca aacatcgcat caagcaatgg aagtgcgccg taccatacga 4260
gcaataccag ccataaaaa atccccaac cagtttcatt tgcaagccag attccgatca 4320
tcggagtagc cgccacaaa gttgatagta tccagagata ttcttttta tctacgtact 4380
ctggagcgga atccagaact ctgtgttct caagcatatg gaattctcca attttatta 4440
aattagtcgc tacgagattt aagacgtaat ttatgccta actgagaaag ttaagccgcc 4500
cactctcact ctgacatct taaacctgag ctaatcggac gcttgcgcca actacaccta 4560
cgggtagttt ttgtccgtc gtctgtgga aaaacacgag ctggccgcaa gcatgccagg 4620
taccgcgagc tactcgcgac ggctgaaagc accgaaatga gcgagctatc tggtcgattt 4680
tgaccgggtg cccgtcttca aaatcggcga aggccgaagt cgccagaaa tagcggccta 4740
cttcagacct tcctagtaa atatttgca ccaccgatca tgccgactac acttaagtgt 4800
agtttaata ttaacaccg taacctatgg tgaaaattc cagtcagctg gcgcgagaat 4860
agcataatga aaataataat aaataatgat ttcccggtcg ctaaggtcgg agcggatcaa 4920
attacgactc tagtaagtgc caaagttcat agttgcatat atcggccaag attgagtatc 4980
gcggatggag ccgctcccag agtatgcctt tacagagccc cacctggata tgggaaaacc 5040
gttgccttg cgttcgagtg gctacgccac agaacagccg gacgtcctgc agtgtggctt 5100
tctttaagag ccagttctta cagtgaattt gatctctgcg cagagattat tgagcagctt 5160
gaaactttcg aaatggtaaa attcagccgt gtgagagagg gtgtgagcaa gcctgcgctc 5220
ttgcgagacc ttgcatctag tctttggcag agcacctcga ataacgagat agaaacgcta 5280
gtttgttgg ataataataa tcatgactta gacttgccgt tgtgcacgc acttatggag 5340

ttatgttaa atacacaaa aaatatcagg ttgcagttg caggcaatac aataaaaggg 5400
 ttctgcagc ttaaactgc aggcgctatg cgggagtaga ccgagaaaga ctggccctt 5460
 agcgcagaag aggcggtggc gtagcggag gcagagtctg ttctggagt tctgaagaa 5520
 cagatagaga ccttggtgca agaagttgag gggtagcctg ctctgtagt tttttgta 5580
 aagcgtgagt tgccggccaa gcatattca gcagtagttg aagtagacaa ttacttagg 5640
 gatgaaatat ttgagcgat tcccgagcgc ttcgtgtt ttctgcaaa ttctcattg 5700
 ctcgattcg tgacgcctga tcaatacaat tatgtattca aatgcgtcaa tggggtctca 5760
 tgtattaagt atttaagcac taattacatg ttgctcgcc atgtgagcgg tgagccagcg 5820
 cagtttacac tgcattcagt actgcgtaat ttctacgag aaattactg gactgaaaat 5880
 cctgctaaaa gatcctacct gcttaagcgt gcagcttct ggcatggcg tagaggtgaa 5940
 taccagtatg caatacgaat atccctacgg gcgaatgact gtcgctgggc agtcagcatg 6000
 tctgagagaa taattttaga ttgtcattt cgtcagggcg aaatagatgc gctgagacag 6060
 tggctgttag agctgccgaa gcaggcctgg caccaaaaac ccatagtgt tattagttac 6120
 gcgtgggtat tgtatttcag tcagcaaggc gcgcgagcag agaagttaat taaagaccta 6180
 tctcacaat ccgataaaaa aaataaatgg caagaaaagg aatggctgca gcttgtgctt 6240
 gcaataggta aagcaaccaa agatgaaatg cttcgagtg aggagctctg taataagtgg 6300
 attagttat ttggggattc aaacgcagtt ggaaaagggg ccgcgctaac ctgtttggct 6360
 ttatttttg ccagttagta tagatttga gagttggaga aggtgctggc tcaggcccaa 6420
 gccgtgaata aatttcaaa acaaaattt gcttttggtt ggctgtatgt cgcgaggtt 6480
 caacaagccc tagcaagcgg aaaaatgggc tgggcgagc agattataac tcaagcacgc 6540
 acagacagtc gcgcgcagat gatggaatcc gagtttactt cgaaaatgtt tgacgctcta 6600
 gagcttgagt tacattatga attgcgctgc ttggacacct cagaagaaaa gctctccaaa 6660
 atttagagt tcatttcaa tcacgggggtg acagacgtgt tttttccgt atgccgtgct 6720
 gtgtcagctt ggccgcttgg aaggagtgc ctaaatggct ccattgagat attggagtgg 6780

gcgaaggcgc atgcgggtga aaaaaatcta ccaagattgg aagttatgag ccaaattgag 6840
atctatcagc gcttagtctg tcaaggcata acgggcataa ataatttaaa aactcttgaa 6900
gatcataaga tttctccgg acagcactca gccccctaa aagcacgcct gctgcttggt 6960
caatcactag tgccttcccg agatcggaac ttcatagtg ccgcgcacag agcgttattg 7020
gctattcagc aagcccgtaa aattaacgag ggccagctgg aagtcctgg attattgtgt 7080
ttggccggag cgcaggcagg tgccggtgat ttaaaaaagg ctacagctaa cattgtttat 7140
gcagtggaga tagcaaaaca gcttcaatgc ttcaaacag ttctgatga agtatgttta 7200
attgagcgaa taataccggc ttcatgtgaa gccttcacag cagttaattt agatcaagcg 7260
attggggctt ttagtcttcc gcgaatagt gagatggaa agtccgcaga gaataaagct 7320
gacgctttat tgacacggaa gcagattgct gtctgaggc ttgtaaaaga ggggtgctca 7380
aacaacaaa tagcaacaaa tatgcatgtc accgaagatg ctataaagt gcatatgagg 7440
aaaatatttg ccacctgaa ttagtgatc cgcacgcaag caacaattga agctgagcgt 7500
caaggaatta tctaaaataa tcggcattaa gtgatatagt gaaaagtata ccggagagag 7560
aattatggca atcgtgttg ttggcgttg tacagctgga gtaaagtctg cgttctggct 7620
tcgtcaatat ggtataaag gggaaattag gatttttagc agggagtctg tggcgctta 7680
tcagcggcct cctctatcca aggccttct gacaagttag attgcagaat ccgcagtgcc 7740
attaaagcca gaagggtttt atacgaataa caatattacc atttcgttaa atacaccgat 7800
tgtatcaatc gacgtggggc gtaagatagt ttcttctaaa gatggaaaag aatacgcgta 7860
tgaaaaattg attcttgcaa cacctgctag cgcacgtagg ttaacctgcg aggggtctga 7920
actgtctggg gtctgtatt tacgcagtat ggaagacgcc aaaaatttac gtaggaaact 7980
tgtggagagt gcgtctgttg ttgtgtggg cggcggagta atcgggcttg aagtcgcctc 8040
agctgcggtg ggcttaggga agagggtcac agtगतगगaa gccacccgc gtgtaatggc 8100
gcgcgtggtt acgccggcag cagcaactt agtcagagcc cgctggagg ctgaaggaat 8160
tgagtcaag ctgaatgcga aattaacgtc tataaagggc aggaatggcc atgtgaaca 8220

atgcgtactt gaaagtggag aagaaattca ggcggatctg attgtagtgt gaatcgggtgc 8280
 tatcccagag cttagagctgg caactgaggc ggcccttgaa gtgagtaatg gtgttggtgt 8340
 cgatgatcag atgtgtacat cggatacaag tatatatgca atcggcgact gcgcaatggc 8400
 tagaaatcct tttggggaa cgatggtacg tttagagaca attcataatg cggttacaca 8460
 cgctcaaatt gtcgcaagta gcatctgttg cacatcaaca ccagcaccaa cccaccacg 8520
 gttctggtct gatcttaaag ggatggcgct gcaaggactt ggtgctctaa aggactacga 8580
 taaactcgtt gttgcaatta ataacgaaac tcttgaacta gaagtccttg cgtacaagca 8640
 ggagcgactg attgcaactg agacaataaa ttgcctaaa cgtcaagggtg cgcttcgagg 8700
 gagtataaaa ttacctgatt agcaatgatg cttagccact cgaaccaacg gtcgcatag 8760
 ggacggcagt tacctgccgc ccccgccact ccgtacgtgc ggaactaccg cgtaaaatgt 8820
 ggcccaggct gttatgtggc gcttggcgcg ggaagtattg ccatatttg tgatgaccgt 8880
 ttctacgcc acataaatcg gtgggtggcta tgggtggatt tcccttgctg aaatgggaga 8940
 tccgatcatg ttcgagctct tattcaaata cactgctgtg ttggcggtaa gcgttctcga 9000
 gctcatagtc caccagccc gtgattttgt agccctggcc gacggccagc aggtaggccg 9060
 acaggctcat gccggccgcc gccgccttt cctcaatgc tctcgttcg tctggaaggc 9120
 agtacacctt gataggtggg ctgcccttcc tggttggctt ggttcatca gccatccgt 9180
 tgccctcatc tgttacgccg gcggtagccg gccagcctcg cagagcagga ttcccgttga 9240
 gcaccgccag gtgcaataa gggacagtga agaaggaaca cccgctcgcg ggtgggccta 9300
 cttcacctat cctgcccggc tgacgccgtt ggatacacca aggaaagtct acacgaaccc 9360
 ttggcaaaa tctgtatat cgtgcgaaaa aggatggata taccgaaaa atcgctataa 9420
 tgaccccgaa gcagggttat gcagcgaaa agcgtgctt ccctgctgtt ttgtggaata 9480
 tctaccgact ggaaacaggc aaatgcagga aattactgaa ctgaggggac aggcgagaga 9540
 ggatcaatgg ctatctgggg gaccgagggc tgcgctgcg ccaaggcacg attggagatc 9600
 ccctatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc 9660

ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggctggtt cggctgcggc gagcgggtatc 9720
 agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 9780
 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt 9840
 ttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg 9900
 gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 9960
 ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 10020
 cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 10080
 caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 10140
 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca cgacttatcg cactggcag cagccactgg 10200
 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagtictga agtggtggcc 10260
 taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac 10320
 cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacia accaccgctg gtagcgggtg 10380
 ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatcctt 10440
 gatctttct acggggctg acgctcagt gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgt 10500
 catgagatta taaaaagga tctcaccta gatccttta aattaaaaat gaagtttaa 10560
 atcaatctaa agtatatatg agtaacttg gtctgacagt taccaatcga ttggtcggtc 10620
 atttgaacc ccagagtccc gctcagaaga actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc 10680
 gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa gcacgaggaa gcggtcagcc cattcgccgc 10740
 caagctcttc agcaatatca cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac 10800
 ccagccggcc acagtcgatg aatccagaaa agcggccatt ttccaccatg atattcggca 10860
 agcaggcatc gccatgggtc acgacgagat cctcgccgctc gggcatgcgc gccttgagcc 10920
 tggcgaacag ttcggtggc gcgagcccct gatgctcttc gtccagatca tctgatcga 10980
 caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc gctcgatgcg atgtttcgt tgggtggtcga 11040
 atgggcaggt agccggaica agcgtatgca gccgccgcat tgcacagcc atgatggata 11100

ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg ccccggcact tcgccaata 11160
gcagccagtc cttccccgt tcaagtacaa cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg 11220
tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct cgtcctgcag ttattcagg gcaccggaca 11280
ggtcgggtctt gacaaaaaga accggggcgcc cctgcgctga cagccggaac acggcgggcat 11340
cagagcagcc gattgtctgt tgtgcccagt catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg 11400
ccggagaacc tgcgtgcaat ccatttgtt caatcatgcg aaacgacatc catcctgtct 11460
cttgatcaga tttgatccc ctgcgccatc agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt 11520
ttactttgca gggcttccc 11539

5	<210> 32 < 211> 35 < 212> ADN < 213> Artificial	
10	<220> < 223> Cebador <400> 32	
15	aagggaattc catatgcttg agaaacacag agttc <210> 33 < 211> 35 < 212> ADN < 213> Artificial	35
20	<220> < 223> Cebador <400> 33	
25	aaaattcgcg tcgacaagcg ctgaatgggt atcgg <210> 34 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Artificial	35
30	<220> < 223> Cebador <400> 34	
35	tgagacagtg gctgttagag <210> 35 < 211> 35 < 212> ADN < 213> Artificial	20
40	<220> < 223> Cebador <400> 35	

	taataaccgc tcgagaacgc ttaccgcaa cacag	35
5	<210> 36 < 211> 47 < 212> ADN < 213> Artificial	
10	<220> < 223> Cebador	
	<400> 36	
15	gccggcgaga acctgtactt tcagatggca agtaagtatg ccacttg	47
20	<210> 37 < 211> 28 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> Cebador	
25	<400> 37	
	ggatcctcac ttctgtgct gagccttg	28
30	<210> 38 < 211> 446 < 212> PRT < 213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 38	

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

His Leu His Ser Lys Tyr Ala Thr Cys Met Ser Gly Asn Ser Thr Ser
20 25 30

Arg Arg Ile Phe Thr Thr Glu Ala Ala Pro Glu Lys Gly Asn Glu Pro
35 40 45

Arg Leu Val Ser Ala Ala Val Glu Gln Leu Asn Thr Leu Pro Phe Tyr
50 55 60

His Ser Phe Trp Asn Arg Thr Thr Lys Pro Ser Leu Asp Leu Ala Lys
65 70 75 80

Val Leu Leu Glu Met Phe Thr Ala Asn Lys Met Ala Lys Ala Phe Phe
85 90 95

Thr Ser Gly Gly Ser Asp Ala Asn Asp Thr Gln Val Lys Leu Val Trp
100 105 110

Tyr Tyr Asn Asn Ala Leu Gly Arg Pro Glu Lys Lys Lys Phe Ile Ala
115 120 125

Arg Lys Lys Ser Tyr His Gly Ser Thr Leu Ile Ser Ala Ser Leu Ser
130 135 140

Gly Leu Pro Pro Leu His Gln Asn Phe Asp Leu Pro Ala Pro Phe Val
145 150 155 160

Leu His Thr Asp Cys Pro His Tyr Trp Arg Phe His Leu Pro Gly Glu
165 170 175

Thr Glu Glu Glu Phe Ser Thr Arg Leu Ala Lys Asn Leu Glu Asp Leu
180 185 190

Ile Ile Lys Glu Gly Pro Glu Thr Ile Gly Ala Phe Ile Ala Glu Pro
195 200 205

Val Met Gly Ala Gly Gly Val Ile Pro Pro Pro Ala Thr Tyr Phe Glu
210 215 220

Lys Val Gln Ala Val Val Lys Lys Tyr Asp Ile Leu Phe Ile Ala Asp
225 230 235 240

Glu Val Ile Cys Ala Phe Gly Arg Leu Gly Thr Met Phe Gly Cys Asp
245 250 255

Lys Tyr Asn Ile Lys Pro Asp Leu Val Thr Leu Ala Lys Ala Leu Ser
260 265 270

Ser Ala Tyr Met Pro Ile Gly Ala Ile Leu Met Ser Gln Glu Val Ala
275 280 285

Asp Val Ile Asn Ser His Ser Ser Lys Leu Gly Val Phe Ser His Gly
290 295 300

Phe Thr Tyr Ser Gly His Pro Val Ser Cys Ala Val Ala Ile Glu Ala
305 310 315 320

Leu Lys Ile Tyr Lys Glu Arg Asn Ile Pro Glu Tyr Val Ala Lys Val
325 330 335

Ala Pro Arg Phe Gln Asp Gly Val Lys Ala Phe Ala Ser Gly Ser Pro
340 345 350

Ile Ile Gly Glu Thr Arg Gly Thr Gly Leu Ile Leu Gly Thr Glu Phe
355 360 365

Val Asp Asn Lys Ser Pro Asn Glu Pro Phe Pro Pro Glu Trp Gly Val
370 375 380

Gly Ala Phe Phe Gly Ala Glu Cys Gln Lys His Gly Met Leu Val Arg
385 390 395 400

Val Ala Gly Asp Gly Ile Leu Met Ser Pro Pro Leu Ile Ile Ser Pro
405 410 415

Glu Glu Ile Asp Glu Leu Ile Ser Ile Tyr Gly Lys Ala Leu Lys Ala
420 425 430

Thr Glu Glu Lys Val Lys Glu Leu Lys Ala Gln His Lys Lys
435 440 445

<210> 39

< 211> 1515

< 212> ADN

< 213> Arabidopsis thaliana

<400> 39

atggtcgta tcaacagtct ccgacgcttg gcgcgtacca ctcaggttca ttgcacagt 60
aagtatgcc aattgatgtc tgggaactcc actccagga ggatttcac tactgaggca 120
gcacctgaga agaaaaacac tgttgggtct aaagggcatg atatgcttgc acctttact 180
gctggatggc agagtgtga ttagatccc ttggcattg caaagtctga gggaagtat 240
gtgtatgatg atactgggaa aaaatatctt gactctctcg ctggttatg gtgtactgcc 300
ttaggaggaa atgagccaag gcttgtttct gccgctgttg aacagtgaa caccttgccg 360
ttttactact ccttttgaa ccgtactact aaaccttctc tggatcttgc taaggttctt 420
ttagagatgt tcacggccaa caaatggcc aaagcattt ttacaagcgg tggatcagat 480
gccaacgata ccaggtcaa gctggtttg tattacaata acgcacttg aaggcccag 540
aagaaaaagt ttatcgcgag aaagaaatcg taccatggct ccactcta atcagcaagt 600
ttgtccggcc ttccccgct acacaaaaat ttgatttac ctgcaccatt tgtgttcac 660
acagattgcc ctcatattg gcgtttcat ctccaggcg aaacggaaga ggagtctca 720
accagattag ccaagaattt agaggatcta atcatcaaag aaggaccaga aactattggt 780

gcttttatag ctgaaccagt catgggtgct ggggggtgta tacctccacc tgctacctac 840
 ttgaaaagg ttcaagctgt tgtaagaaa tatgatatct tgttcattgc tgatgagggtg 900
 atatgtgcat ttggaaggct cgggacaatg ttggctgtg acaaatacaa cattaagcca 960
 gatcttgtga ccttagctaa ggcactgtct tcagcatata tgccgattgg agccattctt 1020
 atgagccaag aagtggcaga tgcataaat tctcatagca gcaagctagg cgttttctcc 1080
 catggattta cttattctgg tcatccagtt tcgtgtgctg tagcaattga agcgltaaag 1140
 atatacaagg agaggaacat accagagtat gtcgccaaag ttgccccaaag gtttcaagat 1200
 ggagltaaag cgtttgcctc tggtagtctt attattggag agacaagagg aacaggtttg 1260
 attcttggga ctgagtttgt agacaataaa tctccgaacg aaccatttcc accagaatgg 1320
 ggtgttggcg cattctttgg agccgagtgc cagaagcacg ggatgttagt ccgtgttgca 1380
 ggtgatggca tttgatgtc tccaccgctc attatctcac ctgaagagat tgatgagttg 1440
 attctatct atgggaaagc attgaaggca acggaagaga aggtaaaaga actcaaggct 1500
 cagcacaaga agtga 1515

<210> 40
 < 211> 1362
 < 212> ADN
 < 213> Pseudomonas sp.

<400> 40

atgagcgtca acaaccgcga aaccctgtaa tggcaaacc tgagcgggga gcaccatctc 60
 gcaccttica gtgactacaa gcagctgaag gagaaggggc cgcgcatcat caccaaggcc 120
 caggggggtgc atttgtggga cagcgagggg cacaagatcc tcgacggcat ggcgggcctg 180
 tgggtcgtgg cgggtgggta cggccgtgaa gagctgggtc aggcagcaga aaagcagatg 240
 cgcgagctgc cgtactacaa cctgttcttc cagacggccc acccgcttgc actggaactg 300
 gccaaaggcca tlaccgatgt ggcgcccagag ggcatgaccc atgtgttctt caccggctcc 360
 ggctccgaag gcaacgacac cgtgctgcgc atgggtgcgc actactgggc gttgaagggc 420
 aagccgcaca agcagacat catcgccgt atcaacggct accacggctc caccttcgcc 480

ggtgcttgcc tgggcggcat gagcggcatg cagcagcagg gcggcctgcc gatcccgggc 540
 atcgtgcaca tcccgagcc gtactggttc ggcaaggcg gtgacatgac cccggatgcg 600
 ttcggtatct gggcggccga acagctggag aagaaaatcc tcgaagtcgg cgaagacaac 660
 gtgcgcgcct tcatcgccga gcctatccag ggcgcaggcg gcgtgatcat cccgccggaa 720
 acctactggc cgaagggtgaa ggagattctc gccaaagtacg acatcctgtt cgttgccgac 780
 gaagtcatct gtggtttcgg ccgtaccggc gagtgggtcg gctctgatta ctacgacctc 840
 aagcccgacc tgatgaccat cgccaaggcg ctgacctccg gttacatccc catgggcggt 900
 gtgatcgtgc gtgacaaagt ggccaagggtg atcagcgaag gcggtgactt caaccacggc 960
 ttcacctatt cgggccaccc ggtagcggcg gcggtgggcc tggaaaacct gcgcatacctg 1020
 cgcgacgagc aaattgtcga gaaggcgcgt actgaagcgg caccgtattt gcaaaagcgt 1080
 ttgcgtgagc tgcaggacca cccgctgggtg ggtgaagtgc gcggccttgg catgcttggc 1140
 gcgatcgagc tggtgaaaga caaggccacc cgcagccgtt acgagggcaa gggcgtgggc 1200
 atgatctgcc gcaccttctg cttcgaaaac ggctgatca tgcgtgcggt ggggtgacacc 1260
 atgatcatcg cgccgccgtt ggtcatcagc catgcggaaa tcgacgaact ggtggaaaag 1320
 gcacgcaaat gcctcgacct gacccttgag gcgattcgat aa 1362

<210> 41
 < 211> 1359
 < 212> ADN
 < 213> Pseudomonas sp.

<400> 41

atgagcgatt cgcaaaccct gcactggcaa gcgctgagcc gcgaccatca tctgccgccc 60
 ttcaccgatt acaaggcgct gaacgcaaaa ggcacgcgca tcatcaccaa ggcgtcaggc 120
 gtctacctgt gggacagcga aggccacaag atcctcgacg ccatggccgg gctctggtgc 180
 gtcaacctgg gctatggccg cgaggagctg gtcgaggccg cgaccaggca gatgcgag 240
 ctgccgtact acaacctgtt cttccagacc gccacccgc cggccgtggc gctggccaag 300

gcgattgccg acatcgcgcc ggccgggatg aaccatgtgt tcttcaccgg ctccggctcg 360
gaggccaacg acaccgtgct gcgcatggcg cgccattact gggcgatcaa gggccagccg 420
gcgaagaagg tggatcatcg ccgctggaat ggctatcacg gctcgaccat cgctggcgca 480
agcctcggtg gcatgaaggc catgcacgag cagggcgacg gcccgatccc cggcacgag 540
catatcgacc agccctactg gttcggcgag ggtggcgaca tgagcccgga agagtccggc 600
gtgcgcatcg ccgaccagct ggagcagaag atccttgagg tcggcgagga caaggtcgcc 660
gccttcacg ccgaacctat ccagggcgcc ggccggcgta tcatccgcc cgagagctac 720
tggccgcggg tcaaggaaat cctcgcgcg ctagacattc tcttcacg cgacgaggtc 780
atctcggtt tcggccgtac cggtagtggt ttggcgagcg actactacgg cctcgagccg 840
gacctgatgc cgatcgcaa gggcctgacc tctggctaca tcccatggg cggcgtagtg 900
gtgcgacg aagtggcgca cagctcaac gagggcgggc agttctacca cggcttcacc 960
tactcggggc acccgtggc cgccgggtg gcgctggaga acatccgcat cctgcgag 1020
gagaagatcg tcgagcgggt gaagacgaag acggcaccct attgcagtc ccgttggcag 1080
gaactgctcg agcatccgct ggtaggcgag gcgcgggcg tcggcctgct tggcgcgctg 1140
gagttggtga agaacaagaa gacccgcgaa cgctttgccg atcccggtgt gggcatgctc 1200
tgtcgcgagc actgcttcg caacggcctg gtgatgcgtg cggttggcga caccatgac 1260
attcgccgc cgctggtgat cagcgaagag cagatcgacg agctggttg caaggtcgg 1320
ttgtcctcg acgccacggc caaggatgtg ctgggctga 1359

<210> 42
 < 211> 1380
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> gen optimizado en codones para la expresión en E coli

<400> 42

atgcagaaac agcgtaccac ctctcagtgg cgtgaactgg atcgggcgca tcatctgcat 60

ccgtttaccg ataccgcgag cctgaatcag gcgggtgcgc gtgtgatgac ccgtggcgaa 120
 ggcgtgtatc tgtgggatag cgaaggcaac aaaattattg atggcatggc gggcctgtgg 180
 tgcgtgaacg tgggctatgg ccgtaaagat ttgcggaag cggcgcgtcg tcagatggaa 240
 gaactgccgt ttataacac ctctttaaa accacccatc cggcgggtgt ggaactgagc 300
 agcctgtctg ccgaagttac cccggcaggt ttgatcgtg tgtttatac caacagcggc 360
 agcgaaagcg tggataccat gattcgtatg gtgcgtcgtt attgggatgt gcagggcaaa 420
 ccggaaaaaa aaaccctgat tggccgttgg aacggctatc acggcagcac cattggcgggt 480
 gcgagcctgg gcggcatgaa atatatgcat gaacagggcg atctgccgat tccgggcatg 540
 gcgcatattg aacagccgtg gtgtgataaa catggcaaag atatgacccc ggatgaattt 600
 ggcgtgggtg cggcgcgttg gctggaagaa aaaattctgg aaatcggcgc ggataaagtg 660
 gcggcgtttg tgggcgaacc gattcagggt gcgggcggtg tgattgttc gccggcaacc 720
 tattggccgg aaattgaacg tattgccgc aaatatgatg tgctgctggt tgcggatgaa 780
 gtgattgctg gctttggccg taccggcgaa tggtttgcc atcagcattt tggctttcag 840
 ccggacctgt ttaccgcggc gaaaggcctg agcagcggct atctgccgat tggcgcgggtg 900
 ttgtgggca aacgtgttc ggaaggctc attgcgggcg gtgatttaa ccatggcttt 960
 acctatagcg gccatccggt gtgtgcggcg gtggcgcatg cgaatgttc gccgctgcgt 1020
 gatgaaggca ttgtcagcg tgtgaaagat gatattggcc cgtatatgca gaaacgttgg 1080
 cgtgaaacct ttgaccgtt tgaacatgtg gatgatgtgc gtggcgtggg catggtgcag 1140
 cggtttaccc tggtgaaaaa caaagcgaaa cgtgaactgt ttccggattt tggcgaaatt 1200
 ggcaccctgt gccgcgatat tttttcgc aacaacctga ttatgcgtgc gtgcggcgat 1260
 cacatttgt ctgcaccgcc gctggttatg acccgtgcgg aagtggatga aatgctggcc 1320
 gtggcggaac gttgcctgga agaattgaa cagaccctga aagcgcgtgg cctggcctaa 1380

<210> 43
 < 211> 5143
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Vector

<400> 43

ttlaagaagg agatataccc atgacacaga gggcccacca tcaccatcac cattccatgg 60
 cctcctccga ggacgtcatc aaggagtcca tgcgcttcaa ggtgcgcatg gagggctccg 120
 tgaacggcca cgagttcgag atcgagggcg agggcgaggg ccgcccctac gagggcaccc 180
 agaccgcca gctgaagggt accaagggcg gccccctgcc ctgcgctgg gacatcctgt 240
 cccctcagtt ccagtaggc tccaaggcct acgtgaagca ccccgccgac atccccgact 300
 actgaagct gtcctcccc gagggcttca agtgggagcg cgtgatgaac ttcgaggacg 360
 gcggcggtgt gaccgtgacc caggactcct ccctgcagga cggcgagttc atctacaagg 420
 tgaagctcg cggcaccaac tccccctcg acggccccgt aatgcagaag aagactatgg 480
 gttgggaggc ctccaccgag cggatgtacc ccgaggacgg cgccctgaag ggcgagatca 540
 agatgaggct gaagctgaag gacggcggcc actacgacgc cgaggtaag accacctaca 600
 tggccaagaa gcccgtagc ctgcccggcg cctacaagac cgacatcaag ctggacatca 660
 cctcccacaa cgaggactac accatcgtgg aacagtacga gcgcgccgag ggccgccact 720
 ccaccggcgc cggcgagaac ctgtactttc agatggcaag taagtatgcc acttgcattg 780
 ctgggaactc cacttccagg aggattttca ctactgaggc agcacctgag aagaaaaaca 840
 ctgtgggtc taaagggcat gatatgcttg caccctttac tgctggatgg cagagtgtg 900
 attgatcc ctgggtcatt gcaaagtctg aggggaagtt tgtgtatgat gatactggga 960
 aaaaatatct tgactctctc gctggtttat ggtgtactgc cttaggagga aatgagccaa 1020
 ggcttgctt tgccgctgtt gaacagtga acacctgcc gttttatcac tccttttga 1080
 accgtactac taaaccttct ctggatcttg ctaagggtct ttagagatg ttcacggcca 1140
 aaaaatggc caaagcattt ttacaagcg gtggatcaga tgccaacgat acccaggtca 1200
 agctgggttg gtattacaat aacgcacttg gaaggcccga gaagaaaaag ttatcgca 1260

gaaagaaatc gtaccatggc tccactctaa tatcagcaag ttgtccggc cttccccgc 1320
 tacaccaaaa tttgattta cctgcacat ttgtgttgca cacagattgc cctcattatt 1380
 ggcgttttca tcttccaggc gaaacggaag aggagtctc aaccagatta gccaagaatt 1440
 tagaggatct aatcatcaaa gaaggaccag aaactattgg tgctttata gctgaaccag 1500
 tcatgggtgc tgggggtgtg atacctccac ctgctaccta ctttgaaaag gttcaagctg 1560
 ttgtaagaa atatgatatc ttgtcattg ctgatgaggt gatatgtgca ttggaaggc 1620
 tggggacaat gtttggctgt gacaaataca acattaagcc agatcttggt accttagcta 1680
 aggcaactgc ttcagcatat atgccgattg gagccattct tatgagccaa gaagtggcag 1740
 atgcataaa ttctcatagc agcaagctag gcgtttctc ccatggattt acttattctg 1800
 gtcattccagt ttctgtgtgt gtagcaattg aagcgtaaa gatatacaag gagaggaaca 1860
 taccagagta tgtcgccaaa gttgccccaa ggttcaaga tggagttaaa gcgtttgcct 1920
 ctggtagctc tattattgga gagacaagag gaacagggtt gattcttggg actgagtttg 1980
 tagacaataa atctccgaac gaaccattc caccagaatg ggggtgtggc gcattctttg 2040
 gagccgagtg ccagaagcac gggatgttag tccgtgttg aggtgatggc atttgatgt 2100
 ctccaccgt cattaatca cctgaagaga ttgatgagtt gatttctatc tatgggaaag 2160
 cattgaaggc aacggaagag aaggtaaaag aactcaaggc tcagcacaag aagtgaggat 2220
 ccggctgcta acaaagcccg aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa 2280
 ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gtttttgct gaaaggagga 2340
 actatatccg gccggatatc cacaggacgg gtgtggctgc catgatcgcg tagtcgatag 2400
 tggctccaag tagcgaagcg agcaggactg ggcggcggcc aaagcggctg gacagtgtc 2460
 cgagaacggg tgcgcataga aattgcatca acgcatatag cgctagcagc acgcatagt 2520
 gactggcgat gctgtcgga tggacgatat cccgcaagag gcccggcagt accggcataa 2580
 ccaagcctat gcctacagca tccaggggtga cggtgccgag gatgacgatg agcgattgt 2640
 tagatttcat acacggtgcc tgactgcgtt agcaatttaa ctgtgataaa ctaccgcatt 2700

aaagcttata gatgataagc tgtcaaacaat gagaattctt gaagacgaaa gggcctcgtg 2760
 atacgcctat tttataggt taatgtcatg catgagacaa taaccctgat aaatgcttca 2820
 ataataattga aaaaggaaga gtatgagat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt 2880
 tttgcggca tttgccttc ctgttttgc tcaccacagaa acgctgggtga aagtaaaaga 2940
 tgctgaagat cagttgggtg cagcagtggtg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa 3000
 gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt ttaaagttct 3060
 gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgccggggcaa gagcaactcg gtcgccgcat 3120
 acactattct cagaatgact tgggtgacgc gtcaccagtc acagaaaagc atcttacgga 3180
 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata acactgcggc 3240
 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgctttt tgcacaacat 3300
 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccatacaaaa 3360
 cgacgagcgt gacaccacga tgctgcagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac 3420
 tggcgaacta ctactctag ctcccgga acaattaata gactggatgg aggcgggataa 3480
 agttgcagga ccacttctgc gtcgggccct tccggctggc tggttattg ctgataaatc 3540
 tggagccggt gagegtgggt ctgcgggtat cattgcagca ctggggccag atggttaagcc 3600
 ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gactcaggca actatggatg aacgaaatag 3660
 acagatcgtc gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagtta 3720
 ctcatatata cttagattg atttaaaact tcatttttaa ttaaaagga tctaggtgaa 3780
 gatcctttt gataatctca tgcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgtccact 3840
 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttctg agatccttt tttctgcgcg 3900
 taatctgctg ctgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggttgt ttgccggatc 3960
 aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaata 4020
 ctgtccttct agttagaccg tagttaggcc accactcaa gaactctgta gcaccgccta 4080
 catacctgc tctgtaac ctgttaccag tggtctgtgc cagtggcgat aagtcgtgc 4140

ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg 4200
 ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 4260
 agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg 4320
 taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt 4380
 atctttatag tctgtcggg ttccgccacc tctgactga gcgtcgatt ttgtgatgct 4440
 cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggcctttta cggttcctgg 4500
 ccttttctg gccttttct cacatgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata 4560
 accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca 4620
 gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac 4680
 tgtcggtat ttcacaccgc atatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccg 4740
 atagttaagc cagtatacac tccgctatcg ctacgtgact gggcatggc tgcgccccga 4800
 caccgcgcaa caccgctga cgcgccctga cgggcttgc tgctcccgc atccgcttac 4860
 agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggtttcacc gtcacaccg 4920
 aaacgcgcga ggcagctggc acgacaggtt tcccactgg aaagcgggca gtgagcgcaa 4980
 cgcaattaat gtgagttagc tactcatta ggcacccag gctttacact ttatgcttc 5040
 ggctcgatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga 5100
 ccatgattac gccaagctct agctagaaat aattttgtt aac 5143

<210> 44
 < 211> 36
 5 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cebador

10 <400> 44

ggaattccat atgagcgtca acaacccgca aacccg 36

15 <210> 45
 < 211> 37
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

20 <220>
 < 223> Cebador

<400> 45
 25 ccgctcgagt tatcgaatcg cctcaagggt caggctc 37

<210> 46
 < 211> 38
 < 212> ADN

ES 2 536 639 T3

< 213> Artificial
<220>
< 223> Cebador
5 <400> 46
ggaattccat atgagcgatt cgcaaaccct gcactggc 38
10 <210> 47
< 211> 35
< 212> ADN
< 213> Artificial
15 <220>
< 223> Cebador
<400> 47
20 cgcggatcct cagcccagca catccttggc tgtcg 35

REIVINDICACIONES

1. Una célula que ha sido modificada mediante tecnología genética con respecto a su tipo salvaje de modo que, en comparación con su tipo salvaje, es capaz de producir más ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o más lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos a partir de ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos, presentando la célula una actividad, incrementada en comparación con su tipo salvaje, de las enzimas E_I y E_{III} o de las enzimas E_I, E_{II} y E_{III}:
 - i) de una enzima E_I que cataliza la reacción de ácidos carboxílicos o ésteres de ácidos carboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -hidroxicarboxílicos o ésteres de ácidos ω -hidroxicarboxílicos, elegida del grupo consistente en las alcano monooxigenasas:
 - alcano monooxigenasa codificada por *alkBGT* de *Pseudomonas putida* GPo1 y citocromo-P450-monooxigenasas de *Candida tropicalis*;
 - ii) de una enzima E_{II} que cataliza la reacción de ácidos ω -hidroxicarboxílicos o ésteres de ácidos ω -hidroxicarboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -oxocarboxílicos o ésteres de ácidos ω -oxocarboxílicos, elegida del grupo consistente en las alcoholdehidrogenasas codificadas por el gen *alkJ*;
 - iii) de una enzima E_{III} que cataliza la reacción de ácidos ω -oxocarboxílicos o ésteres de ácidos ω -oxocarboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -aminocarboxílicos o ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos, elegida del grupo de las ω -transaminasas.
2. La célula según la reivindicación 1, en donde la enzima E_I es la alcano monooxigenasa codificada por *alkBGT* de *Pseudomonas putida* GPo1.
3. La célula según la reivindicación 1 ó 2, en donde la enzima E_{II} es codificada por el gen *alkJ* de *Pseudomonas putida* GPo1.
4. La célula según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la enzima E_{III} es la ω -transaminasa CV2025 de *Chromobacterium violaceum* DSM30191.
5. La célula según una de las reivindicaciones precedentes, en donde en la célula está incrementada la expresión de una enzima E_{IV} que cataliza la reacción de ésteres de ácidos ω -oxocarboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -aminocarboxílicos.
6. La célula según la reivindicación 5, en donde la enzima E_{IV} es la lipasa LipA (Q76D26) de *Pseudomonas fluorescens* que es secretada por la célula.
7. La célula según una de las reivindicaciones precedentes, en donde en la célula está incrementada la expresión de una enzima E_V que cataliza la reacción de ácidos ω -oxocarboxílicos para dar las correspondientes lactamas.
8. La célula según la reivindicación 7, en donde la enzima E_V es secretada por la célula.
9. La célula según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la célula es una célula de *Escherichia coli* modificada por tecnología genética, una célula de *Corynebacterium glutamicum* modificada por tecnología genética o una célula de *Pseudomonas putida* modificada por tecnología genética.
10. Un procedimiento para la preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos, de ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, que contiene las etapas de procedimiento:
 - I) poner en contacto una célula de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 con un medio de cultivo que contiene un ácido carboxílico o un éster de ácido carboxílico, o con un medio de cultivo contiguo a una fase orgánica que contiene un ácido carboxílico o un éster de ácido carboxílico bajo condiciones que posibilitan a la célula a formar, a partir del ácido carboxílico o a partir de los ésteres de ácido carboxílico, ácidos ω -aminocarboxílicos, ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos;
 - II) eventualmente, aislamiento de los ácidos ω -aminocarboxílicos, de los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos formados.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en donde los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos formados en la etapa I) del procedimiento se hacen reaccionar, en una etapa adicional del procedimiento, con procedimientos químicos convencionales para dar ácidos ω -aminocarboxílicos.

12. El procedimiento según la reivindicación 10 u 11, en el que la célula es una célula de *Escherichia coli* modificada por tecnología genética, una célula de *Corynebacterium glutamicum* modificada por tecnología genética o una célula de *Pseudomonas putida* modificada por tecnología genética.
- 5 13. El procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el medio de cultivo empleado en la etapa I) del procedimiento contiene aminoácidos que actúan de donantes de amina en la reacción, catalizada por transaminasa, de los ácidos ω -aminocarboxílicos o de los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos para dar los correspondientes ácidos ω -aminocarboxílicos o ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos.
- 10 14. El procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el procedimiento se lleva a cabo en un sistema bifásico que contiene
A) una fase acuosa, así como
B) una fase orgánica,
en donde la formación de los ácidos ω -aminocarboxílicos, de los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o de las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos por parte de las células en la etapa I) del procedimiento tiene lugar en la fase acuosa, y los ácidos ω -aminocarboxílicos formados, los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos formados o las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos formados se acumulan en la fase orgánica.
- 15 15. El procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el aislamiento de los ácidos ω -aminocarboxílicos formados, de los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos formados o de las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos formados tiene lugar a través de un procedimiento de purificación de al menos dos etapas, que comprende
20 a) una etapa de extracción, en la que se extraen del medio de cultivo los ácidos ω -aminocarboxílicos, los ésteres de ácidos ω -aminocarboxílicos o las lactamas derivadas de ácidos ω -aminocarboxílicos, así como
b) una etapa de purificación fina, en la que el extracto obtenido en la etapa a) del procedimiento se purifica adicionalmente a través de procedimientos de destilación o de otros procedimientos de extracción, obteniéndose una fase de ácido ω -aminocarboxílico, una fase de éster de ácido ω -aminocarboxílico o una
25 fase de lactama con una pureza de al menos 99,8%.
16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que en el caso de la extracción en la etapa a) del procedimiento se trata de una extracción reactiva.
17. El procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 16, en el que el ácido carboxílico es ácido láurico o el éster de ácido carboxílico es éster metílico del ácido láurico, y en el que el ácido láurico o el éster metílico del ácido láurico se hace reaccionar en la etapa II) del procedimiento para formar laurin-lactama.
- 30 18. Un procedimiento para la preparación de poliamidas basadas en ácidos ω -aminocarboxílicos, que comprende las etapas de procedimiento:
(α 1) preparación de ácidos ω -aminocarboxílicos mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 17;
35 (α 2) polimerización del ácido ω -aminocarboxílico, obteniéndose una poliamida.
19. Un procedimiento para la preparación de poliamidas basadas en lactamas, que comprende las etapas de procedimiento:
(β 1) preparación de lactamas mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 17;
40 (β 2) polimerización con apertura del anillo o policondensación de la lactama, obteniéndose una poliamida.

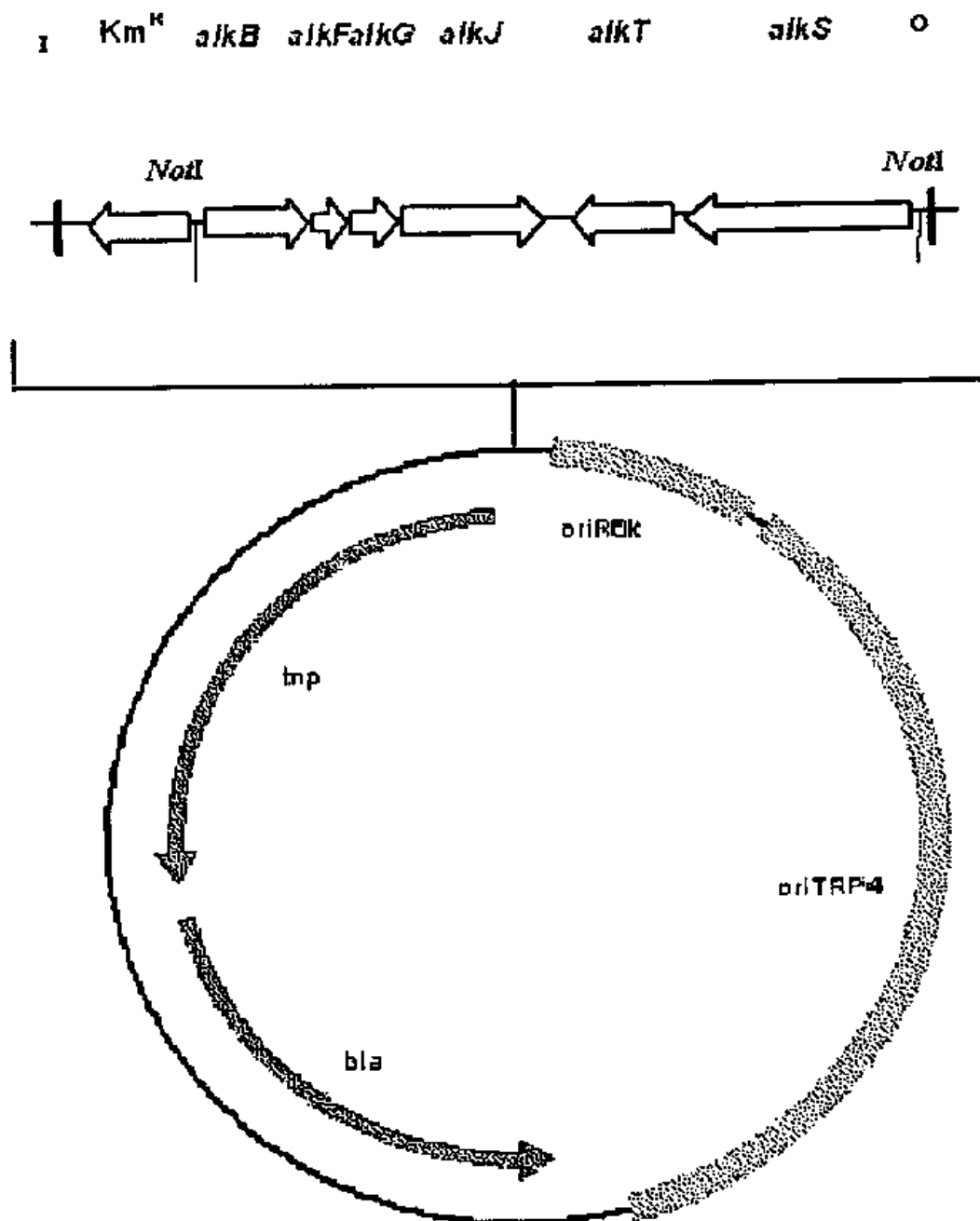


FIGURA 1

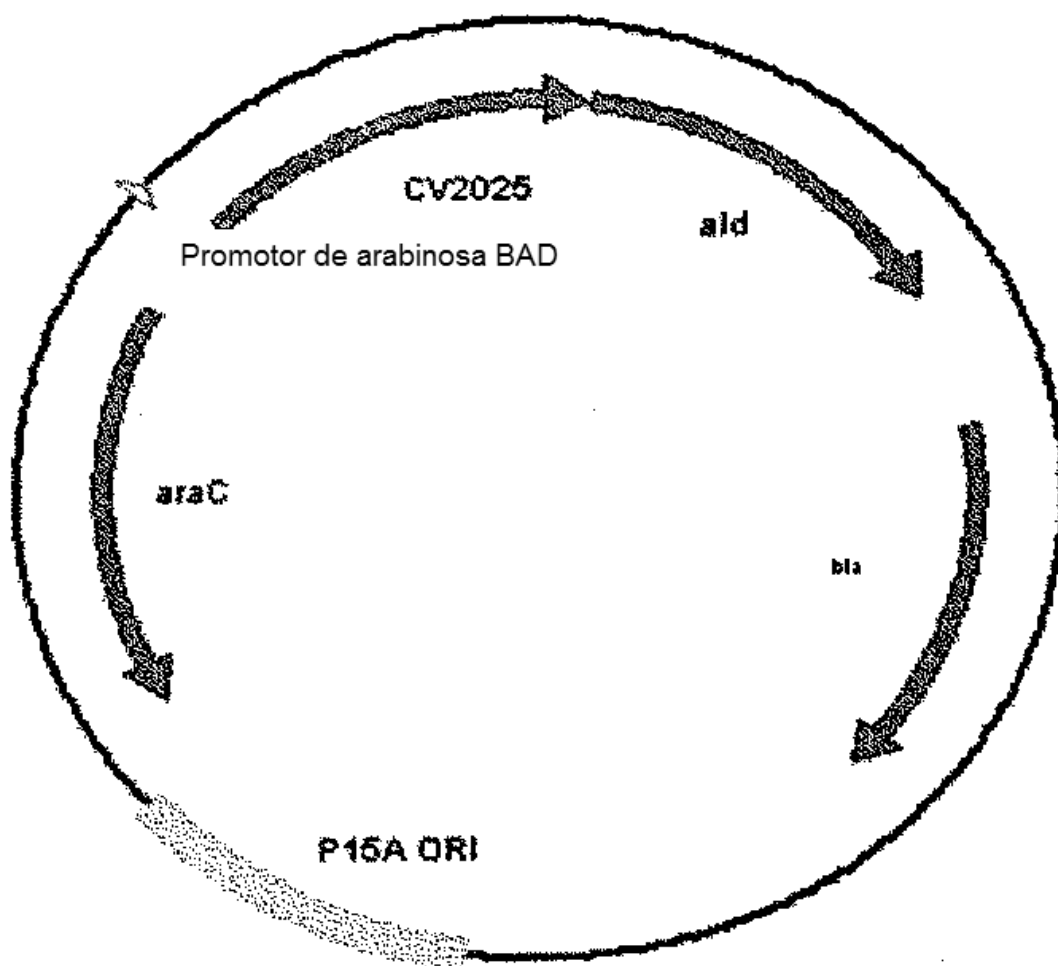


FIGURA 2

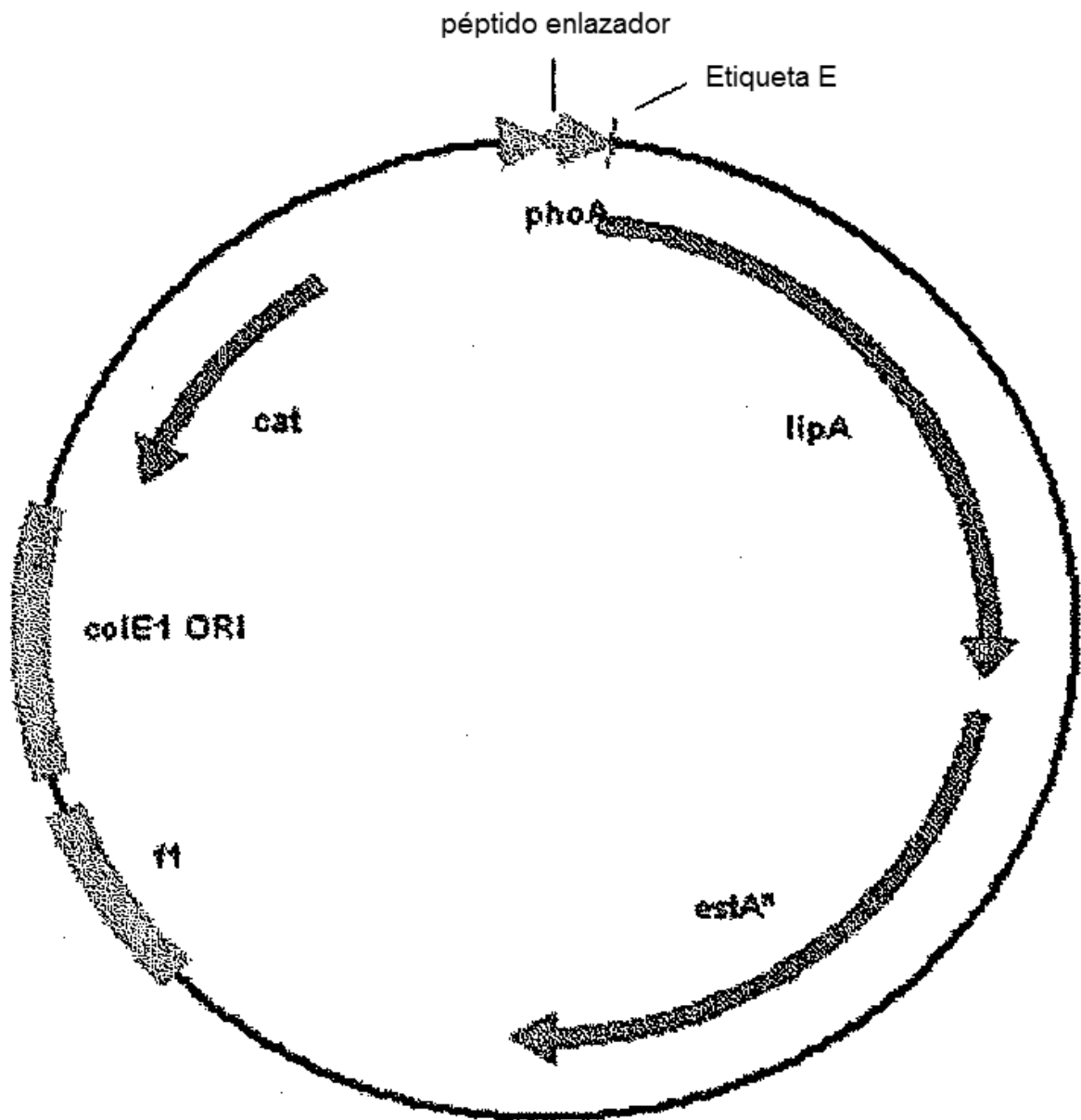


FIGURA 3

Conversión de 12-OLSME mediante ω -transaminasa de

Chromobacterium violaceum

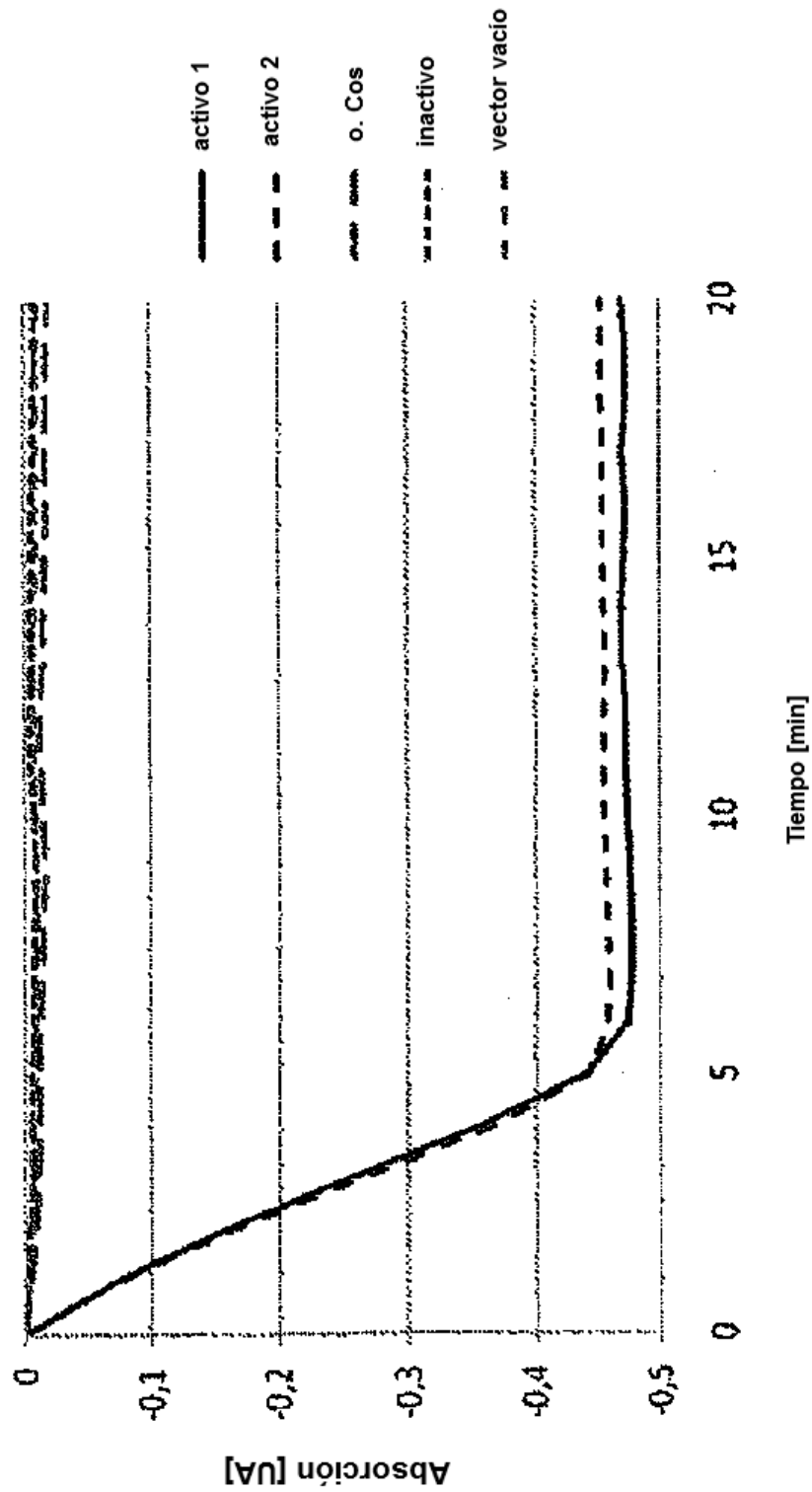


FIGURA 4

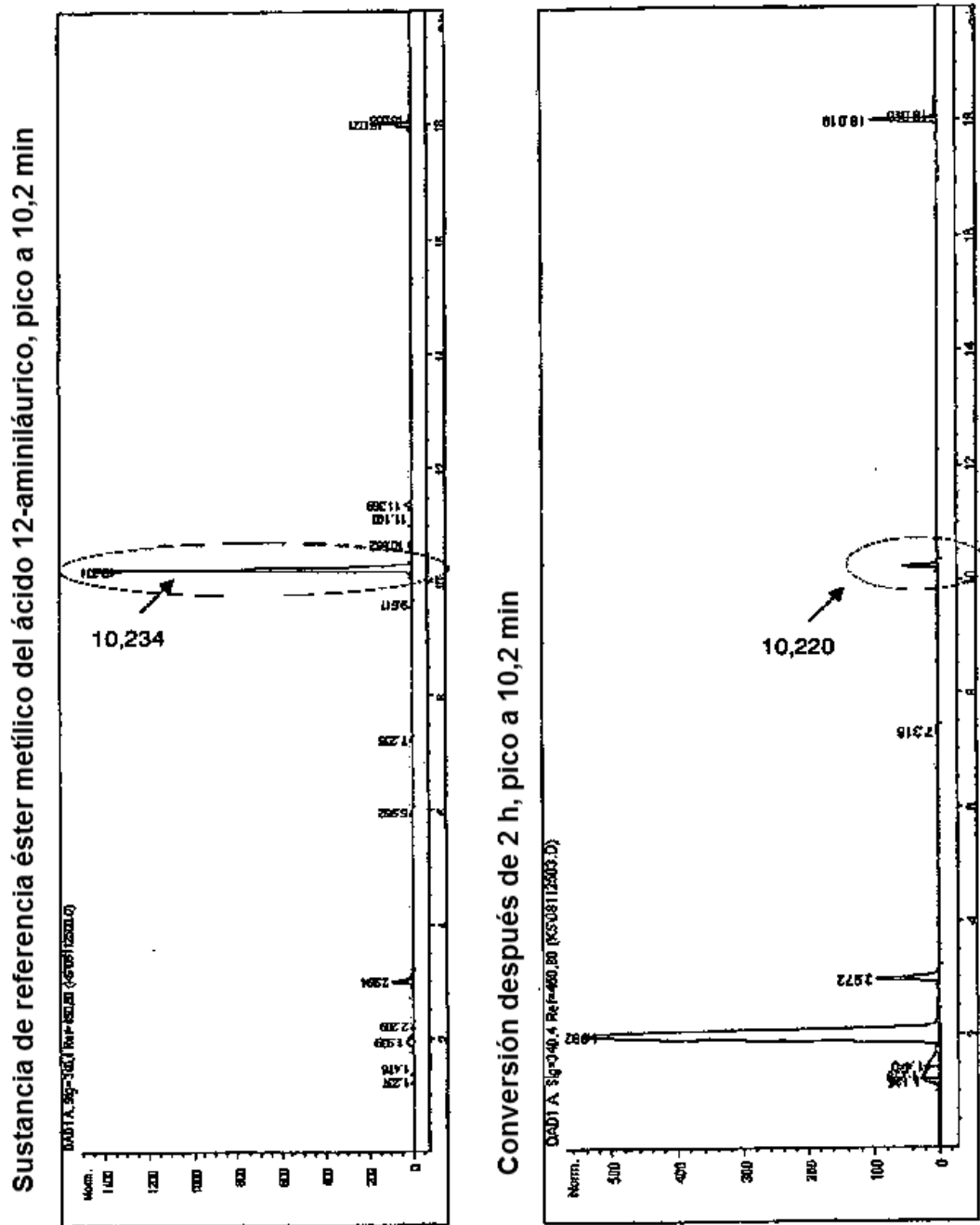
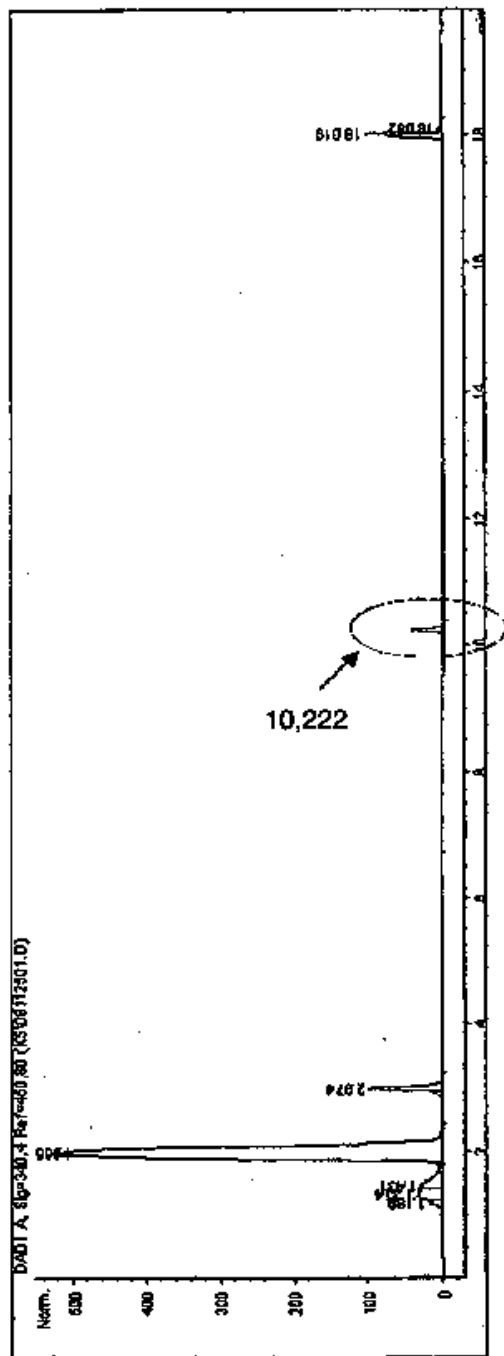


FIGURA 5

Conversión después de 24 h, pico a 10,2 min



Conversión después de 24 h, aumentado con sustancia de referencia, pico a 10,2 min

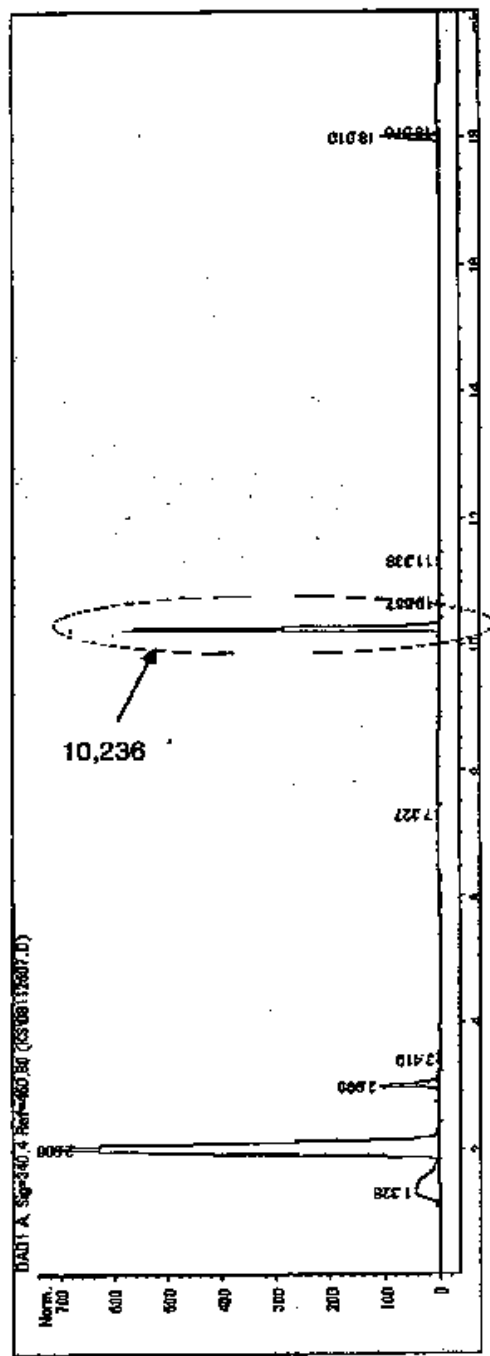
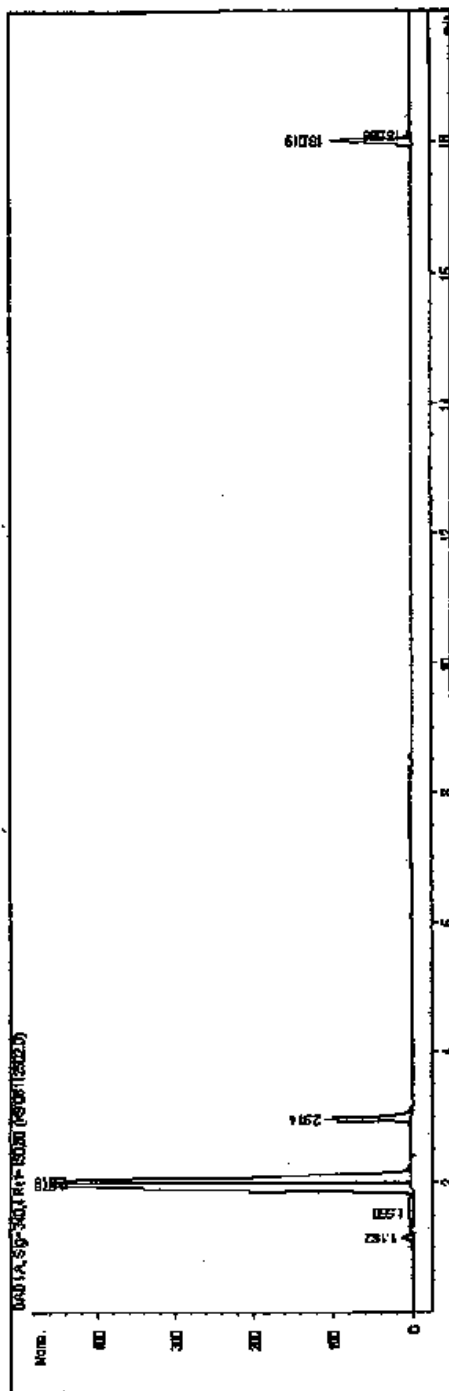


FIGURA 6

Control: proteína inactivada por calor, conversión después de 24 h, ningún producto detectable



Control: Conversión después de 0 h, ningún producto detectable

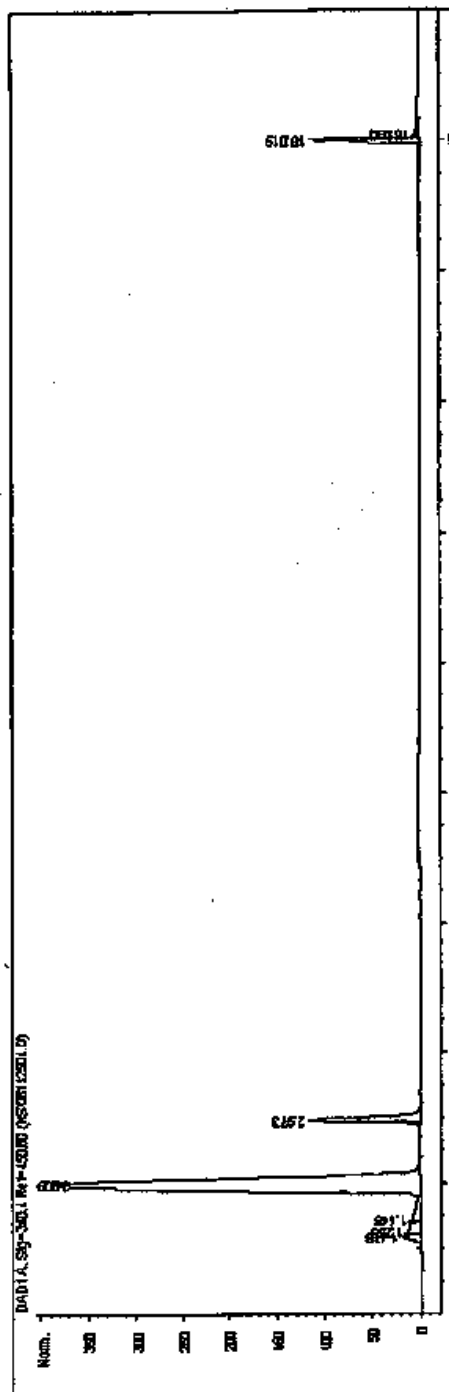


FIGURA 7

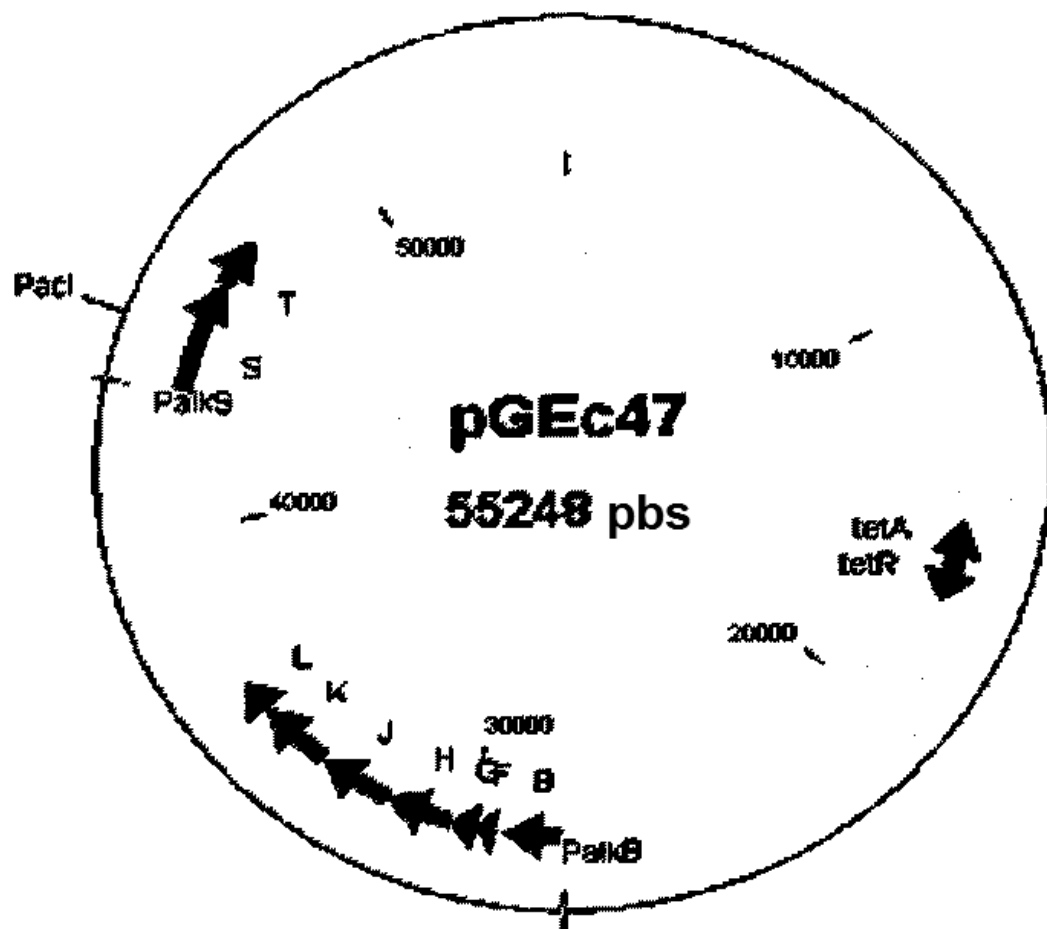


FIGURA 8

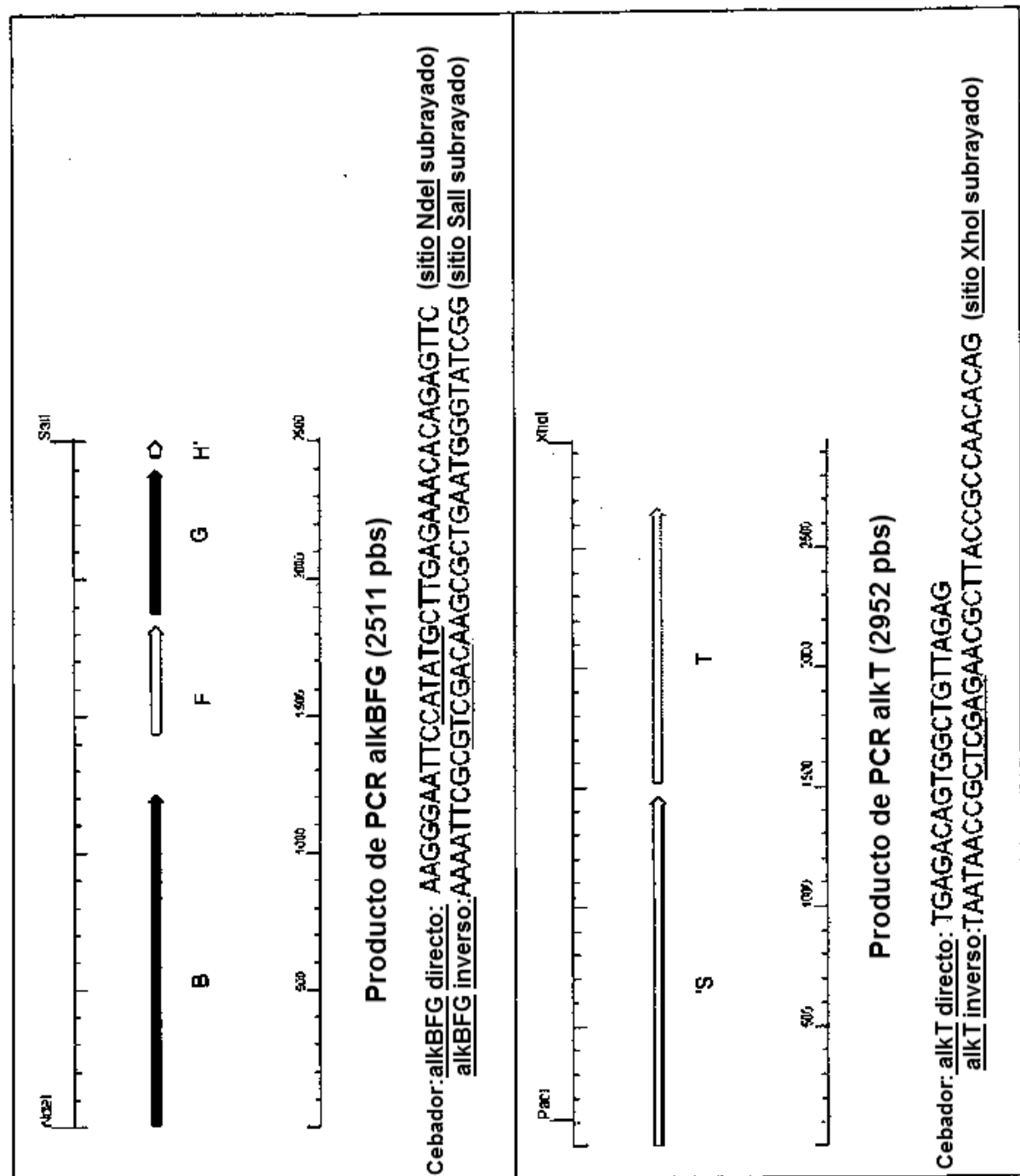


FIGURA 9

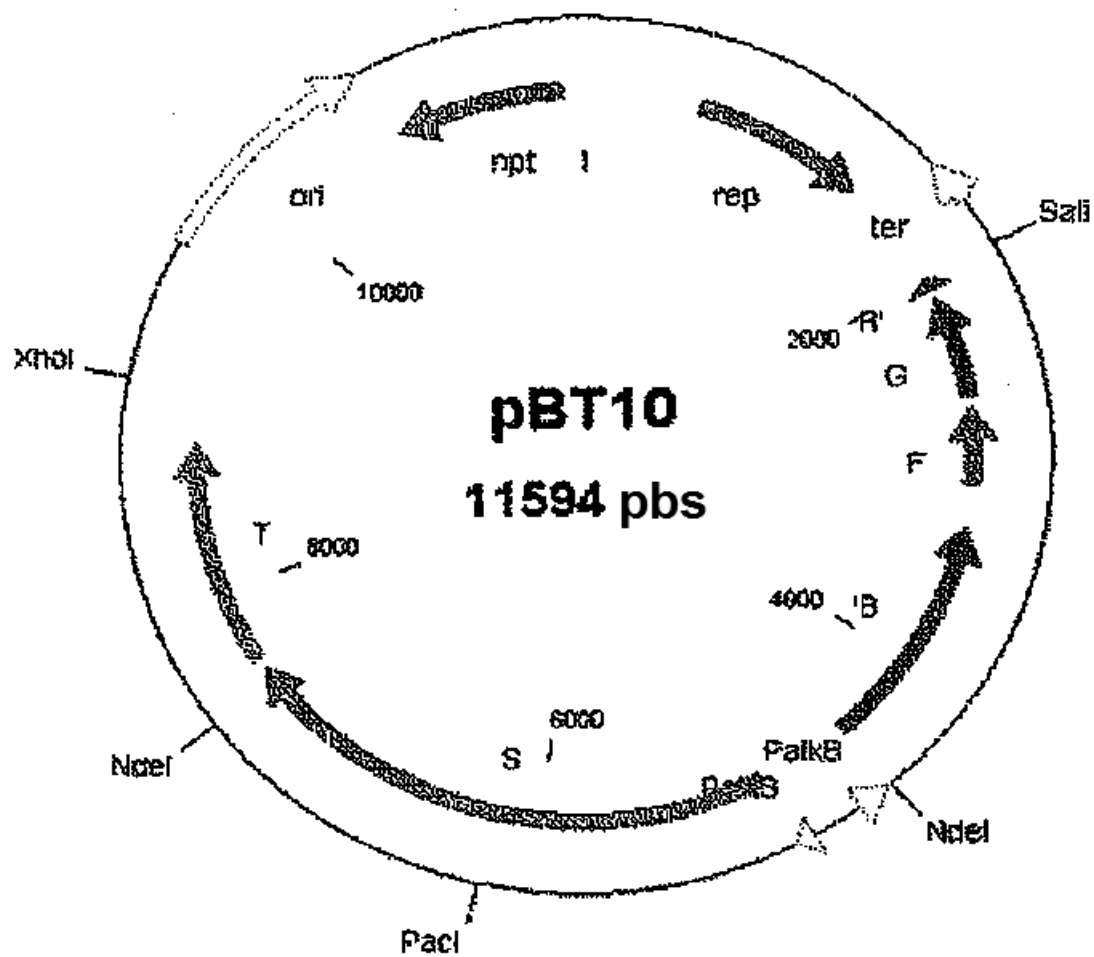


FIGURA 10

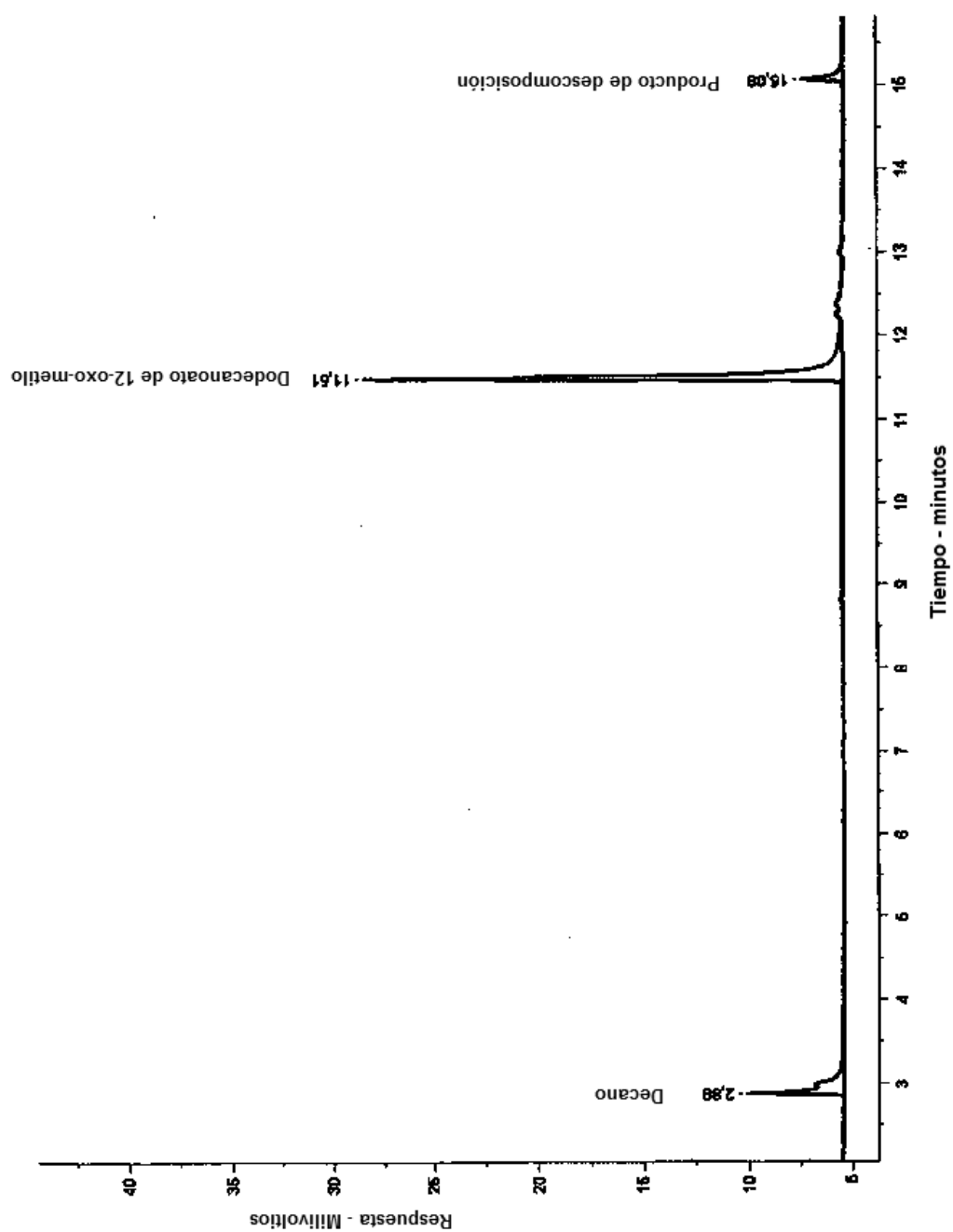


FIGURA 11

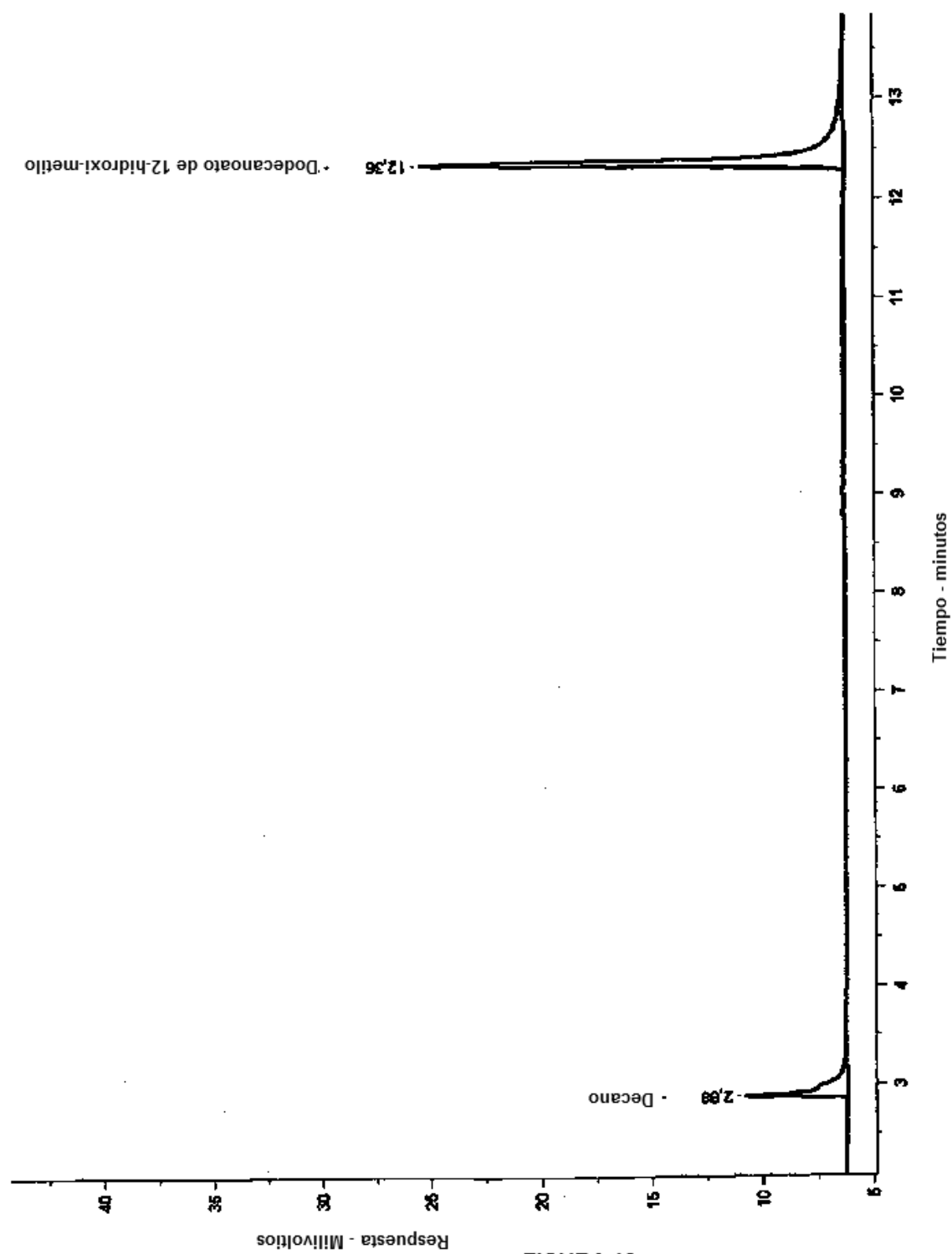


FIGURA 12

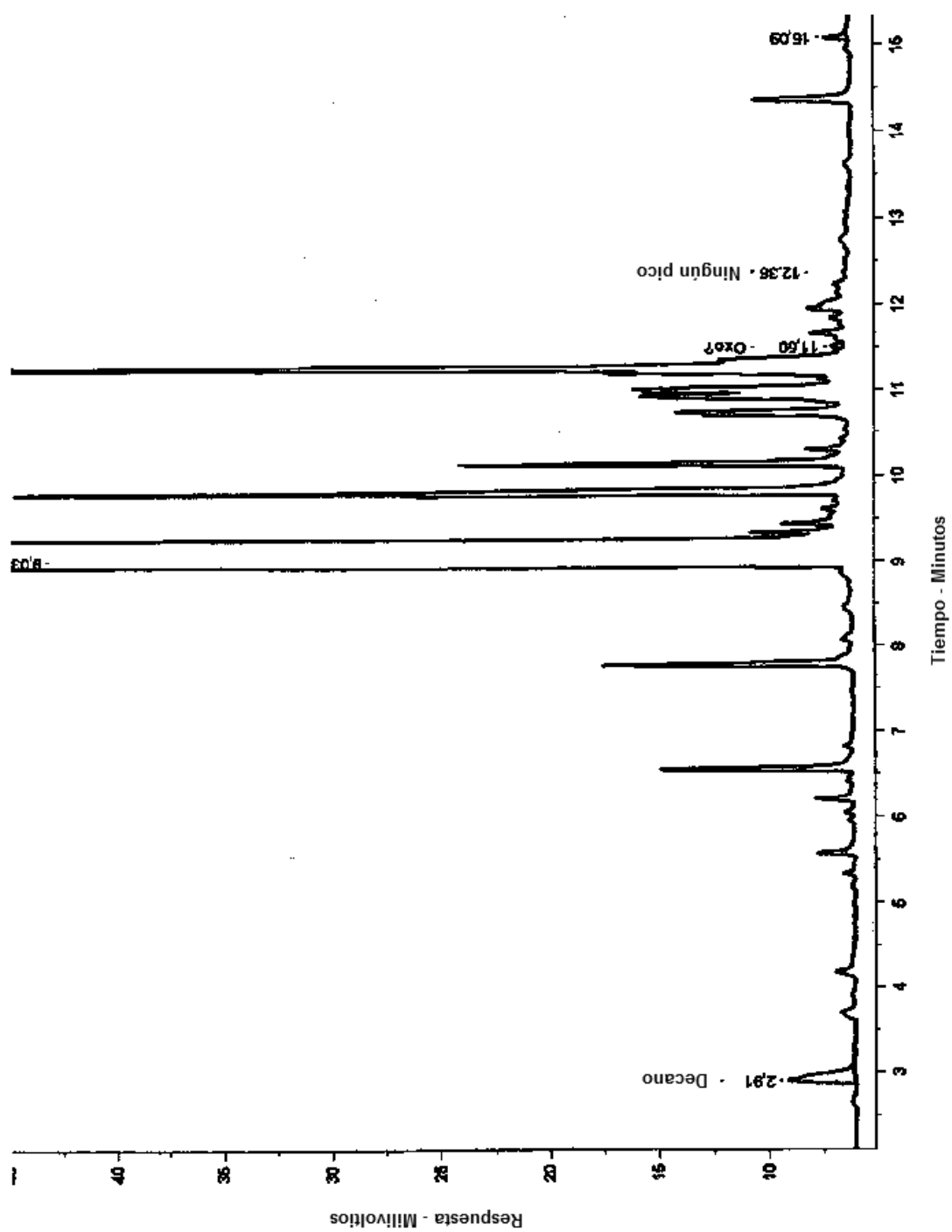


FIGURA 13

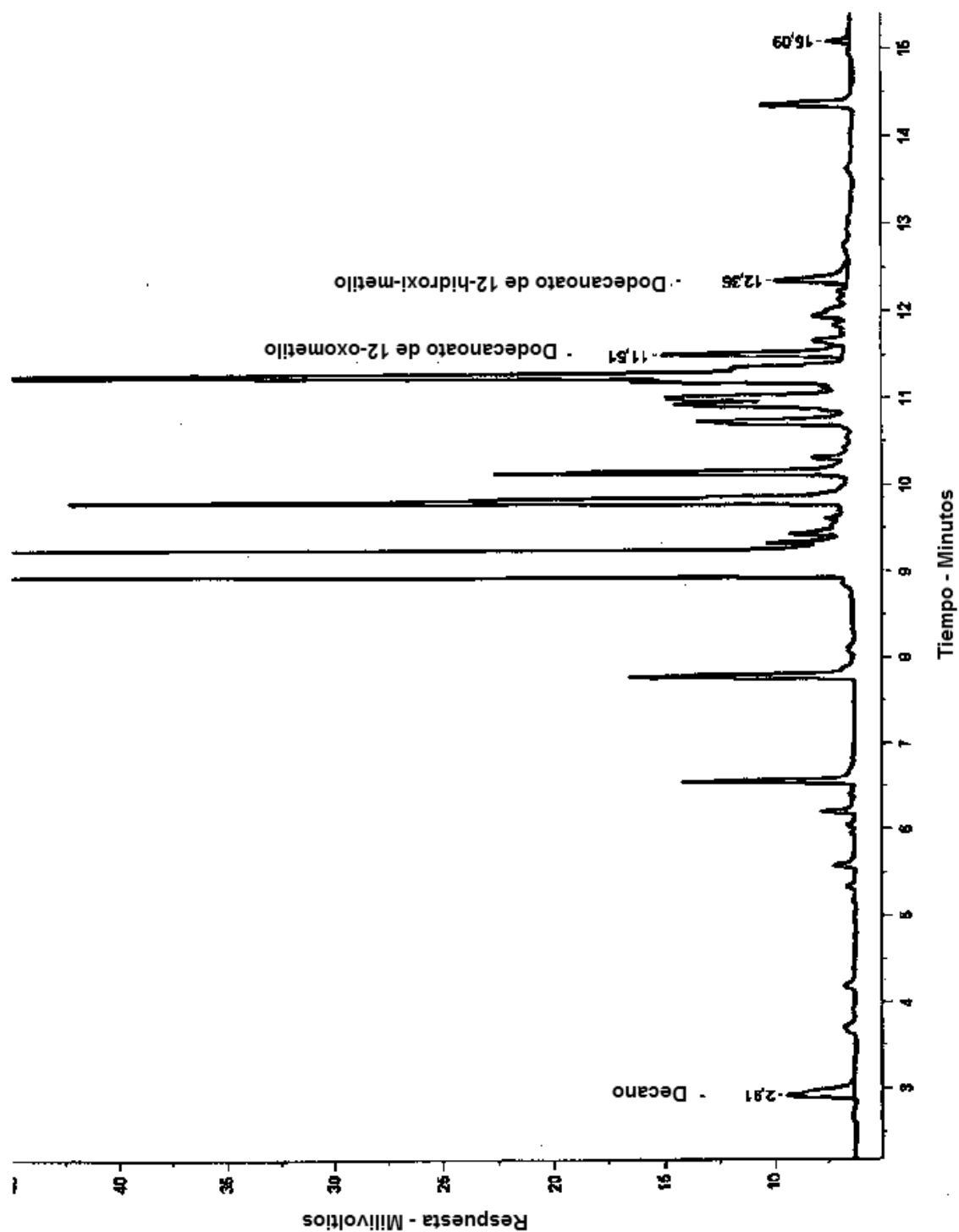


FIGURA 14

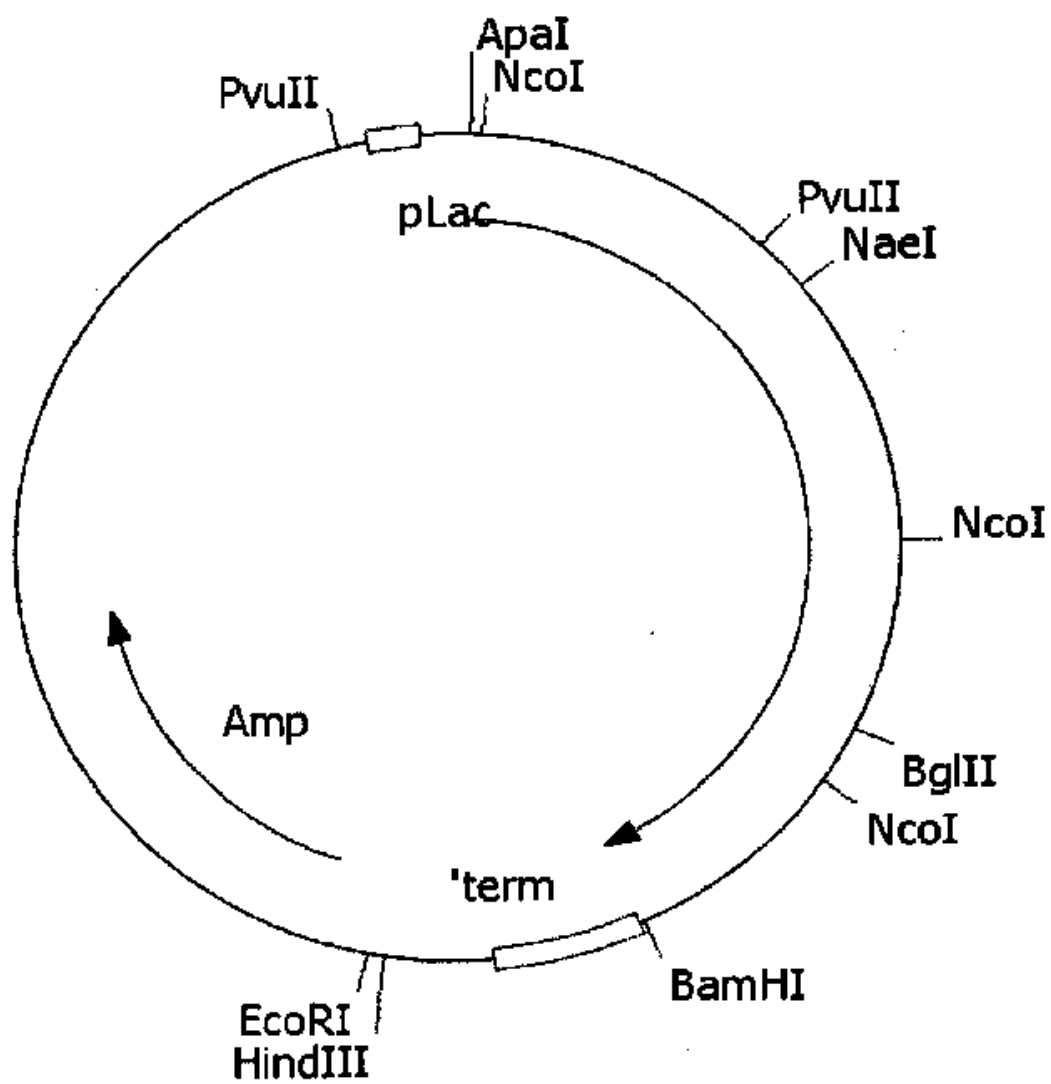


FIGURA 15

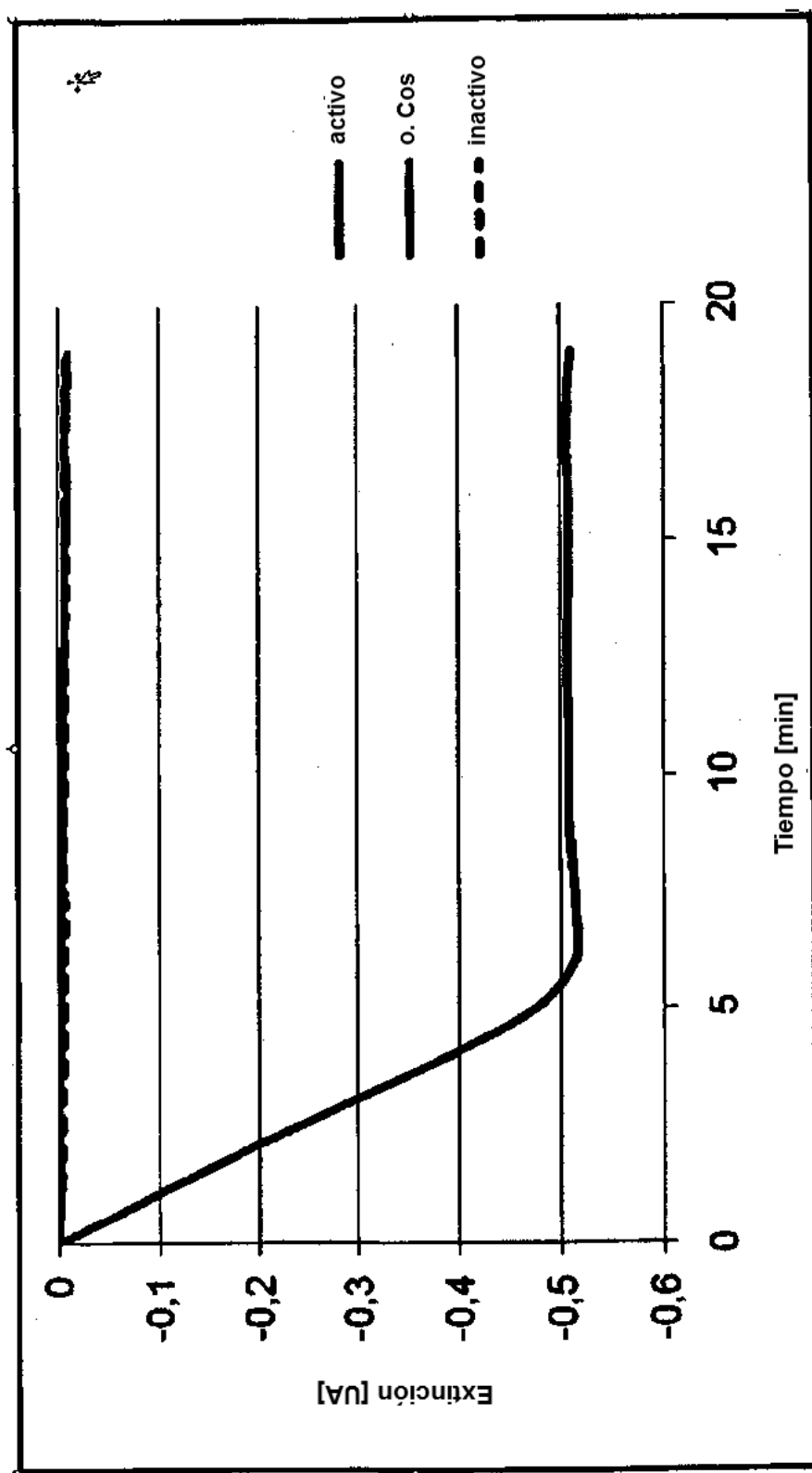
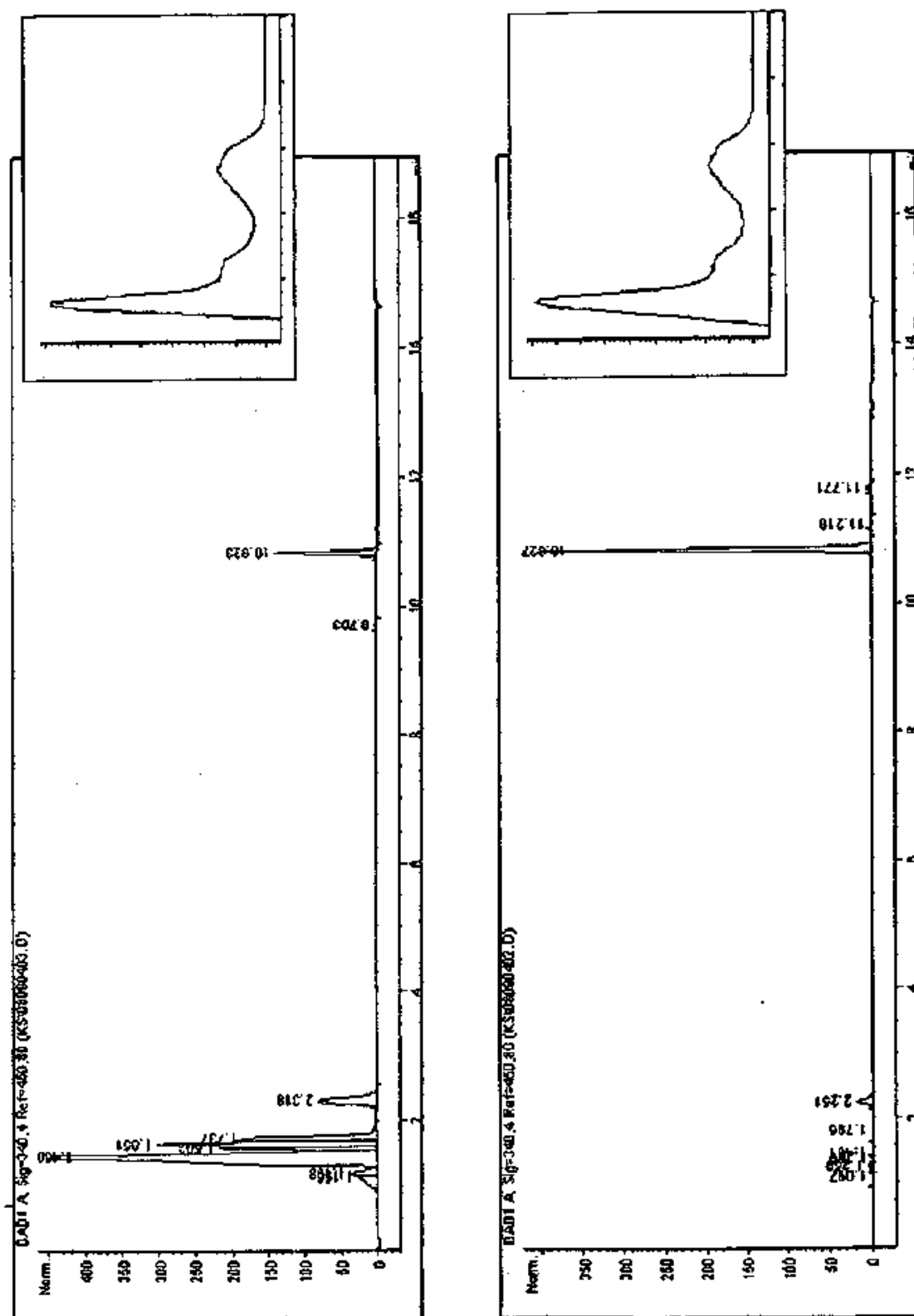


FIGURA 16

**FIGURA 17**

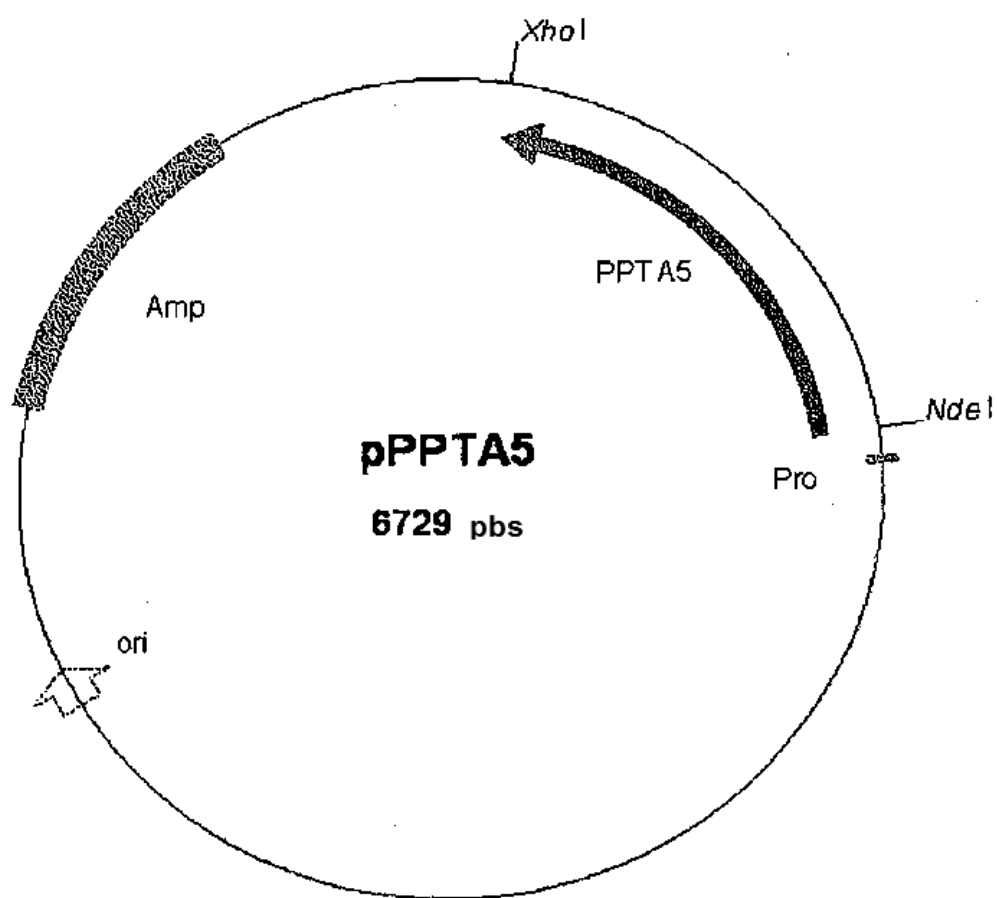


FIGURA 18

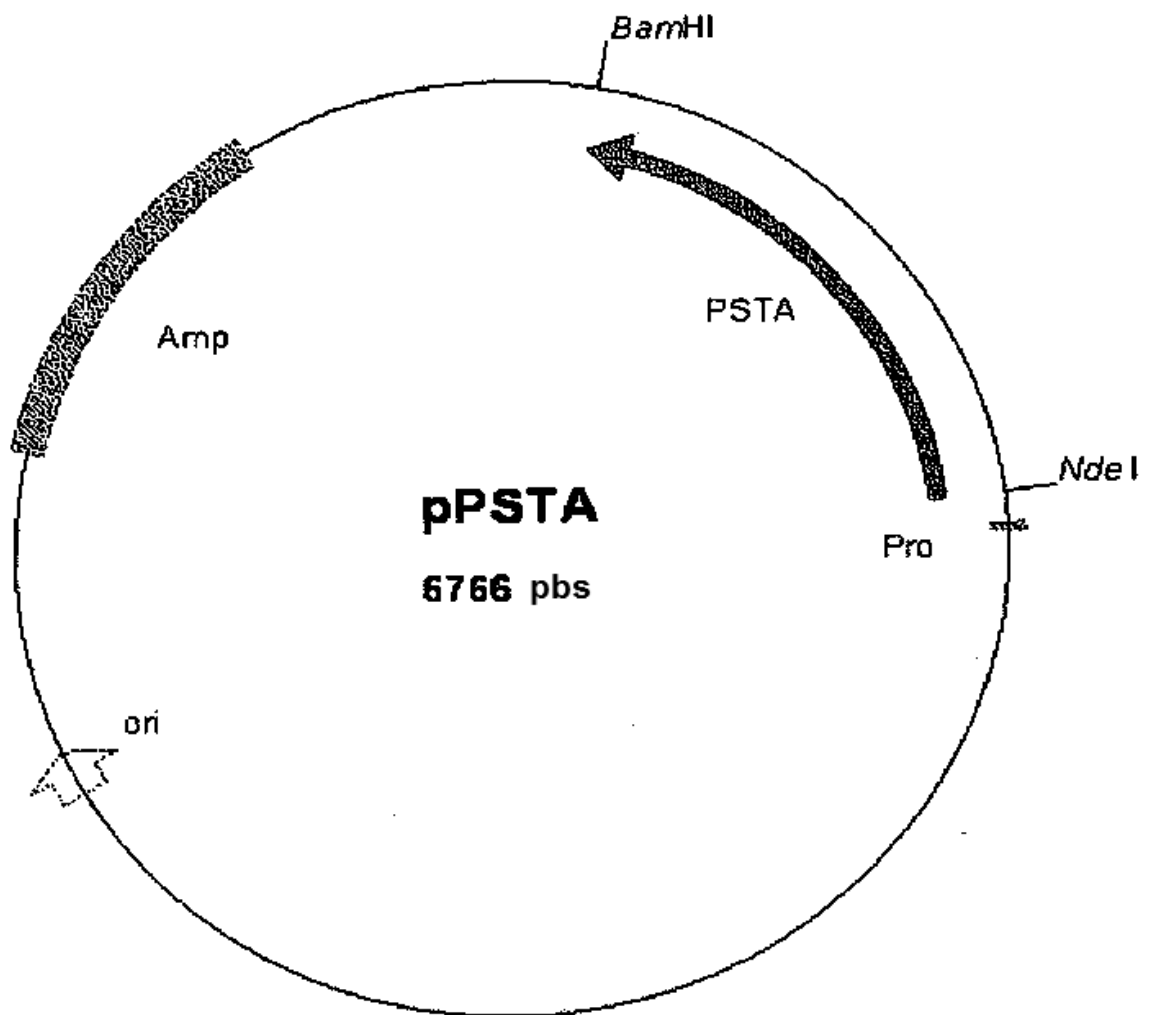


FIGURA 19

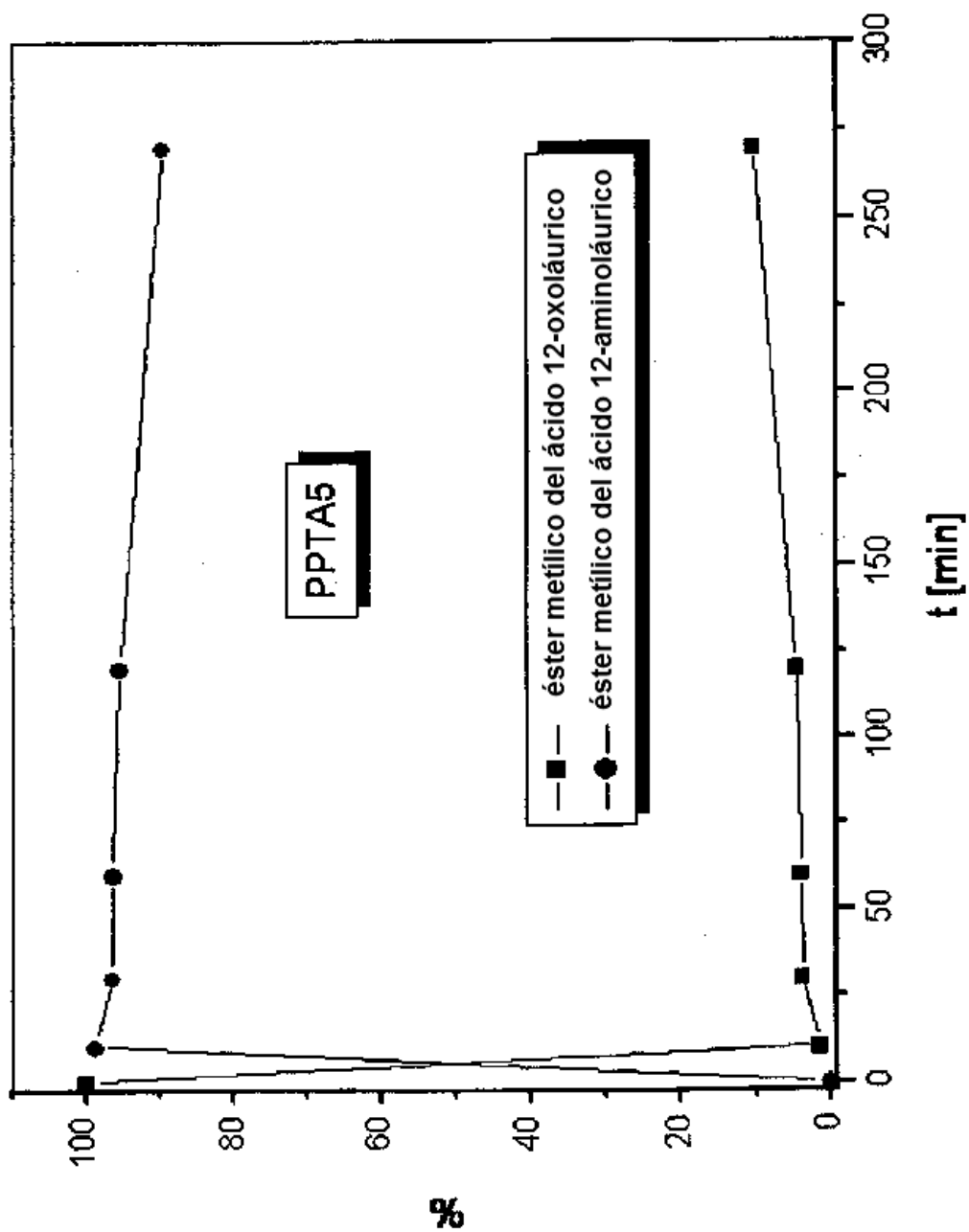


FIGURA 20

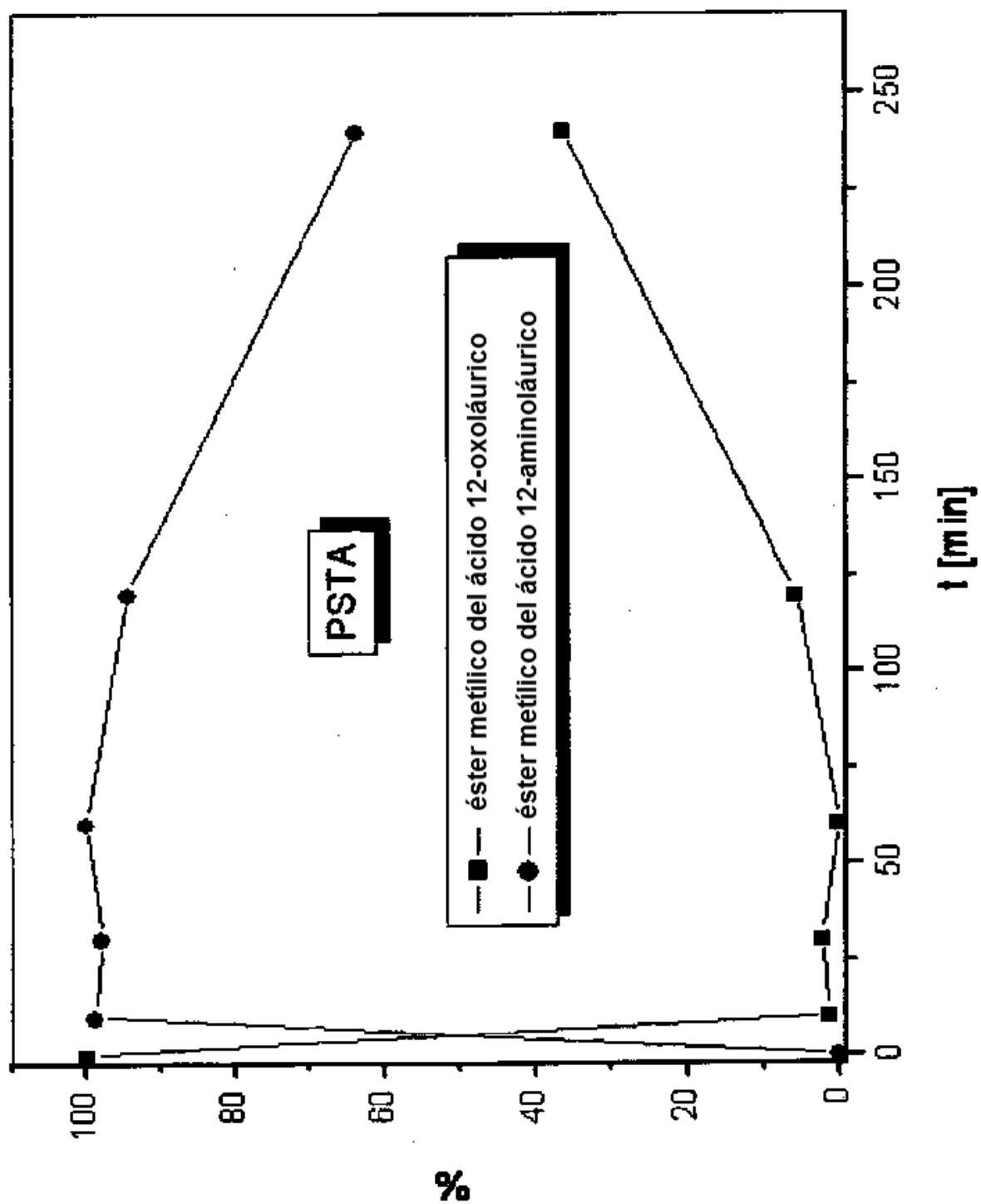


FIGURA 21