

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 791**

15 Folleto corregido: T3

Texto afectado: Lista de secuencias

48 Fecha de publicación de la corrección: 18.04.2016

51 Int. Cl.:

**C12N 9/78** (2006.01)

**C12N 11/00** (2006.01)

**C12P 7/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA CORREGIDA

T9

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08845012 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2215226**

54 Título: **Mejoras en nitrilasa microbiana inmovilizada para la producción de ácido glicólico**

30 Prioridad:

**31.10.2007 US 930744**

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

**08.03.2016**

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY  
(100.0%)  
Chestnut Run Plaza, 974 Center Road, P.O. Box  
2915  
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

**DICOSIMO, ROBERT y  
BEN-BASSAT, ARIE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 562 791 T9**

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

Mejoras en nitrilasa microbiana inmovilizada para la producción de ácido glicólico

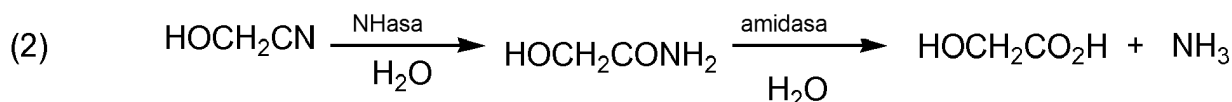
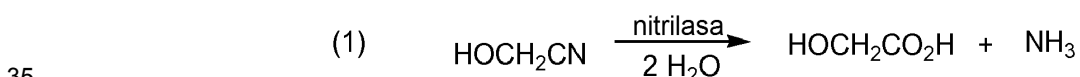
## Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de la síntesis de ácidos orgánicos y a la microbiología. Más específicamente, se proporciona un procedimiento para mejorar la actividad específica de un catalizador enzimático deshidratado que tiene actividad de nitrilasa para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico por rehidratación. En particular, se proporciona un procedimiento para pretratar un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa con glutaraldehído, inmovilizar las células pretratadas con glutaraldehído y reticular químicamente las células inmovilizadas antes de la deshidratación. Tras la rehidratación, el catalizador enzimático presenta una mejor actividad específica de nitrilasa en comparación con los catalizadores enzimáticos que tienen actividad de nitrilasa que son deshidratados y rehidratados sin dicho tratamiento.

## Antecedentes de la invención

15 El ácido glicólico (HOCH<sub>2</sub>COOH; Número de registro en *Chemical Abstracts* (CAS) 79-14-1) es el miembro más sencillo de la familia de los α-hidroxiácidos de los ácidos carboxílicos. Sus propiedades lo hacen ideal para un amplio espectro de aplicaciones de consumo e industriales, incluyendo el uso en la rehabilitación de pozos de agua, la industria del cuero, la industria del petróleo y gas, y la industria de lavandería y textil, como monómero en la preparación de poli(ácido glicólico) (PGA) y como componente en productos para el cuidado personal. El ácido glicólico es también un ingrediente principal para agentes de limpieza en una variedad de industrias (agentes de limpieza para equipos de tratamiento en las industrias láctea y alimentaria, agentes de limpieza para el hogar e instituciones, agentes de limpieza industriales [para equipo de transporte, mampostería, placas de circuitos impresos, calderas de acero inoxidable y equipos de procedimientos, torres de refrigeración/intercambiadores de calor] y el procesamiento de metales [para el decapado de metales, abrillantamiento de cobre, ataque químico, electrochapado y electropulido]). También se ha informado de que el poli(ácido glicólico) es útil como material barrera para gases (es decir, presenta altas características de barrera para el oxígeno) para el envasado de alimentos y bebidas carbónicas (documento WO 2005/106005 A1). Sin embargo, la síntesis química tradicional del ácido glicólico produce una cantidad significativa de impurezas que se deben eliminar antes de su uso. Por tanto sería muy bien recibida en la industria una nueva tecnología para producir comercialmente ácido glicólico, especialmente una que produzca ácido glicólico de alta pureza y a bajo coste.

30 Los catalizadores enzimáticos microbianos pueden hidrolizar un nitrilo (por ejemplo, glicolonitrilo) directamente a los correspondientes ácidos carboxílicos (por ejemplo, ácido glicólico) usando una nitrilasa (EC 3.5.5.7), donde no hay producción intermedia de la amida correspondiente (Ecuación 1), o por una combinación de las enzimas nitrilo-hidratasa (EC 4.2.1.84) y amidasa (EC 3.5.1.4), donde una nitrilo-hidratasa (NHasa) convierte inicialmente un nitrilo en una amida, y luego la amida es convertida posteriormente por la amidasa en el correspondiente ácido carboxílico (Ecuación 2):



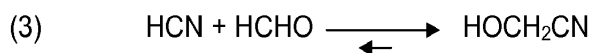
40 La hidrólisis enzimática de nitrilos a ácido glicólico con fines comerciales requiere la producción del catalizador enzimático a gran volumen por fermentación. Gran parte del volumen es atribuible al contenido de agua del caldo de fermentación. Debido a que dicho caldo de fermentación de gran volumen, el almacenamiento, y en muchos casos el transporte de dicho caldo de fermentación que contiene el catalizador enzimático, se plantean tanto problemas logísticos como económicos. Un mecanismo para proporcionar facilidad de almacenamiento y transporte del catalizador enzimático es aislar el catalizador enzimático del caldo de fermentación, inmovilizar el catalizador enzimático (por ejemplo, mediante atrapamiento en un gel de carragenina), y deshidratar el catalizador enzimático inmovilizado. El catalizador enzimático inmovilizado puede ser rehidratado antes de su uso para la producción de ácido glicólico. Sin embargo, la deshidratación y la rehidratación frecuentemente dan como resultado una pérdida significativa de la actividad enzimática.

45 La deshidratación o secado de catalizadores celulares inmovilizados se ha descrito previamente. La patente de EE.UU. 5.998.180 describe un procedimiento para la producción de una nitrilasa microbiana inmovilizada y secada, donde las células de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 40757 o NCIMB 408333 que contienen dicha nitrilasa retienen al menos 80% de su actividad inicial después de la inmovilización en perlas de poli(acrilamida) reticulada, y donde la nitrilasa celular inmovilizada resultante retiene al menos 90% de su actividad inmovilizada

inicial después de que las perlas de poliacrilamida reticulada sean secadas hasta 12% de humedad a 60°C. B. DeGiulio et al., (*World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 739-746, (2005)) describen la inmovilización de bacterias de ácido láctico en alginato de calcio, seguido por liofilización del catalizador celular inmovilizado resultante, en donde al menos 72% de las células retuvo la actividad metabólica después de la liofilización. La patente de EE.UU. 5.846.762 describe la deshidratación de perlas de gelatina que contienen celobiasa covalentemente inmovilizada, y señala en la columna 6, líneas 9-11, que el alginato de calcio y la perlas de kappa-carragenina, una vez deshidratados, generalmente no pueden ser rehidratados.

Ninguno de los métodos descritos inmediatamente antes, para la deshidratación o liofilización de catalizadores enzimáticos inmovilizados y posterior rehidratación implica una mejora en la actividad de la enzima recuperada después de la rehidratación, o mejora en la estabilidad de la actividad enzimática cuando se emplea el catalizador enzimático rehidratado resultante en una reacción para convertir sustrato en producto, en comparación con un catalizador enzimático inmovilizado y rehidratado comparable que no se preparó con células pretratadas con glutaraldehído.

Además de la pérdida de actividad del catalizador enzimático como resultado del tratamiento de dicho catalizador enzimático, tal como en el caso de deshidratación/rehidratación, la hidrólisis enzimática de glicolonitrilo a ácido glicólico requiere típicamente una forma sustancialmente pura de glicolonitrilo. Se han descrito previamente métodos para sintetizar glicolonitrilo por reacción de soluciones acuosas de formaldehído y cianuro de hidrógeno (Patentes de EE.UU. 2.175.805; 2.890.238; y 5.187.301; Ecuación 3).



Sin embargo, estos métodos dan como resultado típicamente un producto de reacción de glicolonitrilo acuoso que requiere una purificación significativa (por ejemplo, purificación por destilación) puesto que muchas de las impurezas y/o subproductos de la reacción (incluyendo el exceso de formaldehído reactivo) pueden interferir con la conversión enzimática de glicolonitrilo en ácido glicólico, incluyendo la supresión de la actividad del catalizador (es decir, disminución de la actividad específica). En particular, es bien sabido que el formaldehído puede crear modificaciones indeseables en las proteínas por reacción con los grupos amino de residuos de aminoácidos N-terminales y las cadenas laterales de residuos de arginina, cisteína, histidina, y lisina (Metz et al., *J. Biol. Chem.*, 279 (8): 6235-6243 (2004)). La supresión de la actividad del catalizador disminuye la productividad global del catalizador (es decir, gramos totales de ácido glicólico formados por gramo de catalizador), añadiendo un costo significativo al procedimiento global que puede hacer la producción enzimática económicamente no viable en comparación con la síntesis química. Como tales, se necesitan condiciones de reacción que puedan ayudar a proteger la actividad enzimática contra las impurezas indeseables que disminuyen la actividad del catalizador.

Se ha descrito un método de producir glicolonitrilo de alta pureza sometiendo formaldehído a un tratamiento térmico antes de la reacción de síntesis del glicolonitrilo (solicitudes de patente US 2006/0160196 y US 2006/0247467; Ecuación 3). Sin embargo, el glicolonitrilo puede disociarse reversiblemente en formaldehído y cianuro de hidrógeno. Por tanto, sigue habiendo necesidad de proteger la actividad de nitrilasa contra los efectos indeseables tanto del formaldehído como del cianuro de hidrógeno producidos por la disociación de glicolonitrilo.

El documento WO 01/04278 enseña un método para conservar células microbianas inmovilizadas o no inmovilizadas que tienen actividad de nitrilasa y para estabilizar la actividad de nitrilasa de células microbianas no inmovilizadas.

Panova et al., *Adv. Synth. Catal.* 2007, 349, 1462-1467 describen un procedimiento quimioenzimático para la producción de ácido glicólico de alta pureza usando un transformante de *E. coli* MG1655 inmovilizada en carragenina y reticulada con glutaraldehído/polietilenamina que expresa el mutante de nitrilasa de *A. facilis* 72W.

La patente de EE.UU. 5.508.181 describe también dificultades similares relacionadas con la inactivación rápida del catalizador enzimático cuando se convierten compuestos de nitrilo en alfa-hidroxiácidos. Específicamente, la patente de EE.UU. 5.508.181 establece que los compuestos de alfa-hidroxi-nitrilo se disocian parcialmente en los aldehídos correspondientes, de acuerdo con el equilibrio de disociación. Se informó de estos aldehídos inactivaban la enzima en un corto período de tiempo uniéndose a la proteína, lo que hace que sea difícil obtener el  $\alpha$ -hidroxiácido o la  $\alpha$ -hidroxi-amida en una alta concentración con una alta productividad a partir de alfa-hidroxi-nitrilos (col. 2, líneas 16-29). Como solución para evitar la inactivación de la enzima debido a la acumulación de aldehídos, se añadieron a la mezcla de reacción iones fosfato o hipofosfito. Similarmente, la patente de EE.UU. 5.326.702 describe el uso de iones sulfito, disulfito o ditionito para secuestrar el aldehído y prevenir la inactivación de la enzima, pero concluye que la concentración de  $\alpha$ -hidroxiácido producido y acumulada incluso usando tales aditivos no es suficiente para la mayoría de los propósitos comerciales.

Además la patente de EE.UU. 6.037.155 enseña que la baja acumulación de producto  $\alpha$ -hidroxiácido está relacionada con la inactivación enzimática en un corto período de tiempo, debido a la acumulación del aldehído disociado. Los inventores de dicha patente sugieren que la actividad enzimática es inhibida en presencia de cianuro de hidrógeno (Asano et al., *Agricultural Biological Chemistry*, Vol. 46, pp. 1165-1174 (1982)) generado en la

5 disociación parcial del  $\alpha$ -hidroxi-nitrilo en agua junto con el aldehído o cetona correspondiente (Mowry, David T., *Chemical Reviews*, vol. 42, pp. 189-283 (1948)). Los inventores abordan el problema de la inactivación enzimática inducida por el aldehído usando microorganismos cuya actividad enzimática podría ser mejorada por adición de una sustancia de cianuro a la mezcla de reacción. La adición de una sustancia de cianuro limitaría la disociación del  $\alpha$ -hidroxi-nitrilo a aldehído y cianuro de hidrógeno. Si bien esta táctica proporciona un beneficio para el sistema, sólo se refiere a un aspecto asociado con la inactivación enzimática en la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico, porque, como se ha indicado anteriormente, se sabe que el glicolonitrilo se disocia reversiblemente en cianuro de hidrógeno y formaldehído, y se sabe que ambos afectan negativamente a la actividad del catalizador enzimático.

10 El documento WO 2006/069114 proporciona un procedimiento para producir ácido glicólico a partir de formaldehído y cianuro de hidrógeno. Más específicamente, el formaldehído tratado térmicamente y el cianuro de hidrógeno se hacen reaccionar para producir glicolonitrilo que tiene bajas concentraciones de impurezas. El glicolonitrilo se convierte posteriormente en una solución acuosa de glicolato de amonio usando un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa derivado de *Acidovorax facilis* 72W (ATCC 57746).

15 Se ha desarrollado un procedimiento separado para proteger la actividad específica de un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa cuando convierte glicolonitrilo en ácido glicólico en presencia de formaldehído, donde se consiguieron mejoras significativas en la actividad y estabilidad del catalizador por adición a la mezcla de reacción de un protector de amina o por inmovilización del catalizador nitrilasa en o sobre una matriz que se compone de un protector de amina, por ejemplo PEI, polialilamina, PVOH/polivinilamina, etc. En ese sistema, se mejora la actividad específica del catalizador en presencia de formaldehído.

20 El documento WO 2007/036235 se refiere a la inmovilización de enzimas, absorbiendo las enzimas, una amina polifuncional y un agente de reticulación sobre un soporte poroso en partículas en un aparato mezclador o en un aparato de lecho fluido.

25 La patente EP1233057 enseña la esterilización de una célula microbiana viable habiendo producido en ella una enzima industrialmente útil, sin desactivar la enzima.

A pesar de que muchos de los medios anteriores mejoraron la productividad del catalizador nitrilasa para el ácido glicólico, se sigue todavía observando generalmente una disminución significativa en la actividad enzimática inicial de la nitrilasa microbiana inmovilizada en el uso de dicho catalizador en las reacciones para la hidrólisis de glicolonitrilo, por ejemplo, en reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del catalizador, o en la etapa inicial de puesta en marcha de una reacción continua en depósito agitado (abreviadamente en lo sucesivo CSTR por la expresión inglesa *Continuous Stirred Tank Reaction*) o un reactor de columna de lecho fijo. El problema de la pérdida significativa de actividad inicial de la nitrilasa durante la hidrólisis de glicolonitrilo fue abordado en parte por el pretratamiento del catalizador microbiano con glutaraldehído antes de la inmovilización en carragenina, donde se retuvo un porcentaje significativamente mayor de la actividad específica inicial de la nitrilasa microbiana inmovilizada ( $\mu$ moles de glicolonitrilo hidrolizado por minuto y por gramo de catalizador) durante la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico (como sal de amonio).

30 La patente de EE.UU. 4.288.552 describe (columna 1, líneas 46-49, y columna 2, líneas 50-55) que las enzimas sensibles al glutaraldehído (tales como tiol-enzimas (por ejemplo, nitrilasa) y otras con un grupo SH en el sitio activo, o muy cerca de él, de la molécula de enzima) son inactivadas por agentes reactivos con tiol, tal como glutaraldehído. Por lo tanto, no sólo era impredecible que el pretratamiento de un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa con glutaraldehído no diera como resultado una disminución significativa de la actividad de nitrilasa microbiana antes de la inmovilización, pero sorprendentemente, el pretratamiento con glutaraldehído se encontró que beneficiaba la actividad del catalizador enzimático, particularmente cuando el catalizador enzimático inmovilizado fue deshidratado, y posteriormente rehidratado antes de su uso para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico. El procedimiento de la presente invención evita una pérdida significativa de actividad durante las etapas de deshidratación/rehidratación, y da como resultado un catalizador enzimático inmovilizado y rehidratado con una actividad inicial y posterior estabilidad de la actividad del catalizador enzimático durante el posterior uso de la enzima inmovilizada rehidratada para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico. Este beneficio incorporado en el procedimiento descrito en la presente memoria que se proporciona para hacer frente a la necesidad de un procedimiento comercial, que incluye una etapa de deshidratación, para producir un catalizador enzimático que tiene actividad específica mejorada para la producción de ácido glicólico después de la rehidratación.

40 Por lo tanto, el problema a resolver es la necesidad de un procedimiento comercialmente viable para la producción de un catalizador enzimático que tenga actividad de nitrilasa para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico con actividad específica mejorada. Más específicamente, se necesita un procedimiento comercialmente aceptable para el uso de un catalizador enzimático que tenga actividad de nitrilasa para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico que minimice la pérdida de la actividad enzimática resultante de la deshidratación y la rehidratación antes de su uso y como resultado de la inactivación por impurezas o disociación de los reaccionantes.

**Sumario de la invención**

Los presentes problemas han sido resueltos proporcionando un procedimiento para producir un catalizador enzimático deshidratado que tiene actividad de nitrilasa con actividad específica mejorada, que comprende:

- (a) producir por fermentación un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa;
- 5 (b) pretratar dicho catalizador enzimático con glutaraldehído;
- (c) inactivar opcionalmente el glutaraldehído sin reaccionar con bisulfito después del pretratamiento con glutaraldehído;
- (d) recuperar el catalizador enzimático de (b) o (c) e inmovilizar dicho catalizador enzimático en carragenina;
- 10 (e) reticular el catalizador enzimático inmovilizado en carragenina resultante de (d) con glutaraldehído y polietilenimina; y
- (f) deshidratar el catalizador enzimático inmovilizado y reticulado producido en la etapa (e);

en donde dicho catalizador enzimático comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57.

- 15 También se describe un procedimiento para producir un catalizador enzimático inmovilizado y deshidratado que tiene una mejor actividad específica después de la rehidratación y el uso de dicho catalizador enzimático para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) producir por fermentación un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa;
- (b) pretratar dicho catalizador enzimático con glutaraldehído;
- 20 (c) inactivar opcionalmente el glutaraldehído sin reaccionar con bisulfito después del pretratamiento con glutaraldehído;
- (d) recuperar el catalizador enzimático de (b) o (c) e inmovilizar dicho catalizador enzimático en carragenina;
- (e) reticular el catalizador enzimático inmovilizado en carragenina resultante de (d) con glutaraldehído y polietilenimina; y
- 25 (f) deshidratar el catalizador enzimático inmovilizado y reticulado producido en la etapa (e).

Un aspecto adicional de la invención es rehidratar el catalizador inmovilizado y deshidratado de la etapa (f) anterior, en una solución acuosa. Y además, poner en contacto dicho catalizador enzimático rehidratado con glicolonitrilo en una solución acuosa, con lo cual se produce ácido glicólico. En un aspecto adicional, el ácido glicólico se recupera de dicha solución acuosa.

- 30 El catalizador enzimático inmovilizado que se produce por el procedimiento de las etapas (a) a (f) anteriores, conserva un porcentaje significativamente mayor de su actividad específica inicial ( $\mu$ moles de glicolonitrilo hidrolizado por minuto y por gramo de catalizador) cuando se compara con un catalizador enzimático inmovilizado preparado sin pretratamiento con glutaraldehído del catalizador enzimático antes de la inmovilización, reticulación, deshidratación y rehidratación, cuando se utiliza para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico (como la sal de amonio).
- 35

- La solicitud proporciona el catalizador enzimático deshidratado como un mejor catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa. El catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído inmovilizado, reticulado y deshidratado de la invención conserva al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90% de su actividad específica después de la rehidratación.
- 40

**Breve descripción de la figura, listado de secuencias y los depósitos biológicos**

La invención puede ser entendida más completamente a partir de la figura, lista de secuencias, los depósitos biológicos, y la descripción detallada que juntos forman esta solicitud.

**Figura**

- 45 La Figura 1, paneles A-G, es un alineamiento por el programa CLUSTAL W (versión 1.83 utilizando parámetros por defecto) de varias secuencias de nitrilasa. La secuencia distintiva del catalizador conservada que rodea al residuo de cisteína del catalizador está resaltada con sombreado gris. Están subrayados los aminoácidos que

representan la tríada catalítica (Glu<sub>48</sub>, Lys<sub>130</sub> y Cys<sub>164</sub>; con la numeración basada en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4).

#### Listado de secuencias

5 Las siguientes descripciones de secuencias y listados de secuencias adjuntas cumplen con las normas que rigen las descripciones de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en las solicitudes de patentes como se establece en el 37 C.F.R §1.821-1.825. Las descripciones de secuencias contienen el código de una letra para los caracteres de las secuencias de nucleótidos y los códigos de tres letras para los aminoácidos como se define de conformidad con las normas de la IUPAC-IYUB descritas en *Nucleic Acids Research* 13: 3021-3030 (1985) y en el *Biochemical Journal* 219 (Nº 2): 345-373 (1984). Los símbolos y formatos utilizados para los datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las normas establecidas en 37 C.F.R §1.822.

10 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del resto distintivo catalítico que abarca el residuo de cisteína esencial de las enzimas nitrilasas (Fórmula 1).

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de un resto distintivo catalítico preferido que abarca el residuo de cisteína esencial de las enzimas nitrilasas (Fórmula 2).

15 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificadora de nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W que comprende un cambio en el codón de inicio de TTG a ATG para facilitar la expresión recombinante en *E. coli*.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W (ATCC 55746).

20 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Alcaligenes faecalis* JM3 (GENBANK® BAA02684.1).

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 (GENBANK® Q03217).

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* K22 (GENBANK® Q02068).

25 La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Nocardia sp.* C-14-1 (GENBANK® AAX18182.1).

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Bordetella bronchiseptica* RB50 (GENBANK® NP\_887662.1).

30 La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Arabidopsis thaliana* (GENBANK® AAB60275.1 y AAA19627.1).

La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (GENBANK® YP\_399857.1).

La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (GENBANK® YP\_171411.1).

35 La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (GENBANK® NP\_442646.1).

La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Entomophila Pseudomonas* L48 (GENBANK® YP\_609048.1).

40 La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Zymomonas mobilis* (GENBANK® YP\_162942.1).

La SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Bacillus sp.* OxB-1 (GENBANK® BAA90460.1).

La SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Comamonas testosteroni* (GENBANK® AAA82085.1).

45 La SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Synechococcus sp.* CC9605 (GENBANK® YP\_381420.1).

## ES 2 562 791 T9

- La SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (GENBANK® YP\_260015.1).
- La SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Nocardia farcinica* IFM 10152 (GENBANK® YP\_119480.1).
- 5 La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Alcaligenes faecalis* 1650 (GENBANK® AAY06506.1).
- La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (GENBANK® AAY35081.1).
- 10 La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Bradyrhizobium* sp. BTail (GENBANK® ZP\_00859948.1).
- La SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 (GENBANK® CAC88237).
- La SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* ATCC™ 39484.
- 15 La SEQ ID NO: 26 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dio como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201Q; Leu → Gln).
- La SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 26) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Gln) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 20 La SEQ ID NO: 28 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201A; Leu → Ala).
- La SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 28) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Ala) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 25 La SEQ ID NO: 30 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201C; Leu → Cys).
- La SEQ ID NO: 31 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 30) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Cys) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 30 La SEQ ID NO: 32 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201T; Leu → Thr).
- 35 La SEQ ID NO: 33 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 32) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Thr) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 34 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dio como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201 G; Leu → Gly).
- 40 La SEQ ID NO: 35 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 34) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Gly) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 36 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dio como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201 H; Leu → His).
- 45 La SEQ ID NO: 37 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 36) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → His) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.

- La SEQ ID NO: 38 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201 K; Leu → Lys).
- 5 La SEQ ID NO: 39 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 38) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Lys) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 40 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201 N; Leu → Asn).
- 10 La SEQ ID NO: 41 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 40) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Asn) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 42 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (L201S; Leu → Ser).
- 15 La SEQ ID NO: 43 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 42) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 201 (Leu201 → Ser) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 44 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (F168K; Phe → Lys).
- 20 La SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 44) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (Phe168 → Lys) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 25 La SEQ ID NO: 46 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (F168M; Phe → Met).
- La SEQ ID NO: 47 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 46) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (Phe168 → Met) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 30 La SEQ ID NO: 48 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (F168T; Phe → Thr).
- La SEQ ID NO: 49 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 48) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (Phe168 → Thr) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 35 La SEQ ID NO: 50 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (F168V; Phe → Val).
- 40 La SEQ ID NO: 51 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 50) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (Phe168 → Val) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- La SEQ ID NO: 52 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácidos en el residuo de la posición 168 (T210A; Thr → Ala).
- 45 La SEQ ID NO: 53 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 52) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 210 (Thr210 → Ala) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.
- 50 La SEQ ID NO: 54 es la secuencia de nucleótidos de una nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W que comprende un cambio de codón que dió como resultado una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 168 (T210C; Thr → Cys).



La SEQ ID NO: 55 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante (SEQ ID NO: 54) que comprende una única sustitución de aminoácido en el residuo de la posición 210 (Thr210 → Cys) de la nitrilasa de *A. facilis* 72W.

5 La SEQ ID NO: 56 es la secuencia de nucleótidos de la nitrilasa de *A. facilis* 72W expresada en la cepa *i* SS1001 de *E. coli* (ATCC PTA-1177).

La SEQ ID NO: 57 es la secuencia de aminoácidos deducida de la nitrilasa mutante de *A. facilis* 72W expresada en la cepa SS1001 de *E. coli* (ATCC PTA-1177).

### Depósitos biológicos

10 Los siguientes depósitos biológicos se han hecho en los términos del Tratado de Budapest sobre Reconocimiento internacional del Depósito de microorganismos para los fines del procedimiento en materia de patentes:

Referencia para identificación del depositante	Designación internacional del depósito	Fecha del depósito
<i>Acidovorax facilis</i> 72W	ATCC 55746	8 de marzo 1996
<i>E. coli</i> SS1001	ATCC PTA-1177	11 de enero 2000

Como se usa en la presente memoria, "ATCC" se refiere al Organismo internacional para el depósito de microorganismos *American Type Culture Collection* domiciliado en ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. La "Designación del depósito Internacional" es el número de acceso al cultivo depositado en ATCC.

15 Los depósitos mencionados se mantendrán en el depósito internacional indicado durante al menos treinta (30) años y se pondrán a disposición del público tras la concesión de una patente que los describe. La disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patente concedidos por la acción gubernamental.

### Descripción detallada de la invención

20 Se proporciona un procedimiento para mejorar la actividad específica de un catalizador enzimático inmovilizado, reticulado y deshidratado, que tiene actividad de nitrilasa para la hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico después de la rehidratación. En particular, se proporciona un procedimiento para pretratar con glutaraldehído un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa, inmovilizar las células pretratadas con glutaraldehído y reticular químicamente las células inmovilizadas antes de la deshidratación. Después de la rehidratación, el catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado presenta mejor actividad específica de nitrilasa en comparación con catalizadores enzimáticos inmovilizados y reticulados que tienen actividad de nitrilasa que están deshidratados y rehidratados sin dicho tratamiento.

### Definiciones:

30 En esta descripción, se utilizan una serie de términos y abreviaturas. Salvo que se especifique lo contrario se aplican las siguientes definiciones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "que comprende" significa la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados a los que se refieren las reivindicaciones, pero que no excluye la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, componentes o sus grupos.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" que modifica la cantidad de un ingrediente o reaccionante de la invención empleado se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, por los procedimientos típicos de medición y manipulación de líquidos utilizados para preparar concentrados o soluciones de uso en el mundo real; por errores involuntarios en estos procedimientos; por diferencias en la fabricación, la fuente o la pureza de los ingredientes empleados para preparar las composiciones o llevar a cabo los métodos; y similares. El término "aproximadamente" incluye también cantidades que difieren debido a las diferentes condiciones de equilibrio para una composición que resulta de una mezcla inicial particular. Sean o no modificadas por el término "aproximadamente", las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades. En una realización, el término "aproximadamente" significa dentro de 10% del valor numérico descrito, preferiblemente dentro de 5% del valor numérico descrito.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glicolonitrilo" se abrevia como "GLN" y es sinónimo de hidroxiacetonitrilo, 2-hidroxiacetonitrilo, hidroximetilnitrilo y todos los demás sinónimos del compuesto de número de registro en el *Chemical Abstracts Service* (CAS) 107-16-4.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ácido glicólico" se abrevia como "GLA" y es sinónimo de ácido hidroxiaacético, ácido hidroxietanoico y todos los demás sinónimos del compuesto de número de registro en el CAS 79-14-1. El ácido glicólico producido por los presentes procedimientos puede estar en forma del ácido carboxílico protonizado y/o la sal de amonio correspondiente.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glicolato de amonio" se abrevia "NH<sub>4</sub>GLA".

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glicolamida" es la amida derivada de la reacción de amoníaco con ácido glicólico y se refiere a todos los otros sinónimos de compuesto que tienen el número de registro CAS 598-42-5.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glicólido" se refiere al compuesto de número de registro en el CAS 502-97-6.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "formaldehído" se abrevia como "FA" y es sinónimo de aldehído fórmico, aldehído metílico, oxometano, y todos los demás sinónimos del compuesto de número de registro en el CAS 50-00-0. El formaldehído comercialmente disponible se compone típicamente de una mezcla de formaldehído monómero ("formaldehído libre") y diversos oligómeros de formaldehído junto con algo de metanol (típicamente alrededor de 1% en peso a alrededor de 15% en peso).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cianuro de hidrógeno" es sinónimo de ácido prúsico, ácido cianhídrico y todos los demás sinónimos del compuesto de número de registro en el CAS 200-821-6.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glutaraldehído" se abrevia "GA" y es sinónimo de pentanodial, 1,5-pentanodial, 1,5-pentanodiona, aldehído diglutárico, glutaral, glutardialdehído, dialdehído del ácido glutárico, dialdehído glutárico y todos las demás sinónimos de los compuestos de número de registro en el CAS 111-30-8.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "bisulfito" o "bisulfito de sodio" es sinónimo de sal sódica del ácido sulfuroso, sal monosódica del ácido sulfuroso, sulfito de sodio e hidrógeno, hidrogenosulfito de sodio, sulfito monosódico, sulfito ácido de sodio, bisulfito de sodio, bisulfato de sodio (sic), hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio (NaHSO<sub>3</sub>) y todos los otros sinónimos del compuesto de número de registro en el CAS 7631-90-5.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "recuperación" significa aislamiento, purificación o transferencia del producto formado por el presente procedimiento. Los métodos para aislar y purificar el o los productos a partir de la mezcla de reacción son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, aunque sin limitación, precipitación selectiva, cristalización, filtración, extracción con disolventes reactivos, intercambio iónico, electrodialisis, polimerización, destilación, descomposición térmica, alcoholisis, cromatografía en columna y sus combinaciones. En una realización, el término "recuperación" también puede incluir transferencia de la mezcla de productos (típicamente después de filtrar el catalizador enzimático) a otra reacción para crear uno o más productos. En una realización preferida, se utiliza intercambio iónico para recuperar el ácido glicólico.

35 Tal como se usa en la presente memoria, los términos "catalizador enzimático", "catalizador nitrilasa" o "catalizador de células microbianas" se refiere a un catalizador que se caracteriza por una actividad de nitrilasa (es decir, comprende al menos un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa) para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico y amoníaco. Una enzima nitrilasa convierte directamente un nitrilo (preferiblemente, un nitrilo alifático) en el ácido carboxílico correspondiente, sin formación de la amida correspondiente como producto intermedio (véase la ecuación 1). Las nitrilasas comparten varios dominios distintivos conservados conocidos en la técnica, incluyendo un dominio distintivo en la presente invención denominado "secuencia distintiva catalítica" o "secuencia distintiva". Esta región comprende un residuo de cisteína esencial (por ejemplo, Cys<sub>164</sub> de la SEQ ID NO: 4). Como tales, los polipéptidos que tienen actividad de nitrilasa se pueden identificar por la existencia de la secuencia distintiva de dominio catalítico (SEQ ID NO: 1). En una realización preferida, la secuencia distintiva es la SEQ ID NO: 2. El catalizador enzimático puede estar en forma de células microbianas enteras o células microbianas permeabilizadas. Tal como se usa en la presente memoria, "catalizador enzimático reciclado" se refiere a un catalizador enzimático que se reutiliza como catalizador enzimático en reacciones por lotes o continuas. Dependiendo de la etapa del procedimiento de producción o utilización del catalizador enzimático descrito en la presente memoria, el catalizador enzimático puede ser pretratado con glutaraldehído, inmovilizado, reticulado y deshidratado o rehidratado.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "*Acidovorax facilis*" y "*A. facilis*" se usan intercambiamente y se refieren a *Acidovorax facilis* 72W depositado en la *American Type Culture Collection* (una autoridad internacional de depósito), que tiene el número de acceso 55746 ("ATCC 55746"). Los nitrilasas mutantes derivadas de *A. facilis* 72W caracterizadas por su mejor actividad de nitrilasa en convertir glicolonitrilo en ácido glicólico han sido descritas previamente (véase la patente de EE.UU. 7.198.927 compartida con la sociedad titular de la presente). Ejemplos de estas nitrilasas mutantes derivadas de *A. facilis* 72W se proporcionan en las SEQ ID NO: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 y 55.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "*Escherichia coli*" y "*E. coli*". se usan intercambiamente. Varias cepas de *E. coli* adecuadas para la expresión recombinante se describen en la presente memoria, incluyendo, aunque sin limitación, *E. coli* MG1655 que tiene el número de depósito internacional ATCC 47076, *E. coli* FM5 que tiene el número de depósito internacional ATCC 53911, *E. coli* W3110 que tiene el número de depósito internacional ATCC 27325, *E. coli* MC4100 que tiene el número de depósito internacional ATCC 35695 y *E. coli* W1485 que tiene el número de depósito internacional ATCC 12435. En una realización las cepas de *Escherichia coli* adecuadas incluyen *E. coli* FM5 (ATCC 53911) y *E. coli* MG1655 (ATCC 47076).

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "*E. coli* SS1001" o "SS1001" se refieren a una cepa de *E. coli* transformada que expresa la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W que tiene el número de acceso en ATCC PTA-1177 (véase la patente de EE.UU. 6.870.038; incorporada en la presente memoria en su totalidad como referencia). La nitrilasa de *E. coli* SS1001 expresada recombinantemente (SEQ ID NO: 57) contiene 2 cambios de secuencia menores en comparación con la secuencia de nitrilasa de 72W de tipo natural (SEQ ID NO: 4). El codón de iniciación estaba cambiado de GTG a ATG para facilitar la expresión recombinante y se introdujo un artefacto durante la clonación que dio como resultado un cambio de un único aminoácido cerca del extremo C (Pro367 [CCA] → Ser [TCA]).

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "mezcla de reacción de glicolonitrilo acuosa adecuada" y "mezcla de reacción acuosa adecuada" se refieren a los materiales (incluyendo al menos un protector de amina) y agua en la que entran en contacto el glicolonitrilo y el catalizador enzimático. Los componentes de la mezcla de reacción acuosa adecuada se proporcionan en la presente memoria y los expertos en la técnica apreciarán la gama de variaciones de componentes adecuada para este procedimiento.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "solución de glicolato de amonio acuosa", "solución acuosa que comprende glicolato de amonio" y "solución acuosa de glicolato de amonio" se utilizarán para describir una solución acuosa que comprende glicolato de amonio producido por la hidrólisis enzimática de glicolonitrilo bajo condiciones típicas de reacción enzimática (es decir, un intervalo de pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8). La solución acuosa de glicolato de amonio comprende glicolato de amonio a una concentración de al menos aproximadamente 0,1 por ciento en peso a aproximadamente 99% en peso de glicolato de amonio. En otra realización, la solución acuosa de glicolato de amonio se compone de al menos aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 75% en peso glicolato de amonio. En una realización adicional, la solución acuosa de glicolato de amonio se compone de al menos aproximadamente 20% en peso a aproximadamente 50% en peso de glicolato de amonio. El pH de la solución acuosa de glicolato de amonio puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 12, preferiblemente 5 a aproximadamente 10, más preferiblemente 6 a aproximadamente 8. El pH se puede ajustar según sea necesario antes de iniciar las etapas del procedimiento relacionadas con la recuperación del ácido glicólico (en forma de ácido o sal) de la solución acuosa de glicolato de amonio.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "productividad del catalizador" y "productividad del catalizador enzimático" se refieren a la cantidad total de producto producida por gramo de peso de células secas de catalizador enzimático. En la presente invención, el catalizador enzimático comprende una enzima nitrilasa (EC 3.5.5.7) y el producto formado es ácido glicólico y/o glicolato de amonio (dependiendo del pH de la reacción). En general, los procedimientos producidos que pretenden producir ácido glicólico se realizan en condiciones esencialmente de pH neutro de modo que el ácido glicólico producido esté predominantemente en forma de la sal correspondiente del ácido glicólico (es decir, glicolato de amonio). Generalmente, en reacciones por lotes con reciclaje del catalizador, la actividad del catalizador disminuye con cada reacción de reciclaje (inactivación enzimática).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "productividad volumétrica" se refiere a la producción volumétrica de ácido glicólico en la reacción, expresada como gramos de ácido glicólico producido por volumen de mezcla de reacción por unidad de tiempo. Típicamente la productividad volumétrica se expresa como gramos de ácido glicólico /L/h.

El término "actividad de nitrilasa" o "actividad específica" se refiere a la actividad enzimática por unidad de masa (por ejemplo, miligramos) de proteína, peso de células secas o peso de perlas (catalizador inmovilizado) cuando se convierte glicolonitrilo en ácido glicólico (o el glicolato de amonio correspondiente). Se midieron comparaciones de la actividad de nitrilasa proporcionales al peso de células secas o al peso de perlas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "una unidad de actividad enzimática" o "una unidad de actividad de nitrilasa" o "U" se define como la cantidad de actividad enzimática requerida para la producción de 1  $\mu$ mol de producto ácido glicólico por minuto (U de GLA/g en peso de células secas o en peso de perlas) a una temperatura especificada (por ejemplo, 25°C).

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "actividad relativa de nitrilasa", "mejor actividad de nitrilasa", y "mejora relativa de la actividad de nitrilasa" se refieren a la actividad de nitrilasa expresada como un múltiplo (o fracción) de una actividad de nitrilasa de referencia (control). Las nitrilasas descritas en la presente

memoria muestran una mejora significativa de la actividad de nitrilasa en relación con la actividad de nitrilasa observada con la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W natural. Una "mejora significativa" de la actividad relativa de nitrilasa es una mejora de al menos 1,5 veces mayor que la actividad de nitrilasa en comparación con la actividad de nitrilasa de un control en condiciones de reacción idénticas. En otra realización, la mejora es al menos 2 veces mayor que la actividad de nitrilasa en comparación con la actividad de nitrilasa del control en condiciones de reacción idénticas. En una realización adicional, la mejora es al menos 4 veces mayor que la actividad de nitrilasa en comparación con la actividad de nitrilasa del control en condiciones de reacción idénticas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "velocidad de reacción inicial" es una medición de la velocidad de conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico en las condiciones de reacción indicadas, donde la medición de la velocidad de reacción comienza tras la adición inicial de glicolonitrilo a la mezcla de reacción, y donde la velocidad de reacción se mide durante un período de tiempo en el que la concentración de glicolonitrilo se mantiene por encima de aproximadamente 50 milimolar (mM) durante el curso de la reacción. La velocidad de reacción se mide como el cambio en la concentración de ácido glicólico producido por unidad de tiempo (por ejemplo, en moles de ácido glicólico/L/min o mM de ácido glicólico/hora).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "mejora de la retención de la actividad específica inicial" se refiere a una comparación de un catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado con un catalizador enzimático no pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado, teniendo ambos actividad de nitrilasa, durante la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico en las condiciones de reacción establecidas después de la deshidratación y rehidratación, medida como micromoles de ácido glicólico producido por minuto y por g en peso de células secas de catalizador enzimático, o micromoles de ácido glicólico producido por minuto y por g de catalizador enzimático inmovilizado y reticulado, en donde la actividad específica como se mide en una primera reacción o reacción "inicial" después de la rehidratación, es retenida en mayor medida por el catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado que por el catalizador enzimático no pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado, para una o más reacciones posteriores. La mejora más notable, como se describe en la presente memoria, es para la cantidad de actividad retenida para la reacción inmediatamente después de una reacción por lotes inicial, medida en una o más reacciones por lotes subsiguientes con reciclaje del catalizador. Una segunda mejora notable, como se describe en la presente memoria, es para la cantidad de actividad retenida durante el curso de la realización de la reacción en un reactor de depósito continuamente agitado (CSTR), o en un reactor de flujo de pistón en lecho fijo, o en un reactor de lecho fluidizado o de lecho semi-fluidizado, después de la producción de al menos 40 g de ácido glicólico por gramo en peso de células secas de catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído, inmovilizado y reticulado que ha sido deshidratado y rehidratado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "organismo recombinante", "hospedante transformado", "transformante", "organismo transgénico", y "hospedante microbiano transformado" se refieren a un organismo hospedante que ha sido transformado con DNA heterólogo o extraño. Los organismos recombinantes de la presente invención expresan secuencias codificadoras extrañas o genes que codifican la enzima nitrilasa activa. "Transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de DNA al organismo hospedante. El fragmento de DNA transferido puede ser incorporado cromosómica o extracromosómicamente (es decir, a través de un vector) en el organismo hospedante. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "casete de transformación" se refiere a un fragmento específico de DNA que contiene un conjunto de elementos genéticos convenientemente dispuestos para su inserción en una célula hospedante, por lo general como parte de un plásmido. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "casete de expresión" se refiere a un fragmento específico de DNA que contiene un conjunto de elementos genéticos convenientemente dispuestos para su inserción en una célula hospedante, por lo general como parte de un plásmido que también permite una mayor expresión génica en el hospedante.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "fragmento de ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se refieren a una molécula de DNA que puede codificar un gen completo, la secuencia codificadora, y/o secuencias reguladoras que preceden (5', aguas arriba) o siguen (3', aguas abajo) a la secuencia codificadora. En un aspecto, las presentes moléculas de ácidos nucleicos codifican polipéptidos que tienen actividad de nitrilasa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "gen" se refiere a una molécula de ácido nucleico que expresa una proteína específica. Como se usa en la presente memoria, puede o no puede incluir secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificadoras) y que siguen (secuencias 3' no codificadoras) a la secuencia codificadora. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen natural, que comprende secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que se derivan de diferentes fuentes o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la encontrada en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen natural en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo hospedante, pero que se introduce en el organismo hospedante por transferencia de genes. Los genes extraños pueden comprender genes naturales insertados en un organismo no natural o genes

quiméricos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma por un procedimiento de transformación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia codificadora" se refiere a una secuencia de DNA que codifica una secuencia específica de aminoácidos. Tal como se usa en la presente memoria, "secuencias reguladoras adecuadas" se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias no codificadoras en 5'), dentro de, o aguas abajo (secuencias no codificadoras en 3') de una secuencia codificadora, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del RNA, o la traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias situadas antes de las secuencias que se traducen, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitios de procesamiento del RNA, sitios de unión a efectores, y estructuras de tallo-bucle.

"Promotor" se refiere a una secuencia de DNA capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o RNA funcional. En general, una secuencia codificadora está situada en 3' respecto a una secuencia promotora. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen natural o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de DNA sintéticos. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de tipos de células, en la mayoría de veces, o bajo la mayoría de condiciones ambientales se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Los promotores que hacen que un gen se exprese sólo en presencia de un compuesto particular o condición ambiental se denominan comúnmente "promotores inducibles". Dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido completamente definidos, los fragmentos de DNA de diferentes longitudes pueden tener idéntica actividad promotora.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "unida operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico con una única molécula de ácido nucleico de modo que la función de una secuencia se ve afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificadora cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificadora (es decir, que la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras pueden unirse operativamente a las secuencias reguladoras en orientación con sentido o antisentido.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "secuencias no codificadoras en 3' " se refiere a secuencias de DNA localizadas aguas abajo de una secuencia codificadora e incluyen secuencias de reconocimiento de la poliadenilación (normalmente limitadas a eucariotas) y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar el procesamiento del mRNA o a la expresión génica. La señal de poliadenilación (normalmente limitada a los eucariotas) se caracteriza normalmente por afectar a la adición de tramos de poli(ácido adenílico) al extremo 3' del precursor del mRNA.

Los expertos en la técnica conocen bien el "sesgo de codones" exhibido por una célula hospedante específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por lo tanto, cuando se sintetiza un gen para mejorar la expresión en una célula hospedante, es deseable diseñar el gen de modo que su uso de codones refleje el sesgo de codones preferido por la célula hospedante. Un estudio de genes derivados de la célula hospedante cuando está disponible la información de la secuencia puede determinar su sesgo de codones. La optimización de codones es bien conocida en la técnica y se ha descrito para varios sistemas, incluyendo, aunque sin limitación, levadura (Outchkourov et al., *Protein Expr. Purif.* 24 (1): 18-24 (2002)) y *E. coli* (Feng et al., *Biochemistry*, 39 (50):15399-15409 (2000)).

Catalizadores enzimáticos que tienen actividad de nitrilasa.

Todas las nitrilasas (EC 3.5.5.7) comparten una triada catalítica conservada (Glu, Lys y Cys) (Chauhan et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:118-122 (2003); Pace, H. and Brenner, C., *Genome Biol.* [archivo digital en Internet] 2(1):reviews 0001.1-0001.9 (2001)). Todas las nitrilasas conocidas tienen una cisteína nucleófila en el sitio de la actividad enzimática (Cowan et al., *Extremophiles*, 2:207-216 (1998); Pace, H. and Brenner, C., *supra*; y Chauhan et al., *supra*) y todas son susceptibles de inactivación por reactivos de tiol (concentraciones 1,0 mM de cloruro de cobre, nitrato de plata, acetato mercúrico o cloruro férrico producían cada uno disminuciones importantes en la actividad de la enzima nitrilasa de *A. facilis* 72W). Los residuos de cisteína son también capaces de ser oxidados irreversiblemente a ácido sulfínico, dando como resultado una pérdida de la actividad enzimática. A pesar de la sensibilidad de las enzimas nitrilasas a diversos mecanismos inactivantes, las células de *A. facilis* 72W inmovilizadas son robustas, y capaces de retener mucha de su actividad de nitrilasa después de numerosas reacciones de reciclaje (Patentes de EE.UU. 6.870.038; 7.148.051 y 7.198.927; y Chauhan et al., *supra*). Los catalizadores nitrilasas derivados de la nitrilasa de *A. facilis* 72W han demostrado también catalizar la conversión de  $\alpha$ -hidroxinitrilos (es decir, glicolonitrilos) a ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos (es decir, ácido glicólico) (véanse las patentes de EE.UU. 6.383.786; 6.416.980 y 7.198.927).

Se han descrito comparaciones de secuencias de la nitrilasa de *A. facilis* 72W con otras nitrilasas bacterianas (Patente de EE.UU. 6.870.038; Chauhan et al., *supra*). La nitrilasa de 72W tiene diversos dominios distintivos conservados incluyendo una región de 16 aminoácidos cerca del extremo amino (residuos de aminoácidos 40-55

de la SEQ ID NO: 4) y una región catalítica de 12 aminoácidos (residuos de aminoácidos 160-171 de la SEQ ID NO: 4) que contiene el residuo de cisteína esencial. Este residuo de cisteína esencial (Cys<sub>164</sub> de la SEQ ID NO: 4), junto con el ácido glutámico conservado (Glu<sub>48</sub> de la SEQ ID NO:4) y los residuos de lisina (Lys<sub>130</sub> de la SEQ ID NO:4), forman el resto de la triada catalítica encontrado en todas las nitrilasas (Pace, H., y Brenner, C., *supra*).

5 Las regiones que rodean cada uno de los residuos de la triada catalítica están altamente conservadas, especialmente la región que rodea al residuo catalítico de cisteína. El residuo catalítico de cisteína esencial está localizado en una región altamente conservada denominada el "resto distintivo catalítico" o "resto distintivo". Por tanto, el procedimiento descrito en la presente memoria es útil para proteger la actividad enzimática de cualquier nitrilasa que contenga el resto distintivo catalítico definido por la Fórmula 1 (los residuos de aminoácidos en letras **negritas** indican los residuos de aminoácidos estrictamente conservados, los residuos de aminoácidos en letra  *cursiva* son los que presentan mínima variabilidad [es decir, una variación mínima de 3 o menos residuos de aminoácidos], el residuo catalítico de cisteína está subrayado):

Fórmula 1 (SEQ ID NO: 1). **Gly-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Trp-Glu-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>**

en donde

15 Xaa<sub>1</sub> = Ala o Gly;

Xaa<sub>2</sub> = Leu, Val o Ala;

Xaa<sub>3</sub> = Ala, Asn, Ile, Cys, Val o Gln;

Xaa<sub>4</sub> = His o Asn;

Xaa<sub>5</sub> = Leu, Tyr, Phe, Ala, Met, Lys, Val, Thr o Arg;

20 Xaa<sub>6</sub> = Asn, Gln, Met, Leu o Ser;

Xaa<sub>7</sub> = Pro o Thr; y

Xaa<sub>8</sub> = Leu o Val.

En una realización preferida, el resto distintivo de nitrilasa de Fórmula 1 es Xaa<sub>1</sub> = Ala o Gly; Xaa<sub>2</sub> = Leu; Xaa<sub>3</sub> = Ala, Asn, Ile, Cys, Val o Gln; Xaa<sub>4</sub> = His; Xaa<sub>5</sub> = Leu, Tyr, Phe, Ala, Met, Lys, Val, Thr o Arg; Xaa<sub>6</sub> = Ser, Gln, Asn o Met; Xaa<sub>7</sub> = Pro; y Xaa<sub>8</sub> = Leu; dando como resultado el resto distintivo catalítico representado por la siguiente fórmula:

Gly-Xaa<sub>1</sub>-Leu-Xaa<sub>3</sub>-Cys-Trp-Glu-His-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Pro-Leu (SEQ ID NO: 2)

Ejemplos de nitrilasas, que incluyen las secuencias y la posición en la secuencia de resto distintivo catalítico correspondiente se proporcionan en la Tabla 1.

30 Tabla 1. Región de cisteína catalítica conservada - Restos distintivos catalíticos

Fuente de nitrilasa	Número de acceso en GenBank®	Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:	Secuencia del resto distintivo (posiciones de los residuos de aminoácidos)
<i>Acidovorax facilis</i> 72W	ABD98457.1	4	GGLNCWEHFQPL (160-171)
<i>Alcaligenes faecalis</i> JM3	BAA02684.1	5	GALCCWEHLSPL (159-170)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	Q03217	6	GALNCWEHFQTL (161-172)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> K22	Q02068	7	GGLNCWEHFQPL (166-177)
<i>Nocardia sp.</i> C-14-1	AAX18182.1	8	GGLNCWEHFQPL (154-165)
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	NP_887662.1	9	GAWCWENYMPL (161-172)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAB60275.1 AAA19627.1	10	GAAICWENRMPL (175-186)
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	YP_399857.1	11	GALACWEHYNPL (157-168)
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	YP_171411.1	12	GALACWEHYNPL (157-168)

Fuente de nitrilasa	Número de acceso en GenBank®	Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:	Secuencia del resto distintivo (posiciones de los residuos de aminoácidos)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	NP_442646.1	13	GALACWEHYNPL (165-176)
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	YP_6090481.1	14	GAAVCWENYMPPL (161-172)
<i>Zymomonas mobilis</i>	YP_162942.1	15	GAAICWENYMPV (161-172)
<i>Bacillus</i> sp. OxB-1	BAA90460.1	16	GGLQCWEHFLPL (158-169)
<i>Comamonas testosteroni</i>	AAA82085.1	17	GGLQCWEHALPL (159-170)
<i>Synechococcus</i> sp. CC9605	YP_381420.1	18	GALACWEHYNPL (156-167)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	YP_260015.1	19	GAVICWENMMPL (161-172)
<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	YP_119480.1	20	GALCCWEHLQPL (159-170)
<i>Alcaligenes faecalis</i> 1650	AAY06506.1	21	GALCCWEHLSPL (159-170)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	AAY35081.1	22	GALCCWEHLQPL (157-168)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTail	ZP_00859948.1	23	GALCCWEHLQPL (163-174)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 11216	CAC88237	24	GALNCWEHFQTL (161-172)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 39484™	N/A	25	GALNCWEHFQTL (161-172)

También se describe en la presente memoria el catalizador nitrilasa que comprende un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa, aislado de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acidovorax*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Bacillus* y *Alcaligenes*. En otro ejemplo, el catalizador nitrilasa comprende un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa aislado de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acidovorax* y *Rhodococcus*.

- 5 En otra realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa procede de *Acidovorax facilis* 72W (ATCC 55746) o un polipéptido (que tiene actividad de nitrilasa) que es sustancialmente similar a la nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W (SEQ ID NO: 4) o la enzima derivada de *A. facilis* 72W representada por la SEQ ID NO: 51.

En una realización, el catalizador nitrilasa es una célula microbiana hospedante transformada para expresar al menos un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa. En una realización, la célula hospedante transformada se  
10 selecciona del grupo que consiste en: *Comamonas* sp., *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Azotobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Lactobacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Saccharomyces* sp., *Yarrowia* sp., *Zygosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Hansenula* sp., *Dunaliella* sp., *Debaryomyces* sp., *Mucor* sp., *Torulopsis* sp., *Methylobacteria* sp., *Bacillus* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., y *Streptomyces* sp. En una realización preferida, la célula  
15 microbiana hospedante se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Escherichia* sp. En una realización preferida, el catalizador es una célula hospedante de *Escherichia coli* que expresa recombinantemente uno o más de los polipéptidos que tienen actividad de nitrilasa.

También se describe en la presente memoria el catalizador nitrilasa que comprende un polipéptido que tiene actividad de nitrilasa, en donde dicho polipéptido que tiene actividad de nitrilasa tiene al menos 60% de identidad  
20 con la SEQ ID NO: 51, preferiblemente al menos 70% de identidad con la SEQ ID NO: 51, incluso más preferiblemente al menos 80% de identidad con la SEQ ID NO: 51, e incluso más preferiblemente al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO: 51, y lo más preferiblemente al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 51.

En la presente memoria se describen ejemplos de trabajo de diversos catalizadores que tienen actividad de nitrilasa derivados de diversas fuentes, incluyendo un catalizador derivado de nitrilasa de *A. facilis* 72W. Se han  
25 descrito en la técnica diversos mutantes derivados de la enzima nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W (Patentes de EE.UU. 7.148.051 y 7.198.927).

En una realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41,  
30 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57. En otra realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57. En

otra realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57. En otra realización, el polipéptido que tiene actividad de nitrilasa se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 24, 25 y 51. En otra realización, el catalizador nitrilasa comprende el polipéptido de la SEQ ID NO SEQ ID NO: 51.

#### 5 Nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W (ATCC 55746)

La nitrilasa de *A. facilis* 72W (EC 3.5.5.1) es un catalizador robusto para la producción de ácidos carboxílicos a partir de nitrilos alifáticos o aromáticos (documento WO 01/75077; Patente de EE.UU 6.870.038; y Chauhan et al., *supra*). También se ha demostrado que cataliza la conversión de  $\alpha$ -hidroxinitrilos (es decir, glicolonitrilo) en ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos (es decir, ácido glicólico) (véanse las patentes de EE. UU. 6.383.786 y 6.416.980). Sin embargo, los catalizadores nitrilasa que tengan mejor actividad y/o estabilidad de nitrilasa (con relación a la nitrilasa de *A. facilis* 72W) cuando conviertan glicolonitrilo en ácido glicólico reducirán el coste de fabricación del ácido glicólico. Por tanto, un método para producir ácido glicólico que use un mejor catalizador de nitrilasa es útil para reducir el coste de fabricación del ácido glicólico, sin embargo la nitrilasa de *A. facilis* 72W es un catalizador enzimático para los fines de los procedimientos de la presente invención, así como dichas mejores nitrilasas descritas con detalle anteriormente.

#### Producción industrial del catalizador microbiano

Quando se desea la producción comercial de los catalizadores enzimáticos descritos en la presente memoria, se puede utilizar una variedad de metodologías de cultivo. Se pueden realizar operaciones de fermentación de modos por lotes, por lotes alimentados o continuo, siendo dichos métodos bien conocidos en la técnica (Thomas D. Brock en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Second edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, (1989); Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36(3): 227-234 (1992)).

Un método de cultivo por lotes clásico es un sistema cerrado donde la composición de los medios se ajusta al comienzo del cultivo y no está sometida a alteraciones artificiales durante el procedimiento de cultivo. Por tanto, al comienzo del procedimiento de cultivo el medio se inocula con el organismo u organismos deseados y se deja que tenga lugar el crecimiento o la actividad metabólica no añadiendo nada al sistema. Típicamente, sin embargo, un cultivo "por lotes" es por lote con respecto a la adición de la fuente de carbono y con frecuencia se realizan intentos de controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. En los sistemas por lotes, las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en el que se termina el cultivo. Dentro de los cultivos por lotes, las células se moderan desde de una fase logarítmica estática hasta una fase logarítmica de alto crecimiento y finalmente hasta una fase estacionaria donde disminuye o se detiene la velocidad de crecimiento. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria finalmente morirán. En algunos sistemas las células en la fase logarítmica son con frecuencia responsables de la mayor parte de la producción del producto final o producto intermedio. En otros sistemas se puede obtener una producción en fase estacionaria o post-exponencial.

Una variación en el sistema por lotes estándar es el sistema por lotes alimentado. Los procedimientos de cultivo por lotes alimentados son también adecuados en la presente invención y comprenden un sistema por lotes típico con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos a medida que progresa el cultivo. Los sistemas por lotes alimentados son útiles cuando la represión de catabolitos es apta para inhibir el metabolismo de las células y cuando es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. La medición de la concentración real del sustrato en los sistemas por lotes alimentados es difícil y por lo tanto se estima basándose en los cambios de factores medibles, tales como pH, oxígeno disuelto y presión parcial de los gases residuales, tales como CO<sub>2</sub>. Los métodos de cultivo por lotes y por lotes alimentados son usuales y bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar ejemplos en Brock (*supra*) y Deshpande (*supra*).

La producción comercial de los presentes catalizadores enzimáticos que tienen actividad de nitrilasa también se puede realizar por un cultivo continuo. Los cultivos continuos son un sistema abierto en el que se añade continuamente a un biorreactor un medio de cultivo definido y se elimina simultáneamente durante el procedimiento una cantidad igual de medio acondicionado. Los cultivos continuos mantienen generalmente las células a una densidad en fase líquida alta y constante donde las células se desarrollan principalmente en fase logarítmica. Alternativamente, el cultivo continuo se puede realizar con células inmovilizadas a las que se añaden continuamente carbono y nutrientes y se eliminan continuamente de la masa celular productos valiosos, subproductos o productos residuales. La inmovilización celular se puede realizar utilizando una amplia gama de soportes sólidos compuestos de materiales naturales y/o sintéticos.

El cultivo continuo o semicontinuo permite la modulación de un factor o de cualquier número de factores que afecten al crecimiento celular o a la concentración celular final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante, tal como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno, en una tasa fija y permitirá que se moderen todos los demás parámetros. En otros sistemas, se pueden alterar continuamente una serie de factores que afecten al crecimiento mientras se mantenga constante la concentración celular, medida por la turbidez del medio. Los sistemas continuos intentan mantener las condiciones de crecimiento en estado estacionario y, por tanto, la



pérdida de células debido a los medios que se retiran debe equilibrarse con la tasa de crecimiento celular en el cultivo. Los métodos para modular los nutrientes y los factores de crecimiento en los procedimientos de cultivo continuos, así como las técnicas para maximizar la velocidad de formación de células, son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial y una variedad de métodos han sido detallados por Brock (*supra*).

- 5 Los medios de fermentación en la presente invención deben contener sustratos de carbono adecuados. Los sustratos adecuados pueden incluir, aunque sin limitación, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, disacáridos, tales como lactosa o sacarosa, polisacáridos, tales como almidón o celulosa, o sus mezclas, y mezclas no purificadas de materias primas renovables, tales como líquido filtrado de suero de queso, licor de maíz fermentado, melazas de remolacha azucarera y malta de cebada. Por tanto, se considera que la fuente de carbono  
10 utilizada en la presente invención puede abarcar una amplia variedad de sustratos que contengan carbono y solamente estará limitada por la elección del organismo.

Pretratamiento con glutaraldehído del catalizador enzimático antes de la inmovilización

- 15 El tratamiento con glutaraldehído de un cultivo de fermentación del catalizador enzimático puede ser una manera conveniente de matar los microbios en el cultivo, evitando así problemas de contención y seguridad en la manipulación, la conservación y el transporte asociados con los cultivos recombinantes vivos. Se ha descubierto ahora que el pretratamiento con glutaraldehído, o el pretratamiento con glutaraldehído seguido de tratamiento con bisulfito, puede preservar la actividad de nitrilasa en células en suspensión y en una forma inmovilizada.

- 20 La preservación de la actividad de nitrilasa por pretratamiento con glutaraldehído de un catalizador enzimático se ve afectada por el tiempo, la temperatura, la concentración de glutaraldehído, el pH y la concentración de productos inhibidores como amoníaco y otras aminas (por ejemplo, aminoácidos y péptidos) en los medios que interactúan con el glutaraldehído. Un método de pretratamiento con glutaraldehído preferido trata las células procedentes de la fermentación de alta densidad (100-150 DO<sub>550</sub>) con 5-10% en peso de glutaraldehído en agua que es suministrado preferiblemente como una mezcla adecuada de 50 mg a 500 mg de glutaraldehído/L-min, más preferiblemente suministrado como una mezcla adecuada de 50 mg a 200 mg de glutaraldehído/L-min, lo más  
25 preferiblemente suministrado como una mezcla adecuada de 50 mg a 100 mg de glutaraldehído/L-min, dando como resultado una concentración final de aproximadamente 3 g a aproximadamente 5 g de glutaraldehído/L (aproximadamente 0,025 g a aproximadamente 0,042 g de glutaraldehído por DO<sub>550</sub>), más preferiblemente de aproximadamente 3,6 g a aproximadamente 5 g de glutaraldehído/L (aproximadamente 0,030 g a aproximadamente 0,042 g de glutaraldehído por DO<sub>550</sub>). El cultivo pretratado con glutaraldehído se puede  
30 mantener en el fermentador durante aproximadamente 1 a 5 horas. A continuación se añade opcionalmente una solución al 10% en peso de bisulfito de sodio en agua a 1 g/L para inactivar el glutaraldehído residual.

- 35 El pH preferido para el pretratamiento con glutaraldehído del catalizador enzimático en el caldo de fermentación o en suspensión celular es desde pH 5,0 hasta 9,0, más preferiblemente desde pH 5,0 hasta 8,0, incluso más preferiblemente desde pH 5,0 hasta 7,0, todavía más preferiblemente desde pH 5,0 hasta 6,0, y lo más preferiblemente desde pH 5,0 hasta 5,5. La concentración de glutaraldehído residual después del pretratamiento con glutaraldehído es típicamente baja, en el intervalo de 10 - 200 ppm, y puede ser inactivado como se ha indicado anteriormente, con la adición de bisulfito de sodio hasta una concentración final de aproximadamente 1 g/L. Se encontró que el pretratamiento con glutaraldehído y bisulfito no tenía ningún efecto perjudicial significativo sobre la actividad de nitrilasa. La suspensión celular pretratada con glutaraldehído o glutaraldehído/bisulfito se  
40 enfría opcionalmente hasta 5 - 10°C, y se lava opcionalmente (por concentración y re-dilución de la suspensión celular o del caldo de fermentación) con agua o un tampón de conservación adecuado para eliminar el bisulfito residual y el glutaraldehído sin reaccionar.

Inmovilización del catalizador enzimático pretratado con glutaraldehído y reticulación química

- 45 Los métodos para la inmovilización de catalizadores enzimáticos han sido documentados ampliamente y son bien conocidos por los expertos en la técnica (*Methods in Biotechnology, Vol. 1: Immobilization of enzymes and Cells*; Gordon F. Bickerstaff, editor; Humana Press, Totowa, NJ, USA; 1997). También se ha documentado previamente la inmovilización del catalizador nitrilasa de *A. facilis* 72W (patente de EE.UU. 6.870.038).

- 50 Además, existe un método para la inmovilización en carragenina y posterior reticulación con glutaraldehído/polietilenimina del catalizador enzimático inmovilizado (y como se ha descrito en la patente de EE.UU. 6.870.038 y como se ha descrito con detalle en la patente de EE.UU. 6.551.804 B), sin embargo, un experto en la técnica reconocería y aplicaría fácilmente variaciones para realizar la inmovilización y reticulación.

- 55 Dichas variaciones están contempladas en la presente memoria y están dentro del alcance del presente procedimiento. Además, las cantidades o concentraciones de los componentes utilizados para la inmovilización y reticulación química variarán dependiendo de la cantidad y tipo de catalizador enzimático y la producción por fermentación del catalizador enzimático. Un experto en la técnica reconocería estos factores y ajustaría en consecuencia los procedimientos de inmovilización y reticulación química. Con relación a la reticulación con glutaraldehído y polietilenimina, la patente de EE.UU. 6.551.804 (*supra*), describe los procesos y procedimientos

para reticular químicamente células inmovilizadas con alginato. Dicha descripción se aplica también en la presente invención para células inmovilizadas en carragenina.

Deshidratación/rehidratación del catalizador enzimático microbiano inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina

5 Como se indicó anteriormente, un problema particular relacionado con el uso de un catalizador nitrilasa microbiano abordado en la presente solicitud es la conservación y transporte del catalizador enzimático. Aspectos de interés para la conservación y transporte de los catalizadores enzimáticos que tienen actividad de nitrilasa incluyen dificultades con el volumen del material y la inactivación de la actividad enzimática del material con el tiempo. Cuando se inmovilizó en carragenina y posteriormente se reticuló con glutaraldehído y polietilenimina, el catalizador nitrilasa microbiano inmovilizado resultante contenía aproximadamente 90% en peso de agua, y el catalizador se conservó típicamente a 5°C en un peso equivalente de tampón acuoso. Una reducción en la cantidad de agua presente en el catalizador de nitrilasa microbiano inmovilizado, y la eliminación del tampón acuoso utilizado para conservar el catalizador, disminuiría el volumen del catalizador y del tampón asociado necesario para ser transportado y conservado antes de su uso, y mejoraría aún más significativamente la economía de fabricación del ácido glicólico.

La deshidratación del catalizador enzimático inmovilizado y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina se puede realizar por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, deshidratación al aire, deshidratación en una corriente de un gas inerte, deshidratación en una estufa a vacío con o sin purga con un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón) o liofilización (secado por congelación). La temperatura para la deshidratación puede variar preferiblemente desde aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 60°C, más preferiblemente desde aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 50°C y lo más preferiblemente desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 40°C. Las perlas deshidratadas resultantes pueden perder hasta aproximadamente 91% de su peso húmedo inicial (cuando se comienza con perlas constituidas por aproximadamente 5% en peso de células secas de células que contiene nitrilasa microbianas). El catalizador celular inmovilizado y deshidratado puede ser conservado al aire o bajo una atmósfera inerte, y preferiblemente a temperaturas en el intervalo de - 25°C a 35°C, preferiblemente de 5°C a 25°C. El catalizador celular inmovilizado y deshidratado puede ser rehidratado colocando las perlas deshidratadas en agua o en un tampón acuoso adecuado, por ejemplo, una solución de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3), siendo la temperatura de rehidratación preferiblemente de aproximadamente 5°C a aproximadamente 35°C. Las perlas rehidratadas resultantes se pueden usar directamente en una reacción para la producción de ácido glicólico a partir de glicolonitrilo, o conservarse en el líquido de rehidratación desde aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 35°C hasta su uso.

Hidrólisis de glicolonitrilo a ácido glicólico usando un catalizador nitrilasa

La conversión enzimática de glicolonitrilo en ácido glicólico (en forma de ácido y/o de la sal de amonio correspondiente) se puede realizar poniendo en contacto un catalizador enzimático, un catalizador enzimático inmovilizado o un catalizador enzimático inmovilizado y reticulado que tiene actividad de nitrilasa en condiciones de reacción adecuadas, como se describe a continuación (es decir, en una mezcla de reacción acuosa a determinados intervalos de pH, temperaturas, concentraciones, etc.). En una realización, las células microbianas recombinantes enteras se pretratan con glutaraldehído, se inmovilizan en carragenina, se reticulan, se deshidratan y después de rehidratación el catalizador enzimático resultante se utiliza directamente para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico, o las células inmovilizadas se pueden mantener separadas de la mezcla de reacción a granel usando cartuchos de membrana de fibra hueca o membranas de ultrafiltración. En una segunda realización, las células microbianas recombinantes enteras se inmovilizan en gel de poliacrilamida, y el catalizador enzimático resultante se utiliza directamente para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico.

La concentración de catalizador enzimático en la mezcla de reacción acuosa depende de la actividad específica del catalizador enzimático y se elige para obtener la velocidad de reacción deseada. El peso de células húmedas de las células microbianas utilizadas como catalizador en reacciones de hidrólisis varía típicamente desde 0,001 gramos hasta 0,250 gramos de células húmedas por mL de volumen de reacción total, preferiblemente desde 0,002 gramos hasta 0,050 gramos de células húmedas por mL. El % en peso indicado de células húmedas por volumen de volumen de reacción total puede estar presente en la mezcla de reacción en forma de un catalizador enzimático inmovilizado preparado como se ha descrito anteriormente (*supra*), donde el peso de células húmedas como porcentaje del peso total del catalizador enzimático inmovilizado se conoce por el método de preparación del catalizador enzimático inmovilizado.

La temperatura de la reacción de hidrólisis de glicolonitrilo se elige para controlar tanto la velocidad de reacción como la estabilidad de la actividad del catalizador enzimático. La temperatura de la reacción puede variar desde justo por encima del punto de congelación de la mezcla de reacción (aproximadamente 0°C) hasta aproximadamente 65°C, con un intervalo preferido de temperatura de reacción desde aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 35°C. La suspensión de catalizador enzimático se puede preparar poniendo en suspensión las células inmovilizadas y deshidratadas en agua destilada, o en una solución acuosa de un tampón que mantenga el

pH inicial de la reacción entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 10,0, preferiblemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8,0, más preferiblemente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,7, y lo más preferiblemente desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 7,7. A medida que avanza la reacción, el pH de la mezcla de reacción puede cambiar debido a la formación de una sal de amonio del ácido carboxílico a partir de la funcionalidad nitrilo correspondiente. La reacción se puede realizar para completar la conversión de glicolonitrilo sin control de pH, o se puede añadir un ácido o una base adecuados durante el transcurso de la reacción para mantener el pH deseado.

Se encontró que el glicolonitrilo era completamente miscible con agua en todas las proporciones a 25°C. En los casos en los que se eligen las condiciones de reacción, de tal manera que la solubilidad del sustrato (es decir, un  $\alpha$ -hidroxinitrilo) también dependa de la temperatura de la solución y/o la concentración de sal (tampón o el producto sal de amonio del ácido glicólico, también conocido como glicolato de amonio) en la fase acuosa, la mezcla de reacción puede estar compuesta inicialmente de dos fases: una fase acuosa que contiene el catalizador enzimático y  $\alpha$ -hidroxinitrilo disuelto, y una fase orgánica (el  $\alpha$ -hidroxinitrilo sin disolver). A medida que progresa la reacción, el  $\alpha$ -hidroxinitrilo se disuelve en la fase acuosa, y finalmente se obtiene una mezcla de producto en una sola fase. La reacción también puede ser realizada añadiendo el  $\alpha$ -hidroxinitrilo a la mezcla de reacción a una velocidad aproximadamente igual a la velocidad de reacción de la hidrólisis enzimática, manteniendo de este modo una mezcla de reacción acuosa en una sola fase, y evitando el problema potencial de inhibición por el sustrato de la enzima a altas concentraciones de material de partida.

El ácido glicólico puede estar en la mezcla de productos como una mezcla del ácido carboxílico protonizado y/o su sal de amonio correspondiente (dependiendo del pH de la mezcla de productos; el pKa del ácido glicólico es aproximadamente 3,83) y adicionalmente puede estar presente como una sal del ácido carboxílico con cualquier tampón que adicionalmente pueda estar presente en la mezcla de productos. Típicamente, el ácido glicólico producido está principalmente en forma de sal de amonio (el pH de la reacción de hidrólisis del glicolonitrilo está típicamente entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,7). El producto de ácido glicólico se puede aislar de la mezcla de reacción como el ácido carboxílico protonizado, o como una sal del ácido carboxílico, según se desee.

La concentración final de ácido glicólico en la mezcla de productos en la conversión completa de glicolonitrilo puede variar desde 0,001 M hasta el límite de solubilidad del producto ácido glicólico. En una realización, la concentración de ácido glicólico variará desde aproximadamente 0,10 M hasta aproximadamente 5,0 M. En otra realización, la concentración de ácido glicólico variará desde aproximadamente 0,2 M hasta aproximadamente 3,0 M.

El ácido glicólico puede ser recuperado en forma del ácido o la sal correspondiente usando una variedad de técnicas que incluyen, aunque sin limitación, intercambio iónico, electrodiálisis, extracción con disolvente reactivo, polimerización, descomposición térmica, alcoholisis y sus combinaciones.

Además, cuando una cantidad, concentración u otro valor o parámetro se da en forma de un intervalo, un intervalo preferido o una lista de valores superiores preferibles y valores inferiores preferibles, debe entenderse que están descritos específicamente todos los intervalos formados a partir de una pareja de cualquier límite superior del intervalo o valor preferido y cualquier límite inferior del intervalo o valor preferido, independientemente de si los intervalos se describen por separado. Cuando en la presente memoria se enumera un intervalo de valores numéricos, a menos que se indique lo contrario, se pretende que el intervalo incluya sus extremos, y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo. No se pretende que el alcance de la invención esté limitado a los valores específicos citados cuando se define un intervalo.

### Métodos generales

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor para llevar bien a la práctica la invención, y por tanto se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

Los materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos bacterianos son muy conocidos en la técnica. Técnicas adecuadas para uso en los siguientes ejemplos se pueden encontrar descritos en *Manual of Methods for General Bacteriology* (1994) (Phillipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, eds.), *American Society for Microbiology*, Washington, DC.) o por Thomas D. Brock, en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, (1989) Second Edition, (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA). Los métodos para inmovilizar catalizadores enzimáticos se pueden encontrar en Bickerstaff, G. F., *supra*.

Los procedimientos requeridos para la preparación de DNA genómico, la amplificación por PCR, las modificaciones del DNA por endo- y exo-nucleasas para generar extremos deseados para la clonación del DNA, las ligamientos y la transformación bacteriana, son bien conocidos en la técnica. Técnicas de DNA recombinante y de

clonación molecular estándares utilizadas en la presente invención son bien conocidas en la técnica y han sido descritas por Maniatis, *supra*; y por T. J. Silhavy, M. L. Bannan, and L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, (1984) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY; y por Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, (1994-1998) John Wiley & Sons, Inc., New York.

- 5 Todos los reactivos y materiales se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) o Sigma/Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO) salvo indicación contraria.

Las abreviaturas en la memoria descriptiva corresponden a unidades de medida, técnicas, propiedades o compuestos de la siguiente manera: "s" significa segundo(s), "min" significa minuto(s), "h" significa hora(s), "d" significa densidad en g/mL, "µL" significa microlitros, "mL" significa mililitros, "L" significa litros, "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" significa milimol(es), "p" significa peso, "% en peso" significa porcentaje en peso, "g" significa gramos, "µg" significa microgramos, "HPLC" significa cromatografía de líquidos de alta resolución, "DO" significa densidad óptica a la longitud de onda designada, "pcs" significa peso de células secas, "U" significa unidades de actividad de nitrilasa; "EDTA" significa ácido etilendiamintetraacético y "DTT" significa ditiotreitól. Una U de actividad de nitrilasa corresponde a la hidrólisis de 1 µmol de glicolonitrilo/min.

#### Metodología analítica

##### *Análisis por HPLC*

A menos que se indique lo contrario, se utilizó el siguiente método de HPLC. Las mezclas de productos de reacción se analizaron por el siguiente método de HPLC. Se añadieron partes alícuotas (0,01 mL) de la mezcla de reacción a 1,50 mL de agua y se analizó por HPLC (columna HPX 87H, 30 cm x 7,8 mm; fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N; caudal 1,0 mL/min a 50°C; volumen de inyección 10 µL; detector infrarrojo (IR), tiempo de análisis 20 min). El método se calibró para glicolonitrilo en una serie de concentraciones utilizando glicolonitrilo comercialmente disponible adquirido a Aldrich.

##### *Análisis cuantitativo por <sup>13</sup>C RMN*

25 Los espectros cuantitativos de <sup>13</sup>C RMN se obtuvieron utilizando un espectrómetro Varian Unity Inova (Varian, Inc., Palo Alto, CA) que funciona a 400 MHz. Las muestras se prepararon tomando 3,0 mL del producto de reacción junto con 0,5 mL de D<sub>2</sub>O en un tubo de RMN de 10 mm. Los espectros de <sup>13</sup>C RMN se obtuvieron típicamente usando una anchura espectral de 26 KHz con el transmisor situado en 100 ppm, puntos 128K y un pulso de 90 grados (pw90 = 10,7 microsegundos a una potencia del transmisor de 56 db). El <sup>13</sup>C T1 más largo (23 s) se asoció con el carbono del nitrilo GLN, y el tiempo total de reciclaje se fijó a un valor diez veces mayor que este valor (retraso del reciclaje d1 = 240 s, tiempo de adquisición, ta = 2,52 s). La señal media de 360 escaneos dio un tiempo de experimento total de 26,3 horas. La mejora nuclear Overhauser (NOE) fue suprimida controlando el desacoplamiento <sup>1</sup>H modulado por Waltz sólo durante el tiempo de adquisición (ta).

#### **Ejemplo 1**

##### 35 Fermentación de *E. coli* MG1655/pSW138-168V

Se realizaron cultivos de siembra de *E. coli* MG1655/pSW138-168V en 500 mL de medio LB complementado con 0,1 mg de ampicilina por mL durante 6-10 horas (DO<sub>550</sub> = 1-2) a 30°C con agitación (300 rpm) antes de la inoculación del fermentador. El cultivo de la cepa de *E. coli* MG1655/pSW138-168V productora de nitrilasa se realizó en fermentadores Braun Biostat C de 14 L (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemania) utilizando un medio mineral con glucosa, amoníaco y sales, y se usó lactosa para inducción. El medio del fermentador antes de la esterilización (7,5 L) se describe en la Tabla 2. Las adiciones después de la esterilización incluyen elementos trazas esterilizados por filtración (Tabla 3), 0,1 mg de ampicilina por mL, 2 g de casaminoácidos (Difco) por litro, 4 g de glucosa por litro y 500 mL de cultivo de siembra

45 Los puntos de ajuste de la fermentación se describen en la Tabla 4. Para controlar el pH se utilizaron NH<sub>4</sub>OH (40% p/v) y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (20% p/v). La concentración de oxígeno disuelto se controló al 25% de saturación en aire con la agitación ajusta para elevar en primer lugar el aumento de la demanda de oxígeno seguido por aireación. El protocolo de alimentación de la fermentación utilizado con la inducción de lactosa se recoge en la Tabla 5. Los caudales de alimentación de glucosa se reducían si la glucosa se acumulaba por encima de 5 g/L. Después de 40-56 horas, el caldo de fermentación se enfrió bruscamente hasta 5-10°C y las células se recogieron por centrifugación. La pasta celular se congeló y conservó a -70°C. La pasta celular se denominó NIT 60 (1910 U de GLN/g en pcs).

Tabla 2. Medios de fermentación, antes de la esterilización.

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,0 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,6 g/L
Citrato sódico.2H <sub>2</sub> O	1,0 g/L
NZ Amine AS (Quest)	2,5 g/L
Antiespumante - Biospumex 153K	0,25 mL/L

Tabla 3. Elementos trazas en la fermentación

	Concentración
Ácido cítrico	10 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,5 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,39 g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,38 g/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,3 g/L

Tabla 4. Puntos de ajuste de la fermentación

	Puntos de ajuste iniciales	Mínimo	Máximo
Agitador (rpm)	400	400	1000
Caudal de aire (litros estándar por minuto)	2	2	10
pH	6,8	6,8	6,8
Presión (kPa)	0,5	0,5	0,5
Oxígeno disuelto (Od)	25%	25%	25%
Temperatura °C	30	30	30

Tabla 5. Protocolo de alimentación de la fermentación usado con inducción de lactosa

Tiempo de fermentación transcurrido (h)	Caudal de alimentación (g/min)	Sustrato
0	0	Glucosa (por lotes)
5	0,27	Glucosa (50% p/p)
14	1,3	Lactosa (25% p/p)

**Ejemplo 2**

Inmovilización de *E. coli* MG1655/pNM18-168V en perlas de carragenina reticuladas con GA/PEI

Con agitación rápida, se añadieron lentamente 12 g de carragenina (FMC GP911) a 228 g de agua destilada desionizada, a 50°C, la mezcla resultante se calentó hasta 80°C hasta que la carragenina se disolvió completamente, y la solución resultante se enfrió con agitación hasta 52°C. En un vaso separado equipado con una barra de agitación, se añadieron 83,2 g de células congeladas de *E. coli* MG1655/pNM18-168V (25,2% en pcs) a 84,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,35 M (pH 7,3) a aproximadamente 25°C y se mezcló hasta que las células se pusieron en suspensión, y a continuación se añadió una solución de desoxirribonucleasa I (10 µL de 12.500 U/mL de DNasa (Sigma)/100 mL de suspensión celular). La suspensión celular se filtró consecutivamente por un elemento filtrante Nupro TF de 230 micrómetros y 140 micrómetros y se calentó con agitación hasta 50°C. A la solución de carragenina a 52°C, se añadieron con agitación, 160,0 g de una suspensión celular de *E. coli* MG1655/pNM18-168V a 50°C, y la suspensión de células/carragenina resultante se bombeó a través de una aguja de calibre 20 calentada eléctricamente a 47°C y se añadió gota a gota con agitación a KHCO<sub>3</sub> 0,25 M (pH = 7,3) a aproximadamente 37-38°C; el caudal a través de la aguja se ajustó a 5-8 mL/min. Se dejaron endurecer las perlas resultantes en este mismo tampón durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación, y se conservaron en bicarbonato de potasio 0,25 M (pH 7,3).

La reticulación química de las perlas inmovilizadas de células/carragenina se realizó por adición de 0,5 g de glutaraldehído (GA) al 25% en agua (Sigma M 752-07) a 20 g de perlas en suspensión en 48 mL de bicarbonato de potasio 0,25 M (pH 7,3) y agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. A la suspensión de perlas se añadieron luego 2,0 g de polietilenimina al 12,5% en peso (PEI, BASF LUPASOL PS) en agua, y la suspensión de perlas se agitó durante 18 horas más a temperatura ambiente. Las perlas reticuladas con GA/PEI se recuperaron de la suspensión, se agitaron dos veces durante 15 minutos en 48 mL de bicarbonato de potasio 0,25 M (pH 7,3), y a continuación se almacenaron en bicarbonato de amonio 1,0 M (pH 7,3) a 5°C. Antes de su uso como catalizador para la conversión del glicolonitrilo en ácido glicólico (como la sal de amonio), las perlas se lavaron dos veces durante 15 minutos con 180 mL de glicolato de amonio 0,1 M (pH 7,3) a temperatura ambiente para eliminar el tampón de conservación de bicarbonato de amonio 1,0 M (pH 7,3). El catalizador celular inmovilizado resultante se identificó como NIT 60 inmovilizado.

**Ejemplo 3**

Deshidratación/rehidratación del transformante *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina

Las perlas del transformante *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizadas en carragenina y reticuladas con glutaraldehído/polietilenimina preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2 se deshidrataron en una estufa a vacío (176 mm de Hg) a 35°C con purga de nitrógeno durante 24 horas. La relación entre el peso de las perlas deshidratadas y el peso de las perlas originales (no deshidratadas) fue 0,0914. Las perlas deshidratadas se rehidrataron posteriormente colocando las perlas deshidratadas en una solución 20 veces (en peso) de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3) a 5°C o 25°C durante 18 horas. Las perlas rehidratadas resultantes se lavaron dos veces con una solución 9 veces (en peso) de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3), y a continuación se pesaron; la relación entre el peso de las perlas rehidratadas y el peso de las perlas originales (no deshidratadas) fue 0,210 para las perlas rehidratadas a 5°C, y la relación entre el peso de las perlas rehidratadas y el peso de las perlas originales fue 0,212 para las perlas rehidratadas a 25°C.

**Ejemplo 4**

Actividad específica del transformante *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina antes y después de la deshidratación/rehidratación

Las reacciones por lotes para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico se realizaron a 25°C en un baño de agua a temperatura controlada. Un primer recipiente de reacción equipado con una barra de agitación magnética se cargó con 8,0 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI (peso de células secas 0,40 g, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2 sin deshidratación/rehidratación), 6,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 21,7 mL de agua destilada desionizada. Un segundo recipiente de reacción equipado con una barra de agitación magnética se cargó con 1,71 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI rehidratadas (peso de células secas 0,41 g, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 3 con deshidratación a 35°C y rehidratación a 5°C), 6,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 28,0 mL de agua destilada desionizada. Un tercer recipiente de reacción equipado con una barra de agitación magnética se cargó con 1,70 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI rehidratadas (peso células secas 0,40 g, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2 con deshidratación a 35°C y rehidratación a 25°C), 6,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 28,0 mL de agua destilada desionizada. A continuación se añadieron simultáneamente y con agitación a cada recipiente de reacción 3,50 mL (3,75 g) de glicolonitrilo (GLN) al 60,8% en

5 peso en agua (GLN 40,0 mmol, formaldehído 0,320 mmol; estabilizado con ácido glicólico al 0,7% en peso) y se añadieron 0,80 mL de hidróxido de amonio acuoso (NH<sub>3</sub> al 1,875% en peso) (pH final 7,5). Las muestras de reacción (0,100 mL) se retiraron en tiempos predeterminados después de la adición de GLN y se mezclaron con 0,100 mL de agua, 0,010 mL de HCl 6,0 N y 0,200 mL de n-propanol 0,25 M en agua (patrón externo para HPLC), la mezcla se centrifugó y el líquido sobrenadante resultante se analizó por HPLC para determinar la velocidad de reacción inicial y la actividad específica del catalizador (U/g pcs) (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad específica del transformante *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina antes y después de la deshidratación/rehidratación

Biocatalizador celular inmovilizado	Temperatura de deshidratación (°C)	Temperatura de rehidratación (°C)	Actividad específica (U/g pcs)	Actividad después de la rehidratación (%)
Sin deshidratación	ninguna	ninguna	1787	-
Deshidratado/rehidratado	35	5	1049	59
Deshidratado/rehidratado	35	25	1032	58

### Ejemplo 5

10 Pretratamiento de *E. coli* MG1655/pSW138-168V con glutaraldehído antes de la inmovilización

Se realizó una fermentación de 200 L para producir un caldo que contuviera células de *E. coli* MG1655/pSW138-168V que se pretrataron posteriormente con glutaraldehído *in situ* antes de la inmovilización. En primer lugar se preparó un cultivo de pre-siembra cargando un matraz de agitación de 2 L con 0,5 L de medio de siembra que contenía extracto de levadura (Ambrex 695, 5,0 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10,0 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (7,0 g/L), citrato de sodio dihidrato (1,0 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4,0 g/L), MgSO<sub>4</sub> heptahidrato (1,0 g/L) y citrato de amonio férrico (0,10 g/L). El pH del medio se ajustó hasta 6,8 y el medio se esterilizó en el matraz. Las adiciones posteriores a la esterilización incluyeron glucosa (10 mL, 50% en peso) y 1 mL de ampicilina (25 mg/mL). El medio de pre-siembra se inoculó con 1 mL de un cultivo madre congelado de *E. coli* MG1655/pSW138-168V en glicerol al 20% y se cultivó a 35°C y 300 rpm. El cultivo de siembra se transfirió a aproximadamente 2 DO<sub>550</sub> a un fermentador de siembra de 14 L (Braun) con 8 L de medio que contenía KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,50 g/L), FeSO<sub>4</sub> heptahidrato (0,05 g/L), MgSO<sub>4</sub> heptahidrato (2,0 g/L), citrato de sodio dihidrato (1,90 g/L), extracto de levadura (Ambrex 695, 5,0 g/L), antiespumante Biospumex153K (0,25 mL/L, Cognis Corporation), NaCl (1,0 g/L), CaCl<sub>2</sub> dihidrato (10 g/L) y solución de elementos trazas de NIT (10 mL/L). La solución de elementos traza contenía ácido cítrico monohidrato (10 g/L), MnSO<sub>4</sub> hidratado (2 g/L), NaCl (2 g/L), FeSO<sub>4</sub> heptahidrato (0,5 g/L), ZnSO<sub>4</sub> heptahidrato (0,2 g/L), CuSO<sub>4</sub> pentahidrato (0,02 g/L) y NaMoO<sub>4</sub> dihidrato (0,02 g/L). Las adiciones posteriores a la esterilización incluían 120 g de solución de glucosa (50% p/p) y 16 mL de solución madre de ampicilina (25 mg/mL).

La concentración de oxígeno disuelto (Od) se controló a 25% de saturación en aire. El Od se controló en primer lugar por una velocidad de agitación de paletas (400 hasta 1400 rpm) y más tarde por una velocidad de aireación (2 a 10 litros estándares por minuto). El pH se controló a 6,8. Para el control del pH se usaron NH<sub>4</sub>OH (29% p/p) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20% p/v). La temperatura se controló a 35°C y la presión en cabeza fue 0,5 bares. A aproximadamente 6 DO<sub>550</sub> el cultivo se transfirió al fermentador Biostat-D Braun de 200 L. El medio utilizado fue el mismo que en el fermentador de siembra, el volumen de trabajo inicial fue 140 L y se cargó glucosa al 50% p/p a 8 g/L. La fermentación se inició como una operación por lotes, y una vez que se agotó la glucosa (<0,5 g/L) se inició una operación por lotes alimentados con glucosa al 50% p/p a un caudal predeterminado (Tabla 6), a aproximadamente 25 DO<sub>550</sub> la alimentación se cambió a una solución de D-lactosa al 25% con un caudal predeterminado (Tabla 7).

La temperatura se controló a 35,0°C, la presión en cabeza a 0,5 bares, el pH en la primera etapa (fase de glucosa) a 6,8 y en la segunda etapa (fase de lactosa) a 7,2, se utilizaron NH<sub>4</sub>OH (29% p/p) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20% p/v) para el control del pH, el Od se controló en la primera etapa al 25% de saturación en aire y en la segunda etapa al 10%, el Od se controló en primer lugar por agitación (250-450 rpm) y más tarde por aireación (25-35 litros estándares por minuto). Los niveles de glucosa y lactosa se monitorizaron durante la operación de alimentación y si los niveles de glucosa superaban 0,1 g/L o la lactosa estaba por encima de 1 g/L, se detendría o se reduciría temporalmente el programa de alimentación. La operación se terminó 40 horas después de la iniciación de la alimentación de lactosa, y las células se recogieron por centrifugación o microfiltración o se mantuvieron en el recipiente para el tratamiento con glutaraldehído. La fermentación produjo aproximadamente 8 kg en peso de células secas con una actividad específica de nitrilasa de 2819 U de BZN/g pcs (1788 U de GLN /g pcs).

Tabla 7: Protocolo de alimentación

Intervalos de tiempo de alimentación, (h)	Caudal de alimentación, g/min	Sustrato	Etapas
0	6,13	50% p/p de glucosa	1ª
1	7,13	50% p/p de glucosa	1ª
2	8,28	50% p/p de glucosa	1ª
3	9,62	50% p/p de glucosa	1ª
4	11,18	50% p/p de glucosa	1ª
5	11,18	50% p/p de glucosa	1ª
6	11,18	50% p/p de glucosa	1ª
7	11,18	50% p/p de glucosa	1ª
8	11,18	50% p/p de glucosa	1ª
0	11,22	25% p/p de glucosa	2ª
2	24,42	25% p/p de glucosa	2ª
20	16,72	25% p/p de glucosa	2ª
30	18,7	25% p/p de glucosa	2ª
40	18,7	25% p/p de glucosa	2ª

Al final de la fermentación, la agitación se redujo hasta 150 rpm, se detuvo la aireación y la temperatura se mantuvo a 35°C. Se retiró parte del caldo de fermentación, dejando aproximadamente 180 kg en el fermentador. Este caldo remanente se tituló hasta pH 5,2 y se mantuvo a este pH con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20% (20% p/p) y NaOH (50% p/p), mientras se añadían con agitación 9,0 L de glutaraldehído acuoso (GA, 10% p/p) a un caudal de ~90 mL/min; este caudal de adición era equivalente a 50 mg de glutaraldehído/L de caldo de fermentación/min, y la concentración final de glutaraldehído fue aproximadamente 5 g de glutaraldehído/L (0,035 g de glutaraldehído/DO<sub>550</sub>). Después de 5 h desde el inicio de la adición de glutaraldehído al caldo, el pH se ajustó a 7,0 y se añadieron con agitación 1,8 L de bisulfito de sodio acuoso (10% p/p, pH 7) (aproximadamente 1 g de bisulfito de sodio/L de concentración final), y el caldo se agitó durante 15 minutos más. A continuación se disminuyó la temperatura del caldo hasta 10°C y la agitación se disminuyó hasta 100 rpm. El caldo se concentró hasta 40 kg de suspensión celular usando una centrifugadora Diskstack (Alfa Laval), después se añadieron a la suspensión 50 kg de agua DI (20°C) y la mezcla se concentró por centrifugación para producir 40 kg de suspensión celular lavada. La suspensión (identificada como NIT 188A-C2) se conservó a 5°C, y una porción de la suspensión celular se usó directamente para la preparación de un catalizador celular inmovilizado (Ejemplo 6). La actividad específica de nitrilasa durante cada etapa del procedimiento se resume en la Tabla 8.

Tabla 8: Actividad de nitrilasa durante las diferentes etapas del tratamiento con GA y bisulfito

Etapas de fermentación	U de BZN/g pcs
Pretratamiento con GA	2819
Postratamiento con GA	3300
NaHSO <sub>3</sub>	2493

### Ejemplo 6

Inmovilización de *E. coli* MG1655/pNM18-168V pretratada con glutaraldehído en perlas de carragenina reticuladas con GA/PEI.

El concentrado de la suspensión celular final recuperado del caldo de fermentación tratado con bisulfito de sodio y glutaraldehído del Ejemplo 5 se centrifugó a 5°C. El sedimento celular resultante se volvió a poner en suspensión en una cantidad 5 veces en peso de tampón de fosfato de potasio 0,35 M (pH 7,2), y la centrifugación de la suspensión celular resultante a 5°C produjo una pasta celular húmeda que se inmovilizó y reticuló químicamente



con GA y PEI como se ha descrito en el Ejemplo 2. El catalizador celular inmovilizado resultante se identificó como NIT 188A-C2 inmovilizado.

### Ejemplo 7

5 Deshidratación/rehidratación del biocatalizador inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina preparado usando los transformantes *E. coli* MG1655/pNM18-168V y *E. coli* MG1655/pSW138-F168V pretratados con glutaraldehído

10 Las perlas del transformantes *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizadas en carragenina y reticuladas con glutaraldehído/polietilenimina preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 6 utilizando células pretratadas con glutaraldehído se deshidrataron en una estufa a vacío (176 mm de Hg) a 35°C con purga de nitrógeno durante 20 horas, se pesaron y se deshidrataron como antes durante 4 horas más (un total de 24 horas). La relación entre el peso final de las perlas deshidratadas y el peso de las perlas originales (no deshidratadas) fue 0,217. Las perlas deshidratadas se rehidrataron posteriormente colocando las perlas en una solución 20 veces (en peso) de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3) a 5°C durante 72 horas. Las perlas rehidratadas resultantes se lavaron dos veces con una solución 9 veces (en peso) de glicolato de amonio 0,10 M (pH 7,3), a continuación se pesaron; la relación entre el peso de las perlas rehidratadas y el peso de las perlas originales (no deshidratadas) fue 0,578 para las perlas rehidratadas a 5°C. El biocatalizador resultante se identificó como NIT 188A-C2-D inmovilizado.

### Ejemplo 8

20 Actividad específica del biocatalizador *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina preparado usando los transformantes *E. coli* MG1655/pNM18-168V y *E. coli* MG1655/pSW138-F168V pretratados con glutaraldehído, antes y después de la deshidratación/re-hidratación del biocatalizador inmovilizado

25 En un procedimiento típico, se realizaron series duplicadas de reacciones por lotes para la conversión de glicolonitrilo en ácido glicólico en recipientes de reacción con camisa, de 50 mL, equipados con agitación superior y control de temperatura a 25°C. En una primera serie de reacciones duplicadas, cada recipiente de reacción se cargó con 4 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI (0,20 g en peso de células secas; NIT 188A-C2 inmovilizado, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 6 (pretratamiento con GA de las células antes de la inmovilización)), 3,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 7,75 mL de agua destilada desionizada. En una segunda serie de reacciones duplicadas, cada recipiente de reacción se cargó con 2,55 g de perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI (0,20 g en peso de células secas; NIT 188A-C2-D inmovilizado, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 7 (pretratamiento con GA de las células antes de la inmovilización y posterior deshidratación/rehidratación)), 3,0 mL de glicolato de amonio acuoso (4,0 M, pH 7,0) y 9,10 mL de agua destilada desionizada.

35 Cada recipiente de reacción se purgó con nitrógeno y la mezcla se agitó a 25°C, mientras se utilizaban bombas de jeringa programables para añadir simultáneamente 0,520 mL de glicolonitrilo (GLN) al 62% en peso en agua (GLN 6,0 mmol, formaldehído 0,006 mmol; estabilizada con ácido glicólico al 0,7 % en peso) y 0,150 mL de hidróxido de amonio acuoso (NH<sub>3</sub> al 0,9375% en peso); cada 2 h se añadió simultáneamente un volumen equivalente de soluciones de GLN e hidróxido de amonio (total de ocho adiciones simultáneas de solución de GLN e hidróxido de amonio acuoso) para mantener la concentración de GLN a  $\leq$  400 mM y el pH en un intervalo de 7,0-7,5. Se retiraron muestras de reacción (0,050 mL) en momentos predeterminados después de la primera adición de GLN y se añadieron a 0,010 mL de HCl 6,0 N y 0,200 mL de iso-propanol 0,25 M en agua (patrón externo de HPLC), se centrifugó la mezcla resultante, y el líquido sobrenadante se analizó por HPLC para determinar la velocidad de reacción inicial y la actividad específica del catalizador ( $\mu$ mol de ácido glicólico/min/g en pcs de biocatalizador). Al completarse la reacción, se produjo una conversión del 100% de GLN en ácido glicólico (en forma de sal de amonio) con un rendimiento > 99%. La Tabla 9 recoge las actividades específicas iniciales de los biocatalizadores.

45 Al final de la primera reacción, la mezcla acuosa de producto se decantó del catalizador (bajo nitrógeno) en cada recipiente de reacción, dejando una mezcla de catalizador celular inmovilizado y permaneciendo la solución del producto remanente. A continuación se añadió al recipiente de reacción suficiente agua destilada desionizada para reproducir el volumen de reacción inicial en la primera reacción antes de la adición de soluciones de GLN e hidróxido de amonio (aproximadamente 15,3 mL de volumen de reacción inicial) y se realizó una segunda reacción a 25°C por adición de partes alícuotas de GLN acuoso e hidróxido de amonio como se acaba de describir. Las actividades específicas del biocatalizador recuperado en reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del catalizador se recogen en la Tabla 10.

Tabla 9. Actividad específica del biocatalizador *E. coli* MG1655/pSW138-F168V inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina preparado usando los transformantes *E. coli* MG1655/pNM18-168V y *E. coli* MG1655/pSW138-F168V pretratados con glutaraldehído.

Biocatalizador celular inmovilizado	Temperatura de deshidratación, (°C)	Temperatura de rehidratación, (°C)	Actividad específica. (U/g pcs)	Actividad después de la rehidratación, (%)
NIT 188A-C2	ninguna	ninguna	1826	-
NIT 188A-C2	ninguna	ninguna	1857	-
NIT 188A-C2-D	35	5	1660	90
NIT 188A-C2-D	35	5	1584	86

5 Tabla 10. Actividad específica del biocatalizador recuperado en reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del biocatalizador utilizando un biocatalizador microbiano inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/PEI preparado utilizando células pretratadas con glutaraldehído.

Biocatalizador celular inmovilizado	Células inmovilizadas deshidratadas / rehidratadas	Actividad específica del biocatalizador (U de GLN/g pcs) en reacciones por lotes consecutivas				Disminución de la actividad específica, rxn1 a rxn4 (%)
		Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4	
NIT 188C2	no	1826	1518	1596	1759	4
NIT 188C2	no	1857	1656	1581	1947	0
NIT 188C2-D	sí	1660	1369	1472	1674	0
NIT 188C2-D	sí	1584	1392	1485	1417	10

### Ejemplo 9

10 Estabilidad en durante la conservación del biocatalizador inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/polietilenimina preparado utilizando un transformante *E. coli* MG1655/pNM18-168V pretratado con glutaraldehído, antes y después de la deshidratación/rehidratación del biocatalizador inmovilizado

15 Perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI recién preparadas (NIT 188A-C2 inmovilizado, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 6 (pretratamiento con GA de las células antes de la inmovilización)) se conservaron durante 28 días en bicarbonato de amonio 1,0 M (pH 7,3) a 5°C. Las perlas de *E. coli* MG1655/pSW138-168V/carragenina reticuladas con GA/PEI deshidratadas (NIT 188A-C2 inmovilizado, deshidratado como se ha descrito en el Ejemplo 7) se conservaron en seco bajo nitrógeno a 5°C durante 28 días, y luego se rehidrataron tal como se ha descrito en el Ejemplo 7. Antes de su uso, los biocatalizadores se lavaron dos veces durante 15 minutos con 180 mL de glicolato de amonio 0,1 M (pH 7,0) a temperatura ambiente, luego se evaluaron en series duplicadas de reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del biocatalizador utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 8. La actividad específica de cada biocatalizador en cuatro reacciones por lotes consecutivas para convertir glicolonitrilo en glicolato de amonio se recoge en la Tabla 11.

20

Tabla 11. Actividad específica en reacciones por lotes consecutivas con reciclaje del biocatalizador usando catalizador microbiano inmovilizado en carragenina y reticulado con glutaraldehído/PEI preparado utilizando células pretratadas con glutaraldehído; biocatalizador conservado durante 28 días a 5°C, con o sin deshidratación.

	Actividad específica del biocatalizador en reacciones por lotes consecutivas (U de GLN/g pcs)				Disminución de la actividad específica, rxn1 a rxn4 (%)
	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4	
Biocatalizador celular inmovilizado (células pretratadas con glutaraldehído)					
No deshidratado	1910	1455	1580	1543	19
No deshidratado	1987	1434	1472	1783	10
Deshidratado/rehidratado	1474	1467	1585	1318	11
Deshidratado/rehidratado	1493	1412	-	1665	0

**Listado de Secuencias**

- <110> E.I. duPont de Nemours and Company, Inc.
- <120> Mejoras en nitrilasa microbiana inmovilizada para la producción de ácido glicólico
- <130> CL3889PCT
- 5 <160> 57
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 12
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Resto distintivo catalítico
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA
- 15 <222> (2)..(2)
- <223> Xaa = Ala o Gly
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA
- <222> (3)..(3)
- 20 <223> Xaa = Leu, Val, o Ala
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA
- <222> (4)..(3)
- <223> Xaa = Ala, Asn, Ile, Cys, Val, o Gln;
- 25 <220>
- <221> característica\_nueva
- <222> (4)..(4)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- 30 <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA
- <222> (8)..(8)
- <223> Xaa = His o Asn;
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA
- 35 <222> (9)..(9)
- <223> Xaa = Leu, Tyr, Phe, Ala, Met, Lys, Val, Thr, o Arg
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA
- <222> (10)..(10)
- 40 <223> Xaa = Asn, Gln, Met, Leu, o Ser;
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA
- <222> (11)..(11)
- <223> Xaa = Pro o Thr
- 45 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA\_NUEVA
- <222> (12)..(12)
- <223> Xaa = Leu o Val
- <400> 1



ES 2 562 791 T9

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag	48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu	
1 5 10 15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc	96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	
20 25 30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa	144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	
35 40 45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag	192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta	240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	
65 70 75 80	
ggg gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa	288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	
85 90 95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat	336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	
100 105 110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115 120 125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130 135 140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145 150 155 160	
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg	528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	
165 170 175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc	576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	
180 185 190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg	624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	
195 200 205	
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg	672
Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser	
210 215 220	

ES 2 562 791 T9

acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac 720  
 Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac 768  
 Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag 816  
 Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag 864  
 Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg cgg cct gac gtg ctg tcg 912  
 Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att 960  
 Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga 1008  
 Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga 1056  
 Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 4  
 <211> 369  
 <212> PRT

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<400> 4

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

ES 2 562 791 T9

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser



ES 2 562 791 T9

290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
355 360 365

Lys

<210> 5

<211> 356

<212> PRT

5 <213> *Alcaligenes faecalis* LM3

<400> 5

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

Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala  
20 25 30

Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr  
35 40 45

Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp  
50 55 60

Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp  
65 70 75 80

Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile  
85 90 95

Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu  
100 105 110

Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Gln Met Leu Trp Ser Arg Arg  
115 120 125

ES 2 562 791 T9

Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr  
 130 135 140

Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala  
 145 150 155 160

Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr  
 165 170 175

Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu  
 180 185 190

Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala  
 195 200 205

Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser  
 210 215 220

Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His  
 225 230 235 240

Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala  
 245 250 255

Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly  
 260 265 270

Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala  
 275 280 285

Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu  
 290 295 300

Val Leu Asp Leu Gly His Arg Glu Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys  
 305 310 315 320

Ser Val Ile Gln Glu Glu Ala Pro Glu Pro His Val Gln Ser Thr Ala  
 325 330 335

Ala Pro Val Ala Val Ser Gln Thr Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val  
 340 345 350

Gln Glu Pro Ser  
 355

<210> 6  
 <211> 366  
 <212> PRT  
 <213> Rhodococcus rhodochrous J1

ES 2 562 791 T9

<400> 6

Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Gln  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Thr Val Ser Ile  
 20 25 30

Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu Leu Val Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile Trp Val Asp Ser Pro Leu  
 50 55 60

Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr  
 65 70 75 80

Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu Asp Ala Ala Arg Asp His  
 85 90 95

Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu  
 100 105 110

Tyr Met Thr Gln Leu Val Ile Asp Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg  
 115 120 125

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

Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu  
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala  
 165 170 175

Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly Met  
 180 185 190

Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala Gln Leu  
 195 200 205

Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe Val Val Cys  
 210 215 220

ES 2 562 791 T9

Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe Phe Cys Asp Asn  
225 230 235 240

Asp Glu Gln Arg Lys Leu Ile Gly Arg Gly Gly Gly Phe Ala Arg Ile  
245 250 255

Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Glu Asp Glu  
260 265 270

Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala  
275 280 285

Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu  
290 295 300

Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg His Thr Thr Pro Val Asn Thr Ala Ile  
305 310 315 320

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

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

Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp Arg Ala Thr Ala Ser Ile  
355 360 365

<210> 7

<211> 383

<212> PRT

5 <213> Rhodococcus rhodochrous K22

<400> 7

Met Ser Ser Asn Pro Glu Leu Lys Tyr Thr Gly Lys Val Lys Val Ala  
1 5 10 15

Thr Val Gln Ala Glu Pro Val Ile Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp  
20 25 30

Lys Ala Ile Gly Phe Ile Glu Glu Ala Ala Lys Asn Gly Ala Glu Phe  
35 40 45

Leu Ala Phe Pro Glu Val Trp Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp  
50 55 60

ES 2 562 791 T9

Ile Gly Asp Val Lys Trp Ala Val Ser Asp Phe Ile Pro Lys Tyr His  
65 70 75 80

Glu Asn Ser Leu Thr Leu Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Glr Leu  
85 90 95

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

Asp Gly Ala Ser Arg Tyr Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Gln Asr Gly  
115 120 125

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

Thr Ile Tyr Gly Glu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe  
145 150 155 160

Gly Phe Gly Arg Val Gly Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Glr Pro  
165 170 175

Leu Ser Lys Tyr Met Met Tyr Ser Leu Asn Glu Gln Ile His Val Ala  
180 185 190

Ser Trp Pro Ala Met Phe Ala Leu Thr Pro Asp Val His Gln Leu Ser  
195 200 205

Val Glu Ala Asn Asp Thr Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln  
210 215 220

Thr Phe Val Leu Ala Ser Thr His Val Ile Gly Lys Ala Thr Glr Asp  
225 230 235 240

Leu Phe Ala Gly Asp Asp Asp Ala Lys Arg Ala Leu Leu Pro Leu Gly  
245 250 255

Gln Gly Trp Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp Gly Lys Ser Leu Ala Glu  
260 265 270

Pro Leu Pro Glu Asp Ala Glu Gly Leu Leu Tyr Ala Glu Leu Asp Leu  
275 280 285

Glu Gln Ile Ile Leu Ala Lys Ala Ala Ala Asp Pro Ala Gly His Tyr  
290 295 300

Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser Leu Lys Ile Asp Thr Arg Asn His Thr

ES 2 562 791 T9

305 310 315 320

Pro Val Gln Tyr Ile Thr Ala Asp Gly Arg Thr Ser Leu Asn Ser Asn  
 325 330 335

Ser Arg Val Glu Asn Tyr Arg Leu His Gln Leu Ala Asp Ile Glu Lys  
 340 345 350

Tyr Glu Asn Ala Glu Ala Ala Thr Leu Pro Leu Asp Ala Pro Ala Pro  
 355 360 365

Ala Pro Ala Pro Glu Gln Lys Ser Gly Arg Ala Lys Ala Glu Ala  
 370 375 380

<210> 8

<211> 381

<212> PRT

5 <213> Norcardia sp. C-14-1

<400> 8

Met Lys Val Ala Thr Val Gln Ala Glu Pro Val Ile Leu Asp Ala Asp  
 1 5 10 15

Ala Thr Ile Asp Lys Ala Ile Gly Tyr Ile Glu Glu Ala Ser Lys Asn  
 20 25 30

Gly Ala Glu Phe Ile Ala Phe Pro Glu Val Trp Ile Pro Gly Tyr Pro  
 35 40 45

Tyr Trp Ala Trp Ile Gly Asp Val Lys Trp Ala Val Ser Glu Phe Ile  
 50 55 60

Pro Lys Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr Leu Gly Asp Asp Arg Met Arg  
 65 70 75 80

Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Gln His Asn Ile Ala Met Val Val Gly  
 85 90 95

Tyr Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ser Arg Tyr Leu Ser Gln Val Phe Ile  
 100 105 110

Asp Gln Asn Gly Asp Ile Val Ala Asn Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr  
 115 120 125

His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Leu  
 130 135 140

ES 2 562 791 T9

Thr His Asp Phe Gly Phe Gly Arg Val Gly Gly Leu Asn Cys Trp Glu  
145 150 155 160

His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Tyr Met Met Tyr Ser Leu Asn Glu Gln  
165 170 175

Ile His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Phe Ala Leu Thr Pro Asp Val  
180 185 190

His Gln Leu Ser Val Glu Ala Asn Asp Thr Val Thr Arg Ser Tyr Ala  
195 200 205

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

Ala Thr Gln Asp Leu Phe Ala Gly Asp Asp Glu Ala Lys Arg Ala Leu  
225 230 235 240

Leu Pro Leu Gly Gln Gly Trp Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp Gly Lys  
245 250 255

Ser Leu Ala Glu Pro Leu Ala Glu Asn Ala Glu Gly Leu Leu Tyr Ala  
260 265 270

Glu Leu Asp Leu Glu Gln Ile Ile Val Ala Lys Ala Ala Ala Asp Pro  
275 280 285

Ala Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser Leu Lys Val Asp Thr  
290 295 300

Arg Asn His Thr Pro Val Gln Tyr Val Thr Glu Asp Gly Gly Ser Ser  
305 310 315 320

Leu Asn Ser Asn Ser Arg Val Glu Asn Tyr Arg Leu Arg Gln Leu Ala  
325 330 335

Asp Ile Glu Lys Tyr Glu Asn Ala Asp Ser Ala Thr Val Pro Leu Asp  
340 345 350

Val Thr Thr Pro Glu Lys Gln Ser Gly Asp Val Asn Ala Asn Gly Asn  
355 360 365

Ala Lys Val Asn Thr Asn Pro Ser Ala Lys Ala Lys Ala  
370 375 380

<210> 9

<211> 310

<212> PRT

5 <213> Bordetella bronchiseptica RB50

ES 2 562 791 T9

<400> 9

Met Thr Thr His Arg Ile Ala Val Ile Gln Asp Gly Pro Val Pro Gly  
 1 5 10 15

Asp Ala Met Ala Thr Ala Glu Lys Met Ser Arg Leu Ala Ala Ser Ala  
 20 25 30

Lys Ala Gln Gly Ala Arg Leu Ala Leu Phe Pro Glu Ala Phe Val Gly  
 35 40 45

Gly Tyr Pro Lys Gly Ala Asp Phe His Ile Phe Leu Gly Gly Arg Thr  
 50 55 60

Pro Gln Gly Arg Ala Gln Tyr Gln Arg Tyr Ala Glu Thr Ala Ile Ala  
 65 70 75 80

Val Pro Gly Pro Val Thr Glu Arg Ile Gly Gln Ile Ala Ala Glu Gln  
 85 90 95

Asp Met Phe Ile Val Val Gly Val Ile Glu Arg Asp Gly Gly Thr Leu  
 100 105 110

Tyr Cys Thr Ile Leu Phe Phe Ser Pro Glu Gly Glu Leu Leu Gly Lys  
 115 120 125

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

Gly Asp Gly Ser Thr Phe Pro Val Tyr Asp Thr Pro Leu Gly Lys Leu  
 145 150 155 160

Gly Ala Val Val Cys Trp Glu Asn Tyr Met Pro Leu Leu Arg Met Ala  
 165 170 175

Met Tyr Gly Lys Gln Ile Gln Ile Tyr Cys Ala Pro Thr Ala Asp Asp  
 180 185 190

Lys Pro Thr Trp Val Ser Thr Met Gln His Val Ala Leu Glu Gly Arg  
 195 200 205

Cys Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln His Leu Arg Gly Lys Asp Phe Pro  
 210 215 220



ES 2 562 791 T9

Pro Glu Phe His Asn Ala Leu Asp Val Gln Pro Asp Thr Val Leu Met  
225 230 235 240

Arg Gly Gly Ser Cys Ile Val Asp Pro Met Gly Gln Leu Leu Ala Gly  
245 250 255

Pro Val Tyr Asp Glu Asp Ala Ile Leu Val Ala Asp Ile Asp Leu Asp  
260 265 270

Ala Val Thr Arg Gly Lys Met Asp Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ala  
275 280 285

Arg Pro Asp Ile Phe Ser Leu Thr Val Asp Glu Arg Pro Lys Pro Pro  
290 295 300

Val Thr Thr Leu Lys Pro  
305 310

<210> 10

<211> 339

<212> PRT

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 10

Met Ser Thr Ser Glu Asn Thr Pro Phe Asn Gly Val Ala Ser Ser Thr  
1 5 10 15

Ile Val Arg Ala Thr Ile Val Gln Ala Ser Thr Val Tyr Asn Asp Thr  
20 25 30

Pro Ala Thr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Phe Ile Val Glu Ala Ala Ser  
35 40 45

Lys Gly Ser Glu Leu Val Val Phe Pro Glu Ala Phe Ile Gly Gly Tyr  
50 55 60

Pro Arg Gly Phe Arg Phe Gly Leu Gly Val Gly Val His Asn Glu Glu  
65 70 75 80

Gly Arg Asp Glu Phe Arg Lys Tyr His Ala Ser Ala Ile Lys Val Pro  
85 90 95

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

ES 2 562 791 T9

Tyr Leu Val Met Gly Ala Ile Glu Lys Asp Gly Tyr Thr Leu Tyr Cys  
 115 120 125

Thr Ala Leu Phe Phe Ser Pro Gln Gly Gln Phe Leu Gly Lys His Arg  
 130 135 140

Lys Leu Met Pro Thr Ser Leu Glu Arg Cys Ile Trp Gly Gln Gly Asp  
 145 150 155 160

Gly Ser Thr Ile Pro Val Tyr Asp Thr Pro Ile Gly Lys Leu Gly Ala  
 165 170 175

Ala Ile Cys Trp Glu Asn Arg Met Pro Leu Tyr Arg Thr Ala Leu Tyr  
 180 185 190

Ala Lys Gly Ile Glu Leu Tyr Cys Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Lys  
 195 200 205

Glu Trp Gln Ser Ser Met Leu His Ile Ala Ile Glu Gly Gly Cys Phe  
 210 215 220

Val Leu Ser Ala Cys Gln Phe Cys Leu Arg Lys Asp Phe Pro Asp His  
 225 230 235 240

Pro Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Trp Tyr Asp Asp Lys Glu Pro Asp Ser  
 245 250 255

Ile Val Ser Gln Gly Gly Ser Val Ile Ile Ser Pro Leu Gly Gln Val  
 260 265 270

Leu Ala Gly Pro Asn Phe Glu Ser Glu Gly Leu Ile Thr Ala Asp Leu  
 275 280 285

Asp Leu Gly Asp Val Ala Arg Ala Lys Leu Tyr Phe Asp Ser Val Gly  
 290 295 300

His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu His Leu Thr Val Asn Glu His Pro  
 305 310 315 320

Lys Lys Pro Val Thr Phe Ile Ser Lys Val Glu Lys Ala Glu Asp Asp  
 325 330 335

Ser Asn Lys

- <210> 11
- <211> 334
- <212> PRT
- <213> Synechococcus elongatus PCC 7942

ES 2 562 791 T9

<400> 11

Met Ala Asp Lys Ile Ile Val Ala Ala Ala Gln Ile Arg Pro Val Leu  
 1 5 10 15

Phe Ser Leu Glu Gly Ser Val Ala Arg Val Leu Ala Ala Met Ala Glu  
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Leu Ile Val Phe Pro Glu Thr Phe Leu  
 35 40 45

Pro Tyr Tyr Pro Tyr Phe Ser Phe Val Glu Pro Pro Val Leu Met Gly  
 50 55 60

Arg Ser His Leu Lys Leu Tyr Glu Gln Ala Phe Thr Met Thr Gly Pro  
 65 70 75 80

Glu Leu Gln Gln Ile Ala Arg Ala Ala Arg Gln His Arg Leu Phe Val  
 85 90 95

Leu Leu Gly Val Asn Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Asn Thr Gln  
 100 105 110

Leu Leu Ile Ser Asp Gln Gly Asp Leu Leu Leu Lys Arg Arg Lys Ile  
 115 120 125

Thr Pro Thr Tyr His Glu Arg Met Val Trp Gly Gln Gly Gly Gly Ala  
 130 135 140

Gly Leu Thr Val Val Glu Thr Val Leu Gly Lys Val Gly Ala Leu Ala  
 145 150 155 160

Cys Trp Glu His Tyr Asn Pro Leu Ala Arg Phe Ser Leu Met Thr Gln  
 165 170 175

Gly Glu Glu Ile His Cys Ala Gln Phe Pro Gly Ser Leu Val Gly Pro  
 180 185 190

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

Ala Gly Cys Phe Val Leu Ser Ser Thr Ala Trp Leu Asp Pro Ala Asp  
 210 215 220

ES 2 562 791 T9

Tyr Asp Thr Ile Thr Pro Asp Arg Ser Leu His Lys Ala Phe Gln Gly  
225 230 235 240

Gly Cys His Thr Ala Ile Ile Ser Pro Glu Gly Arg Tyr Leu Ala Gly  
245 250 255

Pro Leu Pro Glu Gly Glu Gly Leu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Lys Ser  
260 265 270

Leu Ile Thr Lys Arg Lys Arg Met Met Asp Ser Val Gly His Tyr Ser  
275 280 285

Arg Pro Asp Leu Leu Ser Leu Arg Ile Asn Arg Ser Pro Ala Thr Gln  
290 295 300

Val Gln Ala Ile Gly Ser Ala Ala Ala Leu Pro Glu Leu Pro Asn Leu  
305 310 315 320

Glu Ala Ala Pro Ala Glu Thr Ala Glu Asp Tyr Leu His Ala  
325 330

<210> 12

<211> 334

<212> PRT

5 <213> *Synechococcus elongatus* PCC 6301

<400> 12

Met Ala Asp Lys Ile Ile Val Ala Ala Ala Gln Ile Arg Pro Val Leu  
1 5 10 15

Phe Ser Leu Glu Gly Ser Val Ala Arg Val Leu Ala Ala Met Ala Glu  
20 25 30

Ala Ala Ala Ala Gly Val Gln Leu Ile Val Phe Pro Glu Thr Phe Leu  
35 40 45

Pro Tyr Tyr Pro Tyr Phe Ser Phe Val Glu Pro Pro Val Leu Met Gly  
50 55 60

Arg Ser His Leu Lys Leu Tyr Glu Gln Ala Phe Thr Met Thr Gly Pro  
65 70 75 80

Glu Leu Gln Gln Ile Ala Arg Ala Ala Arg Gln His Arg Leu Phe Val  
85 90 95

Leu Leu Gly Val Asn Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Asn Thr Gln

ES 2 562 791 T9

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

<210> 13  
 <211> 346  
 <212> PRT

5 <213> Synechocystis sp. PCC 6803

ES 2 562 791 T9

<400> 13

Met Leu Gly Lys Ile Met Leu Asn Tyr Thr Lys Asn Ile Arg Ala Ala  
 1 5 10 15

Ala Ala Gln Ile Ser Pro Val Leu Phe Ser Gln Gln Gly Thr Met Glu  
 20 25 30

Lys Val Leu Asp Ala Ile Ala Asn Ala Ala Lys Lys Gly Val Glu Leu  
 35 40 45

Ile Val Phe Pro Glu Thr Phe Val Pro Tyr Tyr Pro Tyr Phe Ser Phe  
 50 55 60

Val Glu Pro Pro Val Leu Met Gly Lys Ser His Leu Lys Leu Tyr Gln  
 65 70 75 80

Glu Ala Val Thr Val Pro Gly Lys Val Thr Gln Ala Ile Ala Gln Ala  
 85 90 95

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

Glu Gly Ser Leu Tyr Asn Thr Gln Leu Ile Phe Asp Ala Asp Gly Ala  
 115 120 125

Leu Val Leu Lys Arg Arg Lys Ile Thr Pro Thr Tyr His Glu Arg Met  
 130 135 140

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

Val Gly Arg Leu Gly Ala Leu Ala Cys Trp Glu His Tyr Asn Pro Leu  
 165 170 175

Ala Arg Tyr Ala Leu Met Ala Gln His Glu Gln Ile His Cys Gly Gln  
 180 185 190

Phe Pro Gly Ser Met Val Gly Gln Ile Phe Ala Asp Gln Met Glu Val  
 195 200 205

Thr Met Arg His His Ala Leu Glu Ser Gly Cys Phe Val Ile Asn Ala  
 210 215 220

ES 2 562 791 T9

Thr Gly Trp Leu Thr Ala Glu Gln Lys Leu Gln Ile Thr Thr Asp Glu  
225 230 235 240

Lys Met His Gln Ala Leu Ser Gly Gly Cys Tyr Thr Ala Ile Ile Ser  
245 250 255

Pro Glu Gly Lys His Leu Cys Glu Pro Ile Ala Glu Gly Glu Gly Leu  
260 265 270

Ala Ile Ala Asp Leu Asp Phe Ser Leu Ile Ala Lys Arg Lys Arg Met  
275 280 285

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

Leu Asn Asn Gln Pro Trp Ser Ala Leu Glu Ala Asn Pro Val Thr Pro  
305 310 315 320

Asn Ala Ile Pro Ala Val Ser Asp Pro Glu Leu Thr Glu Thr Ile Glu  
325 330 335

Ala Leu Pro Asn Asn Pro Ile Phe Ser His  
340 345

<210> 14

<211> 307

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas entomophila* L48

<400> 14

Met Pro Lys Ser Ile Val Ala Ala Leu Gln Val Gly Ser Leu Pro Glu  
1 5 10 15

Gly Lys Ala Ala Thr Leu Glu Gln Ile Leu Gly Tyr Glu Gln Ala Ile  
20 25 30

Arg Glu Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Met Pro Glu Ala Leu Leu Gly  
35 40 45

Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Gly Phe Gly Thr Gln Leu Gly Tyr Arg Leu  
50 55 60

Pro Glu Gly Arg Glu Ala Phe Ala Arg Tyr Phe Ala Asn Ala Ile Asp  
65 70 75 80

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

ES 2 562 791 T9

Gly Ala Ser Leu Val Leu Gly Val Ile Glu Arg Ser Gly Asn Thr Leu  
 100 105 110

Tyr Cys Thr Val Leu Phe Phe Glu Pro Glu Gly Gly Leu Val Ala Lys  
 115 120 125

His Arg Lys Leu Met Pro Thr Gly Thr Glu Arg Leu Ile Trp Gly Lys  
 130 135 140

Gly Asp Gly Ser Thr Leu Pro Val Val Asp Gly Arg Ala Gly Arg Ile  
 145 150 155 160

Gly Ala Ala Val Cys Trp Glu Asn Tyr Met Pro Leu Leu Arg Thr Ala  
 165 170 175

Met Tyr Ala Lys Gly Val Gln Leu Trp Cys Ala Pro Thr Val Asp Glu  
 180 185 190

Arg Glu Leu Trp Gln Val Ser Met Arg His Val Ala Ala Glu Gly Arg  
 195 200 205

Cys Phe Val Ile Ser Ala Cys Gln Val Gln Asp Ser Pro Ala Ala Leu  
 210 215 220

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

Gly Ser Leu Ile Val Gly Pro Leu Gly Asp Val Leu Ala Gly Pro Leu  
 245 250 255

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

Val Arg Ala Arg Tyr Asp Phe Asp Val Val Gly His Tyr Ala Arg Pro  
 275 280 285

Asp Val Phe Glu Leu Ser Val Asp Glu Arg Pro Arg Pro Gly Val Arg  
 290 295 300

Phe Ile Gly  
 305

<210> 15

<211> 329

<212> PRT

5 <213> *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4

<400> 15



ES 2 562 791 T9

Met Ser Cys His Arg Val Ala Val Ile Gln Ala Gly Thr Ser Leu Phe  
1 5 10 15

Asp Thr Glu Lys Thr Leu Asp Arg Met Glu Ala Leu Cys Arg Gln Ala  
20 25 30

Ala Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Val Phe Pro Glu Ala Tyr Ile Gly  
35 40 45

Gly Tyr Pro Lys Gly Leu Asp Phe Gly Ala Arg Met Gly Thr Arg Thr  
50 55 60

Glu Ala Gly Arg Glu Asp Phe Leu Arg Tyr Trp Lys Ala Ala Ile Asp  
65 70 75 80

Val Pro Gly Lys Glu Thr Ala Arg Ile Gly Ser Phe Ala Ala Lys Met  
85 90 95

Lys Ala Tyr Leu Val Val Gly Val Ile Glu Arg Ser Glu Ala Thr Leu  
100 105 110

Tyr Cys Thr Ala Leu Phe Phe Ala Pro Asp Gly Thr Leu Ile Gly Lys  
115 120 125

His Arg Lys Leu Met Pro Thr Ala Thr Glu Arg Leu Val Trp Gly Gln  
130 135 140

Gly Asp Gly Ser Thr Ile Glu Ile Leu Asp Thr Ala Val Gly Lys Leu  
145 150 155 160

Gly Ala Ala Ile Cys Trp Glu Asn Tyr Met Pro Val Leu Arg Gln Val  
165 170 175

Met Tyr Ala Gly Gly Val Asn Ile Trp Cys Ala Pro Thr Val Asp Gln  
180 185 190

Arg Glu Ile Trp Gln Val Ser Met Arg His Ile Ala Tyr Glu Gly Arg  
195 200 205

Leu Phe Val Leu Ser Ala Cys Gln Tyr Met Thr Arg Ala Asp Ala Pro  
210 215 220

Ala Asp Tyr Asp Cys Ile Gln Gly Asn Asp Pro Glu Thr Glu Leu Ile



ES 2 562 791 T9

Gln Leu Trp Phe Asp Pro Asn Gly Asp Leu Ile Gly Lys His Arg Lys  
 115 120 125

Leu Lys Ala Thr Asn Ala Glu Lys Thr Ile Trp Gly Asp Gly Asp Gly  
 130 135 140

Ser Met Met Pro Val Phe Glu Thr Glu Phe Gly Asn Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

Gln Cys Trp Glu His Phe Leu Pro Leu Asn Val Ala Ala Met Ala Ser  
 165 170 175

Met Asn Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ile Gly Met Pro Gln  
 180 185 190

Glu Gly His Leu Phe Gly Pro Glu Gln Cys Val Thr Ala Thr Lys Tyr  
 195 200 205

Tyr Ala Ile Ser Asn Gln Val Phe Cys Leu Leu Ser Ser Gln Ile Trp  
 210 215 220

Thr Glu Glu Gln Arg Asp Lys Ile Cys Glu Thr Glu Glu Gln Arg Asn  
 225 230 235 240

Phe Met Lys Val Gly His Gly Phe Ser Lys Ile Ile Ala Pro Asn Gly  
 245 250 255

Met Glu Ile Gly Asn Lys Leu Ala His Asp Glu Glu Gly Ile Thr Tyr  
 260 265 270

Ala Asp Ile Asp Leu Glu Gln Ile Ile Pro Gly Lys Phe Leu Ile Asp  
 275 280 285

Ser Ala Gly His Tyr Ser Thr Pro Gly Phe Leu Ser Leu Ser Phe Asp  
 290 295 300

Arg Thr Glu Lys Lys Pro Ile Lys His Ile Gly Glu Ser Ala Gln Glu  
 305 310 315 320

Thr Val Thr Tyr Glu Glu Ile Gln Tyr Gly Asn Lys Ala Asn Val Lys  
 325 330 335

Val His Ser

<210> 17  
 <211> 354  
 <212> PRT

5 <213> Comamonas testosterone

ES 2 562 791 T9

<400> 17

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

Val Phe Met Asn Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Thr Cys Lys Leu Ile  
 20 25 30

Ala Glu Ala Ala Ser Met Gly Ala Lys Val Ile Gly Phe Pro Glu Ala  
 35 40 45

Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ile Trp Thr Ser Asn Met Asp Phe  
 50 55 60

Thr Gly Met Met Trp Ala Val Leu Phe Lys Asn Ala Ile Glu Ile Pro  
 65 70 75 80

Ser Lys Glu Val Gln Gln Ile Ser Asp Ala Ala Lys Lys Asn Gly Val  
 85 90 95

Tyr Val Cys Val Ser Val Ser Glu Lys Asp Asn Ala Ser Leu Tyr Leu  
 100 105 110

Thr Gln Leu Trp Phe Asp Pro Asn Gly Asn Leu Ile Gly Lys His Arg  
 115 120 125

Lys Phe Lys Pro Thr Ser Ser Glu Arg Ala Val Trp Gly Asp Gly Asp  
 130 135 140

Gly Ser Met Ala Pro Val Phe Lys Thr Glu Tyr Gly Asn Leu Gly Gly  
 145 150 155 160

Leu Gln Cys Trp Glu His Ala Leu Pro Leu Asn Ile Ala Ala Met Gly  
 165 170 175

Ser Leu Asn Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Phe Val Pro  
 180 185 190

Lys Gly Ala Val Ser Ser Arg Val Ser Ser Ser Val Cys Ala Ser Thr  
 195 200 205

Asn Ala Met His Gln Ile Ile Ser Gln Phe Tyr Ala Ile Ser Asn Gln  
 210 215 220

ES 2 562 791 T9

Val Tyr Val Ile Met Ser Thr Asn Leu Val Gly Gln Asp Met Ile Asp  
225 230 235 240

Met Ile Gly Lys Asp Glu Phe Ser Lys Asn Phe Leu Pro Leu Gly Ser  
245 250 255

Gly Asn Thr Ala Ile Ile Ser Asn Thr Gly Glu Ile Leu Ala Ser Ile  
260 265 270

Pro Gln Asp Ala Glu Gly Ile Ala Val Ala Glu Ile Asp Leu Asn Gln  
275 280 285

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

Pro Gly Phe Leu Ser Leu Thr Phe Asp Gln Ser Glu His Val Pro Val  
305 310 315 320

Lys Lys Ile Gly Glu Gln Thr Asn His Phe Ile Ser Tyr Glu Asp Leu  
325 330 335

His Glu Asp Lys Met Asp Met Leu Thr Ile Pro Pro Arg Arg Val Ala  
340 345 350

Thr Ala

<210> 18

<211> 332

<212> PRT

5 <213> Synechococcus sp. CC9605

<400> 18

Met Thr Thr Val Lys Val Ala Ala Ala Gln Ile Arg Pro Val Leu Phe  
1 5 10 15

Ser Leu Asp Gly Ser Leu Gln Lys Val Leu Asp Ala Met Ala Glu Ala  
20 25 30

Ala Ala Gln Gly Val Glu Leu Ile Val Phe Pro Glu Thr Phe Leu Pro  
35 40 45

Tyr Tyr Pro Tyr Phe Ser Phe Val Glu Pro Pro Val Leu Met Gly Arg  
50 55 60

ES 2 562 791 T9

Ser His Leu Ala Leu Tyr Glu Gln Ala Val Val Val Pro Gly Pro Val  
65 70 75 80

Thr Asp Ala Val Ala Ala Ala Ala Ser Gln Tyr Gly Met Gln Val Leu  
85 90 95

Leu Gly Val Asn Glu Arg Asp Gly Gly Thr Leu Tyr Asn Thr Gln Leu  
100 105 110

Leu Phe Asn Ser Cys Gly Glu Leu Val Leu Lys Arg Arg Lys Ile Thr  
115 120 125

Pro Thr Tyr His Glu Arg Met Val Trp Gly Gln Gly Asp Gly Ser Gly  
130 135 140

Leu Lys Val Val Gln Thr Pro Leu Ala Arg Val Gly Ala Leu Ala Cys  
145 150 155 160

Trp Glu His Tyr Asn Pro Leu Ala Arg Tyr Ala Leu Met Ala Gln Gly  
165 170 175

Glu Glu Ile His Cys Ala Gln Phe Pro Gly Ser Leu Val Gly Pro Ile  
180 185 190

Phe Thr Glu Gln Thr Ala Val Thr Met Arg His His Ala Leu Glu Ala  
195 200 205

Gly Cys Phe Val Ile Cys Ser Thr Gly Trp Leu His Pro Asp Asp Tyr  
210 215 220

Ala Ser Ile Thr Ser Glu Ser Gly Leu His Lys Ala Phe Gln Gly Gly  
225 230 235 240

Cys His Thr Ala Val Ile Ser Pro Glu Gly Arg Tyr Leu Ala Gly Pro  
245 250 255

Leu Pro Asp Gly Glu Gly Leu Ala Ile Ala Asp Leu Asp Leu Ala Leu  
260 265 270

Ile Thr Lys Arg Lys Arg Met Met Asp Ser Val Gly His Tyr Ser Arg  
275 280 285

Pro Glu Leu Leu Ser Leu Gln Ile Asn Ser Ser Pro Ala Val Pro Val  
290 295 300

Gln Asn Met Ser Thr Ala Ser Val Pro Leu Glu Pro Ala Thr Ala Thr



ES 2 562 791 T9

Arg Glu Met Trp Gln Val Ser Met Arg His Ile Ala His Glu Gly Arg  
 195 200 205

Cys Phe Val Val Ser Ala Cys Gln Val Gln Ala Ser Pro Glu Glu Leu  
 210 215 220

Gly Leu Glu Ile Ala Asn Trp Pro Ala Gln Arg Pro Leu Ile Ala Gly  
 225 230 235 240

Gly Ser Val Ile Val Gly Pro Met Gly Asp Val Leu Ala Gly Pro Leu  
 245 250 255

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

Val Arg Ala Arg Tyr Asp Tyr Asp Val Val Gly His Tyr Ala Arg Pro  
 275 280 285

Asp Val Phe Glu Leu Thr Val Asp Gln Arg Pro Arg Pro Gly Val Arg  
 290 295 300

Phe Thr  
 305

<210> 20  
 <211> 336  
 <212> PRT

5 <213> *Nocardia farcinica* IFM 10152]

<400> 20

Met Ser Gln Arg Asp Ser Phe Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Pro  
 1 5 10 15

Val Trp Leu Asp Gly Ala Ala Thr Val Asp Lys Cys Val Ala Leu Ile  
 20 25 30

Glu Glu Ala Ala Asp Asn Gly Ala Ala Leu Ile Ala Phe Pro Glu Thr  
 35 40 45

Phe Val Pro Gly Tyr Pro Trp Trp Leu Trp Leu Asp Ser Pro Ala Trp  
 50 55 60

Gly Met Gln Phe Val Ala Arg Tyr Phe Asp Asn Ser Leu Ala Leu Asp  
 65 70 75 80

Gly Pro Leu Phe Ala Arg Leu Arg Glu Ala Ala Arg Arg Ser Ala Ile



ES 2 562 791 T9

85 90 95

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

Gly Gln Ala Ile Ile Gly Ala Asp Gly Glu Val Leu Ala Ala Arg Arg  
115 120 125

Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Ser Asp  
130 135 140

Gly Ser Asn Leu Thr Val Val Asp Thr Glu Leu Gly Arg Leu Gly Ala  
145 150 155 160

Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Gln Pro Leu Thr Lys Tyr Ala Met Tyr  
165 170 175

Ser Gln His Glu Gln Ile His Val Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Val  
180 185 190

Tyr Arg Gly Ala Ala Tyr Ala Leu Gly Pro Glu Val Asn Thr Gly Ala  
195 200 205

Ala Arg Gln Tyr Ala Val Glu Gly Gln Cys Phe Val Leu Ser Pro Cys  
210 215 220

Ala Val Ile Asp Glu Ala Gly Val Glu Leu Phe Cys Asp Thr Pro Ala  
225 230 235 240

Lys Arg Glu Leu Leu Leu Pro Gly Gly Gly Phe Ala Gln Ile Tyr Gly  
245 250 255

Pro Asp Gly Arg Glu Leu Gly Thr Ala Leu Pro Glu Thr Glu Glu Gly  
260 265 270

Leu Val Tyr Ala Asp Leu Glu Ala Ser Ala Val Ala Val Ala Lys Ser  
275 280 285

Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Gln Leu  
290 295 300

Leu Trp Asp Pro Arg Pro Arg Ser Val Val Arg Gln Val Ala Leu Ser  
305 310 315 320

Val Ala Ser Pro Ala Glu Ser Ala Asp Asp Ala Glu Pro Ala Val Arg  
325 330 335

<210> 21  
<211> 356

ES 2 562 791 T9

<212> PRT

<213> *Alcaligenes faecalis* 1650

<400> 21

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

Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala  
 20 25 30

Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr  
 35 40 45

Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp  
 50 55 60

Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp  
 65 70 75 80

Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile  
 85 90 95

Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu  
 100 105 110

Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg  
 115 120 125

Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr  
 130 135 140

Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala  
 145 150 155 160

Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr  
 165 170 175

Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu  
 180 185 190

Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala  
 195 200 205

ES 2 562 791 T9

Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser  
 210 215 220

Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His  
 225 230 235 240

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

Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly  
 260 265 270

Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala  
 275 280 285

Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu  
 290 295 300

Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys  
 305 310 315 320

Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile  
 325 330 335

Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val  
 340 345 350

Gln Glu Pro Ser  
 355

<210> 22

<211> 336

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a

<400> 22

Met Lys Glu Pro Leu Lys Val Ala Cys Val Gln Ala Ala Pro Val Phe  
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Asp Ala Thr Val Asp Lys Thr Ile Thr Leu Met Glu Gln  
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Leu Ile Ala Phe Pro Glu Thr Trp Ile  
 35 40 45

Pro Gly Tyr Pro Trp Phe Leu Trp Leu Asp Ala Pro Ala Trp Asn Met  
 50 55 60

ES 2 562 791 T9

Pro Leu Val Gln Arg Tyr His Gln Gln Ser Leu Val Leu Asp Ser Val  
65 70 75 80

Gln Ala Arg Arg Ile Ser Asp Ala Ala Arg His Leu Gly Leu Tyr Val  
85 90 95

Val Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Asn Lys Ala Ser Leu Tyr Ile Gly Gln  
100 105 110

Trp Ile Ile Asp Asp His Gly Glu Thr Val Gly Val Arg Arg Lys Leu  
115 120 125

Lys Ala Thr His Val Glu Arg Thr Met Phe Gly Glu Gly Asp Gly Ala  
130 135 140

Ser Leu Arg Thr Phe Glu Thr Pro Val Gly Val Leu Gly Ala Leu Cys  
145 150 155 160

Cys Trp Glu His Leu Gln Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Met Tyr Ala Gln  
165 170 175

Asn Glu Gln Ile His Val Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu Tyr Arg  
180 185 190

Asn Ala Thr Ser Ala Leu Gly Pro Glu Val Asn Thr Ala Ala Ser Arg  
195 200 205

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

Val Ser Pro Glu Met Ile Glu Met Leu Cys Asp Ser Asp Ala Lys Arg  
225 230 235 240

Ser Leu Leu Gln Ala Gly Gly Gly His Ala Arg Ile Phe Gly Pro Asp  
245 250 255

Gly Ser Asp Leu Ala Thr Pro Leu Gly Glu His Glu Glu Gly Leu Leu  
260 265 270

Tyr Ala Thr Leu Asp Pro Ala Ala Leu Thr Leu Ala Lys Val Ala Ala  
275 280 285

Asp Pro Ala Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Thr Arg Leu Met Phe  
290 295 300

ES 2 562 791 T9

Asn Pro Asn Pro Thr Pro Cys Val Val Asp Leu Pro Asp Leu Pro Ile  
 305 310 315 320

Ser Ser Glu Ser Ile Glu Leu Leu Arg Pro Asp Ile Ala Leu Glu Val  
 325 330 335

<210> 23

<211> 345

<212> PRT

5 <213> Bradyrhizobium sp. BTAi1

<400> 23

Met Gly Leu Ala His Pro Lys Tyr Lys Val Ala Val Val Gln Ala Ala  
 1 5 10 15

Pro Ala Trp Leu Asp Leu Asp Ala Ser Ile Lys Lys Thr Ile Ala Leu  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Asp Lys Gly Ala Lys Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Trp His Ile Trp Met Asp Ser Pro Ala  
 50 55 60

Trp Cys Ile Gly Arg Gly Phe Val Gln Arg Tyr Phe Asp Asn Ser Leu  
 65 70 75 80

Ala Tyr Asp Ser Pro Gln Ala Glu Ala Leu Arg Ala Ala Val Arg Lys  
 85 90 95

Ala Gln Leu Thr Ala Val Leu Gly Leu Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser  
 100 105 110

Leu Tyr Ile Ala Gln Trp Leu Ile Gly Ala Asp Gly Glu Thr Ile Ala  
 115 120 125

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

Glu Gly Asp Gly Ser Asp Leu Ala Val His Glu Arg Pro Asp Ile Gly  
 145 150 155 160

Arg Ile Gly Ala Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Gln Pro Leu Ser Lys  
 165 170 175

Tyr Ala Met Tyr Ala Gln Asn Glu Gln Val His Val Ala Ala Trp Pro

ES 2 562 791 T9

180 185 190

Ser Phe Ser Leu Tyr Asp Pro Phe Ala Pro Ala Leu Gly Ala Glu Val  
 195 200 205

Asn Asn Ala Ala Ser Arg Val Tyr Ala Val Glu Gly Ser Cys Phe Val  
 210 215 220

Leu Ala Pro Cys Ala Thr Val Ser Gln Ala Met Ile Asp Glu Leu Cys  
 225 230 235 240

Asp Arg Pro Asp Lys His Ala Leu Leu His Ala Gly Gly Gly His Ala  
 245 250 255

Ala Ile Phe Gly Pro Asp Gly Ser Ala Leu Ala Ala Gln Leu Pro Pro  
 260 265 270

Asp Gln Glu Gly Leu Leu Ile Ala Glu Ile Asp Leu Gly Met Ile Gly  
 275 280 285

Ile Ala Lys Asn Ala Ala Asp Pro Ala Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp  
 290 295 300

Val Thr Arg Leu Leu Leu Asn Lys Lys Pro Leu Asn Arg Val Glu His  
 305 310 315 320

Phe Ser Leu Pro Val Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu Pro Gly Glu Ala  
 325 330 335

Ala Val Ala Arg Pro Asp Gln Ser Ile  
 340 345

<210> 24

<211> 366

<212> PRT

5 <213> Rhodococcus rhodochrous NCIMB 11216

<400> 24

Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Gln  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Thr Val Ser Ile  
 20 25 30

Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu Leu Val Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

ES 2 562 791 T9

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile Trp Val Asp Ser Pro Leu  
50 55 60

Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr  
65 70 75 80

Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu Asp Ala Ala Arg Asp His  
85 90 95

Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu  
100 105 110

Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg  
115 120 125

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

Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala  
165 170 175

Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly Met  
180 185 190

Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala Gln Leu  
195 200 205

Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe Val Val Cys  
210 215 220

Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe Phe Cys Glu Asn  
225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Lys Leu Ile Gly Arg Gly Gly Gly Phe Ala Arg Ile  
245 250 255

Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Glu Asp Glu  
260 265 270

Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala  
275 280 285

ES 2 562 791 T9

Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu  
 290 295 300

Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg Arg Thr Thr Pro Val Asn Thr Pro Leu  
 305 310 315 320

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

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

Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp Arg Ala Thr Ala Thr Leu  
 355 360 365

<210> 25

<211> 366

<212> PRT

5 <213> *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 39484

<400> 25

Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Gln  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Thr Val Ser Ile  
 20 25 30

Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu Leu Val Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile Trp Val Asp Ser Pro Leu  
 50 55 60

Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr  
 65 70 75 80

Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu Asp Ala Ala Arg Asp His  
 85 90 95

Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu  
 100 105 110

Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg  
 115 120 125

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



ES 2 562 791 T9

Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala  
165 170 175

Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly Met  
180 185 190

Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala Gln Leu  
195 200 205

Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe Val Val Cys  
210 215 220

Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe Phe Cys Glu Asn  
225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Met Leu Ile Gly Arg Gly Gly Gly Phe Ala Arg Ile  
245 250 255

Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Glu Asp Glu  
260 265 270

Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala  
275 280 285

Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu  
290 295 300

Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg Arg Thr Thr Pro Val Asn Thr Pro Leu  
305 310 315 320

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

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

Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp Arg Ala Thr Ala Thr Leu  
355 360 365

- <210> 26
- <211> 1110
- <212> DNA
- <213> Acidovorax facilis 72W

5

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1110)

ES 2 562 791 T9

<400> 26

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag	48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu	
1 5 10 15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc	96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	
20 25 30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa	144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	
35 40 45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag	192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta	240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	
65 70 75 80	
ggg gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa	288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	
85 90 95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat	336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	
100 105 110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115 120 125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130 135 140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145 150 155 160	
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg	528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	
165 170 175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc	576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	
180 185 190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa cag agc atc gaa gcc aac gcg acg	624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Gln Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	
195 200 205	
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg	672

ES 2 562 791 T9

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac 720  
 Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac 768  
 Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag 816  
 Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag 864  
 Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg ccg cct gac gtg ctg tcg 912  
 Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att 960  
 Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga 1008  
 Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag ccg ctc gga 1056  
 Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 27

<211> 369

<212> PRT

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<400> 27

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

ES 2 562 791 T9

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Gln Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
275 280 285

ES 2 562 791 T9

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 28

<211> 1110

<212> DNA

5 <213> *Acidovorax facilis* 72W

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<400> 28

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc 96  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
 Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta 240  
 Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

ggc gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa 288  
 Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

10 atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat 336

ES 2 562 791 T9

Ile	Ala	Leu	Val	Met	Gly	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Arg	Tyr		
			100					105					110				
ctg	agc	cag	gtg	ttc	atc	gac	gag	cgt	ggc	gag	atc	gtt	gcc	aat	cgg		384
Leu	Ser	Gln	Val	Phe	Ile	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Arg		
		115					120					125					
cgc	aag	ctg	aag	ccc	aca	cac	gtt	gag	cgt	acg	atc	tac	ggc	gaa	ggc		432
Arg	Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	His	Val	Glu	Arg	Thr	Ile	Tyr	Gly	Glu	Gly		
	130					135					140						
aac	gga	acc	gat	ttc	ctc	acg	cac	gac	ttc	gcg	ttc	gga	cgc	gtc	ggt		480
Asn	Gly	Thr	Asp	Phe	Leu	Thr	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Gly		
145					150					155					160		
gga	ttg	aac	tgc	tgg	gaa	cat	ttc	caa	ccg	ctc	agc	aag	ttc	atg	atg		528
Gly	Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	His	Phe	Gln	Pro	Leu	Ser	Lys	Phe	Met	Met		
			165					170						175			
tac	agc	ctc	ggt	gag	cag	gtc	cac	gtt	gca	tcg	tgg	ccg	gcg	atg	tcc		576
Tyr	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Val	His	Val	Ala	Ser	Trp	Pro	Ala	Met	Ser		
		180						185					190				
cct	ctt	cag	ccg	gat	gtt	ttc	caa	gct	agc	atc	gaa	gcc	aac	gcg	acg		624
Pro	Leu	Gln	Pro	Asp	Val	Phe	Gln	Ala	Ser	Ile	Glu	Ala	Asn	Ala	Thr		
		195					200					205					
gtc	acc	cgc	tcg	tac	gca	atc	gaa	ggc	caa	acc	ttt	gtg	ctt	tgc	tcg		672
Val	Thr	Arg	Ser	Tyr	Ala	Ile	Glu	Gly	Gln	Thr	Phe	Val	Leu	Cys	Ser		
	210					215					220						
acg	cag	gtg	atc	gga	cct	agc	gcg	atc	gaa	acg	ttc	tgc	ctc	aac	gac		720
Thr	Gln	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Ile	Glu	Thr	Phe	Cys	Leu	Asn	Asp		
225					230					235					240		
gaa	cag	cgc	gca	ctg	ttg	ccg	caa	gga	tgt	ggc	tgg	gcg	cgc	att	tac		768
Glu	Gln	Arg	Ala	Leu	Leu	Pro	Gln	Gly	Cys	Gly	Trp	Ala	Arg	Ile	Tyr		
			245					250						255			
ggc	ccg	gat	gga	agc	gag	ctt	gcg	aag	cct	ctg	gcg	gaa	gat	gct	gag		816
Gly	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys	Pro	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Glu		
			260					265					270				
ggg	atc	ttg	tac	gca	gag	atc	gat	ctg	gag	cag	att	ctg	ctg	gcg	aag		864
Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Glu	Gln	Ile	Leu	Leu	Ala	Lys		
		275					280					285					
gct	gga	gcc	gat	ccg	gtc	ggg	cac	tat	tcg	cgg	cct	gac	gtg	ctg	tcg		912
Ala	Gly	Ala	Asp	Pro	Val	Gly	His	Tyr	Ser	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Ser		
	290					295					300						
gtc	cag	ttc	gac	ccg	cgc	aat	cat	acg	cca	gtt	cat	cgc	atc	ggc	att		960
Val	Gln	Phe	Asp	Pro	Arg	Asn	His	Thr	Pro	Val	His	Arg	Ile	Gly	Ile		
305					310					315				320			
gac	ggt	cgc	ttg	gat	gtg	aat	acc	cgc	agt	cgc	gtg	gag	aat	ttc	cga		1008
Asp	Gly	Arg	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Arg	Ser	Arg	Val	Glu	Asn	Phe	Arg		
			325					330					335				
ctg	cga	caa	gcg	gct	gag	cag	gag	cgt	cag	gca	tcc	aag	cgg	ctc	gga		1056
Leu	Arg	Gln	Ala	Ala	Glu	Gln	Glu	Arg	Gln	Ala	Ser	Lys	Arg	Leu	Gly		

ES 2 562 791 T9

	340		345		350												
	acg	aaa	ctc	ttt	gaa	caa	tcc	ctt	ctg	gct	gaa	gaa	ccg	gtc	cca	gca	1104
	Thr	Lys	Leu	Phe	Glu	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Glu	Glu	Pro	Val	Pro	Ala	
			355					360					365				
	aag	tag															1110
	Lys																
	<210>	29															
	<211>	369															
	<212>	PRT															
5	<213>	Acidovorax facilis 72W															
	<400>	29															
	Met	Val	Ser	Tyr	Asn	Ser	Lys	Phe	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Gln	Ala	Glu	
	1				5					10					15		
	Pro	Val	Trp	Leu	Asp	Ala	Asp	Ala	Thr	Ile	Asp	Lys	Ser	Ile	Gly	Ile	
				20					25					30			
	Ile	Glu	Glu	Ala	Ala	Gln	Lys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ala	Phe	Pro	Glu	
			35					40					45				
	Val	Phe	Ile	Pro	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Trp	Ala	Trp	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	
		50					55					60					
	Tyr	Ser	Leu	Ser	Phe	Thr	Ser	Arg	Tyr	His	Glu	Asn	Ser	Leu	Glu	Leu	
	65					70					75					80	
	Gly	Asp	Asp	Arg	Met	Arg	Arg	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Arg	Arg	Asn	Lys	
					85					90					95		
	Ile	Ala	Leu	Val	Met	Gly	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Arg	Tyr	
				100					105					110			
	Leu	Ser	Gln	Val	Phe	Ile	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Arg	
			115					120					125				
	Arg	Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	His	Val	Glu	Arg	Thr	Ile	Tyr	Gly	Glu	Gly	
		130					135					140					
	Asn	Gly	Thr	Asp	Phe	Leu	Thr	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Gly	
	145					150					155					160	
	Gly	Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	His	Phe	Gln	Pro	Leu	Ser	Lys	Phe	Met	Met	
					165					170					175		

ES 2 562 791 T9

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Ala Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 30  
 <211> 1110  
 <212> DNA

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)

<400> 30



ES 2 562 791 T9

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag	48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu	
1 5 10 15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc	96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	
20 25 30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa	144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	
35 40 45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag	192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta	240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	
65 70 75 80	
ggg gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa	288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	
85 90 95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat	336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	
100 105 110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115 120 125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130 135 140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145 150 155 160	
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg	528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	
165 170 175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc	576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	
180 185 190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa tgt agc atc gaa gcc aac gcg acg	624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Cys Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	
195 200 205	
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg	672
Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser	
210 215 220	
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac	720
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp	

ES 2 562 791 T9

225		230		235		240		
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac								768
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr								
		245		250		255		
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag								816
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu								
		260		265		270		
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag								864
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys								
		275		280		285		
gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg cgg cct gac gtg ctg tcg								912
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser								
		290		295		300		
gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att								960
Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile								
		305		310		315		320
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga								1008
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg								
		325		330		335		
ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga								1056
Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly								
		340		345		350		
acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca								1104
Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala								
		355		360		365		
aag tag								1110
Lys								
<210> 31								
<211> 369								
<212> PRT								
5 <213> Acidovorax facilis 72W								
<400> 31								
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu								
1		5		10		15		
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile								
		20		25		30		
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu								
		35		40		45		
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys								
		50		55		60		

ES 2 562 791 T9

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

ES 2 562 791 T9

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
355 360 365

Lys

<210> 32

<211> 1110

<212> DNA

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<400> 32

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
1 5 10 15

ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc 96  
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
20 25 30

atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
35 40 45

gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
50 55 60

tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta 240  
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
65 70 75 80

ggc gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa 288  
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
85 90 95

atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat 336  
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
100 105 110

10 ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg 384  
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg

ES 2 562 791 T9

115	120	125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc			432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly			
130	135	140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt			480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly			
145	150	155	160
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg			528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met			
165	170	175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc			576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser			
180	185	190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa acc agc atc gaa gcc aac gcg acg			624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Thr Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr			
195	200	205	
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg			672
Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser			
210	215	220	
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac			720
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp			
225	230	235	240
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac			768
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr			
245	250	255	
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag			816
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu			
260	265	270	
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag			864
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys			
275	280	285	
gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg ccg cct gac gtg ctg tcg			912
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser			
290	295	300	
gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att			960
Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile			
305	310	315	320
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga			1008
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg			
325	330	335	
ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag ccg ctc gga			1056
Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly			
340	345	350	
acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca			1104
Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala			
355	360	365	

ES 2 562 791 T9

1110

aag tag  
Lys

<210> 33  
<211> 369  
<212> PRT

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<400> 33

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
180 185 190

ES 2 562 791 T9

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Thr Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 34

<211> 1110

<212> DNA

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<400> 34

10 atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu

48

ES 2 562 791 T9

1	5	10	15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc				96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	20	25	30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa				144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	35	40	45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag				192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	50	55	60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta				240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	65	70	75	80
ggg gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa				288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	85	90	95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat				336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	100	105	110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat ccg				384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	115	120	125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc				432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	130	135	140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt				480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	145	150	155	160
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg				528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	165	170	175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc				576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	180	185	190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa gga agc atc gaa gcc aac gcg acg				624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Gly Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	195	200	205	
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg				672
Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser	210	215	220	
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac				720
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp	225	230	235	240
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac				768
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr	245	250	255	



ES 2 562 791 T9

ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag 816  
 Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag 864  
 Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg cgg cct gac gtg ctg tcg 912  
 Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att 960  
 Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga 1008  
 Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga 1056  
 Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 35

<211> 369

<212> PRT

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<400> 35

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

ES 2 562 791 T9

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Gly Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg

ES 2 562 791 T9

325

330

335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 36  
 <211> 1110  
 <212> DNA

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)

<400> 36

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc 96  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
 Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta 240  
 Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

ggc gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa 288  
 Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat 336  
 Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg 384  
 Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc 432  
 Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
 130 135 140

10

ES 2 562 791 T9

aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt 480  
 Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg 528  
 Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc 576  
 Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa cac agc atc gaa gcc aac gcg acg 624  
 Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln His Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg 672  
 Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac 720  
 Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac 768  
 Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag 816  
 Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag 864  
 Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg ccg cct gac gtg ctg tcg 912  
 Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att 960  
 Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga 1008  
 Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag ccg ctc gga 1056  
 Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 37  
 <211> 369  
 <212> PRT

ES 2 562 791 T9

<213> Acidovorax facilis 72W

<400> 37

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln His Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser

ES 2 562 791 T9

210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 38  
 <211> 1110  
 <212> DNA

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)

<400> 38

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc 96  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

10

ES 2 562 791 T9

atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu 35 40 45	144
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys 50 55 60	192
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu 65 70 75 80	240
ggg gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys 85 90 95	288
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr 100 105 110	336
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg 115 120 125	384
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly 130 135 140	432
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly 145 150 155 160	480
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met 165 170 175	528
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser 180 185 190	576
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa aag agc atc gaa gcc aac gcg acg Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Lys Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr 195 200 205	624
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser 210 215 220	672
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp 225 230 235 240	720
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr 245 250 255	768
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu 260 265 270	816

ES 2 562 791 T9

```

ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag      864
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys
           275                          280                          285

gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg cgg cct gac gtg ctg tcg      912
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser
           290                          295                          300

gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att      960
Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile
           305                          310                          315                          320

gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga      1008
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg
                    325                          330                          335

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga      1056
Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly
                    340                          345                          350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca      1104
Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala
           355                          360                          365

aag tag                                                                1110
Lys

```

<210> 39  
 <211> 369  
 <212> PRT

5 <213> *Acidovorax facilis* 72W

<400> 39

```

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu
 1              5              10              15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile
      20              25              30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu
      35              40              45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys
      50              55              60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu
65              70              75              80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys
      85              90              95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr

```



ES 2 562 791 T9

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

ES 2 562 791 T9

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 40  
 <211> 1110  
 <212> DNA  
 5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)

<400> 40

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag	48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu	
1 5 10 15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc	96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	
20 25 30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa	144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	
35 40 45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag	192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta	240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	
65 70 75 80	
ggc gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa	288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	
85 90 95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat	336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	
100 105 110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115 120 125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130 135 140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145 150 155 160	

10



ES 2 562 791 T9

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Asn Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
225 230 235 240

ES 2 562 791 T9

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 42

<211> 1110

<212> DNA

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<400> 42

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc 96  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
 Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

10

ES 2 562 791 T9

gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
50 55 60

tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta 240  
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
65 70 75 80

ggt gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa 288  
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
85 90 95

atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat 336  
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
100 105 110

ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg 384  
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
115 120 125

cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc 432  
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly  
130 135 140

aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt 480  
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
145 150 155 160

gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg 528  
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
165 170 175

tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc 576  
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
180 185 190

cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa tct agc atc gaa gcc aac gcg acg 624  
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Ser Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
195 200 205

gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg 672  
Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
210 215 220

acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac 720  
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
225 230 235 240

gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac 768  
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
245 250 255

ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag 816  
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
260 265 270

ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag 864  
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
275 280 285

gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg ccg cct gac gtg ctg tcg 912

ES 2 562 791 T9

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att 960  
 Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga 1008  
 Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga 1056  
 Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 43  
 <211> 369  
 <212> PRT  
 5 <213> Acidovorax facilis 72W

<400> 43

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

ES 2 562 791 T9

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Ser Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 44  
 <211> 1110



ES 2 562 791 T9

<212> DNA  
 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>  
 <221> CDS

5 <222> (1)..(1110)

<400> 44

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag	48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu	
1 5 10 15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc	96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	
20 25 30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa	144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	
35 40 45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag	192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta	240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	
65 70 75 80	
ggt gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa	288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	
85 90 95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat	336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	
100 105 110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115 120 125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130 135 140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145 150 155 160	
gga ttg aac tgc tgg gaa cat aaa caa ccg ctc agc aag ttc atg atg	528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Lys Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	
165 170 175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc	576

ES 2 562 791 T9

Tyr	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Val	His	Val	Ala	Ser	Trp	Pro	Ala	Met	Ser		
			180					185					190				
cct	ctt	cag	ccg	gat	gtt	ttc	caa	ctg	agc	atc	gaa	gcc	aac	gcg	acg		624
Pro	Leu	Gln	Pro	Asp	Val	Phe	Gln	Leu	Ser	Ile	Glu	Ala	Asn	Ala	Thr		
		195					200					205					
gtc	acc	cgc	tcg	tac	gca	atc	gaa	ggc	caa	acc	ttt	gtg	ctt	tgc	tcg		672
Val	Thr	Arg	Ser	Tyr	Ala	Ile	Glu	Gly	Gln	Thr	Phe	Val	Leu	Cys	Ser		
	210					215				220							
acg	cag	gtg	atc	gga	cct	agc	gcg	atc	gaa	acg	ttc	tgc	ctc	aac	gac		720
Thr	Gln	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Ile	Glu	Thr	Phe	Cys	Leu	Asn	Asp		
225					230					235					240		
gaa	cag	cgc	gca	ctg	ttg	ccg	caa	gga	tgt	ggc	tgg	gcg	cgc	att	tac		768
Glu	Gln	Arg	Ala	Leu	Leu	Pro	Gln	Gly	Cys	Gly	Trp	Ala	Arg	Ile	Tyr		
			245					250						255			
ggc	ccg	gat	gga	agc	gag	ctt	gcg	aag	cct	ctg	gcg	gaa	gat	gct	gag		816
Gly	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys	Pro	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Glu		
			260					265						270			
ggg	atc	ttg	tac	gca	gag	atc	gat	ctg	gag	cag	att	ctg	ctg	gcg	aag		864
Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Glu	Gln	Ile	Leu	Leu	Ala	Lys		
		275					280					285					
gct	gga	gcc	gat	ccg	gtc	ggg	cac	tat	tcg	cgg	cct	gac	gtg	ctg	tcg		912
Ala	Gly	Ala	Asp	Pro	Val	Gly	His	Tyr	Ser	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Ser		
	290					295					300						
gtc	cag	ttc	gac	ccg	cgc	aat	cat	acg	cca	gtt	cat	cgc	atc	ggc	att		960
Val	Gln	Phe	Asp	Pro	Arg	Asn	His	Thr	Pro	Val	His	Arg	Ile	Gly	Ile		
305					310					315				320			
gac	ggt	cgc	ttg	gat	gtg	aat	acc	cgc	agt	cgc	gtg	gag	aat	ttc	cga		1008
Asp	Gly	Arg	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Arg	Ser	Arg	Val	Glu	Asn	Phe	Arg		
				325					330					335			
ctg	cga	caa	gcg	gct	gag	cag	gag	cgt	cag	gca	tcc	aag	cgg	ctc	gga		1056
Leu	Arg	Gln	Ala	Ala	Glu	Gln	Glu	Arg	Gln	Ala	Ser	Lys	Arg	Leu	Gly		
			340					345					350				
acg	aaa	ctc	ttt	gaa	caa	tcc	ctt	ctg	gct	gaa	gaa	ccg	gtc	cca	gca		1104
Thr	Lys	Leu	Phe	Glu	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Glu	Glu	Pro	Val	Pro	Ala		
		355					360						365				
aag	tag																1110
Lys																	
<210>	45																
<211>	369																
<212>	PRT																
5 <213>	Acidovorax facilis 72W																
<400>	45																
Met	Val	Ser	Tyr	Asn	Ser	Lys	Phe	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Gln	Ala	Glu		
1				5					10					15			

ES 2 562 791 T9

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Lys Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

ES 2 562 791 T9

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 46

<211> 1110

<212> DNA

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<400> 46

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc 96  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
 Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta 240

10

ES 2 562 791 T9

Tyr 65	Ser	Leu	Ser	Phe	Thr 70	Ser	Arg	Tyr	His	Glu 75	Asn	Ser	Leu	Glu	Leu 80	
ggt Gly	gac Asp	gac Asp	cgt Arg	atg Met	cgt Arg	cgc Arg	ctc Leu	cag Gln	ctg Leu	gcc Ala	gcg Ala	cgc Arg	cgc Arg	aac Asn	aaa Lys	288
			85					90						95		
atc Ile	gca Ala	ctc Leu	gtc Val	atg Met	ggc Gly	tat Tyr	tcg Ser	gag Glu	cgg Arg	gaa Glu	gcc Ala	gga Gly	tcg Ser	cgc Arg	tat Tyr	336
			100					105					110			
ctg Leu	agc Ser	cag Gln	gtg Val	ttc Phe	atc Ile	gac Asp	gag Glu	cgt Arg	ggc Gly	gag Glu	atc Ile	ggt Val	gcc Ala	aat Asn	cgg Arg	384
		115					120					125				
cgc Arg	aag Lys	ctg Leu	aag Lys	ccc Pro	aca Thr	cac His	gtt Val	gag Glu	cgt Arg	acg Thr	atc Ile	tac Tyr	ggc Gly	gaa Glu	ggc Gly	432
	130					135					140					
aac Asn	gga Gly	acc Thr	gat Asp	ttc Phe	ctc Leu	acg Thr	cac His	gac Asp	ttc Phe	gcg Ala	ttc Phe	gga Gly	cgc Arg	gtc Val	ggt Gly	480
	145				150					155					160	
gga Gly	ttg Leu	aac Asn	tgc Cys	tgg Trp	gaa Glu	cat His	atg Met	caa Gln	ccg Pro	ctc Leu	agc Ser	aag Lys	ttc Phe	atg Met	atg Met	528
				165				170						175		
tac Tyr	agc Ser	ctc Leu	ggt Gly	gag Glu	cag Gln	gtc Val	cac His	gtt Val	gca Ala	tcg Ser	tgg Trp	ccg Pro	gcg Ala	atg Met	tcc Ser	576
			180					185					190			
cct Pro	ctt Leu	cag Gln	ccg Pro	gat Asp	gtt Val	ttc Phe	caa Gln	ctg Leu	agc Ser	atc Ile	gaa Glu	gcc Ala	aac Asn	gcg Ala	acg Thr	624
		195					200					205				
gtc Val	acc Thr	cgc Arg	tcg Ser	tac Tyr	gca Ala	atc Ile	gaa Glu	ggc Gly	caa Gln	acc Thr	ttt Phe	gtg Val	ctt Leu	tgc Cys	tcg Ser	672
	210					215					220					
acg Thr	cag Gln	gtg Val	atc Ile	gga Gly	cct Pro	agc Ser	gcg Ala	atc Ile	gaa Glu	acg Thr	ttc Phe	tgc Cys	ctc Leu	aac Asn	gac Asp	720
		225			230				235						240	
gaa Glu	cag Gln	cgc Arg	gca Ala	ctg Leu	ttg Leu	ccg Pro	caa Gln	gga Gly	tgt Cys	ggc Gly	tgg Trp	gcg Ala	cgc Arg	att Ile	tac Tyr	768
			245					250						255		
ggc Gly	ccg Pro	gat Asp	gga Gly	agc Ser	gag Glu	ctt Leu	gcg Ala	aag Lys	cct Pro	ctg Leu	gcg Ala	gaa Glu	gat Asp	gct Ala	gag Glu	816
		260						265					270			
ggg Gly	atc Ile	ttg Leu	tac Tyr	gca Ala	gag Glu	atc Ile	gat Asp	ctg Leu	gag Glu	cag Gln	att Ile	ctg Leu	ctg Leu	gcg Ala	aag Lys	864
		275					280					285				
gct Ala	gga Gly	gcc Ala	gat Asp	ccg Pro	gtc Val	ggg Gly	cac His	tat Tyr	tcg Ser	cgg Arg	cct Pro	gac Asp	gtg Val	ctg Leu	tcg Ser	912
	290					295					300					
gtc Val	cag Gln	ttc Phe	gac Asp	ccg Pro	cgc Arg	aat Asn	cat His	acg Thr	cca Pro	gtt Val	cat His	cgc Arg	atc Ile	ggc Gly	att Ile	960

ES 2 562 791 T9

```

305                310                315                320
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga      1008
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg
                        325                330                335

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga      1056
Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly
                        340                345                350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca      1104
Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala
                        355                360                365

aag tag      1110
Lys

```

- <210> 47
- <211> 369
- <212> PRT
- 5 <213> Acidovorax facilis 72W
- <400> 47

```

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu
1                5                10                15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile
                20                25                30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu
                35                40                45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys
50                55                60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu
65                70                75                80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys
                85                90                95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr
100                105                110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg
115                120                125

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

```

ES 2 562 791 T9

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Met Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 48  
 <211> 1110  
 <212> DNA  
 <213> Acidovorax facilis 72W

5

ES 2 562 791 T9

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<400> 48

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag	48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu	
1 5 10 15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc	96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	
20 25 30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa	144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	
35 40 45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag	192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta	240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	
65 70 75 80	
ggg gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa	288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	
85 90 95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat	336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	
100 105 110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115 120 125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130 135 140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145 150 155 160	
gga ttg aac tgc tgg gaa cat acc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg	528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Thr Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	
165 170 175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc	576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	
180 185 190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg	624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	

5



ES 2 562 791 T9

	195		200		205																
	gtc	acc	cgc	tcg	tac	gca	atc	gaa	ggc	caa	acc	ttt	gtg	ctt	tgc	tcg	672				
	Val	Thr	Arg	Ser	Tyr	Ala	Ile	Glu	Gly	Gln	Thr	Phe	Val	Leu	Cys	Ser					
	210					215						220									
	acg	cag	gtg	atc	gga	cct	agc	gcg	atc	gaa	acg	ttc	tgc	ctc	aac	gac	720				
	Thr	Gln	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Ile	Glu	Thr	Phe	Cys	Leu	Asn	Asp					
	225				230						235				240						
	gaa	cag	cgc	gca	ctg	ttg	ccg	caa	gga	tgt	ggc	tgg	gcg	cgc	att	tac	768				
	Glu	Gln	Arg	Ala	Leu	Leu	Pro	Gln	Gly	Cys	Gly	Trp	Ala	Arg	Ile	Tyr					
				245						250					255						
	ggc	ccg	gat	gga	agc	gag	ctt	gcg	aag	cct	ctg	gcg	gaa	gat	gct	gag	816				
	Gly	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys	Pro	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Glu					
			260						265					270							
	ggg	atc	ttg	tac	gca	gag	atc	gat	ctg	gag	cag	att	ctg	ctg	gcg	aag	864				
	Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Glu	Gln	Ile	Leu	Leu	Ala	Lys					
		275						280					285								
	gct	gga	gcc	gat	ccg	gtc	ggg	cac	tat	tcg	cgg	cct	gac	gtg	ctg	tcg	912				
	Ala	Gly	Ala	Asp	Pro	Val	Gly	His	Tyr	Ser	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Ser					
	290					295						300									
	gtc	cag	ttc	gac	ccg	cgc	aat	cat	acg	cca	gtt	cat	cgc	atc	ggc	att	960				
	Val	Gln	Phe	Asp	Pro	Arg	Asn	His	Thr	Pro	Val	His	Arg	Ile	Gly	Ile					
	305					310					315				320						
	gac	ggt	cgc	ttg	gat	gtg	aat	acc	cgc	agt	cgc	gtg	gag	aat	ttc	cga	1008				
	Asp	Gly	Arg	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Arg	Ser	Arg	Val	Glu	Asn	Phe	Arg					
				325						330					335						
	ctg	cga	caa	gcg	gct	gag	cag	gag	cgt	cag	gca	tcc	aag	cgg	ctc	gga	1056				
	Leu	Arg	Gln	Ala	Ala	Glu	Gln	Glu	Arg	Gln	Ala	Ser	Lys	Arg	Leu	Gly					
			340						345					350							
	acg	aaa	ctc	ttt	gaa	caa	tcc	ctt	ctg	gct	gaa	gaa	ccg	gtc	cca	gca	1104				
	Thr	Lys	Leu	Phe	Glu	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Glu	Glu	Pro	Val	Pro	Ala					
			355					360					365								
	aag	tag																			
	Lys																				

<210> 49  
 <211> 369  
 <212> PRT

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<400> 49

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

ES 2 562 791 T9

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Thr Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
260 265 270

ES 2 562 791 T9

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 50

<211> 1110

<212> DNA

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<400> 50

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc 96  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
 Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta 240  
 Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

10 ggt gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa 288  
 Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys

ES 2 562 791 T9

				85					90					95				
atc	gca	ctc	gtc	atg	ggc	tat	tcg	gag	cgg	gaa	gcc	gga	tcg	cgc	tat			336
Ile	Ala	Leu	Val	Met	Gly	Tyr	Ser	Glu	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Arg	Tyr			
			100					105					110					
ctg	agc	cag	gtg	ttc	atc	gac	gag	cgt	ggc	gag	atc	gtt	gcc	aat	cgg			384
Leu	Ser	Gln	Val	Phe	Ile	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Arg			
		115					120					125						
cgc	aag	ctg	aag	ccc	aca	cac	gtt	gag	cgt	acg	atc	tac	ggc	gaa	ggc			432
Arg	Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	His	Val	Glu	Arg	Thr	Ile	Tyr	Gly	Glu	Gly			
	130					135					140							
aac	gga	acc	gat	ttc	ctc	acg	cac	gac	ttc	gcg	ttc	gga	cgc	gtc	ggc			480
Asn	Gly	Thr	Asp	Phe	Leu	Thr	His	Asp	Phe	Ala	Phe	Gly	Arg	Val	Gly			
145					150					155				160				
gga	ttg	aac	tgc	tgg	gaa	cat	gtg	caa	ccg	ctc	agc	aag	ttc	atg	atg			528
Gly	Leu	Asn	Cys	Trp	Glu	His	Val	Gln	Pro	Leu	Ser	Lys	Phe	Met	Met			
				165				170						175				
tac	agc	ctc	ggc	gag	cag	gtc	cac	gtt	gca	tcg	tgg	ccg	gcg	atg	tcc			576
Tyr	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Val	His	Val	Ala	Ser	Trp	Pro	Ala	Met	Ser			
			180					185					190					
cct	ctt	cag	ccg	gat	gtt	ttc	caa	ctg	agc	atc	gaa	gcc	aac	gcg	acg			624
Pro	Leu	Gln	Pro	Asp	Val	Phe	Gln	Leu	Ser	Ile	Glu	Ala	Asn	Ala	Thr			
		195					200					205						
gtc	acc	cgc	tcg	tac	gca	atc	gaa	ggc	caa	acc	ttt	gtg	ctt	tgc	tcg			672
Val	Thr	Arg	Ser	Tyr	Ala	Ile	Glu	Gly	Gln	Thr	Phe	Val	Leu	Cys	Ser			
	210					215					220							
acg	cag	gtg	atc	gga	cct	agc	gcg	atc	gaa	acg	ttc	tgc	ctc	aac	gac			720
Thr	Gln	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ala	Ile	Glu	Thr	Phe	Cys	Leu	Asn	Asp			
225					230					235					240			
gaa	cag	cgc	gca	ctg	ttg	ccg	caa	gga	tgt	ggc	tgg	gcg	cgc	att	tac			768
Glu	Gln	Arg	Ala	Leu	Leu	Pro	Gln	Gly	Cys	Gly	Trp	Ala	Arg	Ile	Tyr			
			245					250						255				
ggc	ccg	gat	gga	agc	gag	ctt	gcg	aag	cct	ctg	gcg	gaa	gat	gct	gag			816
Gly	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Leu	Ala	Lys	Pro	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Glu			
			260					265					270					
ggg	atc	ttg	tac	gca	gag	atc	gat	ctg	gag	cag	att	ctg	ctg	gcg	aag			864
Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Glu	Gln	Ile	Leu	Leu	Ala	Lys			
		275					280					285						
gct	gga	gcc	gat	ccg	gtc	ggg	cac	tat	tcg	cgg	cct	gac	gtg	ctg	tcg			912
Ala	Gly	Ala	Asp	Pro	Val	Gly	His	Tyr	Ser	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Ser			
	290					295					300							
gtc	cag	ttc	gac	ccg	cgc	aat	cat	acg	cca	gtt	cat	cgc	atc	ggc	att			960
Val	Gln	Phe	Asp	Pro	Arg	Asn	His	Thr	Pro	Val	His	Arg	Ile	Gly	Ile			
305					310					315				320				
gac	ggc	cgc	ttg	gat	gtg	aat	acc	cgc	agt	cgc	gtg	gag	aat	ttc	cga			1008
Asp	Gly	Arg	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Arg	Ser	Arg	Val	Glu	Asn	Phe	Arg			
				325					330					335				

ES 2 562 791 T9

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga 1056  
 Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 51  
 <211> 369  
 <212> PRT  
 5 <213> Acidovorax facilis 72W

<400> 51

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
 115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145 150 155 160

ES 2 562 791 T9

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Val Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
 165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
 180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
 195 200 205

Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
 210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 52  
 <211> 1110  
 <212> DNA

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)

ES 2 562 791 T9

<400> 52

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag	48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu	
1 5 10 15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc	96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	
20 25 30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa	144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	
35 40 45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag	192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta	240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	
65 70 75 80	
ggt gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa	288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	
85 90 95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat	336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	
100 105 110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115 120 125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130 135 140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145 150 155 160	
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg	528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	
165 170 175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc	576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	
180 185 190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg	624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	
195 200 205	
gtc gcc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg	672
Val Ala Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser	
210 215 220	

ES 2 562 791 T9

acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac 720  
 Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
 225 230 235 240

gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac 768  
 Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag 816  
 Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag 864  
 Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg ccg cct gac gtg ctg tcg 912  
 Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att 960  
 Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga 1008  
 Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag ccg ctc gga 1056  
 Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 53  
 <211> 369  
 <212> PRT  
 5 <213> Acidovorax facilis 72W

<400> 53

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45



ES 2 562 791 T9

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
65 70 75 80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
85 90 95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
100 105 110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
115 120 125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
145 150 155 160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
165 170 175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser  
180 185 190

Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr  
195 200 205

Val Ala Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser  
210 215 220

Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp  
225 230 235 240

Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
245 250 255

Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
260 265 270

Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
275 280 285

Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser

ES 2 562 791 T9

290 295 300

Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
 355 360 365

Lys

<210> 54  
 <211> 1110  
 <212> DNA  
 5 <213> Acidovorax facilis 72W

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1110)

<400> 54

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag 48  
 Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc 96  
 Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa 144  
 Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag 192  
 Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta 240  
 Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65 70 75 80

ggg gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa 288  
 Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
 85 90 95

atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat 336  
 Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
 100 105 110

10

ES 2 562 791 T9

ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115 120 125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130 135 140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145 150 155 160	
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg	528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	
165 170 175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc	576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	
180 185 190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg	624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	
195 200 205	
gtc tgc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg	672
Val Cys Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser	
210 215 220	
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac	720
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp	
225 230 235 240	
gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac	768
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr	
245 250 255	
ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag	816
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu	
260 265 270	
ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag	864
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys	
275 280 285	
gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg ccg cct gac gtg ctg tcg	912
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser	
290 295 300	
gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att	960
Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile	
305 310 315 320	
gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga	1008
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg	
325 330 335	
ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag cgg ctc gga	1056
Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly	
340 345 350	

ES 2 562 791 T9

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc cca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala  
           355                                  360                                  365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 55

<211> 369

<212> PRT

5 <213> Acidovorax facilis 72W

<400> 55

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1                  5                                  10                                  15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
           20                                  25                                  30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
           35                                  40                                  45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
           50                                  55                                  60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu  
 65                                  70                                  75                                  80

Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys  
           85                                  90                                  95

Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr  
           100                                  105                                  110

Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg  
           115                                  120                                  125

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

Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly  
 145                                  150                                  155                                  160

Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met  
           165                                  170                                  175

Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser

## ES 2 562 791 T9

180	185	190
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr 195 200 205		
Val Cys Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser 210 215 220		
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp 225 230 235 240		
Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr 245 250 255		
Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu 260 265 270		
Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys 275 280 285		
Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser 290 295 300		
Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile 305 310 315 320		
Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg 325 330 335		
Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly 340 345 350		
Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Pro Ala 355 360 365		

Lys

<210> 56

<211> 1110

<212> DNA

5 <213> Escherichia coli SS1001

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<400> 56

ES 2 562 791 T9

atg gtt tcg tat aac agc aag ttc ctc gcg gca acc gtt cag gca gag	48
Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu	
1 5 10 15	
ccg gta tgg ctc gac gca gac gca acg atc gac aag tcg atc ggc atc	96
Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile	
20 25 30	
atc gaa gaa gct gcc caa aag ggc gcg agt ctg atc gct ttc ccg gaa	144
Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu	
35 40 45	
gta ttc att ccg ggc tac ccc tat tgg gcg tgg ctc ggc gac gtg aag	192
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
tac agc cta agc ttt act tca cgc tat cac gag aat tcg ttg gag cta	240
Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu	
65 70 75 80	
ggg gac gac cgt atg cgt cgc ctc cag ctg gcc gcg cgc cgc aac aaa	288
Gly Asp Asp Arg Met Arg Arg Leu Gln Leu Ala Ala Arg Arg Asn Lys	
85 90 95	
atc gca ctc gtc atg ggc tat tcg gag cgg gaa gcc gga tcg cgc tat	336
Ile Ala Leu Val Met Gly Tyr Ser Glu Arg Glu Ala Gly Ser Arg Tyr	
100 105 110	
ctg agc cag gtg ttc atc gac gag cgt ggc gag atc gtt gcc aat cgg	384
Leu Ser Gln Val Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ile Val Ala Asn Arg	
115 120 125	
cgc aag ctg aag ccc aca cac gtt gag cgt acg atc tac ggc gaa ggc	432
Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Gly	
130 135 140	
aac gga acc gat ttc ctc acg cac gac ttc gcg ttc gga cgc gtc ggt	480
Asn Gly Thr Asp Phe Leu Thr His Asp Phe Ala Phe Gly Arg Val Gly	
145 150 155 160	
gga ttg aac tgc tgg gaa cat ttc caa ccg ctc agc aag ttc atg atg	528
Gly Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Pro Leu Ser Lys Phe Met Met	
165 170 175	
tac agc ctc ggt gag cag gtc cac gtt gca tcg tgg ccg gcg atg tcc	576
Tyr Ser Leu Gly Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Met Ser	
180 185 190	
cct ctt cag ccg gat gtt ttc caa ctg agc atc gaa gcc aac gcg acg	624
Pro Leu Gln Pro Asp Val Phe Gln Leu Ser Ile Glu Ala Asn Ala Thr	
195 200 205	
gtc acc cgc tcg tac gca atc gaa ggc caa acc ttt gtg ctt tgc tcg	672
Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ile Glu Gly Gln Thr Phe Val Leu Cys Ser	
210 215 220	
acg cag gtg atc gga cct agc gcg atc gaa acg ttc tgc ctc aac gac	720
Thr Gln Val Ile Gly Pro Ser Ala Ile Glu Thr Phe Cys Leu Asn Asp	
225 230 235 240	

ES 2 562 791 T9

gaa cag cgc gca ctg ttg ccg caa gga tgt ggc tgg gcg cgc att tac 768  
 Glu Gln Arg Ala Leu Leu Pro Gln Gly Cys Gly Trp Ala Arg Ile Tyr  
 245 250 255

ggc ccg gat gga agc gag ctt gcg aag cct ctg gcg gaa gat gct gag 816  
 Gly Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Glu Asp Ala Glu  
 260 265 270

ggg atc ttg tac gca gag atc gat ctg gag cag att ctg ctg gcg aag 864  
 Gly Ile Leu Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Glu Gln Ile Leu Leu Ala Lys  
 275 280 285

gct gga gcc gat ccg gtc ggg cac tat tcg ccg cct gac gtg ctg tcg 912  
 Ala Gly Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser  
 290 295 300

gtc cag ttc gac ccg cgc aat cat acg cca gtt cat cgc atc ggc att 960  
 Val Gln Phe Asp Pro Arg Asn His Thr Pro Val His Arg Ile Gly Ile  
 305 310 315 320

gac ggt cgc ttg gat gtg aat acc cgc agt cgc gtg gag aat ttc cga 1008  
 Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
 325 330 335

ctg cga caa gcg gct gag cag gag cgt cag gca tcc aag ccg ctc gga 1056  
 Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
 340 345 350

acg aaa ctc ttt gaa caa tcc ctt ctg gct gaa gaa ccg gtc tca gca 1104  
 Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Ser Ala  
 355 360 365

aag tag 1110  
 Lys

<210> 57  
 <211> 369  
 <212> PRT

5 <213> Escherichia coli SS1001

<400> 57

Met Val Ser Tyr Asn Ser Lys Phe Leu Ala Ala Thr Val Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Leu Asp Ala Asp Ala Thr Ile Asp Lys Ser Ile Gly Ile  
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Ala Gln Lys Gly Ala Ser Leu Ile Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ala Trp Leu Gly Asp Val Lys  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Phe Thr Ser Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Glu Leu





ES 2 562 791 T9

Asp Gly Arg Leu Asp Val Asn Thr Arg Ser Arg Val Glu Asn Phe Arg  
325 330 335

Leu Arg Gln Ala Ala Glu Gln Glu Arg Gln Ala Ser Lys Arg Leu Gly  
340 345 350

Thr Lys Leu Phe Glu Gln Ser Leu Leu Ala Glu Glu Pro Val Ser Ala  
355 360 365

Lys

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para producir un catalizador enzimático deshidratado que tiene actividad de nitrilasa con mejor actividad específica, que comprende:
- (a) producir por fermentación un catalizador enzimático que tiene actividad de nitrilasa;
- 5 (b) pretratar dicho catalizador enzimático con glutaraldehído;
- (c) inactivar opcionalmente el glutaraldehído sin reaccionar con bisulfito después del pretratamiento con glutaraldehído;
- (d) recuperar el catalizador enzimático de (b) o (c) e inmovilizar dicho catalizador enzimático en carragenina;
- 10 (e) reticular el catalizador enzimático inmovilizado en carragenina resultante de (d) con glutaraldehído y polietilenimina; y
- (f) deshidratar el catalizador enzimático inmovilizado y reticulado producido en la etapa (e);
- en donde dicho catalizador enzimático comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55 y 57.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa (g) rehidratar el catalizador enzimático de la etapa (f) en una solución acuosa.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además la etapa (h) poner en contacto el catalizador enzimático rehidratado de la reivindicación 2 con glicolonitrilo en una solución acuosa en condiciones de reacción adecuadas en las que se produce ácido glicólico.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende además la etapa (i) recuperar el ácido glicólico producido en la etapa (h).
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH se mantiene entre 5,0 y 9,0 durante el pretratamiento con glutaraldehído.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pretratamiento con glutaraldehído en la etapa (b) comprende añadir glutaraldehído a un caldo de fermentación producido en la etapa (a) en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 3 g/L (0,025 g de GA por DO<sub>550</sub>) y aproximadamente 5 g/L (0,042 g de GA por DO<sub>550</sub>).
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pretratamiento con glutaraldehído en la etapa (b) comprende añadir glutaraldehído a un caldo de fermentación producido en la etapa (a) a un caudal de 50 mg/L/h a 500 mg/L/h.
- 30 8. El catalizador enzimático inmovilizado y reticulado, pretratado con glutaraldehído y deshidratado producido por el procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho catalizador retiene al menos aproximadamente 70% de su actividad específica para hidrolizar glicolonitrilo a ácido glicólico después de rehidratación.



```

SEQ ID NO:4 IPGYP----YAWLGDVKYSL--FTSRHENSLELGDDRMRRLQLAARNKIALVMGYS
SEQ ID NO:5 LPGA----FHWLGA PAWSLK--YSARYYANSLSDSAEFQRIAQAAARTLGFIALGYS
SEQ ID NO:6 IPGYP----YHIWVDSPLAGMAK-FAVRYHENS LTMDSPHVQRLLDAARDHNI AVVVGIS
SEQ ID NO:7 IPGYP----YWAWIGDVKWAVSD-FIPKYHENS LTLGDDRMRRLQLAARQNNIALVMGYS
SEQ ID NO:8 IPGYP----YWAWIGDVKWAVSE-FIPKYHENS LTLGDDRMRRLQLAARQHNIAMVVGYS
SEQ ID NO:9 VGGYPKGADEFHIFLGGRTPEQGRA-QYQRYAETAIAVPGPVTIRIGQIAAEQDMFIVVGV
SEQ ID NO:10 IGGYPRGFRFGLGVGHNEEGRD-EFRKYHASAIKVPGEVEKLAELAGKNNVYLVMGAI
SEQ ID NO:11 LPYYP----YFSTVEPPVLMGRS--HLKLYEQAF TMTGPELQQIARAARQIIRLTVLLGVN
SEQ ID NO:12 LPYYP----YFSFVEPPVLMGRS--HLKLYEQAF TMTGPELQQIARAARQHRLFVLLGVN
SEQ ID NO:13 VPYYP----YFSFVEPPVLMGKS--HLKLYQEAVTVP GKVTQIAQAAKTHIGMVVVLGVN
SEQ ID NO:14 LGGYPKGEFGTQLGYRLPEGRE-AFARYFANAIDVPGSETAALAGLSARTGASLVLGV
SEQ ID NO:15 IGGYPKGLDFGARMGTRTEAGRE-DFLRYWKAADVP GKETARIGSFAAKMKAYLVVGV
SEQ ID NO:16 IPGYP----WWIWLGNADYGMK--YYIQLYKNSVEI PSLAVQKLSAG-TNKVYFCVSVT
SEQ ID NO:17 IPGYP----YWIWTSNMDFTGM--MWA VLFKNAIEI PSKEVQQISDAAKNGVYCVSVS
SEQ ID NO:18 LPYYP----YFSFVEPPVLMGRS--HLALYEQA VVVP GPVTDVAVAASQYGMQVLLGVN
SEQ ID NO:19 LGGYPKGEFGTQLGYRLPEGRE-AFARYFANAIEV PGETDALAALSARTGANLVLGV
SEQ ID NO:20 VPGYP----WWLWLDSPA WGMQ--FVARYFDNSLALDGPLFARLREAAARSAITVVVTGHS
SEQ ID NO:21 LPGA----FHWLGA PAWSLK--YSARYYANSLSDSAEFQRIAQAAARTLGFIALGYS
SEQ ID NO:22 IPGYP----WFLWLDAPA WNNMP--LVQRYHQQSLV LDSVQARRISDAARHLGLYVVLGYS
SEQ ID NO:23 IPGYP----WHIWMDSPAWCIGR GFVQRYFDNSL AYDSPAQAEALRAAVRKAQLTAVLGLS
SEQ ID NO:24 IPGYP----YHIWVDSPLAGMAK-FAVRYHENS LTMDSPHVQRLLDAARDHNI AVVVGIS
SEQ ID NO:25 IPGYP----YHIWVDSPLAGMAK-FAVRYHENS LTMDSPHVQRLLDAARDHNI AVVVGIS
: * *
: . . .
: .

```

FIGURA 1B



SEQ ID NO:4	CWEHFGPESKFMFMYSLGEQVHVHVASWPAMSPLODPVDFOLSIEANATV-----TRSYAIE
SEQ ID NO:5	CWEHESPLSKYALYSQHEAIIHAAWPSFSLYSEQAHALSAKVNMAA-----SQIYSVE
SEQ ID NO:6	CWEHFOITLTKYAMYSMHEQVHVASWPAGMSLYQPEVPFAGVDAQLLTA-----TRMYALE
SEQ ID NO:7	CWEHFOPLSKYMMYSLNEQIHVASWPAMFALTPDVHQLSVEANDTV-----TRSYAIE
SEQ ID NO:8	CWEHFOPLSKYMMYSLNEQIHVASWPAMFALTPDVHQLSVEANDTV-----TRSYAIE
SEQ ID NO:9	CWENEMPELLRMAMYGKQIQIYCAPTADDKPTWVSTMQ-----IIVALE
SEQ ID NO:10	CWENRMPLRYTALYAKGLELYCAPTADGSKQWQSSML-----HIAIE
SEQ ID NO:11	CWENYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGFIFSEQTAVT-----LRHHALE
SEQ ID NO:12	CWENYNPIARFSLMTQGEIHCQAQFPGSLVGFIFSEQTAVT-----LRHHALE
SEQ ID NO:13	CWENYNPIARYALMAQHEQIHCGQFPGSMVGFIFADQMEVT-----MRHHALE
SEQ ID NO:14	CWENYMPPLRTAMYAKGVQLWCAPTVDEREIHWQVSMR-----HVAAE
SEQ ID NO:15	CWENYMPVLRQVMYAGGVNIWCAPTVDQREIHWQVSMR-----HIAYE
SEQ ID NO:16	CWEHFLPLNVAAMASMNEQVHVASWPVIGMPQ--EGHLFGPEQCVTA-----TKYYAIS
SEQ ID NO:17	CWEHALPLNIAAMGSLNEQVHVASWPATVPKGAVSSRVSSVCASTNAMHQIISQFYAIS
SEQ ID NO:18	CWENYNPIARYALMAQGEIHCQAQFPGSLVGFIFSEQTAVT-----MRHHALE
SEQ ID NO:19	CWENNPPLLRTAMYAQGIEVWCAPTVDEREMWQVSMR-----HIAHE
SEQ ID NO:20	CWEHQPPLTKYAMYSQHEQIHVAAMPSEFSYRGAAYALGPEVNTGA-----ARQYAVE
SEQ ID NO:21	CWEHESPLSKYALYSQHEAIIHAAWPSFSLYSEQAHALSAKVNMAA-----SOIYSVE
SEQ ID NO:22	CWEHQPPLSKYAMYAQNEQIHVAAMPSEFSLYRNATSALGPEVNTAA-----SRVYAAE
SEQ ID NO:23	CWEHQPPLSKYAMYAQNEQVHVAAAMPSEFSLYDPFAPALGAEVNNAA-----SRVYAVE
SEQ ID NO:24	CWEHFOITLTKYAMYSMHEQVHVASWPAGMSLYQPEVPFAGVDAQLLTA-----TRMYALE
SEQ ID NO:25	CWEHFOITLTKYAMYSMHEQVHVASWPAGMSLYQPEVPFAGVDAQLLTA-----TRMYALE

\*\*\*: : : .  
 \_

FIGURA 1D

SEQ ID NO:4	GQTFVLCSTQVIG-----PSAIEETFCLNDE--QRALLPQCGGWARIYGPDGSEELAKPLAED
SEQ ID NO:5	GQCFVIAASSVVT-----QETLDMLEVGEH--NASLLKVGSGSSMIFADGRTLAPYLPHD
SEQ ID NO:6	GQTFVVTCTQVVT-----PEAHEFFCDNDE--QRKLI GRGGGFARIIGPDGRDLATPLAED
SEQ ID NO:7	GQTFVLAATHVIG-----KATQDLFAGDDDA--KRALLPLGQGWARIYGGPDGKSLAELPED
SEQ ID NO:8	GQTFVLAATHVIG-----KATQDLFAGDDEA--KRALLPLGQGWARIYGGPDGKSLAELPLAEN
SEQ ID NO:9	GRCFVLSACQHLRKGDFPEFHNALDVQP-----DTVLMRGGSCIVDPMGQLLAGPVY-D
SEQ ID NO:10	GGCFVLSACQFCILRKDFPDHFDYLFETDWDYDDKEPDS IVSQGGSV IISPLGQVLAGPNF-E
SEQ ID NO:11	AGCFVLSSTAWLD-----PADYDTITPDRS---LHKAFQGGCHTAIISPEGRYLAGPLP-E
SEQ ID NO:12	AGCFVLSSTAWLD-----PADYDTITPDRS---LHKAFQGGCHTAIISPEGRYLAGPLP-E
SEQ ID NO:13	SGCFVINATGWL T-----AEQKLOITTDEK---MHQALS GCCYTAIISPEGKHLCEPIA-E
SEQ ID NO:14	GRCFVLSACQVQ-----DSPAALGMEVANWFA---ERPLINGGSLIVGPLGDVLAGPLL-G
SEQ ID NO:15	GRLFVLSACQYMT RADAPADYDCIQGNDP-----ETELIAGGSV IIDPMGNILAGPLY-G
SEQ ID NO:16	NQVFCLLSSQIWT-----EEQRDKICETEE--QRNFMKVGHGFSKIIAPNGMEIGNKLAHD
SEQ ID NO:17	NQVYVIMSTNLVG-----QDMIDMIGKDEF--SKNFLPLGSGNTA IISNTG-EILASIPQD
SEQ ID NO:18	AGCFVICSTGWLH-----PDDYASITSESG---LHKAFQGGCHTAIISPEGRYLAGPLP-D
SEQ ID NO:19	GRCFVVSACQVQ---ASPEELGLEIANWFA---QRPLIAGGSVIVGPMGDVLAGPLV-G
SEQ ID NO:20	GQCFVLSPCAVID-----EAGVELFCDTPA--KRELLLPGGGFAQIYGGPDGRELGTALPET
SEQ ID NO:21	GQCFVIAASSVVT-----QETLDMLEVGEH--NAPLLKVGSGSSMIFADGRTLAPYLPHD
SEQ ID NO:22	GQCFVLAPCAIVS-----PEMIEMLCDSDA--KRSLIQAGGGHARITGPDGSDLATPLGEH
SEQ ID NO:23	GSCFVLAPCAIVS-----QAMIDELCDRPD--KHALLHAGGGHAAIFGPDGSSALAAQLPPD
SEQ ID NO:24	GQTFVVTCTQVVT-----PEAHEFFCENEE--QRKLI GRGGGFARIIGPDGRDLATPLAED
SEQ ID NO:25	GQTFVVTCTQVVT-----PEAHEFFCENEE--QRMLI GRGGGFARIIGPDGRDLATPLAED

FIGURA 1E

```

SEQ ID NO:4 AEGILYAEIDLEQILLAKAGADPVGHYSRDPDVLVSVQDFPRNHTPVRHIGIDGRLLDVNTRS
SEQ ID NO:5 AEGLIADLNMEELAFAKAINDPVGHYSKPEATRLVLDLGHREPMTRVHSK---SVIQEE
SEQ ID NO:6 EEGILYADIDLSAITLAKQAADPVGHYSRDPDVLVSLNFNQRHTTPVN-----TAISTI
SEQ ID NO:7 AEGLLYAEIDLEQIILAKAAAADPAGHYSRDPDVLVSLKIDTRNHTPVQYITADGRTSLNSNS
SEQ ID NO:8 AEGLLYAEIDLEQIIVAKAAAADPAGHYSRDPDVLVSLKIDTRNHTPVQYVTEDEGSSLSNSNS
SEQ ID NO:9 EDAILVADIDLDVTRGKMDFDVVGHYARPDIFSLTVDERPKPPVTTL-----K
SEQ ID NO:10 SEGLITADLDLGDVVARAKLYFDSVGHYSRDPDVLHLTVNEHPKPVTFI-----S
SEQ ID NO:11 GEGLAIAEELDKSLITKRRKRMDSVGHYSRDPDVLVSLRINRSPATQVQAIG-----S
SEQ ID NO:12 GEGLAIAEELDKSLITKRRKRMDSVGHYSRDPDVLVSLRINRSPATQVQAIG-----S
SEQ ID NO:13 GEGLAIAEELDKSLITKRRKRMDSVGHYSRDPDVLVSLRINRSPATQVQAIG-----S
SEQ ID NO:14 ARGLVCAEVDDELVRARYDFDVVGHYARPDVFEVLSVDERPRPGVR-----F
SEQ ID NO:15 QEGVLVADIDLDLTIKARYDLDSVGHYSRDPDIFELKVDQRSHQVITDQ-----F
SEQ ID NO:16 EEGIITYADIDLEQIIPGKFLIDSAGHYSTPGFELSLFDRTEKKPIKHIG-----E
SEQ ID NO:17 AEGIAVAEIDLNQIIYGGKWLDPAGHYSTPGFELSLTFDQSEHVPPKKIG-----E
SEQ ID NO:18 GEGLAIAEELDKSLITKRRKRMDSVGHYSRPELISLQINSSPAVQVQNM-----S
SEQ ID NO:19 RAGLISAQIDTADLVRARYDYDVVGHYARPDVFEVLSVDERPRPGVR-----F
SEQ ID NO:20 EEGLVYADLEASAVAKSAADPVGHYSRDPDVLQLLWDP--RPRSVMR-----Q
SEQ ID NO:21 AEGLIADLNMEELAFAKAINDPVGHYSKPEATRLVLDLGHREPMTRVHSK---SVTREE
SEQ ID NO:22 EEGLLYATLDPAAITLAKVAADPAGHYSRDPDVTRLMFPN---NPTPCVV-----D
SEQ ID NO:23 QEGLLIAEIDLGMIKIAKNAADPAGHYSRDPDVTRLINK---KPINRVE-----H
SEQ ID NO:24 EEGILYADIDLSAITLAKQAADPVGHYSRDPDVLVSLNFNQRHTTPVN-----TPLSTI
SEQ ID NO:25 EEGILYADIDLSAITLAKQAADPVGHYSRDPDVLVSLNFNQRHTTPVN-----TPLSTI

```

FIGURA 1F



SEQ	ID	NO:	RVENFRLRQAAEQERQASKRLGKLFEQS-----LLAEEPVPK----
SEQ	ID	NO: 4	
SEQ	ID	NO: 5	APEPHVQSTAAPVAVSQTQSDTLLVQEPS-----
SEQ	ID	NO: 6	HATHLLVPQSGALDGVRELNAGADEQRALPS-----THSDETD RATASI
SEQ	ID	NO: 7	RVENYRLHLQADIEKVENAEAA TLPLDAPAP-----APEQKSGRAKAEA
SEQ	ID	NO: 8	RVENYRLRQLADIEKVENADSATVPLDVTTPEKQSGDVNANGNAKVNTNPSAKAKA
SEQ	ID	NO: 9	P-----
SEQ	ID	NO: 10	KVEKAEDDSNK-----
SEQ	ID	NO: 11	AAALPELPNLEAAPAEAEYDLHA-----
SEQ	ID	NO: 12	AAALPELPNLEAAPAEAEYDLHA-----
SEQ	ID	NO: 13	VTPNAIPAVSDPELTETIEALPNNPIFSH-----
SEQ	ID	NO: 14	IG-----
SEQ	ID	NO: 15	SRDOATEKKPVSSEI SLD-----
SEQ	ID	NO: 16	SAQETVYEEIQYGNKANVKVHS-----
SEQ	ID	NO: 17	QTNHFI SYEDLHEDKMDMLTIPRRVATA-----
SEQ	ID	NO: 18	TASVPLEPATATDALSSMEALNHV-----
SEQ	ID	NO: 19	T-----
SEQ	ID	NO: 20	VA-LSVASPAESAD-----DAEPAVR-----
SEQ	ID	NO: 21	APEQGVQSKIASVAISHPQSDTLLVQEPS-----
SEQ	ID	NO: 22	LPDLPISSESI ELL-----RPDIALEV-----
SEQ	ID	NO: 23	FS-LPVD SAAAALPGEAAVARPDQSI-----
SEQ	ID	NO: 24	HATHTFVFPQFGALDGVRELNAGADEQRALPS-----THSDETD RATATL
SEQ	ID	NO: 25	HATHTFVFPQFGALDGVRELNAGADEQRALPS-----THSDETD RATATL

FIGURA 1G