

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 181**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/24** (2006.01)

**C12R 1/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2014 PCT/EP2014/065659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15011112**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2014 E 14741628 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3024939**

54 Título: **Ingeniería genética de Pseudomonas putida KT2440 para una producción rápida y de alto rendimiento de vainillina a partir de ácido ferúlico**

30 Prioridad:

**22.07.2013 EP 13177401**

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

**09.05.2019**

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)  
Carl-Bosch-Strasse 38  
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**GRAF, NADJA y  
ALTENBUCHNER, JOSEF**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 712 181 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Ingeniería genética de *Pseudomonas putida* KT2440 para una producción rápida y de alto rendimiento de vainillina a partir de ácido ferúlico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento biocatalítico mejorado para producir vainillina a partir de ácido ferúlico basado en cepas de *Pseudomonas* modificadas por ingeniería genética, así como a dichas cepas de *Pseudomonas*.

**Antecedentes técnicos**

10 La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), el compuesto organoléptico de sabor a vainilla, es uno de los agentes aromatizantes cuantitativos más utilizados en todo el mundo. Su demanda ha superado durante mucho tiempo la oferta de la fuente botánica *Vanilla planifolia*. Actualmente, la mayor parte de la vainillina se sintetiza químicamente a partir de guaiacol, que procede de materias primas fósiles, y lignina, un componente en materiales de desecho de la industria de la pulpa de madera (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2000). Sin embargo, la demanda de esta vainillina "idéntica a la de la naturaleza", que se utiliza principalmente en la industria de alimentos y bebidas, se desplaza hacia la vainillina "natural" debido a una creciente conciencia de salud y nutrición de los clientes. Por tanto, 15 la producción biotecnológica de vainillina "natural" se vuelve cada vez más importante (revisado por Krings y Berger, 1998; Priefert y col., 2001).

20 Se han realizado esfuerzos para producir vainillina mediante células de *Vanilla planifolia* cultivadas *in vitro* (Davidonis y Knorr, 1991). También se implementó una síntesis *de novo* utilizando cepas de levadura modificadas por ingeniería genética (Hansen y col., 2009). El foco principal, sin embargo, se colocó en la biotransformación utilizando enzimas aisladas o diferentes microorganismos procarióticos como biocatalizadores de células completas (Havkin-Frenkel y Belanger, 2008; Berger, 2009).

25 Además de lignina y estilbenos fenólicos, como el eugenol, la biotransformación del ácido ferúlico en vainillina es el procedimiento más intensamente estudiado para producir vainillina "natural" (revisado por Rosazza y col., 1995; Priefert y col., 2001). El precursor del ácido ferúlico (ácido 3- (4-hidroxi-3-metoxi-fenil) prop-2-enoico), un ácido hidroxicinámico, es una sustancia muy abundante ya que es un componente de muchas paredes celulares de plantas (Ishikawa y col., 1963; Escott-Watson y Marais, 1992; Ishii, 1997; Oosterveld y col., 2000). Se han evaluado muchos microorganismos diferentes para la producción de vainillina a partir de ácido ferúlico que comprende cepas recombinantes de *E. coli*, *Pseudomonas* ssp., *Rhodococcus* ssp., *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Pycnoporous cinnabarinus*, *Amycolatopsis* ssp. y *Streptomyces* ssp. (Lesage-Meessen y col., 1996; Okeke y Venturi, 1999; 30 Muheim y Lerch, 1999; Achterholt y col., 2000; Overhage y col., 2003; Peng y col., 2003; Plaggenborg y col., 2006; Yoon y col., 2007; Barghini y col., 2007; Hua y col., 2007; Di Gioia y col., 2010; Tilay y col., 2010; Fleige y col., 2013). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los rendimientos de vainillina fueron bajos y las reacciones de biotransformación lentas. Los bajos rendimientos pueden atribuirse principalmente a la alta toxicidad de la vainillina (Krings y Berger, 1998). La producción mejorada de vainillina con resinas adsorbentes mejoró los niveles de vainillina hasta 19,2 g l<sup>-1</sup>, pero el rendimiento molar de aproximadamente un 43 % fue bastante bajo (Hua y col., 35 2007). Otros inconvenientes fueron la ineficiente expresión génica heteróloga y la inestabilidad del plásmido. También se centró la atención en la prevención de una mayor degradación de la vainillina en alcohol de vainillílico o ácido vainillílico (Stentelaire y col., 1997; Bonnin y col., 1999; Oddou y col., 1999; Civolani y col., 2000; Overhage y col., 2000).

40 Las bacterias del género *Pseudomonas* muestran una amplia versatilidad metabólica, ya que pueden usar una amplia gama de moléculas aromáticas como fuentes únicas de carbono (Clarke, 1982). El catabolismo del ácido ferúlico en la cepa HR199 de *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens* BF13 y *P. putida* KT2440 se producen a través de una vía no- $\beta$ -oxidativa dependiente de coenzima A como se representa en la Figura 1 (Narbad y Gasson, 1998; Gasson y col., 1998; Overhage y col., el documento 1999b; Plaggenborg y col., 2003; Calisti y col., 2008). En primer lugar, el ácido ferúlico se activa en feruloil-CoA catalizada por la feruloil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.34; codificada por *fcs*). En segundo lugar, el tioéster CoA se hidrata y se escinde en vainillina y acetil-CoA catalizada por enoil-CoA 45 hidratasa/aldolasa (EC 4.2.1.101; codificada por *ech*). La vainillina deshidrogenasa (EC 1.2.1.67; codificada por *vdh*), oxida la vainillina a ácido vainílico, que se cataboliza adicionalmente a ácido protocatechúico mediante vainillato-O-desmetilasa (EC 1.14.13.82; codificado por *vanAB*). Overhage y col., (1999b) también propusieron una segunda ruta sobre 4-hidroxi-3-metoxifenil- $\beta$ -cetopropionil-CoA y vainillil-CoA catalizada por enzimas codificadas por PP\_3355 50 (*aat*) y probablemente PP\_3354.

55 Un estudio reciente ha utilizado una cepa modificada metabólica de *P. fluorescens* para la producción de vainillina a partir de ácido ferúlico (Di Gioia y col., 2010). Mediante la delección del gen *vdh* para la vainillina deshidrogenasa y la sobreexpresión de los genes estructurales *fcs* y *ech* en un vector de copias bajas, los autores pudieron producir hasta 8,41 mM de vainillina a partir de ácido ferúlico 10 mM, que fue el título final más alto de vainillina producida con una cepa de *Pseudomonas* hasta ahora.

DIANA DI GIOIA y col., (JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 156, no. 4) desvelan la ingeniería genética de *Pseudomonas fluorescens* para la producción de vainillina a

partir de ácido ferúlico, en el que el gen que codifica la vainillina deshidrogenasa (VDH) está inactivado y se añade un plásmido que codifica la feruloil-CoA sintetasa (fcs) y la hidratasa/aldolasa (ech).

5 OVERHAGE J y col., (APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLÍN, DE, vol. 52, n.º 6) desvelan un procedimiento biocatalítico para producir vainillina a partir de eugenol a través del ácido ferúlico, en el que el gen de la vainillina deshidrogenasa (vdh) está alterado. La vainillina no se acumula, dado que una segunda vainillina deshidrogenasa, en concreto, la coniferil-aldehído deshidrogenasa (codificada por el gen calB) oxida la vainillina. Se ha propuesto la inactivación de dicho gen calB.

10 El documento JP H05 227980 A (TAKASAGO PERFUMERY CO LTD) desvela la mutación de bacterias del género *Pseudomonas* para obtener un mutante que no crece en absoluto o solo crece lentamente en un medio con vainilla como fuente de carbono. El mutante se utiliza para la preparación de vainillina. Los enfoques de la técnica anterior para la producción microbiana de vainillina todavía sufren uno o más de los siguientes inconvenientes: baja tasa de conversión de ácido ferúlico, bajo rendimiento molar de vainillina, formación significativa de subproductos.

El problema subyacente de la presente invención era, por lo tanto, la provisión de un procedimiento que evite al menos uno de los inconvenientes mencionados anteriormente.

### 15 Sumario de la invención

Sorprendentemente, el problema mencionado anteriormente se resolvió proporcionando cepas modificada por ingeniería genéticas de bacterias del género *Pseudomonas* que tienen la capacidad de catalizar el catabolismo del ácido ferúlico a través de una vía no  $\beta$ -oxidativa dependiente de coenzima A en vainillina. Vía no oxidativa  $\beta$  a la vainillina.

20 En una realización particular, se utilizó la cepa no patogénica y completamente secuenciada KT2440 de *Pseudomonas putida* (ATCC 47054) (Nelson y col., 2002), que es un derivado libre de plásmido de la cepa de bioseguridad de *P. putida* mt-2 (Kojima y col., 1967; Williams y Murray, 1974; Nakazawa, 2002). Mediante modificación genética se pudo establecer una forma altamente eficiente para la biotransformación de ácido ferúlico a vainillina usando células mutantes de *P. putida* en reposo sin plásmido. En particular, la manipulación genética de *P.*  
25 *putida* KT2440 mediante el sistema de contraselección de *upp* (Graf y Altenbuchner, 2011) condujo a células que podían convertir rápidamente el ácido ferúlico en vainillina acompañado de rendimientos molares de hasta el 86 %, altas productividades y poca formación de subproductos.

Dicha cepa no patogénica de *Pseudomonas putida* KT2440 se optimizó genéticamente para que convirtiera el ácido ferúlico en vainillina de una manera particular. La delección del gen de la vainillina deshidrogenasa (*vdh*) no fue  
30 suficiente para prevenir la degradación de la vainillina. La inactivación adicional de un transportador de molibdato, identificado por mutagénesis de transposón, llevó a una cepa incapaz de crecer en vainillina como única fuente de carbono. La bioconversión se optimizó aún más mediante la expresión cromosómica aumentada de los genes estructurales para la feruloil-CoA sintetasa (*fcs*) y la enoil-CoA hidratasa/aldolasa (*ech*) mediante la introducción del sistema fuerte del promotor *tac*. Ingeniería genética adicional condujo a altas tasas de conversión inicial y  
35 rendimientos molares de vainillina de hasta un 86 % en solo 3 horas, acompañados de niveles muy bajos de subproductos. Esto representa la productividad más alta y el rendimiento de vainillina molar más alto obtenidos hasta la fecha con una cepa de *Pseudomonas*. Junto con su alta tolerancia al ácido ferúlico, las nuevas cepas de *Pseudomonas* libres de plásmidos recién desarrolladas representan candidatos prometedores para la producción biotecnológica de vainillina.

### 40 Descripción de las figuras

**Figura 1:** Ruta propuesta para el catabolismo del ácido ferúlico sobre la vainillina en cepas de *Pseudomonas*. La ruta alternativa de 4-hidroxi-3-metoxifenil- $\beta$ -hidroxipropionil-CoA a ácido vainillílico se muestra a la derecha (propuesta por Overhage y col., 1999b). La reducción de la vainillina en alcohol vainillílico se representa con una flecha discontinua. Los signos de interrogación simbolizan reacciones catalizadas por enzimas desconocidas.

45 **Figura 2:** Organización de los genes estructurales de la enoil-CoA hidratasa/aldolasa (*ech*), feruloil-CoA sintetasa (*fcs*) y vainillina deshidrogenasa (*vdh*),  $\beta$ -cetotiolasa (*aat*) y acil-CoA deshidrogenasa (PP\_3354) en las cepas mutantes de *P. putida* utilizadas en la presente invención. Se representa el sitio de integración de la región del promotor *tac* que incluye el operador *lac* ( $P_{lac}$ ) y el gen para el represor *lac* (*lac<sup>R</sup>*).

50 **Figura 3:** Crecimiento de las cepas mutantes de *P. putida* GN23, GN235, GN275 y GN276 en medio mínimo M9 con diferentes fuentes de carbono. Las cepas se inocularon con 0,05 DO<sub>600</sub> como se indica con una flecha. El crecimiento se documentó midiendo la DO<sub>600</sub>. Se presenta la DO<sub>600</sub> después de 24 horas a 30 °C para mostrar la capacidad de las cepas para crecer en glucosa, ácido ferúlico, ácido vainillílico y vainillina, respectivamente, como única fuente de carbono.

55 **Figura 4:** Ensayos de bioconversión de ácido ferúlico en vainillina. Se indujeron los genes metabólicos *ech* y *fcs* durante 6 horas con IPTG 5 mM antes de que se iniciara la bioconversión de ácido ferúlico en vainillina con 5 x 10<sup>9</sup> células en reposo ml<sup>-1</sup> de las cepas de *P. putida* (a) GN23, (b) GN235, (c) GN276, (d) GN299, (e) GN347, (f)

GN440, (g) GN441 y (h) GN442. Las concentraciones de ácido ferúlico (círculos negros), vainillina (círculos blancos), alcohol vainillílico (triángulo negro) y ácido vainillílico (triángulo blanco) se midieron mediante HPLC y se representaron gráficamente sobre el tiempo de conversión. La figura muestra los valores medios de al menos tres ensayos repetidos independientemente. La desviación estándar fue inferior al 10 %.

5 **Figura 5:** Influencia de la cantidad de inductor IPTG en la bioconversión de ácido ferúlico a vainillina. Se indujeron células de *P. putida* GN299 durante 6 horas con (a) IPTG 1 mM y (b) IPTG 5 mM antes de comenzar la bioconversión de ácido ferúlico en vainillina con  $5 \times 10^9$  células en reposo  $\text{ml}^{-1}$ . Las concentraciones de ácido ferúlico (círculos negros), vainillina (círculos blancos), alcohol vainillílico (triángulo negro) y ácido vainillílico (triángulo blanco) se midieron mediante HPLC y se representaron gráficamente sobre el tiempo de conversión. La figura muestra los valores medios de al menos tres ensayos repetidos independientemente. La desviación estándar fue inferior al 10 %.

10 **Figura 6:** Influencia de (a) el tiempo de inducción y (b) la cantidad de células en reposo de *P. putida* GN299 en la bioconversión de ácido ferúlico a vainillina. (a) Se indujeron las células durante 2, 4 y 6 h con IPTG 5 mM antes de que se iniciara la bioconversión de ácido ferúlico en vainillina con  $5 \times 10^9$  células en reposo  $\text{ml}^{-1}$ . (b) Las células se indujeron durante 6 horas con IPTG 5 mM antes de que se iniciara la bioconversión de ácido ferúlico en vainillina con cantidades variables de células en reposo ( $5$ ,  $10$  y  $20 \times 10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$ ). Las concentraciones de ácido ferúlico (barras negras), vainillina (barras blancas), alcohol vainillílico (barras de color gris oscuro) y el ácido vainillílico (barras de color gris claro) se midieron por HPLC y se mostraron al principio (0 h) y al final (18 h) del ensayo de bioconversión. La figura muestra los valores medios de al menos tres ensayos repetidos independientemente. La desviación estándar está representada por barras de error.

15 **Fig. 7:** Influencia de la concentración de (a) ácido ferúlico y (b) vainillina en la bioconversión. Se indujeron los genes metabólicos *ech* y *fcs* durante 6 horas con IPTG 5 mM antes de que se iniciara la bioconversión de ácido ferúlico en vainillina con  $5 \times 10^9$  células en reposo  $\text{ml}^{-1}$  de la cepas de *P. putida* GN299. (a) Se utilizaron concentraciones crecientes de ácido ferúlico (10, 20, 30 y 40 mM) para la conversión a vainillina. (b) Se añadieron concentraciones crecientes de vainillina (0, 10, 15, 20 y 30 mM) al comienzo del ensayo de bioconversión con ácido ferúlico 10 mM. Las concentraciones de ácido ferúlico (barras negras), vainillina (barras blancas), alcohol vainillílico (barras de color gris oscuro) y el ácido vainillílico (barras de color gris claro) se midieron por HPLC y se mostraron al principio (0 h) y al final (18 h) del ensayo de bioconversión. La figura muestra los valores medios de al menos tres ensayos independientes. La desviación estándar está representada por barras de error.

20 **Figura 8:** Tolerancia de la cepa mutante de *P. putida* cepa GN299 hacia diferentes concentraciones de (a) ácido ferúlico y (b) vainillina en medio mínimo M9. Después de la inoculación con 0,1  $\text{DO}_{600}$  en medio mínimo M9 con 0,4 % de glucosa y concentraciones crecientes de (a) ácido ferúlico y (b) vainillina, el crecimiento se documentó midiendo la  $\text{DO}_{600}$ . Se presenta la  $\text{DO}_{600}$  después de 24 horas a 30 °C para mostrar la tolerancia de GN299 a diferentes concentraciones de ácido ferúlico y vainillina, respectivamente. La figura muestra los valores medios de al menos tres ensayos independientes. La desviación estándar está representada por barras de error.

## Descripción detallada de la invención

### A. Definiciones generales

40 "Regulación alterada" debe entenderse en su sentido más amplio (regulación por aumento o regulación por disminución, amplificación o atenuación, aumento o disminución de la actividad/función), y comprende un aumento o disminución o un apagado completo o el encendido de un objetivo, como, por ejemplo, una actividad enzimática (enzima diana) u otra actividad de proteínas metabólicamente activas (proteína diana), por diferentes medios bien conocidos por los expertos en la técnica.

45 Pueden producirse manipulaciones adecuadas en las secuencias de aminoácidos que alteran el nivel de proteína/enzima o restos de aminoácidos; o puede ocurrir a nivel de ácidos nucleicos, alterando, por ejemplo, la información genética o el elemento genético regulador. Los procedimientos adecuados comprenden, por ejemplo, un aumento o disminución del número de copias del gen y/o las moléculas de las enzimas/proteínas en un organismo modificado por ingeniería genética, o la modificación de otra característica de la enzima que afecta a su actividad enzimática o de la proteína, que afecta a su actividad biológica, como por ejemplo metabólica, que luego da como resultado el efecto deseado en la vía metabólica en cuestión.

50 La manipulación genética adecuada también puede incluir, pero sin limitación, alterar o modificar secuencias reguladoras o sitios asociados con la expresión de un gen particular (por ejemplo, eliminando o introduciendo promotores fuertes, promotores inducibles o promotores múltiples), modificando la localización cromosómica de un gen en particular, alterando secuencias de ácido nucleico adyacentes a un gen en particular, tal como un sitio de unión a ribosoma o terminador de la transcripción, disminuyendo o aumentando el número de copias de un gen en particular, modificando proteínas (por ejemplo, proteínas reguladoras, supresores, potenciadores, activadores de la transcripción y similares) involucrados en la transcripción de un gen en particular y/o la traducción de un producto génico en particular, o cualquier otro medio convencional de alteración de la regulación de la expresión de una rutina

génica en particular en la técnica (incluido, entre otros, el uso de moléculas de ácido nucleico antisentido u otros procedimientos para eliminar o bloquear la expresión de la proteína diana).

Más particularmente "alterar la regulación", "con la regulación alterada y "regulación alterada" se hace referencia a alteraciones o modificaciones de al menos un gen en un microorganismo, en el que la alteración o modificación da como resultado un aumento de la eficiencia de la producción de vainillina en el microorganismo en relación con la producción de vainillina en ausencia de la alteración o modificación. En algunas realizaciones, un gen que está alterado o modificado codifica una enzima en una vía biosintética o una proteína de transporte, de modo que el nivel o la actividad de la enzima biosintética en el microorganismo se altere o modifique o la especificidad o eficiencia del transporte se altere o modifique. En algunas realizaciones, al menos un gen que codifica una enzima en una ruta biosintética se altera o modifica de tal manera que el nivel o la actividad de la enzima se potencia o aumenta con relación al nivel en presencia del gen de tipo natural o no alterado. La alteración de la regulación también incluye alterar la región de codificación de uno o más genes para producir, por ejemplo, una enzima que es resistente a la retroalimentación o que tiene una actividad específica mayor o menor. Asimismo, la alteración de la regulación abarca además la alteración genética de los genes que codifican los factores de la transcripción (por ejemplo, activadores, represores), que regulan la expresión de genes que codifican enzimas o proteínas de transporte. Más específicamente, la alteración de la regulación puede dar como resultado una actividad enzimática "disminuida", en la que la actividad enzimática resultante es inferior al 100 % de la actividad enzimática observada en el estado de no alteración de la regulación o está "apagada", es decir, de forma reversible o irreversible, ya no está presente o al menos ya no es detectable con una herramienta analítica convencional, como un ensayo de actividad enzimática.

Una forma en particular de una regulación por aumento es la amplificación de un gen objetivo, en particular realizando una mutación "por aumento" que aumenta la actividad del gen, por ejemplo, mediante amplificación génica utilizando señales de expresión fuertes y/o mutaciones puntuales que mejoran o aumentan la actividad enzimática o la actividad metabólica de una proteína.

Una forma preferida de una regulación por disminución es la atenuación de un gen objetivo, en particular realizando una mutación "por disminución" que disminuye la actividad del gen, por ejemplo, por delección o alteración de genes, utilizando señales de expresión débiles y/o mutaciones puntuales que destruyen o disminuyen la actividad enzimática o la actividad metabólica de una proteína.

En particular, un gen puede manipularse de manera que uno o más nucleótidos se delecionen del cromosoma del organismo huésped. La actividad disminuida de un producto génico también puede obtenerse introduciendo una o más mutaciones genéticas que conducen a una actividad disminuida del producto génico. La actividad disminuida puede ser una reducción de la actividad enzimática u otra actividad metabólica en > 50 % de la actividad enzimática no mutada o no alterada, o reducción de la actividad en > 90 % o, más preferentemente, una reducción de la actividad en > 95 % o, más preferentemente, una reducción de la actividad en > 98 %, o incluso más preferentemente una reducción de la actividad en > 99 %, o incluso más preferentemente una reducción de la actividad en > 99,9 %.

El aumento de la actividad de un producto génico también se puede obtener introduciendo una o más mutaciones génicas que conduzcan a un aumento de la actividad del producto génico. El aumento de la actividad puede ser un aumento de la actividad enzimática u otra metabólica por, por ejemplo, un factor de 1 a 1.000 de la actividad enzimática no mutada o no alterada, o aumento de la actividad por un factor de 2 a 100 o, más preferentemente, un aumento de la actividad por un factor de 5 a 50 o de 10 a 20.

El término "heterólogo" o "exógeno" se refiere a proteínas, ácidos nucleicos y las secuencias correspondientes como se describe en el presente documento, que se introducen o se producen (transcriben o traducen) por un microorganismo manipulado genéticamente (modificado por ingeniería genética), tal como se define en el presente documento y el microorganismo anterior a dicha manipulación no contenía o no producía dicha secuencia. En particular, dicho microorganismo antes de dicha manipulación puede no contener o expresar dicha actividad enzimática heteróloga, o puede contener o expresar una enzima endógena de actividad o especificidad comparables, que está codificado por una secuencia codificante diferente o por una enzima de diferente secuencia de aminoácidos, y dicha enzima endógena puede convertir el mismo sustrato o sustratos que dicha enzima exógena.

Un "microorganismo" se refiere a eucariotas y, en particular, a procariotas y, más particularmente, a bacterias.

Un microorganismo "derivado de un microorganismo parental" se refiere a un microorganismo modificado por cualquier tipo de manipulación, o combinación de tales manipulaciones, seleccionadas entre técnicas químicas, bioquímicas o microbianas, en particular de ingeniería genética. En este último caso, se les conoce como microorganismos "modificados por ingeniería genética". Dicha manipulación da como resultado al menos un cambio de una característica biológica de dicho microorganismo parental. Como ejemplo, la secuencia de codificación de una enzima heteróloga puede introducirse en dicho organismo o puede eliminarse una secuencia de codificación del microorganismo parental. Mediante dicho cambio se puede añadir, reemplazar o deleccionar al menos una característica de dicho microorganismo parental. Dicho cambio puede, por ejemplo, dar lugar a una característica metabólica alterada de dicho microorganismo, de modo que, por ejemplo, un sustrato de una enzima expresada por dicho microorganismo (cuyo sustrato dicho microorganismo parental no utilizó o lo utilizó con diferente eficacia) se metaboliza de una manera característica (por ejemplo, en diferente cantidad, proporcional o con diferente eficacia si

se compara con el microorganismo parental), y/o dicho microorganismo modificado forma un producto metabólico final o intermedio de una manera característica (por ejemplo, en diferente cantidad, proporción o con diferente eficacia si se compara con el microorganismo parental).

5 Un microorganismo puede ser "alterado" o "modificado" física o ambientalmente para expresar un producto génico a un nivel mayor o menor en relación con el nivel de expresión del producto génico por el microorganismo de partida. Por ejemplo, un microorganismo puede tratarse o cultivarse en presencia de un agente (químico o genético) que se sabe o se sospecha que aumenta o disminuye la transcripción y/o la traducción de un gen particular y/o la traducción de un producto génico particular tal que la transcripción y/o la traducción se incrementa o disminuye. Como alternativa, un microorganismo puede cultivarse a una temperatura seleccionada para aumentar o disminuir la transcripción y/o la traducción de un gen particular y/o la traducción de un producto génico en particular de manera que la transcripción y/o la traducción aumenten o disminuyan.

"Modificado por ingeniería genética" se refiere a un microorganismo alterado en el sentido anterior mediante técnicas de ingeniería genética disponibles en la materia, como por ejemplo transformación, mutación, recombinación homóloga.

15 La expresión "capaz de utilizar" se refiere a la capacidad de un microorganismo de la invención para convertir un sustrato, como por ejemplo ácido ferúlico, en al menos un producto químico estructuralmente y/o estéricamente diferente.

20 Una "actividad enzimática involucrada o asociada con la conversión fermentativa del ácido ferúlico en vainillina" significa cualquier actividad catalítica o reguladora de una enzima que influye en la conversión del ácido ferúlico en vainillina y/o subproductos, como puede determinarse mediante uno cualquiera del conjunto de parámetros como se define en el presente documento a continuación.

Los diferentes parámetros de rendimiento ("Rendimiento" o YP/S; "Rendimiento-productividad específica"; o Espacio-Tiempo-Rendimiento (STY) son bien conocidos en la técnica y se determinan como describen, por ejemplo, Song y Lee, 2006.

25 "Rendimiento" e "YP/S" (cada uno expresado en masa del producto producido/masa de material consumido) se usan en el presente documento como sinónimos.

30 El rendimiento-productividad específica describe la cantidad de un producto, como vainillina, que se produce por h y l de caldo de fermentación por g de biomasa. La cantidad de peso celular húmedo expresada como WCW describe la cantidad de microorganismo biológicamente activo en una reacción bioquímica. El valor se da como g producto por g de WCW por h (es decir,  $g/gWCW^{-1} h^{-1}$ ).

La expresión "producción fermentativa" o "fermentación" se refiere a la capacidad de un microorganismo (asistido por la actividad de la enzima contenida en o generada por dicho microorganismo) para producir un compuesto químico en cultivo celular utilizando al menos una fuente de carbono agregada a la incubación.

35 Se entiende que la expresión "caldo de fermentación" significa una solución acuosa que se basa en un procedimiento de fermentación y no se ha procesado o se ha procesado, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

40 Un "huésped recombinante" puede ser cualquier célula procarionta o eucariota, que contiene un vector de clonación o un vector de expresión. Este término también pretende incluir las células procariontas o eucariotas que se han modificado por ingeniería genética para contener el gen o los genes clonados en el cromosoma o genoma de la célula huésped.

45 La expresión "microorganismo recombinante" incluye un microorganismo (por ejemplo, bacterias, levadura, un hongo, etc.) o cepa microbiana, (por ejemplo, bacterias, células de levadura, célula fúngica, etc.) que se ha alterado genéticamente, modificado o diseñado (por ejemplo, modificado por ingeniería genética) de manera que muestre un genotipo y/o fenotipo alterado, modificado o diferente (por ejemplo, cuando la modificación genética afecta a las secuencias de ácido nucleico codificantes del microorganismo) en comparación con el microorganismo natural o el microorganismo "parental" del cual derivó.

Las enzimas particulares involucradas en la base que forma la ruta de biosíntesis de la vainillina de la presente invención incluyen:

50 Feruloil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.34; codificada por *fccs*).  
 Enoil-CoA hidratasa/aldolasa (EC 4.2.1.101; codificada por *ech*).  
 Vainillina deshidrogenasa (EC 1.2.1.67; codificada por *vdh*),  
 $\beta$ -Cetotiolasa (EC 2.3.1.16 codificada por *aat*)  
 Acil-CoA-Hidrolasa (EC 3.1.2.20 codificada por PP\_3354)  
 Transportador de molibdato (codificado por *modABC*)

**B. Realizaciones particulares**

La presente invención se refiere en particular a las siguientes realizaciones:

1. Un procedimiento biocatalítico para producir vainillina a partir de ácido ferúlico, en el que

a) se cultiva una cepa bacteriana modificada por ingeniería genética del género *Pseudomonas* que tiene la capacidad de convertir el ácido ferúlico en vainillina en presencia de ácido ferúlico; y  
 b) opcionalmente, la vainillina así formada se aísla del medio de cultivo; en el que dicha cepa bacteriana modificada por ingeniería genética tiene una capacidad reducida, disminuida, para crecer en vainillina como única fuente de carbono, en el que dicha cepa modificada por ingeniería genética contiene al menos la siguiente modificación genética:

i) regulación por disminución, en particular inhibición completa o cuantitativa, de la captación de molibdato celular, que preferentemente da como resultado dicha capacidad reducida para crecer en vainillina; y

ii) regulación por disminución de la actividad de la vainillina deshidrogenasa, en particular el gen correspondiente (*vdh*), por ejemplo, mediante delección parcial o completa de la información genética correspondiente.

Preferentemente, no se observa un crecimiento en la vainillina como única fuente de carbono para una cepa modificada por ingeniería genética.

2. delecionado

3. delecionado

4. El procedimiento de la realización 1, en el que la captación celular de molibdato se regula por disminución regulando por disminución la proteína de unión al molibdato periplasmático (*modA*), por ejemplo, mediante delección parcial o completa de la información genética correspondiente.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en el que la captación celular de molibdato se regula por disminución mediante la delección del operón *modABC*.

6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que al menos una de las siguientes actividades enzimáticas y, en particular, los genes para

iii) feruloil-CoA sintetasa y  
 iv) enoil-CoA hidratasa

está regulado por aumento.

La regulación por aumento se puede lograr, por ejemplo, aumentando el número de copias de dichos genes de forma cromosómica o mediante la introducción de vectores de expresión recombinantes que contengan dicha información genética o modificando la expresión del gen, en particular mediante el uso de un promotor fuerte.

7. El procedimiento de acuerdo con la realización 6, en el que la expresión cromosómica de los genes para la feruloil-CoA sintetasa (*fcs*) y la enoil-CoA hidratasa (*ech*) está regulada por aumento.

8. El procedimiento de acuerdo con la realización 7, en el que la expresión de los genes de la feruloil-CoA sintetasa (*fcs*) y la enoil-CoA hidratasa (*ech*) está bajo el control de un elemento regulador que comprende un promotor fuerte, opcionalmente inducible, en particular el promotor *tac* fuerte, opcionalmente en combinación con *lacI* o *lacI<sup>f</sup>* en particular el promotor *tac* fuerte en combinación con el elemento *lacI<sup>f</sup>*.

9. El procedimiento de acuerdo con una de las realizaciones anteriores, en el que adicionalmente al menos una de las siguientes actividades enzimáticas, en particular, al menos uno de los genes correspondientes está regulado por disminución:

v) aldehído deshidrogenasa PP\_2680 y/o PP\_0545vi) benzaldehído deshidrogenasa PP\_1948

En particular, la regulación por disminución se puede lograr mediante la delección cromosómica parcial o completa de la información genética correspondiente.

10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que adicionalmente al menos una de las siguientes actividades enzimáticas, en particular, al menos uno de los genes correspondientes está regulado por disminución:

vii) beta-Cetotiolasa PP\_3355 (*aat*) y  
 viii) acil-CoA deshidrogenasa PP\_3354.

En particular, la regulación por disminución se puede lograr mediante la delección cromosómica parcial o completa de la información genética correspondiente.

11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la cepa microbiana que se va a modificar por ingeniería genética es una cepa de *Pseudomonas putida*.
- 5 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que dicha cepa de *Pseudomonas putida* se modifica por ingeniería genética regulando por disminución la proteína de adhesión superficial (*lapA*) en particular, regulando por disminución del gen correspondiente. En particular, la regulación por disminución se puede lograr mediante la delección parcial o completa de la información genética correspondiente.
13. El procedimiento de una de las realizaciones anteriores, que se realiza aeróbicamente y/o a una temperatura en el intervalo de 10 a 40 °C, o 20 a 30 °C y/o a un pH en el intervalo de 6 a 8 o de 6,5 a 7,5.
- 10 14. El procedimiento de una de las realizaciones anteriores, en el que la reacción se lleva a cabo a una concentración inicial de ácido ferúlico de 1 a 50 mM, en particular de 5 a 15 u 8 a 12 mM, como aproximadamente 10 mM, preferentemente en un medio acuoso.
- 15 15. El procedimiento de una de las realizaciones anteriores, en el que la reacción se realiza en células completas de dichas cepas bacterianas o en un homogeneizado de células de las mismas o en una fracción obtenida de dicho homogeneizado.
16. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que dicha cepa bacteriana se aplica en forma libre o inmovilizada.
17. El procedimiento de una de las realizaciones anteriores se realizó de forma continua o discontinua.
- 20 18. Una cepa de *Pseudomonas* modificada por ingeniería genética que contiene una modificación genética como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 12, en las que dicha regulación por disminución se logra mediante la delección de un gen o la alteración de un gen.
19. La cepa de *Pseudomonas* modificada por ingeniería genética de la realización 18, que se obtiene por ingeniería genética de *Pseudomonas putida*, en particular de *Pseudomonas putida* KT2440, en la que dicha cepa modificada por ingeniería genética está preferentemente libre de plásmidos.
- 25 20. La cepa de *Pseudomonas* modificada por ingeniería genética de la realización 19, seleccionada de GN23, GN235, GN237, GN275, GN276, GN299, GN347, GN440, GN441 y GN442; o una variante funcional o cepa mutante de la misma, que retiene la capacidad de convertir ácido ferúlico en vainillina y/o que no crece en vainillina como única fuente de carbono y/o en la que la captación de molibdato está regulada por disminución.
- 30 21. En otra realización, un sistema de bioconversión de la invención, por ejemplo con *P. putida* GN442, puede comprender resinas adsorbentes adecuadas para reducir la toxicidad del producto vainillina.

## C. Otras realizaciones de la invención

### C.1 Alteración de la regulación de otros genes

35 La producción fermentativa de vainillina con una cepa *Pseudomonas* recombinante como se describe en el presente documento puede mejorarse aún más si se combina con la alteración de la regulación de al menos un gen adicional como está involucrado en la vía catabólica del ácido ferúlico no beta oxidativa como se muestra en la Figura 1 adjunta.

### C.2 Proteínas según la invención

40 Aunque las realizaciones preferidas de la invención se basan en un enfoque que altera la regulación las actividades de enzimas o proteínas mediante la delección de secuencias de genes y/o el aumento de las tasas de expresión de enzimas particulares, la invención no se limita a las mismas.

Además, puede ser posible alcanzar mejoras similares mediante la regulación por disminución de las actividades de enzimas/proteínas mediante la realización de mutaciones adecuadas en una o más secuencias de aminoácidos identificadas en el presente documento. La regulación por aumento se puede realizar generando proteínas/enzimas mutantes con actividad mejorada.

45 Por lo tanto, la invención en este contexto también se refiere a "equivalentes funcionales" o "análogos" o "mutaciones funcionales" de las enzimas/proteínas específicamente descritas.

Por ejemplo, "equivalentes funcionales" significa enzimas, que, en una prueba utilizada para la actividad enzimática, muestran al menos un 1 a un 10 %, o al menos un 20 %, o al menos un 50 %, o al menos un 75 %, o al menos un 90 % mayor o menor actividad de una enzima, como se define en el presente documento.

50 "Equivalentes funcionales", de acuerdo con la invención, también significa en particular mutantes, que, en al menos



una posición de secuencia de las secuencias de aminoácidos indicadas anteriormente, tienen un aminoácido que es diferente de lo que se dice en concreto, pero, sin embargo, poseen una de las actividades biológicas mencionadas anteriormente. Los "equivalentes funcionales" comprenden así los mutantes obtenibles por uno o más, como 1 a 20, 1 a 15 o 5 a 10 adiciones, sustituciones, deleciones y/o inversiones de aminoácidos, donde los cambios indicados pueden producirse en cualquier posición de secuencia, siempre que conduzcan a un mutante con el perfil de propiedades de acuerdo con la invención. La equivalencia funcional también se proporciona en particular si los patrones de reactividad coinciden cualitativamente entre el mutante y el polipéptido no modificado, es decir, si, por ejemplo, los mismos sustratos se convierten a una velocidad diferente. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos adecuadas se muestran en la siguiente tabla:

Resto original	Ejemplos de sustitución
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Los "equivalentes funcionales" en el sentido anterior son también "precursores" de los polipéptidos descritos, así como "derivados funcionales" y "sales" de los polipéptidos.

Los "precursores" son en ese caso precursores naturales o sintéticos de los polipéptidos con o sin la actividad biológica deseada.

La expresión "sales" significa sales de grupos carboxilo así como sales de adición de ácido de grupos amino de las moléculas de proteína de acuerdo con la invención. Las sales de los grupos carboxilo se pueden producir de una manera conocida y comprenden sales inorgánicas, por ejemplo sales de sodio, calcio, amonio, hierro y cinc, y sales con bases orgánicas, por ejemplo aminas, tales como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina y similares. Sales de adición de ácido, por ejemplo sales con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, tales como ácido acético y ácido oxálico, también están cubiertas por la invención.

Los "derivados funcionales" de los polipéptidos de acuerdo con la invención también pueden producirse en grupos laterales de aminoácidos funcionales o en su extremo N-terminal o C-terminal usando técnicas conocidas. Tales derivados comprenden, por ejemplo, ésteres alifáticos de grupos ácido carboxílico, amidas de grupos de ácido carboxílico, obtenible por reacción con amoníaco o con una amina primaria o secundaria; derivados N-acilo de grupos amino libres, producidos por reacción con grupos acilo; o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres, producidos por reacción con grupos acilo.

Los "equivalentes funcionales" naturalmente también comprenden polipéptidos que pueden obtenerse de otros organismos, así como variantes de origen natural. Por ejemplo, se pueden establecer áreas de secuencia homóloga mediante comparación de secuencia, y se pueden determinar enzimas equivalentes según los parámetros concretos de la invención.

Los "equivalentes funcionales" también comprenden fragmentos, preferentemente dominios individuales o motivos de secuencia, de los polipéptidos según la invención, que, por ejemplo, muestran la función biológica deseada.

"Equivalentes funcionales" son, además, proteínas de fusión, que tienen una de las secuencias polipeptídicas indicadas anteriormente o equivalentes funcionales derivados de y al menos una más, secuencias heterólogas funcionalmente diferentes en asociación funcional N-terminal o C-terminal (es decir, sin deterioro funcional mutuo

sustancial de las partes de la proteína de fusión). Los ejemplos no limitantes de estas secuencias heterólogas son, por ejemplo, péptidos señal, anclajes de histidina o enzimas.

5 Los "equivalentes funcionales" que también se incluyen de acuerdo con la invención son homólogos de las proteínas desveladas concretamente. Estos poseen valores de identidad porcentuales como se ha indicado anteriormente. Dichos valores se refieren a la identidad con las secuencias de aminoácidos desveladas concretamente, y pueden calcularse de acuerdo con el algoritmo de Pearson y Lipman, (1988).

Los valores de % de identidad también se pueden calcular a partir de alineaciones de BLAST, algoritmo blastp (proteína-proteína BLAST) o aplicando el ajuste Clustal como se indica a continuación.

10 Un porcentaje de identidad de un polipéptido homólogo según la invención significa, en particular, el porcentaje de identidad de los restos de aminoácidos con respecto a la longitud total de una de las secuencias de aminoácidos descritas concretamente en el presente documento.

En el caso de una posible glucosilación de proteínas, los "equivalentes funcionales" de acuerdo con la invención comprenden proteínas del tipo designado anteriormente en forma desglucosilada o glicosilada, así como formas modificadas que pueden obtenerse alterando el patrón de glucosilación.

15 Dichos equivalentes funcionales u homólogos de las proteínas o polipéptidos de acuerdo con la invención pueden producirse por mutagénesis, por ejemplo, por mutación puntual, alargamiento o acortamiento de la proteína.

20 Dichos equivalentes funcionales u homólogos de las proteínas de acuerdo con la invención pueden identificarse seleccionando bases de datos combinatorias de mutantes, por ejemplo, acortando mutantes. Por ejemplo, se puede producir una variada base de datos de variantes de proteínas mediante mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico, por ejemplo, mediante ligadura enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos. Hay una gran cantidad de procedimientos que pueden usarse para la producción de bases de datos de posibles homólogos a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automático, y el gen sintético se puede ligar luego en un vector de expresión adecuado. El uso de un genoma degenerado permite suministrar todas las secuencias en una mezcla, que codifican para el conjunto deseado de secuencias de proteínas potenciales. Los procedimientos de síntesis de oligonucleótidos degenerados son conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, Narang, S.A. (1983); Itakura y col., (1984) (a) ; Itakura y col., (1984) (b); Ike y col., (1983)).

30 En la técnica anterior, se conocen varias técnicas para la detección de productos genéticos de bases de datos combinatorias, que se produjeron mediante mutaciones puntuales o acortamiento, y para la selección de bibliotecas de ADNc para productos génicos con una propiedad seleccionada. Estas técnicas se pueden adaptar para la selección rápida de los bancos de genes que se produjeron mediante mutagénesis combinatoria de homólogos de acuerdo con la invención. Las técnicas más utilizadas para el cribado de grandes bancos de genes, que se basan en un análisis de alto rendimiento, comprenden la clonación del banco de genes en vectores de expresión que pueden replicarse, la transformación de las células adecuadas con la base de datos de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Mutagénesis Recursiva De Conjunto (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bases de datos, se puede utilizar en combinación con las pruebas de detección, para identificar homólogos (Arkin y Yourvan (1992); Delgrave y col., (1993)).

### C.3 Codificación de secuencias de ácido nucleico

40 La invención también se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas/proteínas como se definen en el presente documento y que pueden aplicarse para realizar las manipulaciones de ingeniería genética requeridas.

La presente invención también se refiere a ácidos nucleicos con un cierto grado de "identidad" con las secuencias específicamente desveladas en el presente documento. "Identidad" entre dos ácidos nucleicos significa la identidad de los nucleótidos, en cada caso en toda la longitud del ácido nucleico.

45 Por ejemplo, la identidad puede calcularse mediante el programa Vector NTI Suite 7.1 de la empresa Informax (EE.UU.) usando el procedimiento Clustal (Higgins DG, Sharp PM. ((1989))) con los siguientes ajustes:

#### Parámetro de alineación múltiple:

penalización por abertura de huecos	10
penalización de extensión de hueco	10
Rango de penalización por separación de huecos	8
Pena de separación de huecos	apagado
% de identidad por retraso de alineación	40
Huevos específicos de restos	apagado
Hueco de restos hidrofílicos	apagado
Ponderación de la transición	0

(continuación)

Parámetro de alineación por pares:

Algoritmo FAST	on
Tamaño de la tupla K	1
Penalización por huecos	3
Tamaño de ventana	5
Número de mejores diagonales	5

Como alternativa, la identidad puede determinarse de acuerdo con Chenna, y col., (2003), la página web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html#> y las siguientes configuraciones

Penalización por abertura de huecos en ADN	15,0
Pena de extensión de huecos de ADN	6,66
Matriz de ADN	Identidad
Penalización por abertura de huecos en proteínas	10,0
Penalización por extensión de huecos en proteínas	0,2
Matriz proteica	Gonnet
FIN DE HUECO Proteínas/ADN	-1
DISTANCIA DE HUECOS Proteína/ADN	4

5

Todas las secuencias de ácido nucleico mencionadas en el presente documento (secuencias de ADN y ARN de cadena simple y cadena doble, por ejemplo, ADNc y ARNm) pueden producirse de forma conocida por síntesis química a partir de los bloques de construcción de nucleótidos, por ejemplo, por condensación de fragmentos de superposición individual, bloques componentes de ácido nucleico complementarios de la doble hélice. La síntesis química de oligonucleótidos puede, por ejemplo, realizarse de una manera conocida, por el procedimiento de la fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press, Nueva York, páginas 896-897). La acumulación de oligonucleótidos sintéticos y el llenado de huecos por medio del fragmento Klenow de ADN polimerasa y las reacciones de ligado, así como las técnicas generales de clonación, se describen en Sambrook y col., (1989), véase a continuación.

10

15

La invención también se refiere a secuencias de ácido nucleico (secuencias de ADN y ARN monocatenarias y bicatenarias, por ejemplo, ADNc y ARNm), que codifican una de las proteínas/enzimas anteriores y sus equivalentes funcionales, que se puede obtener, por ejemplo, usando análogos de nucleótidos artificiales.

20

La invención se refiere tanto a moléculas de ácido nucleico aisladas, que codifican para polipéptidos o proteínas de acuerdo con la invención o segmentos biológicamente activos de los mismos, y para fragmentos de ácido nucleico, que pueden usarse, por ejemplo, como sondas de hibridación o cebadores para identificar o amplificar ácidos nucleicos codificantes de acuerdo con la invención.

Las moléculas de ácido nucleico según la invención pueden además contener secuencias no traducidas en los extremos 3' y/o 5' de la región genética codificante.

La invención se refiere además a las moléculas de ácido nucleico que son complementarias a las secuencias de nucleótidos descritas concretamente o un segmento de las mismas.

25

Las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención hacen posible la producción de sondas y cebadores que pueden usarse para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas en otros tipos celulares y organismos. Dichas sondas o cebadores generalmente comprenden una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones "rigurosas" (véase a continuación) en al menos aproximadamente 12, preferentemente al menos aproximadamente 25, por ejemplo, aproximadamente 40, 50 o 75 nucleótidos sucesivos de una cadena sentido de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención o de una cadena antisentido correspondiente.

30

Una molécula de ácido nucleico "aislada" se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y, además, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo, si se está produciendo mediante técnicas recombinantes, o puede estar libre de precursores químicos u otros productos químicos, si se está sintetizando químicamente.

35

Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención se puede aislar por medio de técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencia suministrada de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el ADNc puede aislarse de una biblioteca de ADNc adecuada, utilizando una de las secuencias completas descritas concretamente o un segmento de las mismas como sonda de hibridación y técnicas de hibridación estándar (como se describe, por ejemplo, en Sambrook, (1989)). Además, una molécula de ácido nucleico que comprende una de las secuencias descritas o un segmento de las mismas, puede aislarse mediante reacción en cadena de la

40

polimerasa, utilizando los cebadores oligonucleotídicos que se construyeron sobre la base de esta secuencia. El ácido nucleico amplificado de esta manera puede clonarse en un vector adecuado y puede caracterizarse por secuenciación de ADN. Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención también pueden producirse mediante procedimientos estándar de síntesis, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automático.

5 Las secuencias de ácido nucleico según la invención o derivados de la misma, homólogos o partes de estas secuencias, se pueden aislar, por ejemplo, mediante técnicas de hibridación habituales o la técnica de PCR de otras bacterias, por ejemplo, a través de bibliotecas genómicas o de ADNc. Estas secuencias de ADN se hibridan en condiciones estándar con las secuencias de acuerdo con la invención.

10 "Hibridar" significa la capacidad de un polinucleótido u oligonucleótido para unirse a una secuencia casi complementaria en condiciones estándar, mientras que la unión no específica no se produce entre socios no complementarios en estas condiciones. Para ello, las secuencias pueden ser complementarias al 90-100 %. La propiedad de las secuencias complementarias de poder unirse específicamente entre sí se utiliza, por ejemplo, en transferencia de tipo Northern o transferencia de tipo Southern, o en la unión del cebador en PCR o RT-PCR.

15 Los oligonucleótidos cortos de las regiones conservadas se usan ventajosamente para la hibridación. Sin embargo, también es posible usar fragmentos más largos de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención o las secuencias completas para la hibridación. Estas condiciones estándar varían según el ácido nucleico utilizado (oligonucleótido, fragmento más largo o secuencia completa) o según el tipo de ácido nucleico (ADN o ARN) que se utiliza para la hibridación. Por ejemplo, las temperaturas de fusión para ADN:híbridos de ADN son aproximadamente 10 °C más  
20 bajos que los de las de ADN:híbridos de ARN de la misma longitud.

Por ejemplo, dependiendo del ácido nucleico particular, las condiciones estándar promedian temperaturas entre 42 y 58 °C en una solución tampón acuosa con una concentración entre 0,1 a 5 x SSC (1 X SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 15 mM, pH 7,2) o adicionalmente en presencia 50 % de e formamida, por ejemplo 42 °C en 5 x SSC, 50 %  
25 de formamida. Ventajosamente, las condiciones de hibridación para ADN:híbridos de ADN son 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 20 °C y 45 °C, preferentemente entre aproximadamente 30°C y 45°C. Para ADN:híbridos de ARN, las condiciones de hibridación son ventajosamente 0,1 x SSC y temperaturas entre aproximadamente 30 °C y 55 °C, preferentemente entre aproximadamente 45 °C y 55 °C. Estas temperaturas indicadas para la hibridación son ejemplos de valores de temperatura de fusión calculados para un ácido nucleico con una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y un contenido de G + C del 50 % en ausencia de formamida.  
30 Las condiciones experimentales para la hibridación de ADN se describen en los libros de texto de genética relevantes, por ejemplo Sambrook y col., 1989, y pueden calcularse utilizando fórmulas conocidas por un experto en la materia, por ejemplo, dependiendo de la longitud de los ácidos nucleicos, el tipo de híbridos o el contenido de G + C. Un experto en la materia puede obtener más información sobre la hibridación de los siguientes libros de texto: Ausubel y col., (eds), (1985), Brown (ed) (1991).

35 La "hibridación" se puede realizar, en particular, en condiciones rigurosas. Dichas condiciones de hibridación se describen, por ejemplo, en Sambrook (1989) o en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

Las condiciones de hibridación "rigurosas" significan en particular: incubación a 42 °C durante la noche en una  
40 solución que consiste en 50 % de formamida, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato de tri-sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x Solución Denhardt, 10 % de sulfato de dextrano y 20 g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado cortado, seguido por el lavado de los filtros con 0,1 x SSC a 65 °C.

La invención también se refiere a derivados de las secuencias de ácido nucleico desveladas concretamente o derivables.

45 Por tanto, otras secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención pueden derivarse de las secuencias específicamente desveladas en el presente documento y pueden diferir de ella por adición, sustitución, inserción o delección de nucleótidos individuales o varios, y además codifica los polipéptidos con el perfil de propiedades deseado.

La invención también abarca secuencias de ácido nucleico que comprenden las llamadas mutaciones silenciosas o que se han alterado, en comparación con una secuencia concreta, de acuerdo con el uso del codón de un organismo  
50 original o huésped especial, así como variantes de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas, de los mismos.

También se refiere a secuencias que pueden obtenerse mediante sustituciones de nucleótidos conservadoras (es decir, el aminoácido en cuestión se reemplaza por un aminoácido de la misma carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

55 La invención también se refiere a las moléculas derivadas de los ácidos nucleicos desvelados concretamente mediante polimorfismos de secuencia. Estos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población debido a la variación natural. Estas variaciones naturales generalmente producen una variación de 1 a 5 %

en la secuencia de nucleótidos de un gen.

Los derivados de secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención significan, por ejemplo, variantes alélicas, que tienen al menos un 60 % de homología a nivel del aminoácido derivado, preferentemente al menos un 80 % de homología, de manera bastante especialmente preferible al menos un 90 % de homología en todo el intervalo de secuencia (con respecto a la homología a nivel de aminoácidos, se debe hacer referencia a los detalles dados anteriormente para los polipéptidos). Ventajosamente, las homologías pueden ser superiores a las regiones parciales de las secuencias.

Adicionalmente, los derivados también deben entenderse como homólogos de las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención, por ejemplo homólogo de animales, plantas, fúngicos o bacterianos, secuencias acortadas, ADN o ARN monocatenario de la secuencia de ADN codificante y no codificante. Por ejemplo, los homólogos tienen, a nivel de ADN, una homología de al menos el 40 %, preferentemente de al menos el 60 %, especialmente preferentemente de al menos el 70 %, muy especialmente preferentemente de al menos el 80 % sobre la región de ADN completa dada en una secuencia específicamente descrita en el presente documento.

Además, Los derivados deben entenderse como, por ejemplo, fusiones con promotores. Los promotores que se agregan a las secuencias de nucleótidos indicadas pueden modificarse por al menos un intercambio de nucleótidos, al menos una inserción, inversión y/o deleción, aunque sin perjudicar la funcionalidad o eficacia de los promotores. Además, la eficacia de los promotores puede aumentarse alterando su secuencia o puede intercambiarse completamente con promotores más efectivos, incluso de organismos de un género diferente.

#### C.4 Construcciones según la invención

La invención también se refiere a construcciones como construcciones de expresión, que contienen, bajo el control genético de secuencias reguladoras de ácidos nucleicos, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido o proteína de fusión aplicable en la invención; así como vectores que comprenden al menos una de estas construcciones.

"Unidad de expresión" significa, de acuerdo con la invención, un ácido nucleico con actividad de expresión, que comprende un promotor como se define en el presente documento y, después de la asociación funcional con un ácido nucleico que se va a expresar o un gen, regula la expresión, es decir, la transcripción y la traducción de este ácido nucleico o de este gen. En este contexto, por lo tanto, también se llama "secuencia reguladora de ácido nucleico". Además del promotor, otros elementos reguladores pueden estar presentes, por ejemplo, potenciadores.

"Casete de expresión" o "construcción de expresión" significa, de acuerdo con la invención, una unidad de expresión, que está asociada funcionalmente con el ácido nucleico que se va a expresar o el gen que se va a expresar. En contraste con una unidad de expresión, un casete de expresión comprende así no solo secuencias de ácido nucleico que regulan la transcripción y la traducción, sino también las secuencias de ácido nucleico que deben expresarse como proteínas como resultado de la transcripción y traducción.

Los términos "expresión" o "sobreexpresión" describen, en el contexto de la invención, la producción o aumento de la actividad intracelular de una o más enzimas en un microorganismo, que están codificadas por el ADN correspondiente. Para ello, es posible, por ejemplo, insertar un gen en un organismo, reemplazar un gen existente por otro gen, aumentar el número de copias del gen o genes, usar un promotor fuerte o usar un gen que codifique una enzima correspondiente con una actividad alta, y opcionalmente estas medidas se pueden combinar.

Preferentemente, tales construcciones de acuerdo con la invención comprenden un promotor 5' corriente arriba de la secuencia de codificación respectiva, y una secuencia de terminación 3' corriente abajo, y opcionalmente otros elementos reguladores habituales, en cada caso funcionalmente asociado con la secuencia de codificación.

Un "promotor", un "ácido nucleico con actividad promotora" o una "secuencia promotora" significa, de acuerdo con la invención, un ácido nucleico que, asociado funcionalmente con un ácido nucleico que se va a transcribir, regula la transcripción de este ácido nucleico.

Asociación "funcional" o "operativa" significa, en este contexto, por ejemplo, la disposición secuencial de uno de los ácidos nucleicos con actividad promotora y de una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y opcionalmente otros elementos reguladores, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que permiten la transcripción de ácidos nucleicos y, por ejemplo, un terminador, de tal manera que cada uno de los elementos reguladores pueda cumplir su función en la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. Esto no requiere necesariamente una asociación directa en el sentido químico. Las secuencias de control genético, tales como secuencias potenciadoras, también pueden ejercer su función en la secuencia objetivo desde posiciones más remotas o incluso desde otras moléculas de ADN. Se prefieren las disposiciones en las que la secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir se coloca detrás (es decir, en el extremo 3') de la secuencia promotora, de modo que las dos secuencias están unidas covalentemente entre sí. La distancia entre la secuencia del promotor y la secuencia de ácido nucleico que debe expresarse de forma transgénica puede ser menor que 200 pb (pares de bases), o menor que 100 pb o menor que 50 pb.

Aparte de promotores y terminadores, ejemplos de otros elementos reguladores que se pueden mencionar son secuencias de direccionamiento, potenciadores, señales de poliadenilación, marcadores seleccionables, señales de amplificación, orígenes de replicación y similares. Las secuencias reguladoras adecuadas se describen, por ejemplo, en Goeddel (1990).

5 Las construcciones de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprenden en particular secuencias seleccionadas de aquellas, específicamente mencionadas en el presente documento o derivados y homólogos de las mismas, así como las secuencias de ácido nucleico que pueden derivarse de secuencias de aminoácidos mencionadas específicamente en el presente documento que están asociadas ventajosamente operativa o funcionalmente con una o más señales de regulación para controlar, por ejemplo, aumentar, la expresión génica.

10 Además de estas secuencias reguladoras, la regulación natural de estas secuencias todavía puede estar presente frente a los genes estructurales reales y, opcionalmente, puede haber sido alterada por ingeniería genética, de modo que se desactiva la regulación natural y se aumenta la expresión de los genes. La construcción de ácido nucleico también puede ser de un diseño más simple, es decir, sin que se inserten señales reguladoras adicionales delante de la secuencia de codificación y sin eliminar el promotor natural con su regulación. En cambio, la secuencia reguladora natural se silencia, de modo que la regulación ya no tiene lugar y aumenta la expresión génica.

15 Una construcción de ácido nucleico preferida también contiene ventajosamente una o más de las secuencias potenciadoras mencionadas anteriormente, funcionalmente asociadas con el promotor, lo que permite una mayor expresión de la secuencia de ácido nucleico. Secuencias adicionales ventajosas, tales como otros elementos reguladores o terminadores, también se pueden insertar en el extremo 3' de las secuencias de ADN. Una o más copias de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden estar contenidas en la construcción. La construcción también puede contener otros marcadores, tales como resistencias antibióticas o genes complementarios de auxotrofia, opcionalmente para selección en la construcción.

20 Ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas están contenidas en promotores tales como *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacIq-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *rhaP* (*rhaPBAD*)*SP6-*, *lambda-PR-* o en el promotor *lambda-PL*, que encuentran aplicación ventajosamente en bacterias gramnegativas. Otras secuencias reguladoras ventajosas están contenidas, por ejemplo, en los promotores de grampositivas *ace*, *amy* y *SPO2*, en los promotores de levadura o hongos *ADC1*, *MFalpha*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH*. Los promotores artificiales también pueden usarse para la regulación.

25 Para la expresión, la construcción de ácido nucleico se inserta en un organismo huésped ventajosamente en un vector, por ejemplo un plásmido o un fago, que permite la expresión óptima de los genes en el huésped. Además de los plásmidos y fagos, los vectores también deben entenderse en el sentido de todos los demás vectores conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, virus, tales como *SV40*, *CMV*, *baculovirus* y *adenovirus*, transposones, elementos *IS*, fásmidos, cósmidos, y ADN lineal o circular. Estos vectores pueden replicarse de forma autónoma en el organismo huésped o pueden replicarse cromosómicamente. Estos vectores representan una realización adicional de la invención.

30 Los plásmidos adecuados son, por ejemplo en *E. coli*, *pLG338*, *pACYC184*, *pBR322*, *pUC18*, *pUC19*, *pKC30*, *pRep4*, *pHS1*, *pKK223-3*, *pDHE19.2*, *pHS2*, *pPlc236*, *pMBL24*, *pLG200*, *pUR290*, *PIN-III113-B1*, *lgt11* o *pBdCl*; en los actinomicetos nocardioformes *pJAM2*; en *Streptomyces* *pIJ101*, *pIJ364*, *pIJ702* o *pIJ361*; en bacilos *pUB110*, *pC194* o *pBD214*; en *Corynebacterium* *pSA77* o *pAJ667*; en hongos *pALS1*, *pIL2* o *pBB116*; en levaduras *2alphaM*, *PAG-1*, *YEp6*, *YEp13* o *pEMBLye23* o en plantas *pLGV23*, *pGHlac+*, *pBIN19*, *pAK2004* o *pDH51*. Los plásmidos mencionados representan una pequeña selección de los plásmidos posibles. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se encontrarán, por ejemplo, en el libro *Cloning Vectors* (Eds. Pouwels P.H. y col.,) 1985.

35 En una realización adicional del vector, el vector que contiene la construcción de ácido nucleico según la invención o el ácido nucleico según la invención puede insertarse ventajosamente en forma de un ADN lineal en los microorganismos e integrarse en el genoma del organismo huésped mediante recombinación heteróloga u homóloga. Este ADN lineal puede comprender un vector linealizado tal como plásmido o solo la construcción de ácido nucleico o el ácido nucleico de acuerdo con la invención.

40 Para la expresión óptima de genes heterólogos en organismos, es ventajoso alterar las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con el uso del codón específico empleado en el organismo. El uso de codones se puede determinar fácilmente sobre la base de evaluaciones computarizadas de otros, genes conocidos del organismo en cuestión.

45 La producción de un casete de expresión según la invención se basa en la fusión de un promotor adecuado con una secuencia de nucleótidos codificante adecuada y una señal de terminación o una señal de poliadenilación. Para ello se utilizan técnicas comunes de recombinación y clonación, como se describe, por ejemplo, en J. Sambrook (1989), así como en T.J. Silhavy, y col., (1984) y en Ausubel, F.M. y col., (1987).

50 La construcción de ácido nucleico recombinante o construcción de gen se inserta ventajosamente en un vector específico del huésped para la expresión en un organismo huésped adecuado, para permitir la expresión óptima de los genes en el huésped. Los vectores son bien conocidos por los expertos en la técnica y se encontrarán, por

ejemplo, en "Cloning Vectors" Pouwels P.H. y col., (1985).

### C.5 Huéspedes que pueden usarse según la invención

Dependiendo del contexto, el término "microorganismo" significa el microorganismo de partida (tipo salvaje) o un microorganismo modificado por ingeniería genética de acuerdo con la invención, o ambos.

- 5 Las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden modificarse exclusivamente en el nivel cromosómico, pueden contener vectores, como, por ejemplo, plásmidos que llevan la información genética requerida o pueden ser modificados por una combinación de ambos.

Se utilizan procedimientos comunes de clonación y transfección que son familiares para un experto en la materia, por ejemplo coprecipitación, fusión de protoplastos, electroporación, transfección retroviral y similares, con el fin de asegurar la expresión de un ácido nucleico en el sistema de expresión respectivo. Los sistemas adecuados se describen, por ejemplo, en F. Ausubel y col., (1997), o Sambrook y col., (1989).

Los microorganismos parentales son típicamente aquellos que tienen la capacidad de producir vainillina, a partir del ácido ferúlico. Típicamente estas son bacterias del género *Pseudomonas*.

- 15 Ejemplos no limitantes de cepas adecuadas del género *Pseudomonas*, son aquellos, que llevan los genes *ech* y *fcc* identificados anteriormente, como:

*P. putida* KT2440 ATCC 47054 *Pseudomonas* sp. cepa HR199, y  
*P. fluorescens* BF13.

ATCC designa la Colección Americana de Cultivos Tipo, FERM BP designa la colección del Instituto Nacional de Biociencias y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, Japón.

### 20 C.6 Producción fermentativa de vainillina

La invención también se refiere a procedimientos para la producción fermentativa de vainillina.

- Una fermentación como se usa de acuerdo con la presente invención puede, por ejemplo, realizarse en fermentadores agitados, columnas de burbujas y reactores de bucle. Se puede encontrar una descripción general de los posibles tipos de procedimientos, incluidos los tipos de agitadores y diseños geométricos, en "Chmiel: Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik, Band 1 ". En el procedimiento de la invención, las variantes típicas disponibles son las siguientes variantes conocidas por los expertos en la técnica o explicadas, por ejemplo, en "Chmiel, Hammes y Bailey: Biochemical Engineering", tal como fermentación discontinua, semicontinua, semicontinua repetida o continua con y sin reciclaje de la biomasa. Dependiendo de la cepa de producción, rociando con aire, oxígeno, dióxido de carbono, hidrógeno, se pueden efectuar mezclas de nitrógeno o gases apropiados para lograr un buen rendimiento (YP/S).

El medio de cultivo que se va a utilizar debe satisfacer los requisitos de las cepas particulares de manera adecuada. Las descripciones de los medios de cultivo para diversos microorganismos se encuentran en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D. C., EE.UU., 1981).

- 35 Estos medios que pueden usarse de acuerdo con la invención pueden comprender una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o oligoelementos.

- Las fuentes preferidas de carbono son azúcares, tales como mono-, di- o polisacáridos. Muy buenas fuentes de carbono son, por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. Los azúcares también se pueden agregar a los medios a través de compuestos complejos, tales como melaza, u otros subproductos de la refinación de azúcar. También puede ser ventajoso agregar mezclas de varias fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas, tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos como el ácido palmítico, ácido esteárico o ácido linoleico, alcoholes tales como glicerol, metanol o etanol y ácidos orgánicos tales como ácido acético o ácido láctico.

- 45 Las fuentes de nitrógeno suelen ser compuestos orgánicos o inorgánicos de nitrógeno o materiales que contienen estos compuestos. Ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen gas amoníaco o sales de amonio, tal como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato amónico, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes complejas de nitrógeno, tal como licor de maíz, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar por separado o como una mezcla.

- 50 Los compuestos de sales inorgánicas que pueden estar presentes en los medios comprenden el cloruro, sales de fosfato o sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, cinc, cobre y hierro.

Compuestos inorgánicos que contienen azufre, por ejemplo sulfatos, sulfitos, di-tionitos, tetracionatos, tiosulfatos, sulfuros, pero también compuestos orgánicos de azufre, tales como mercaptanos y tioles, pueden usarse como

fuentes de azufre.

Ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o el hidrogenofosfato dipotásico o las sales correspondientes que contienen sodio se pueden usar como fuentes de fósforo.

5 Se pueden añadir agentes quelantes al medio, para mantener los iones metálicos en solución. Los agentes quelantes especialmente adecuados comprenden dihidroxifenoles, tales como catecol o protocatechuato, o ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico.

10 Los medios de fermentación utilizados de acuerdo con la invención también pueden contener otros factores de crecimiento, tales como vitaminas o promotores de crecimiento, que incluyen, por ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales a menudo provienen de componentes complejos de los medios, tal como extracto de levadura, melazas, licor de maíz y similares. Además, se pueden añadir precursores adecuados al medio de cultivo. La composición precisa de los compuestos en el medio depende en gran medida del experimento particular y debe decidirse individualmente para cada caso específico. La información sobre la optimización de los medios se puede encontrar en el libro de texto "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (1997) Los medios de cultivo también pueden obtenerse de proveedores comerciales, tal como el estándar 1 (Merck) o BHI (infusión de corazón-cerebro, DIFCO), etc.

15 Todos los componentes del medio son esterilizados, por calentamiento (20 min a 1,5 bares y 121 °C) o por filtración estéril. Los componentes pueden esterilizarse juntos o, si es necesario, por separado. Todos los componentes del medio pueden estar presentes al comienzo del crecimiento, u opcionalmente pueden agregarse de forma continua o mediante alimentación por lotes.

20 La temperatura del cultivo es normalmente entre 15 °C y 45 °C, preferentemente de 25 °C a 40 °C y se puede mantener constante o se puede variar durante el experimento. El valor de pH del medio debe estar en el intervalo de 5 a 8,5, preferentemente aproximadamente 7,0. El valor de pH para el crecimiento se puede controlar durante el crecimiento mediante la adición de compuestos básicos como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o agua amoniacal o compuestos ácidos como el ácido fosfórico o el ácido sulfúrico. Los agentes antiespumantes, por ejemplo, ésteres de poliglicol de ácidos grasos, pueden usarse para controlar la formación de espuma. Para mantener la estabilidad de los plásmidos, sustancias adecuadas con acción selectiva, por ejemplo, antibióticos, se pueden añadir al medio. Oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, por ejemplo, el aire ambiente, se introducen en el cultivo para mantener las condiciones aeróbicas. La temperatura del cultivo es normalmente de 20 °C a 45 °C. El cultivo continúa hasta que se ha formado un máximo del producto deseado. Esto normalmente se logra dentro de 1 hora a 160 horas.

Las células pueden interrumpirse opcionalmente por ultrasonidos de alta frecuencia, por alta presión, por ejemplo, en una celda de presión francesa, por osmolisis, por la acción de los detergentes, enzimas líticas o disolventes orgánicos, por medio de homogeneizadores o por una combinación de varios de los procedimientos enumerados.

35 La composición particular puede adaptarse al tipo de microorganismo aplicado. En la fermentación, las composiciones de medios útiles para fermentaciones basadas en cepas de *Pseudomonas* son conocidas en la técnica. Por ejemplo, el medio LB es un medio típico aplicable a tales cepas.

### 3.6 Aislamiento de vainillina

40 La metodología de la presente invención puede incluir además una etapa de recuperación de vainillina. El término "recuperar" incluye la extracción, cosecha, aislamiento o purificación del compuesto de los medios de cultivo. La recuperación del compuesto se puede realizar de acuerdo con cualquier metodología convencional de aislamiento o purificación conocida en la técnica, lo que incluye, aunque no de forma limitativa, tratamiento con una resina convencional (por ejemplo, resina de intercambio catiónico o aniónico, resina de adsorción no iónica, etc.), tratamiento con un adsorbente convencional (por ejemplo, carbón activado, ácido silícico, gel de sílice, celulosa, alúmina, etc.), alteración del pH, extracción en disolvente (por ejemplo, con un disolvente convencional como un alcohol, acetato de etilo, hexano y similares), destilación, diálisis, filtración, concentración, cristalización, recristalización, ajuste de pH, liofilización y similares.

50 Antes del aislamiento previsto, se puede eliminar la biomasa del caldo. Los procedimientos para eliminar la biomasa son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, filtración, sedimentación y flotación. En consecuencia, la biomasa puede eliminarse, por ejemplo, con centrifugadoras, separadores, decantadores, filtros o en aparatos de flotación. Para la máxima recuperación del producto de valor, el lavado de la biomasa es a menudo recomendable, por ejemplo en forma de diafiltración. La selección del procedimiento depende del contenido de biomasa en el caldo del fermentador y de las propiedades de la biomasa, y también de la interacción de la biomasa con el producto de valor.

55 En una realización, el caldo de fermentación puede esterilizarse o pasteurizarse. En una realización adicional, el caldo de fermentación se concentra. Dependiendo del requerimiento, esta concentración se puede hacer por lotes o continuamente. El intervalo de presión y temperatura debe seleccionarse de modo que, en primer lugar, no se produzcan daños al producto y, en segundo lugar, se requiera un uso mínimo del aparato y la energía. La selección



hábil de los niveles de presión y temperatura para una evaporación de múltiples etapas en particular permite el ahorro de energía.

Los siguientes ejemplos solo sirven para ilustrar la invención. Las numerosas variaciones posibles que se harán evidentes de inmediato para una persona experta en la técnica después de considerar la divulgación proporcionada en el presente documento también entran dentro del alcance de la invención.

## Parte experimental

### A) Materiales y procedimientos

#### Plásmidos, cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas y plásmidos bacterianos utilizados en la presente invención se muestran en la Tabla 1. Las cepas de *P. putida* se cultivaron a 30 °C y *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron y col., 1985) a 37 °C en medio LB (Bertani, 1951). Para la selección de plásmidos, se agregaron 50 µg ml<sup>-1</sup> de kanamicina (Kan). Durante el procedimiento de eliminación y para las pruebas de tolerancia, se utilizó medio mínimo M9 para el crecimiento de las cepas de *P. putida* (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 48 mM x7 H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM, NaCl 8,6 mM, NH<sub>4</sub>Cl 18,7 mM), suplementado con 0,2 % de glucosa, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, clorhidrato de tiamina 6 µM y 20 µg ml<sup>-1</sup> de 5-fluorouracilo (5-FU; preparado como una solución madre de 100 mg ml<sup>-1</sup> en dimetilsulfóxido [DMSO]).

**Tabla 1** Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en la presente invención

Cepa o plásmido	Genotipo o características relevantes	Referencia o fuente
Cepas		
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi, Δ (lac-proAB), F'[traD36 proAB+ lac<sup>R</sup> lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron y col., (1985)
S17.1	<i>recA pro hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	(Simon y col., (1983))
<i>P. putida</i>		
KT2440	de tipo salvaje	ATCC 47054
ΔUPP4	<i>Δupp</i>	Graf y Altenbuchner (2011)
GN23	<i>Δupp ΔPP_0166-0168</i>	La presente invención
GN235	<i>Δupp ΔPP_0166-0168 Δvdh</i>	La presente invención
GN275	<i>Δupp ΔPP_0166-0168 Δvdh modA::mini-Tn5495</i>	La presente invención
GN276	<i>Δupp ΔPP_0166-0168 Δvdh ΔPP_3827-3832</i>	La presente invención
GN299	<i>Δupp ΔPP_0166-0168 Δvdh ΔPP_3827-3832 lac<sup>R</sup>-P<sub>tac</sub>-ech-fcs</i>	La presente invención
GN347	<i>Δupp 0166-0168 Δvdh ΔPP_3827-3832 ΔPP_3354 ΔPP_3355 lac<sup>R</sup>-P<sub>tac</sub>-ech-fcs</i>	La presente invención
GN440	<i>Δupp ΔPP_0166-0168 Δvdh ΔPP_3827-3832 ΔPP_2680 lac<sup>R</sup>-P<sub>tac</sub>-ech-fcs</i>	La presente invención
GN441	<i>Δupp ΔPP_0166-0168 Δvdh ΔPP_3827-3832 ΔPP_2680 ΔPP_0545 lac<sup>R</sup>-P<sub>tac</sub>-ech-fcs</i>	La presente invención
GN442	<i>Δupp ΔPP_0166-0168 Δvdh ΔPP_3827-3832 ΔPP_2680 ΔPP_0545 ΔPP_1948 lac<sup>R</sup>-P<sub>tac</sub>-ech-fcs</i>	La presente invención
Plásmidos		
pCro2a	Vector de liberación mini-Tn5495	Onaca y col., (2007)
pJOE5304.1	vector de expresión con <i>lac<sup>R</sup>-P<sub>tac</sub>-eGFP</i>	material de laboratorio
pJOE6261.2	pIC20HE (Altenbuchner y col., 1992) estructura con un gen de resistencia a kanamicina y una copia de <i>upp</i> de <i>P. putida</i> KT2440	Graf y Altenbuchner (2011)
pNG53.1	pJOE6261.2 con la región aguas arriba de PP_0166 y la región aguas abajo de PP_0168 clonadas en el sitio BamHI	La presente invención
pNG173.1	pJOE6261.2 con las regiones aguas arriba y aguas abajo de <i>vdh</i> clonadas en el sitio BamHI	La presente invención
pNG260.4	pJOE6261.2 con la región aguas arriba de PP_3827 y la región aguas abajo de PP_3832 clonadas en el sitio BamHI	La presente invención

(continuación)

Cepa o plásmido	Genotipo o características relevantes	Referencia o fuente
pNG276.1	pJOE6261.2 con las regiones aguas arriba y aguas abajo de PP_2680 clonadas en el sitio de Sail	La presente invención
pNG281.1	derivado de pJOE5304.1 con <i>lacI<sup>q</sup>-P<sub>tac</sub>-ech</i>	La presente invención
pNG283.5	pJOE6261.2 con 900 pb de <i>ech</i> , <i>P<sub>tac</sub></i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> y la región aguas abajo de cada <i>ech</i> clonado en el sitio BamHI	La presente invención
pNG338.1	pJOE6261.2 con las regiones aguas arriba y aguas abajo de PP_0545 clonadas en el sitio BamHI	La presente invención
pNG340.2	pJOE6261.2 con la región aguas arriba de PP_3354 y la región aguas abajo de aat clonadas en el sitio BamHI	La presente invención
pNG412.1	pJOE6261.2 con las regiones aguas arriba y aguas abajo de PP_1948 clonadas en el sitio BamHI	La presente invención

### Productos químicos y otros materiales

5 Los productos químicos utilizados en la presente invención fueron de calidad analítica y se compraron a Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Alemania), Sigma-Aldrich Corporation (Taufkirchen, Alemania) y Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). En particular, 5-FU, ácido ferúlico, vainillina, ácido vainillílico y alcohol vainillílico se adquirieron de Sigma-Aldrich. Los oligonucleótidos de ADN sintéticos (Tabla 2a) se adquirieron de Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Alemania). Las enzimas de restricción y las enzimas modificadoras de ADN se adquirieron de Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Alemania), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Alemania) y Fermentas GmbH (parte de Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Alemania). Las PCR se realizaron con la mezcla de enzimas PCR de alta fidelidad de Fermentas GmbH en un termociclador TPersonal de Biometra GmbH (Goettingen, Alemania).

**Tabla 2a** Cebadores oligonucleotídicos utilizados en la presente invención

Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia (5' → 3') <sup>a</sup>
s6007	1	AAAAAAGGATCCTAAAGCAATGGCGAAACCC
s6008	2	AAAAAAAAGCTTACCCAGTACGCCAACAGCCT
s6009	3	AAAAAAAAGCTTGACAGTGCCGGCAAGCCA
s6010	4	AAAAAAGGATCCGTGGTCTGTCAGCTGTCCTT
s6534	5	AAAAAAGGATCCTAAAGCACGATGCCGAGG
s6535	6	AAAAAGAATTCTAGACCTCCGGCAAGA T G A
s6536	7	AAAAAGAATTCCATGCTCATTCTCTTGTG
s6537	8	AAAAAAGGATCCTTATGCGATTCCGGCTAGAGA
s6882	9	AAAAAAGGATCCCCCGCCTTGTGCATATCC
s6883	10	AAAAAACCATGGCATGCGATTCTCCTTGCGT
s6884	11	AAAAAACCATGGTGAGCGTCACCCGAGGG
s6885	12	AAAAAAGGATCCGGTCAGTCAGCCTGTTGAT
s6927	13	AAAAAAGTCCAGACAAGGACGGCGGCAAGG
s6928	14	AAAAAATGTACACATGCTGAGCCTCTGCGG
s6930	15	AAAAAAGTCCAGAGTAGTCGATACCCTGGGC
s6936	16	AAAAAAGGATCCCTCTTGTGTGCTT AT AGAGA
s6937	17	AAAAACATATGAGCAAATACGAAGGCCG
s6938	18	AAAAAGAATTCGGTTCTGCACTCTTGTGTT
s6939	19	AAAAAAGGATCCTGGCCATTATCTGGCTCAG

ES 2 712 181 T3

(continuación)

Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia (5' → 3') <sup>a</sup>
s6946	20	AAAAAAT <b>GTAC</b> ACTGGTGAGCTACGACATCAA
s6965	21	AAAAA <b>CAATT</b> GTCACCTGCCCGCTTTCCAGT
s7343	22	AAAAA <b>AGGAT</b> CCACGGCAGGAAGCTGCTGG
s7344	23	AAAAA <b>GAATT</b> CTAGACCGCGTCGCCTTCTT
s7345	24	AAAAA <b>GAATT</b> CCATGGTGTGTCTCCTTGGA
s7346	25	AAAAA <b>AGGAT</b> CCCGCGATACGTCCGGGCG
s7390	26	AAAAA <b>AGGAT</b> CCTTGACGTGCATCCGGTCAC
s7391	27	AAAAA <b>GAATT</b> CCATTCATTGCCGAATCGTTCT
s7392	28	AAAAA <b>GAATT</b> CCATCTGGACGATGGCCGTG
s7393	29	AAAAA <b>AGGAT</b> CCGCGCTACGCGAGGTGTTC
s7982	30	AAAAA <b>AGGAT</b> CCTTCCATGCTCAGGACCCTAT
s7983	31	AAAAA <b>CAATT</b> GTCATGCACCTTTTGAT-TAATCGATT
s7984	32	AAAAA <b>CAATT</b> GTGATTCGGGTGCGAGCTGT
s7985	33	AAAAA <b>AGGAT</b> CCCGCCGGACAGCATGAGCA

<sup>a</sup> Los sitios de restricción están indicados en negrita. Tabla 2b Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de genes y elementos reguladores utilizados para experimentos de ingeniería:

SEQ NO:	ID	Nombre del gen del genoma de P.putida	Nombre corto/Descripción (NS/AS)
34		PP_0166-PP_0168	<i>lapABC</i> ; NS
35		PP_0166, incompleto	LapC; AS
36		PP_0167	LapB; AS
37		PP_0168, incompleto	LapA; AS
38		PP_3357	Vainillina deshidrogenasa; NS
39		PP_3357	Vainillina deshidrogenasa; AS
40		PP_3827-3832	incluyendo <i>modABC</i> ; NS
41		PP_3828	ModA; AS
42		PP_3829	ModB; AS
43		PP_3830	ModC; AS
44		PP_2680	Aldehído deshidrogenasa; NS
45		PP_2680	Aldehído deshidrogenasa; AS
46		PP_0545	Aldehído deshidrogenasa; NS
47		PP_0545	Aldehído deshidrogenasa; AS
48		PP_1948	Benzaldehído deshidrogenasa; NS
49		PP_1948	Benzaldehído deshidrogenasa; AS
50			<i>P<sub>tac-lac</sub><sup>R</sup></i> (integrado entre los pares de bases 3798896 y 3798897); NS
51		PP_3354-3355	β-cetotiolasa/acil-CoA hidrolasa; NS
52		PP_3354	β-cetotiolasa; AS
53		PP_3355	acil-CoA hidrolasa, AS

NS = secuencia de nucleótidos  
AS = secuencia de aminoácidos

**Construcción de vectores y manipulación genética de cepas de *P. putida***

5 Las etapas de clonación se realizaron con *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron y col., 1985) utilizando técnicas estándar de ADN recombinante (Sambrook y col., 1989). La transformación de *E. coli* con el ADN plasmídico se produjo a través del procedimiento TSS (Solución de Transformación y Almacenamiento) (Chung y col., 1989). Las cepas de *P. putida* se transformaron con ADN plasmídico mediante electroporación (Sambrook y col., 1989). La construcción de los plásmidos y las cepas se resume en la Tabla 3.

Tabla 3 Resumen de las construcciones de cepas

Gen/región	PP_0166-PP_0168 ( <i>ispABC</i> )	PP_3357 ( <i>vdh</i> )	PP_3827-PP_3832 ( <i>modABC</i> )	$P_{lac}$ - <i>lad<sup>fl</sup></i>	PP_3354 + PP_3355	PP_2680	PP_0545	PP_1948
Región de delección/integración (pb) <sup>a</sup>	190765-219759	3796527-3797987	4352876-4358100	entre 3798896 y 3798897	3791583-3794516	3068912-3070390	631921-633435	2203324-2204796
Región aguas arriba de los cebadores del (longitud del fragmento)	s6007/s6008 (808 pb)	s6534/s6535 (936 pb)	s6882/s6883 (955 pb)	s6937/s6936 (897 pb)	s7390/s7391 (782 pb)	s6927/s6928 (950 pb)	s7343/s7344 (876 pb)	s7982/s7983 (823 pb)
Región aguas abajo de los cebadores del (longitud del fragmento)	s6009/s6010 (791 pb)	s6536/s6537 (1053 pb)	s6884/s6885 (1072 pb)	s6938/s6939 (952 pb)	s7392/s7393 (923 pb)	s6946/s6930 (953 pb)	s7345/s7346 (820 pb)	s7984/s7985 (829 pb)
Clonado a través de	BamHI/HindIII	BamHI/EcoRI	BamHI/NcoI	BamHI/EcoRI/MfeI	BamHI/EcoRI	Sall/BsrGI	BamHI/EcoRI	BamHI/MfeI
Vector de integración	PNG53.1	PNG173.1	PNG260.4	PNG283.5	PNG340.2	PNG276.1	PNG338.1	PNG412.1
Cepa objetivo de <i>P. putida</i>	$\Delta$ Upp4	GN23	GN235	GN276	GN299	GN299	GN440	GN441
Cepa resultante	GN23	GN235	GN276	GN299	GN347	GN440	GN441	GN442

<sup>a</sup> números de pb se derivan del genoma secuenciado de *P. putida* KT2440 (número de acceso de GenBank AE015451)

Para las deleciones e integraciones cromosómicas en *P. putida* KT2440, se utilizó el sistema de contraselección *upp/5-FU* como se ha descrito anteriormente (Graf y Altenbuchner, 2011). En primer lugar, las regiones aguas arriba y aguas abajo, incluidos los codones de inicio y parada del gen diana, se amplificaron por PCR utilizando el ADN cromosómico de *P. putida* KT2440 (número de acceso de GenBank AE015451) como molde. Estos fragmentos se clonaron mediante el ligado de 3 fragmentos en pJOE6261.2. El vector de integración resultante se usó luego para la electroporación de *P. putida* ΔUPP4 u otras cepas con deleción de *upp*. Uno de los clones Kan<sup>r</sup> 5-FU<sup>s</sup> obtenidos se incubó en medio LB durante 24 horas a 30 °C en condiciones de agitación (200 rpm). Después de ello, se sembraron diferentes diluciones en placas mínimas que contenían 20 µg ml<sup>-1</sup> de 5-FU y 0,2 % de glucosa. Se verificaron diez clones de 5-FU<sup>r</sup> y Kan<sup>s</sup> mediante PCR de las colonias, utilizando oligonucleótidos que se unen a las secuencias aguas arriba y aguas abajo del gen que se va a deleccionar.

La construcción del vector de integración de *lacI<sup>q</sup>-P<sub>tac</sub>pNG283.5* comenzó con la amplificación por PCR de *ech* utilizando los cebadores oligonucleotídicos s6936/s6937 y el ADN cromosómico de *P. putida* KT2440 como molde. El fragmento de PCR purificado (897 pb) se clonó a través de NdeI/BamHI en pJOE5304.1 dando como resultado pNG281.1, un vector con el casete *lacI<sup>q</sup>-P<sub>tac</sub>-ech*. A continuación, este casete se amplificó por PCR con s6936/s6965 (fragmento A; 2376 pb). Asimismo, la región aguas arriba de *ech* se amplificó por PCR con s6938/s6939 (fragmento B; 952 pb). Los fragmentos A y B se cortaron con BamHI/MfeI y EcoRI/BamHI, respectivamente, y se clonaron mediante ligado de 3 fragmentos en el corte con BamHI de pJOE6261.2, dando pNG283.5.

### Mutagénesis de transposones y apareamiento

Los cultivos durante la noche de *E. coli* S17.1/pCro2a (contiene mini-Tn5495) (Onaca y col., 2007) y *P. putida* GN235 cultivados en LB con kanamicina y sin kanamicina, respectivamente, se mezclaron por igual (200 µl cada uno) y 100 µl de esa mezcla se vertieron en una placa de agar LB sin antibióticos. Después de la incubación durante 24 horas a 30 °C, las células cultivadas se rasparon de la placa con 3 ml de medio líquido LB. En cada caso, se sembraron en placas 100 µl de una dilución 10<sup>-2</sup> (que proporcionó aproximadamente 50-100 colonias) en un total de 50 LB de placas de agar que contenían 50 µg ml<sup>-1</sup> de kanamicina y µg ml<sup>-1</sup> µM de ácido nalidíxico (para la contraselección del donante de *E. coli*). Las placas se incubaron luego durante 40 horas a 30 °C. De cada placa, las colonias se replicaron en placas de agar mínimo M9, una con 0,2 % (p/v) de glucosa y la otra con 0,1 % (p/v) de vainillina. La incubación se produjo durante la noche a 30 °C. Las colonias que se hicieron crecer en placas M9 con glucosa pero no en placas M9 con vainillina se seleccionaron en una placa de agar LB con 50 µg ml<sup>-1</sup> kanamicina y µg ml<sup>-1</sup> de ácido nalidíxico, en una placa de agar M9 con vainillina al 0,1% y en una placa de agar M9 con ácido vainillílico al 0,1% y se incubó durante la noche a 30 °C. Se aisló el ADN cromosómico de los clones que habían crecido en LB<sub>kan/nal</sub> y en M9 con ácido vainillílico pero no en M9 con vainillina (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) y se digirieron con las enzimas de restricción BsrGI, EcoRI y Sail, respectivamente. Los fragmentos cromosómicos se purificaron (kit NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel, Düren, Alemania), se ligaron durante la noche a 4 °C, se precipitaron con isopropanol durante 2 h en hielo, se lavaron con etanol y se resuspendieron en 10 µl de H<sub>2</sub>O (bidest.). *E. coli* JM109 se transformó con los fragmentos cromosómicos ligados. La selección se realizó en placas de agar LB que contenían 50 µg ml<sup>-1</sup> de kanamicina. Los plásmidos se aislaron a partir de clones resistentes a kanamicina y se verificaron mediante digestión con enzimas de restricción. Después de la secuenciación de los plásmidos con los cebadores s4052 y s4037 (Onaca y col., 2007) (GATC Biotech, Constanza, Alemania), las secuencias obtenidas finalmente se sometieron a una búsqueda BLAST.

### Ensayo de bioconversión de ácido ferúlico en vainillina

Los cultivos durante la noche de las cepas de *P. putida* se diluyeron 1:50 en medio LB fresco y se cultivaron durante 2 horas a 30 °C en matraces agitados (200 rpm). La inducción de los genes metabólicos del ácido ferúlico se produjo mediante la adición de ácido ferúlico 5 mM o IPTG 5 mM dependiendo de la cepa. Después de un crecimiento adicional durante 6 horas a 30 °C en condiciones de agitación, se recogieron 25 x 10<sup>9</sup> células mediante centrifugación (10 minutos, 3.500 g, a temperatura ambiente), se lavaron y se resuspendieron con 5 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,2). Se añadió un total de 10 mM de ácido ferúlico (solución madre 1 M en DMSO) a la suspensión celular. La bioconversión se realizó en tubos largos de cultivo de vidrio a 30 °C en condiciones de agitación (200 rpm). Se tomaron muestras de 200 µl después de un tiempo de conversión de 1,2, 3, 4, 5 y 18 horas. Después de un paso de centrifugación (10 min, 16.000 g, temperatura ambiente) para sedimentar las células. Se recolectaron 100 µl del sobrenadante y se almacenaron a -70 °C hasta su análisis por HPLC.

### Procedimientos analíticos

Las muestras del ensayo de bioconversión se diluyeron 1:10 con ácido acético al 0,2 % antes de la aplicación de HPLC. El ácido ferúlico, la vainillina, el ácido vainillílico y el alcohol vainillílico se cuantificaron con un sistema HPLC Merck-Hitachi (Merck, Darmstadt, Alemania) equipado con una columna RP Purospher®-Star RP-18e (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), una columna protectora LiChroCART® (4 mm x 4 mm, 5 µm), un desgasificador L7612, una bomba de gradiente L6200A, un módulo de interfaz D6000A, un detector UV visible L4200, una válvula de inyección Rheodyne 7125 con un bucle de muestra de 100 µl y el software D7000 HPLC System Manager. Para las mediciones se usó un procedimiento modificado como se ha descrito anteriormente (Sinha y col., 2007): Se usaron metanol, acetonitrilo y 0,2 % de ácido acético (3:3:14) como la fase móvil. El caudal fue de 1 ml min<sup>-1</sup> y la absorbancia se midió a 231 nm durante 20 min. Las soluciones de ácido ferúlico, vainillina, ácido vainillílico y alcohol vainillílico con siete

concentraciones diferentes (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 y 1 mM) se usaron para calibración.

## B. Experimentos

### Ejemplo 1: Construcción y caracterización de un mutante de *P. putida* KT2440 incapaz de crecer en vainillina como única fuente de carbono

5 Como se informó anteriormente (Overhage y col., 1999b; Plaggenborg y col., 2003), *P. putida* KT2440 puede crecer en ácido ferúlico como única fuente de carbono. El ácido ferúlico se metaboliza en pocos pasos en vainillina, catalizada por la feruloil-CoA-sintetasa (PP\_3356, *fcs*) y la enoil-CoA-hidratasa/aldolasa (PP\_3358, *ech*). La vainillina a su vez se degrada más a ácido vainillílico por la vainillina deshidrogenasa (PP\_3357, *vdh*). El último paso tiene que evitarse si se desea acumulación de vainillina. La organización cromosómica de estos genes en *P. putida* KT2440 y  
10 otras cepas construidas en la presente invención se muestra en la Figura 2.

Con respecto a las aplicaciones industriales, los inventores construyeron la cepa GN23 de *P. putida* con una delección en el operón *lapABC* que incluye el gen para la proteína de adhesión a la superficie (PP\_0168, *lapA*) utilizando el procedimiento de contraselección *upp* descrito anteriormente (Graf y Altenbuchner, 2011). La proteína de adhesión a la superficie es responsable y esencial para la formación de biopelículas como se ha mostrado anteriormente para otra cepa mutante *P. putida* KT2440  $\Delta lapA$  (Graf y Altenbuchner, 2011).  
15

En un segundo paso, el gen *vdh* cromosómico de *P. putida* GN23 se delecionó dejando solo el codón de inicio y terminación de *vdh* (Fig. 2). La cepa resultante, designada como GN235, todavía era capaz de crecer en ácido ferúlico como única fuente de carbono que demuestra la expresión funcional de *fcs*. GN235 también conservó la capacidad de crecer en vainillina y ácido vainillílico (Fig. 3).

20 Usando la mutagénesis de transposones de GN235, se descubrió un mutante (GN275) que no pudo crecer en ácido ferúlico o vainillina como única fuente de carbono. Sin embargo, se retuvo el crecimiento sobre ácido vainillílico (Fig. 3). La identificación del gen interrumpido por el transposón reveló *modA* (PP\_3828), que codifica una proteína de unión a molibdato periplásmica, que es parte de un transportador ABC de molibdato. Todo el operón, que incluye *modABC* (PP\_3827 - PP\_3832), se delecionó sin marcadores con el procedimiento de contraselección de *upp* que resultó en la cepa GN276. El fenotipo de esta cepa fue el mismo que el transposón mutante (Fig. 3).  
25

### Ejemplo 2: Ensayos de bioconversión de las cepas GN23, GN235 y GN276

Se utilizaron células en reposo de las cepas GN23 y GN235 para los ensayos de bioconversión. Se añadieron 10 mM de ácido ferúlico a las células en reposo y las concentraciones de ácido ferúlico, vainillina, alcohol vainillílico y ácido vainillílico se midieron por HPLC tomando muestras a intervalos regulares durante el tiempo de reacción. El  
30 ensayo se detuvo después de un tiempo de conversión de 18 h. Ambas cepas, GN23 y GN235, mostraron una conversión rápida de ácido ferúlico acompañada de una acumulación temporal de ácido vainillílico en las primeras 5 h (Fig. 4a, b). Adicionalmente, la acumulación de vainillina, alcohol vainillílico y ácido vainillílico no se pudo observar en ninguno de ellos.

Un ensayo de bioconversión de ácido ferúlico con GN276 (Fig. 4c) mostró una tasa de conversión disminuida del ácido ferúlico. Considerando que con GN23 todo el ácido ferúlico aplicado (10 mM) se convirtió después de 18 h, todavía se podría medir 2,4 mM usando GN276. En contraste con GN23 y GN235, GN276 se acumularon 4,8 mM de vainillina después de 5 h de tiempo de conversión. La concentración de vainillina aumentó ligeramente a 5,2 mM después de 13 h más de conversión. Al final de la conversión (18 h), también se acumularon alcohol vainillílico y ácidos vainillílicos hasta 1,5 mM y 0,3 mM, respectivamente. Para mejorar la tasa de conversión de ácido ferúlico  
40 fueron necesarios otros pasos.

### Ejemplo 3: El aumento de la expresión de *ech-fcs* cromosómicos conduce a altas tasas de conversión y altos rendimientos molares de vainillina

La feruloil-CoA-sintetasa (*fcs*) y la enoil-CoA-hidratasa/aldolasa (*ech*) catalizan la conversión del ácido ferúlico en vainillina. Los inventores asumieron que la tasa de conversión del ácido ferúlico debe ser directamente proporcional  
45 al número de estas dos enzimas metabólicas en la célula, si los cofactores requeridos, ATP y CoA-SH, Están disponibles en exceso o se han regenerado. Utilizando el sistema de contraselección *upp*, el promotor de tac fuerte ( $P_{tac}$ ) y *lacI<sup>f</sup>* se integraron inmediatamente aguas arriba de *ech* y *fcs* en el cromosoma de GN276 para controlar la expresión de estos dos genes (Fig. 2).

La cepa resultante fue designada GN299. Después de la inducción de expresión de *ech* y *fcs* con IPTG, se realizaron ensayos de bioconversión con esta cepa. Después de 5 h, casi todo el ácido ferúlico 10 mM se convirtió en alcohol vainillílico 1,1 mM, ácido vainillílico 0,2 mM y vainillina 8,3 mM, correspondiente a un rendimiento molar del 83 % (Fig. 4d). Después de 18 h de conversión, la concentración de vainillina disminuyó ligeramente a 7,6 mM acompañada con un aumento de alcohol vainillílico y ácido vainillílico a 1,6 mM y 0,4 mM, respectivamente.  
50

**Ejemplo 4: La optimización del ensayo de bioconversión reveló un umbral para la vainillina**

Se usaron células en reposo de *P. putida* GN299 para experimentos de bioconversión. Se variaron varios parámetros con el objetivo de obtener un alto rendimiento del producto reproducible combinado con un alto índice de conversión inicial.

5 En primer lugar, los inventores analizaron la influencia de la concentración del inductor (1 y 5 mM de IPTG) y del tiempo de inducción (2, 4 y 6 h) para la expresión de las enzimas metabólicas necesarias para la bioconversión de ácido ferúlico a vainillina (Fig. 5 + 6a). Los inventores descubrieron que la conversión de ácido ferúlico fue mucho más lenta usando menos de 5 mM de IPTG (Fig. 5). Sin embargo, los rendimientos de vainillina después de un tiempo de conversión de 18 h fueron similares (no se muestra). Con respecto a la influencia del tiempo de inducción (Fig. 6a), las mayores tasas de conversión y rendimientos de vainillina se encontraron después de 6 h de inducción de las enzimas metabólicas.

Adicionalmente, la cantidad de células en reposo también se varió (5, 10 y 20 x 10<sup>9</sup> células ml<sup>-1</sup>). Los mejores resultados se apuntaron con la concentración más baja de 5 x 10<sup>9</sup> células ml<sup>-1</sup> (Fig. 6b). Las concentraciones celulares más altas llevaron a niveles elevados de alcohol vainillílico y ácido vainillílico acompañados de una disminución en el rendimiento molar de vainillina después de una conversión prolongada (18 h).

En la presente invención, los inventores descubrieron que hay un umbral para la producción de vainillina. Las células inducidas y en reposo se incubaron con cantidades crecientes de ácido ferúlico en el caldo de bioconversión (10, 20, 30 y 40 mM). Utilizando hasta 30 mM de ácido ferúlico, las cepas no produjeron más de 13,5 mM de vainillina (Fig. 7a). Con ácido ferúlico 40 mM, no se produjo nada de vainillina. Los mejores rendimientos se lograron utilizando ácido ferúlico 10 mM para el ensayo de bioconversión. La cinética de crecimiento de las cepas mutantes de *P. putida* KT2440 en medio M9 tamponado (pH 7,0) con glucosa y cantidades crecientes de ácido ferúlico (0 - 50 mM) no mostró influencia de la concentración de ácido ferúlico (Fig. 8a).

El efecto del umbral de vainillina se confirmó mediante la incubación de células en reposo con ácido ferúlico 10 mM y cantidades crecientes adicionales de vainillina (10, 15, 20 y 30 mM). Las células incubadas con vainillina 10 mM adicional produjeron solamente vainillina 3,2 mM adicional después de 18 h (Fig. 7b). Por otra parte, mayores cantidades de vainillina dieron como resultado una ligera disminución de la concentración de vainillina y un aumento de las concentraciones de alcohol vainillílico y ácido vainillílico. La cinética de crecimiento de las cepas mutantes de *P. putida* KT2440 en medio M9 mínimo con glucosa y cantidades crecientes de vainillina (0 - 25 mM) mostró una influencia significativa de la concentración de vainillina (Fig. 8b). Con hasta 12,5 mM de vainillina, las cepas mostraron un crecimiento moderado. Con más de 15 mM de vainillina, el crecimiento se hallaba fuertemente impedido.

**Ejemplo 5: Deleción de nuevos genes y consecuencias sobre la producción de vainillina y la formación de subproductos**

Los ensayos de bioconversión realizados con GN299 mostraron la formación de alcohol vainillílico y ácido vainillílico que inevitablemente reducen el rendimiento del producto. Por lo tanto, se analizó el efecto de la inactivación de varios genes potencialmente implicados en el metabolismo del ácido ferúlico. Los genes elegidos para este enfoque analítico fueron PP\_3354 ( $\beta$ -cetotiolasa) y PP\_3355 (acil-CoA deshidrogenasa), PP\_2680 y PP\_0545 (aldehído deshidrogenasas), y PP\_1948 (benzaldehído deshidrogenasa).

En primer lugar, una segunda vía del ácido ferúlico al ácido vainillílico (Fig. 1) propuesta por (Overhage y col., 1999b) se interrumpió en la cepa GN299 mediante la eliminación combinada de PP\_3354 y PP\_3355 que codifica una acil-CoA deshidrogenasa y una  $\beta$ -cetotiosa (aat) como se muestra en la Figura 2. La cepa resultante GN347 se utilizó para los ensayos de bioconversión (Fig. 4e). Después de 5 h, se convirtió ácido ferúlico 9 mM en vainillina 7,7 mM, alcohol vainillílico 1 mM y ácido vainillílico 0,2 mM. Después de 18 h, se convirtieron 0,5 mM de ácido ferúlico. La concentración de vainillina disminuyó a 7,5 mM, mientras que el alcohol vainillílico y el ácido vainillílico aumentaron ligeramente a 1,4 mM y 0,3 mM, respectivamente. En comparación con GN299, la tasa de conversión y el rendimiento de vainillina en las primeras 5 h disminuyeron.

Dado que la deleción de *vdh* no pudo evitar la degradación de la vainillina en ácido vainillílico, otras aldehído deshidrogenasas pueden catalizar esta reacción. Desde un enfoque proteómico se pudo demostrar que dos aldehído deshidrogenasas (codificadas por PP\_2680 y PP\_0545) y la benzaldehído deshidrogenasa (PP\_1948) estaban reguladas por aumento en *P. putida* KT2440 que crecía en vainillina (Simon, Pfannstiel y Huber, datos en bruto no publicados, manuscrito en preparación). La inactivación secuencial de PP\_2680 y PP\_0545 en GN299 por deleción sin marcador dio como resultado las cepas GN440 y GN441, respectivamente. La benzaldehído deshidrogenasa también puede aceptar vainillina como sustrato, ya que es un derivado del benzaldehído. Por lo tanto, el gen correspondiente (PP\_1948) se eliminó en GN441, dando como resultado la cepa GN442. Las cepas mutantes GN440, GN441 y GN442 se utilizaron en ensayos de bioconversión (Fig. 4f-h). Las cepas mostraron resultados muy similares. Después de 4 horas, aproximadamente 9,5 mM de ácido ferúlico se convirtieron en 8,6 mM de vainillina con células en reposo de GN440 y GN441. Las concentraciones medidas de alcohol vainillílico y ácido vainillílico fueron aproximadamente 0,8 mM y 0,1 mM, respectivamente. La cepa GN442 mostró los mismos resultados, sin



embargo, ya después de 3 h de conversión. Después de 18 h de conversión, casi todo el ácido ferúlico se convirtió con las tres cepas. De nuevo, la concentración de vainillina disminuyó a 7,9 mM, mientras que el alcohol vainillílico y el ácido vainillílico aumentaron a aproximadamente 1,5 mM y 0,4 mM, respectivamente.

## B. Discusión de los experimentos

5 En contraste con las cepas AN103 y BF13 de *P. fluorescens* (Martinez-Cuesta y col., 2005; Di Gioia y col., 2010), los hallazgos de los inventores con *P. putida* GN235 confirman que la simple inactivación de *vdh* no es suficiente para prevenir la degradación de la vainillina. Esto se ha comunicado anteriormente con un mutante defectivo en *vdh* de *Pseudomonas* sp. cepa HR199 y un mutante de *Pseudomonas* KT2440 (Overhage y col., 1999a; Plaggenborg y col., 2003). KT2440*vdh*ΩKm y GN235 aún podían crecer en vainillina como única fuente de carbono. La principal diferencia, sin embargo, fue que *P. putida* GN235 también fue capaz de crecer en ácido ferúlico, debido a una expresión funcional de los genes adyacentes de *vdh*, a saber, *ech* y *fcs*. La delección limpia de la expresión sostenida de *vdh* de *ech* y *fcs*, que probablemente no fue el caso en el mutante KT2440*vdh*ΩKm. Una mutagénesis de transposón aleatoria realizada con GN235 reveló un mutante con un transposón en el locus genético de *modA*, que codifica una proteína de unión a molibdato periplásmica. Se sabe que los iones molibdato desempeñan un papel como cofactores en las oxidorreductasas de las especies de *Pseudomonas* (Koenig y Andreesen, 1990; Blaschke y col., 1991; Frunzke y col., 1993). Dado que la cepa GN276 de Δ*modABC* no pudo crecer en la vainillina como única fuente de carbono, se puede suponer que el molibdato desconocido que depende de las oxidorreductasas puede aceptar la vainillina como un sustrato que complementa la inactivación de *vdh*. La inhibición de la captación de molibdato podría inactivar estas enzimas y la vainillina no se oxida a ácido vainillílico., que es degradado aún más. Dado que el ácido ferúlico no se convirtió completamente con GN276, nuevas mejoras fueron necesarias.

Una expresión concurrente de los genes estructurales *ech* y *fcs* en un plásmido de baja copia en una cepa de *P. fluorescens* negativa para *vdh* condujo a un rendimiento molar de vainillina de 63 % en 5 h usando células en reposo de experimentos en matraz agitados y hasta 84% en 24 h utilizando células en reposo de un reactor de tanque agitado (Di Gioia y col., 2010). Para evitar posibles problemas de inestabilidad de plásmidos y uso de antibióticos, el promotor fuerte *tac* se introdujo en el cromosoma de *P. putida* GN276 para controlar la expresión de *ech* y *fcs* (GN299). Esto mejoró el rendimiento molar de vainillina hasta un 83 % en solo 5 h. Suponemos que el aumento de la tasa de expresión de *ech* y *fcs* a través de la inducción con IPTG condujo a concentraciones más altas de las enzimas metabólicas codificadas que al utilizar el sistema promotor original. En contraste con el ácido ferúlico, el inductor IPTG no se metaboliza y las tasas de expresión pueden permanecer en un nivel alto. La reducción de la cantidad de inductor llevó a una disminución en el rendimiento del producto y la productividad, lo que puede explicarse por menores concentraciones de enzimas. También se comprobó el efecto del tiempo de inducción, mostrando que menos de 6 h resultó en rendimientos de producto más bajos, probablemente debido a niveles de enzimas más bajos. También se verificaron tiempos de inducción más largos, pero no mejoró los rendimientos del producto (datos no mostrados). El aumento de la concentración celular en el ensayo condujo a niveles más altos de los subproductos del ácido vainillílico y el alcohol vainillílico y no aceleró el tiempo de conversión. Los inventores supusieron que las densidades celulares más altas se acompañan con niveles más altos de equivalentes de reducción que a su vez pueden favorecer la formación de alcohol vainillílico.

Otras mejoras del procedimiento de conversión demostraron que el aumento de la concentración de ácido ferúlico en el caldo de bioconversión produce una reducción del rendimiento molar de vainillina, si se utilizan concentraciones superiores a 10 mM de ácido ferúlico. Una concentración de ácido ferúlico de 40 mM incluso inhibió cualquier conversión a vainillina. Un efecto tóxico del ácido ferúlico, sin embargo, pudo excluirse, como los experimentos de crecimiento con cantidades crecientes de ácido ferúlico con hasta 50 mM han demostrado.

Por otra parte, *P. putida* GN299 mostró un umbral de vainillina de aproximadamente 13,5 mM en los ensayos de bioconversión. El aumento de la concentración de vainillina por encima de este umbral llevó a la formación de más alcohol vainillílico y ácido vainillílico e inhibió la conversión del ácido ferúlico. Tal inhibición del producto también se observó con cepas de *E. coli* recombinantes que convierten el ácido ferúlico en vainillina (Overhage y col., 2003). El carácter tóxico de la vainillina se confirmó con experimentos de crecimiento de *P. putida* GN299 en presencia de concentraciones crecientes de vainillina, donde solo se toleraron hasta 12,5 mM de vainillina. En contraste con *P. fluorescens* BF13, sin embargo, que mostró una reducción del 98 % en el rendimiento molar al aumentar la concentración de ácido ferúlico de 5 mM a 12,5 mM (Di Gioia y col., 2010), *P. putida* no mostró tales reducciones sensibles. De hecho, las células en reposo de *P. putida* GN442 se podrían reutilizar después de la conversión durante 18 h. La distracción de la vainillina al resuspender las células en un nuevo tampón con ácido ferúlico 10 mM y la incubación adicional a 30 °C durante 18 h dio como resultado la producción de vainillina 5 mM (ácido ferúlico 4,5 mM, 0,5 mM de alcohol vainillílico, 0 mM de ácido vainillílico). Por lo tanto, la distracción inmediata del producto tóxico vainillina por las resinas adsorbentes permitiría que las células de *P. putida* conviertan más ácido ferúlico como podría mostrarse previamente para otros sistemas (Yoon y col., 2007; Hua y col., 2007; Lee y col., 2009).

La inactivación de la ruta alternativa del ácido ferúlico al ácido vainillílico propuesta por Overhage y col., (1999b) por delección de PP\_3355 (*aat*) y PP\_3354 en GN299 no tuvo ningún efecto positivo en la formación de la formación no deseada de los subproductos alcohol vainillílico y ácido vainillílico. Se observó que la tasa de conversión incluso disminuyó. Una posible explicación para este comportamiento podría ser una vida media más corta del ARNm provocada por la eliminación de los dos genes y, por lo tanto, un nivel disminuido de las enzimas metabólicas. Sin

embargo, la inactivación de las aldehído deshidrogenasas reguladas, codificadas por PP\_2680 y PP\_0545, y la benzaldehído deshidrogenasa (PP\_1948) en GN299 condujo a mayores tasas de conversión iniciales y altos rendimientos molares. Los resultados con esta cepa (GN442) representan la mayor productividad de una cepa de *Pseudomonas* en la bioconversión de ácido ferúlico a vainillina encontrada en la literatura hasta el momento. Sin embargo, las delecciones no tuvieron un efecto significativo en la formación de los subproductos en comparación con GN299. En experimentos con reactores de tanque agitado, se pudo demostrar previamente que elevar las concentraciones de oxígeno disuelto no dio lugar a la formación de más ácido vainillílico, excluyendo un procedimiento de oxidación química (Di Gioia y col., 2010). Se propuso que otras deshidrogenasas de especificidad de sustrato pueden actuar en cepas de *Pseudomonas* que aún deben determinarse (Overhage y col., 1999b).

Todos nuestros experimentos de bioconversión mostraron que los tiempos prolongados de bioconversión hasta 18 h redujeron el rendimiento molar de vainillina debido a la formación de los subproductos. Por lo tanto, una conversión rápida y completa como sea posible del ácido ferúlico a vainillina es deseable en las primeras horas. La reducción de la vainillina a alcohol vainillílico parece representar un mecanismo de desintoxicación, ya que también se observó con células de *E. coli* recombinantes que convierten el ácido ferúlico en vainillina (Overhage y col., 2003). Otro enfoque para reducir la formación de alcohol vainillílico fue disminuir la cantidad de NADH<sub>2</sub> mediante delección de los genes PP\_4011 y PP\_4012, que codifican la isocitrato deshidrogenasa, como se propuso para *E. coli* recombinante (Lee y col., 2009).

La sorprendente mejora (rápida y casi completa) conversión de ácido ferúlico como se observa de acuerdo con la presente invención en comparación con los resultados de (Di Gioia y col., 2010) se ilustra mediante los datos de productividad resumidos en la siguiente Tabla 4:

**Tabla 4** Comparación de productividades

	Di Gioia (matraz de agitación)	Di Gioia (Biorreactor de 3 l)	GN442 (Invención)
Productividad específica [g (Vainillina)/(g (peso húmedo celular) · h)]	0,01	0,02	0,09
Productividad volumétrica [g (Vainillina)/(l · h)]	0,04	0,05	0,44

## LISTA DE REFERENCIAS

- Achterholt S, Priefert H, Steinbüchel A (2000) Identification of Amycolatopsis sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:799-807
- Altenbuchner J, Viell P, Pelletier I (1992) Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. *Methods Enzymol* 216:457-466
- Barghini P, Di GD, Fava F, Ruzzi M (2007) Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions. *Microb Cell Fact* 6:13
- Berger RG (2009) Biotechnology of flavours—the next generation. *Biotechnol Lett* 31:1651-1659
- Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62:293-300
- Blaschke M, Kretzer A, Schafer C, Nagel M, Andreesen JR (1991) Molybdenum-dependent degradation of quinoline by *Pseudomonas putida* Chin IK and other aerobic bacteria. *Arch Microbiol* 155:164-169
- Bonnin E, Lesage-Meessen L, Asther M, Thibault JF (1999) Enhanced bioconversion of vanillic acid into vanillin by the use of "natural" cellobiose. *J Sci Food Agric* 79:484-486
- Calisti C, Ficca AG, Barghini P, Ruzzi M (2008) Regulation of ferulic catabolic genes in *Pseudomonas fluorescens* BF13: involvement of a MarR family regulator. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:475-483
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2172-2175
- Civolani C, Barghini P, Roncetti AR, Ruzzi M, Schiesser A (2000) Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* strain BF13. *Appl Environ Microbiol* 66:2311-2317
- Clarke PH (1982) The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie van Leeuwenhoek* 48:105-130
- Davidonis G, Knorr D (1991) Callus formation and shoot regeneration in vanilla planifolia. *Food Biotechnol* 5:59-66
- Di Gioia D, Luziatelli F, Negroni A, Ficca AG, Fava F, Ruzzi M (2010) Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. *J Biotechnol* 156:309-316
- Escott-Watson PL, Marais JP (1992) Determination of alkali-soluble phenolic monomers in grasses after separation by thin-layer chromatography. *J Chromatogr* 604:290-293
- Fleige C, Hansen G, Kroll J, Steinbüchel A (2013) Investigation of the Amycolatopsis sp. Strain ATCC 39116 vanillin dehydrogenase and its impact on the biotechnical production of vanillin. *Appl Environ Microbiol* 79:81-90
- Frunzke K, Heiss B, Meyer O, Zumft WG (1993) Molybdopterin guanine dinucleotide is the organic moiety of the molybdenum cofactor in respiratory nitrate reductase from *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS Microbiol Lett* 113:241-245

- Gasson MJ, Kitamura Y, McLauchlan WR, Narbad A, Parr AJ, Parsons EL, Payne J, Rhodes MJ, Walton NJ (1998) Metabolism of ferulic acid to vanillin. A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *J Biol Chem* 273:4163-4170
- 5 Graf N, Altenbuchner J (2011) Development of a method for markerless gene deletion in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 77:5549-5552
- Hansen EH, Moller BL, Kock GR, Bunner CM, Kristensen C, Jensen OR, Okkels FT, Olsen CE, Motawia MS, Hansen J (2009) De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Appl Environ Microbiol* 75:2765-2774
- 10 Havkin-Frenkel D, Belanger FC (2008). Biotechnological Production of Vanillin. In: Havkin-Frenkel D, Belanger FC (ed) *Biotechnology in Flavor Production*, 1<sup>a</sup> edn. Blackwell, Oxford, pág. 83-103
- Hua D, Ma C, Song L, Lin S, Zhang Z, Deng Z, Xu P (2007) Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:783-790
- Ishii T (1997) Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci* 127:111-127
- 15 Ishikawa H, Schubert WJ, Nord FF (1963) Investigations on lignins and lignification. 28. The degradation by *Polyporus versicolor* and *Fomes fomentarius* of aromatic compounds structurally related to softwood lignin. *Arch Biochem Biophys* 100:140-149
- Koenig K, Andreesen JR (1990) Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. *J Bacteriol* 172:5999-6009
- 20 Kojima Y, Fujisawa H, Nakazawa A, Nakazawa T, Kanetsuna F, Taniuchi H, Nozaki M, Hayaishi O (1967) Studies on pyrocatechase. I. Purification and spectral properties. *J Biol Chem* 242:3270-3278
- Krings U, Berger RG (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:1-8
- 25 Lee EG, Yoon SH, Das A, Lee SH, Li C, Kim JY, Choi MS, Oh DK, Kim SW (2009) Directing vanillin production from ferulic acid by increased acetyl-CoA consumption in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 102:200-208
- Lesage-Meessen L, Delattre M, Delattre M, Haon M, Thibault JF, Ceccaldi BC, Brunerie P, Asther M (1996) A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biotechnol* 50:107-113
- 30 Martinez-Cuesta MC, Payne J, Hanniffy SB, Gasson MJ, Narbad A (2005) Functional analysis of the vanillin pathway in a vdh-negative mutant strain of *Pseudomonas fluorescens* AN103. *Enzym Microb Technol* 37:131-138
- Muheim A, Lerch K (1999) Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:456-461
- 35 Nakazawa T (2002) Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* 4:782-786
- Narbad A, Gasson MJ (1998) Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol* 144:1397-1405
- Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dS, V, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris LP, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen JA, Timmis KN, Dusterhoft A, Tumbler B, Fraser CM (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4:799-808
- 40 Oddou J, Stentelaire C, Lesage-Meessen L, Asther M, Colonna Ceccaldi B (1999) Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:1-6
- Okeke BC, Venturi V (1999) Construction of recombinants *Pseudomonas putida* BO14 and *Escherichia coli* QEFCA8 for ferulic acid biotransformation to vanillin. *J Biosci Bioeng* 88:103-106
- 45 Onaca C, Kieninger M, Engesser KH, Altenbuchner J (2007) Degradation of alkyl methyl ketones by *Pseudomonas veronii* MEK700. *J Bacteriol* 189:3759-3767
- Oosterveld A, Beldman G, Schols HA, Voragen AG (2000) Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. *Carbohydr Res* 328:185-197
- Overhage J, Priefert H, Rabenhorst J, Steinbüchel A (1999a) Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (vdh) gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:820-828
- 55 Overhage J, Priefert H, Rabenhorst J, Steinbüchel A (2000) Construction of production strains for producing substituted phenols by specifically inactivating genes of the eugenol and ferulic acid catabolism. *Solicitud de patente* WO 0026355
- Overhage J, Priefert H, Steinbüchel A (1999b) Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. Strain HR199. *Appl Environ Microbiol* 65:4837-4847
- 60 Overhage J, Steinbüchel A, Priefert H (2003) Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69:6569-6576
- Peng X, Misawa N, Harayama S (2003) Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic acids. *Appl Environ Microbiol* 69:1417-1427
- 65 Plaggenborg R, Overhage J, Loos A, Archer JA, Lessard P, Sinskey AJ, Steinbüchel A, Priefert H (2006) Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol. *Appl*

- Microbiol Biotechnol 72:745-755
- Plaggenborg R, Overhage J, Steinbüchel A, Priefert H (2003) Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:528-535
- Priefert H, Rabenhorst J, Steinbüchel A (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:296-314
- 5 Ramachandra Rao S, Ravishankar GA (2000) Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *J Sci Food Agric* 80:289-304
- Rosazza JP, Huang Z, Dostal L, Volm T, Rousseau B (1995) Review: biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *J Ind Microbiol* 15:457-471
- 10 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotech* 1:784-791
- 15 Sinha AK, Verma SC, Sharma UK (2007) Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. *J Sep Sci* 30:15-20
- Stentelaire C, Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, Sigoillot JC, Ceccaldi BC, Asther M (1997) By-passing of unwanted vanillyl alcohol formation using selective adsorbents to improve vanillin production with *Phanerochaete chrysosporium*. *World J Microbiol Biotechnol* 14:285-287
- 20 Tilay A, Bule M, Annapure U (2010) Production of biovanillin by one-step biotransformation using fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Agric Food Chem* 58:4401-4405
- Williams PA, Murray K (1974) Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol* 120:416-423
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119
- 25 Yoon SH, Lee EG, Das A, Lee SH, Li C, Ryu HK, Choi MS, Seo WT, Kim SW (2007) Enhanced vanillin production from recombinant *E. coli* using NTG mutagenesis and adsorbent resin. *Biotechnol Prog* 23:1143-1148
- Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3;
- Itakura y col., (1984) (a) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323;
- Itakura y col., (1984) (b) *Science* 198:1056;
- 30 Ike y col., (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:477 Arkin y Yourvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815;
- Delgrave y col., (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331
- Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl. Biosci.* (1989) Apr; 5(2):151-1
- 35 Chenna, Ramu, y col., (2003) *Nucleic Acids Res* 31 (13): 3497-500, Ausubel y col., (eds), 1985, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York;
- Hames and Higgins (eds), 1985, *Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford;
- Brown (ed), 1991, *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford
- 40 Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)
- Cloning Vectors* (Eds. Pouwels P.H. y col., Elsevier), Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018)
- T.J. Silhavy, y col., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984)
- Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85(8), 1988, 2444-2448.
- 45 *Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach*" (Publ. P.M. Rhodes, P.F. Stan-bury, IRL Press (1997) p. 53-73, ISBN 0 19 963577 3).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> BASF SE
- <120> Producción de alto rendimiento de vainillina a partir de ácido ferúlico
- 50 <130> M/54278
- <160> 53
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 31
- 55 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador de PCR

<400> 1  
 aaaaaaggat cctaaagcaa tggcgaaacc c 31

5 <210> 2  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> temporizador de PCR

10 <400> 2  
 aaaaaaaagc ttaccagta cgccaacagc ct 32

<210> 3  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 3  
 aaaaaaaagc ttgacagtgc cggcaagcca 30

20 <210> 4  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de PCR

25 <400> 4  
 aaaaaaggat ccggtgtctg tcagctgtcc tt 32

30 <210> 5  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de PCR

35 <400> 5  
 aaaaaaggat cctaaagcac gatgccgagg 30

<210> 6  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 6  
 aaaaaagaat tctagacctc cggcaagatg a 31

45 <210> 7  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de PCR

50 <400> 7  
 aaaaaagaat tccatgctca ttctctgtg tg 32

<210> 8

<211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 8  
 aaaaaaggat ccttatgcga ttcggctaga ga 32  
  
 <210> 9  
 <211> 31  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 9  
 15 aaaaaaggat cccccgcgct tgcgatatc c 31  
  
 <210> 10  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 10  
 aaaaaacccat ggcatgcgat tctccttgcg t 31  
  
 <210> 11  
 <211> 29  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 30 <400> 11  
 aaaaaacccat ggtgagcgtc acccgaggg 29  
  
 <210> 12  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 12  
 aaaaaaggat ccggtcagtc agcctgtga t 31  
  
 40 <210> 13  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 45 <400> 13  
 aaaaaagtcc agacaggacg gcggcaagg 29  
  
 <210> 14  
 <211> 30  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 14  
 aaaaaatgta cacatgctga gcctctgcgg 30  
 5 <210> 15  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 10  
  
 <400> 15  
 aaaaaagtcc agagtagtcg atacctggg c 31  
  
 <210> 16  
 <211> 33  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 16  
 aaaaaaggat ccctctgtt gtcgttatag aga 33  
 20  
  
 <210> 17  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 17  
 aaaaaacata tgagcaaata cgaaggccg 29  
 30  
  
 <210> 18  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 35  
  
 <400> 18  
 aaaaaagaat tcggtctgc actctgttg tt 32  
  
 <210> 19  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 19  
 aaaaaaggat cctggccatt atctggctca g 31  
 45  
  
 <210> 20  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 50  
  
 <400> 20

aaaaaatgta cactggtgag ctacgacatc aa 32  
 <210> 21  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 <400> 21  
 aaaaaacaat tgtcactgcc cgctttccag t 31  
 10  
 <210> 22  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 15  
 <400> 22  
 aaaaaaggat ccacggcagg aagctgctgg 30  
 20  
 <210> 23  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 <400> 23  
 aaaaaagaat tctagaccgc gtcgccttct t 31  
 25  
 <210> 24  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 <400> 24  
 aaaaaagaat tccatggtgt gtctccttgg ta 32  
 35  
 <210> 25  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 <400> 25  
 aaaaaaggat cccgcgatac gtcggggcg 29  
 40  
 <210> 26  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
 <400> 26  
 aaaaaaggat ccttgacgtg catccggtca c 31  
 50  
 <210> 27  
 <211> 33



<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 5 <400> 27  
 aaaaaagaat tccattcatt gccgaatcgt tct 33  
  
 <210> 28  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 28  
 aaaaaagaat tccatctgga cgatggccgt g 31  
  
 15 <210> 29  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 29  
 aaaaaaggat cgcgctacg cgagggttc 30  
  
 25 <210> 30  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 30  
 30 aaaaaaggat ccttccatgc tcaggaccct at 32  
  
 <210> 31  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 <400> 31  
 aaaaaacaat tgcatgcact ttgattaat cgatt 35  
  
 40 <210> 32  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de PCR  
  
 45 <400> 32  
 aaaaaacaat tgtgattcgg gtgcgagctg t 31  
  
 <210> 33  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>

ES 2 712 181 T3

<223> cebador de PCR

<400> 33

aaaaaggat cccgccggac agcatgagca 30

5

<210> 34

<211> 28995

<212> ADN

<213> Pseudomonas putida

<400> 34

gcgtttggag ctgtattcgc gcagctcctg ctggcgttgg accaactgct gttgcaggcc	60
gccaatttcg tcctgcagtt gctggcgccg gctctggtac agcgactcct cactggccgc	120
ctggtttggc gcggctttac gcagcttttc gtcgataatc agcgggcggt cctctacctc	180
ggcactcaaa cgttcgactc gcagggccat ggccaggcgg tcagcctcgg tttcaccaac	240
gttggaggcg aagcggggtt catccaggcg cagcaatggc tggcccactt cgacgatctg	300
cccctccttg gcgaagattt cggcgacgat gccgccctcc aggttctgga tcttctgcac	360
cttgaagac ggaatggcct tgccttcacc ccgcgtaact tcgtcgatgg gcgcgacgct	420
ggcccataca atcaagaaca cgaagaacag gatcacgccc cagatggtca gccgcaccac	480
gcgcggtgca tcttcgatca gggccttggt cacctcgggc agcggctggc cgccaagcga	540
gtcgtgcct ttgaaatagc gccgcaggcc gtccttgaac tgcccataat ccagcttatg	600
caactgat ctgcccttc ttcagtgcac ccatgaccgc ggctttcggg ccgtcggcga	660
caatctgccc gcgatcgatc acgatcagcc ggtctaccag cgacagcaat gaggcacggt	720
gcgtgaccag cagtaccgtc ttgccctcca ccaccgcttg caggcgctgc ttgaggcgtt	780
cttcaccggt gttgtccatg gcgctggtcg gctcgtccag cagcaggatc tgccgggtga	840

ES 2 712 181 T3

gcagcagcgc acggcccaag ggcacgttct gccgctggcc gccggacagg ttttgcccgc 900  
gttcaaccac ttgcagctcg tagccgtcgg ggtgcagccg ggcgaattca tgtacgcccg 960  
ccagttcagc ggcctgcagg atcaattcgt cctcgatgta gcgggcgccc ctgaccaggt 1020  
tgtcaagcaa ggtgccggcc agcagctgga tatcctgggg gacgtagccg atgttgtggc 1080  
gcagttcgct gacatcgatc tggcgaatgt cgacgccatc aaccagcagc gagccacat 1140  
cggcctcgta caggccgacg atgagcttgg ccagcgagct cttgccggag ccgctgcggc 1200  
cgatgatgcc gaccttctcg ccagggcggg tggtcagggt gatattcttc agggccaggt 1260  
tctgctgggt cggataagtg aagtcgacc cgcggaactc gacgctgccc tgcagcacct 1320  
tgcggctcag cgggcgttct tcgaagttgc gctcttgccg tagatccatc atgtggtcgg 1380  
tggagacatc ggtcaccttg gcttgcctgg agcgggcccag caggccgttg agctggccca 1440  
acgggcccag ggcacggccc ctgagcatgt agcaagccac caggcccgcc atgctcaggt 1500  
tgccgtcgat gatcaggtac acgccgacgc agatcattgc cacgcctgcc agttgctgga 1560  
tcagcagggg gatgttcac gccaggctcg acagcacttt cacgcgcagt tccagccggc 1620  
tcagggtgcc gagggtttgc tcccacatat actggcgctc gctttcggcg ttgttgacct 1680  
ttaccgcatc cagaccgcc agggtttcga tcaggctgga ctggcgctct gatgccaaag 1740  
ccatggtccg ctccatggtc gccatcagtg gccgctgcag ggcgtagccg atgccagag 1800  
ccagcgggaa ggcgatgatc ggtatccaca ccagggtccc gccaatgatg gcgatgacga 1860  
tcaaaatcag gatggtaaag ggcaggtcga tcaggctggt cagggtcagc gaggcgagga 1920  
agtcgcgcag gccctggaac tcgtgaatgt tctgggcaaa gctgcctacc cgcgccggcc 1980  
ggtacttcat cgacatgccg acgatacgtt caaacagcgt tgccgagatg atcaggtcgg 2040  
tcttcttgcc ggccaggtcc aggcacaggc cgcgaaggcc tttgaggatc aggtcgaaga 2100  
tatacgcgcc ggcgataccg atggccagta cccagagcgt cgaggtggcc tggtttgca 2160  
ccactcggtc atacacgttc atcacgaaca gcggcgccgc caaggcgatc aggttgatca 2220  
ccaggctggc ggcgatggcg tcgatataca accacttgct gcgcagcagg gtgtcgcgga 2280  
accacgactt cgctcgtggg atgaggttgc cgtggttgac atcgaacttg tgctgcggct 2340  
gcgcgaagaa cacgcggccg ctgtagtcgc ttagcagggc ttcgcggctg acatgcacct 2400  
cgccaccgtc gctctcgctg agtagcaggc gcgcgggtgc atcgttctcc cagccgagca 2460  
ggacggcgct gcggccctcc ttgagcagca gcatggccgg catggcgata ctcgggatct 2520  
gctccagctt tcgctgaagc aggcgccctc gcaggccagc ccgggcccgc gcgcgcggca 2580  
gcagttcagg gctcagcgc tgggcgggta gcggtaggcc tgttgcagc atgaccggc 2640  
tggcgggctt ctggtgcagg acacacaggc tcagcagact atccagcagg ggatcgtcat 2700

ES 2 712 181 T3

gctgactgcg tggatcgtgg ctgagttgga ctcgactgac ttcggattcc acgcggcgct 2760  
ctcttcatcc ttgtggtggg tggggtgggt gtgccgtcgt taaggtcagg ccggctcacc 2820  
ctggcattct ttggtgctgc aaagctgtgc tgataagggt tatcacgccc tgggtgctgga 2880  
gcagctggcc aatgttcgcc ttgaatcggg gttgagtaaa caattctacg tgcttcattt 2940  
tcaccagact tagcggggca atgattgttt catttttgat ccagccatca tccggcttgt 3000  
tgcagcatag cctgccactc agccaaggca tgcaagggtt ttgggttcca gcttagtcac 3060  
tgtcagtaaa caggecgtgg tttgttggeg catatctgtg gcttgtagt caaaattcat 3120  
ctatagagtg cggattcttg ccttcttgca ttcaatatcc gcaagcgatt ttcaatgatc 3180  
gggataccat tattcacgca ctcgtcggtc atctctttga tttgcgacac atagctgctt 3240  
gtgactcgcg cagcgttgat agccgcaagc gcccccggt ctggctggct atcgacctct 3300  
gcctggccgc attccggcaa ggtttgtgct tatttggcaa tcagtgtccg ggcgattgac 3360  
agtgacctgg atattgacgc cagtaacgct gacattgtcg agtaagtcgg tcgcgcccgcg 3420  
tgatttacgg ctgctgaggt gtatgaaaaa gtgctaggac tgatggctta acacctttt 3480  
gatgatgtaa gacatttgtc ctcaggaaac gcttggctaa ggtacaaata tcaatgtgac 3540  
attacattgc cgattgttta ggatggcatg tataaggta caatagtttggc agtcaggcaa 3600  
ttccaaaaag ttatagacgg aatattgacg tcaaaaacgt caagagatca tcgacatagt 3660  
tccgcctgaa gtggctagca agcgcctgc tggcagggaa gtaccccatc gggtcacacg 3720  
gagagtcaa tgagcagcgt ttagccatc gtcaaaagca ttgtcggcca ggttattgcg 3780  
gtatccccag agggcatccg gcgtgtactt atcgaagggt accgcctggt ggccgggtgag 3840  
gaagtgctca ccggtccggg tggcgcagtt actttggagc tggctgatgg ccgactgctc 3900  
gatcttgac gtgacagcca atggagcgc gatgcgcctg acagtagcac cgacctgagc 3960  
caggcggcag cccaggccgc gccttcggtg gaagagttgc agcaggcaat tgctgctggt 4020  
gttgaccgca ctactgagct tgaagctacc gccgctggcc cgtcatcagc ggtggtggt 4080  
gcgctgggcg gtggccacag cttcgtgatg ctcgaagaga cggctggccg agttgacacg 4140  
acggttggt tcccgaactga cgggctgggc tttgcgggcg taaccgataa ccaagaagtg 4200  
ggcctgctgg aactaacgg caacaacctg gtgaccacac cgacggatac caccgtcgtt 4260  
actgagctga cgcttggcgc aacccttct atcagtgaag cgggtggcgt aatcgtttat 4320  
accgccaccg ttggtcaggc gccgaccacc aacctggtaa ttactctgtc caatggtgcc 4380  
gtgatcgtca ttccggctgg gcagaccagt ggtagcgtca acgtcgcagt tccggcaaac 4440  
gacacacctt acatcgacgg tggccagatt tcggccaccg tgacaggtag tacgggtggt 4500  
ggcgggctga cggtgacatt gccgaaaacg ccagcggtta cccaagtac cgatacaatc 4560  
gacactaaa ccgcgacct gaccgcctcg ccaagcgtga ccgaaggtgg cgtgatcacc 4620

ES 2 712 181 T3

tacaccgtga	ccctgagcaa	ccctgcccag	acgccggtga	ccgtgaccct	gtccaacggc	4680
caggtcatca	ctgttgaagc	cggcaaaacc	cagggcagcg	tcgatttcca	gaccccggcc	4740
aatgacgtct	acaacaacgg	ttcgaccgtc	agcgtcacca	tcgagaacgc	caccggcggt	4800
aatttcgagc	aactgacccc	gaatccgacc	ccggctcaga	ccacgatcaa	cgactcggtc	4860
gacaccacca	ccgcgaccct	gacggcgagc	ccgtcgggtca	ccgaaggcgg	cgatgatcact	4920
tacaccgtga	ccctgagcaa	ccctgcccag	acgccggtaa	ccgtgaacct	gtccaacggc	4980
caaacgatta	ccgttgaagc	gggtaaaacc	cagggcagcg	tcgatttcca	gaccccggcc	5040
aatgacgtct	acaacaacgg	ctcgaccgtc	agcgtcacca	tcgagagcgc	caactggcggc	5100
aacttcgaac	agctgacccc	gaacccgacg	ccggctcaga	ccacgatcaa	cgactcggtc	5160
gacaccacca	ccgcgaccct	gacggcgagc	ccgtcgggtca	ccgaaggcgg	cgatgatcacc	5220
tacaccgtga	ccctgagcaa	tcctgcccag	acgccggtaa	ctgtgaccct	gtccaacggc	5280
caaacgatta	ccgttgaagc	gggtaaaacc	cagggcagcg	tcgatttcca	gaccccggcc	5340
aatgacgtct	acaacaacgg	ttcgaccgtc	agcgtcacca	tcgagaacgc	cacggcggt	5400
aatttcgagc	aactgacccc	gaacccgacg	ccggctcaga	ccacgatcaa	cgactcggtc	5460
gacaccacta	ccgcgaccct	gacggcgagc	ccgtcgggtca	ccgaaggcgg	cgatgatcact	5520
tacaccgtga	ccctgagcaa	tcctgcccag	acgccgggtga	cagtgaccct	gtccaacggc	5580
caaaccatta	ccgttgaagc	cggcaaaacc	cagggcagcg	tcgatttcca	gaccccggcg	5640
aatgacgtct	acaacaacgg	ttcgactgtc	agtgtcacca	tcgagaacgc	caccggcggt	5700
aatttcgagc	aactgacccc	gaatccgacg	ccggctcaga	ccacgatcaa	cgactcggtc	5760
gatgccacca	ccgcgaccct	gacggcgagc	ccgtcgggtca	ccgaaggcgg	cgatgatcacc	5820
tacaccgtga	ccctgagcaa	tcctgcccag	acgccgggtga	cagtgaccct	gtccaacggc	5880
caaaccatta	ccgttgaagc	cggcaagacc	cagggcagcg	tcgatttcca	gaccccggcg	5940
aatgacgtct	acaacaacgg	ttcgaccgtc	agcgtcacca	tcgagaacgc	caactggcggc	6000
aacttcgaac	agctgacccc	gaacccgacg	ccggctcaga	ccacgatcaa	cgactcggtc	6060
gatgccacca	ccgcgaccct	gacggcgagc	ccgtcgggtca	ccgaaggcgg	cgatgatcacc	6120
tacaccgtga	ccctgagcaa	tcctgcccag	acgccgggtga	cagtgaccct	gtccaacggc	6180
caaaccatta	ccgttgaagc	cggcaagacc	cagggcagcg	tcgatttcca	gaccccggcg	6240
aatgacgtct	acaacaacgg	ttcgaccgtc	agcgtcacca	tcgagaacgc	cacaggcggt	6300
aatttcgagc	aactgacccc	gaatccgacc	ccggctcaga	ccacgatcaa	cgactcggtc	6360
gatgccacca	ccgcgaccct	gacggcgagc	ccgtcgggtca	ccgaaggcgg	cgtaatcacc	6420
tacaccgtga	ccctgagcaa	tcctgcccag	acgccggtaa	ccgtgaccct	gtccaacggc	6480

ES 2 712 181 T3

caggatcatca ctgttgaagc cggcaaaacc cagggcagcg tcgatttcca gaccccggcc 6540  
 aatgacgtct acaacaacgg ttcgaccgtc agcgtcacca tcgagaacgc caccggcgcc 6600  
 aacttogaac agctgacccc gaacccgacg ccggctcaga ccacgatcaa cgactcggtc 6660  
 gatgccacca ccgcgaccct gacggcgagc ccgtcgggtca ccgaaggcgg cgtgatcacc 6720  
 tacaccgtga tcctgagcaa tcctgccag acgcccgtta ccgtgaccct gtccaacggc 6780  
 caaacatta ccgttgaagc cggcaagacc cagggcagcg tcgatttcca gaccccggcg 6840  
 aatgacgtct acaacaacgg ttcgactgtc agcgtcacca tcgagaacgc cacaggcggc 6900  
 aatttogaac aactgacccc gaacccgacg ccggctcaga ccacgatcac cgactcggtc 6960  
 gacaccacta ctgcgaccct gaccgcctcg ccaagcgtga ccgaaggcgg cgtgatcacc 7020  
 tacaccgtga ccctgagcaa tcctgccag acgcccgtta ccgtgaccct gtccaacggc 7080  
 caaacatta ccgttgaagc gggtaaaacc cagggcagcg tcgatttcca gaccccggcc 7140  
 aatgacgtct acaacaacgg ctgcaccgtc agcgtcacca tcgagagcgc cacggcgccg 7200  
 aacttogaac atctgactcc gaatccgacc ccagcctcga ctgtcatcaa tgacagcatc 7260  
 gataccgtca ccgtaagtat tgtcagcaat ggcaatgtga ccgaagacca gcagccttcc 7320  
 ttactgtga aagtaagcca ggcgctggac cgtccggtga cggtaaccct gtctaacggc 7380  
 gacaccgtga cgatcgaagc cggttaagacc gaagtcgagt acaagacctc ggttcagggc 7440  
 gatgacgtct atcttgatgc aggtccatc acgctcagtg ttaccgagcgc tacagtccg 7500  
 ggtgccacct tcgagaagct ggccttgggt ggcgccgcta ccgttgagat ctcggaact 7560  
 atcagtgaag tgggtggcaa actgactgcc accccttcgg tgaccgaagg cggtgagatc 7620  
 acctacacca tcaccctgac caacaaagac ggtctgccga tcaataacca ctcggaagt 7680  
 tacttcaagc tgaccgatgg cactactgtc gtcgtggcag ccaacagcac caccggttcg 7740  
 gccactgtag ccgccccgga caacgtctat gtcggcacca accagccggt ggtcaatgcc 7800  
 atcgagcggc tcagcggcgc agatgatgg aagttcgaaa acctgaacct ggacaagacc 7860  
 ccggtcagca ccgaggtcac cgacgagcca ggtacgccag gcaacgaagg cgatatactc 7920  
 aaggtcacca tcacggccga ccagacttcg gtagccgaga acgtcaaacc gaccttcact 7980  
 gtgcacatca acaccgacct ggcctcagac ctggtcgtga ccctgagcaa caacgctcag 8040  
 gtcaccatca aggccggcga aaccagcgcga ccgtacactc acgacgcgca gggcgatgac 8100  
 gtctatcagg atgcgggcca gatcagcctg ggcataact cggcgggtga gccactggt 8160  
 gctcgttcg agaacctcga gttggcggt gccgcgaaag tggatgtcac cgacacctc 8220  
 gacgaggtgg tggccaagct gactgccact ccgtcgggtca ccgaaggcgg cgagatcacc 8280  
 tacaccatca cgctgaccaa caaagcggc ctgccgatca ataaccactc ggagctgtac 8340  
 ttcaagctga ccgatggcac tactgtcgtc gtggcagcca acagcaccac cggttcggcc 8400

ES 2 712 181 T3

actgtagccg ccccgacaa cgtctatgtc ggcaccaacc agccggtggt caatgccatc 8460  
 gacgcggtca ggggcgcaga tgcattggaag ttcgaaaacc tgaacctgga caagaccccg 8520  
 gtcagcaccg aggtcaccga cgagccaggc actccaggca acgaaggcga catcgtcaag 8580  
 gtcaccatca cggctgacca gacttcggtg gccgagaacg tcaagccgac cttcacccgtg 8640  
 cacgtcaacc agccgctggc ccacgacctg gtcgtgacct tgagcaacaa cgcccaggtc 8700  
 accatcaagg ctggtgagac cagcgcgccg tacaccacg acgcgcaagg cgatgacgtc 8760  
 tatcaggacg ctggccagat cagcttgggc atcaactcgg cggtgagcgc cactggtgct 8820  
 gcattcgaga accttgagct gggcgggtgct gcttcggttc aagtcaccga caccctcgac 8880  
 gaagtgggtg ccaagctgac tgccaccctt tcggtgaccg aaggcgggtg gatcacctac 8940  
 accatcaccg tgaccaacaa agacggtctg ccgatcaata accactcgga gctgtacttc 9000  
 aagctgaccg acggcaccac tgtcgtcgtg gcagccaaca gcaccacggg ctccggcgact 9060  
 gcaaccgcac cagacaacgt ctatgtcggc accaacgcgc cggtgatcaa tgccatcgac 9120  
 gcggtcagcg gcgcagatgc gtggaagttt gaaaacctga acctggacaa gaccccggtc 9180  
 agcaccgagg tcaccgacga gccaggcact ccaggcaacg aaggcgacat cgtcaaggtc 9240  
 accatcacgg ccgaccagac ttcggtggcc gagaacgtca aaccgacctt caccgtgcac 9300  
 gtcaaccagc cgctggccca cgacctggtc gtgacctga gcaacaatgc tcaggtcacc 9360  
 atcaaggctg gcgaaaccag cgcgccgtac acccacgatg cgcaaggcga tgacgtctat 9420  
 caggacgctg gccagatcag cctgggcatc aactcggcag tagacgccac tggtgctgog 9480  
 ttcgagaacc ttgagctggg cggttccgct tcggttcaag tcaccgacac cctcgacgaa 9540  
 gtggtggcca agctgactgc cacccttcg gtgaccgaag gcggtgagat cacctacacc 9600  
 atcaccctga ccaacaaaga cggctctgcc atcaacaacc actcggagct gtacttcaag 9660  
 ctgaccgacg gcaccaccgt cgtcgtggca gccaacagca ccaccggtc gccactgca 9720  
 accgcaccag acaacgtcta tgtcggcacc aacgcgccgg tggtaaatgc catcgacgcg 9780  
 gtcagcggcg cagatgcgtg gaagtctgaa aacctgaacc tggacaagac cccggtcagc 9840  
 accgaggtga ccgacgagcc aggcacacca ggtaacgaag gcgatatcgt caaggtcacc 9900  
 atcaccgccg accaggcttc ggtggccgag aacgtcaaac cgaccttac cgtgcacgtc 9960  
 aaccagccgc tggcccacga cctggtcgtg accctgagca acaacgctca ggtcaccatc 10020  
 aaggctggcg aaaccagcgc gccgtacacc cagcagcgc aaggcgatga cgtctatcag 10080  
 gatgcgggcc agatcagcct cggcatcacg tccgctgtgg atgtagacgg tcacaccttc 10140  
 gagaacctgc aactggggcg caacgcttcg gttcaagtga ccgacacct cgacgaggtg 10200  
 gtggcgaagc tgaccgcgac cccttcagtc accgaaggcg gtgagatcac ctacaccatc 10260

ES 2 712 181 T3

accctgacca acaaagatgg tctgccgatc aacaaccact cggagctgta cttcaagctg 10320  
 accgacggca cactgtcgt cgtggcagcc aacagcacca cgggctcggc cactgcaacc 10380  
 gcaccagaca acgtctatgt cggcaactaat gcgccggtgg tcaatgccat cgacgccgtc 10440  
 agcggcgcag atgcgtggaa gttcgaaaac ctgaacctgg acaagacccc ggtcagcact 10500  
 accgtcactg acgagccagg cactccaggc aacgaaggcg acatcgtcaa ggtcaccatc 10560  
 acggccgacc agacctcggc agccgagaac gtcaaaccga cttcactgt gcacgtcaat 10620  
 cagccgctgg cccacgacct gatcgtgacc ctgagcaaca acgctcaggt caccatcaag 10680  
 gccggtgaaa ccagcgcgcc gtacaccac gagcgcgaag gcgatgacgt ctatcaggac 10740  
 gctggccaga tcagcttggg catcaactcg gcggtggacg cactggtgc tgcgttcgag 10800  
 aacctgcaac tggcggcaa cgcttcggtt caagtgaccg acaccctcga cgaagtctg 10860  
 gcgaagctga ccgaccccc ttcggtgacc gaaggcggcg agatcaccta caccatcacg 10920  
 ctgaccaaca aagacggtct gccgatcaat aaccactcgg agctgtactt caagctgacc 10980  
 gatggcacta ctgtcgtcgt ggcagccaac agcaccaccg gttcggccac tgtagccgcc 11040  
 ccggacaacg tctatgtcgg caccaacgcg ccggtggtca atgccatcga cgcggtcagc 11100  
 ggcgcagatg cgtggaagt cgaaaacctg aacctggaca agaccccggt cagcactacc 11160  
 gtcactgacg agccaggcac tccaggcaac gaaggcgaca tcgtcaaggt caccatcacg 11220  
 gccgaccaga cttcggtagc cgagaacgtc aagccaacct tcaccgtgca cgtcaaccag 11280  
 ccgctggctc acgacctggt cgtgacctg agcaacaacg ctcaggtcac catcaaggcc 11340  
 ggtgagacca gtgcgccgta caccacgac gcgcaaggcg atgacgtcta ccaggacgct 11400  
 ggccagatca gcctgggcat cacgtccgct gtggatgtag acggtcacac cttcgagaac 11460  
 ctgcaactgg gggcaacgc ttcggttcaa gtgaccgaca ccctcgacga ggtggtggcg 11520  
 aagctgaccg cgacccttc ggtcaccgaa ggcggtgaga tcacctacac catcaccctg 11580  
 accaacaag acggtctgcc gatcaacaac cactcggagc tgtacttcaa gctgaccgac 11640  
 ggcaccaccg tcgtcgtggc agccaacagc accaccggtt cggcactgc aaccgccccg 11700  
 gacaacgtct atgtcggcac caacgcgccg gtggtcaatg ccatcgacgc cgtcagcggc 11760  
 gcagatgctt ggaagttcga aaacctgaat ctggacaaga ccccggtcag caccgaggtc 11820  
 actgacgagc caggcactcc aggcaacgaa ggcgatatcg tcaaagtcac tattactgct 11880  
 gaccagacct cgggtggccga gaacgtcaaa ccgaccttca ccgtacatat caacaccgcc 11940  
 ttggcccacg acctggtcgt gaccctgagc aacaacgccc aggtcaccat caaggccggc 12000  
 gaaaccagcg cgcgctacac ccacgctgcg cagggtgatg acgtttaca cgacgctggc 12060  
 cagatcagcc tgggcatcac ctcgccggtg gacgccactg gtgcaacctt cgagaacctg 12120  
 gcgctgggcg gtgccgcaa ggtggatgtc accgacacca ccgacgaagt cgtggccaag 12180



ES 2 712 181 T3

ttgaccgcca	ccccgtcgg	caccgaaggc	ggcgagatca	cctacacat	cacgctgacc	12240
aacaagacg	gtctgccaat	caacaaccac	agtgcattga	ccttcacgct	gagcgacggc	12300
aaaaccgtca	tcaccgtgcc	ggctaattggc	accgtgggta	ctgccactgt	caactgccccg	12360
gacaacgtct	acgtcggcac	caacgaccct	gtgatcaaat	cgatcgcaac	cggtgaaggt	12420
gcggatgtcg	gcaagttcga	gcaactgacg	ctggacaaga	ccccggtcag	cacgtcggtc	12480
accgacgagc	cgggcaccac	aggcaacgaa	ggcgacttgg	tcaaggtcac	catcacagcc	12540
gaccagacct	cggtggctga	gaacgtcaaa	ccgaccttca	ccgtgcacgt	caaccagccg	12600
ctggcccacg	acctggctgt	gaccctgagc	aacaatgcc	aggtcacat	caaggctggc	12660
gaaaccagcg	cgccgtacac	ccacgctgcg	cagggtgatg	acgtttaca	cgacgctggc	12720
cagatcagcc	tgggcatcac	ctcggcgggtg	gacgccactg	gtgacgacct	cgagaacctg	12780
gagctgggcg	gtgcccgcaa	ggtggatgtc	accgacacca	ccgacgaagt	cggtggccaag	12840
ttgaccgcca	ccccgtcgg	caccgaaggc	ggcgagatca	cttacacat	caccctgacc	12900
aacaagatg	gtctgccgat	caacaaccac	agtgcattga	ccttcacgct	gagcgacggc	12960
aaaaccgtca	tcaccgtgcc	ggccaacggc	accgtgggca	ctgcaaccgt	gactgccccg	13020
gacaacgtct	acgtcggtag	caacgaccct	gtgatcaaat	cgatcgcaac	cggtgaaggt	13080
gcggacgtcg	gtaagttcga	gcaactgacg	ctggacaaga	cgccggtcag	caactaccgtc	13140
accgacgagc	ctggtacccc	aggcaacccg	ggcggcagca	acgaaggcga	cctggtcaag	13200
gtcaccatca	cgcccgacca	gacttcggta	gcccgagaacg	tcaaaccgac	cttcactggt	13260
cacgtcaacc	agccgctggc	tcacgacctg	gtcgtgacct	tgagcaaca	tgcccaggtc	13320
accatcaagg	ccggtgaaac	cagcgcgccg	tacaccacg	ctgctcagg	tgatgacgtc	13380
tacaacgacg	ctggccagat	cagcctgggt	atcaactcgg	cggtggacgc	caactggtgcg	13440
accttcgaga	acctcgagtt	ggcgggtgcc	gcgaaggtgg	atgtcaccga	caccaccgac	13500
gaagtgggtg	ccaagttgac	cgcgaccctt	tcggtgacct	aaggcgggtga	gatcaactac	13560
accattacc	tgaccaaca	agacggttg	ccgatcaata	accacagtgc	attgaccttc	13620
acgtgagcg	acggcaaac	cgatcatcacc	gtgccggcca	acggcaccgt	gggcaactgca	13680
accgtgactg	ccccggacia	cgctctacgtc	ggtaccaacg	accctgtgat	caaatcgatc	13740
gcaaccggtg	aagggtgcga	cgctcgtaag	ttcgagcaac	tgacgctgga	caagacgccg	13800
gtcagcacta	ccgtcaccga	cgagcctggt	accccaggca	acccgggccc	cagcaacgaa	13860
ggcgacctgg	tcaaggtcac	catcacggcc	gaccagactt	cggtagccga	gaacgtcaaa	13920
ccgaccttca	ctgttcacgt	caaccagccg	ctggctcagc	acctggctgt	gaccctgagc	13980
aacaatgcc	aggtcacat	caaggccggt	gaaaccagcg	cgccgtacac	ccacgctgct	14040

ES 2 712 181 T3

cagggatgatg acgtctacaa cgacgctggc cagatcagcc tgggtatcac gtctgctgtg 14100  
 gatgtagacg gtcgcacctt cgaaaacctg gagctggggc gtgcggcttc ggttcaagtg 14160  
 accgatacca ccgacgaagt ggtggccaag ttgaccgca cccttcggt gaccgaaggc 14220  
 ggtgagatca cttacacat taccctgacc acaaagacg gcttgccgat caataaccac 14280  
 agtgattga ccttcacgct gagcgacggc aaaacctgca tcacctgcc ggccaacggc 14340  
 accgtgggca ctgcaacctg gactgccccg gacaacctct acgtcggtag caacgacct 14400  
 gtgatcaaat cgatcgcaac cgttgaaggt gcgatgtcg gcaagttcga acaactgaca 14460  
 ctgacaaga ccccggtcag cactacctgc accgacgagc ctggtacccc aggcaaccg 14520  
 ggccgagca acgaaggcga cctggtcaag gtcaccatca ccgccacca gacttcggtg 14580  
 gccgagaacg tcaaaccgac cttcactgtt cacgtcaacc agccgctggc tcacgacctg 14640  
 gtcgtgacct tgagcaacaa cgcccaggtc accatcaagg ccggcgaaac cagcgcgccg 14700  
 tacaccacg ctgcccaggc cgatgacgtc tacaacgatg ctggccagat cagcctgggt 14760  
 atcaactcgg ccggtggatgc cactggtgag accttcgaga acctgcaact gggcggcaac 14820  
 gcttcggttc aagtgaccga caccaccgac gaagtgggtg ccaagctgac cgcgaccccg 14880  
 tcggtcaccg aaggcggcga gatcacttac accatcacgc tgaccaacaa agacggtctg 14940  
 ccgatcaaca accacagtgc attgacctt acgctgagcg acggcaaac cgtcatcacc 15000  
 gtgccggcca acggcaccgt gggcactgct accgtcactg ccccgacaa cgtctacgtc 15060  
 ggtaccaacg accctgtgat caaatcgatc gcaaccgttg aagtgcgga cgtcggcaag 15120  
 ttogagcaac tgacgctgga caagacggc gtcagcacgt ccggtaccga cgagccagg 15180  
 acgccgggca acgaaggcga cctggtcaag gtcaccatca cagccacca gacttcggtg 15240  
 gccgagaacg tcaaaccgat cttcaccgtg cacgtaaacc agccgctggc tcacgacctg 15300  
 gtcgtgacct tgagcaacaa cgcccaggtc accatcaagg ccggcgagac cagcgcgcca 15360  
 tacaccacg ctgcccaggc cgatgacgtc tacaacgacg ctggccagat cagcctgggc 15420  
 atcacgtctg ctgtggatgt agacggtcgc accttcgaga acctgcaact gggcggcaac 15480  
 gcttcggttc aagtaccga caccaccgac gaagtgggtg ccaagctgac cgcgaccccg 15540  
 tcggtgaccg aaggcggcga gatcacctac accatcacgc tgaccaacaa agacggtctg 15600  
 ccgatcaaca accacagtgc attgacctt acgctgagcg acggcaaac cgtcatcacc 15660  
 gtgccggcca acggtaccgt gggtaactgct accgtgactg ccccgacaa cgtctacgtc 15720  
 ggcaccaacg accctgtcgt gatgtogatc gcaaccgttg gagtgcgga cgtcggcaag 15780  
 ttogagcaac tgacgctgga caagacggc gtcagcacta ccgtcaccga cgagcctggc 15840  
 accccaggca atccggggcg cagcaacgaa ggcgacctg tcaaggtcac catcacggcc 15900  
 gaccagactt ccggtggcga gaacgtcaaa ccgacgttca ccgtacacgt caaccagccg 15960

ES 2 712 181 T3

ctggcccacg acctggtcgt gaccctgagc aacaacgccc aggtcaccat caaggctggc 16020  
gagaccagcg cgccgtacac ccacgctgcg caggggatg acgtttacaa cgacgctggc 16080  
cagatcagcc tgggcatcaa ctcggcggtg gacgccactg gtgcgacctt cgagaacctg 16140  
gcgctgggcg gtgccgcaa ggtggatgtc accgacacca ccgacgaagt cgtggccaag 16200  
ttgaccgcca ccccgtcggt caccgaaggc ggcgagatca cctacacat cacgctgacc 16260  
aacaagacg gtctgccaat caacaaccac agtgcattga ccttcacgct gagcgacggc 16320  
aaaaccgtca tcaccgtgcc ggctaattggc accgtgggta ctgccactgt cactgccccg 16380  
gacaacgtct acgtcggcac caacgaccct gtgatcaaat cgatcgcaac cgttgaaggc 16440  
gcggatgtcg gcaagttcga gcaactgacg ctggacaaga ccccggtcag cacgtcggtc 16500  
accgacgagc cgggcacccc aggcaacgaa ggcgacttgg tcaaggtcac catcacagcc 16560  
gaccagacct cgggtggctga gaacgtcaaa ccgaccttca ccgtgcacgt caaccagccg 16620  
ctggcccacg acctggtcgt gaccctgagc aacaatgccc aggtcacat caaggccggt 16680  
gaaaccagcg cgccatacac ccacgctgcg caaggcgatg acgtctacaa cgacgctggc 16740  
cagatcagcc tgggcatcac gtccgctgtg gatgtagacg gtcgcacctt cgaaaaacctg 16800  
caactgggcg gtgcggctac cgttcaagtg accgatacca ccgacgaagt agtggccaag 16860  
ctgaccgcca ccccttcggt caccgaaggc ggcgagatca cttacacat caccctgacc 16920  
aacaagacg gcctgccgat caacaaccac agtgcattga ccttcacgct gagcgacggc 16980  
aaaaccgtca tcaccgtgcc ggctaattggc accgtgggta ctgccaccgt gactgccccg 17040  
gacaacgtct acgttggcac caacgaccct gtgatcaaat cgatcgcaac cgttgaaggc 17100  
gcggatgtcg gcaagttcga gcaactgaca ctggacaaga ccccggtcag cacgtcggtt 17160  
accgacgagc caggtacgcc gggcaacgaa ggcgacctgg tcaaggtcac catcacagcc 17220  
gaccagactt cgggtggcca gaacgtcaaa ccgaccttca ctgttcacgt caaccagccg 17280  
ctggctcagc acctggtcgt gaccctgagc aacaatgccc aggtcacat caaggccggc 17340  
gagaccagcg cgccatacac ccacgctgcg cagggcgatg acgtttacaa cgatgctggc 17400  
cagatcagcc tgggtatcaa ctcggcggtg gacgccactg gcgctacgtt cgagaacctg 17460  
caactgggcg gtgcggctac cgttcaagtg accgatacca ccgacgaagt agtggccaag 17520  
ctgaccgcca ccccttcggt caccgaaggc ggcgagatca cttacacat caccctgacc 17580  
aacaagacg gcctgccgat caacaaccac agtgcattga ccttcacgct gagtgacggc 17640  
aaaaccgtca tcaccgtgcc ggccaacggc accgtgggca ctgctaccgt cactgccccg 17700  
gacaacgtct acgtcggcac caacgaccct gtcgtgatgt cgatcgcaac cgttggaggc 17760  
gcgacgctcg gtaagttcga gcaactgaca ctcgacaaaa ccccggtcag cacgtcggtc 17820

ES 2 712 181 T3

accgacgagc cgggtacccc aggcaacgaa ggcgacctgg tcaaggcac catcaccgcc 17880  
 gaccagactt cggtagccga gaacgtcaag ccgaccttca ccgtgcacgt caaccagccg 17940  
 ctggctcacg acctggctgt gaccctgagc aacaacgccc aggtcaccat caaggccggc 18000  
 gaaaccagcg cgccgtacac ccacgctgcg cagggcgatg acgtctaaa cgatgctggc 18060  
 cagatcagcc tgggcatcaa ctcggcggtg gacgccactg gtgcgacctt cgagaacctc 18120  
 gagctgggcg gtgccgcaa ggtggatgtc accgacacca ccgacgaagt ggtggccaag 18180  
 ctgaccgca ccccttcggt aaccgaaggc ggcgagatca cctacacat cacgctgacc 18240  
 aaaaagatg gtctgcctat cgacaagcat ggcgctgga cctttacctt ggacgatggc 18300  
 aaaaccacca tcaccatccc ggctaacggt acaaccggca ctgccaccgt gactgccccg 18360  
 gacaacgtct acgtcggcac caacgacctt gtctgatgt cgatcgcaac cgttgagggt 18420  
 gcggacgtcg gtaagtctga gcaactgaca ctcgacaaga ccccggtcag cacgtcggtc 18480  
 accgacgagc cgggtacccc aggcaacgaa ggcgacctgg tcaaggcac catcaccgcc 18540  
 gaccagactt cggtagccga gaacgtcaaa ccgaccttca ctgttcacgt caaccagccg 18600  
 ctggctcacg acctggctgt gaccctgagc aacaacgctc aggtcaccat caaggctggc 18660  
 gagaccagcg cgccgtacac ccacgctgcg caggggatg acgtctaaa cgatgctggc 18720  
 cagatcagcc tgggcatcac gtccgctgtg gatgtagacg gtcgcacctt cgaaaacctg 18780  
 gagctgggcg gtgccgcttc ggtccaagtg accgacacc tgcacgaagt ggtggccaaa 18840  
 ctgaccgca ccccttcggt gaccgaaggc ggtgagatca cttacacat cacgctgacc 18900  
 aaaaagacg gtctgccgat caacaaccac agtgattga ccttcacgct gagcgacggc 18960  
 aaaaccgtca tcaactgtgc ggccaacggc accgtgggca ctgccaccgt gactgctccg 19020  
 gacaacgtct acgtcggcgc taacgacctt gtctgatgt cgatcgcaac cgttgagggc 19080  
 gcggatgtcg gcaagtctga acagcttacg ctggacaaga cgcgggtcag cacgtcggtg 19140  
 accgacgagc caggtacgcc gggcaacgaa ggcgacttgg tcaaggcac catcaccgcc 19200  
 gaccagacct cggtagccga gaacgtcaag ccgaccttca ccgtgcacgt caaccagccg 19260  
 ctggcccacg acctggctgt gaccctgagc aacaacgccc aggtcaccat caaggctggc 19320  
 gaaaccagcg cgccgtacac ccacgctgcg caggggatg acgtttaaa cgacgctggc 19380  
 cagatcagcc tgggcatcac ctcggcggtg gacgccactg gtgcgacctt cgagaacctg 19440  
 gagctgggcg gtgcccgttc ggttcaagtg accgacacca ccgacgaagt ggtggccaag 19500  
 ctgactgca ccccgctcgt caccgaaggc ggcgagatca cctacacat caccctgacc 19560  
 aaaaagacg gcctgccgat caacaaccac agtgattga ccttcacgct gagcgacggc 19620  
 aagaccgtca tcaccgtgcc ggccaacggc accgtgggca ctgcaaccgt gactgccccg 19680  
 gacaacgtct acgtcggcag caacgacctt gtctgatgt cgatcgctac cgttgccgggt 19740

ES 2 712 181 T3

gcggacgtcg gtaagttcga gcaactgacg ctggacaaga cgccggtcag cacgtcggtc 19800  
 accgacgagc caggtacccc aggcaacgaa ggcgacctgg tcaaggtcac catcacccgc 19860  
 gaccagactt cgggtggccga gaacgtcaaa ccgaccttca ctgttcacgt caaccagccg 19920  
 ctggctcacg acctggtcgt gaccctgagc aacaatgccc aggtcaccat caaggccggc 19980  
 gagaccagcg cgccgtacac ccacgctgcg cagggcgatg acgtttacaa cgatgctggc 20040  
 cagatcagcc tgggcatcaa ctcggcggtg gacgccactg gtgcgacctt cgagaacctg 20100  
 caactgggcy gcaacgcttc ggttcaagtg accgacacca ccgacgaagt ggtggccaag 20160  
 ctgactgcga ccccgctcggc caccgaaggc ggcgagatca cctacacat cacgctgacc 20220  
 aacaaagacg gtctgccaat caacaaccac agtgattga ccttcacgct gagcgacggc 20280  
 aaaaccgtca tcaccgtgcc ggccaacggc accgtgggca ctgctaccgt cactgccccg 20340  
 gacaacgtct acgtcggcac caacgacct gtctgatgt cgatcgcaac cggtggaggt 20400  
 gcggacgtcg gtaagttcga gcaactgacg ctggacaaga ccccggtcag cactaccgtc 20460  
 accgacgagc ctggcacccc aggcaacccg ggcggcagca acgaaggcga cctggtcaag 20520  
 gtcaccatca cggccgacca gacttcggtg gccgagaacg tcaaaccgac gttcaccgta 20580  
 cacgtcaacc agccgctggc ccacgacctg gtctgacct tgagcaacaa cgcccaggtc 20640  
 accatcaagg ctggcgagac cagcgcgccg tacaccacg ctgcgcaggg tgatgacggt 20700  
 tacaacgacg ctggccagat cagcctgggc atcaactcgg cgggtggacgc cactggtgcy 20760  
 accttcgaga acctcgagct gggcggtgcy gcttcggttc aagtgaccga taccaccgac 20820  
 gaagtggtyg ccaagctgac cgcgacgcct tcggtgaccg aaggtygtga gatcacctac 20880  
 accatcacc tgaccaacaa agatggtctg ccgatcaaca accacagtgc attgaccttc 20940  
 accctgagcy acggcaaaac cgtcatcacc gtgccggcta atggcaccgt ggtactgccc 21000  
 actgtcactg ccccgataa cgtctacgtc ggcagcaacg accctgtcgt gatgtcgatc 21060  
 gctaccgttg gcggtgcyga tgtcggcaag ttcgagcaac tgacactgga caagaccccg 21120  
 gtcagcacgt cggttaccga cgagccaggc acgcccggca acgaaggcga cctggtcaag 21180  
 gtcaccatca cggccgacca gacttcggtg gccgagaacg tcaaaccgac cttcactggt 21240  
 cacgtcaacc agccgctggc tcacgacctg gtctgacct tgagcaacaa tgcccaggtc 21300  
 accatcaagg ccggtgaaac cagcgcgccg tacaccacg ctgcgcaggg tgatgacgtc 21360  
 tacaacgatg ctggccagat cagcctgggt atcaactcgg cgggtggacgc cactggtgcy 21420  
 accttcgaga acctcgagct gggcggtgcy gcttcggttc aagtgaccga caccaccgac 21480  
 gaagtagtyg ccaagctgac tgcgaccccg tcggtgaccg aaggcgtga gatcacttac 21540  
 accattacc tgaccaacaa agacggtctg ccgattaaca accacagtgc attgaccttc 21600

ES 2 712 181 T3

accctgagcg acggcaaaac cgtcatcacc gtgccggcta atggcaccgt gggactgccc 21660  
 actgtcactg ccccgataa cgtctacgtc ggcagcaacg accctgtcgt gatgtcgatc 21720  
 gctaccgttg gcggtgcgga tgtcggcaag ttcgagcaac tgacgtgga caagacgccg 21780  
 gtcagcacgt cggttaccga cgagccaggc acgccgggca acgaaggcga cctgggtcaag 21840  
 gtcacatca cggccacca gacctcggcg gccgagaacg tcaagccgac cttcaccgtg 21900  
 cacgtcaacc agccgctggc ccacgacctg gtcgtgacct tgagcaacaa cgcccaggtc 21960  
 accatcaagg ctggcgaaac cagcgcgccg tacaccacg ctgcgcaagg tgatgacgtc 22020  
 tacaacgacg ctggccagat cagcctgggt atcaactcgg cggtagacgc cactgggtgcg 22080  
 accttcgaga acctggagct gggcgggtgcc gcgaagggtg atgtcaccga caccaccgac 22140  
 gaagtgcgtg ccaagttgac cgccaccccg tcggtcaccg aaggcggcga gattacctac 22200  
 accatcacgc tgaccaacaa agacggcctg ccgatcaaca accacagtgc attgaccttc 22260  
 acgctgagcg acggcaaaac cgtcatcacc gtgccggcca acggcaccgt gggactgccc 22320  
 accgtcactg ccccgataa tgtctacgtc ggtaccaacg accctgtcgt gatgtcgatc 22380  
 gcaaccgttg aaggcgcgga cgttggcaag ttcgagcaac tgacgtgga caagacgccg 22440  
 gtcagcacgt cggtagaccga cgagccgggt accccaggca acgaaggcga cttgggtcaag 22500  
 gtcacatca cggccacca gacctcggcg gccgagaacg tcaagccgac gttcaccgtg 22560  
 cacatcaaca ccgccttggc tcacgacctg gtcgtgacct tgagcaacaa tgcccaggtc 22620  
 atcatcaagg ctggcgaaac cagcgcgccg tacaccacg ctgcgcaagg cgatgacgtc 22680  
 tacaacgatg ctggccagat cagcctgggc attaattcgg cagtggacgc cactgggtgcg 22740  
 accttcgaga acctgcaact gggcggcaac gcttcgggtc aagtgaccga caccaccgac 22800  
 gaagtagtgg ccaagttgac cgcgaccccg tcggtgaccg aaggcggcga gattacctac 22860  
 accatcacgc tgaccaacaa agacggcctg ccgatcaaca accacagtgc attgaccttc 22920  
 acgctgagcg acggcaaaac cgtcatcacc gtgccggcca acggcaccgt gggactgccc 22980  
 accgtgactg ctccggataa cgtctacgtc ggtaccaacg accctgtcgt gatgtcgatc 23040  
 gctaccgttg aaggtgcgga cgttggcaag ttcgagcaac tgacactcga caagaccccg 23100  
 gtcagcactt cggtagaccga cgagccgggt accccaggca acgaaggcga cccgggtcaag 23160  
 gtcacatca cggccacca gacctcggcg gccgagaacg tcaaacgac cttcactgtg 23220  
 cacgtcaacc agccgctggc ccacgacctg gtcgtgacct tgagcaacaa cgcccaggtc 23280  
 accatcaagg ccggcgaaac cagcgcgccg tacaccacg acgcaagg cgatgacgtc 23340  
 tacaacgatg ctggccagat cagcctgggc atcaattcgg cggtagacgc caccggcgct 23400  
 acattcgaga acctggaact ggggtggtgcg gcttcgggtc aagtgaccga caccaccgac 23460  
 gaagtagtgg ccaagctgac cgcgacccct tcggttaaccg aaggcggcga gatcacctac 23520

ES 2 712 181 T3

accatcacgc tgaccaacaa agatggtctg cctatcgaca agcatgcggc gctgaccttt 23580  
 accctggacg atggcaaaac caccatcacc atcccggcta acggtacaac cggaactgcc 23640  
 accgtgactg ccccggacaa cgtctacgtc ggcaccaacg accctgtcgt gatgtcgatc 23700  
 gcaaccgttg gaggtgcgga cgtcggtaag ttcgagcaac tgacactcga caagaccccg 23760  
 gtcagcacgt cggtcaccga cgagccgggt accccaggca acgaaggcga cctggtcaag 23820  
 gtcaccatca ccgccgacca gacttcggtg gccgagaacg tcaaaccgac cttcaactgtt 23880  
 cacgtcaacc agccgctggc tcacgacctg gtcgtgacct tgagcaacaa cgctcaggtc 23940  
 accatcaagg ctggcgagac cagcgcgccg tacaccacg ctgcgcaggg tgatgacgtc 24000  
 tacaacgatg cgggccagat cagcctgggc atcacgtccg ctgtggatgt agacggtcgc 24060  
 accttcgaaa acctggagct gggcggtgcc gcttcggtcc aagtgaccga caccctcgac 24120  
 gaagtggtag ccaaactgac cgccaccctc tcggtgaccg aaggcggtag gatcacttac 24180  
 accatcacgc tgaccaacaa agacggtctg ccgatcaaca accacagtgc attgaccttc 24240  
 acgctgagcg acggcaaaac cgtcatcact gtgccggcca acggcacctg gggcaactgcc 24300  
 accgtgactg ctccggacaa cgtctacgtc ggcgctaacg accctgtcgt gatgtcgatc 24360  
 gcaaccgttg agggcgcgga tgtcggcaag ttcgaacagc ttacgctgga caagacgccg 24420  
 gtcagcacgt cggtgaccga cgagccaggc acgccgggca acgaaggcga cttggtcaag 24480  
 gtcaccatca ccgccgacca gacctcggtg gccgagaacg tcaagccgac cttcaactgtg 24540  
 cacgtcaacc agccgctggc ccacgacctg gtcgtgacct tgagcaacaa cgcccaggtc 24600  
 accatcaagg ccggcgaaac cagcgcgccg tacaccacg ctgcgcaagg cgatgacgtc 24660  
 tacaacgacg ctggccagat cagcctgggc atcacgtccg ctgtggatgt agacggtcgc 24720  
 accttcgaaa acctgcaact gggcggtagc gctaccgttc aagtgaccga taccaccgac 24780  
 gaagtagtag ccaagctgac cgcgaccctc tcggtcaccg aaggtagcga gatcacttac 24840  
 accatcacc tgaccaacaa agacggcctg ccgatcaaca accacagtgc attgaccttc 24900  
 acgctgagcg acggcaaaac cgtcatcacc gtgccggcta atggcacctg gggtaactgcc 24960  
 accgtgactg ccccggacaa cgtctacgtt ggcaccaacg accctgtgat caaatcgatc 25020  
 gcaaccgttg aaggtagcga tgtcggcaag ttcgagcaac tgacactgga caagaccccg 25080  
 gtcagcacgt cggttaccga cgagccaggc acgccgggca acgaaggcga cctggtcaag 25140  
 gtcaccatca cagccgacca gacttcggtg gccgagaacg tcaaaccgac cttcaactgtt 25200  
 cacgtcaacc agccgctggc tcacgacctg gtcgtgacct tgagcaacaa tgcccaggtc 25260  
 accatcaagg ccggcgagac cagcgcgccg tacaccacg ctgcgcaggg cgatgacgtt 25320  
 tacaacgatg ctggccagat cagcctgggt atcaactcgg cggtagacgc cactggcgct 25380

ES 2 712 181 T3

acgttcgaga acctgcaact gggcggtgcg gctaccgttc aagtgaccga taccaccgac 25440  
 gaagttagtg ccaagctgac cgcgaccctc tcggtcaccg aaggtggcga gatcacttac 25500  
 accatcacc tgaccaacaa agacggcctg ccgatcaaca accacagtgc attgaccttc 25560  
 acgctgagtg acggcaaaac cgtcatcacc gtgccggcca acggcaccgt gggcactgct 25620  
 accgtcactg ccccggacaa cgtctacgtc ggcaaccaacg accctgtcgt gatgtcgatc 25680  
 gcaaccgttg gaggtgcgga cgtcggtaag ttcgagcaac tgactctcga caaaacccccg 25740  
 gtcagcacgt cggtcaccga cgagccgggt accccaggca acgaaggcga cctgggtcaag 25800  
 gtcacatca ccgccgacca gacttcggtg gccgagaacg tcaagccgac cttcaccgtg 25860  
 cacgtcaacc agccgctggc tcacgacctg gtcgtgacc tgagcaacaa cgcccaggtc 25920  
 accatcaagg ccggcgaaac cagcgcgccg tacaccacg ctgctcagg cgatgacgtc 25980  
 tacaacgatg ctggccagat cagcctgggc atcaactcgg cgggtggacgc cactgggtgcg 26040  
 accttcgaga acctcgagct gggcggtgcc gcgaaggtgg atgtcaccga caccaccgac 26100  
 gaagtggtag ccaagctgac cgcgaccctc tcggttaaccg aaggcggcga gatcacctac 26160  
 accatcacc tgaccaacaa agatggtctg ccaatcaaca accacagtgc attgaccttc 26220  
 acgctgagcg acggcaaaac cgtcatcacc gtgccggcca acggcaccgt gggcactgct 26280  
 accgtcactg ccccggacaa cgtctacgtc ggtaccaacg accctgtgat caaatcgatc 26340  
 gcaaccgttg gcggcgcgga tgttggaag ttcgaacagc tgactctgga caagacccccg 26400  
 gtcagcaccg ccgtgaccga cgaaccaggt tcgggaactc caggcaccgg caacaagggc 26460  
 gacgtcacca ccgtcggtat taccggcacg acttctctga ccgagggtga aaccggccag 26520  
 tacaccctga cgctgagcaa cgcgtccaag tccgaagtca ctatcaccct tagctacagc 26580  
 ggtaccgcc aaaacggtga tgacttcacc ggtggtgca ccgtgaagat tccggccaac 26640  
 agcacaggca cgacgttcaa catcgtacc ctcaacgaca aactggtcga aggtaccgag 26700  
 aacttcgtcg tgaagatcga aaccgccacg ggtggttaact tcgagaacct gcaggtcgat 26760  
 agcagcaaat cgagcgtgac gaccaccatt ctcgacaatg accacctgcc ggtttcgcct 26820  
 ggcggcgcgg tatttgcggt tgaggacacc gattacgtgt ttgcctggag tgatttcaaa 26880  
 gtcactgatg ccgacggcaa cactaacctg tctgtgacca ttacctcgt cccggccgcc 26940  
 ggcaacttgc agttcttcaa cggtagtca tgggtgaatg tggccgttg ccaagtggtc 27000  
 agccaggctg atatcactgc caagaacctg aagttcgttc cggccctcaa ccagtcgggt 27060  
 gcggacaact acggtggtaa tgggtggtg aaccagaagg ctgactacgc ccagttcaag 27120  
 ttcaagccga acgatggcac caacctgggc agcgaagtga ccatgaaggt cgatatcagc 27180  
 ccggttgccg acaaaccgac cctgagcttc ggcagcgccg atatcgagtc caaagggtg 27240  
 accaaggaag tctggaccag cctcaaaggc ctgggtactg gcggcaacgg cattaccggc 27300



ES 2 712 181 T3

gaggatctga agacggtcct tgccaactcc ggcagcgcga actccagcag caccactacc 27360  
aacgtgcagt ccgatggcag cgtcaccgct ggcaccgggt cgaaaacgtc gggcctgatc 27420  
tacctggaag ccggcaaggt ctataccttc agtggtttgg ccgacgacag cttcgtggtc 27480  
accatcggtg gcaagactgt agtcacggcc acctggggag ccggtggcgg ggtgtcgggt 27540  
acctttacc caaataccag cggctactac ccgatcgagg tctaccatgc caaccagtcc 27600  
ggtccaggca gctatgacct gaacatccag gtaggctccg gtgccgttac cgacctgagc 27660  
agctcgaacg tcaagatgta ccagaacggt accgagatgg cgaacgcagg cctgggcgtg 27720  
tccgacctgc acaccgtgaa tggtcagagc tactacgacg gctacaagct caacgaaggg 27780  
cctgagggtg gctcggtgaa actggtcgggt atttccaccg ccctgaccga cactgacggc 27840  
tccgaaagcc tgaacgtaac actcagcgggt atcccgaaag gtactgtggt gagcgtggt 27900  
gcaggccaca cggtcacggt aggtactgcc ccggtcggatg tgacaggctg gaaactcagc 27960  
agcctgacgc tgaccccgcc ggcctattac aaaggctcgt tcgacatcac ggttacctcg 28020  
actgccaccg aaagcctggg cggctcggcc atcaccaccg gcaatatccc ggtgacgggt 28080  
tacggcgcga cctacaagc cagtgtgggt acctcgggta atgacacgct gaccggtagt 28140  
gaaggcaacg acatcttctg cgtgacgta tccgggctga acgtggttca gggcaagaac 28200  
tacaacatcg cttcatggt cgatagctcg ggcagtatga gcgacaagtc gattgccgac 28260  
gccaagacgc agttggcctc ggtgttcaac acgctcaagg ccagcctggg ctcgacacc 28320  
tcgggtaccg taaacatctt cctggtcgac ttcgataccc aggtaaaca gaacgtggca 28380  
gtgaaccttg ccgaccgga tgctttgagc aagttgcagg cggattgaa ctcgatggtg 28440  
ggcggctact acggtggcgg taccaactat gaagacgctg tcaagaccac gtccaacttc 28500  
ttcaacagca ccatggccac cagcaacaaa ggtgcggaga acctgactta cttcattacc 28560  
gacggtaagc caacctacta tcagagcaat gagtccacca accctagcct gtggaagaat 28620  
ggcaagagcc tggacgatgt agtcaacgtc aacaattaca agatgggtga cacgttcagc 28680  
gcctgggccg acgcgactca caaggtcgag atcagcagca gtggtgtggt caaagtgctg 28740  
acttataccg agaaccgccg aggtgagttg gtgctcgact ccaccaagac ggtaggcacc 28800  
cttcacgcac agggatgatg tacctatgaa ttctccagcc tggacggtag cggctacgcg 28860  
gattactgga actacgtcta ctcgccgca ggttctactg aaagtttcgc agtattgggc 28920  
ggcaccaatg gcttgagcaa agtccaggct atcggcctga acagcgtatg cacgctgaac 28980  
gatctgaaac cttac 28995

<210> 35

<211> 202

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

5

<400> 35

ES 2 712 181 T3

Val Leu His Lys Leu Asp Met Gly Gln Phe Lys Asp Gly Leu Arg Arg  
 1 5 10 15

Tyr Phe Lys Gly Ser Asp Ser Leu Gly Gly Gln Pro Leu Pro Glu Val  
 20 25 30

Asn Lys Ala Leu Ile Glu Asp Ala Pro Arg Val Val Arg Leu Thr Ile  
 35 40 45

Trp Gly Val Ile Leu Phe Phe Val Phe Leu Ile Val Trp Ala Ser Val  
 50 55 60

Ala Pro Ile Asp Glu Val Thr Arg Gly Glu Gly Lys Ala Ile Pro Ser  
 65 70 75 80

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

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

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

Asp Arg Leu Ala Met Ala Leu Arg Val Glu Arg Leu Ser Ala Glu Val  
 130 135 140

Glu Asp Arg Pro Leu Ile Ile Asp Glu Lys Leu Arg Lys Ala Ala Pro  
 145 150 155 160

Asn Gln Ala Ala Ser Glu Glu Ser Leu Tyr Gln Ser Arg Arg Gln Gln  
 165 170 175

Leu Gln Asp Glu Ile Gly Gly Leu Gln Gln Gln Leu Val Gln Arg Gln  
 180 185 190

Gln Glu Leu Arg Glu Tyr Ser Ser Lys Arg  
 195 200

<210> 36

<211> 718

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas putida

<400> 36

ES 2 712 181 T3

Val Glu Ser Glu Val Ser Arg Val Gln Leu Ser His Asp Pro Arg Ser  
1 5 10 15

Gln His Asp Asp Pro Leu Leu Asp Ser Leu Leu Ser Leu Cys Val Leu  
20 25 30

His Gln Lys Pro Ala Ser Arg Val Met Leu Thr Thr Gly Leu Pro Leu  
35 40 45

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

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

Ser Ile Ala Met Pro Ala Met Leu Leu Leu Lys Glu Gly Arg Ser Ala  
85 90 95

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

Glu Ser Asp Gly Gly Glu Val His Val Ser Arg Glu Ala Leu Leu Ser  
115 120 125

Asp Tyr Ser Gly Arg Val Phe Phe Ala Gln Pro Gln His Lys Phe Asp  
130 135 140

Val Asn His Gly Asn Leu Ile Pro Arg Ala Lys Ser Trp Phe Arg Asp  
145 150 155 160

Thr Leu Leu Arg Ser Lys Trp Leu Tyr Ile Asp Ala Ile Ala Ala Ser  
165 170 175

Leu Val Ile Asn Leu Ile Ala Leu Ala Ala Pro Leu Phe Val Met Asn  
180 185 190

Val Tyr Asp Arg Val Val Pro Asn Gln Ala Thr Ser Thr Leu Trp Val  
195 200 205

Leu Ala Ile Gly Ile Ala Gly Ala Tyr Ile Phe Asp Leu Ile Leu Lys  
210 215 220

Gly Leu Arg Gly Leu Cys Leu Asp Leu Ala Gly Lys Lys Thr Asp Leu  
225 230 235 240

Ile Ile Ser Ala Thr Leu Phe Glu Arg Ile Val Gly Met Ser Met Lys  
245 250 255

ES 2 712 181 T3

Tyr Arg Pro Ala Arg Val Gly Ser Phe Ala Gln Asn Ile His Glu Phe  
 260 265 270  
 Gln Gly Leu Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu Thr Leu Thr Ser Leu Ile  
 275 280 285  
 Asp Leu Pro Phe Thr Ile Leu Ile Leu Ile Val Ile Ala Ile Ile Gly  
 290 295 300  
 Gly His Leu Val Trp Ile Pro Ile Ile Ala Phe Pro Leu Ala Leu Gly  
 305 310 315 320  
 Ile Gly Tyr Ala Leu Gln Arg Pro Leu Met Ala Thr Met Glu Arg Thr  
 325 330 335  
 Met Ala Leu Ala Ser Glu Arg Gln Ser Ser Leu Ile Glu Thr Leu Ala  
 340 345 350  
 Gly Leu Asp Ala Val Lys Val Asn Asn Ala Glu Ser Glu Arg Gln Tyr  
 355 360 365  
 Met Trp Glu Gln Thr Leu Gly Thr Leu Ser Arg Leu Glu Leu Arg Val  
 370 375 380  
 Lys Val Leu Ser Ser Leu Ala Met Asn Ile Thr Leu Leu Ile Gln Gln  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Gly Val Ala Met Ile Cys Val Gly Val Tyr Leu Ile Ile Asp  
 405 410 415  
 Gly Asn Leu Ser Met Gly Gly Leu Val Ala Cys Tyr Met Leu Ser Gly  
 420 425 430  
 Arg Ala Leu Gly Pro Leu Gly Gln Leu Asn Gly Leu Leu Ala Arg Tyr  
 435 440 445  
 Gln Gln Ala Lys Val Thr Met Val Ser Thr Asp His Met Met Asp Leu  
 450 455 460  
 Pro Gln Glu Arg Asn Phe Glu Glu Arg Pro Leu Ser Arg Lys Val Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Gly Ser Val Glu Phe Arg Gly Val Asp Phe Thr Tyr Pro Asn Gln  
 485 490 495  
 Gln Asn Leu Ala Leu Lys Asn Ile Asn Leu Thr Ile Arg Pro Gly Glu  
 500 505 510

ES 2 712 181 T3

Lys Val Gly Ile Ile Gly Arg Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Leu Ala  
 515 520 525

Lys Leu Ile Val Gly Leu Tyr Glu Ala Asp Gly Gly Ser Leu Leu Val  
 530 535 540

Asp Gly Val Asp Ile Arg Gln Ile Asp Val Ser Glu Leu Arg His Asn  
 545 550 555 560

Ile Gly Tyr Val Pro Gln Asp Ile Gln Leu Leu Ala Gly Thr Leu Arg  
 565 570 575

Asp Asn Leu Val Ser Gly Ala Arg Tyr Ile Glu Asp Glu Leu Ile Leu  
 580 585 590

Gln Ala Ala Glu Leu Ala Gly Val His Glu Phe Ala Arg Leu His Pro  
 595 600 605

Asp Gly Tyr Glu Leu Gln Val Gly Glu Arg Gly Gln Asn Leu Ser Gly  
 610 615 620

Gly Gln Arg Gln Asn Val Ala Leu Gly Arg Ala Leu Leu Leu Asn Pro  
 625 630 635 640

Gln Ile Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Ser Ala Met Asp Asn Thr Gly  
 645 650 655

Glu Glu Arg Leu Lys Gln Arg Leu Gln Ala Val Val Glu Gly Lys Thr  
 660 665 670

Val Leu Leu Val Thr His Arg Ala Ser Leu Leu Ser Leu Val Asp Arg  
 675 680 685

Leu Ile Val Ile Asp Arg Gly Gln Ile Val Ala Asp Gly Pro Lys Ala  
 690 695 700

Ala Val Met Asp Ala Leu Lys Lys Gly Gln Ile Ser Val Ala  
 705 710 715

<210> 37  
 <211> 8422  
 <212> PRT  
 <213> Pseudomonas putida

5

<400> 37

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

ES 2 712 181 T3

Ala Val Ser Pro Glu Gly Ile Arg Arg Val Leu Ile Glu Gly Asp Arg  
 20 25 30

Leu Leu Ala Gly Glu Glu Val Leu Thr Gly Pro Gly Gly Ala Val Thr  
 35 40 45

Leu Glu Leu Ala Asp Gly Arg Leu Leu Asp Leu Gly Arg Asp Ser Gln  
 50 55 60

Trp Ser Ala Asp Ala Pro Asp Ser Ser Thr Asp Leu Ser Gln Ala Ala  
 65 70 75 80

Ala Gln Ala Ala Pro Ser Val Glu Glu Leu Gln Gln Ala Ile Ala Ala  
 85 90 95

Gly Val Asp Pro Thr Thr Glu Leu Glu Ala Thr Ala Ala Gly Pro Ser  
 100 105 110

Ser Ala Gly Gly Gly Ala Leu Gly Gly Gly His Ser Phe Val Met Leu  
 115 120 125

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

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

Asp Thr Asn Gly Asn Asn Leu Val Thr Thr Pro Thr Asp Thr Thr Val  
 165 170 175

Ala Thr Glu Leu Thr Leu Gly Ala Thr Pro Ser Ile Ser Glu Ala Gly  
 180 185 190

Gly Val Ile Val Tyr Thr Ala Thr Val Gly Gln Ala Pro Thr Thr Asn  
 195 200 205

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

Gln Thr Ser Gly Ser Val Asn Val Ala Val Pro Ala Asn Asp Thr Pro  
 225 230 235 240

Tyr Ile Asp Gly Gly Gln Ile Ser Ala Thr Val Thr Gly Ser Thr Gly  
 245 250 255

Gly Gly Gly Leu Thr Val Thr Leu Pro Gln Thr Pro Ala Val Thr Gln

ES 2 712 181 T3

260	265	270																		
Val	Thr	Asp	Thr	Ile	Asp	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Ser	Pro					
		275						280				285								
Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Asn					
	290					295					300									
Pro	Ala	Gln	Thr	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Gly	Gln	Val	Ile					
305					310					315					320					
Thr	Val	Glu	Ala	Gly	Lys	Thr	Gln	Gly	Ser	Val	Asp	Phe	Gln	Thr	Pro					
				325					330					335						
Ala	Asn	Asp	Val	Tyr	Asn	Asn	Gly	Ser	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Ile	Glu					
			340					345						350						
Asn	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Phe	Glu	Gln	Leu	Thr	Pro	Asn	Pro	Thr	Pro					
		355					360					365								
Ala	Gln	Thr	Thr	Ile	Asn	Asp	Ser	Val	Asp	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Leu					
	370					375					380									
Thr	Ala	Ser	Pro	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr	Thr	Val					
385					390					395					400					
Thr	Leu	Ser	Asn	Pro	Ala	Gln	Thr	Pro	Val	Thr	Val	Asn	Leu	Ser	Asn					
				405					410					415						
Gly	Gln	Thr	Ile	Thr	Val	Glu	Ala	Gly	Lys	Thr	Gln	Gly	Ser	Val	Asp					
			420					425					430							
Phe	Gln	Thr	Pro	Ala	Asn	Asp	Val	Tyr	Asn	Asn	Gly	Ser	Thr	Val	Ser					
		435					440					445								
Val	Thr	Ile	Glu	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Phe	Glu	Gln	Leu	Thr	Pro					
	450					455					460									
Asn	Pro	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Thr	Ile	Asn	Asp	Ser	Val	Asp	Thr	Thr					
465					470					475					480					
Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Ser	Pro	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Gly	Val	Ile					
				485					490					495						
Thr	Tyr	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Pro	Ala	Gln	Thr	Pro	Val	Thr	Val					
			500					505					510							

ES 2 712 181 T3

Thr Leu Ser Asn Gly Gln Thr Ile Thr Val Glu Ala Gly Lys Thr Gln  
515 520 525

Gly Ser Val Asp Phe Gln Thr Pro Ala Asn Asp Val Tyr Asn Asn Gly  
530 535 540

Ser Thr Val Ser Val Thr Ile Glu Asn Ala Thr Gly Gly Asn Phe Glu  
545 550 555 560

Gln Leu Thr Pro Asn Pro Thr Pro Ala Gln Thr Thr Ile Asn Asp Ser  
565 570 575

Val Asp Thr Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ala Ser Pro Ser Val Thr Glu  
580 585 590

Gly Gly Val Ile Thr Tyr Thr Val Thr Leu Ser Asn Pro Ala Gln Thr  
595 600 605

Pro Val Thr Val Thr Leu Ser Asn Gly Gln Thr Ile Thr Val Glu Ala  
610 615 620

Gly Lys Thr Gln Gly Ser Val Asp Phe Gln Thr Pro Ala Asn Asp Val  
625 630 635 640

Tyr Asn Asn Gly Ser Thr Val Ser Val Thr Ile Glu Asn Ala Thr Gly  
645 650 655

Gly Asn Phe Glu Gln Leu Thr Pro Asn Pro Thr Pro Ala Gln Thr Thr  
660 665 670

Ile Asn Asp Ser Val Asp Ala Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ala Ser Pro  
675 680 685

Ser Val Thr Glu Gly Gly Val Ile Thr Tyr Thr Val Thr Leu Ser Asn  
690 695 700

Pro Ala Gln Thr Pro Val Thr Val Thr Leu Ser Asn Gly Gln Thr Ile  
705 710 715 720

Thr Val Glu Ala Gly Lys Thr Gln Gly Ser Val Asp Phe Gln Thr Pro  
725 730 735

Ala Asn Asp Val Tyr Asn Asn Gly Ser Thr Val Ser Val Thr Ile Glu  
740 745 750

Asn Ala Thr Gly Gly Asn Phe Glu Gln Leu Thr Pro Asn Pro Thr Pro  
755 760 765



ES 2 712 181 T3

Ala Gln Thr Thr Ile Asn Asp Ser Val Asp Ala Thr Thr Ala Thr Leu  
770 775 780

Thr Ala Ser Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Val Ile Thr Tyr Thr Val  
785 790 795 800

Thr Leu Ser Asn Pro Ala Gln Thr Pro Val Thr Val Thr Leu Ser Asn  
805 810 815

Gly Gln Thr Ile Thr Val Glu Ala Gly Lys Thr Gln Gly Ser Val Asp  
820 825 830

Phe Gln Thr Pro Ala Asn Asp Val Tyr Asn Asn Gly Ser Thr Val Ser  
835 840 845

Val Thr Ile Glu Asn Ala Thr Gly Gly Asn Phe Glu Gln Leu Thr Pro  
850 855 860

Asn Pro Thr Pro Ala Gln Thr Thr Ile Asn Asp Ser Val Asp Ala Thr  
865 870 875 880

Thr Ala Thr Leu Thr Ala Ser Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Val Ile  
885 890 895

Thr Tyr Thr Val Thr Leu Ser Asn Pro Ala Gln Thr Pro Val Thr Val  
900 905 910

Thr Leu Ser Asn Gly Gln Val Ile Thr Val Glu Ala Gly Lys Thr Gln  
915 920 925

Gly Ser Val Asp Phe Gln Thr Pro Ala Asn Asp Val Tyr Asn Asn Gly  
930 935 940

Ser Thr Val Ser Val Thr Ile Glu Asn Ala Thr Gly Gly Asn Phe Glu  
945 950 955 960

Gln Leu Thr Pro Asn Pro Thr Pro Ala Gln Thr Thr Ile Asn Asp Ser  
965 970 975

Val Asp Ala Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ala Ser Pro Ser Val Thr Glu  
980 985 990

Gly Gly Val Ile Thr Tyr Thr Val Ile Leu Ser Asn Pro Ala Gln Thr  
995 1000 1005

Pro Val Thr Val Thr Leu Ser Asn Gly Gln Thr Ile Thr Val Glu  
1010 1015 1020

ES 2 712 181 T3

Ala Gly Lys Thr Gln Gly Ser Val Asp Phe Gln Thr Pro Ala Asn  
1025 1030 1035

Asp Val Tyr Asn Asn Gly Ser Thr Val Ser Val Thr Ile Glu Asn  
1040 1045 1050

Ala Thr Gly Gly Asn Phe Glu Gln Leu Thr Pro Asn Pro Thr Pro  
1055 1060 1065

Ala Gln Thr Thr Ile Thr Asp Ser Val Asp Thr Thr Thr Ala Thr  
1070 1075 1080

Leu Thr Ala Ser Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Val Ile Thr Tyr  
1085 1090 1095

Thr Val Thr Leu Ser Asn Pro Ala Gln Thr Pro Val Thr Val Thr  
1100 1105 1110

Leu Ser Asn Gly Gln Thr Ile Thr Val Glu Ala Gly Lys Thr Gln  
1115 1120 1125

Gly Ser Val Asp Phe Gln Thr Pro Ala Asn Asp Val Tyr Asn Asn  
1130 1135 1140

Gly Ser Thr Val Ser Val Thr Ile Glu Ser Ala Thr Gly Gly Asn  
1145 1150 1155

Phe Glu His Leu Thr Pro Asn Pro Thr Pro Ala Ser Thr Val Ile  
1160 1165 1170

Asn Asp Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Ser Ile Val Ser Asn Gly  
1175 1180 1185

Asn Val Thr Glu Asp Gln Gln Pro Ser Phe Thr Val Lys Val Ser  
1190 1195 1200

Gln Ala Leu Asp Arg Pro Leu Thr Val Thr Leu Ser Asn Gly Asp  
1205 1210 1215

Thr Val Thr Ile Glu Ala Gly Lys Thr Glu Val Glu Tyr Lys Thr  
1220 1225 1230

Ser Val Gln Gly Asp Asp Val Tyr Leu Asp Ala Gly Ser Ile Thr  
1235 1240 1245

Leu Ser Val Thr Asp Ala Thr Val Pro Gly Ala Thr Phe Glu Lys

ES 2 712 181 T3

1250						1255								1260
Leu Ala	Leu Gly	Gly Pro	Ala Thr	Val Glu	Ile Ser	Asp Thr	Ile							
1265						1270								1275
Ser Glu	Val Val	Ala Lys	Leu Thr	Ala Thr	Pro Ser	Val Thr	Glu							
1280						1285								1290
Gly Gly	Glu Ile	Thr Tyr	Thr Ile	Thr Leu	Thr Asn	Lys Asp	Gly							
1295						1300								1305
Leu Pro	Ile Asn	Asn His	Ser Glu	Leu Tyr	Phe Lys	Leu Thr	Asp							
1310						1315								1320
Gly Thr	Thr Val	Val Val	Ala Ala	Asn Ser	Thr Thr	Gly Ser	Ala							
1325						1330								1335
Thr Val	Ala Ala	Pro Asp	Asn Val	Tyr Val	Gly Thr	Asn Gln	Pro							
1340						1345								1350
Val Val	Asn Ala	Ile Asp	Ala Val	Ser Gly	Ala Asp	Ala Trp	Lys							
1355						1360								1365
Phe Glu	Asn Leu	Asn Leu	Asp Lys	Thr Pro	Val Ser	Thr Glu	Val							
1370						1375								1380
Thr Asp	Glu Pro	Gly Thr	Pro Gly	Asn Glu	Gly Asp	Ile Val	Lys							
1385						1390								1395
Val Thr	Ile Thr	Ala Asp	Gln Thr	Ser Val	Ala Glu	Asn Val	Lys							
1400						1405								1410
Pro Thr	Phe Thr	Val His	Ile Asn	Thr Ala	Leu Ala	His Asp	Leu							
1415						1420								1425
Val Val	Thr Leu	Ser Asn	Asn Ala	Gln Val	Thr Ile	Lys Ala	Gly							
1430						1435								1440
Glu Thr	Ser Ala	Pro Tyr	Thr His	Asp Ala	Gln Gly	Asp Asp	Val							
1445						1450								1455
Tyr Gln	Asp Ala	Gly Gln	Ile Ser	Leu Gly	Ile Asn	Ser Ala	Val							
1460						1465								1470
Asp Ala	Thr Gly	Ala Ala	Phe Glu	Asn Leu	Glu Leu	Gly Gly	Ala							
1475						1480								1485

ES 2 712 181 T3

Ala Lys Val Asp Val Thr Asp Thr Leu Asp Glu Val Val Ala Lys  
1490 1495 1500

Leu Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr  
1505 1510 1515

Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His  
1520 1525 1530

Ser Glu Leu Tyr Phe Lys Leu Thr Asp Gly Thr Thr Val Val Val  
1535 1540 1545

Ala Ala Asn Ser Thr Thr Gly Ser Ala Thr Val Ala Ala Pro Asp  
1550 1555 1560

Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Gln Pro Val Val Asn Ala Ile Asp  
1565 1570 1575

Ala Val Ser Gly Ala Asp Ala Trp Lys Phe Glu Asn Leu Asn Leu  
1580 1585 1590

Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Glu Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr  
1595 1600 1605

Pro Gly Asn Glu Gly Asp Ile Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp  
1610 1615 1620

Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His  
1625 1630 1635

Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn  
1640 1645 1650

Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr  
1655 1660 1665

Thr His Asp Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr Gln Asp Ala Gly Gln  
1670 1675 1680

Ile Ser Leu Gly Ile Asn Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Ala  
1685 1690 1695

Phe Glu Asn Leu Glu Leu Gly Gly Ala Ala Ser Val Gln Val Thr  
1700 1705 1710

Asp Thr Leu Asp Glu Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser  
1715 1720 1725

ES 2 712 181 T3

Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn  
 1730 1735 1740

Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser Glu Leu Tyr Phe Lys  
 1745 1750 1755

Leu Thr Asp Gly Thr Thr Val Val Val Ala Ala Asn Ser Thr Thr  
 1760 1765 1770

Gly Ser Ala Thr Ala Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Thr  
 1775 1780 1785

Asn Ala Pro Val Ile Asn Ala Ile Asp Ala Val Ser Gly Ala Asp  
 1790 1795 1800

Ala Trp Lys Phe Glu Asn Leu Asn Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser  
 1805 1810 1815

Thr Glu Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly Asp  
 1820 1825 1830

Ile Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala Glu  
 1835 1840 1845

Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu Ala  
 1850 1855 1860

His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr Ile  
 1865 1870 1875

Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Asp Ala Gln Gly  
 1880 1885 1890

Asp Asp Val Tyr Gln Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile Asn  
 1895 1900 1905

Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Ala Phe Glu Asn Leu Glu Leu  
 1910 1915 1920

Gly Gly Ser Ala Ser Val Gln Val Thr Asp Thr Leu Asp Glu Val  
 1925 1930 1935

Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Glu  
 1940 1945 1950

Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro Ile  
 1955 1960 1965

ES 2 712 181 T3

Asn Asn His Ser Glu Leu Tyr Phe Lys Leu Thr Asp Gly Thr Thr  
 1970 1975 1980  
  
 Val Val Val Ala Ala Asn Ser Thr Thr Gly Ser Ala Thr Ala Thr  
 1985 1990 1995  
  
 Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Ala Pro Val Val Asn  
 2000 2005 2010  
  
 Ala Ile Asp Ala Val Ser Gly Ala Asp Ala Trp Lys Phe Glu Asn  
 2015 2020 2025  
  
 Leu Asn Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Glu Val Thr Asp Glu  
 2030 2035 2040  
  
 Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly Asp Ile Val Lys Val Thr Ile  
 2045 2050 2055  
  
 Thr Ala Asp Gln Ala Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe  
 2060 2065 2070  
  
 Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val Val Thr  
 2075 2080 2085  
  
 Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser  
 2090 2095 2100  
  
 Ala Pro Tyr Thr His Asp Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr Gln Asp  
 2105 2110 2115  
  
 Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile Thr Ser Ala Val Asp Val Asp  
 2120 2125 2130  
  
 Gly His Thr Phe Glu Asn Leu Gln Leu Gly Gly Asn Ala Ser Val  
 2135 2140 2145  
  
 Gln Val Thr Asp Thr Leu Asp Glu Val Val Ala Lys Leu Thr Ala  
 2150 2155 2160  
  
 Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr  
 2165 2170 2175  
  
 Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser Glu Leu  
 2180 2185 2190  
  
 Tyr Phe Lys Leu Thr Asp Gly Thr Thr Val Val Val Ala Ala Asn

## ES 2 712 181 T3

2195						2200									2205
Ser	Thr	Thr	Gly	Ser	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Pro	Asp	Asn	Val	Tyr	
	2210						2215								2220
Val	Gly	Thr	Asn	Ala	Pro	Val	Val	Asn	Ala	Ile	Asp	Ala	Val	Ser	
	2225						2230					2235			
Gly	Ala	Asp	Ala	Trp	Lys	Phe	Glu	Asn	Leu	Asn	Leu	Asp	Lys	Thr	
	2240						2245								2250
Pro	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Asn	
	2255						2260						2265		
Glu	Gly	Asp	Ile	Val	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gln	Thr	Ser	
	2270						2275						2280		
Val	Ala	Glu	Asn	Val	Lys	Pro	Thr	Phe	Thr	Val	His	Val	Asn	Gln	
	2285						2290						2295		
Pro	Leu	Ala	His	Asp	Leu	Ile	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Asn	Ala	Gln	
	2300						2305						2310		
Val	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Pro	Tyr	Thr	His	Asp	
	2315						2320							2325	
Ala	Gln	Gly	Asp	Asp	Val	Tyr	Gln	Asp	Ala	Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	
	2330						2335					2340			
Gly	Ile	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Phe	Glu	Asn	
	2345						2350								2355
Leu	Gln	Leu	Gly	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Gln	Val	Thr	Asp	Thr	Leu	
	2360						2365					2370			
Asp	Glu	Val	Val	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Thr	Pro	Ser	Val	Thr	Glu	
	2375						2380					2385			
Gly	Gly	Glu	Ile	Thr	Tyr	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	
	2390						2395					2400			
Leu	Pro	Ile	Asn	Asn	His	Ser	Glu	Leu	Tyr	Phe	Lys	Leu	Thr	Asp	
	2405						2410					2415			
Gly	Thr	Thr	Val	Val	Val	Ala	Ala	Asn	Ser	Thr	Thr	Gly	Ser	Ala	
	2420						2425					2430			

ES 2 712 181 T3

Thr Val Ala Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Ala Pro  
 2435 2440 2445

Val Val Asn Ala Ile Asp Ala Val Ser Gly Ala Asp Ala Trp Lys  
 2450 2455 2460

Phe Glu Asn Leu Asn Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Thr Val  
 2465 2470 2475

Thr Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly Asp Ile Val Lys  
 2480 2485 2490

Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys  
 2495 2500 2505

Pro Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu  
 2510 2515 2520

Val Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly  
 2525 2530 2535

Glu Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Asp Ala Gln Gly Asp Asp Val  
 2540 2545 2550

Tyr Gln Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile Thr Ser Ala Val  
 2555 2560 2565

Asp Val Asp Gly His Thr Phe Glu Asn Leu Gln Leu Gly Gly Asn  
 2570 2575 2580

Ala Ser Val Gln Val Thr Asp Thr Leu Asp Glu Val Val Ala Lys  
 2585 2590 2595

Leu Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr  
 2600 2605 2610

Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His  
 2615 2620 2625

Ser Glu Leu Tyr Phe Lys Leu Thr Asp Gly Thr Thr Val Val Val  
 2630 2635 2640

Ala Ala Asn Ser Thr Thr Gly Ser Ala Thr Ala Thr Ala Pro Asp  
 2645 2650 2655

Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Ala Pro Val Val Asn Ala Ile Asp  
 2660 2665 2670



ES 2 712 181 T3

Ala Val Ser Gly Ala Asp Ala Trp Lys Phe Glu Asn Leu Asn Leu  
 2675 2680 2685

Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Glu Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr  
 2690 2695 2700

Pro Gly Asn Glu Gly Asp Ile Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp  
 2705 2710 2715

Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His  
 2720 2725 2730

Ile Asn Thr Ala Leu Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn  
 2735 2740 2745

Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr  
 2750 2755 2760

Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln  
 2765 2770 2775

Ile Ser Leu Gly Ile Thr Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr  
 2780 2785 2790

Phe Glu Asn Leu Ala Leu Gly Gly Ala Ala Lys Val Asp Val Thr  
 2795 2800 2805

Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser  
 2810 2815 2820

Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn  
 2825 2830 2835

Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr  
 2840 2845 2850

Leu Ser Asp Gly Lys Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr  
 2855 2860 2865

Val Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly  
 2870 2875 2880

Thr Asn Asp Pro Val Ile Lys Ser Ile Ala Thr Val Glu Gly Ala  
 2885 2890 2895

Asp Val Gly Lys Phe Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val  
 2900 2905 2910

ES 2 712 181 T3

Ser Thr Ser Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly  
 2915 2920 2925

Asp Leu Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala  
 2930 2935 2940

Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu  
 2945 2950 2955

Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr  
 2960 2965 2970

Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln  
 2975 2980 2985

Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile  
 2990 2995 3000

Thr Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Phe Glu Asn Leu Glu  
 3005 3010 3015

Leu Gly Gly Ala Ala Lys Val Asp Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu  
 3020 3025 3030

Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly  
 3035 3040 3045

Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro  
 3050 3055 3060

Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys  
 3065 3070 3075

Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr  
 3080 3085 3090

Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Asp Pro Val  
 3095 3100 3105

Ile Lys Ser Ile Ala Thr Val Glu Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe  
 3110 3115 3120

Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Thr Val Thr  
 3125 3130 3135

Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Pro Gly Gly Ser Asn Glu Gly

ES 2 712 181 T3

3140						3145						3150			
Asp	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gln	Thr	Ser	Val	Ala	
3155						3160						3165			
Glu	Asn	Val	Lys	Pro	Thr	Phe	Thr	Val	His	Val	Asn	Gln	Pro	Leu	
3170						3175						3180			
Ala	His	Asp	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Asn	Ala	Gln	Val	Thr	
3185						3190						3195			
Ile	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Pro	Tyr	Thr	His	Ala	Ala	Gln	
3200						3205						3210			
Gly	Asp	Asp	Val	Tyr	Asn	Asp	Ala	Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Gly	Ile	
3215						3220						3225			
Asn	Ser	Ala	Val	Asp	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	
3230						3235						3240			
Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Asp	Glu	
3245						3250						3255			
Val	Val	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Thr	Pro	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Gly	
3260						3265						3270			
Glu	Ile	Thr	Tyr	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	Leu	Pro	
3275						3280						3285			
Ile	Asn	Asn	His	Ser	Ala	Leu	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Asp	Gly	Lys	
3290						3295						3300			
Thr	Val	Ile	Thr	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Ala	Thr	
3305						3310						3315			
Val	Thr	Ala	Pro	Asp	Asn	Val	Tyr	Val	Gly	Thr	Asn	Asp	Pro	Val	
3320						3325						3330			
Ile	Lys	Ser	Ile	Ala	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Asp	Val	Gly	Lys	Phe	
3335						3340						3345			
Glu	Gln	Leu	Thr	Leu	Asp	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	
3350						3355						3360			
Asp	Glu	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Gly	Ser	Asn	Glu	Gly	
3365						3370						3375			

ES 2 712 181 T3

Asp Leu Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala  
 3380 3385 3390

Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu  
 3395 3400 3405

Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr  
 3410 3415 3420

Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln  
 3425 3430 3435

Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile  
 3440 3445 3450

Thr Ser Ala Val Asp Val Asp Gly Arg Thr Phe Glu Asn Leu Glu  
 3455 3460 3465

Leu Gly Gly Ala Ala Ser Val Gln Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu  
 3470 3475 3480

Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly  
 3485 3490 3495

Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro  
 3500 3505 3510

Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys  
 3515 3520 3525

Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr  
 3530 3535 3540

Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Asp Pro Val  
 3545 3550 3555

Ile Lys Ser Ile Ala Thr Val Glu Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe  
 3560 3565 3570

Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Thr Val Thr  
 3575 3580 3585

Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Pro Gly Gly Ser Asn Glu Gly  
 3590 3595 3600

Asp Leu Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala  
 3605 3610 3615

ES 2 712 181 T3

Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu  
 3620 3625 3630

Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr  
 3635 3640 3645

Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln  
 3650 3655 3660

Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile  
 3665 3670 3675

Asn Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Phe Glu Asn Leu Gln  
 3680 3685 3690

Leu Gly Gly Asn Ala Ser Val Gln Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu  
 3695 3700 3705

Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly  
 3710 3715 3720

Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro  
 3725 3730 3735

Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys  
 3740 3745 3750

Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr  
 3755 3760 3765

Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Asp Pro Val  
 3770 3775 3780

Ile Lys Ser Ile Ala Thr Val Glu Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe  
 3785 3790 3795

Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Ser Val Thr  
 3800 3805 3810

Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly Asp Leu Val Lys Val  
 3815 3820 3825

Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro  
 3830 3835 3840

Ile Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val  
 3845 3850 3855

ES 2 712 181 T3

Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu  
3860 3865 3870

Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr  
3875 3880 3885

Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile Thr Ser Ala Val Asp  
3890 3895 3900

Val Asp Gly Arg Thr Phe Glu Asn Leu Gln Leu Gly Gly Asn Ala  
3905 3910 3915

Ser Val Gln Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu  
3920 3925 3930

Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr  
3935 3940 3945

Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser  
3950 3955 3960

Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys Thr Val Ile Thr Val  
3965 3970 3975

Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp  
3980 3985 3990

Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Asp Pro Val Val Met Ser Ile Ala  
3995 4000 4005

Thr Val Gly Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe Glu Gln Leu Thr Leu  
4010 4015 4020

Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Thr Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr  
4025 4030 4035

Pro Gly Asn Pro Gly Gly Ser Asn Glu Gly Asp Leu Val Lys Val  
4040 4045 4050

Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro  
4055 4060 4065

Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val  
4070 4075 4080

Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu

ES 2 712 181 T3

4085						4090						4095			
Thr	Ser	Ala	Pro	Tyr	Thr	His	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Asp	Val	Tyr	
4100						4105					4110				
Asn	Asp	Ala	Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Gly	Ile	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	
4115						4120					4125				
Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Phe	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	
4130						4135					4140				
Lys	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Asp	Glu	Val	Val	Ala	Lys	Leu	
4145						4150					4155				
Thr	Ala	Thr	Pro	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Thr	Tyr	Thr	
4160						4165					4170				
Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	Leu	Pro	Ile	Asn	Asn	His	Ser	
4175						4180					4185				
Ala	Leu	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Val	Ile	Thr	Val	
4190						4195					4200				
Pro	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Ala	Pro	Asp	
4205						4210					4215				
Asn	Val	Tyr	Val	Gly	Thr	Asn	Asp	Pro	Val	Ile	Lys	Ser	Ile	Ala	
4220						4225					4230				
Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Asp	Val	Gly	Lys	Phe	Glu	Gln	Leu	Thr	Leu	
4235						4240					4245				
Asp	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Gly	Thr	
4250						4255					4260				
Pro	Gly	Asn	Glu	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	
4265						4270					4275				
Gln	Thr	Ser	Val	Ala	Glu	Asn	Val	Lys	Pro	Thr	Phe	Thr	Val	His	
4280						4285					4290				
Val	Asn	Gln	Pro	Leu	Ala	His	Asp	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	
4295						4300					4305				
Asn	Ala	Gln	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Pro	Tyr	
4310						4315					4320				

ES 2 712 181 T3

Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln  
4325 4330 4335

Ile Ser Leu Gly Ile Thr Ser Ala Val Asp Val Asp Gly Arg Thr  
4340 4345 4350

Phe Glu Asn Leu Gln Leu Gly Gly Ala Ala Thr Val Gln Val Thr  
4355 4360 4365

Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser  
4370 4375 4380

Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn  
4385 4390 4395

Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr  
4400 4405 4410

Leu Ser Asp Gly Lys Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr  
4415 4420 4425

Val Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly  
4430 4435 4440

Thr Asn Asp Pro Val Ile Lys Ser Ile Ala Thr Val Glu Gly Ala  
4445 4450 4455

Asp Val Gly Lys Phe Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val  
4460 4465 4470

Ser Thr Ser Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly  
4475 4480 4485

Asp Leu Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala  
4490 4495 4500

Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu  
4505 4510 4515

Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr  
4520 4525 4530

Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln  
4535 4540 4545

Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile  
4550 4555 4560



ES 2 712 181 T3

Asn Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Phe Glu Asn Leu Gln  
 4565 4570 4575  
  
 Leu Gly Gly Ala Ala Thr Val Gln Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu  
 4580 4585 4590  
  
 Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly  
 4595 4600 4605  
  
 Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro  
 4610 4615 4620  
  
 Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys  
 4625 4630 4635  
  
 Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr  
 4640 4645 4650  
  
 Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Asp Pro Val  
 4655 4660 4665  
  
 Val Met Ser Ile Ala Thr Val Gly Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe  
 4670 4675 4680  
  
 Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Ser Val Thr  
 4685 4690 4695  
  
 Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly Asp Leu Val Lys Val  
 4700 4705 4710  
  
 Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro  
 4715 4720 4725  
  
 Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val  
 4730 4735 4740  
  
 Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu  
 4745 4750 4755  
  
 Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr  
 4760 4765 4770  
  
 Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile Asn Ser Ala Val Asp  
 4775 4780 4785  
  
 Ala Thr Gly Ala Thr Phe Glu Asn Leu Glu Leu Gly Gly Ala Ala  
 4790 4795 4800

ES 2 712 181 T3

Lys Val Asp Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu  
4805 4810 4815

Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr  
4820 4825 4830

Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asp Lys His Ala  
4835 4840 4845

Ala Leu Thr Phe Thr Leu Asp Asp Gly Lys Thr Thr Ile Thr Ile  
4850 4855 4860

Pro Ala Asn Gly Thr Thr Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp  
4865 4870 4875

Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Asp Pro Val Val Met Ser Ile Ala  
4880 4885 4890

Thr Val Gly Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe Glu Gln Leu Thr Leu  
4895 4900 4905

Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Ser Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr  
4910 4915 4920

Pro Gly Asn Glu Gly Asp Leu Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp  
4925 4930 4935

Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His  
4940 4945 4950

Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn  
4955 4960 4965

Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr  
4970 4975 4980

Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln  
4985 4990 4995

Ile Ser Leu Gly Ile Thr Ser Ala Val Asp Val Asp Gly Arg Thr  
5000 5005 5010

Phe Glu Asn Leu Glu Leu Gly Gly Ala Ala Ser Val Gln Val Thr  
5015 5020 5025

Asp Thr Leu Asp Glu Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser

ES 2 712 181 T3

5030						5035						5040			
Val	Thr	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Thr	Tyr	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	
5045						5050					5055				
Lys	Asp	Gly	Leu	Pro	Ile	Asn	Asn	His	Ser	Ala	Leu	Thr	Phe	Thr	
5060						5065					5070				
Leu	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Val	Ile	Thr	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Thr	
5075						5080					5085				
Val	Gly	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Ala	Pro	Asp	Asn	Val	Tyr	Val	Gly	
5090						5095					5100				
Ala	Asn	Asp	Pro	Val	Val	Met	Ser	Ile	Ala	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	
5105						5110					5115				
Asp	Val	Gly	Lys	Phe	Glu	Gln	Leu	Thr	Leu	Asp	Lys	Thr	Pro	Val	
5120						5125					5130				
Ser	Thr	Ser	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Asn	Glu	Gly	
5135						5140					5145				
Asp	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gln	Thr	Ser	Val	Ala	
5150						5155					5160				
Glu	Asn	Val	Lys	Pro	Thr	Phe	Thr	Val	His	Val	Asn	Gln	Pro	Leu	
5165						5170					5175				
Ala	His	Asp	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Asn	Ala	Gln	Val	Thr	
5180						5185					5190				
Ile	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Pro	Tyr	Thr	His	Ala	Ala	Gln	
5195						5200					5205				
Gly	Asp	Asp	Val	Tyr	Asn	Asp	Ala	Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Gly	Ile	
5210						5215					5220				
Thr	Ser	Ala	Val	Asp	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	
5225						5230					5235				
Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Ser	Val	Gln	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Asp	Glu	
5240						5245					5250				
Val	Val	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Thr	Pro	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Gly	
5255						5260					5265				

ES 2 712 181 T3

Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro  
 5270 5275 5280  
 Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys  
 5285 5290 5295  
 Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr  
 5300 5305 5310  
 Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Ser Asn Asp Pro Val  
 5315 5320 5325  
 Val Met Ser Ile Ala Thr Val Gly Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe  
 5330 5335 5340  
 Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Ser Val Thr  
 5345 5350 5355  
 Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly Asp Leu Val Lys Val  
 5360 5365 5370  
 Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro  
 5375 5380 5385  
 Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val  
 5390 5395 5400  
 Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu  
 5405 5410 5415  
 Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr  
 5420 5425 5430  
 Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile Asn Ser Ala Val Asp  
 5435 5440 5445  
 Ala Thr Gly Ala Thr Phe Glu Asn Leu Gln Leu Gly Gly Asn Ala  
 5450 5455 5460  
 Ser Val Gln Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu  
 5465 5470 5475  
 Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr  
 5480 5485 5490  
 Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser  
 5495 5500 5505

ES 2 712 181 T3

Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys Thr Val Ile Thr Val  
5510 5515 5520

Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp  
5525 5530 5535

Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Asp Pro Val Val Met Ser Ile Ala  
5540 5545 5550

Thr Val Gly Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe Glu Gln Leu Thr Leu  
5555 5560 5565

Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Thr Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr  
5570 5575 5580

Pro Gly Asn Pro Gly Gly Ser Asn Glu Gly Asp Leu Val Lys Val  
5585 5590 5595

Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Leu Ala Glu Asn Val Lys Pro  
5600 5605 5610

Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val  
5615 5620 5625

Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu  
5630 5635 5640

Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr  
5645 5650 5655

Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile Asn Ser Ala Val Asp  
5660 5665 5670

Ala Thr Gly Ala Thr Phe Glu Asn Leu Glu Leu Gly Gly Ala Ala  
5675 5680 5685

Ser Val Gln Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu  
5690 5695 5700

Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr  
5705 5710 5715

Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser  
5720 5725 5730

Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys Thr Val Ile Thr Val  
5735 5740 5745

ES 2 712 181 T3

Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp  
5750 5755 5760

Asn Val Tyr Val Gly Ser Asn Asp Pro Val Val Met Ser Ile Ala  
5765 5770 5775

Thr Val Gly Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe Glu Gln Leu Thr Leu  
5780 5785 5790

Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Ser Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr  
5795 5800 5805

Pro Gly Asn Glu Gly Asp Leu Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp  
5810 5815 5820

Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His  
5825 5830 5835

Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn  
5840 5845 5850

Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr  
5855 5860 5865

Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln  
5870 5875 5880

Ile Ser Leu Gly Ile Asn Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr  
5885 5890 5895

Phe Glu Asn Leu Glu Leu Gly Gly Ala Ala Ser Val Gln Val Thr  
5900 5905 5910

Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser  
5915 5920 5925

Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn  
5930 5935 5940

Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr  
5945 5950 5955

Leu Ser Asp Gly Lys Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr  
5960 5965 5970

Val Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly

ES 2 712 181 T3

5975						5980										5985
Ser	Asn	Asp	Pro	Val	Val	Met	Ser	Ile	Ala	Thr	Val	Gly	Gly	Ala		
5990						5995					6000					
Asp	Val	Gly	Lys	Phe	Glu	Gln	Leu	Thr	Leu	Asp	Lys	Thr	Pro	Val		
6005						6010					6015					
Ser	Thr	Ser	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Asn	Glu	Gly		
6020						6025					6030					
Asp	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gln	Thr	Ser	Val	Ala		
6035						6040					6045					
Glu	Asn	Val	Lys	Pro	Thr	Phe	Thr	Val	His	Val	Asn	Gln	Pro	Leu		
6050						6055					6060					
Ala	His	Asp	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Asn	Ala	Gln	Val	Thr		
6065						6070					6075					
Ile	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Pro	Tyr	Thr	His	Ala	Ala	Gln		
6080						6085					6090					
Gly	Asp	Asp	Val	Tyr	Asn	Asp	Ala	Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Gly	Ile		
6095						6100					6105					
Asn	Ser	Ala	Val	Asp	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu		
6110						6115					6120					
Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Asp	Glu		
6125						6130					6135					
Val	Val	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Thr	Pro	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Gly		
6140						6145					6150					
Glu	Ile	Thr	Tyr	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	Leu	Pro		
6155						6160					6165					
Ile	Asn	Asn	His	Ser	Ala	Leu	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Asp	Gly	Lys		
6170						6175					6180					
Thr	Val	Ile	Thr	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Ala	Thr		
6185						6190					6195					
Val	Thr	Ala	Pro	Asp	Asn	Val	Tyr	Val	Gly	Thr	Asn	Asp	Pro	Val		
6200						6205					6210					

ES 2 712 181 T3

Val Met Ser Ile Ala Thr Val Glu Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe  
6215 6220 6225

Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Ser Val Thr  
6230 6235 6240

Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly Asp Leu Val Lys Val  
6245 6250 6255

Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro  
6260 6265 6270

Thr Phe Thr Val His Ile Asn Thr Ala Leu Ala His Asp Leu Val  
6275 6280 6285

Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Ile Ile Lys Ala Gly Glu  
6290 6295 6300

Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr  
6305 6310 6315

Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile Asn Ser Ala Val Asp  
6320 6325 6330

Ala Thr Gly Ala Thr Phe Glu Asn Leu Gln Leu Gly Gly Asn Ala  
6335 6340 6345

Ser Val Gln Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu  
6350 6355 6360

Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr  
6365 6370 6375

Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser  
6380 6385 6390

Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys Thr Val Ile Thr Val  
6395 6400 6405

Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp  
6410 6415 6420

Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Asp Pro Val Val Met Ser Ile Ala  
6425 6430 6435

Thr Val Glu Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe Glu Gln Leu Thr Leu  
6440 6445 6450



ES 2 712 181 T3

Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Ser Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr  
 6455 6460 6465  
  
 Pro Gly Asn Glu Gly Asp Pro Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp  
 6470 6475 6480  
  
 Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His  
 6485 6490 6495  
  
 Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn  
 6500 6505 6510  
  
 Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr  
 6515 6520 6525  
  
 Thr His Asp Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln  
 6530 6535 6540  
  
 Ile Ser Leu Gly Ile Asn Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr  
 6545 6550 6555  
  
 Phe Glu Asn Leu Glu Leu Gly Gly Ala Ala Ser Val Gln Val Thr  
 6560 6565 6570  
  
 Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser  
 6575 6580 6585  
  
 Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn  
 6590 6595 6600  
  
 Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asp Lys His Ala Ala Leu Thr Phe Thr  
 6605 6610 6615  
  
 Leu Asp Asp Gly Lys Thr Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Gly Thr  
 6620 6625 6630  
  
 Thr Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly  
 6635 6640 6645  
  
 Thr Asn Asp Pro Val Val Met Ser Ile Ala Thr Val Gly Gly Ala  
 6650 6655 6660  
  
 Asp Val Gly Lys Phe Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val  
 6665 6670 6675  
  
 Ser Thr Ser Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly  
 6680 6685 6690

ES 2 712 181 T3

Asp Leu Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala  
 6695 6700 6705  
  
 Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu  
 6710 6715 6720  
  
 Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr  
 6725 6730 6735  
  
 Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln  
 6740 6745 6750  
  
 Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile  
 6755 6760 6765  
  
 Thr Ser Ala Val Asp Val Asp Gly Arg Thr Phe Glu Asn Leu Glu  
 6770 6775 6780  
  
 Leu Gly Gly Ala Ala Ser Val Gln Val Thr Asp Thr Leu Asp Glu  
 6785 6790 6795  
  
 Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly  
 6800 6805 6810  
  
 Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro  
 6815 6820 6825  
  
 Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys  
 6830 6835 6840  
  
 Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr  
 6845 6850 6855  
  
 Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Ala Asn Asp Pro Val  
 6860 6865 6870  
  
 Val Met Ser Ile Ala Thr Val Glu Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe  
 6875 6880 6885  
  
 Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Ser Val Thr  
 6890 6895 6900  
  
 Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly Asp Leu Val Lys Val  
 6905 6910 6915  
  
 Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala Glu Asn Val Lys Pro

ES 2 712 181 T3

6920						6925						6930			
Thr	Phe	Thr	Val	His	Val	Asn	Gln	Pro	Leu	Ala	His	Asp	Leu	Val	
6935						6940					6945				
Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Asn	Ala	Gln	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Glu	
6950						6955					6960				
Thr	Ser	Ala	Pro	Tyr	Thr	His	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Asp	Val	Tyr	
6965						6970					6975				
Asn	Asp	Ala	Gly	Gln	Ile	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Ser	Ala	Val	Asp	
6980						6985					6990				
Val	Asp	Gly	Arg	Thr	Phe	Glu	Asn	Leu	Gln	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	
6995						7000					7005				
Thr	Val	Gln	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Asp	Glu	Val	Val	Ala	Lys	Leu	
7010						7015					7020				
Thr	Ala	Thr	Pro	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Thr	Tyr	Thr	
7025						7030					7035				
Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	Leu	Pro	Ile	Asn	Asn	His	Ser	
7040						7045					7050				
Ala	Leu	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Val	Ile	Thr	Val	
7055						7060					7065				
Pro	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Ala	Pro	Asp	
7070						7075					7080				
Asn	Val	Tyr	Val	Gly	Thr	Asn	Asp	Pro	Val	Ile	Lys	Ser	Ile	Ala	
7085						7090					7095				
Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Asp	Val	Gly	Lys	Phe	Glu	Gln	Leu	Thr	Leu	
7100						7105					7110				
Asp	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Gly	Thr	
7115						7120					7125				
Pro	Gly	Asn	Glu	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	
7130						7135					7140				
Gln	Thr	Ser	Val	Ala	Glu	Asn	Val	Lys	Pro	Thr	Phe	Thr	Val	His	
7145						7150					7155				

ES 2 712 181 T3

Val Asn Gln Pro Leu Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn  
7160 7165 7170

Asn Ala Gln Val Thr Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr  
7175 7180 7185

Thr His Ala Ala Gln Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln  
7190 7195 7200

Ile Ser Leu Gly Ile Asn Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr  
7205 7210 7215

Phe Glu Asn Leu Gln Leu Gly Gly Ala Ala Thr Val Gln Val Thr  
7220 7225 7230

Asp Thr Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser  
7235 7240 7245

Val Thr Glu Gly Gly Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn  
7250 7255 7260

Lys Asp Gly Leu Pro Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr  
7265 7270 7275

Leu Ser Asp Gly Lys Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr  
7280 7285 7290

Val Gly Thr Ala Thr Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly  
7295 7300 7305

Thr Asn Asp Pro Val Val Met Ser Ile Ala Thr Val Gly Gly Ala  
7310 7315 7320

Asp Val Gly Lys Phe Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val  
7325 7330 7335

Ser Thr Ser Val Thr Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Glu Gly  
7340 7345 7350

Asp Leu Val Lys Val Thr Ile Thr Ala Asp Gln Thr Ser Val Ala  
7355 7360 7365

Glu Asn Val Lys Pro Thr Phe Thr Val His Val Asn Gln Pro Leu  
7370 7375 7380

Ala His Asp Leu Val Val Thr Leu Ser Asn Asn Ala Gln Val Thr  
7385 7390 7395

ES 2 712 181 T3

Ile Lys Ala Gly Glu Thr Ser Ala Pro Tyr Thr His Ala Ala Gln  
7400 7405 7410

Gly Asp Asp Val Tyr Asn Asp Ala Gly Gln Ile Ser Leu Gly Ile  
7415 7420 7425

Asn Ser Ala Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Phe Glu Asn Leu Glu  
7430 7435 7440

Leu Gly Gly Ala Ala Lys Val Asp Val Thr Asp Thr Thr Asp Glu  
7445 7450 7455

Val Val Ala Lys Leu Thr Ala Thr Pro Ser Val Thr Glu Gly Gly  
7460 7465 7470

Glu Ile Thr Tyr Thr Ile Thr Leu Thr Asn Lys Asp Gly Leu Pro  
7475 7480 7485

Ile Asn Asn His Ser Ala Leu Thr Phe Thr Leu Ser Asp Gly Lys  
7490 7495 7500

Thr Val Ile Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Val Gly Thr Ala Thr  
7505 7510 7515

Val Thr Ala Pro Asp Asn Val Tyr Val Gly Thr Asn Asp Pro Val  
7520 7525 7530

Ile Lys Ser Ile Ala Thr Val Gly Gly Ala Asp Val Gly Lys Phe  
7535 7540 7545

Glu Gln Leu Thr Leu Asp Lys Thr Pro Val Ser Thr Ala Val Thr  
7550 7555 7560

Asp Glu Pro Gly Ser Gly Thr Pro Gly Thr Gly Asn Lys Gly Asp  
7565 7570 7575

Val Thr Thr Val Gly Ile Thr Gly Thr Thr Ser Leu Thr Glu Gly  
7580 7585 7590

Glu Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Lys Ser  
7595 7600 7605

Glu Val Thr Ile Thr Leu Ser Tyr Ser Gly Thr Ala Gln Asn Gly  
7610 7615 7620

Asp Asp Phe Thr Gly Val Ala Thr Val Lys Ile Pro Ala Asn Ser  
7625 7630 7635

ES 2 712 181 T3

Thr Gly Thr Thr Phe Asn Ile Ala Thr Leu Asn Asp Lys Leu Val  
 7640 7645 7650  
 Glu Gly Thr Glu Asn Phe Val Val Lys Ile Glu Thr Ala Thr Gly  
 7655 7660 7665  
 Gly Asn Phe Glu Asn Leu Gln Val Asp Ser Ser Lys Ser Ser Val  
 7670 7675 7680  
 Thr Thr Thr Ile Leu Asp Asn Asp His Leu Pro Val Ser Pro Gly  
 7685 7690 7695  
 Gly Ala Val Phe Gly Val Glu Asp Thr Asp Tyr Val Phe Ala Trp  
 7700 7705 7710  
 Ser Asp Phe Lys Val Thr Asp Ala Asp Gly Asn Thr Asn Leu Ser  
 7715 7720 7725  
 Val Thr Ile Thr Ser Leu Pro Ala Ala Gly Asn Leu Gln Phe Phe  
 7730 7735 7740  
 Asn Gly Thr Ala Trp Val Asn Val Ala Val Gly Gln Val Val Ser  
 7745 7750 7755  
 Gln Ala Asp Ile Thr Ala Lys Asn Leu Lys Phe Val Pro Ala Leu  
 7760 7765 7770  
 Asn Gln Ser Gly Ala Asp Asn Tyr Gly Gly Asn Gly Val Gly Asn  
 7775 7780 7785  
 Gln Lys Ala Asp Tyr Ala Gln Phe Lys Phe Lys Pro Asn Asp Gly  
 7790 7795 7800  
 Thr Asn Leu Gly Ser Glu Val Thr Met Lys Val Asp Ile Ser Pro  
 7805 7810 7815  
 Val Ala Asp Lys Pro Thr Leu Ser Phe Gly Ser Ala Asp Ile Glu  
 7820 7825 7830  
 Ser Lys Gly Leu Thr Lys Glu Val Trp Thr Ser Leu Lys Gly Leu  
 7835 7840 7845  
 Gly Thr Gly Gly Asn Gly Ile Thr Gly Glu Asp Leu Lys Thr Val  
 7850 7855 7860  
 Phe Ala Asn Ser Gly Ser Ala Asn Ser Ser Ser Thr Thr Thr Asn

ES 2 712 181 T3

7865						7870									7875
Val	Gln	Ser	Asp	Gly	Ser	Val	Thr	Ala	Gly	Thr	Gly	Ser	Lys	Thr	
7880						7885					7890				
Ser	Gly	Leu	Ile	Tyr	Leu	Glu	Ala	Gly	Lys	Val	Tyr	Thr	Phe	Ser	
7895						7900					7905				
Gly	Leu	Ala	Asp	Asp	Ser	Phe	Val	Val	Thr	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	
7910						7915					7920				
Val	Val	Thr	Ala	Thr	Trp	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Thr	
7925						7930					7935				
Phe	Thr	Pro	Asn	Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Ile	Glu	Val	Tyr	His	
7940						7945					7950				
Ala	Asn	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Tyr	Asp	Leu	Asn	Ile	Gln	Val	
7955						7960					7965				
Gly	Ser	Gly	Ala	Val	Thr	Asp	Leu	Ser	Ser	Ser	Asn	Val	Lys	Met	
7970						7975					7980				
Tyr	Gln	Asn	Val	Thr	Glu	Met	Ala	Asn	Ala	Gly	Leu	Gly	Val	Ser	
7985						7990					7995				
Asp	Leu	His	Thr	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Lys	
8000						8005					8010				
Leu	Asn	Glu	Gly	Pro	Glu	Gly	Gly	Ser	Val	Lys	Leu	Val	Gly	Ile	
8015						8020					8025				
Ser	Thr	Ala	Leu	Thr	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Leu	Asn	Val	
8030						8035					8040				
Thr	Leu	Ser	Gly	Ile	Pro	Lys	Gly	Thr	Val	Leu	Ser	Asp	Gly	Ala	
8045						8050					8055				
Gly	His	Thr	Val	Thr	Val	Gly	Thr	Ala	Pro	Val	Asp	Val	Thr	Gly	
8060						8065					8070				
Trp	Lys	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr	Tyr	Lys	
8075						8080					8085				
Gly	Ser	Phe	Asp	Ile	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Glu	Ser	Leu	
8090						8095					8100				

ES 2 712 181 T3

Gly Gly Ser Ala Ile Thr Thr Gly Asn Ile Pro Val Thr Val Tyr  
8105 8110 8115

Gly Ala Thr Tyr Lys Ala Ser Val Gly Thr Ser Gly Asn Asp Thr  
8120 8125 8130

Leu Thr Gly Ser Glu Gly Asn Asp Ile Phe Val Ala Asp Val Ser  
8135 8140 8145

Gly Leu Asn Val Val Gln Gly Lys Asn Tyr Asn Ile Ala Phe Met  
8150 8155 8160

Val Asp Ser Ser Gly Ser Met Ser Asp Lys Ser Ile Ala Asp Ala  
8165 8170 8175

Lys Thr Gln Leu Ala Ser Val Phe Asn Thr Leu Lys Ala Ser Leu  
8180 8185 8190

Gly Ser Asp Thr Ser Gly Thr Val Asn Ile Phe Leu Val Asp Phe  
8195 8200 8205

Asp Thr Gln Val Asn Lys Asn Val Ala Val Asn Leu Ala Asp Pro  
8210 8215 8220

Asp Ala Leu Ser Lys Leu Gln Ala Val Leu Asn Ser Met Val Gly  
8225 8230 8235

Gly Tyr Tyr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Glu Asp Ala Phe Lys Thr  
8240 8245 8250

Thr Ser Asn Phe Phe Asn Ser Thr Met Ala Thr Ser Asn Lys Gly  
8255 8260 8265

Ala Glu Asn Leu Thr Tyr Phe Ile Thr Asp Gly Lys Pro Thr Tyr  
8270 8275 8280

Tyr Gln Ser Asn Glu Ser Thr Asn Pro Ser Leu Trp Lys Asn Gly  
8285 8290 8295

Lys Ser Leu Asp Asp Val Val Asn Val Asn Asn Tyr Lys Met Gly  
8300 8305 8310

Asp Thr Phe Ser Ala Trp Ala Asp Ala Thr His Lys Val Glu Ile  
8315 8320 8325

Ser Ser Ser Gly Val Val Lys Val Leu Thr Tyr Thr Glu Asn Arg  
8330 8335 8340



ES 2 712 181 T3

Arg Gly Glu Leu Val Leu Asp Ser Thr Lys Thr Val Gly Thr Leu  
8345 8350 8355

His Ala Gln Gly Asp Gly Thr Tyr Glu Phe Ser Ser Leu Asp Gly  
8360 8365 8370

Thr Gly Tyr Ala Asp Tyr Trp Asn Tyr Val Tyr Ser Ala Ala Gly  
8375 8380 8385

Ser Thr Glu Ser Phe Ala Val Leu Gly Gly Thr Asn Gly Leu Ser  
8390 8395 8400

Lys Val Gln Ala Ile Gly Leu Asn Ser Asp Val Thr Leu Asn Asp  
8405 8410 8415

Leu Lys Pro Tyr  
8420

<210> 38

<211> 1461

<212> ADN

5 <213> Pseudomonas putida

<400> 38

ES 2 712 181 T3

ctgggcctgc	cgcggctaga	tgggatagtg	acgcgggccc	tgctggaggg	tgaccacagcg	60
caactgggtg	aactgatcga	tggccgtgcg	gctgccgaag	ctgccatagc	cgctggactt	120
gaccccgcca	aacggcatct	gcgcttcac	gtgaacggtc	gggccgttga	tatggcagat	180
acccgactcc	accggttggg	ccaaggccag	ggcgcggctg	gtgtcgcggc	tgaaaatggc	240
cgatgacaga	ccgaactccg	agtcgttggc	cagctgcagc	aaggcttcgt	cgcttcggc	300
gcgcagtacc	accgccaccg	ggccgaagga	ctcctcgcgg	tacaggcgca	tgctggcatc	360
gacgttgctg	agcaaggtcg	ggtgcaggat	gctgccttcc	agctggccgc	cgctgaccag	420
gcgcgcgccc	ttggccacgg	catcgtcgat	cagtgccttg	atgcgctcgc	cgcccgctgc	480
gctgaccagc	gagccgagca	ccgaggtgct	ggcttgccga	tcacctgac	gcagcccggc	540
gatcttcacc	gccagcttgt	cgacgaaagc	gtcggcaata	cagctgtcca	ccacaaggcg	600
ctcggtgga	atgcagatct	gcccctggtt	gaagtaggca	ccgaaggccg	ccgcttcgac	660
cgtggcgtcc	aggtcggcat	cgtcgagcac	cagcaaaggt	gccttgccgc	ccagttcgag	720
cagggccggc	ttgagatggc	gggccgccag	ttcgcgcagc	atgcgcccga	cgtgcgtcga	780
accggtgaag	ttgaccggc	gtaccgcagg	ggtggcgatc	agccgctcga	cgatggcggg	840
ggcatcctgc	ggcgcattgc	tgatgacatt	gaccacgccg	tcgccgatgc	ctgcatcgtg	900
cagcacctgg	ccgatcagcc	gatggaccgc	cgggctcagc	tccgaggcct	tgagcaccac	960
ggtgttgccg	cagggcagcg	gcatggcaat	ggcacgcgtg	gccagtatca	ccggggcggt	1020
ccacggtgcg	atgcccaaca	ccacgccgca	gggcgcgcgc	agggccattg	cgaagctgcc	1080
gggaacgtcc	gaggggatca	cttcaccggt	gatctgcgtg	gtcatggctg	cagcctcggg	1140
cagcatgttg	gcggccaact	tcacgttgaa	gccataccag	ttggccatgg	ccccggtttc	1200
accggcggcg	gcgatgaact	cggcggccct	cgctgcaac	agatcagcgc	ctgccagcaa	1260
gcggctgcgc	cgctcgcgcc	gtgccagggc	ggcccaggcc	ggaaacgccg	cgctggcagc	1320
agccaccgcg	gcacggcat	cggccagtgt	ggcggcggca	gcctgcgaca	ccacctcgcc	1380
agtcaccggg	ttacagcgct	cgaaggttcg	tccatcgctg	gcggggcgcg	actgcccgcc	1440
aatcagcaaa	ggcacctgca	a				1461

<210> 39

<211> 482

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

5

<400> 39

ES 2 712 181 T3

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

Asp Gly Arg Thr Phe Glu Arg Cys Asn Pro Val Thr Gly Glu Val Val  
 20 25 30

Ser Gln Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ala Asp Ala Asp Ala Ala Val Ala  
 35 40 45

Ala Ala Ser Ala Ala Phe Pro Ala Trp Ala Ala Leu Ala Pro Gly Glu  
 50 55 60

Arg Arg Ser Arg Leu Leu Ala Gly Ala Asp Leu Leu Gln Ala Arg Ala  
 65 70 75 80

Ala Glu Phe Ile Ala Ala Ala Gly Glu Thr Gly Ala Met Ala Asn Trp  
 85 90 95

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

Ala Met Thr Thr Gln Ile Thr Gly Glu Val Ile Pro Ser Asp Val Pro  
 115 120 125

Gly Ser Phe Ala Met Ala Leu Arg Ala Pro Cys Gly Val Val Leu Gly  
 130 135 140

Ile Ala Pro Trp Asn Ala Pro Val Ile Leu Ala Thr Arg Ala Ile Ala

ES 2 712 181 T3

145    150    155    160  
 Met Pro Leu Ala Cys Gly Asn Thr Val Val Leu Lys Ala Ser Glu Leu  
     165    170    175  
 Ser Pro Ala Val His Arg Leu Ile Gly Gln Val Leu His Asp Ala Gly  
     180    185    190  
 Ile Gly Asp Gly Val Val Asn Val Ile Ser Asn Ala Pro Gln Asp Ala  
     195    200    205  
 Pro Ala Ile Val Glu Arg Leu Ile Ala Asn Pro Ala Val Arg Arg Val  
     210    215    220  
 Asn Phe Thr Gly Ser Thr His Val Gly Arg Ile Val Gly Glu Leu Ala  
     225    230    235    240  
 Ala Arg His Leu Lys Pro Ala Leu Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ala Pro  
     245    250    255  
 Leu Leu Val Leu Asp Asp Ala Asp Leu Asp Ala Thr Val Glu Ala Ala  
     260    265    270  
 Ala Phe Gly Ala Tyr Phe Asn Gln Gly Gln Ile Cys Met Ser Thr Glu  
     275    280    285  
 Arg Leu Val Val Asp Ser Cys Ile Ala Asp Ala Phe Val Asp Lys Leu  
     290    295    300  
 Ala Val Lys Ile Ala Gly Leu Arg Ala Gly Asp Pro Gln Ala Ser Thr  
     305    310    315    320  
 Ser Val Leu Gly Ser Leu Val Ser Ala Ala Ala Gly Glu Arg Ile Lys  
     325    330    335  
 Ala Leu Ile Asp Asp Ala Val Ala Lys Gly Ala Arg Leu Val Ser Gly  
     340    345    350  
 Gly Gln Leu Glu Gly Ser Ile Leu Gln Pro Thr Leu Leu Asp Asn Val  
     355    360    365  
 Asp Ala Ser Met Arg Leu Tyr Arg Glu Glu Ser Phe Gly Pro Val Ala  
     370    375    380  
 Val Val Leu Arg Ala Glu Gly Asp Glu Ala Leu Leu Gln Leu Ala Asn  
     385    390    395    400

ES 2 712 181 T3

Asp Ser Glu Phe Gly Leu Ser Ser Ala Ile Phe Ser Arg Asp Thr Ser  
 405 410 415

Arg Ala Leu Ala Leu Ala Gln Arg Val Glu Ser Gly Ile Cys His Ile  
 420 425 430

Asn Gly Pro Thr Val His Asp Glu Ala Gln Met Pro Phe Gly Gly Val  
 435 440 445

Lys Ser Ser Gly Tyr Gly Ser Phe Gly Ser Arg Thr Ala Ile Asp Gln  
 450 455 460

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

Pro Ile

<210> 40  
 <211> 5225  
 <212> ADN  
 <213> Pseudomonas putida

5

<400> 40

```

agccattggc ccgaccgccg tatictcaac ctgctgggca tcgagctgcc cattctgcag      60
gcacccatgg cggggggcgac cggctcggcc atggccatcg ctgtggggcca ggcaggtggg      120
ctgggcgccc tgccctgcgc catgctcagc ggcgaacagg tgcgcgccga gatcgcctgca      180
ttccgcgccg gctgccgggg ggcgccgctg aacctgaact tcttctgcca ccagccgcca      240
gcgcccgatg ccgagcgcca tgcgcgctgg aagcaggcac ttgagcctta ttacagcgaa      300
gtgggcgccc atttcacggc gccacgccg gtgtccaacc gtgcgcttt cgacgagcag      360
agctgcctgc tggtcgaagc gttgcgcccg gaggtggtga gcttcattt cggcctgccg      420
caggccgaac tgctgcagcg ggtaaaggcc agcggtgcca aggtactgtc cagcgccacg      480
accgtggaag aagcggcctg gctggagcgc aatggctgcg atgcgatcat cgccatgggg      540
tatgaagccg gtggccatcg cggcatgttc ctacgcgatg acatcaccag ccagataggc      600
accttcgcgc tcgtaccgca ggtggccgat gccgtcggcg tgccgggtgat tgcccgggt      660
ggtatcggcg accaccgcgg gctgttggcg gactggccc tgggtgcctc ggcagtgcag      720
atcggcaccg cttacctggt ctgccccgag gccaaagggtg cgccagcgca tcgccaggcg      780
ctggacagcg cgcctgccag cgacaccgcc ctgaccaacc tgttcaccgg ccgcccggcg      840
cgcggcacat acaatcgctt catgcgcgag ctggggccga tgagcgagct tgcaccgcgc      900
ttcccgcctg cgggcggggc attgatgcct ttacggggca tcaccgatcc gcagggtaag      960
agtgatttca gcaatctgtg gtcggggcag gcgttacggc taggccggca catgccggcg     1020
    
```

ES 2 712 181 T3

ggtgagctga cccgggagat tgccggtaag gcattggcag tgatcgggtca ccaggcattc 1080  
 tgacaggcag gcatggcctc ttcacggcca atggcttata gctatatagt taaggctata 1140  
 acgataacct caaggagctg tcttcatgcg tatccgctcg ccccagctgg tcatcactgc 1200  
 cctggccagc ctgctcggct tcaacactgc ctgggcccagc gaagtccagc tcgcggtcgc 1260  
 agccaacttc acagcccctg tccaggccat cgccaaggac ttcgagaaag acaccggcca 1320  
 caaactgatc gcgccctacg gcgccaccgg gcagttctac ggcgagatca agaacgggtgc 1380  
 accgttcgaa gtgttcctcg ccgctgacga ctccaccccc aagaagctgg aagcagaaag 1440  
 ggaaaccgta cctggctcac gctttaccta cgccatcggc accctggcct tgtgggtctgc 1500  
 gaaggaaggc tacgtagatg ccaaggggtga agtgctgaaa aagaacgaat acaaacacct 1560  
 gtccatcgcc aacccgaaag cggcacctta cggcctggcc gccaccagc tactggacgg 1620  
 gctgaagctc accgaggcca ccaaaggcaa gatcgtcgaa ggccagaaca tcaccaggc 1680  
 cttccagttc gtctccaccg gcaacgccga gctgggcttc gtcgcccttt cgcagatcta 1740  
 caaggacggc aaggtaaacc atggctcggc atggatcgtg ccgtccaacc tgcacgacct 1800  
 gatccgccag gacgcgtca tcctcaaaa aggcaaggac aatgcggccg ccaaggcact 1860  
 ggtcgaatac ctcaaaggcc cgaaagccgc agcgggtgatc aaatcctatg gttatgaacg 1920  
 ctgatgccac tcgatgccag tgacctgggc gccatctggc tgaccgtaa actggccagc 1980  
 ctgaccaccc tgatcctgct gatcatcggc acaccctcgc cctgggtggct cgcgcgcagc 2040  
 cgctcttggc tgccgcgggc ggtgggtgcg gtgggtggcac tgccgctggt actgccaccg 2100  
 acggtgatcg gtttttacct gttgatcgcc cttggcccgc accggtggct tggtcaggcc 2160  
 acccaggcgc taggcctggg cagtgtggtg ttcagcttca caggcctggt gattggctcg 2220  
 acggtgtact ccatgccgtt cgtgggtgcaa cccctgcaga atgcctttgg cgcgatcggc 2280  
 cagcgccccc tggaagtgc cgctactctg cgagccagcc catgggatac cttogttcat 2340  
 gtgggtgctgc cgctggcccg ccctggcttc gtcactgcca gcatcctcgg ctttgcccac 2400  
 acggtgggcg agtttgcgct cgtactgatg atcggcggca acatccccga caagactcgc 2460  
 gtggtttcgg tgacagatctt cgatcacgtc gaagccatgg agtattcgca ggcccactgg 2520  
 ctggccgggtg ccatgctggt gttctctttc ctgggtgctgc tcctgctgta cgctggacgc 2580  
 cgccggcaaag ctggctggag ctgaaatgac cgcatcgatt gtggcgcacc tgaaactggc 2640  
 acgcgacgac tttaccctgg acgtcaacct gcacctgccc gggcgcggca tcagcgcgct 2700  
 gttcggccac tctggctccg gcaagaccag ctgcctgcgc tgcctggccg ggctggaacg 2760  
 ggccgccagc gcctatatcg aagtcaacgg cgaagtctgg gaagacagca cccgaggcta 2820  
 cttccaggca ccgcacctgc gcccggtggg ctacgtgttc caggaagcca gcctgttccc 2880

ES 2 712 181 T3

gcacctgtcg gtgcgcgga acctgacggt cggctggcgc cgggtagcgc ccgctgaacg 2940  
caaggtcagc ctcgaccagg cgtgccaaact gctgggtatc ggccacttgc tggaccgccg 3000  
cccggcaacc ctgtcgggtg gcgagggcga gcgggtgggt attgcccgcg ccctgctcag 3060  
cagcccgcgg ctgtttgtga tggacgagcc gctggcagcc ctcgacagcc cgcgcaagcg 3120  
cgagatactg cccttcctgg agcgcctgca cgacgaactg gatatccctc tgatatatgt 3180  
cagccacgcc caggatgaag tcgcgcggct ggccgaccac ctggtgttgc tggaaacaag 3240  
ccgggggatc gccagcggcc cgatcggcga aaccctggct cgccttgacc tgtcgcctggc 3300  
ccagggcgac gacgcggcg tcgtgttcga aggtaggggt gttgggcacg acccgatta 3360  
cggcctgctg gacctgcgcc tgcccggcag cagcgggccg ctgctgcgca taccacgcg 3420  
ggcgcaggtg atgggcagca ccctgcgcgt caaggtgcag gcccgggatg tcagcctggc 3480  
actggcggcg gatagcgcac cgagcctcct caaccgcctg ccggtgcgtg tgcgcgagag 3540  
ctgcccggcg gccaaaccgg cgcattgtgct ggtcagcctg gatgctggcg gcaatgcct 3600  
gcttgcacgc atcaccgct tctcggcaga ccagctcggc ttgcacacag ggcagatact 3660  
gttcgccag atcaagtcgg tggccctttt gggtgagca tcctcagcgc gcgtattgtc 3720  
cattgatcag tgacctgatc gagggccgcc gcccatgctt gactgcccc tgcgcgcac 3780  
cctgcactac gttgacgaca gtcagccggg cctgaccctg cggcgcctggc gcgaccgttt 3840  
catctacctg gatgccgatg gccaacgggt acgcgacagc gaaacccttg cgcgcatcgc 3900  
cgcattggtg atcccccg cctaacggga tgtgtggatc tgcgccgatc cgcaaggcca 3960  
cctgcaagcc accggccgcg atgcccgtgg ccgcaagcag taccgctacc acgcacagtg 4020  
gcgcgaactg cgcgaccagc acaaatacgg gcgcatgctt gcgttcgccc aagccctgcc 4080  
aaagctgcgc acacagctgg aagcccactt ggcgcgcca gggctggacc gggaaaaagt 4140  
catggcgctg gtggtgagcc tgctggacca caccctgatc cgcacgcgca accagcgcta 4200  
cctgcgcgat aaccggtcgt acggattgac caccctgcgc aatcgccatg tgcaggtcaa 4260  
aggcagcact atccgcttcc agttccgcgg caagcgcggc gtcgaacaca acgtcacct 4320  
caacgaccgg cgcttgcca acctactcaa acgtgcgatg gaactgcctg ggcaggcact 4380  
gtttcagtac ctggatgaag atggccagcg ccatagtgtc ggctccagcg aggtcaatca 4440  
gtttctgcag cagttgaccg gtgccgactt tactgccaaag gactatcgca cctgggccgg 4500  
cagcagcctg gcattgaacc tgctaaagcc cttggcctgg gagccggaga gtgaagccaa 4560  
acgccaggtc gccgcaatag tccgccaggt agccacgcgc ctgggcaata cgcggcagt 4620  
gtgccggcgc tgctacatcc acccggcagt tctggagcac tatgccttgg ggcgcctggc 4680  
caatttgccg aaaaaccgtg tgcgcaaagg cctggaccgg gaggaagtgg ccttgctgtt 4740  
gtttctcag gcacttgagg aacaggagga ccattgagct tgtctattca gcccatgatg 4800

# ES 2 712 181 T3

cgaagaaatt tcccattagc cgccaacccc cctattcttg ccagcgagca ccttggccga	4860
caaaccgttg acggtttgct ttggcacctg caactgaaga cacgcaacag aatttgtctg	4920
tcggggaatt actatccgcc gaaagcgtct ttaatgagaa ggaagagga caagctcccg	4980
ccgccgcggc aactagccca ggggacttat acatcaccaa ggagaactac atgctgatac	5040
tcacccgtaa ggttggcgaa agcatcgtca tcaacgatga catcaaagtc accattctgg	5100
gcgtcaaagg gatgcaggtg aggatcggtg tcgatgcacc gaaagatgtt caggtccatc	5160
gagaagagat tttcaaacgc atccaggccg gcagcccggc tccggagaaa cacgaagaca	5220
cacac	5225

<210> 41

<211> 252

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas putida*

<400> 41



ES 2 712 181 T3

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

Leu Gly Phe Asn Thr Ala Trp Ala Asp Glu Val Gln Val Ala Val Ala  
 20 25 30

Ala Asn Phe Thr Ala Pro Val Gln Ala Ile Ala Lys Asp Phe Glu Lys  
 35 40 45

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

Tyr Ala Gln Ile Lys Asn Gly Ala Pro Phe Glu Val Phe Leu Ala Ala  
 65 70 75 80

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

Gly Ser Arg Phe Thr Tyr Ala Ile Gly Thr Leu Ala Leu Trp Ser Ala  
 100 105 110

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

Tyr Lys His Leu Ser Ile Ala Asn Pro Lys Ala Ala Pro Tyr Gly Leu  
 130 135 140

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

Gly Lys Ile Val Glu Gly Gln Asn Ile Thr Gln Ala Phe Gln Phe Val  
 165 170 175

Ser Thr Gly Asn Ala Glu Leu Gly Phe Val Ala Leu Ser Gln Ile Tyr  
 180 185 190

Lys Asp Gly Lys Val Thr His Gly Ser Ala Trp Ile Val Pro Ser Asn  
 195 200 205

Leu His Asp Pro Ile Arg Gln Asp Ala Val Ile Leu Asn Lys Gly Lys  
 210 215 220

Asp Asn Ala Ala Ala Lys Ala Leu Val Glu Tyr Leu Lys Gly Pro Lys  
 225 230 235 240

Ala Ala Ala Val Ile Lys Ser Tyr Gly Tyr Glu Arg  
 245 250

<210> 42

<211> 226

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

ES 2 712 181 T3

<400> 42

Met Pro Leu Asp Ala Ser Asp Leu Gly Ala Ile Trp Leu Thr Val Lys  
 1 5 10 15

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

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

Ala Val Val Ala Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Thr Val Ile Gly Phe  
 50 55 60

Tyr Leu Leu Ile Ala Leu Gly Pro His Gly Trp Leu Gly Gln Ala Thr  
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Gly Leu Gly Ser Val Val Phe Ser Phe Thr Gly Leu Val  
 85 90 95

Ile Gly Ser Thr Val Tyr Ser Met Pro Phe Val Val Gln Pro Leu Gln  
 100 105 110

Asn Ala Phe Gly Ala Ile Gly Gln Arg Pro Leu Glu Val Ala Ala Thr  
 115 120 125

Leu Arg Ala Ser Pro Trp Asp Thr Phe Val His Val Val Leu Pro Leu  
 130 135 140

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

Val Gly Glu Phe Gly Val Val Leu Met Ile Gly Gly Asn Ile Pro Asp  
 165 170 175

Lys Thr Arg Val Val Ser Val Gln Ile Phe Asp His Val Glu Ala Met  
 180 185 190

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

Phe Leu Val Leu Leu Leu Leu Tyr Ala Gly Arg Arg Gly Lys Ala Gly  
 210 215 220

Trp Ser  
 225

<210> 43  
 <211> 363  
 <212> PRT  
 <213> Pseudomonas putida

5

ES 2 712 181 T3

<400> 43

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

ES 2 712 181 T3

Lys Val Ser Leu Asp Gln Ala Cys Gln Leu Leu Gly Ile Gly His Leu  
 115 120 125

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

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

Glu Pro Leu Ala Ala Leu Asp Ser Pro Arg Lys Arg Glu Ile Leu Pro  
 165 170 175

Phe Leu Glu Arg Leu His Asp Glu Leu Asp Ile Pro Leu Ile Tyr Val  
 180 185 190

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

Leu Glu Gln Gly Arg Ala Ile Ala Ser Gly Pro Ile Gly Glu Thr Leu  
 210 215 220

Ala Arg Leu Asp Leu Ser Leu Ala Gln Gly Asp Asp Ala Gly Val Val  
 225 230 235 240

Phe Glu Gly Arg Val Val Gly His Asp Pro His Tyr Gly Leu Leu Asp  
 245 250 255

Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ser Gly Pro Leu Leu Arg Ile Thr His Ala  
 260 265 270

Ala Gln Val Met Gly Ser Thr Leu Arg Val Lys Val Gln Ala Arg Asp  
 275 280 285

Val Ser Leu Ala Leu Ala Ala Asp Ser Ala Ser Ser Ile Leu Asn Arg  
 290 295 300

Leu Pro Val Arg Val Arg Glu Ser Cys Pro Ala Ala Asn Pro Ala His  
 305 310 315 320

Val Leu Val Ser Leu Asp Ala Gly Gly Asn Ala Leu Leu Ala Arg Ile  
 325 330 335

Thr Arg Phe Ser Ala Asp Gln Leu Gly Leu His Thr Gly Gln Ile Leu  
 340 345 350

Phe Ala Gln Ile Lys Ser Val Ala Leu Leu Gly

355

360

ES 2 712 181 T3

<210> 44  
 <211> 1479  
 <212> ADN  
 <213> Pseudomonas putida

5

<400> 44

```

atctacgcac aacccggaac tccagggcgcc gtcgtatcct tcaaaccgccg ttatggcaac      60
ttcatcgggtg gcgagttcgt gcagccggtt gctggccagt acttcatcaa cagctcgccg      120
gtcaatggcc agccgattgc cgaattcccg cgctccacgg cccaggacgt cgagcgcgcc      180
ctggacgccg cgcatgccgc cgccgaagcc tggggcaaga cctcggtgca agaccgtgcg      240
cgggtactgc tgaaaattgc cgaccgcatt gaacagaacc tggaagtgct ggcggttacc      300
gaaagctggg acaacggcaa ggcatacgc gaaacctga atgccgacgt gccgctggca      360
gcggaccact tccgctatct tgccgggttc atccgcgccc aggagggtgg cgtaggcgag      420
atcaacgaag gcaccgtggc ttatcatt cagcagccgc tgggtgtggt ggggcagatc      480
atcccgtgga acttcccgct gctgatggcc gcctggaagc tcgccccggc cttggccgct      540
ggcaactgcg tgggtgctcaa gcccgcgagg cagacgccgc tgtcgattac cgtctttgcc      600
gaactgatcg ccgacctgtt gccggcaggc gtactgaaca tcgtccaggg ctttggccgt      660
gaggccggtg aggcgctggc caccagcaag cgattgcca agatcgcggt caccgggtcc      720
accccgtggg gctcgcacat catgaagtgc gcggccgaga acatcatccc gtccaccgtc      780
gaactgggtg gcaagtcgcc gaacattttc ttcgaagaca tcatgcaggc cgagccggcg      840
ttcatcgaga aggctgccga aggcctggtg ctggcgcttc tcaaccaggg cgaggtgtgc      900
acctgcccgt cacgggcgct gatccaggag tcgatctacg aaccgttcat ggccgaggtg      960
atgaagaaga tcgccaagat caccgcggc aaccgctgg ataccgaaac catggtgggt      1020
gctcaggcgt ccgagcaaca gtacgacaag atcctttcgt acctggaaat tgcccgggag      1080
gagggcgcgc agctgctcac cggcgggtgt gccgagcggc tgcagggtga cctggccagc      1140
ggttactaca ttcagccaac cctgctcaag ggcaacaaca agatgcgcgt gttccaggaa      1200
gaaatcttcg ggccagtggg gggcgtgacc accttcaagg acgaagccga agcgtggcg      1260
atcgccaacg acagtgaatt cggcctgggc gccgcctgt ggaccgcga catcaaccgc      1320
gcttaccgca tgggccgcgg gatcaaggcc gggcgagtgt ggaccaactg ctaccacctg      1380
taccggcgc atgcggcggt cgggggttac aagaagtccg gtggtggccg tgagaccac      1440
aagatgatgc ttgaccatta tcagcagacc aagaacctg      1479
    
```

<210> 45  
 <211> 494  
 <212> PRT  
 <213> Pseudomonas putida

10

<400> 45

ES 2 712 181 T3

Met Ile Tyr Ala Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ala Val Val Ser Phe Lys  
1 5 10 15

Pro Arg Tyr Gly Asn Phe Ile Gly Gly Glu Phe Val Gln Pro Leu Ala  
20 25 30

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

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

Ala His Ala Ala Ala Glu Ala Trp Gly Lys Thr Ser Val Gln Asp Arg  
65 70 75 80

Ala Arg Val Leu Leu Lys Ile Ala Asp Arg Ile Glu Gln Asn Leu Glu  
85 90 95

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

Thr Leu Asn Ala Asp Val Pro Leu Ala Ala Asp His Phe Arg Tyr Phe  
115 120 125

Ala Gly Cys Ile Arg Ala Gln Glu Gly Gly Val Gly Glu Ile Asn Glu  
130 135 140

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

Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Leu Leu Met Ala Ala Trp Lys Leu Ala  
165 170 175

Pro Ala Leu Ala Ala Gly Asn Cys Val Val Leu Lys Pro Ala Glu Gln  
180 185 190

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

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

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

ES 2 712 181 T3

Ser Thr Pro Val Gly Ser His Ile Met Lys Cys Ala Ala Glu Asn Ile  
 245 250 255

Ile Pro Ser Thr Val Glu Leu Gly Gly Lys Ser Pro Asn Ile Phe Phe  
 260 265 270

Glu Asp Ile Met Gln Ala Glu Pro Ala Phe Ile Glu Lys Ala Ala Glu  
 275 280 285

Gly Leu Val Leu Ala Phe Phe Asn Gln Gly Glu Val Cys Thr Cys Pro  
 290 295 300

Ser Arg Ala Leu Ile Gln Glu Ser Ile Tyr Glu Pro Phe Met Ala Glu  
 305 310 315 320

Val Met Lys Lys Ile Ala Lys Ile Thr Arg Gly Asn Pro Leu Asp Thr  
 325 330 335

Glu Thr Met Val Gly Ala Gln Ala Ser Glu Gln Gln Tyr Asp Lys Ile  
 340 345 350

Leu Ser Tyr Leu Glu Ile Ala Arg Glu Glu Gly Ala Gln Leu Leu Thr  
 355 360 365

Gly Gly Gly Ala Glu Arg Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Gly Tyr Tyr  
 370 375 380

Ile Gln Pro Thr Leu Leu Lys Gly Asn Asn Lys Met Arg Val Phe Gln  
 385 390 395 400

Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Gly Val Thr Thr Phe Lys Asp Glu  
 405 410 415

Ala Glu Ala Leu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Phe Gly Leu Gly Ala  
 420 425 430

Gly Leu Trp Thr Arg Asp Ile Asn Arg Ala Tyr Arg Met Gly Arg Gly  
 435 440 445

Ile Lys Ala Gly Arg Val Trp Thr Asn Cys Tyr His Leu Tyr Pro Ala  
 450 455 460

His Ala Ala Phe Gly Gly Tyr Lys Lys Ser Gly Val Gly Arg Glu Thr  
 465 470 475 480

His Lys Met Met Leu Asp His Tyr Gln Gln Thr Lys Asn Leu  
 485 490

<210> 46  
 <211> 1465  
 <212> ADN

ES 2 712 181 T3

<213> Pseudomonas putida

<400> 46

gctgatagtg atccagcatc atcttgtgcg tctcacgccc aacccccgac ttcttgtacc	60
cgccgaacgc ggcacgccc gggtagcaggt ggtagcagtt ggtccacaca cggccagcct	120
tgatgccccg gcccatgcgg taggcacggt tgatgtcgcg ggtccacacg ccggcgccca	180
ggccgaactc ggtgtcgttg gcaattgcca gcgcttcggc ttcgtccttg aaggtggtga	240
cgctgaccac cgggccaag atttcttcct ggaacacgcg catcttggtt ttgcccttga	300
gcagggtcgg ctggatgtag taaccggtag ccagogaacc ttccagcttc tcgaccttgc	360
cgccggtgag cagctcggcg ccttcttcct gggcaatctg caggtacgag aggatctttt	420
cgaactgctg ctgagggcc tgggcgccga ccatggtgtc ggtgtccaac gggtcgccgc	480
gcttgatctg cagcaccttc ttcacacca cttccatgaa ctgcggatag atcgactctt	540
gcaccagggc acgagcggg caggtgcaca cttcaccctg gttgaagaac gccagcacca	600
tgcttcttgc cgccttctcg atgaagcttg gttcggcctg catgatgtct tcgaagtaca	660
cgttcggcga cttgccacc agttcgacgg tggacgggat gatgttctcg gcggcgatt	720
tcatgatgtg cgagcccacc gggtagagc cgggtgaaggc gatcttggcg atgcgtttgc	780
tggtggccag ggcttcaccg gcttcgcggc catagccttg cactacgttg agcacgccag	840
gtggcaacag gtcgccaatg acttcgagca gtacggtgat acccagcggc gtctgttcgg	900
caggcttgag caccacgcag ttaccagctg ccagtgccgg ggcaagcttc caggcagcca	960
tcaggatcgg gaagttccag gggatgatct gcccgaccac gcccagtgcc tcgtggatgt	1020
ggtaggccac ggtgccttca ttgatttcgg cagcgcgcc ttctggggcg cggatgcagc	1080
cagcgaata gcggaagtgg tcgaccgcca gcggaatgtc ggcggtgagg gtttcgcgga	1140
tcggcttgcc gttgtcccag gtttcggtaa tggccagcag ttcgaggttc tgctcgatgc	1200
ggtcggcgat cttcagcagc acggtggaac gatcctgcac tgaagtgcgg ccccagcgt	1260
cggccgcagc atgggcggca tccagggctt tgcgatgtc ttcggcagta gagcggggga	1320
actcagcgat cagcttgcca ttcaccgggg aggtatcttc gaagtactgc ccctttaccg	1380
gagtaacgaa ctcaccaccg atgtagttgc cgtagcggct cttgaaggaa accttcgcgc	1440
cttcggtacc gggatgtgca taacg	1465

<210> 47

<211> 506

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 47

5



ES 2 712 181 T3

Met Arg Tyr Ala His Pro Gly Thr Glu Gly Ala Lys Val Ser Phe Lys  
1 5 10 15

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

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

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

Ala His Ala Ala Ala Asp Ala Trp Gly Arg Thr Ser Val Gln Asp Arg  
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Asn Ala Asp Ile Pro Leu Ala Val Asp His Phe Arg Tyr Phe  
115 120 125

Ala Gly Cys Ile Arg Ala Gln Glu Gly Gly Ala Ala Glu Ile Asn Glu  
130 135 140

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

Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile Leu Met Ala Ala Trp Lys Leu Ala  
165 170 175

Pro Ala Leu Ala Ala Gly Asn Cys Val Val Leu Lys Pro Ala Glu Gln  
180 185 190

Thr Pro Leu Gly Ile Thr Val Leu Leu Glu Val Ile Gly Asp Leu Leu  
195 200 205

Pro Pro Gly Val Leu Asn Val Val Gln Gly Tyr Gly Arg Glu Ala Gly  
210 215 220

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

ES 2 712 181 T3

Ser Thr Pro Val Gly Ser His Ile Met Lys Cys Ala Ala Glu Asn Ile  
 245 250 255

Ile Pro Ser Thr Val Glu Leu Gly Gly Lys Ser Pro Asn Val Tyr Phe  
 260 265 270

Glu Asp Ile Met Gln Ala Glu Pro Ser Phe Ile Glu Lys Ala Ala Glu  
 275 280 285

Gly Met Val Leu Ala Phe Phe Asn Gln Gly Glu Val Cys Thr Cys Pro  
 290 295 300

Ser Arg Ala Leu Val Gln Glu Ser Ile Tyr Pro Gln Phe Met Glu Val  
 305 310 315 320

Val Met Lys Lys Val Leu Gln Ile Lys Arg Gly Asp Pro Leu Asp Thr  
 325 330 335

Asp Thr Met Val Gly Ala Gln Ala Ser Gln Gln Gln Phe Glu Lys Ile  
 340 345 350

Leu Ser Tyr Leu Gln Ile Ala Gln Glu Glu Gly Ala Glu Leu Leu Thr  
 355 360 365

Gly Gly Lys Val Glu Lys Leu Glu Gly Ser Leu Ala Thr Gly Tyr Tyr  
 370 375 380

Ile Gln Pro Thr Leu Leu Lys Gly Asn Asn Lys Met Arg Val Phe Gln  
 385 390 395 400

Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Ser Val Thr Thr Phe Lys Asp Glu  
 405 410 415

Ala Glu Ala Leu Ala Ile Ala Asn Asp Thr Glu Phe Gly Leu Gly Ala  
 420 425 430

Gly Val Trp Thr Arg Asp Ile Asn Arg Ala Tyr Arg Met Gly Arg Gly  
 435 440 445

Ile Lys Ala Gly Arg Val Trp Thr Asn Cys Tyr His Leu Tyr Pro Ala  
 450 455 460

His Ala Ala Phe Gly Gly Tyr Lys Lys Ser Gly Val Gly Arg Glu Thr  
 465 470 475 480

His Lys Met Met Leu Asp His Tyr Gln Gln Thr Lys Asn Leu Leu Val  
 485 490 495

Ser Tyr Asp Ile Asn Pro Leu Gly Phe Phe  
 500 505

ES 2 712 181 T3

<210> 48  
 <211> 1473  
 <212> ADN  
 <213> Pseudomonas putida

5

<400> 48  
 gcggtatattg ccagtgactc ttttggccag ctgaaagtgg agaaaattat gactgcccag 60  
 tggaaaccact acattaacgg ggaatacgtc tcacccgaat ctgaagagta tatccacgag 120  
 ttcaccccaa ccacggcttt gccgggtgac tcaatcgcaa ggggctcggc agctgacggt 180  
 gataaggctg ttcgtgccgc ggcagcggct cagcctgcct ggaatgcacg caagccaatt 240  
 gagcggggtc gtatccttct cgccatagct cgtttggttc gcgccaacgc agcggctttc 300  
 tgcgccaaag aagcgggaaga aactggcaag cctctgaaga tggccgcctt tgagatcgag 360  
 gcatgtgctc agtactttga gtattacggc ggtttggcga cagccatcca gggcgaaacc 420  
 atcaacctcg gccccagcta ccacgcctat accaccogag agccatttgg agtgggtggg 480  
 gtcacacctc cgtggaattc gccactgaac caagctgggc gagccattgc cccggcattg 540  
 gttagcggga acaccgtggg ggtcaaactc tcagagttca cctcgggtgac gatgctccag 600  
 ttcgcggaac tggttgtgaa agaggcaggg ttgccaccag gcgtattgaa cgtgggttacc 660  
 ggcaccggta aggaaaccgg tgagcctctg gttaaaccacc ctctgatccg aaaggttgct 720  
 ttcaccgggt ctgtccgtgc cggacgggag atcggcaagc tcgccgcaga tcgcatcatt 780  
 ccgctgtcgc tcgaattggg cggcaaatcc ccgaacattg tcttcgaaga cgcagatctg 840  
 gatcgagctg tcgcggttag cgtctttgcc ttcaccgtca aactggtca agtctgtctc 900  
 gccgggacct gttgcctggg gcatgagctg atttttgaaa aattctccaa gaagcttgcc 960  
 ggtgctgtag aggcgcttca gttcagcgac ggcgaaagct tcggtctcgg cccctaaccg 1020  
 accaaggctc agtttgagca ggttcacgtc tacaacgagc tggccatcca ggagggggct 1080  
 cattgcttgg tcggtgggga agctccaagt gacaaaaccg gctggtacgt acgaccacc 1140  
 gtctacacca acgtcaacaa ctcgatgcgg attgctcggg aagaaattht cggaccggt 1200  
 ctggtactga ttccgttcaa ggacgaaaac gaggcggtgg ccatcgcgaa tgactcggac 1260  
 tacgggctcg cggctggcgt atggaccacc gatctggctc gcgcgaccg cgtatccgct 1320  
 caaatcgaag cgggcccagg gtacgtcaac gaatatccat caggtggcgt tgagactcca 1380  
 ttcggcgggt tcaagcaaag cggccatggg cgcgagaagg gcattgaagc actccacat 1440  
 tacacccaaa caaagacgac catcatccgc att 1473

<210> 49  
 <211> 492  
 <212> PRT  
 <213> Pseudomonas putida

10

<400> 49

ES 2 712 181 T3

Met Ala Val Phe Ala Ser Asp Ser Phe Gly Gln Leu Lys Val Glu Lys  
 1 5 10 15

Ile Met Thr Ala Gln Trp Asn His Tyr Ile Asn Gly Glu Tyr Val Ser  
 20 25 30

Pro Glu Ser Glu Glu Tyr Ile His Glu Phe Ile Pro Thr Thr Ala Leu  
 35 40 45

Pro Gly Asp Ser Ile Ala Arg Gly Ser Ala Ala Asp Val Asp Lys Ala  
 50 55 60

Val Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gln Pro Ala Trp Asn Ala Arg Lys Pro  
 65 70 75 80

Ile Glu Arg Gly Arg Ile Leu Leu Ala Ile Ala Arg Leu Val Arg Ala  
 85 90 95

Asn Ala Ala Ala Phe Cys Ala Lys Glu Ala Glu Glu Thr Gly Lys Pro  
 100 105 110

Leu Lys Met Ala Ala Phe Glu Ile Glu Ala Cys Ala Gln Tyr Phe Glu  
 115 120 125

Tyr Tyr Gly Gly Leu Ala Thr Ala Ile Gln Gly Glu Thr Ile Asn Leu  
 130 135 140

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

Gly Val Ile Leu Pro Trp Asn Ser Pro Leu Asn Gln Ala Gly Arg Ala  
 165 170 175

Ile Ala Pro Ala Leu Val Ser Gly Asn Thr Val Val Val Lys Pro Ser  
 180 185 190

Glu Phe Thr Ser Val Thr Met Leu Gln Phe Ala Glu Leu Val Val Lys  
 195 200 205

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

Lys Glu Thr Gly Glu Pro Leu Val Lys His Pro Leu Ile Arg Lys Val



ES 2 712 181 T3

<210> 50  
 <211> 1487  
 <212> ADN  
 <213> Pseudomonas putida

5 <400> 50

```

atggtatatac tccttcgaat tctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca      60
cacattatac gagccgatga ttaattgtca acagctcatt tcagaatatt tgccagaacc      120
gttatgatgt cggcgcaaaa aacattatcc agaacgggag tgcgccttga gcgacacgaa      180
ttatgcagtg atttacgacc tgcacagcca taccacagct tccgatggct gcctgacgcc      240
agaagcattg gtgcaccgtg cagtcgataa gcccggatca gcttgcaatt cgcgcgcgaa      300
ggcgaagcgg catttacgtt gacaccatcg aatggtgcaa aacctttcgc ggtatggcat      360
gatagcgcgc ggaagagagt caattcaggg tggatgaatgt gaaaccagta acgttatacg      420
atgtcgcaga gtatgccggt gtctcttatac agaccgtttc ccgctggtg aaccaggcca      480
gccacgtttc tgcgaaaacg cgggaaaaag tggaaagcggc gatggcggag ctgaattaca      540
ttccaaccg cgtggcacia caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt ggcgttgcca      600
cctccagtct ggccctgcac gcgcctgcgc aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcgccg      660
atcaactggg tgccagcgtg gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta      720
aagcggcggg gcacaatctt ctgcgcgaac gcgtcagtgg gctgatcatt aactatccgc      780
tggatgacca ggatgccatt gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg gcgttatttc      840
ttgatgtctc tgaccagaca cccatcaaca gtattatattt ctcccatgaa gacggtacgc      900
gactgggcgt ggagcatctg gtgcgattgg gtcaccagca aatcgcgctg ttagcggggc      960
cattaagtctc tgtctcggcg cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatat ctcaactcga      1020
atcaaatca gccgatagcg gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac      1080
aaaccatgca aatgctgaat gagggcatcg ttcccactgc gatgctggtt gccaacgatc      1140
agatggcgtc gggcgcaatg cgcgccatta ccgagtcagg gctgcgcgtt ggtgcggata      1200
tctcggtagt gggatacgac gataccgaag acagctcatg ttatatcccg ccgttaacca      1260
ccatcaaaca ggattttcgc ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg ctgcaactct      1320
ctcagggcca ggcggtgaag ggcaatcagc tgttgcccgt ctcaactggtg aaaagaaaaa      1380
ccaccctggc gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc      1440
agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg acaattc      1487
    
```

<210> 51  
 <211> 2934  
 <212> ADN  
 <213> Pseudomonas putida

10 <400> 51

ES 2 712 181 T3

gcaacggcgt ggcggccgcg tcgatggccg ccacctgccg gtcgaggtcg ggcagcaggt 60  
agccgaggaa gaaccaacg ctttcctgct tttcccggcg ctgcgccgcc cccactggca 120  
acgcctggat gcagcgcgcg ctgcgggccc aggcgaaggc ctgcagcacc gttgcgcaca 180  
actgcaggaa gtcgcctgcg gcgcggtacg gaaattcggg atcgcccgcg gtcacgcaca 240  
gcaccttggc cagcgcctgcc tccagcgtgt cgcacgcact gcccaacgcg gcggcggcgg 300  
cgccagcgtc cgcagcggcc tcggtacgca actcactcaa cagcagggcg aacacctccc 360  
ccccatcgcc caataccttg cgcagcatca ggtcgttggc ctgtatttcg ttggtgcctt 420  
cgtagatcat cgcgatgcbg ctgtcgcgca aggtctgctc gatggcaaac tcctgggtgt 480  
agccatagcc acccaacacc tgcaaggcct tgcttgccag gctgaacccc tgctcgggtga 540  
aggccgcctt gacgatgggg gtcaacagcg ccgccaatgt cgcagccttc gcccgttgtg 600  
caggctcgac ggcggcgtcg gcgatatcca gccactgggc cgtccagtag gccagcgcgc 660  
gcatcccctc ggtacgcacc cgcaactcca gcaagaccgg acgcatggcc ggggtgcaggt 720  
ggatcgggtc ggcgccttgg gcgccccctc tggcccggcc cggggcactc atctggcggc 780  
gctccagggc atagtcbgcb gcctgttgcc aggcggcctc agcatgcccc agcccttgca 840  
ggccaacatg cagacgcgcb gaattcatca tcacgaacat cgcgcccagg ccgccatggg 900  
gctggcctat caaccagccc cgggccccct ccaggcgtag tgcacaggtg gcgctgcccc 960  
ggatgcccag cttatgttcc aggcgctcgc agtacagtgt attgcgctgg ccacacctca 1020  
gccatttcgg caccagcaac agcgagagcc cgcggttgcc gggcggcgca tccggcaacc 1080  
gggccaacac caggtggagt atgtcgcggg tcaggtcgtg ttcgccgcca gagatgaaca 1140  
gcttgttgcc actgaccgcb tagccaccgt cgccaccgtc gcccaggggc acggcgcggc 1200  
agcgcacacg gctgagatcb ctgccggcct ggggttcggg caggcacatg gtaggcaggg 1260  
tggcaccact gacgatgccc ggcagatagc gcgcctgcag ctcggcggat gcatgggctt 1320  
tcaggcacag gtaggcaccg tgggcgatgc cgggtgtacat ggcccagccg tggttgctgc 1380  
cgaacagcat ctcttgcaag gccgcctcca gactaacgcb cagcccttgg ccgccaagcb 1440  
ccggggcgca tgccagcgcg gccagccac cgtcgacata ggcgcgataa gccgcccggg 1500  
atccgtccgg ggtgcgtacc tccccgcctc ccatctggca gccctggcga tcgcccgaac 1560  
tgttcaaagg ggcagcacc tgctcgcaga aacggggcgc ctcttccagt acctgggccc 1620  
ccaggtcagag gtcgacgcbg gcatatgcbg gtaattgcgc ccaggcctga tcggcccgca 1680  
gccagtgttg caggacgaac tgcatgtcgc gcagggggcg cttccaggtc atcggatacc 1740  
tccgggtcag gcaacgaaat gagggtttcc gatcagcagc gccatgcctt ggccaccgcb 1800

ES 2 712 181 T3

gatgcatgcc gctgcatgc catagcgcaa gttgccgtcg cgcaattgac gggccaaggt 1860  
 gtggaccagg cgcagacctg tagcggccaa tgggtgacca agggcgatag cgccgccatg 1920  
 gacattgagc ttgtccacat cgagttcgag cgcctggggc accgccagca cttgggcggc 1980  
 ctgggcctcg ttgatttcca ggcggtcgat ctgctccagg cgcaggccgc tgcgctcgag 2040  
 cagcaaggta atggccggcg ccggcccgat gcccatgagg ccggggcgca cgccaacagc 2100  
 cgtggccatc agcaagcgcg ccaaaggcgg atgagtgcaa tcggagtagc gcgtgaccaa 2160  
 ggctgccgcc gcgccatcga ccaccgcgca actggtgcca gccgtctgca cgccaccggc 2220  
 gtgcaccggg cgcagtcggg ccagtgcggc cgcgtcggta ggccgtgggt ggctgtcctg 2280  
 gctgacctca ctcacgccac gcggcaatgc aatgccgcgt ggctggcagc cttctacctc 2340  
 cagtgcctgc gcggtgacgc tgacgatttc ctcgtcgaac cagccctgca cctgggcttg 2400  
 cagggcccgc tgatggctgc gcagggccca cgcgtccacc gtttcacgcg ccaggccata 2460  
 ggcacgggcc aggttttccg cagtaccgat catgtccacg ccggcagccg ggtcgtacag 2520  
 ggcttcccag agaaagtcc tgaacccgac cggcgcccc aggcgaaaac cgccccggtg 2580  
 ttcataggcc gcgatcggat tgcgcgacat cgactccgcg cccacgcaca gcacctggcg 2640  
 ggcgccactg cgcagctggt caccggcctg acgcaacagt tcaaggcccg tgccacagat 2700  
 gcgctgcacc gccagtgccg gtaccgcctg cggcacgcca cagtagaggc cgacatggcg 2760  
 tggcagcatg taggcgtoga agctggcctg agccatgctg ccggcgagca cactgtctac 2820  
 cgcctgaggg gcggcagctg cacgtgccag caccgcgcgg ccggcctgaa tgcccaggtc 2880  
 gatgggcgag atcgcggcca atgcccacc caggtcgacc cagggcgtgc gcac 2934

<210> 52

<211> 396

<212> PRT

5 <213> Pseudomonas putida

<400> 52

Met Val Arg Thr Pro Trp Val Asp Leu Gly Gly Ala Leu Ala Ala Ile  
 1 5 10 15

Ser Pro Ile Asp Leu Gly Ile Gln Ala Gly Arg Ala Val Leu Ala Arg  
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Pro Gln Ala Val Asp Ser Val Leu Ala Gly Ser Met  
 35 40 45

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



ES 2 712 181 T3

Tyr Cys Gly Val Pro Gln Ala Val Pro Ala Leu Ala Val Gln Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Cys Gly Thr Gly Leu Glu Leu Leu Arg Gln Ala Gly Glu Gln Leu Arg  
 85 90 95  
 Ser Gly Ala Arg Gln Val Leu Cys Val Gly Ala Glu Ser Met Ser Arg  
 100 105 110  
 Asn Pro Ile Ala Ala Tyr Glu His Arg Gly Gly Phe Arg Leu Gly Ala  
 115 120 125  
 Pro Val Gly Phe Lys Asp Phe Leu Trp Glu Ala Leu Tyr Asp Pro Ala  
 130 135 140  
 Ala Gly Val Asp Met Ile Gly Thr Ala Glu Asn Leu Ala Arg Ala Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Ala Arg Glu Thr Val Asp Ala Trp Ala Leu Arg Ser His Gln  
 165 170 175  
 Arg Ala Leu Gln Ala Gln Val Gln Gly Trp Phe Asp Glu Glu Ile Val  
 180 185 190  
 Ser Val Thr Ala Gln Ala Leu Glu Val Glu Gly Cys Gln Pro Arg Gly  
 195 200 205  
 Ile Ala Leu Pro Arg Gly Val Ser Glu Val Ser Gln Asp Ser His Pro  
 210 215 220  
 Arg Pro Thr Asp Ala Ala Ala Leu Ala Arg Leu Arg Pro Val His Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Val Gln Thr Ala Gly Asn Ser Cys Ala Val Val Asp Gly Ala  
 245 250 255  
 Ala Ala Ala Leu Val Thr Arg Tyr Ser Asp Cys Thr His Pro Pro Leu  
 260 265 270  
 Ala Arg Leu Leu Met Ala Thr Ala Val Gly Val Pro Pro Gly Leu Met  
 275 280 285  
 Gly Ile Gly Pro Ala Pro Ala Ile Thr Leu Leu Leu Glu Arg Ser Gly  
 290 295 300  
 Leu Arg Leu Glu Gln Ile Asp Arg Leu Glu Ile Asn Glu Ala Gln Ala  
 305 310 315 320

ES 2 712 181 T3

Ala Gln Val Leu Ala Val Ala Gln Ala Leu Glu Leu Asp Val Asp Lys  
 325 330 335

Leu Asn Val His Gly Gly Ala Ile Ala Leu Gly His Pro Leu Ala Ala  
 340 345 350

Thr Gly Leu Arg Leu Val His Thr Leu Ala Arg Gln Leu Arg Asp Gly  
 355 360 365

Asn Leu Arg Tyr Gly Ile Ala Ala Ala Cys Ile Gly Gly Gly Gln Gly  
 370 375 380

Met Ala Leu Leu Ile Glu Asn Pro His Phe Val Ala  
 385 390 395

<210> 53  
 <211> 584  
 <212> PRT  
 <213> Pseudomonas putida

5

<400> 53

Met Thr Trp Lys Ala Pro Leu Arg Asp Met Gln Phe Val Leu Gln His  
 1 5 10 15

Trp Leu Arg Ala Asp Gln Ala Trp Ala Gln Leu Pro Ala Tyr Ala Asp  
 20 25 30

Val Asp Leu Asp Leu Ala Ala Gln Val Leu Glu Glu Ala Ala Arg Phe  
 35 40 45

Cys Glu Gln Val Leu Ala Pro Leu Asn Ser Ser Gly Asp Arg Gln Gly  
 50 55 60

Cys Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Arg Thr Pro Asp Gly Phe Pro Ala  
 65 70 75 80

Ala Tyr Arg Ala Tyr Val Asp Gly Gly Trp Pro Ser Leu Ala Cys Ala  
 85 90 95

Pro Ala Leu Gly Gly Gln Gly Leu Pro Leu Val Leu Glu Ala Ala Leu  
 100 105 110

Gln Glu Met Leu Phe Gly Ser Asn His Gly Trp Ala Met Tyr Thr Gly  
 115 120 125

Ile Ala His Gly Ala Tyr Leu Cys Leu Lys Ala His Ala Ser Ala Glu  
 130 135 140

ES 2 712 181 T3

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

ES 2 712 181 T3

Gln Gly Phe Ser Leu Ala Ser Lys Ala Leu Gln Val Leu Gly Gly Tyr  
 405 410 415

Gly Tyr Thr Gln Glu Phe Ala Ile Glu Gln Thr Leu Arg Asp Ser Arg  
 420 425 430

Ile Ala Met Ile Tyr Glu Gly Thr Asn Glu Ile Gln Ala Asn Asp Leu  
 435 440 445

Met Leu Arg Lys Val Leu Gly Asp Gly Gly Glu Gly Phe Ala Leu Leu  
 450 455 460

Leu Ser Glu Leu Arg Thr Glu Ala Ala Ala Asp Ala Gly Ala Ala Ala  
 465 470 475 480

Ala Ala Leu Gly Ser Ala Cys Asp Thr Leu Glu Ala Ala Leu Ala Lys  
 485 490 495

Val Leu Ser Met Thr Ala Gly Asp Pro Glu Phe Pro Tyr Arg Ala Ala  
 500 505 510

Gly Asp Phe Leu Gln Leu Cys Ala Thr Val Leu Gln Ala Phe Ala Trp  
 515 520 525

Ala Arg Ser Ala Arg Cys Ile Gln Ala Leu Pro Val Gly Ala Ala Gln  
 530 535 540

Arg Arg Glu Lys Gln Glu Ser Val Gly Phe Phe Leu Gly Tyr Leu Leu  
 545 550 555 560

Pro Asp Leu Asp Arg Gln Val Ala Ala Ile Asp Ala Ala Ala Thr Pro  
 565 570 575

Leu Pro Phe Ile Ala Glu Ser Phe  
 580

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento biocatalítico para producir vainillina a partir de ácido ferúlico, en el que se cultiva, en presencia de ácido ferúlico, una cepa bacteriana modificada por ingeniería genética del género *Pseudomonas* que tiene la capacidad de convertir el ácido ferúlico en vainillina;
- 5 en el que dicha cepa bacteriana modificada por ingeniería genética tiene una capacidad reducida para crecer en vainillina como única fuente de carbono; y en el que dicha cepa modificada por ingeniería genética contiene al menos la siguiente modificación genética:
- 10 i) regulación por disminución de la captación celular de molibdato; y  
ii) regulación por disminución de la actividad enzimática codificada por el gen de la vainillina deshidrogenasa (*vdh*).
2. El procedimiento de una de la reivindicación 1, en el que la captación celular de molibdato se regula por disminución regulando por disminución el gen que codifica una proteína de unión a molibdato periplasmática (*modA*)
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la captación celular de molibdato se regula por disminución mediante la delección de una secuencia de nucleótidos que comprende el operón *modABC*.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos una de las actividades enzimáticas codificadas por los genes para  
iii) feruloil-CoA sintetasa (*fcs*) y  
iv) enoil-CoA hidratasa (*ech*)
- 20 está regulado por aumento.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la expresión cromosómica de los genes para la feruloil-CoA sintetasa (*fcs*) y la enoil-CoA hidratasa (*ech*) está regulada por aumento.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la expresión de los genes para la feruloil-CoA sintetasa (*fcs*) y la enoil-CoA hidratasa (*ech*) está bajo el control de un elemento regulador que comprende un promotor fuerte.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que adicionalmente al menos una de las siguientes actividades enzimáticas codificadas por los genes  
v) aldehído deshidrogenasa PP\_2680 y/o PP\_0545  
vi) benzaldehído deshidrogenasa PP\_1948 está regulada por disminución.
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que adicionalmente al menos una de las siguientes actividades enzimáticas codificadas por los genes:  
vii) beta-cetotiolasa PP\_3355 (*aat*)  
viii) acil-CoA deshidrogenasa PP\_3354.
- está regulado por disminución.
- 35 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa microbiana que se va a modificar por ingeniería genética es una cepa de *Pseudomonas putida*.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha cepa de *Pseudomonas putida* está modificada por ingeniería genética regulando por disminución una actividad proteica codificada por el gen para la proteína de adhesión superficial (*lapA*).
- 40 11. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes, en el que la reacción se realiza en células completas de dichas cepas bacterianas o en un homogeneizado de células de las mismas o en una fracción obtenida de dicho homogeneizado.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha cepa bacteriana se aplica en forma libre o inmovilizada.
- 45 13. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes se realiza de forma continua o discontinua.
14. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes, en el que la vainillina así formada se aísla del medio de cultivo.
- 50 15. Una cepa de *Pseudomonas* modificada por ingeniería genética que contiene una modificación genética como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y en la que dicha regulación por disminución se logra mediante la delección de un gen o la alteración de un gen.

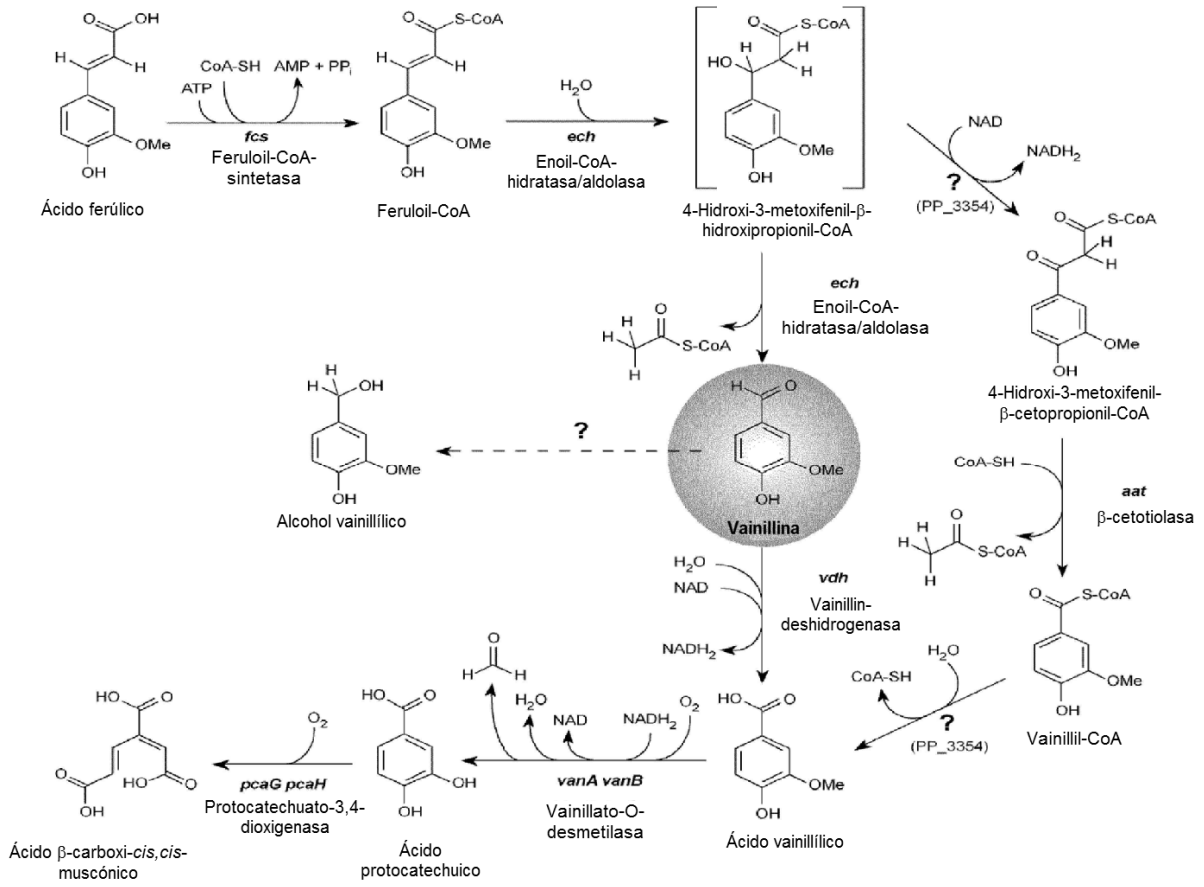
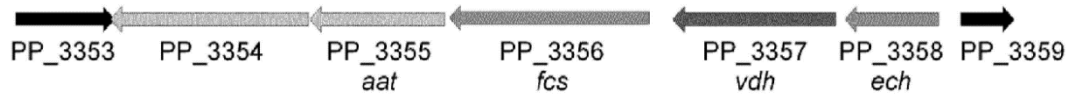
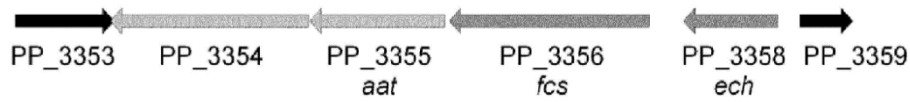


Fig. 1

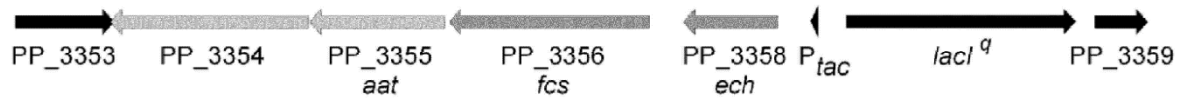
***P. putida* KT2440 / GN23**



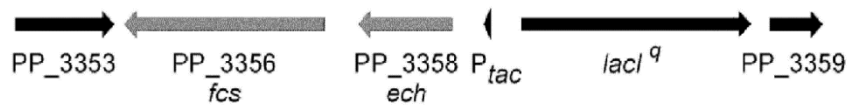
***P. putida* GN235 / GN276**



***P. putida* GN299**

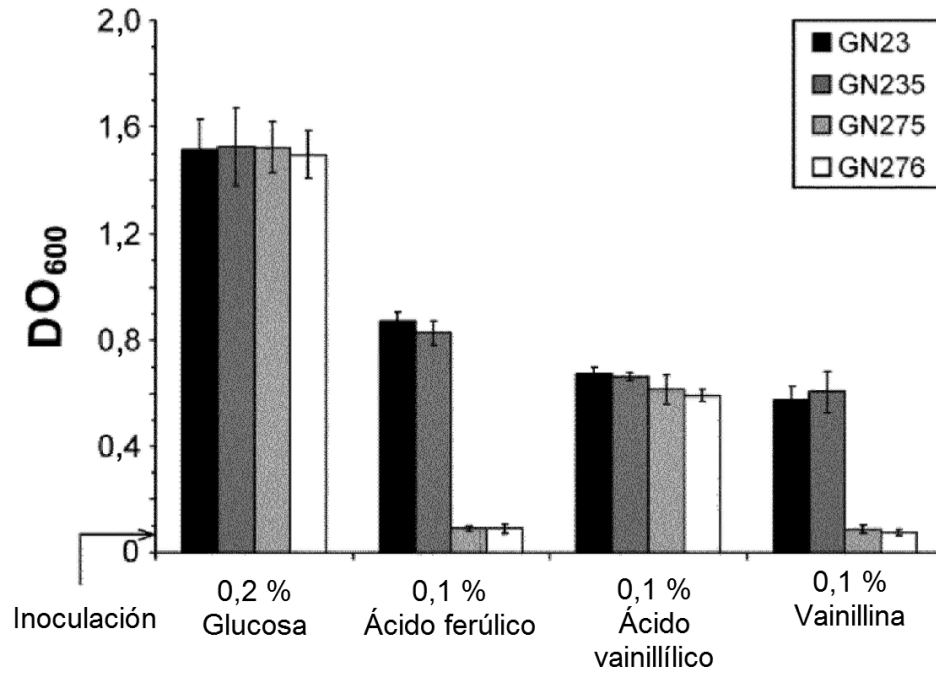


***P. putida* GN347 / GN440 / GN441 / GN442**



1,5 kb

**Fig. 2**



**Fig. 3**



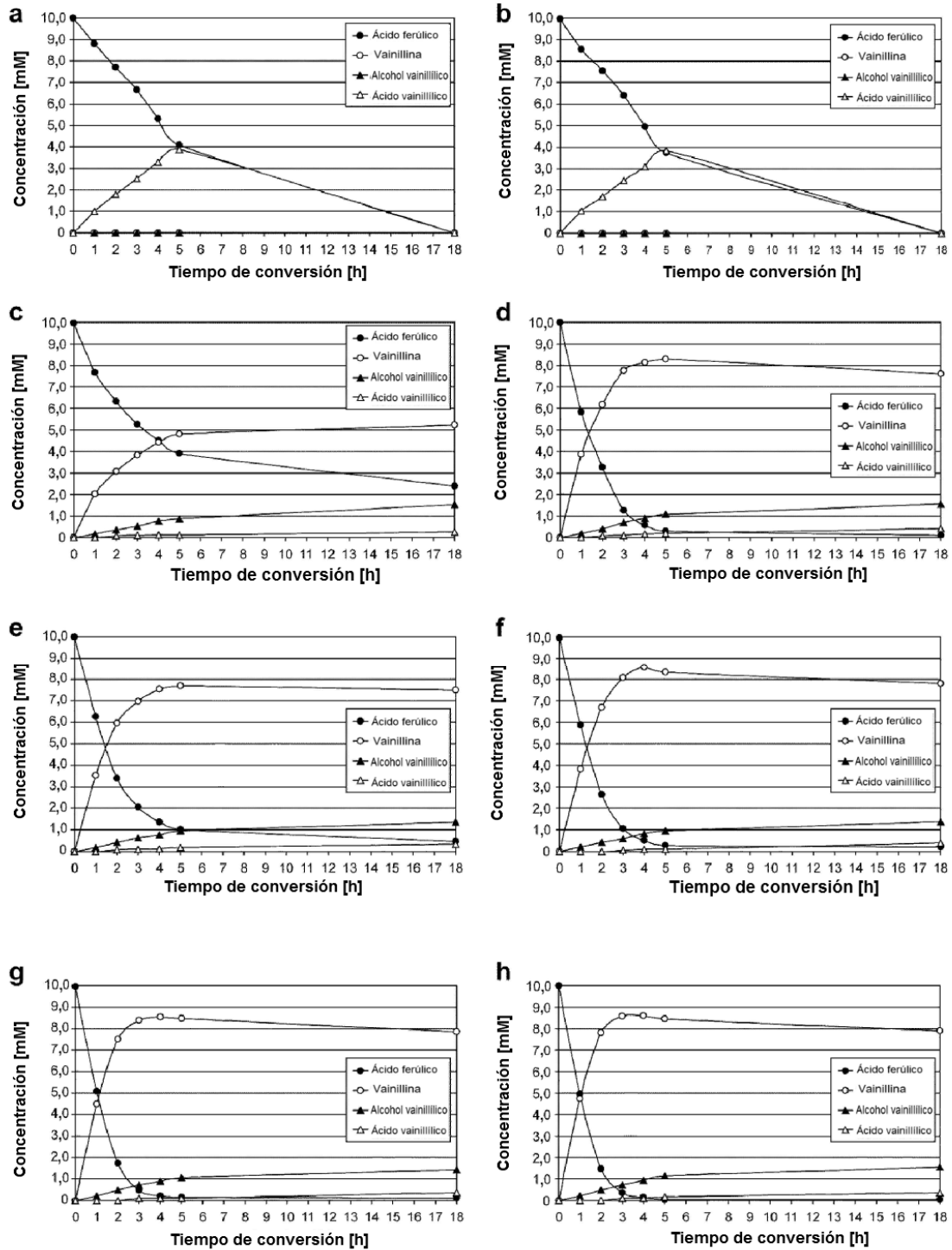


Fig. 4

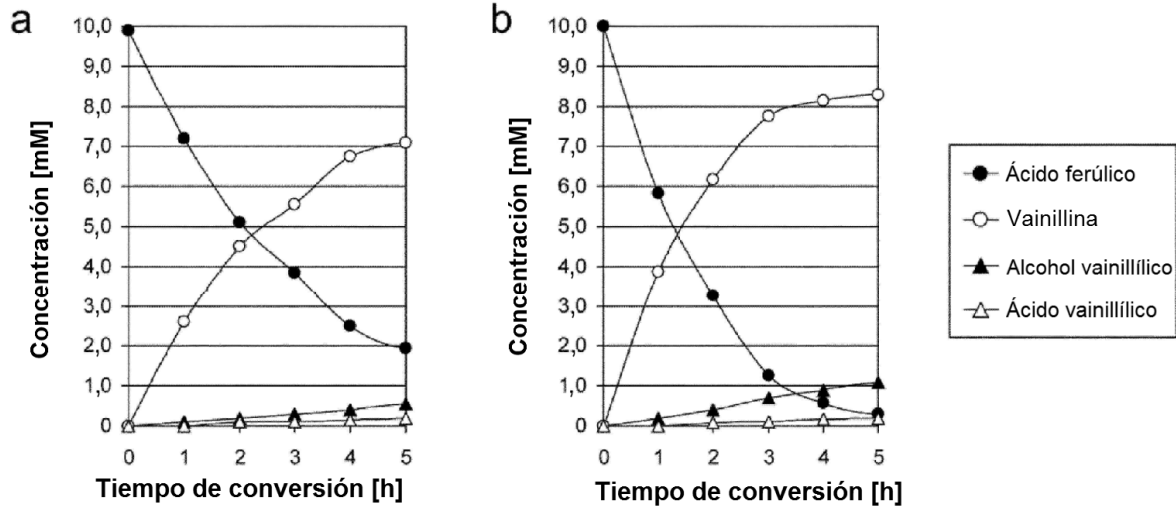


Fig. 5

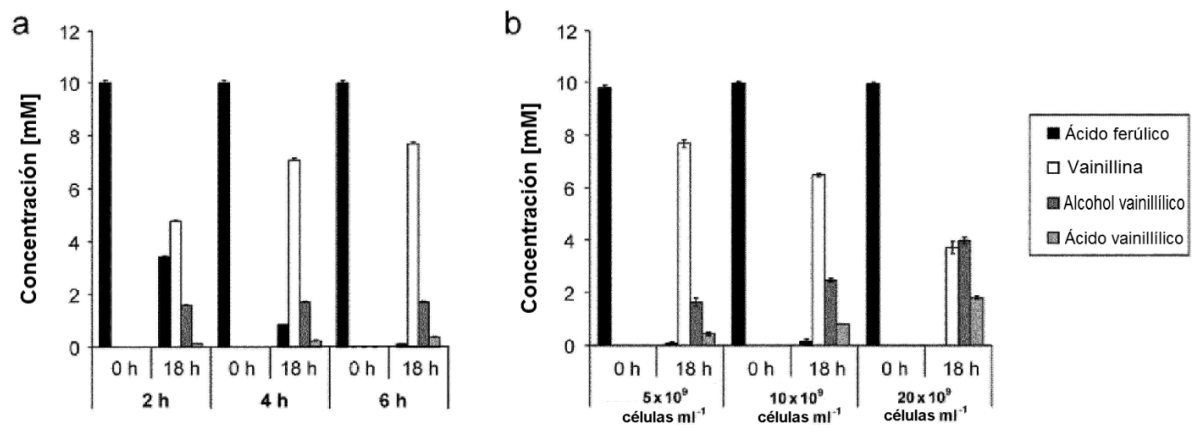


Fig. 6

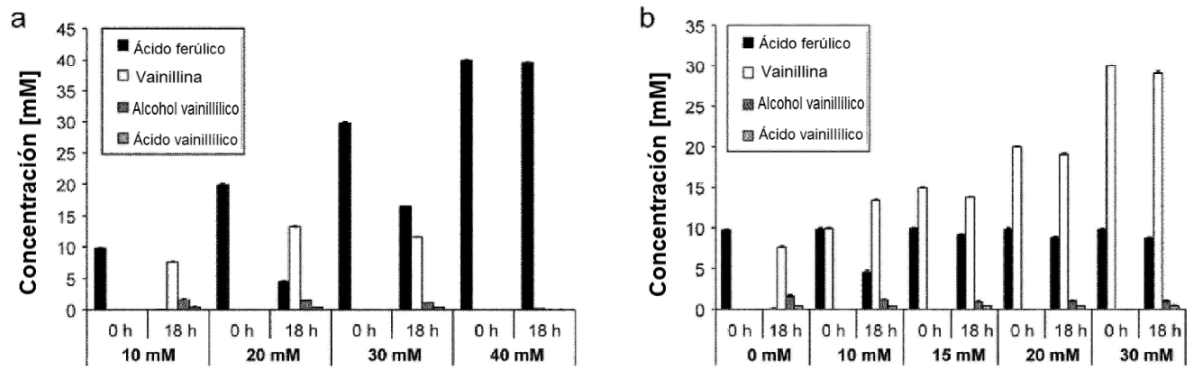


Fig. 7

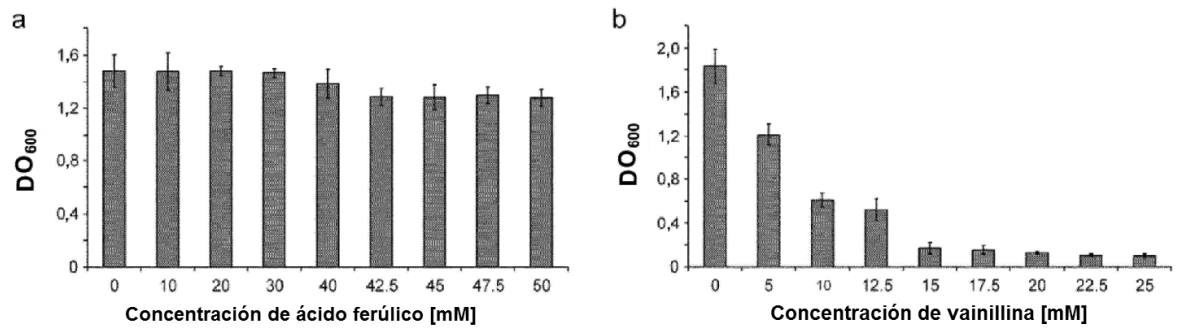


Fig. 8