



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 27 672 T2 2005.01.13**

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 904 396 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 27 672.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/GB97/00809

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 908 412.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/35999

(86) PCT-Anmeldetag: 24.03.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 02.10.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 31.03.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 18.02.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 13.01.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12P 7/24**

C12N 9/00, C12N 15/60, C12N 9/02,

C12N 9/88

(30) Unionspriorität:

9606187 23.03.1996 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Plant Bioscience Ltd., Norwich, Norfolk, GB

(72) Erfinder:

NARBAD, Arjan, Norwich, GB; RHODES, John,  
Michael, Norwich, GB; GASSON, John, Michael,  
Bintree, GB; WALTON, John, Nicholas, Norwich,  
GB

(74) Vertreter:

Henkel, Feiler & Hänzel, 81675 München

(54) Bezeichnung: PRODUKTION VON VANILLIN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft hauptsächlich die Herstellung von Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd), insbesondere die von einer Extraktion aus der Vanilleschote verschiedene Herstellung von Vanillin.

**[0002]** Vanillin ist ein wichtiges Aromatisierungsmittel für Nahrungsmittel und Getränke und die Hauptaroma-komponente von natürlicher Vanille aus der Vanilleschote. Die Verwendung von natürlicher Vanille ist durch deren hohen Preis beschränkt. Synthetisches Vanillin, das meist aus Sulfitlaugen, die während der Bearbeitung von Holzschliff zur Papierherstellung produziert werden, stammt, wird häufig als kostengünstiger Vanilleersatzstoff verwendet. Alternative biologische Verfahren zur Herstellung von natürlichem Vanillin und verwandten Aromen können beträchtlichen großtechnischen Wert und Nutzen besitzen, insbesondere wenn derartige Verfahren die Produktion von Vanillin und/oder verwandten Aromen direkt in einem fermentierten Nahrungsmittel oder Getränk ermöglichen.

**[0003]** Der Mechanismus der Vanillin-Biosynthese in Vanilla bleibt im Wesentlichen uncharakterisiert. M. H. Zenk (Anal. Z. Pflanzenphysiol. 53, 404-414 (1965)) zeigte, dass Vanillin von trans-Ferulat (4-Hydroxy-3-methoxy-trans-cinnamat) abgeleitet wurde, und er schlug einen zur klassischen  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren analogen Mechanismus mit einer Spaltung eines  $\beta$ -Keto-thioesters unter Bildung von Acetyl-SCoA und Vanilloyl-SCoA (4-Hydroxy-3-methoxybenzoyl-SCoA) und einer anschließenden Reduktion und CoASH-Freisetzung unter Bildung von Vanillin vor. C. Funk und P. E. Brodelius (Plant Physiol. 94, 95-101; 102-108 (1990); 99, 256-262 (1992)) schlugen einen unterschiedlichen Weg vor, bei dem die 4-Hydroxygruppe von trans-Ferulat auf dem Wege der Vanillin-Biosynthese aufeinander folgend methyliert und demethyliert wurde; jedoch wurde die detaillierte Enzymologie nicht geklärt. In Kartoffelknollen und im Pilz Polyporus hispidus (C. J. French, C. P. Vance und G. H. N. Towers, Phytochemistry 15, 564-566 (1976)), in Zellkulturen von Lithospermum erythrorhizon (K. Yazaki, L. Heide und M. Tabata), Phytochemistry 30, 2233-2236 (1991)) und in Zellkulturen von Karotten (J.-P. Schnitzler, J. Madlung, A. Rose und H. U. Seitz, Planta 188, 594-600 (1992)) wurden aus in-vitro-Untersuchungen Beweisanzeichen erhalten, dass das entsprechende Analogon von Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd, ein Zwischenprodukt bei der Bildung von 4-Hydroxybenzoat aus 4-Cumarat (4-Hydroxy-trans-cinnamat) war. ATP oder CoASH waren nicht erforderlich, wodurch offensichtlich ein  $\beta$ -Oxidationsmechanismus ausgeschlossen wurde. Weitere Untersuchungen mit zellfreien Extrakten von Lithospermum erythrorhizon stellten jedoch im Gegensatz dazu vor kurzem das Vorhandensein eines  $\beta$ -Oxidationswegs zur Umwandlung von 4-Cumarat in 4-Hydroxybenzoat fest (R. Löscher und L. Heide, Plant Physiol. 106, 271-279 (1994)); in diesem Fall war die Umwandlung von ATP, Mg<sup>2+</sup>-Ionen und NAD<sup>+</sup> abhängig und sie erfolgte über 4-Hydroxybenzoyl-SCoA ohne die intermediäre Bildung von 4-Hydroxybenzaldehyd.

**[0004]** In dem grammnegativen Bakterium Pseudomonas acidovorans wurde gezeigt, dass trans-Ferulat offensichtlich über Vanillin zu Vanillat und Acetat katabolisiert wurde (A. Toms und J. M. Wood, Biochemistry 9, 337-343 (1970)). Obwohl in zellfreien Extrakten NAD<sup>+</sup> für die Oxidation von Vanillin zu Vanillat und für die weitere Oxidation von Vanillat zu Protocatechuat und Formiat notwendig war, wurde keine Angabe über die Notwendigkeit eines anderen Cofaktors genannt. Weitere Untersuchungen der Verwendung von Ferulat in Pseudomonas-Arten wurden berichtet (V. Andreoni und G. Bestetti, FEMS Microbiology Ecology 53, 129-132 (1988); T. Omori, K. Hatakeyama und T. Kodama, Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 497-500 (1988); Z. Huang, L. Dostal und J. P. N. Rosazza, Appl. Env. Microbiol. 59, 2244-2250 (1993); diese versuchten jedoch nicht, den Mechanismus der 2-Kohlenstoff-Abspaltung von Ferulat zu klären. Zenk et al. (1980), Anal. Biochem. 101, 182-187 beschreiben ein Verfahren zur enzymatischen Synthese und Isolierung von Cinnamoyl-CoA-thioestern unter Verwendung eines Bakteriensystems. Im Gegensatz dazu wurden die Enzymologie und Genetik der Verwendung von einfachen Benzolderivaten, die Benzoesäuren und Phenole umfassen, durch Pseudomonas intensiv untersucht (T. K. Kirk, T. Higuchi und H.-M. Chang (Hrsg.), "Lignin Biodegradation", CRC Press, Boca Raton, Fla, USA (1980); D. T. Gibson (Hrsg.), "Microbial degradation of organic compounds", Marcel Dekker, New York (1984); J. L. Ramos, A. Wasserfallen, K. Rose und K. N. Timmis, Science 235, 593-596 (1987); C. S. Harwood, N. N. Nichols, M. K. Kim, J. L. Ditty und R. E. Parales, J. Bacteriol. 176, 6479-6488 (1994); S. Romerosteiner, R. E. Parales, C. S. Harwood und J. E. Houghton, J. Bacteriol. 176, 5771-5779 (1994); J. Inoue, J. P. Shaw, M. Rekik und S. Harayama, J. Bacteriol. 177, 1196-1201 (1995)).

**[0005]** Eine Übersicht über mögliche mikrobielle Wege zu aromatischen Aldehyden, die die Wege (i) ausgehend von trans-Zimtsäuren, (ii) ausgehend von Benzoesäuren durch Reduktion und (iii) durch Umwandlung von aromatischen Aminosäuren in Phenylpyruvinsäuren und die anschließende Behandlung mit einer Base umfassen, wurde von J. Casey und R. Dobb (Enzyme Microb. Technol. 14, 739-747 (1992)) angegeben.

**[0006]** Die US-5 128 253 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Vanillin aus Ferulasäure durch verschiedene Mikroorganismen und Extrakte derselben oder von diesen stammende Enzyme in Gegenwart einer Sulfhydrylverbindung, offenbart jedoch keines der an der Umwandlung von Ferulasäure in Vanillin beteiligten Enzyme. Die US-5 279 950 ist eine Continuation-in-part-Application der US-5 128 253, die zusätzlich beschreibt, das Vanilla-Kalli bei den Verfahren verwendet werden können.

**[0007]** Die WO 94/13614 beschreibt die Herstellung von Vanillin aus Ferulasäure durch die Wirkung von Vanilla-Wurzelmaterial und verwendet ein Adsorptionsmittel, wie Aktivkohle, zur Extraktion von Vanillin, offenbart jedoch nicht die beteiligten speziellen Enzyme.

**[0008]** Die EP 0 453 368 beschreibt, dass eine Kultur von Pycnoporus trans-Ferulasäure in Vanillin umwandeln kann, offenbart jedoch nicht die beteiligten speziellen Enzyme.

**[0009]** Die WO 94/02621 beschreibt die Herstellung von Vanillin aus trans-Ferulasäure durch die Wirkung eines Lipoxygenaseenzyms. Die EP 0 405 197 beschreibt die Herstellung von Vanillin aus Eugenol/Isoeugenol durch Bakterien aus den Gattungen Serratia, Klebsiella und Enterobacter durch Oxidation.

**[0010]** Vanillin kann auch aus Phenolstilbenen hergestellt werden, was bei Hagedorn & Kaphammer (1994) Ann. Rev. Microbiol. 48, 773-800 angegeben ist. Huang et al. (1993), J. Biol. Chem. 268, 23954-23958 betreffen die Umwandlung von Ferulasäure in Vanillinsäure und Guaiacol durch Rhodotornia rubra.

**[0011]** Vanillinsäure ist ebenfalls eine verwendbare Verbindung, da sie zu Oligomeren polymerisiert werden kann oder als Monomer bei der Synthese von Polyester verwendet werden kann; in ähnlicher Weise ist p-Hydroxybenzoësäure ebenfalls zur Polymersynthese verwendbar.

**[0012]** Ein erster Aspekt der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von Vanillin, das die folgenden Stufen umfasst:

- (1) Bereitstellen von trans-Ferulasäure oder einem Salz derselben; und
- (2) Bereitstellen von trans-Ferulat:CoASH-Ligaseaktivität (Enzymaktivität I), trans-Feruloyl-SCoA-Hydrataseaktivität (Enzymaktivität II) und 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl- $\beta$ -hydroxy-propionyl-SCoA(HM-PHP-SCoA)-Spaltungsaktivität (Enzymaktivität III).

**[0013]** Die Vorteile der vorliegenden Erfindung gegenüber einer chemischen Synthese oder Extraktion aus der Vanilla-Schote bzw. Vanilleschote umfassen (i) einen wirtschaftlichen Vorteil gegenüber der Extraktion aus Vanilleschote und Freiheit von einer geographischen Abhängigkeit der Wuchsflächen von Vanilla; (ii) die Fähigkeit zur Herstellung von Vanillin durch ein natürliches Verfahren, das biologische Katalysatoren umfasst; (iii) die Vorteile der Erzeugung eines natürlichen Aromas *in situ* in einem fermentierten Nahrungsmittel oder Getränk, wenn die Gene in passenden Wirten von Lebensmittelqualität, beispielsweise Milchsäurebakterien oder Hefen, exprimiert werden; und (iv) die Möglichkeit zur Erweiterung des Bereichs von Pflanzen, in denen Vanillin und verwandte Substanzen produziert werden können, und aus denen sie extrahiert werden können. Diese und andere Beispiele für die Verfahren gemäß der Erfindung sind im Folgenden detaillierter beschrieben.

**[0014]** Wir bestimmten den Mechanismus der Kettenverkürzung von trans-Ferulat (trans-Ferulasäure) durch einen Stamm von *Pseudomonas fluorescens* (mit der Bezeichnung *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, den wir an einigen Stellen zu AN103 abgekürzt haben), der aus Erde isoliert wurde. Unsere Daten zeigen klar, dass Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd) ein Zwischenprodukt ist und dass der Mechanismus keine  $\beta$ -Oxidation umfasst. Der Vanillin-Pfad von *Ps. fluorescens* biovar V., Stamm AN103, ist in **Fig. 1** beschrieben. trans-Ferulasäure (oder ein Salz derselben) und trans-Feruloyl-SCoA werden in Gegenwart von CoASH ineinander umgewandelt; trans-Feruloyl-SCoA und 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl- $\beta$ -hydroxypropionyl-SCoA (HM-PHP-SCoA) werden ineinander umgewandelt; und HMPHP-SCoA und Vanillin werden ineinander umgewandelt.

**[0015]** Der Einfachheit wegen wird die trans-Ferulat:CoASH-Ligaseaktivität als Enzymaktivität I bezeichnet, die trans-Feruloyl-SCoA-Hydrataseaktivität als Enzymaktivität II bezeichnet und die HMPHP-SCoA-Spaltungsaktivität als Enzymaktivität III bezeichnet. Die durch diese Enzymaktivitäten durchgeführten Umwandlungen sind in **Fig. 1** angegeben.

**[0016]** Das durch die Erfindung bereitgestellte Verfahren zur Herstellung von Vanillin umfasst daher die Stufen des Einwirkens von Enzymaktivität I auf trans-Ferulasäure oder ein Salz derselben und der Bildung eines

Produkts, des Einwirkens von Enzymaktivität II auf das Produkt der Enzymaktivität I unter Bildung eines Produkts, und des Einwirkens von Enzymaktivität II auf das Produkt der Enzymaktivität II unter Bildung eines Produkts.

**[0017]** trans-Ferulasäure oder ein Salz derselben kann direkt, beispielsweise durch Zuführen zuvor hergestellter trans-Ferulasäure oder von einem Salz derselben bereitgestellt werden, oder es kann indirekt durch Zuführen eines Vorläufers von trans-Ferulasäure oder eines Vorläufers von einem Salz von trans-Ferulasäure und Mitteln zur Umwandlung des Vorläufers in trans-Ferulasäure oder ein Salz derselben bereitgestellt werden. Wie im Folgenden angegeben detaillierter beschrieben ist, ist es günstig, wenn der Vorläufer ein Ester von trans-Ferulasäure ist und das Mittel zur Umwandlung des Esters eine geeignete Esterase ist.

**[0018]** Durch "Bereitstellen von trans-Ferulat:CoASH-Ligaseaktivität (Enzymaktivität I), trans-Feruloyl-SCoA-Hydrolaseaktivität (Enzymaktivität II) und 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxypropionyl-SCoA(HMPHP-SCoA)-Spaltungsaktivität (Enzymaktivität III)" umfassen wir die Bereitstellung der Enzymaktivitäten in jeder zum Bewirken der Produktion von Vanillin geeigneten Form. Beispielsweise umfasst das Verfahren der Erfindung, was im Folgenden detaillierter diskutiert wird, ohne hierauf beschränkt zu sein, speziell die Bereitstellung der Enzymaktivitäten (a) durch einen intakten oder permeabilisierten *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 oder eine Mutante desselben, (b) mindestens eine der Enzymaktivitäten II oder III, die in einer vom Zellmaterial im Wesentlichen freien Form ist, (c) durch intakte oder permeabilisierte Zellen in einer Kultur, insbesondere Mikroorganismen, die genetisch so modifiziert wurden, dass sie Gene enthalten, die die Enzymaktivitäten II oder III codieren (beispielsweise Mikroorganismen von Lebensmittelqualität, wie Milchsäurebakterien und Brauereihefe), und (d) durch Pflanzen, die genetisch so modifiziert wurden, dass sie Gene enthalten, die diese Enzymaktivitäten codieren.

**[0019]** Vorzugsweise sind Mittel zur Umwandlung von Vanillin in ein Nicht-Vanillinprodukt nicht vorhanden oder verringert. Natürlich ist die Enzymaktivität III kein derartiges Mittel. In bequemer Weise werden diese Enzymaktivitäten durch das Bodenbakterium *Pseudomonas fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, wobei dieses Bakterium nach dem Budapest Treaty bei National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited, AURIS Business Centre, 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Schottland, unter der Hinterlegungsnummer NCIMB 40783 hinterlegt ist, oder eine Mutante oder Variante desselben bereitgestellt. Durch "Mutante oder Variante desselben" umfassen wir jede Mutante oder Variante des Bakteriums, vorausgesetzt, das Bakterium behält die gleichen Enzymaktivitäten bei, ungeachtet, ob in der gleichen Konzentration oder nicht. Es ist klar, dass die Enzymaktivitäten auch beibehalten werden können, wenn die die Enzyme codierenden Gene mutiert sind. Beispielsweise sind Mutanten, die die Enzymaktivitäten konstitutiv (im Gegensatz zu bedingt oder induziert) exprimieren, besonders günstige Mutanten von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, wie auch Varianten, bei denen ein oder mehrere der Enzyme mit den Aktivitäten günstigere genetische Eigenschaften (beispielsweise eine erhöhte Turnover-Zahl oder einen verringerten Km-Wert) zeigen.

**[0020]** Wenn der *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 auf trans-Ferulat wächst, wird ein maximaler Vorteil erhalten, wenn Vanillin weiter katabolisiert wird, um mehr Energie bereitzustellen. Um jedoch die Produktion von Vanillin durch *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, zu maximieren, ist es günstig, wenn das Mittel zur Umwandlung von Vanillin in ein Nicht-Vanillinprodukt nicht vorhanden oder verringert ist. Wir ermittelten, dass in *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, Vanillin in Vanillinsäure oder ein Salz derselben durch Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase umgewandelt wird. Es ist günstig, wenn eine Mutante von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, worin die Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase-Aktivität nicht vorhanden oder verringert ist, in dem Verfahren verwendet wird. Eine derartige Mutante kann unter Verwendung einer Genaustauschstrategie mit einem unterbrochenen Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktasegen oder einer DNA-Sequenz, aus der dieses Gen deletiert wurde, hergestellt werden. Genaustausch ist auf dem Gebiet der Bakteriengenetik bekannt. Alternativ kann die Isolierung einer derartigen Mutante durch klassische chemische Mutagenese unter Selektion auf der Basis der Unfähigkeit, auf Vanillin zu wachsen, erreicht werden.

**[0021]** Es ist klar, dass andere Mittel zur Umwandlung von Vanillin in ein Nicht-Vanillinprodukt bestehen, und vorzugsweise sind diese bei dem Verfahren nicht vorhanden oder verringert.

**[0022]** Obwohl *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, oder Mutanten oder Varianten desselben bei dem Verfahren gemäß der Erfindung als ganze Zellen oder permeabilisierte oder immobilisierte Zellen verwendbar sind, werden die Enzymaktivitäten I, II und III vorzugsweise durch ein von intakten Zellen freies System von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, oder einer Mutante oder Variante desselben bereitgestellt. Geeignete Systeme und Extrakte können durch einschlägig bekannte Verfahren, beispielsweise durch eine French-Druckzelle oder Ultraschallbehandlung und anschließende Zentrifugation, verwendet werden. Alterna-

tiv können ganze Zellen unter Verwendung von einschlägig bekannten Verfahren, beispielsweise Verwendung von Detergenzien, wie Dimethylsulfoxid (DMSO), permeabilisiert werden.

**[0023]** Die Verwendung eines derartigen von intakten Zellen freien Systems macht es möglich, dass die notwendigen Substrate und etwaige Cofaktoren ohne weiteres die relevanten Enzyme erreichen und die Produkte ohne weiteres in das Reaktionsmedium freigesetzt werden, wenn dies für die weitere Reaktion notwendig ist; jedoch können, wie im Folgenden angegeben diskutiert wird, mindestens einige Enzyme der Erfindung an Substrat-(metabolischer)Kanalisierung beteiligt sein.

**[0024]** Wir ermittelten, dass keine der Enzymaktivitäten I, II und III von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 von NAD<sup>+</sup> abhängig ist, während die Enzymaktivität IV von *Ps. fluorescens* (Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase) NAD<sup>+</sup> erfordert.

**[0025]** Daher ist ein bevorzugter Weg zur Verringerung von Mitteln zur Umwandlung von Vanillin in ein Nicht-Vanillinprodukt in einem von intakten Zellen freien System von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, (oder in einem System mit permeabilisierten Zellen von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103) das Weglassen von NAD<sup>+</sup> aus dem Reaktionssystem. Etwaiges exogenes NAD<sup>+</sup> wird durch das Vorhandensein von trans-Ferulat in dem System bereitwillig und rasch entfernt.

**[0026]** Für die Mikroorganismen der vorliegenden Erfindung, die bei dem Verfahren der Vanillinproduktion verwendet werden können, die *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, umfassen, können mindestens drei Hauptarten eines Bioreaktors für die Biotransformationsreaktionen verwendet werden: Der Chargentank, der Tank mit einem gepackten Bett und der Rühtank mit kontinuierlichem Durchsatz; deren Anwendungsmöglichkeiten und Eigenschaften wurden in einer Übersicht angegeben (M. D.

**[0027]** Lilly in "Recent Advances in Biotechnology", Hrsg. F. Vardar-Sukan und S. S. Sukan, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1992, S. 47-68 und aaO).

**[0028]** Wie im Folgenden detaillierter beschrieben wird, sind die Enzymaktivitäten II und III in von anderen Enzymaktivitäten freier Form beispielsweise direkt oder indirekt aus *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, und aus anderen Organismen oder Zellen, die genetisch so modifiziert wurden, dass sie diese Enzymaktivitäten codierende Gene exprimieren, erhältlich.

**[0029]** Es ist klar, dass beispielsweise durch Screening andere Mikroorganismen, die bei den Verfahren der Erfindung verwendbar sind, ermittelt werden können. Derartige Mikroorganismen und Screeningverfahren und Verwendungsverfahren bilden einen Teil der Erfindung. Das Screeningverfahren für andere Mikroorganismen, die die Aktivitäten I, II und III besitzen, ist im Wesentlichen das in dem Abschnitt Materialien und Verfahren in den Beispielen für die Isolierung von AN103 bereits beschriebene. Der wichtige Aspekt ist die Isolierung aus einer Umgebung, die an trans-Ferulat oder verwandten Verbindungen (beispielsweise 4-trans-Cumarat, trans-Caffeat [3,4-Dihydroxy-trans-cinnamat]), die wie im Folgenden beschrieben ebenfalls Substrate für die Enzymaktivität I sein können) ist, und die Selektion auf Wachstum auf trans-Ferulat (vorzugsweise) als einziger Kohlenstoffquelle. In der Praxis sind bevorzugte Quellen diejenigen, in denen von Pflanzen stammende Materialien abgebaut werden; dies umfasst außer Erde oder Kompost den Abfall oder Rückstände von Fabriken oder anderen Anlagen, die derartige Materialien verarbeiten, beispielsweise Zuckerrübenfabriken, Kakaofortifikationsmassen und dergleichen, und den Inhalt des Magen-Darm-Trakts, insbesondere von Wiederkäuern und anderen Pflanzenfressern. Es ist möglich, dass Anaerobika gefunden werden können, die diese Aktivität besitzen, und dies kann ohne weiteres bei dem Isolierungsverfahren berücksichtigt werden. A priori ist A priori ist die Isolierung von Organismen mit diesen Aktivitäten auch aus der Meereswelt möglich.

**[0030]** Gattungen, in denen weitere in der Erfindung verwendbare Mikroorganismen gefunden werden können, umfassen: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Penicillium* und *Aspergillus*.

**[0031]** Ein alternativer oder zusätzlicher Ansatz ist die Verwendung von einem der *Pseudomonas*-Gene mit Codierung für die hier beschriebenen Enzymaktivitäten II oder III oder von redundanten Sequenzen, die ausgehend von den Aminosäuresequenzen des *Pseudomonas*-Enzyms gestaltet wurden, in DNA-Sonden oder PCR-Amplifikationsstrategien zur Ermittlung verwandter Gene in anderen Organismen. Wie im Folgenden deutlicher gemacht wird, bilden Enzyme und Nukleotidsequenzen, die funktionsmäßig zu den aus AN103 isolierten äquivalent sind, sich jedoch hinsichtlich der Sequenz unterscheiden, einen Teil der Erfindung.

**[0032]** Unsere Untersuchungen zeigen, dass das Enzym, das trans-Ferulat in trans-Feruloyl-SCoA in *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 umwandelt, Coenzym A (CoASH), ATP und  $Mg^{2+}$  oder andere funktionsmäßig äquivalente Cofaktoren verwendet. Daher umfasst das Verfahren vorzugsweise ferner die Stufe (3) des Bereitstellens von einem der Cofaktoren CoASH, ATP oder  $Mg^{2+}$  oder von anderen funktionsmäßig äquivalenten Cofaktoren. ATP ist Adenosintriphosphat. Es ist bekannt, dass andere funktionsmäßig äquivalente Cofaktoren in einigen Fällen CoASH, ATP oder  $Mg^{2+}$  ersetzen können. Beispielsweise kann  $Mn^{2+}$  anstelle von  $Mg^{2+}$  verwendet werden und Derivate oder Analoga von ATP, vorzugsweise mit einem hydrolysierbaren  $\gamma$ -Phosphat, können anstelle von ATP verwendet werden.

**[0033]** Wir stellten ferner fest, dass, zumindest wenn die Enzymaktivität I von dem *Pseudomonas*-AN103-Enzym bereitgestellt wird, die trans-Ferulat in trans-Feruloyl-SCoA umwandelt und wobei das Enzym ATP und Coenzym ASH verwendet, es günstig ist, ein System zu bilden, bei dem entweder einer oder beide der Cofaktoren Coenzym ASH und ATP wiederaufbereitet werden. Die folgenden ATP-Erzeugungs- und CoASH-Wiederaufbereitungssysteme sind bevorzugt.

**[0034]** ATP-Erzeugung:

- (i) trans-Ferulat + CoASH + ATP +  $H_2O \rightarrow$  Vanillin + Acetyl-SCoA + AMP + PPi (Gesamtreaktion wird durch einen Extrakt von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 katalysiert)
- (ii) AMP + ATP  $\rightleftharpoons$  2 ADP (Adenylatkinase)
- (iii) Acetyl- $\sim$ P + ADP  $\rightleftharpoons$  2 Acetat + ATP (Acetatkinaise)
- (iv) Summe: trans-Ferulat + CoASH + 2 Acetyl- $\sim$ P +  $H_2O \rightarrow$  Vanillin + Acetyl-SCoA + 2 Acetat + PPi

**[0035]** Eine CoASH-Wiederaufbereitung ist unter Verwendung von im Handel erhältlicher Citratsynthase (EC 4.1.3.7) und Citratlyase (EC 4.1.3.6) erreichbar:

- (v) AcetylSCoA + Oxalacetat +  $H_2O \rightleftharpoons$  Citrat + CoASH (Citratsynthase)
- (vi) Citrat  $\rightleftharpoons$  Oxalacetat + Acetat (Citratlyase) Gesamtsumme, (iv) – (vi):
- (vii) trans-Ferulat + 2 Acetyl- $\sim$ P + 2  $H_2O \rightarrow$  Vanillin + 3 Acetat + PPi

**[0036]** Das in dem Gesamtverfahren (vii) verwendete Acetyl- $\sim$ P wird nicht selbst durch enzymatische Mittel erzeugt; jedoch erscheint keines von dessen Atomen im Vanillinprodukt.

**[0037]** Acetylphosphat ist im Handel erhältlich oder kann unter Verwendung des bei Stadtman (1957), Meth. Enzymol. 3, 228-231 beschriebenen Verfahrens synthetisiert werden.

**[0038]** Die Reagenzien sind beispielsweise bei Sigma Chemical Co, Fancy Road, Poole, Dorset, UK im Handel erhältlich. Citratlyase stammt typischerweise von *Enterobacter aerogenes*; Citratsynthase stammt typischerweise aus Hühnerherz, Taubenbrutmuskulatur oder Schweineherz.

**[0039]** Daher wird Coenzym-ASH vorzugsweise unter Verwendung der Enzyme Citratsynthase und Citratlyase wiederaufbereitet; und ATP vorzugsweise unter Verwendung der Enzyme Adenylatkinase (EC 2.7.4.3) und Acetatkinaise (EC 2.7.2.1) erzeugt.

**[0040]** Das Cofaktorwiederaufbereitungssystem ist insbesondere bei der Verwendung eines von intakten Zellen freien Systems bevorzugt.

**[0041]** trans-Ferulasäure oder ein Salz derselben ist ohne weiteres aus Pflanzenmaterial erhältlich. Günstigerweise wird trans-Ferulasäure oder ein Salz derselben aus dem Pflanzenmaterial durch die Wirkung von Ferulasäureesterase freigesetzt. Daher wird in einer speziell bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die trans-Ferulasäure oder ein Salz derselben durch die Wirkung von Ferulasäureesterase auf Pflanzenmaterial bereitgestellt.

**[0042]** trans-Ferulasäure und trans-4-Cumarinsäure können zusammen bis zu 1,5 Gew.-% der Zellwände von gemäßigten Gräsern bilden (R. D. Hartley und E. C. Jones, Phytochemistry 16, 1531-1534 (1977)). Es wird berichtet, dass trans-Ferulasäure 0,5 (Gew/Gew) von Weizenkleie (M. C. Ralet, J.-F. Thibault und G. Della Valle, J. Cereal Sci., 11, 249-259 (1990)), 3,1 von Maiskleie (L. Saulnier, C. Marot, E. Chanliaud und J.-F. Thibault, Carbohydr. Polym. 26, 279-287 (1995)) und 0,8 von Zuckerrübenpulpe (V. Micard, G. M. G. C. Renard und J.-F. Thibault, Lebensm.-Wiss. u-Technol. 27, 59-66 (1994)) ausmacht. Diese Materialien gehören zu den bevorzugten Quellen von trans-Ferulasäure. Da trans-Ferulasäure mit Zellwände-Polysacchariden verestert vor-

handen ist, ist eine Hydrolyse essentiell. Eine alkalische oder saure Hydrolyse ist möglich, doch ist eine enzymatische Hydrolyse bevorzugt. Typischerweise ist die erste Stufe die partielle enzymatische Hydrolyse von Kohlehydraten (Arabinanen, Xylanen, Rhamnogalacturananen), an die trans-Ferulat gebunden ist, gefolgt von der Freisetzung von trans-Ferulat von den Oligosaccharidfragmenten durch trans-Ferulasäure-Esteraseaktivität. In der Praxis können beide Stufen gleichzeitig im Reaktionsgemisch erfolgen. Beschreibungen repräsentativer Verfahren im Labormaßstab sind in der Literatur verfügbar (siehe beispielsweise L. P. Christov und B. A. Prior, Enzyme Microb. Technol., 15, 460-475 (1993); C. B. Faulds und G. Williamson, Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 1082-1087 (1995); C. B. Faulds, P. A. Kroon, L. Saulnier, J.-F. Thibault und G. Williamson, Carbohydrate Polymers 27, 187 – 190 (1995)). Über Phenolsäure freisetzende Enzyme aus einer Zahl von Mikroorganismen wurde berichtet, wobei die Mikroorganismen *Streptomyces olivochromogenes* (C. B. Faulds und G. Williamson, J. Gen. Microbiol. 137, 2337-2345 (1991)), *Penicillium pinophilum* (A. Castanares, S. I. McCrae und T. M. Wood, Enzyme Microb. Technol. 14, 875 – 884 (1992)), *Neocallimastix* spp. (W. S. Borneman, R. D. Hartley, W. H. Morrison, D. E. Akin und L. G. Ljungdahl, Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 345-351 (1990)), *Schizophyllum commune* (R. C. MacKenzie und D. Bilous, Appl. Envir. Microbiol. 54, 1170-1173 (1988)) und *Aspergillus* spp. (M. Tenkanen, J. Schuseil, J. Puls und K. Poutanen, J. Biotechnol. 18, 69-84 (1991); C. B. Faulds und G. Williamson, Microbiology 140, 779-787 (1994)) umfassen. Eine trans-Ferulasäure-Esterase (XYLD) aus *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* zusammen mit einer Arabinofuranosidase (XYLC) und einer Endoxylanase (XYLB) wurde charakterisiert (L. M. A. Ferreira, T. M.

**[0043]** Wood, G. Williamson, C. B. Faulds, G. P. Hazlewood und H. J. Gilbert, J. 294, 349-355 (1993)). Die Gene für alle drei Enzyme wurden isoliert (G. P. Hazlewood und H. J. Gilbert, in "Xylans and Xylanases", Hrsg. J. Visser, G. Beldman, M. A. Kusters-van Someren und A. G. J. Voragen, Elsevier, Amsterdam, S. 259-273 (1992)).

**[0044]** Daher kann die trans-Ferulasäure oder ein Salz derselben durch die Wirkung von trans-Ferulasäure-Esterase auf den Ester in vorteilhafter Weise bereitgestellt werden. Insbesondere ist es vorteilhaft, ein Gen mit Codierung für diese Esterase in eine Wirtszelle oder einen Organismus, die bei den Verfahren der Erfindung verwendet werden, einzuführen. Daher ist es günstig, ein trans-Ferulasäure-Esterasegen, beispielsweise das im Vorhergehenden genannte XYLD-Gen, in eine Pflanze, die bei den Verfahren der Erfindung verwendet wird, einzuführen.

**[0045]** Obwohl wie im Vorhergehenden beschrieben das Verfahren unter Verwendung von Enzymaktivitäten I, II und III, die durch *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 oder Mutanten oder Varianten desselben selbst oder von intakten Zellen freie Extrakte derselben bereitgestellt werden, durchgeführt werden kann, ist es günstig, wenn mindestens eine der Enzymaktivitäten II und III durch ein im Wesentlichen gereinigtes Enzym bereitgestellt wird. Im Wesentlichen gereinigte Enzyme mit Enzymaktivitäten II und III werde im Folgenden beschrieben.

**[0046]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Verfahren des ersten Aspekts der Erfindung ferner die Bereitstellung einer Verbindung zusätzlich zu trans-Ferulasäure oder einem Salz derselben, die durch eine der Enzymaktivitäten I, II oder III in ein gewünschtes Produkt umgewandelt werden kann. Günstigerweise wird die Verbindung durch eine oder mehrere der Enzymaktivitäten in ein Produkt umgewandelt, das sich in aus Vanilleschote extrahierter Vanille findet und vorzugsweise zum Geschmack oder Aroma derselben beiträgt.

**[0047]** Aus Vanilleschote extrahierte Vanille enthält Vanillin als Hauptkomponente, jedoch auch geringere Mengen gewünschter Komponenten, wie p-Hydroxybenzoësäure, p-Hydroxybenzaldehyd und Vanillinsäure. Typischerweise sind diese Komponenten und Vanillin als Glukoside in grünen Vanilleschoten sowie in der freien Form vorhanden. Jedoch sind bei Hydrolyse oder Fermentation der grünen Schoten oder Hydrolyse der fermentierten Schoten die meisten Komponenten in der freien Form vorhanden.

**[0048]** Daher ist es besonders bevorzugt, wenn die Verbindung eine Verbindung von trans-4-Cumarinsäure oder ein Salz derselben, trans-4-Cumaroyl-SCoA, trans-Coffeinsäure oder ein Salz derselben, trans-Coffeoyl-SCoA oder 3,4-Methylendioxy-transzimtsäure oder ein Salz derselben ist. Durch die Wirkung von einer oder mehreren der Enzymaktivitäten I, II oder III werden trans-4-Cumarinsäure oder ein Salz derselben und trans-4-Cumaroyl-SCoA in p-Hydroxybenzaldehyd umgewandelt trans-Coffeinsäure oder ein Salz derselben und trans-Coffeoyl-SCoA in 3,4-Dihydroxybenzaldehyd umgewandelt; und 3,4-Methylendioxy-trans-zimtsäure oder ein Salz derselben in Heliotropin umgewandelt.

**[0049]** Vorzugsweise ist die Verbindung trans-4-Cumarinsäure oder ein Salz derselben oder trans-4-Cuma-

royl-SCoA und das gewünschte Produkt 4-Hydroxybenzaldehyd, der eine signifikante Komponente von natürlichem Vanilla-Extrakt ist.

**[0050]** Die Enzymaktivitäten I, II und III von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 können trans-Coffeat und trans-4-Cumarat (und gegebenenfalls die Produkte von deren Reaktion mit der Enzymaktivität I) mit beträchtlicher Effizienz verwenden, während Cinnamat und 3,4-Methylendioxy-trans-cinnamat, obwohl sie als Substrate verwendet werden können, schlechte Substrate der AN103-Enzyme sind.

**[0051]** Daher ist das Verfahren des ersten Aspekts der Erfindung zur Herstellung von Vanillegeschmack und -aromen, die der Vanille aus Vanilleschoten ziemlich stark ähneln, geeignet.

**[0052]** Das Verfahren des ersten Aspekts der Erfindung kann unter bestimmten Umständen auch unter Verwendung der Wirtszellen und genetisch modifizierten Zellen und Organismen, die im Folgenden detaillierter beschrieben sind, durchgeführt werden.

**[0053]** Ein zweiter Aspekt der Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung von Vanillinsäure oder einem Salz derselben bereit, das die folgenden Stufen umfasst:

- (1) Bereitstellen von trans-Ferulasäure oder einem Salz derselben;
- (2) Bereitstellen von trans-Ferulat:CoASH-Ligaseaktivität, trans-Feruloyl-SCoA-Hydrataseaktivität und 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxy-propionyl-SCoA(HMPHP-SCoA)-Spaltungsaktivität; und
- (3) Bereitstellen einer Aktivität die Vanillin und Vanillinsäure ineinander umwandelt.

**[0054]** Der Einfachheit wegen wird die Aktivität, die Vanillin und Vanillinsäure ineinander umwandelt, als Enzymaktivität IV bezeichnet. Üblicherweise wird die Aktivität durch Vanillin: NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (Vanillindehydrogenase) bereitgestellt. Günstigerweise wird diese Aktivität durch *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 bereitgestellt. Verfahren zur Umwandlung von Vanillin in Vanillinsäure oder ein Salz derselben sind ebenfalls einschlägig bekannt, beispielsweise beschreiben Perestelo et al. (1989) App. Environ. Microbiol. 55, 1660-1662 die Produktion von Vanillinsäure aus Vanillin durch ruhende Zellen von *Serratia marcescens*, und Pometto & Crawford (1983) App. Environ. Microbiol. 45, 1582-1585 beschreiben die biologische Umwandlung ganzer Zellen von Vanillin in Vanillinsäure durch *Streptomyces viridosporus*.

**[0055]** Das durch die Erfindung bereitgestellte Verfahren der Herstellung von Vanillinsäure umfasst daher die Stufen des Einwirkens von Enzymaktivität I auf trans-Ferulasäure oder einem Salz derselben und des Bildens eines Produkts, des Einwirkens von Enzymaktivität II auf das Produkt der Enzymaktivität I unter Bildung eines Produkts, des Einwirkens von Enzymaktivität III auf das Produkt der Enzymaktivität II unter Bildung eines Produkts und des Einwirkens der Enzymaktivität IV auf das Produkt von der Enzymaktivität III unter Bildung eines Produkts.

**[0056]** Es ist klar, dass Vanillinsäure durch die gleichen Mittel wie die Herstellung von Vanillin in dem Verfahren des ersten Aspekts der Erfindung hergestellt werden kann, unter natürlich der Voraussetzung, dass Enzymaktivität IV zugeführt wird.

**[0057]** Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des ersten Aspekts der Erfindung umfasst die weitere Stufe der Abtrennung von Vanillin von den anderen Reaktionskomponenten.

**[0058]** Vanillin und andere aromatische Aldehyde sind beispielsweise durch Extraktion mit einem Lösemittel, das superkritisches Kohlendioxid umfasst, und durch organophile Pervaporation unter Verwendung von aus hydrophoben Polymeren konstruierten Membranen gewinnbar (G. Bengston und K. W. Bodekker, in "Bioflavour 95", Hrsg. P. Etievant und P. Schreier, INRA, Paris, S. 393-403 (1995); S. M. Zhang und E. Drioli, Separ. Sci. Technol. 8, 1-31 (1994)). Die Pervaporationstechnologie wurde beispielsweise für die Gewinnung von Aromaverbindungen von Wein verwendet (N. Rajagopalan und M. Cheryan, J. Membrane Sci. 104, 243-250 (1995)). Eine Festphasenextraktion und die anschließende Desorption mit einem Lösemittel ist auch möglich, wenngleich weniger bevorzugt.

**[0059]** Jedoch wird in einigen Fällen, insbesondere wenn Nebenreaktionsprodukte vorhanden sind, die ähnlich zu in der aus Vanilleschote isolierten Vanille vorhandenen Verbindungen sind, Vanillin nicht isoliert.

**[0060]** Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des zweiten Aspekts der Erfindung umfasst die weitere Stufe der Abtrennung von Vanillinsäure oder einem Salz derselben von den anderen Reaktionskomponenten.

**[0061]** Vanillinsäure und andere Carbonsäuren können beispielsweise durch Festphasenextraktion, durch Lösemittelextraktion unter sauren Bedingungen oder durch Pertraktion gewonnen werden; beispielsweise beschreiben L. Boyadzhiev und I. Atanassova (Process Biochemistry 29, 237-243 (1994)) die Gewinnung der aromatischen Aminosäure Phenylalanin durch Pertraktion.

**[0062]** Ein dritter Aspekt der Erfindung stellt *Pseudomonas fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, der nach dem Budapest Treaty bei National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited, AURIS Business Centre, 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Schottland, unter der Hinterlegungsnummer NCIMB 40783 hinterlegt ist, oder eine Mutante oder Variante desselben bereit. Bevorzugte Mutanten und Varianten sind die gleichen wie die im ersten Aspekt der Erfindung bevorzugten. Eine besonders bevorzugt Mutante von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 ist eine Mutante, die Vanillin ansammelt, wenn sie mit trans-Ferulasäure oder einem Salz derselben versorgt wird. Üblicherweise ist dies eine Mutante von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, worin Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktaseaktivität nicht vorhanden oder verringert ist. Günstigerweise besteht eine Mutation in dem Gen mit Codierung für Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase derart, dass die Enzymaktivität nicht vorhanden oder wesentlich verringert ist.

**[0063]** Eine derartige Mutante kann wie im Vorhergehenden beschrieben hergestellt werden.

**[0064]** Ein vierter Aspekt der Erfindung stellt ein Polypeptid bereit, das in Gegenwart geeigneter Cofaktoren, falls diese notwendig sind, die Umwandlung zwischen trans-Feruloyl-SCoA und 4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl-β-hydroxypropionyl-SCoA (HMPHP-SCoA) katalysieren kann. Ein derartiges Polypeptid besitzt die Enzymaktivität II. Üblicherweise umfasst das Polypeptid trans-Feruloyl-SCoA-Hydratase; günstigerweise umfasst das Polypeptid trans-Feruloyl-SCoA-Hydratase aus *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 oder Fragmenten oder Varianten desselben, die mindestens 1 % der spezifischen Aktivität des nativen Enzyms (in Beziehung auf trans-Feruloyl-SCoA-Hydrataseaktivität), zweckmäßigerweise mindestens 10 %, vorzugsweise mindestens 100 % aufweisen.

**[0065]** Die Enzymaktivität wird wie in den Beispielen beschrieben ohne weiteres gereinigt. Modifikationen dieses Verfahrens können ohne weiteres durch einen Fachmann erfolgen, so dass ein Polypeptid mit Enzymaktivität II von jeder geeigneten Quelle unter Verwendung des in den Beispielen beschriebenen Testverfahrens der Enzymaktivität II erhalten werden kann.

**[0066]** Vorzugsweise umfasst das Polypeptid des vierten Aspekts der Erfindung die folgende Aminosäuresequenz:

```

MetSerThrTyrGluGlyArgTrpLysThrValLysValGluIleGluAspGlyIleAla
PheValIleLeuAsnArgProGluLysArgAsnAlaMetSerProThrLeuAsnArgGlu
MetIleAspValLeuGluThrLeuGluGlnAspProAlaAlaGlyValLeuValLeuThr
GlyAlaGlyGluAlaTrpThrAlaGlyMetAspLeuLysGluTyrPheArgGluValAsp
AlaGlyProGluIleLeuGlnGluLysIleArgArgGluAlaSerGlnTrpGlnTrpLys
LeuLeuArgMetTyrAlaLysProThrIleAlaMetValAsnGlyTrpCysPheGlyGly
GlyPheSerProLeuValAlaCysAspLeuAlaIleCysAlaAspGluAlaThrPheGly
LeuSerGluIleAsnTrpGlyIleProProGlyAsnLeuValSerLysAlaMetAlaAsp
ThrValGlyHisArgGlnSerLeuTyrTyrIleMetThrGlyLysThrPheGlyGlyGln
LysAlaAlaGluMetGlyLeuValAsnGluSerValProLeuAlaGlnLeuArgGluVal
ThrIleGluLeuAlaArgAsnLeuLeuGluLysAsnProValValLeuArgAlaAlaLys

```

HisGlyPheLysArgCysArgGluLeuThrTrpGluGlnAsnGluAspTyrLeuTyrAla  
 LysLeuAspGlnSerArgLeuLeuAspThrGluGlyGlyArgGluGlnGlyMetLysGln  
 PheLeuAspAspLysSerIleLysProGlyLeuGlnAlaTyrLysArg (SEQ ID No: 2) ,  
 oder ein Fragment oder eine Variante derselben.

**[0067]** Die Aminosäuresequenz ist die in **Fig. 12** angegebene, die durch die Nucleotide 2872 bis 3699 codiert wird.

**[0068]** Ein fünfter Aspekt der Erfindung stellt ein Polypeptid bereit, das in Gegenwart geeigneter Cofaktoren, falls diese notwendig sind, die Umwandlung von 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxypropionyl-SCoA (HM-PHP-SCoA) in Vanillin katalysieren kann. Ein derartiges Polypeptid besitzt die Enzymaktivität III. Üblicherweise umfasst das Polypeptid das HMPHP-SCoA-Spaltungsenzym; günstigerweise umfasst das Polypeptid das HM-PHP-SCoA-Spaltungsenzym von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 oder Fragmente oder Varianten desselben, die mindestens 1 %, zweckmäßigerweise mindestens 10 %, vorzugsweise mindestens 100 % der spezifischen Aktivität des nativen Enzyms (in Bezug auf die HMPHP-SCoA-Spaltungsaktivität) aufweisen.

**[0069]** Die Enzymaktivität wird wie in den Beispielen beschrieben ohne weiteres gereinigt. Modifikationen dieses Verfahrens können ohne weiteres durch einen Fachmann erfolgen, so dass ein Polypeptid mit Enzymaktivität III von jeder geeigneten Quelle unter Verwendung des in den Beispielen beschriebenen Testverfahrens der Enzymaktivität III erhalten werden kann.

**[0070]** Vorzugsweise umfasst das Polypeptid des fünften Aspekts der Erfindung die folgende Aminosäuresequenz:

MetSerThrTyrGluGlyArgTrpLysThrValLysValGluIleGluAspGlyIleAla  
 PheValIleLeuAsnArgProGluLysArgAsnAlaMetSerProThrLeuAsnArgGlu  
 MetIleAspValLeuGluThrLeuGluGlnAspProAlaAlaGlyValLeuValLeuThr  
 GlyAlaGlyGluAlaTrpThrAlaGlyMetAspLeuLysGluTyrPheArgGluValAsp  
 AlaGlyProGluIleLeuGlnGluLysIleArgArgGluAlaSerGlnTrpGlnTrpLys  
 LeuLeuArgMetTyrAlaLysProThrIleAlaMetValAsnGlyTrpCysPheGlyGly  
 GlyPheSerProLeuValAlaCysAspLeuAlaIleCysAlaAspGluAlaThrPheGly  
 LeuSerGluIleAsnTrpGlyIleProProGlyAsnLeuValSerLysAlaMetAlaAsp  
 ThrValGlyHisArgGlnSerLeuTyrTyrIleMetThrGlyLysThrPheGlyGlyGln  
 LysAlaAlaGluMetGlyLeuValAsnGluSerValProLeuAlaGlnLeuArgGluVal  
 ThrIleGluLeuAlaArgAsnLeuLeuGluLysAsnProValValLeuArgAlaAlaLys  
 HisGlyPheLysArgCysArgGluLeuThrTrpGluGlnAsnGluAspTyrLeuTyrAla  
 LysLeuAspGlnSerArgLeuLeuAspThrGluGlyGlyArgGluGlnGlyMetLysGln  
 PheLeuAspAspLysSerIleLysProGlyLeuGlnAlaTyrLysArg (SEQ ID No: 2) ,

oder ein Fragment oder eine Variante derselben.

**[0071]** Die Aminosäuresequenz ist die in **Fig. 12** angegebene, die durch die Nucleotide 2872 bis 3699 codiert wird.

[0072] Ein sechster Aspekt der Erfindung stellt ein Polypeptid bereit, das die Aminosäuresequenz

MetLeuAspValProLeuLeuIleGlyGlyGlnSerCysProAlaArgAspGlyArgThr  
 PheGluArgArgAsnProValThrGlyGluLeuValSerArgValAlaAlaAlaThrLeu  
 GluAspAlaAspAlaAlaValAlaAlaAlaGlnGlnAlaPheProAlaTrpAlaAlaLeu  
 AlaProAsnGluArgArgSerArgLeuLeuLysAlaAlaGluGlnLeuGlnAlaArgSer  
 GlyGluPheIleGluAlaAlaGlyGluThrGlyAlaMetAlaAsnTrpTyrGlyPheAsn  
 ValArgLeuAlaAlaAsnMetLeuArgGluAlaAlaSerMetThrThrGlnValAsnGly  
 GluValIleProSerAspValProGlySerPheAlaMetAlaLeuArgGlnProCysGly  
 ValValLeuGlyIleAlaProTrpAsnAlaProValIleLeuAlaThrArgAlaIleAla  
 MetProLeuAlaCysGlyAsnThrValValLeuLysAlaSerGluLeuSerProAlaVal  
 HisArgLeuIleGlyGlnValLeuGlnAspAlaGlyLeuGlyAspGlyValValAsnVal  
 IleSerAsnAlaProAlaAspAlaAlaGlnIleValGluArgLeuIleAlaAsnProAla  
 ValArgArgValAsnPheThrGlySerThrHisValGlyArgIleValGlyGluLeuSer  
 AlaArgHisLeuLysProAlaLeuLeuGluLeuGlyGlyLysAlaProLeuLeuValLeu  
 AspAspAlaAspLeuGluAlaAlaValGlnAlaAlaAlaPheGlyAlaTyrPheAsnGln  
 GlyGlnIleCysMetSerThrGluArgLeuIleValAspAlaLysValAlaAspAlaPhe  
 ValAlaGlnLeuAlaAlaLysValGluThrLeuArgAlaGlyAspProAlaAspProGlu  
 SerValLeuGlySerLeuValAspAlaSerAlaGlyThrArgIleLysAlaLeuIleAsp  
 AspAlaValAlaLysGlyAlaArgLeuValIleGlyGlyGlnLeuGluGlySerIleLeu  
 GlnProThrLeuLeuAspGlyValAspAlaSerMetArgLeuTyrArgGluGluSerPhe  
 GlyProValAlaValValLeuArgGlyGluGlyGluGluAlaLeuLeuGlnLeuAlaAsn  
 AspSerGluPheGlyLeuSerAlaAlaIlePheSerArgAspThrGlyArgAlaLeuAla  
 LeuAlaGlnArgValGluSerGlyIleCysHisIleAsnGlyProThrValHisAspGlu  
 AlaGlnMetProPheGlyGlyValLysSerSerGlyTyrGlySerPheGlyGlyLysAla  
 SerIleGluHisPheThrGlnLeuArgTrpValThrLeuGlnAsnGlyProArgHisTyr  
 ProIle

(SEQ ID No: 4) oder ein Fragment oder eine Variante derselben umfasst.

[0073] Die Aminosäuresequenz ist die in Fig. 12 angegebene, die durch die Nucleotide 3804 bis 5249 codiert ist.

[0074] Wie detailliert in den Beispielen beschrieben, codiert diese Polypeptidsequenz für ein Enzym mit Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktaseaktivität aus *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103.

[0075] Mit "Varianten" umfassen wir Deletionen, Insertionen und Substitutionen entweder konservativer oder

nichtkonservativer Art, wobei derartige Änderungen die Aktivität verringern oder verstärken können oder die Aktivität im Wesentlichen nicht ändern können. Insbesondere umfasst der siebte Aspekt der Erfindung die vollständige Polypeptidsequenz der Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 und dieses Polypeptid selbst.

**[0076]** "Konservative Substitutionen" sollen Kombinationen wie Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; und Phe, Tyr bedeuten. Derartige Varianten können unter Verwendung der Verfahren des Protein-Engineering und der positionsspezifischen Mutagenese, die im Folgenden beschrieben und einschlägig bekannt sind, hergestellt werden.

**[0077]** Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein Polypeptid gemäß der Definition in der vierten, fünften oder sechsten Ausführungsform der Erfindung, das im Wesentlichen rein ist.

**[0078]** Der Ausdruck "im Wesentlichen rein" soll bedeuten, dass das Polypeptid im Wesentlichen frei von anderen Polypeptiden oder anderen Makromolekülen ist, mit denen es üblicherweise in der Natur gefunden wird. Günstigerweise ist das Polypeptid im Wesentlichen frei von allen anderen Polypeptiden oder Makromolekülen. Vorzugsweise weist das Polypeptid weniger als 50 Gew.-%, üblicherweise weniger als 10 Gew.-%, zweckmäßigerweise weniger als 1 Gew.-%, noch zweckmäßiger weniger als 0,1 Gew.-% und vorzugsweise weniger als 0,01 Gew.-% an irgendeinem anderen Polypeptid auf.

**[0079]** Polypeptide können unter Verwendung von einschlägig bekannten Verfahren gereinigt werden. Vorzugsweise ist das Polypeptid das Produkt einer rekombinanten DNA.

**[0080]** Eine einzelne Polypeptidkette kann mehr als eine der Enzymaktivitäten (II) trans-Feruloyl-SCoA-Hydrataseaktivität oder (III) HMPHP-SCoA-Spaltungsaktivität umfassen.

**[0081]** Unsere Daten in den Beispielen zeigen, dass im Falle von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 die Enzymaktivitäten II und III in der gleichen Polypeptidkette, deren Sequenz als die bevorzugten Polypeptide des fünften und sechsten Aspekts der Erfindung angegeben sind, gefunden werden. Daher ist es im Falle der Bereitstellung der Enzymaktivitäten II und III in einem Aspekt der Erfindung am günstigsten, wenn sie in der gleichen Polypeptidkette bereitgestellt werden.

**[0082]** Es ist klar, dass unter Verwendung von Protein-Engineering-Verfahren oder einer chemischen Vernetzung die Herstellung eines einzigen Moleküls, das die Enzymaktivitäten II und III besitzt, möglich ist. Ein derartiges Molekül bildet daher einen weiteren Aspekt der Erfindung.

**[0083]** Ein siebter Aspekt der Erfindung stellt ein Polynucleotid mit Codierung für ein Polypeptid gemäß der Definition in einem Aspekt von dem vierten, fünften oder sechsten Aspekt der Erfindung bereit.

**[0084]** Der Ausdruck "Polynucleotid" soll RNA und DNA umfassen. DNA ist bevorzugt.

**[0085]** Daher stellt dieser Aspekt der Erfindung ein Polynucleotid bereit, das für ein Polypeptid codiert, das (II) trans-Feruloyl-SCoA-Hydrataseaktivität, (III) HMPHP-SCoA-Spaltungsaktivität oder (IV) Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktaseaktivität aufweist; oder ein Polypeptid codiert, das mehr als eine dieser Aktivitäten aufweist. Vorzugsweise ist das Polynucleotid von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 abgeleitet. Ein bevorzugtes Polynucleotid umfasst die gesamte oder mindestens einen Teil der *Ps. fluorescens*-DNA, die in dem Cosmidklon pFI 793, der nach dem Budapest Treaty bei National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited, AURIS Business Centre, 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Schottland, unter der Hinterlegungsnummer NCIMB 40777 hinterlegt ist, enthalten ist, oder ein Fragment oder eine Variante derselben.

**[0086]** Die Isolierung des Cosmidklons pFI 793 ist in Beispiel 5 beschrieben; pFI 793 umfasst DNA, die für Polypeptide codiert, die die Enzymaktivitäten II, III und IV besitzen. Der Cosmidklon pFI 793 selbst, die in der *Ps. fluorescens*-DNA derselben enthaltenen Gene und Varianten derselben bilden getrennte Aspekte der Erfindung.

**[0087]** Eine Variante eines Polynucleotids umfasst jede Insertion, Deletion oder Substitution der Sequenz, die für ein Fragment oder eine Variante eines Polypeptids gemäß der obigen Definition codiert.

**[0088]** Beispielsweise können positionsspezifische Mutagenese oder andere Techniken zur Erzeugung einfacher oder mehrfacher Mutationen, beispielsweise Austauschänderungen, Insertionen, Deletionen und Trans-

positionen gemäß der Beschreibung in Botstein und Shortle, Strategies and Applications of In Vitro Mutagenesis, Science, 229: 193-210 (1985) verwendet werden. Da derartige modifizierte Polynucleotide durch die Anwendung bekannter Verfahren auf die hier enthaltenen Lehren erhalten werden können, liegen derartige modifizierte Polynucleotide innerhalb des Schutzmfangs der beanspruchten Erfindung.

**[0089]** Ferner ist einem Fachmann klar, dass die Polynucleotidsequenz (oder Fragmente derselben) gemäß der Erfindung zur Gewinnung anderer DNA-Sequenzen, die mit derselben unter hochstringenten Bedingungen hybridisieren, verwendet werden kann. Eine derartige DNA umfasst jede genomische DNA.

**[0090]** Daher umfasst das Polynucleotid der Erfindung DNA, die mindestens 55 %, zweckmäßigerweise 60 % und vorzugsweise 70 % Homologie mit den in der Erfindung identifizierten Polynucleotidsequenzen zeigt, vorausgesetzt, derartige homologe DNA codiert für ein Protein, das bei den hier beschriebenen Verfahren verwendbar ist.

**[0091]** Eine DNA-DNA-, DNA-RNA- und RNA-RNA-Hybridisierung kann in wässriger Lösung, die zwischen 0,1XSSC und 6XSSC enthält, und bei Temperaturen zwischen 55 °C und 70 °C durchgeführt werden. Es ist einschlägig bekannt, dass die Hybridisierungsbedingungen um so stringenter sind, je höher die Temperatur oder je niedriger die SSC-Konzentration ist. Hohe Stringenz bedeutet hierbei 2XSSC und 65 °C. 1XSSC ist 0,15 M NaCl/0,015 M Natriumcitrat.

**[0092]** "Varianten" des Polynucleotids umfassen Polynucleotide, in denen relativ kurze Strecken (beispielsweise 20 bis 50 Nucleotide) einen hohen Grad an Homologie (mindestens 50 % und vorzugsweise mindestens 90 oder 95 %) mit äquivalenten Strecken des Polynucleotids gemäß der Erfindung besitzen, auch wenn die Gesamthomologie zwischen den zwei Polynucleotiden viel geringer sein kann. Der Grund hierfür liegt darin, dass wichtige aktive oder Bindungsstellen gleich sein können, auch wenn die allgemeine Architektur des Proteins unterschiedlich ist.

**[0093]** Ein besonders bevorzugtes Polynucleotid umfasst die Nucleotidsequenz

```

ATGAGCACATACGAAGGTCGCTGGAAAACGGTCAAGGTCGAAATCGAAGACGGCATCGCG
TTTGTATCCTCAATGCCCGGAAAAACGCAACGCGATGAGCCCACCTGAACCGCGAG
ATGATCGATGTTCTGGAAACCTCGAGCAGGACCTGCCGCCGGTGTGGTGTGACC
GGTGCAGGGCGAAGCCTGGACCGCAGGCATGGACCTCAAGGAATACTTCCCGAAGTGGAC
GCCGGCCCGGAAATCCAGGAAAAAATCCGCCGCGAAGCCTCGCAATGGCAATGGAAA
CTGCTCGCATGTACGCCAAGCCGACCATGCCATGGTCAATGGCTGGTCTCGCGGC
GGTTTCAGCCCGCTGGTGGCTCGCACCTGGGATCTGCCGCCACGAAGCAACCTTCGGT
CTCTCGGAAATCAACTGGGTATCCCGCCGGCAACCTGGTGAGCAAGGCCATGCCGAC
ACCGTGGGCCACCGCCAGTCGCTCTACTACATCATGACCGGCAAGACCTTCGGTGGCAG
AAAGCCGCCGAGATGGGCTGGTCAACGAAAGCGTCCCCCTGGCGCAACTCGCGAAGTC
ACCATCGAGCTGGCGCGTAACCTGCTCGAAAAAAACCGGTGGTGCTCGTGCCTGCCAAA
CACGGTTCAAACGCTGCCGAACTGACCTGGGAGCAGAACGAGGATTACCTGTACGCC
AAGCTCGATCAGTCGCGTTGCTGGACACCGAAGCGGTGCGAGCAGGGCATGAAGCAATTCC
TCGACGACAAGAGCATCAAGCCTGGCTGCAAGCGTATAAACGC (SEQ ID No: 1)

```

(wie in **Fig. 12**, Nucleotide 2872 bis 5249 angegeben) oder ein Fragment oder eine Variante derselben.

**[0094]** Dieses Polynucleotid codiert für HMPHP-SCoA-Spaltungsenzymaktivität und trans-Feruloyl-SCoA-Hydrataseaktivität von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 und codiert für das bevorzugte Poly-

peptid des fünften und sechsten Aspekts der Erfindung.

**[0095]** Ein weiteres besonders bevorzugtes Polynucleotid umfasst die Nucleotidsequenz

ATGCTGGACGTGCCCTGCTGATTGGCGGCCAGTCGTGCCCGCGCGACGGTCGAACC  
 TTCGAGCGCCGCAACCCGGTGACTGGCGAGTTGGTGTGCCGGTTGCCGCCACCTG  
 GAAGATGCCGACGCCCGTGGCCGCTGCCAGCAAGCGTTCCCGGTGGGCCGCGCTG  
 GCGCCAATGAACGGCGCAGCCGTTGCTCAAGGCCCGAACAAATGCAGGCCGCGAGC  
 GCGAGTTCATCGAGGCCGGCGAGACCGCGCCATGCCAATGGTACGGTTCAAC  
 GTACGGCTGGCGCCAACATGCTGCGTGAAGCGGCATCGATGACCACCCAGGTCAATGGT  
 GAAGTGATTCCCTCGGACGTTCCCGCAGTTGCCATGCCCTGCCAGCCCTGTGGC  
 GTGGTGCTGGCATGCCCTGGAACGCCCGGTGATTCTGCCACCCGGCGATTGCC  
 ATGCCGCTGGCCTGTGGCAACACCGTGGTGTGAAGGCTTCCGACGCTGAGTCGGCGGTG  
 CATCGCTTGATGCCAGGTGCTGCCAGGCCGGCTGGCGATGGCGTGGTCAACGTC  
 ATCAGTAATGCCCGGGATGCCACAGATTGTCAGGCCCTGATTGCCAACCCGGCC  
 GTACGCCGGTCAATTCAACCGGTTGACCCACGTCGGCGCATGTCGGCGAGCTCTCG  
 GCGGCCACCTCAAACCGCGTTGCTCGAGCTGGCGCAAGGCACCGTTGCTGGTCTC  
 GACGATGCCGACCTGGAGGCTGCCGTGCAGGCCGGCGTTGGCGCTACTTCAACCA  
 GGACAGATCTGTATGCCACCGAGGCCCTGATTGTCATGCCAAGGTGGCCAGGCC  
 GTGCCAGTTGGCGCCAAGGTCGAGACCCCTGCCGCCGGTGTCTGCCACCCGGAG  
 TCGGTGCTCGGTTGCTGGTGGACGCCAGCGCTGGCACCGGATCAAAGCGTTGATCGAT  
 GATGCCGTGCCAAGGGCGCGCCCTGGTAATGCCGGCAACTGGAGGGCAGCATCTG  
 CAGCCGACCTGCTCGACGGTGTGACGCCAGCATGCCCTGTTGACCGGAAGAGTCCTTC  
 GCCCGGGTGGCGGTGGTGTGCCGCCAGGGCGAAGAAGCGCTGTTGCAACTGCCAAC  
 GACTCCGAGTTGGTTGTCGGCGGCAAGTCCAGCGCTACGGCAGTGGCGGCAAGGCA  
 CTGGCCCAGCGGGTCAATGCCACATCAACGCCCGACCGTGCACGACGAA  
 GCGCAAATGCCCTTGCGGGTCAAGTCCAGCGCTACGGCAGTGGCGGCAAGGCA  
 TCGATTGAGCATTCACTCAGTTGCGCTGGTCACCCCTCAGAATGGTCCACGGCACTAT

CCGATC

(SEQ ID No: 3) (wie in **Fig. 12**, Nucleotide 3804 bis 5249 angegeben) oder ein Fragment oder eine Variante derselben. Dieses Polynucleotid codiert für die Polypeptidsequenz des sechsten Aspekts der Erfindung. Es ist besonders günstig, das ganze Gen aus dem Cosmidklon pFI 793, der unter dem Budapest Treaty bei NCIMB unter der Hinterlegungsnummer NCIMB 40777 hinterlegt ist, zu isolieren.

**[0096]** Die Polynucleotide der Erfindung werden alle ohne weiteres aus pFI 793 durch Sondierung mit den gegebenen Sequenzen oder Teilen derselben oder durch andere einschlägig bekannte Verfahren isoliert, und

die Nucleotidsequenzen können unter Bezugnahme auf das hinterlegte Cosmid (pFI 793) bestätigt werden.

**[0097]** Es ist klar, dass Fragmente und Varianten der Polynucleotide gemäß der Erfindung ohne weiteres durch einen Fachmann unter Verwendung von standardmäßigen molekularbiologischen Verfahren beispielsweise gemäß der Beschreibung in Sambrook et al. "Molecular Cloning, a laboratory manual", (1989) (2. Auflage), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, hergestellt werden können. Das ganze Gen und Varianten und Fragmente desselben werden in diesem Aspekt der Erfindung speziell umfasst.

**[0098]** Vorzugsweise ist das Polynucleotid, üblicherweise die DNA, an ein Nukleinsäurevektor gebunden.

**[0099]** DNA-Konstrukte gemäß der Erfindung können aus der Wirtszelle unter Verwendung von bekannten Verfahren gereinigt werden.

**[0100]** Beispielsweise kann Plasmidvektor-DNA in großem Maßstab aus gespaltenen Lysaten durch Bandenbildung in einem CsCl-Gradienten gemäß den Verfahren von Clewell & Helinski (1970) Biochemistry 9, 4428-4440 und Clewell (1972) J. Bacteriol. 110, 667-676 hergestellt werden. Auf diese Weise extrahierte Plasmid-DNA kann durch Dialyse gegen einen sterilen apyrogenen Puffer durch Visking-Leitungen oder durch Größenausschlusschromatographie von CsCl befreit werden.

**[0101]** Alternativ kann Plasmid-DNA aus gespaltenen Lysaten unter Verwendung von Ionenaustauschchromatographie, beispielsweise von Qiagen (Chatsworth, CA, USA) geliefert, gereinigt werden. Hydroxyapatit-Säulenchromatographie kann ebenfalls verwendet werden.

**[0102]** Die DNA wird dann in einem geeigneten Wirt unter Bildung eines Polypeptids gemäß der Erfindung exprimiert. Auf diese Weis kann eine DNA mit Codierung für ein Polypeptid der Erfindung gemäß bekannten Verfahren, die im Hinblick auf die hier enthaltenen Lehren entsprechend modifiziert wurden, zur Konstruktion eines Expressionsvektors verwendet werden, der dann zur Transformation einer geeigneten Wirtszelle zur Expression und Produktion des Polypeptids gemäß der Erfindung verwendet wird. Derartige Techniken umfassen die Techniken gemäß der Offenbarung in US-Patent Nr. 4 440 859, erteilt am 3. April 1984 an Rutter et al., 4 530 901, erteilt am 23. Juli 1985 an Weissman, 4 582 800, erteilt am 15. April 1986 an Crowl, 4 677 063, erteilt am 30. Juni 1987 an Mark et al., 4 678 751, erteilt am 7. Juli 1987 an Goeddel, 4 704 362, erteilt am 3. November 1987 an Itakura et al., 4 710 463, erteilt am 1. Dezember 1987 an Murray, 4 757 006, erteilt am 12. Juli 1988 an Toole., Jr. et al., 4 766 075, erteilt am 23. August 1988 an Goeddel et al. und 4 810 648, erteilt am 7. März 1989 an Stalker.

**[0103]** Die DNA mit Codierung für das Polypeptid, das die Verbindung gemäß der Erfindung bildet, kann an eine breite Vielzahl anderer DNA-Sequenzen zur Einführung in einen geeigneten Wirt gebunden werden. Die Begleit-DNA hängt von der Art des Wirts, der Art und Weise der Einführung der DNA in den Wirt und davon, ob das Beibehalten des episomalen Zustands oder eine Integration gewünscht wird, ab.

**[0104]** Im Allgemeinen wird die DNA in einen Expressionsvektor, beispielsweise ein Plasmid, in passender Orientierung und im korrekten Leseraster zur Expression insertiert. Falls nötig, kann die DNA an die entsprechende, die Transkription und Translation regulierenden Kontrollnucleotidsequenzen, die von dem gewünschten Wirt erkannt werden, gebunden werden, obwohl derartige Kontrollen allgemein im Expressionsvektor verfügbar sind. Der Vektor wird dann durch Standardverfahren in den Wirt eingeführt. Im Allgemeinen werden nicht alle Wirte durch den Vektor transformiert. Daher ist es nötig, eine Selektion auf transformierte Wirtszellen durchzuführen. Eine Selektionstechnik umfasst das Einarbeiten einer DNA-Sequenz mit etwaigen notwendigen Kontrollelementen in den Expressionsvektor, die für ein selektierbares Merkmal in der transformierten Zelle, beispielsweise Antibiotikaresistenz, codiert. Alternativ kann das Gen für ein derartiges selektierbares Merkmal auf einem anderen Vektor sein, der zur gleichzeitigen Transformation der gewünschten Wirtszelle verwendet wird.

**[0105]** Wirtszellen, die durch rekombinante DNA der Erfindung transformiert wurden, können dann über einen ausreichenden Zeitraum und unter geeigneten Bedingungen, die einem Fachmann im Hinblick auf die hier offenbarten Lehren bekannt sind, kultiviert werden, um die Expression des Polypeptids zu ermöglichen, das, falls gewünscht, dann gewonnen werden kann.

**[0106]** Viele Expressionssysteme sind bekannt, die Bakterien (beispielsweise Escherichia coli und Bacillus subtilis), Hefen (beispielsweise Saccharomyces cerevisiae), Fadenpilze (beispielsweise Apergillus), Pflanzenzellen und ganze Pflanzen, Tierzellen und Insektenzellen umfassen.

**[0107]** Die Vektoren umfassen ein prokaryotisches Replikon, beispielsweise das ColEl ori zur Fortpflanzung in einem Prokaryoten, auch wenn der Vektor zur Expression in anderen, nicht-prokaryotischen Zellarten verwendet werden soll. Die Vektoren können auch einen geeigneten Promotor, beispielsweise einen prokaryotischen Promotor, der die Expression (Transkription und Translation) der Gene in einer Bakterienwirtszelle, beispielsweise *E. coli*, die damit transformiert ist, dirigieren kann, umfassen.

**[0108]** Mehrere Promotoren sind für die direkte Transkription von Bakterien- und anderen heterologen Genen in Pflanzen verfügbar. Insbesondere umfassen diese den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV 35S), den Ribulose Bisphosphat Carboxylase Small Subunit Promotor und die Agrobacterium-T-DNA-Octopine-Synthase- und -Manopine-Synthase-Promotoren. Diese Promotoren wurden in weitem Umfang beispielsweise in Verbindung mit Herbizidresistenz verleihenden Bakteriengenen verwendet (siehe D. M. Stalker, ibid., S. 82-104). Diese Promotoren verleihen keine Spezifität der Genexpression auf Organ-, Gewebe- oder Organellenebene oder eine Ansprechbarkeit der Genexpression auf Umgebungseinflüsse, wie Licht.

**[0109]** Ein Promotor ist ein durch eine DNA-Sequenz gebildetes Expressionskontrollelement, das die Bindung von RNA-Polymerase und das Erfolgen der Transkription ermöglicht. Mit exemplarischen Bakterienwirten kompatible Promotorsequenzen werden typischerweise in Plasmidvektoren bereitgestellt, die zur Insertion eines DNA-Segments der vorliegenden Erfindung geeignete Restriktionsstellen enthalten.

**[0110]** Typische prokaryotische Vektorplasmide sind pUC18, pUC19, pBR322 und pBR329, die bei Biorad Laboratories (Richmond, CA, USA) erhältlich sind, und pTrc99A und pKK223-3, die bei Pharmacia, Piscataway, NJ, USA erhältlich sind.

**[0111]** Ein typisches Säugetiervektorplasmid ist pSVL, erhältlich bei Pharmacia, Piscataway, NJ, USA. Dieser Vektor verwendet den SV40-late-Promotor zum Treiben der Expression klonierter Gene, wobei der höchste Expressionsgrad in T-Antigen produzierenden Zellen, wie COS-1-Zellen, gefunden wird.

**[0112]** Ein Beispiel für einen induzierbaren Säugetierexpressionsvektor ist pMSG, der auch bei Pharmacia erhältlich ist. Dieser Vektor verwendet den Glucocorticoid-induzierbaren Promotor des Long-Terminal-Repeat des Maus-Mammakarzinomvirus zum Treiben der Expression des klonierten Gens.

**[0113]** Verwendbare Hefeplasmidvektoren sind pRS403-406 und pRS413-416 und diese sind allgemein bei Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA erhältlich. Die Plasmide pRS403, pRS404, pRS405 und pRS406 sind Yeast Integrating Plasmide (YIps) und sie bauen die Hefe-selektierbaren-Marker HIS3, TRP1, LEU2 und URA3 ein. Die Plasmide pRS413-416 sind Yeast Centromere Plasmide (YCps).

**[0114]** Eine Vielzahl von Verfahren wurde entwickelt, um DNA durchführbar mit Vektoren über komplementäre kohäsive Enden zu verknüpfen. Beispielsweise können komplementäre Homopolymerstrecken an das DNA-Segment zur Insertion in die Vektor-DNA angefügt werden. Der Vektor und das DNA-Segment werden dann durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen den komplementären Homopolymerenenden unter Bildung rekombinanter DNA-Moleküle verbunden.

**[0115]** Synthetische Linker, die eine oder mehrere Restriktionsstellen enthalten, ergeben ein alternatives Verfahren der Bindung des DNA-Segments an Vektoren. Das DNA-Segment, das durch Endonukleaserestriktionsverdauung gemäß einer früheren Beschreibung erzeugt wurde, wird mit Bakteriophagen-T4-DNA-Polymerase oder *E. coli* DNA-Polymerase I, Enzymen, die vorstehende 3'-einzelsträngige Enden mit deren 3'-5'-exonukleolytischen Aktivitäten entfernen und zurückgesetzte 3'-Enden mit ihren polymerisierenden Aktivitäten auffüllen, behandelt.

**[0116]** Die Kombination dieser Aktivitäten erzeugt daher glattendige DNA-Segmente. Die glattendigen Segmente werden dann mit einem großen molaren Überschuss von Linkermolekülen in Gegenwart eines Enzyms, das die Ligation von glattendigen DNA-Molekülen katalysieren kann, beispielsweise Bacteriophage-T4-DNA-Ligase, inkubiert. Auf diese Weise sind die Reaktionsprodukte DNA-Segmente, die an deren Enden polymere Linker-Sequenzen tragen. Diese DNA-Segmente werden dann mit dem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und an einen Expressionsvektor, der mit einem Enzym gespalten wurde, der mit denen des DNA-Segments kompatible Enden erzeugt, ligiert.

**[0117]** Synthetische Linker, die eine Vielzahl von Restriktionsendonukleasestellen enthalten, sind im Handel bei einer Zahl von Quellen, die International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, USA umfassen, erhältlich.

**[0118]** Ein günstiger Weg zur Modifizierung der DNA mit Codierung für das Polypeptid der Erfindung ist die Verwendung der Polymerasekettenreaktion gemäß der Offenbarung bei Saiki et al. (1988) Science 239, 487-491.

**[0119]** Bei diesem Verfahren wird die enzymatisch zu amplifizierende DNA von zwei spezifischen Oligonucleotidprimern flankiert, die selbst in die amplifizierte DNA eingebaut werden. Diese spezifischen Primer können Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen enthalten, die zur Klonierung in Expressionsvektoren unter Verwendung von einschlägig bekannten Verfahren verwendet werden können.

**[0120]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Wirtszelle, die mit einem Polynucleotidvektorkonstrukt der vorliegenden Erfindung transformiert ist. Die Wirtszelle kann entweder prokaryotisch oder eukaryotisch sein und sie kann aus einem vielzelligen Organismus, wie einer Pflanze, bestehen. Bakterienzellen sind bevorzugte prokaryotische Wirtszellen und typischerweise ein Stamm von *E. coli*, beispielsweise die *E. coli*-Stämme DH5, erhältlich bei Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA, und RR1 erhältlich bei der American Type Culture Collection (ATCC) von Rockville, MD, USA (Nr. ATCC 31343). Bevorzugte eukaryotische Wirtszellen umfassen Hefe- und Pflanzenzellen. Hefewirtszellen umfassen YPH499, YPH500 und YPH501, die allgemein bei Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA erhältlich sind. Bevorzugte Pflanzenwirtszellen und Pflanzen umfassen die von *Nicotiana* spp., *Solanum tuberosum* (Kartoffel), *Brassica* spp. (beispielsweise Rübsamenöl), *Beta* spp. (beispielsweise Zuckerrübe, Blattrübe und Dunkelrübe), *Capsicum* spp. und *Vanilla* spp.

**[0121]** Die Transformation geeigneter Zellwirte mit einem DNA-Konstrukt der vorliegenden Erfindung wird durch bekannte Verfahren, die typischerweise von der Art des verwendeten Vektors abhängen, erreicht. Im Hinblick auf die Transformation von prokaryotischen Wirtszellen siehe beispielsweise Cohen et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 und Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. Die Transformation von Hefezellen wird bei Sherman et al. (1986) Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY beschrieben. Das Verfahren von Beggs (1978) Nature 275, 104-109 ist ebenfalls verwendbar. Im Hinblick auf Pflanzenzellen und ganze Pflanzen werden drei Pflanzentransformationsansätze typischerweise verwendet (J. Draper und R. Scott in D. Grierson (Hrsg.) "Plant Genetic Engineering", Blackie, Glasgow und London, 1991, Band 1, S. 38-81):

- i) eine Agrobacterium-vermittelte Transformation unter Verwendung des Ti-Plasmids von *A. tumefaciens* und des Ri-Plasmids von *A. rhizogenes* (P. Armitage, R. Walden und J. Draper in J. Draper, R. Scott, P. Armitage und R. Walden (Hrsg.), "Plant Genetic Transformation and Expression – A Laboratory Manual". Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988, S. 1-67; R. J. Draper, R. Scott und J. Hamill, ibid., S. 69-160);
- ii) ein DNA-vermittelter Gentransfer durch Polyethylenglykol-stimulierte DNA-Aufnahme in Protoplasten durch Elektroporation oder Mikroinjektion von Protoplasten oder Pflanzenzellen (J. Draper, R. Scott, A. Kumar und G. Dury, ibid., S. 161-198);
- iii) eine Transformation unter Verwendung von Teilchenbeschuss (D. McCabe und P. Christou, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 3, 227-236 (1993); P. Christou, Plant J., 3, 275-281 (1992)).

**[0122]** Eine Agrobacterium-vermittelte Transformation ist für monokotyle Pflanzen (beispielsweise *Vanilla*) im Allgemeinen ineffektiv, für die daher die Ansätze ii) und iii) bevorzugt sind. Bei allen Ansätzen ist ein geeigneter Selektionsmarker, beispielsweise Kanamycin- oder Herbizid-Resistenz, oder alternativ ein Screening zugängliches Marker("Reporter")gen, beispielsweise  $\beta$ -Glucuronidase oder Luciferase, günstig (siehe J. Draper und R. Scott in D. Grierson (Hrsg.), "Plant Genetic Engineering", Blackie, Glasgow und London, 1991, Band 1, S. 38-81).

**[0123]** Elektroporation ist ebenfalls zur Transformation von Zellen günstig und auf dem Gebiet zur Transformation von Hefezellen, Bakterienzellen und Pflanzenzellen bekannt.

**[0124]** Beispielsweise können Bakterienarten durch die Verfahren gemäß der Beschreibung bei Luchansky et al. (1988) Mol. Microbiol. 2, 637-646, transformiert werden. Die größte Zahl der Transformanten wird konsistent nach einer Elektroporation des DNA-Zellgemischs, suspendiert in 2,5X PEB unter Verwendung von 6250 V pro cm mit 25  $\mu$ FD konsistent gewonnen.

**[0125]** Verfahren zur Transformation von Hefe durch Elektroporation sind in Becker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182 offenbart.

**[0126]** Erfolgreich transformierte Zellen, d. h. Zellen, die ein DNA-Konstrukt der vorliegenden Erfindung enthalten, können durch bekannte Verfahren identifiziert werden. Beispielsweise können aufgrund der Einführung eines Expressionskonstrukts der vorliegenden Erfindung erhaltene Zellen gezüchtet werden, wobei das Polypeptid der Erfindung erhalten wird. Die Zellen können geerntet und lysiert werden und ihr DNA-Gehalt kann auf das Vorhandensein der DNA unter Verwendung eines Verfahrens, beispielsweise gemäß der Beschreibung von Southern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503, oder Berent et al. (1985) Biotech. 3, 208, geprüft werden. Alternativ kann das Vorhandensein des Proteins im Überstand unter Verwendung von Antikörpern wie im Folgenden beschrieben nachgewiesen werden.

**[0127]** Zusätzlich zum direkten Testen auf das Vorhandensein von rekombinanter DNA kann eine erfolgreiche Transformation durch bekannte immunologische Verfahren festgestellt werden, wenn die rekombinante DNA zum Lenken der Expression des Proteins fähig ist. Beispielsweise produzieren erfolgreich mit einem Expressionsvektor transformierte Zellen Proteine, die eine entsprechende Antigenität zeigen. Proben von Zellen, von denen vermutet wurde, dass sie transformiert sind, werden geerntet und unter Verwendung geeigneter Antikörper auf das Protein getestet.

**[0128]** Daher betrachtet die vorliegende Erfindung zusätzlich zu den transformierten Wirtszellen selbst auch eine Kultur dieser Zellen, vorzugsweise eine monoklonale (klonal homogene) Kultur, oder eine von einer monoklonalen Kultur abgeleitete Kultur in einem Nährmedium; und auch im Falle von Pflanzenzellen eine von derartigen Zellen abgeleitete und derartige Zellen enthaltende Pflanze.

**[0129]** Besonders bevorzugt umfasst die Wirtszelle eine Nucleinsäure, die für ein Polypeptid oder eine Kombination mit einem Polypeptid, das in Gegenwart geeigneter Cofaktoren, falls diese notwendig sind, die Umwandlung zwischen trans-Feruloyl-SCoR und 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxypropionyl-SCoR (HM-PHP-SCoR) katalysieren kann, oder ein Polypeptid, das in Gegenwart geeigneter Cofaktoren, falls diese notwendig sind, die Umwandlung zwischen 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxypropionyl-SCoR (HM-PHP-SCoR) und Vanillin katalysieren kann, kodiert.

**[0130]** Es ist klar, dass die Wirtszellen der Erfindung oder ein Extrakt derselben zur Verwendung bei den Verfahren der Erfindung besonders geeignet sind. Besonders bevorzugt enthält die Wirtszelle keine Mittel zur Umwandlung von Vanillin in ein Nicht-Vanillin-Produkt.

**[0131]** Am stärksten bevorzugt ist die Wirtszelle einer Pflanzenzelle oder sie besteht aus einer ganzen Pflanze oder einer Bakterienzelle oder einer Wirtszelle. Bevorzugte Bakterienwirte umfassen Milchsäurebakterien, wie Lactococcus spp. und Lactobacillus spp. Bevorzugte Hefewirte umfassen *Saccharomyces cerevisiae* und dessen Biovaritäten. Besonders bevorzugt ist die Wirtszelle eine Wirtszelle von Lebensmittelqualität (beispielsweise ein Mikroorganismus, der in der Nahrungsmittel- oder Getränkeindustrie verwendet wird oder verwendet werden kann). Vorzugsweise ist ferner die Pflanze eine essbare Pflanze.

**[0132]** Es ist klar, dass einige Wirtszellen oder Wirtsorganismen bereits Enzymaktivitäten I, II, III oder IV enthalten können, und in diesem Fall kann es ausreichend sein, um die Wirtszellen bei den Verfahren der Erfindung verwenden zu können, in die Wirtszelle oder den Wirtsorganismus ein oder mehrere Polynucleotide einzuführen, die Enzymaktivitäten II, III oder IV codieren, die diejenigen Enzymaktivitäten codieren, die in der Wirtszelle oder den Wirtsorganismen fehlen.

**[0133]** Im Falle von Pflanzen zur Verwendung bei den Verfahren der Erfindung wird die relevante Genexpression vorzugsweise auf Zielorgane, -gewebe und subzelluläre Organellen gerichtet, in denen trans-Feruloyl-SCoA oder andere geeignete Substrate (beispielsweise 4-trans-Cumaroyl-SCoA oder trans-Coffeoyl-SCoA) für die durch die übertragenen Gene codierten Enzyme am leichtesten zur Verfügung stehen. Das Stadium, in dem eine Thioveresterung mit CoASH in Pflanzen erfolgt, ist in der Relation zur fortschreitenden Substitution des Phenylrings, die während der Umwandlung von trans-Cinnamat in trans-Ferulat stattfindet, unklar und sie kann variabel sein (siehe R. Whetten und R. Sederoff, The Plant Cell, 7, 1001-1013 (1995)). Die subzelluläre Lokalisation oder Verteilung dieser Zwischenprodukte während des Phenylpropanoid-Metabolismus der Pflanze bleibt ebenfalls unklar; wahrscheinlich sind sie im Cytosol vorhanden, oder es erfolgt eine funktionale Organisation der Enzyme, die diese metabolisieren. Das Konzept des Metabolisierungsclusters oder "Metabolon", in der ein Grad einer metabolischen Kanalisierung besteht und eine freie Ausbreitung beschränkt ist, wurde vorgeschlagen und diskutiert (siehe R. A. Dixon und N. L. Paiva, The Plant Cell, 7, 1085-1097 (1995) und aaO.).

**[0134]** trans-Ferulat, 4-trans-Cumarat und trans-Coffeate sind normale Metabolisierungzwischenprodukte.

Daher muss es nicht erforderlich sein, Wirtszellen zu manipulieren, um trans-Feruloyl-SCoA bereitzustellen. Ihre Konzentrationen sollten in variierenden Graden durch physiologische Forderungen nach einem breiten Bereich von Endprodukten des Phenylpropanoid-Pfades, die beispielsweise Lignin, Cumarine und Flavonoide umfassen, beeinflusst werden. Es bestehen gewisse Anzeichen, dass die Aktivität des ersten Enzyms des Phenylpropanoid-Pfades, Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL: EC 4.3.1.5) die Ansammlung von Endprodukten des Pfades beeinflussen kann (N. Bate, J. Orr, W. Ni, A. Meromi, T. Nadler-Hassar, P. W. Doerner, R. A. Dixon, C. J. Lamb und Y. Elkind, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7608-7612 (1994)), weshalb es unter bestimmten Umständen möglich ist, die Metabolisierungswirkungen der Expression der Gene für die Enzymaktivitäten II und III durch Erhöhen der Expression von PAL zu verstärken.

**[0135]** Es ist bekannt, dass die Genexpression im Phenylpropanoid-Pfad auf einen Bereich von Umwelt- und Stressfaktoren, die eine Verwundung, chemische Reize pathogener Herkunft und UV-Licht umfassen, reagiert. Die diese Reaktionen regelnden Mechanismen sind nicht sehr klar, obwohl mehrere Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden (siehe R. A.

**[0136]** Dixon und N. L. Paiva, The Plant Cell, 7, 1085-1097 (1995)). Siehe bieten jedoch, insbesondere wenn sie vollständiger charakterisiert werden, Möglichkeiten zur vorhersagbaren und induzierbaren Kontrolle der Genexpression, insbesondere zur Erhöhung der Bereitstellung eines Substrats, oder werden diese bieten.

**[0137]** Daher stellt ein weiterer Aspekt der Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die ein Polynucleotid gemäß dem vierten oder fünften Aspekt der Erfindung umfasst. Mit anderen Worten wird die transgene Pflanze gentechnisch so verändert, dass sie eine oder mehrere der Enzymaktivitäten II oder III codiert und vorzugsweise exprimiert. Besonders bevorzugt kann die Pflanze nach der gentechnischen Veränderung Vanillin aus trans-Feruloyl-SCoA herstellen. Es ist klar, dass es in Abhängigkeit von den in der Wirtszelle vorhandenen Enzymen notwendig sein kann, nur ein Gen mit Codierung für eine einzige der Enzymaktivitäten bereitzustellen, oder es notwendig sein kann, ein Gen oder Gene von beliebigen zwei der Enzymaktivitäten bereitzustellen.

**[0138]** Üblicherweise wird die transgene Pflanze gentechnisch so verändert, dass sie die Enzymaktivitäten II und III codiert und vorzugsweise exprimiert. Es ist ohne weiteres klar, dass die transgenen Pflanzen dieses Aspekts der Erfindung bei den Verfahren zur Herstellung von Vanillin gemäß der Erfindung verwendet werden können, insbesondere wenn die Pflanze die Enzymaktivität bereitstellt, die trans-Ferulasäure oder ein Salz derselben in trans-Feruloyl-SCoA umwandelt.

**[0139]** Vorzugsweise ist die Pflanze eine Pflanze, die ohne weiteres transformiert wird. Vorzugsweise ist die Pflanze eine Pflanze, die häufig in der Landwirtschaft oder im Gartenbau verwendet wird, und stärker bevorzugt ist die Pflanze eine essbare Pflanze. Vorteilhafterweise ist die Pflanze eine Pflanze, in der die Einführung von Vanillingeschmack oder -aroma gewünscht wird.

**[0140]** Bevorzugte Pflanzen umfassen die aus Nicotiana spp., Solanum tuberosum, Brassica spp., Capsicum spp., Beta spp. und Vanilla spp. ausgewählten.

**[0141]** Wie detaillierter im Folgenden beschrieben, kann die Pflanze gegessen oder zu einem Nahrungsmittel oder Getränk verarbeitet werden. Daher wird die transgene Pflanze günstigerweise so verarbeitet oder hergestellt, dass sie nicht reproduziert oder kultiviert werden kann, beispielsweise wird die transgene Pflanze aus der Umgebung, in der sie gezüchtet wurde, abgeerntet.

**[0142]** Wenn Vanillin (oder die gewünschten Produkte, wie p-Hydroxybenzaldehyd) in einer Wirtszelle oder einem Organismus gemäß der Erfindung produziert wird, wenn es insbesondere in einer transgenen Pflanze gemäß der Erfindung produziert wird, kann das Vanillin oder gewünschte Produkt zunächst in der Form eines Glycosids, insbesondere eines  $\beta$ -D-Glycosids, oder im Falle einer Carbonsäure als Ester von  $\beta$ -D-Glucose (wie dies bei Vanilleschoten auftritt) vorhanden sein. In diesem Fall ist es günstig, das Vanillin (und gewünschte Produkt) in dessen nicht-kombinierte Form, beispielsweise durch säure- oder basekatalysierte Hydrolyse oder durch die Verwendung von Glycosiden, wie  $\beta$ -D-Glucosidase (Emulsin; S. Hestrin, D. S. Feingold und M. Schramm, Meth. Enzymol. I, 231-257 (1955); siehe auch D. Chassagne, C. Bayonore, J. Crouzet und K. Baumé in "Bioflavour 95", Hrsg. P. Étiévant und P. Schreier, INRA, Paris, 5. 217-222 (1995)), freizusetzen.

**[0143]** Im Hinblick auf die Verwendung eines Mikroorganismus wie Ps. fluorescens biovar. V, Stamm AN103 oder eines Mikroorganismus, der genetisch so modifiziert wurde, dass er die Enzymaktivitäten II und III (oder mindestens diejenigen dieser Aktivitäten, die er normalerweise nicht aufweist) enthält, wird der Mikroorganismus vorzugsweise mit trans-Feruloyl-SCoA oder einem Mittel zur Bereitstellung des CoA-Thioesters aus

trans-Ferulasäure oder einem Salz derselben zumindest in dessen Kulturmedium versorgt.

**[0144]** Daher ist aus der gesamten vorhergehenden Beschreibung ersichtlich, dass die Erfindung biochemische und Fermentationsprozesse zur Herstellung von Vanillin und Vanillinsäure, rekombinante oder transgene Pflanzen und die Verwendung der Pflanzen bei einem Verfahren zur Herstellung von Vanillin oder Vanillinsäure umfasst.

**[0145]** Typischerweise ergibt der Stamm *Pseudomonas* (beispielsweise *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103) in einem biochemischen Verfahren ein Enzymsystem zur Biotransformation von Pflanzen stammender trans-Ferulasäure in Vanillin und/oder verwandte Verbindungen. Enzymzubereitungen, ganze Zellen von *Pseudomonas* oder einem heterologen Wirtsorganismus, der entsprechende *Pseudomonas*-Gene exprimiert, können hierfür verwendet werden. Eine Vielzahl von Mutanten von *Pseudomonas* und verschiedene zusätzliche Enzymzubereitungen, Cofaktoren oder Cofaktorwiederaufbereitungssysteme können verwendet werden. Die *Pseudomonas*-Enzyme können in einem heterologen Wirt überexprimiert werden, bevor sie extrahiert und in einer Biotransformation verwendet werden.

**[0146]** Alternativ, jedoch in günstiger Weise kann eine Form eines Fermentationsprozesses verwendet werden, die den *Pseudomonas*-Stamm oder eine entsprechende abgeleitete Mutante oder einen heterologen Wirtsorganismus, in dem die Gene zur Biotransformation exprimiert werden, umfasst. Der gewählte Mikroorganismus wird typischerweise auf einem ferulatreichen Substrat oder einem trans-Feruloyl-SCoA umfassenden Substrat gezüchtet. Dies könnte ein Vanillinproduktionsverfahren bilden.

**[0147]** Ferner umfasst die Erfindung rekombinante Mikroorganismen (beispielsweise Milchsäurebakterien), die so modifiziert wurden, dass sie Gene mit Codierung für die Enzymaktivitäten II und III enthalten. Beispielsweise können gemäß der Erfindung modifizierte Milchsäurebakterien zur Herstellung von Joghurt mit Vanillegeschmack verwendet werden, vorausgesetzt sie werden mit trans-Feruloyl-SCoA versorgt.

**[0148]** Vorteilhafterweise werden Gene zur Vanillinproduktion (beispielsweise diejenigen mit Codierung für die Enzymaktivitäten II und III) in einer Vielzahl von Pflanzenarten derart exprimiert, dass sich Vanillin in einem geeigneten Gewebe ansammelt. In diesem Fall kann eine neue Feldfruchtpflanze gezüchtet und Vanillin extrahiert werden. So kann eine Zuckerrübenpflanze gemäß der Erfindung hergestellt werden, in der die Rübe an Vanillin reich ist. Ferner werden die Entwicklung neuer Pflanzenzuchtvarietäten zum direkten Verbrauch (beispielsweise spanischer Pfeffer mit Vanillearoma) oder auch wegen ihrer gewünschten Aromaeigenschaften von der Erfindung umfasst.

**[0149]** Die Polypeptide der Erfindung oder die diese codierenden Gene können entweder individuell oder in Kombination (entweder als im Wesentlichen isolierte Polypeptide oder in zellfreien Extraktten oder als Wirtszellen oder Organismen, die diese Polypeptide codieren und vorzugsweise exprimieren) zur Umwandlung einer Verbindung in ein gewünschtes Produkt verwendet werden. Bestimmte Verbindungen und gewünschte Produkt wurden im Vorhergehenden beschrieben. Die Erfindung umfasst jedoch auch die Herstellung von jedem anderen gewünschten Produkt, beispielsweise einem Geschmack oder Aroma, aus Substraten, die mit trans-Ferulat verwandt sind, und anderen bekannten Substraten der Polypeptide (Enzyme) gemäß der Erfindung. Daher können die Polypeptide oder Gene der Erfindung entweder individuell oder in Kombination bei Verfahren zur Umwandlung von beispielsweise synthetischen Substraten der Polypeptide (Enzyme) in neuen Geschmacksstoffe und Aromen verwendet werden oder sie können zur Modifizierung des chemischen Profils bekannter Geschmacksstoffe oder Aromen verwendet werden.

**[0150]** In ähnlicher Weise ist klar, dass bestimmte gewünschte Produkte durch die weitere Wirkung der Enzymaktivität IV auf bestimmte Verbindungen, insbesondere die durch die Enzymaktivität I, II und III produzierten, hergestellt werden können. Beispielsweise können die Enzymaktivitäten I, II und III zur Umwandlung von trans-4-Cumarinsäure oder trans-4-Cumaroyl-SCoA in p-Hydroxybenzaldehyd und die Enzymaktivität IV zur Umwandlung von p-Hydroxybenzaldehyd in p-Hydroxybenzoësäure verwendet werden. Daher umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von p-Hydroxybenzoësäure unter Verwendung von mindestens einer der Enzymaktivitäten I, II, III und IV und vorteilhafterweise unter Verwendung von allen.

**[0151]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Nahrungsmittel oder Getränk bereit, das eine ein Polypeptid der Erfindung umfassende Wirtszelle oder einen Extrakt der Wirtszelle umfasst. Die ein oder mehrere Polynukleotide der Erfindung umfassenden Wirtszellen, insbesondere solche Wirtszellen, die Vanillin aufgrund des Vorhandenseins des Polynukleotids oder der Polynukleotide produzieren, können bei der Herstellung von Nahrungsmitteln oder Getränken verwendet werden. Insbesondere können, wie im Vorhergehenden diskutiert,

Milchsäurebakterien, die Vanillin durch die Verfahren der Erfindung produzieren, bei der Herstellung von Käse, Joghurt und verwandten Produkten einschließlich Milchgetränken verwendet werden. In ähnlicher Weise können Hefen, die Vanillin durch die Verfahren der Erfindung produzieren, bei der Herstellung von Nahrungsmitteln und Getränken, wie Brot und Bier, verwendet werden. Extrakte der Wirtszellen können ebenfalls in der Nahrungsmittel- oder Getränkeindustrie verwendet werden.

**[0152]** Ein noch weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Nahrungsmittel oder Getränk bereit, das eine ein Polynucleotid der Erfindung umfassende transgene Pflanze oder einen Teil oder Extrakt der transgenen Pflanze umfasst. Die ein oder mehrere Polynucleotide der Erfindung umfassende transgene Pflanze, insbesondere solche transgenen Pflanzen, die Vanillin aufgrund des Vorhandenseins des Polynucleotids oder der Polynucleotide produzieren, kann das Nahrungsmittel selbst bilden oder sie kann unter Bildung des Nahrungsmittels oder Getränks verarbeitet werden. Beispielsweise bildet eine Knolle einer transgenen Kartoffel gemäß der Erfindung ein Nahrungsmittel dieses Aspekts der Erfindung. Alternativ kann die transgene Kartoffel zu einem anderen Nahrungsmittel, das dennoch ein Nahrungsmittel dieses Aspekts der Erfindung ist, verarbeitet werden.

**[0153]** Noch weitere Aspekte der Erfindung stellen die Verwendung von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 oder einer Mutante oder einem Derivat desselben bei einem Verfahren zur Herstellung von Vanillin oder Vanillinsäure oder einem Salz derselben, die Verwendung eines Polypeptids der Erfindung bei einem Verfahren zur Herstellung von Vanillin oder Vanillinsäure oder einem Salz derselben, die Verwendung eines Polynucleotids der Erfindung bei einem Verfahren zur Herstellung von Vanillin oder Vanillinsäure oder einem Salz derselben, und die Verwendung einer Wirtszelle der Erfindung bei einem Verfahren zur Herstellung von Vanillin oder Vanillinsäure oder einem Salz derselben bereit.

**[0154]** Aus dem im Vorhergehenden angegebenen ist klar, dass die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von Vanillin oder Vanillinsäure oder anderen verwandten Produkten umfasst, wobei das Verfahren das Bereitstellen von trans-Feruloyl-SCoA (oder einem anderen geeigneten CoASH-Thioester, auf den die Enzymaktivität II wirken kann) und das Bereitstellen von Enzymaktivität II, Enzymaktivität III und im Falle der Herstellung von Vanillinsäure oder einem anderen verwandten Produkt von Enzymaktivität IV umfasst. trans-Feruloyl-SCoA ist durch das Verfahren gemäß der Beschreibung in Beispiel 2 erhältlich oder es kann unter Verwendung der Verfahren von Zenk et al. (1980) Anal. Biochem. 101, 182-187 erhalten werden. Andere CoASH-Thioester, die Substrate für das Enzym II sein können, werden ebenfalls bei Zenk et al. beschrieben.

**[0155]** Die bevorzugten Verfahrensstufen und Organismen zur Verwendung bei den Verfahren und die Nahrungsmittel und Getränke der früheren Aspekte der Erfindung sind bei diesem Verfahren dieser Erfindung ebenfalls in dem Maße bevorzugt, als sie mit diesem Verfahren und den bei diesen Verfahren verwendeten Organismen kompatibel sind.

**[0156]** Wie im Vorhergehenden diskutiert, sind trans-Feruloyl-SCoA (und verwandte CoASH-Thioester, wie 4-trans-Cumaroyl-SCoA und trans-Coffeoyl-SCoA) normale Metabolisierungzwischenprodukte bei Pflanzen. Daher ist eine transgene Pflanze, die ein Polynucleotid oder Polynucleotide umfasst, die die Enzymaktivitäten II und III codieren und vorzugsweise an einer Stelle in der Pflanze exprimieren, die trans-Feruloyl-SCoA oder einen anderen CoASH-Thioester enthält, für die Zwecke dieses Aspekts der Erfindung besonders geeignet. Wie im Vorhergehenden beschrieben, bilden derartige transgene Pflanzen und davon abgeleitete Produkte einen Teil der Erfindung.

**[0157]** Die Erfindung wird nun unter Bezug auf die folgenden Beispiele und Figuren detaillierter beschrieben, wobei:

**[0158]** **Fig. 1** den Vanillin-Pfad in *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 beschreibt. HMPHP-SCoA ist 4-Hydroxy-3-methoxy-phenylβ-hydroxypropionyl-SCoA. I ist ein Enzym, das die Umwandlung von trans-Ferulinsäure in trans-Feruloyl-SCoA katalysiert; II ist ein Enzym, das die Umwandlung von trans-Feruloyl-SCoA in HMPHP-SCoA katalysiert; III ist ein Enzym, das die Umwandlung von HMPHP-SCoA in Vanillin katalysiert; und IV ist ein Enzym, das die Umwandlung von Vanillin in Vanillinsäure katalysiert.

**[0159]** **Fig. 2** erläutert das Wachstum des Stamm AN103 nach der Übertragung in MM-Medium, das 10 mM Vanillat (V), 10 mM trans-Ferulat (F) oder 10 mM trans-Ferulat plus 10 mM Vanillat (FV) enthält. Die Kulturen wurden zuvor in MM-Medium, das 10 mM Vanillat enthält, gezüchtet.

**[0160]** **Fig. 3** zeigt die Veränderungen der Konzentrationen von trans-Ferulat und Vanillat während des Wachstums von Stamm AN103 auf MM-Medium, das 10 mM trans-Ferulat enthält.

**[0161]** **Fig. 4** zeigt die Produktion von Vanillin (van) und Vanillat (VA) durch einen Extrakt von Zellen von Stamm AN103 (165 µg Protein), der mit trans-Ferulat, ATP, CoASH und Mg<sup>2+</sup>-Ionen sowohl in Abwesenheit von NAD<sup>+</sup> als auch in dessen Gegenwart (0,5 mM) inkubiert wurde. Die Zellen wurden in Gegenwart von 10 mM trans-Ferulat plus 10 mM Vanillat gezüchtet.

**[0162]** **Fig. 5** zeigt die Bildung von Feruloyl-SCoA, Vanillin und Acetyl-SCoA aus trans-Ferulat, das einen PD10-behandelten Extrakt von auf trans-Ferulat gezüchteten Zellen von Stamm AN103 (7 µg Protein) zugeführt wurde, in Gegenwart von ATP, CoASH und Mg<sup>2+</sup>-Ionen .

**[0163]** **Fig. 6** zeigt die Bildung von Vanillin, Acetyl-SCoA und Feruloyl-SCoA aus HMPHP-SCoA, das einen PD10-behandelten zellfreien Extrakt (7 µg Protein) von auf trans-Ferulat gezüchteten Zellen von Stamm AN103 zugeführt wurde.

**[0164]** **Fig. 7** zeigt die Induktion der trans-Ferulat:CoASH-Ligaseaktivität als Reaktion auf 10 mM trans-Ferulat (V), 10 mM Vanillat (V) und 10 mM trans-Ferulat + 10 mM Vanillat (FV), die in MM-Medium vorhanden sind. Die Inokula wurden in MM-Medium plus 10 mM Vanillat wachsen gelassen; die Wachstumsbedingungen, die Enzymextraktion und der Ansatz waren wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben.

**[0165]** **Fig. 8** zeigt SDS-PAGE von A) einem Extrakt von Zellen, die in MM-Medium mit 10 mM trans-Ferulat gezüchtet wurden, und in aufeinanderfolgenden Stufen der Reinigung des HMPHP-SCoA-Spaltungsenzyms einer Elektrophorese unterzogen wurden; die aufeinanderfolgenden Stufen sind Rohextrakt, mono-Q gereinigt, mono-P gereinigt und Phenyl-Superose gereinigt, und B) Extrakten von Zellen, die in MM-Medium mit entweder 10 mM Vanillat oder 10 mM trans-Ferulat gezüchtet wurden und im Stadium des mono-P gereinigten Spaltungsenzyms einer Elektrophorese unterzogen wurden; A) Silberanfärbung; B) Coomassie-Anfärbung.

**[0166]** **Fig. 9** zeigt EcoRI/PstI-Verdaus der Cosmidklone pFI793, pFI794, pFI795 und pFI796, die auf einem Agarosegel getrennt wurden.

**[0167]** **Fig. 10** zeigt die Sequenz der redundanten Primer, die aus 20 N-terminalen Aminoresten des 31-kD-Proteins gestaltet sind (SEQ ID No: 5 und 6).

**[0168]** **Fig. 11** zeigt ein Southern Blot von EcoRI/PstI-Verdaus von verschiedenen Cosmidklonen, die mit dem unter Verwendung der in **Fig. 10** angegebenen N-terminalen entarteten Oligonucleotidprimer amplifizierten PCR-Produkt sondiert wurden.

**[0169]** **Fig. 12** zeigt die Nucleotidsequenz von pFI989 (d. h. das EcoRI/PstI-Fragment mit 4370 bp von pFI794) zusammen mit den anschließenden 882 bp, die aus einem weiteren Subclon, pFI1056, und aus pFI794 selbst bestimmt wurde (SEQ ID No: 7). Die Aminosequenz des 31 kD-Proteins und die dem anschließenden offenen Leseraster entsprechende mit Codierung für Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (Vanillinhydrogenase) (SEQ ID No: 2 und 4) sind ebenfalls angegeben.

**[0170]** **Fig. 13** zeigt die Nucleotidsequenz von pFI901 (d. h. das EcoRI/PstI-Fragment mit 1,8 kb von pFI793) (SEQ ID No: 8).

**[0171]** **Fig. 14** zeigt die Nucleotidsequenz von pFI911 (d. h. das EcoRI/PstI-Fragment mit 850 bp von pFI793) (SEQ ID No: 9).

**[0172]** **Fig. 15** zeigt die Nucleotidsequenz von pFI912 (d. h. das EcoRI/PstI-Fragment mit 958 bp von pFI793) (SEQ ID No: 10).

**[0173]** **Fig. 16** zeigt die Nucleotidsequenz von pFI913 (d. h. das EcoRI/PstI-Fragment mit 959 bp von pFI793) (SEQ ID No: 11).

**[0174]** **Fig. 17** ist eine Diagrammdarstellung der Outward Reading Primer für pFI901 (P35 und P39), pFI911 (P32 und P36), pFI912 (P33 und P37) und pFI913 (P34 und P38).

**[0175]** **Fig. 18** ist eine Diagrammdarstellung, die die Bildung des 1,5 kb PCR-Produkts unter Verwendung der Primer P34 und P39, das die Region in dem Cosmid zwischen den Inserts von pFI913 und pFI901 überspannt, zeigt.

**[0176]** **Fig. 19** zeigt die Nucleotidsequenz der verschmolzenen fortlaufenden Teile pFI913/PCR-Produkt/pFI901 (4259 bp) (SEQ ID No. 12) .

Beispiel 1: Isolierung und Wachstum von *Pseudomonas fluorescens* biovar. V, Stamm AN103

#### Experimentelles

##### Zuchtmedien

**[0177]** Organismen wurden auf den folgenden Medien gezüchtet: Minimal Medium (MM) enthielt pro 1: 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0, 5 mg  $\text{FeSO}_4$ , 0, 5 mg  $\text{CaCl}_2$ , 5 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1, 1 mg  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg  $\text{MgSO}_4$ , 50 mg EDTA, 28 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1, 6 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1, 6 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Der pH-Wert war 7, 0. Kohlenstoffquellen wurden wie angegeben eingearbeitet.

**[0178]** Medium auf Trypton- und Hefebasis (LBMod) enthielt pro 1: 10 g Trypton (Bacto; Difco, Detroit, USA), 5 g Hefeextrakt (Bacto), 10 g NaCl. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt. Das LB-Medium war mit LB Mod unter Zugabe von Glucose (1 g/l) identisch.

**[0179]** Feste Medien wurden unter Zugabe von 15 g/l Agar (Difco) hergestellt.

**[0180]** Isolierung von *Pseudomonas fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 Der Organismus wurde aus Oberflächenerde auf der Basis der Fähigkeit, auf trans-Ferulat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, isoliert. Zunächst wurde eine Erdprobe von 1 g zu 100 ml steriles Minimal Medium (MM), das trans-Ferulasäure (10 mM) enthielt, gegeben. Nach zwei Wochen bei 25 °C unter Schütteln mit 200  $\text{Umin}^{-1}$  wurde eine Probe (100  $\mu\text{l}$ ) entfernt und in 200 ml frisches Medium, das 10 mM trans-Ferulasäure enthielt, gegeben; dies wurde zweimal wiederholt. Eine Reihenverdünnung auf festem Medium (MM), das 10 mM trans-Ferulat als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, ermöglichte es, isolierte Kolonien zu erhalten, die auf MM-Platten, die individuelle Substrate als Kohlenstoffquellen enthielten, repliziert. Mehrere Stämme, die trans-Ferulat als einzige Kohlenstoffquelle verwenden konnten, wurden isoliert. Einer (AN103), der auch auf Vanillin wachsen konnte, wurde für die weiteren Arbeiten ausgewählt.

#### Zucht von Stamm AN 103

**[0181]** Der Organismus wurde routinemäßig bei 25 °C auf MM unter Schütteln unter Verwendung von Vanilinsäure (10 mM) oder trans-Ferulasäure (10 mM) als einziger Kohlenstoffquelle gezüchtet; 50 ml Medium wurden in einem 250-ml-Erlenmeyer-Kolben verwendet. Das Wachstum wurde durch Ermitteln der Extinktion bei 550 oder 600 nm überwacht.

**[0182]** Zur Langzeitaufbewahrung wurden Bakterien aus Kulturen in der logarithmischen Phase zentrifugiert und dann in Minimal Medium (MM), das 50 % Glycerin enthielt, resuspendiert. Sie wurden dann bei -70 °C aufbewahrt. Kulturen aus diesen gefrorenen Stammlösungen wurden durch Übertragung auf festes LB- oder LB-MOD-Medium erneut gestartet und anschließend in flüssiges Medium, das 10 nM trans-Ferulasäure enthielt, überimpft.

#### Ergebnisse

**[0183]** Der Organismus wurde aus Erdproben, die reich an verrotteter Vegetation waren, isoliert und unter Verwendung von Standardidentifizierungstechniken als Stamm von *Pseudomonas fluorescens* identifiziert. Wie in Tabelle I angegeben, wächst das Bakterium nicht nur auf trans-Ferulat als einziger Kohlenstoffquelle, sondern auch auf mehreren eng verwandten Verbindungen, die Vanillat, Protocatechuat und Coffeat umfassen. Ein Wachstum auf Vanillin wurde bei niedrigen Konzentrationen (< 1 mM) beobachtet, war jedoch variabel; höhere Konzentrationen waren wachstumshemmend. Wenn der Organismus auf Vanillat gezüchtet wurde, folgte auf eine Übertragung auf ein Medium, das trans-Ferulat als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, eine Verzögerung in der Wachstumskurve; dies wurde nicht beobachtet, wenn die Übertragung auf ein Medium, das sowohl Vanillat als auch trans-Ferulat enthielt, erfolgte (**Fig. 2**). Während eines Wachstumszyklus auf trans-Ferulat wurde um den Zeitpunkt, bei dem das Verschwinden von trans-Ferulat maximal war, eine vorübergehende Zunahme von Vanillat beobachtet (**Fig. 3**), was nahelegt, dass Vanillat ein Katabolit von trans-Ferulat war. Eine kleine Menge Protocatechuat wurde ebenfalls beobachtet, wenn das Kulturmedium mittels DC geprüft wurde (nicht angegeben).

**[0184]** Tabelle I: Relatives Wachstum von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 auf einer Reihe von Kohlenstoffsubstraten

**[0185]** Die Substrate wurden in MM-Medium mit einer Konzentration von 10 mM (Vanillin, 1 mM) bereitgestellt und das relative Wachstum nach 48 h bei 25 °C wurde durch Messen der Extinktion bei 600 nm erfasst.

Substrate	Relatives Wachstum (%)
Ferulasäure	100
Coffeinsäure	79
Sinapinsäure	0
Zimtsäure	0
Vanillin	<100
Vanillinsäure	140
Protocatechusäure	77
Protocatechualdehyd	0
Glucose	221
Acetat	47
Methanol	0

Beispiel 2: trans-Ferulat-Metabolismus in zellfreien Extrakten und Mechanismus der Spaltung

Experimentelles

Chemikalien

**[0186]** Chemikalien und Biochemikalien wurden routinemäßig von Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset, UK, Aldrich Chemical Co. Gillingham, Dorset, UK oder BDH-Merck, Poole, Dorset, UK erhalten. Die Synthese von CoASH-Thioestern ist im Folgenden beschrieben.

**[0187]** Herstellung von 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxypropionyl-ScoA (HMPHP-SCoA) Diese Verbindung wurde ausgehend von einer Reformatsky-Kondensation von Vanillin mit Ethylbromacetat (siehe R. L. Shriner, The Reformatsky Reaction in "Organic Reactions", R. Adams, W. E. Bachmann, L. F. Fieser, J. R. Johnson und H. R. Snyder, Hrsg., Band, 1, S. 1-37, John Wiley New York (1942)) durch die anschließende Reinigung des gebildeten Ethyl-4-hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxypropionat (Ethyl-HMPHP) mittels HPLC, Hydrolyse zur freien Säure, N-Succinimidylierung und schließlich Austausch der N-Succinimidylgruppe durch CoASH und Isolierung des CoASH-Thioesters durch präparative DC hergestellt (siehe V. Semler, G. Schmidtberg und G. G. Gross, Z. Naturforsch. 42 c, 1070-1074 (1987)).

**[0188]** Vanillin (3 g) wurde mit 1,9 ml Ethylbromacetat und 2 g trockenem Zn-Staub in 60 ml trockenem 1,4-Dioxan in einem mit Trockenrörhrchen und einem Rückflusskühler ausgestatteten Rundkolben gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Verwendung eines Heizmantels sanft zum Sieden erhitzt und etwa 1 h unter leichtem Rückfließen gehalten. Nach dem Abkühlenlassen wurde das Gemisch mit 60 ml 10%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert und mit 4 × 120 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden mit wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, und nichtumgesetztes Vanillin wurde durch Waschen mit 3 × 100 ml gesättigter K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>-Lösung entfernt. Die Etherphase wurde dann unter Vakuum bei etwa 30 °C am Rotationsverdampfer eingedampft, um den Ether zu entfernen, wobei ein flüssiger Rückstand (etwa 10 ml) zurückblieb. Dieser wurde dann auf eine präparative C-18-Umkehrphasen-HPLC-Säule appliziert (Dynamax 60A, 8 µm, 250 mm × 41 mm; Rainin, Woburn, MA, USA) und mit 12 ml/min mit einem Gradienten von MeOH/H<sub>2</sub>O, das 1 mM Trifluoressigsäure enthielt, eluiert [das Lösemittel A umfasste 40 % MeOH/1 mM Trifluoressigsäure; das Lösemittel B umfasste 100 % MeOH/1 mM Trifluoressigsäure; zum Zeitpunkt 0 min bestand das Lösemittel zu 20 % aus B mit linearem Anstieg auf 40 % B nach 28 min und 100 % B nach 35 min]. Die Fraktionen wurden durch die Extinktion bei 280 nm überwacht und das zwischen 37 und 45 min eluierende Material wurde gewonnen. Das Lösemittel wurde unter Vakuum bei etwa 35 °C entfernt und das übrige Material wurde über Nacht auf -20 °C gebracht. Der Niederschlag, der sich bildete, wurde dann rasch abfiltriert und gefriergetrocknet, wobei 300 mg einer weißen Sub-

stanz erhalten wurden. Diese wurde als 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl- $\beta$ -hydroxypropionsäureethylester (Ethyl-HMPHP) mittels MS  $[M^-] = 240$  identifiziert und ergab bei alkalischer Hydrolyse (1M KOH; 30 min) die freie Säure.

**[0189]** Zur Erzeugung des N-Succinimidylesters wurden 30 mg Ethyl-HMPHP 40 min bei Raumtemperatur in 0,5 ml 1M KOH hydrolysiert. Oxalsäure (0,6 ml, 0,5 M) wurde dann zugegeben, um den pH-Wert auf etwa 3 – 4 zu bringen. Die Lösung wurde nacheinander mit  $\text{Et}_2\text{O}$  (5 × etwa 10 ml) extrahiert; die organischen Phasen wurden dann gepoolt und zur Trockene eingedampft. N-Hydroxysuccinimid (0,1 mmol; 11,5 mg) wurde dann in 1,2 ml trockenem 1,4-Dioxan zugegeben. Darauf folgte schrittweise 0,1 mmol (20,7 mg) Dicyclohexalcarbodiimid in 0,6 ml trockenem 1,4-Dioxan. Das Reaktionsgemisch wurde etwa 4 h bei Raumtemperatur stehengelassen und dann filtriert, um ausgefallenes DCU zu entfernen, wobei weitere 1,8 ml trockenes Dioxan zum Waschen des Filters zugegeben wurden.

**[0190]** Der N-Succinimidylester wurde aus dem Reaktionsgemisch nicht isoliert, sondern *in situ* in den CoASH-Thioester umgewandelt. Lithium-CoASH (40 mg; etwa 0,05 mmol) wurde in 2,4 ml 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  gelöst, und das Reaktionsgemisch wurde zugegeben; die Austauschreaktion wurde unter  $\text{N}_2$  unter Röhren etwa 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Der pH-Wert des Gemischs wurde dann durch die Zugabe von 70  $\mu\text{l}$  2,8 M HCl auf etwa 3 – 4 eingestellt, und das Gemisch wurde bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Der CoASH-Thioester von HMPHP wurde schließlich durch präparative DC isoliert. Cellulose-DC-Platten (Avicel; 1000  $\mu\text{m}$ ; Analtech, Newark, DE, USA), auf die jeweils 200  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch appliziert wurden, wurden in  $\text{nBuOH}/\text{HOAc}/\text{H}_2\text{O}$  (5/2/3, V/V/V) entwickelt. Der CoASH-Thioester wurde bei  $R_F$  0,4 – 0,5 unter Verwendung einer kurzwelliges-W-Lampe lokalisiert und durch Abschaben und Flution mit 50 % MeOH von der Platte gewonnen. Die Identifizierung erfolgte mittels MS  $[M = 960]$  und durch Hydrolyse zur freien Säure (vergleiche Ethyl-HMPHP), die mittels HPLC gemessen und routinemäßig als Testbasis verwendet wurde. Der CoASH-Thioester zeigte ein Absorptionsmaximum bei 258 nm und ihm fehlte das für trans-Feruloyl-SCoA charakteristische Absorptionsmaximum bei 345 nm. Dieses Molekül – und der entsprechende Ethylester und die entsprechende freie Säure – tragen am  $\beta$ -Kohlenstoff ein asymmetrisches Zentrum; jedoch wurde während oder nach der Synthese kein Versuch gemacht, die optischen Isomere aufzutrennen.

#### Herstellung von Vanilloyl-SCoA

**[0191]** Vanilloyl-SCoA wurde aus Vanillinsäure über den N-Succinimidylester im Wesentlichen gemäß dem Verfahren, das von V. Semler, G. Schmidtberg und G. G. Gross (Z. Naturforsch. 42c, 1070-1074 (1987) für die Synthese von Piperoyl-SCoA beschrieben wurde, hergestellt.

**[0192]** Zu einer gerührten Lösung von Vanillinsäure (5 mmol) und N-Hydroxysuccinimid (5 mmol) in 30 ml trockenem 1,4-Dioxan wurden in kleinen Portionen 7,5 mmol festes Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und ausgefallenes DCU wurde durch Filtration entfernt. Das Filtrat wurde unter verminderter Druck bei  $40^\circ\text{C}$  eingedampft, und der ölige Rückstand wurde in siedendem  $\text{CHCl}_3$  gelöst. Das N-Succinimidylvanillat wurde aus der Lösung durch tropfenweise Zugabe von Petrolether ( $K_p$ : 30 °C – 40 °C) kristallisiert. Etwa 750 mg wurden gewonnen.

**[0193]** Zur Erzeugung von Vanilloyl-SCoA aus N-Succinimidylvanillat wurde CoASH (Natriumsalz; 200 mg) in 4 ml 0,1  $\text{NaHCO}_3$  gelöst. N-Succinimidylvanillat (120 mg in 4 ml Dioxan) wurde dann schrittweise über einen Zeitraum von etwa 40 min bei Raumtemperatur unter Ausbreiten von  $\text{N}_2$  zugegeben. Weitere 4 ml 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  wurden dann zusammen mit weiteren 8 ml Dioxan zugegeben. Die Inkubation unter  $\text{N}_2$  bei Raumtemperatur wurde unter Röhren eine weitere Stunde fortgesetzt. Der pH-Wert wurde dann mit 1 M HCl auf etwa 2,8 eingestellt, und die Lösung wurde eingefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Isolierung von Vanilloyl-SCoA erfolgte mittels präparativer DC wie im Vorhergehenden beschrieben mit  $\text{n-BuOH}/\text{HOAc}/\text{H}_2\text{O}$  (5/2/3, V/V/V) als Lösemittel. Vanilloyl-SCoA ( $R_F = 0,5 – 0,6$ ) wurde unter Verwendung einer kurzwelliges-W-Lampe identifiziert und durch Abschaben, Elution mit 40 % MeOH und Gefriertrocknen gewonnen. Die Identifizierung erfolgte mittels MS ( $[M] = 916$ ) und der Thioester setzt bei alkalischer Hydrolyse Vanillinsäure frei.

**[0194]** Herstellung von trans-Feruloyl-SCoA und anderen Cinnamoyl-SCoA-Thioestern trans-Feruloyl-SCoA wurde aus trans-Ferulasäure über den N-Succinimidylester wie im Vorhergehenden für Vanilloyl-SCoA beschrieben hergestellt. Die letztendliche Isolierung wurde in ähnlicher Weise durch präparative DC und Elution erreicht, wobei die Identifizierung mittels MS und durch alkalische Hydrolyse zur freien trans-Ferulasäure erfolgte. Caffeoyl- und p-Cumaroyl-SCoA-thioester wurden in ähnlicher Weise hergestellt.

## Herstellung von zellfreien Extrakten

**[0195]** Zellfreie Extrakte von Kulturen in der logarithmischen Phase (6 – 10 h nach der Beimpfung) wurden durch Ultraschallbehandlung hergestellt. Zellen von etwa 200 ml Medium wurden durch Zentrifugation pelletiert und in 5 – 10 ml Extraktionspuffer (routinemäßig 40 mM KPi; pH-Wert 7,2, mit 10 mM Dithiothreit) resuspendiert. Sie wurden dann bei 4 °C ultraschallbehandelt (MSE Soniprep 150; Fisons Instruments, Crawley, Sussex, UK) 5 × 20 s; 22 Amplitude Microns mit voller Leistung) und zentrifugiert (20000 × g; 20 min; 4 °C). Die Extrakte wurden routinemäßig bei –70 °C gefroren aufbewahrt und in einigen Fällen vor der Verwendung unter Verwendung einer PD10-Säule (Pharmacia) einem Pufferaustausch unterzogen. Die Proteingehalte der Extrakte waren variabel – zwischen 0,25 und 1,8 mg/ml.

## Inkubation zellfreier Extrakte

**[0196]** Zellfreie Extrakte wurden routinemäßig bei 30 °C und pH 7,5 in einem Reaktionsgemisch (1 ml), das 90 mM Tris-HCl-Puffer und 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt, zusammen mit (gegebenenfalls) 0,5 mM trans-Ferulasäure, 0,2 mM CoASH (Li-Salz) und 2,5 mM ATP inkubiert. Dieses vollständige Reaktionsgemisch bildete einen Ansatzz für trans-Ferulat:CoASH-Ligase, wobei die Zunahme der Extinktion bei 345 nm am Anfang gegen ein Leerwertreaktionsgemisch, bei dem CoASH weggelassen war, erfasst wurde. Inkubationen mit HMPHP-SCoA (allgemein 0,4 mM) wurden in ähnlicher Weise durchgeführt, wobei jedoch trans-Ferulasäure, CoASH und ATP weggelassen wurden.

**[0197]** Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase wurde bei 30 °C und pH 7,0 durch Erfassen der Abnahme der Extinktion bei 340 nm am Anfang gegen eine Leerwertküvette, bei der NAD<sup>+</sup> weggelassen wurde, getestet. Wegen der Ähnlichkeit des Extinktionskoeffizienten bei 340 nm für Vanillin und NADH wurde die Empfindlichkeit des Tests durch Katalysieren der Regeneration von NADH zu NAD<sup>+</sup> durch Bereitstellen von Lactatdehydrogenase und Pyruvat erhöht. Reaktionsgemische enthielten in 1 ml Volumen 75 mM KPi-Puffer, pH-Wert 7,0, 0,125 mM Vanillin, 1,2 mM Na-Pyruvat, 1,1 U Lactatdehydrogenase (Kaninchenmuskel) und 0,5 mM NAD<sup>+</sup>.

## HPLC-Analyse

**[0198]** Metabolite von trans-Ferulasäure einschließlich der CoASH-Thioester wurden mittels HPLC unter Verwendung einer Lichrosorb RP-18-Säule (20 cm × 4,6 mm; Capital HPLC; Broxburn, West Lothian, UK) mit einem mehrphasigen Gradienten analysiert und quantitativ erfasst; das Lösemittel A" war 20 mM NaOAc, eingestellt auf pH 6,0, und das Lösemittel B" war MeOH; die Durchflussrate betrug 1,2 ml/min; der Anteil des Lösemittels B" stieg linear von 0 % bei 0 min auf 10 % bei 15 min und dann auf 50 % bei 40 min und 70 bei 45 min und nahm schließlich auf 0 % bei 50 min ab. Die Erfassung erfolgte mit einem Spectra Focus Detektor (Thermo Separation Products, Stone, Staffs. UK), der eine W-Spektralanalyse jeder eluierenden Komponente ermöglichte.

**[0199]** Typische näherungsweise Retentionszeiten waren: CoASH, 3 min; Vanillinsäure, 7 min; trans-Ferulasäure, 19 min; Acetyl-SCoA, 22 min; HMPHP-SCoA, 29 min, Vanillyloyl-SCoA, 31 min; Vanillin, 31,5 min; trans-Feruloyl-SCoA, 34 min.

## Massenspektrometrie

**[0200]** Massenspektren (positives und negatives Ion) wurden auf einem MS 9/50-Massenspektrometer (Kratos Instruments, Manchester UK) unter Verwendung von Xenon-Fast Atom Bombardment (FAB) mit einem Potential von 5 – 7 kV unter Verwendung von Glycerin als Matrix aufgezeichnet (siehe G. R. Fenwick, J. Eagles und R. Self, Biomedical Mass Spectrometry 10, 382-386 (1983) ).

## Proteintest

**[0201]** Protein wurde durch das Verfahren von M. M. Bradford (Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)), unter Verwendung von Bio-Rad-Farbstoffreagens (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) und Rinderserumalbumin als Standard getestet.

## Ergebnisse

**[0202]** Rohextrakte von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 von Zellen, die auf Vanillat zusammen mit trans-Ferulat gewachsen waren, konnten Vanillat produzieren, wenn ihnen trans-Ferulat, CoASH, ATP,

$Mg^{2+}$ -Ionen und  $NAD^+$  zugeführt wurde. Bei Abwesenheit von  $NAD^+$  wurde Vanillat nicht gebildet und Vanillin sammelte sich an Ort und Stelle an (**Fig. 4**). Die bei Abwesenheit von  $NAD^+$  gebildete Vanillinmenge war kleiner als die bei dessen Vorhandensein gebildete Vanillatmenge. Bei Anwesenheit von  $NAD^+$  sammelte sich im Wesentlichen kein Vanillin an.

**[0203]** Diese Nutzung von trans-Ferulat durch Rohextrakte hing von CoASH und ATP und partiell von  $Mg^{2+}$ -Ionen ab (Tabelle II). Diese Eigenschaften zeigen eine Anfangsaktivierung von trans-Ferulat zu trans-Feruloyl-SCoA durch trans-Ferulat:CoASH-Ligase. Dies wurde ferner durch die rasche Entwicklung eines CoASH-abhängigen Extinktionsmaximums bei 345 nm und insbesondere durch eine vorübergehende bathochrome Verschiebung, die das Auftreten einer gelben Farbe bewirkte, wenn das Reaktionsgemisch mit NaOH alkalisch gemacht wurde, gezeigt (Daten nicht gezeigt). In den Anfangsstadien der Gesamtreaktion ermöglichte die lineare Zunahme der Extinktion bei 345 nm einen direkten Test der Aktivität von trans-Ferulat:CoASH-Ligase. Während der späteren Stadien beruhte jedoch die Extinktion bei 345 nm sowohl auf trans-Feruloyl-SCoA als auch auf Vanillin oder in Gegenwart von  $NAD^+$  NADH, die jeweils bei dieser Wellenlänge eine wesentliche Extinktion besitzen.

**[0204]** Tabelle II: Cofaktoranforderungen für die Nutzung von trans-Ferulat durch zellfreie Extrakte von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103

**[0205]** Reaktionsgemische (165  $\mu$ g Protein) wurden 4 h bei 30 °C wie bei Experimentelles beschrieben inkubiert, wobei die Weglassungen aus dem vollständigen Reaktionsgemisch wie angegeben waren.

Reaktions- gemisch	Reaktionsprodukte (nmol)		
	(verbleibendes) trans-Ferulat	Vanillin	Vanillat
vollständig	267	n.d.	311
-CoASH	550	n.d.	40
- $NAD^+$	258	228	23
-ATP	513	n.d.	33
- $Mg^{2+}$	425	n.d.	153

n.d. = nicht nachweisbar

**[0206]** Eine gesamte nicht-oxidative Spaltung von trans-Feruloyl-SCoA ist in **Fig. 5** impliziert, die bei Abwesenheit von  $NAD^+$  Äquivalenz zwischen der Bildung von Vanillin und der von Acetyl-SCoA zeigt. (Die Bildung von [2-<sup>13</sup>C]-Acetyl-SCoA aus am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom <sup>13</sup>C-markiertem trans-Ferulat wurde auch durch NMR-Spektroskopie bestätigt (nicht angegeben)). Der Spaltungsmechanismus wurde ferner durch chemische Synthese des hydratisierten Derivats von trans-Feruloyl-SCoA, 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl- $\beta$ -hydroxypropionyl-SCoA (HMPHP-SCoA), untersucht. Dieses wurde mit zellfreiem Extrakt inkubiert, und es zeigte sich, dass es rasch in Acetyl-SCoA und Vanillin in äquimolaren Anteilen umgewandelt wurde (**Fig. 6**). Vanillingeruch wurde erhalten, wenn HMPHP-SCoA als Substrat verwendet wurde. Dieses hydratisierte Zwischenprodukt wurde jedoch nicht nur in Vorwärtsrichtung metabolisiert, da auch eine fast äquivalente Rückreaktion zu Feruloyl-SCoA (vermutlich trans) beobachtet wurde. Die Schnelligkeit der Nutzung von HMPHP-SCoA war mit der fehlenden Beobachtung von dessen Ansammlung unter Verwendung von HPLC während zellfreier Inkubationen mit trans-Ferulat, CoASH, ATP und  $Mg^{2+}$ -Ionen konsistent. Diese Spaltung von HMPHP-SCoA bei Abwesenheit von  $NAD^+$  zeigte keine störend eingreifende  $\beta$ -Oxidation zum  $\beta$ -Keto-thioester (4-Hydroxy-3-methoxybenzoyl)acetyl-SCoA (vergleiche M. H. Zenk, Anal. Z Pflanzenphysiol 53, 404-414 (1965)). Versuche zur Herstellung dieser Verbindung für zellfreie Untersuchungen waren nicht erfolgreich, jedoch wurde deren erwartetes Spaltungsprodukt, Vanilloyl-SCoA, hergestellt, und es wurde gezeigt, dass es durch zellfreie Extrakte in Gegenwart NADH nicht zu Vanillin metabolisiert wurde, auch wenn gleichzeitige Inkubationen mit trans-Ferulat bei Abwesenheit von  $NAD^+$  aktiv Vanillin produzierten.

**[0207]** Außer trans-Ferulasäure wurden Coffeinsäure und p-Cumarsäure durch Rohextrakte von *Ps. fluorescens*

scens biovar. V, Stamm AN103 in Thioester von CoASH umgewandelt (Tabelle III).

**[0208]** Tabelle III. Bildung von CoASH-Thioestern von trans-p-Hydroxyzimtsäuren durch Rohextrakte von *Ps. fluorescens* AN103. Die Aktivität wurde spektrophotometrisch gemäß der Beschreibung für trans-Ferulat:CoASH-Ligase getestet, wobei die Anfangsrate der Zunahme der Extinktion bei 345 nm im Falle der trans-Feruloyl-SCoA-Bildung und bei den entsprechenden Extinktionsmaxima für die anderen SCoA-Thioester ermittelt wurde.

Substrat	Aktivität (nkat/mg Protein)
Ferulat	0,50
Coffeate	0,39
p-Cumarat	0,37

### Beispiel 3: Mutanten in trans-Ferulat-Metabolismus

#### Experimentelles

##### Mutagenese von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103

**[0209]** Ethylmethansulfonat (EMS) wurde zur Mutagenese verwendet. Die Bakterien wurden zwei Tage bei 25 °C in Minimal Medium (MM) mit Vanillinsäure als Kohlenstoffquelle gezüchtet; 1 ml Kultur wurde dann in 50 ml LB-MOD überimpft und 16 h bei 25 °C wachsen gelassen. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,25 ml) resuspendiert, wobei eine Zelldichte von  $4 \times 10^9$  Zellen/ml (OD<sub>580</sub> 1,0 =  $6 \times 10^7$  Zellen/ml) erhalten wurde. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde reihenmäßig verdünnt ( $10^{-2}$  –  $10^{-8}$ ) und auf LB-MOD-Platten ausplattiert (0,1 ml pro Platte), um Kontrollzellzählraten zur Feststellung der Wirksamkeit der Mutagenese bereitzustellen.

**[0210]** Eine Zellsuspension (1 ml) wurde mit 0,08 ml EMS in insgesamt 3 ml 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 4 °C abgeschieden, und das Zellpellet wurde zweimal mit 10 ml LB-MOD-Medium gewaschen, bevor es in 1 ml dieses Mediums resuspendiert wurde.

**[0211]** Ein Aliquot wurde reihenmäßig verdünnt ( $10^{-2}$  –  $10^{-8}$ ) und auf LB-MOD-Platten ausplattiert; diese wurden über Nacht bei 25 °C zusammen mit den Platten der nicht-mutagenisierten Zellen inkubiert, wobei eine Abschätzung der Abtötung erhalten wurde (70 % Abtötung zeigt eine effiziente Mutagenese). Die verbliebenen mutagenisierten Zellen (0,9 ml) wurden in LB-MOD-Medium (50 ml) überimpft und über Nacht bei 25 °C inkubiert. Die mutagenisierten Zellen wurden dann an Mutanten hinsichtlich der Nutzung von trans-Ferulat durch eine Behandlung mit Carbenicillin in Minimal Medium (MM) in Gegenwart von trans-Ferulasäure angereichert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4 °C geerntet, zweimal mit MM (10 ml) gewaschen und in 20 ml MM resuspendiert. Eine Probe (1 ml) wurde in MM (15 ml) überimpft und 1 h bei 25 °C inkubiert; danach wurden trans-Ferulasäure (10 mM Endkonzentration) und Carbenicillin (2 mg/ml Endkonzentration) zugegeben. Ein Kontrollkolben wurde hergestellt, der trans-Ferulasäure, jedoch nicht Carbenicillin enthielt. Beide Kolben wurden über Nacht bei 25 °C 16 h inkubiert, wobei OD<sub>580</sub> zur Abschätzung des Wachstums und Feststellung der Wirksamkeit des Antibiotikums erfasst wurde. Penicillinase (10 Einheiten) wurde dann zugegeben, um das Carbenicillin zu zerstören, wobei über Nacht bei 25 °C inkubiert wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4 °C geerntet, zweimal in MM (10 ml) gewaschen und in 5 ml MM resuspendiert; 1 ml dieser resuspendierten Zellen wurde dann in 50 ml MM, das 10 mM Vanillinsäure enthielt, überimpft und bei 25 °C etwa 24 h inkubiert.

**[0212]** Diese angereicherten Zellen wurden durch Replikaplattierung einem Screening auf Mutanten, die zur Nutzung von trans-Ferulasäure nicht fähig waren, unterzogen. Die angereicherte Stammlösung wurde auf  $10^{-6}$  verdünnt, auf LB-MOD ausplattiert (0,1 ml pro Platte), 2 Tage bei 25 °C inkubiert und dann auf MM, das 10 mM Vanillinsäure oder 10 mM trans-Ferulasäure enthielt, replikaplattiert. Die Platten wurden 2 – 3 Tage bei 25 °C inkubiert und einem Screening auf Kolonien, die auf Vanillat wachsen konnten, jedoch auf trans-Ferulat nicht wachsen konnten, unterzogen.

#### Ergebnisse

**[0213]** Durch Mutagenese von Stamm AN103 mit Ethylmethansulfonat wurden zwei Klassen von Mutanten,

die zur Nutzung von trans-Ferulat als einzige Kohlenstoffquelle unfähig waren, isoliert; diese waren Van 1, Van 2 und Van 3 und zweitens Van 10 und Van 11. Nach dem Wachstum auf Vanillat plus trans-Ferulat zeigte ein Vertreter der ersten von diesen, Van 1, keine Aktivität in zellfreien Inkubationen mit entweder trans-Ferulat oder Vanillin und es fehlten ihm sowohl trans-Ferulat:CoASH-Ligase als auch das Enzym, das Vanillin in Vanillat umwandelt, Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase. Im Gegensatz dazu besaß ein für die zweite Klasse repräsentativer Typ mit der Bezeichnung Van 10 Gerade eine Aktivität von sowohl trans-Ferulat:CoASH-Ligase als auch Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase, die ähnlich den in Stamm AN103 gefundenen waren, er erzeugte jedoch in Gegenwart von NAD<sup>+</sup> sehr wenig Vanillat (Tabelle IV). Zellfreie Extrakte von Van 10 wurden ferner auf ihre Fähigkeit zur Metabolisierung von HMPHP-SCoA geprüft. Sie metabolisierten diesen Thioester aktiv, schienen ihn jedoch vorwiegend zu Feruloyl-SCoA zu dehydratisieren; die Vanillinbildung war im Vergleich zum AN103-Extrakt im Wesentlichen gehemmt (Tabelle V). Diese Beobachtungen legten nahe, dass Van 1 eine regulatorische Mutante war, bei der die Induktion durch trans-Ferulat fehlerhaft war, während Van 5 hinsichtlich der HMPHP-SCoA-Spaltungsaktivität fehlerhaft zu sein schien.

**[0214]** Tabelle IV: trans-Ferulat-Metabolismus in zellfreien Extrakten von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 und von den Mutantenstämmen Van 1 und Van 10

**[0215]** Die Zellen wurden 6 h in MM-Medium, das 10 mM Vanillat zusammen mit 10 mM trans-Ferulat enthielt, wachsen gelassen. Die Extrakte wurden dann wie in Beispiel 2 hergestellt und auf trans-Ferulat:CoASH-Ligase und Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase getestet. Die Extrakte (etwa 0,3 mg Protein) wurden ebenfalls 4 h in Gegenwart von NAD<sup>+</sup> inkubiert, um die relativen Mengen des gebildeten Vanillats zu bestimmen.

Stamm	Enzymaktivität (nkat/mg Protein)		gebildetes Vanillat (nmol/mg Protein)
	Ferulat:CoASH-Ligase	Vanillin:NAD <sup>+</sup> -Oxidoreduktase	
AN103	1,7	1,2	807
Van 1	0	~0,05	0
Van 10	2,0	1,4	59

**[0216]** Tabelle V: Nutzung von HMPHP-SCoA durch Extrakte von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103 und Van 10

**[0217]** Die Extrakte (AN103, 14 µg Protein; Van 10, 68 µg Protein) wurden 7 min bei 30 °C in einem Volumen von 1 ml, das 0,3 mM HMPHP-SCoA enthielt, inkubiert. Die Extinktionszunahme bei 345 nm wurde gegen ein Leerwertreaktionsgemisch, das keinen Extrakt enthielt, gemessen. Die Vanillinbildung wurde mittels HPLC ermittelt; die Produktion von Feruloyl-SCoA wurde in diesem Fall aus der Extinktionszunahme bei 345 nm nach der Subtraktion des Beitrags von Vanillin berechnet.

Stamm	ΔA <sub>345</sub>	Feruloyl-SCoA (nmol)	Vanillin (nmol)
AN103	0,75	18,4	23,8
Van 10	0,63	29,2	4,5

Beispiel 4: Induktion des trans-Ferulat-Metabolismus in Stamm AN103 und Reinigung des HMPHP-SCoA-Spaltungsenzyms

#### Experimentelles

**[0218]** Reinigung des trans-Feruloyl-SCoA-Hydrolase/Aldol-Spaltungsenzyms Die Zellen (aus 2 1 Kultur, die 72 h auf MM mit 10 mM trans-Ferulic acid als Substrat gezüchtet wurden; OD<sub>565</sub> etwa 0,5) wurden im Wesentlichen gemäß der Beschreibung in Beispiel 2 extrahiert, wobei 50 ml Rohextrakt erhalten wurde, der 1,28 mg

Protein/ml enthielt.

**[0219]** Der Extrakt (16 ml, verdünnt auf 40 ml) wurde bei Raumtemperatur und mit 2 ml/min auf eine Mono Q HR10/10 Arzionaustauschersäule (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), die mit 20 mM Tris-Puffer (pH-Wert 7,5), der 10 mM Dithiothreit enthielt, präequilibriert wurde, appliziert. Nach der Elution von nicht-adsorbiertem Protein wurde an die Säule gebundenes Protein mit einem linearen Gradienten zunehmender NaCl-Konzentration: von 0 auf 0,5 M NaCl in 100 ml Puffer, eluiert.

**[0220]** Fraktionen, die zwischen 0,18 und 0,3 m NaCl eluierten und Aktivität gegenüber HMPHP-SCoR enthielten, was unter Verwendung des Mikrotiterplattentests (siehe im Folgenden) bestimmt wurde, wurden gepoolt und mittels Dialyse in 25 mM Bis-tris-Puffer, der 10 mM Dithiothreit und mit Iminodiessigsäure auf pH 7,1 eingestellt war, einem Pufferaustausch unterzogen. Sie wurden dann mit 0,75 ml/min auf eine Mono P HR 5/20-Chromatofocusing Column (Pharmacia), die mit dem gleichen Puffer präequilibriert war, appliziert. Nach der Elution von nicht-adsorbiertem Protein von der Säule wurde adsorbiertes Protein mit einem Gradienten von abnehmendem pH-Wert, der durch Applikation von 46 ml 10 % (V/V) Polybuffer 74 (Pharmacia), der 10 mM Dithiothreit enthielt und mit Iminodiessigsäure auf pH 4,0 eingestellt wurde, erzeugt wurde, eluiert. Die Aktivität gegenüber HMPHP-SCoA wurde zwischen pH 5,5 und 5,1 eluiert.

**[0221]** Die aktiven Fraktionen wurden erneut gepoolt und einem Pufferaustausch zu 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5), der 1,7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 10 mM Dithiothreit enthielt, unter Verwendung von PD10-Säulen (Pharmacia) unterzogen, bevor sie auf eine PhenylSuperose HR 5/5 Hydrophobic Interaction Chromatography Column (Pharmacia), die mit diesem Puffer präequilibriert war, appliziert wurden. Die Elution von gebundenem Protein wurde mit einem abnehmendem Gradienten von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Puffer, von 1,7 M auf 0 über 30 ml, und anschließend mit Puffer allein während weiterer 5 ml erreicht. Die Aktivität gegenüber HMPHP-SCoA wurde in diesen letzten 5 ml Puffer eluiert.

**[0222]** In jedem Stadium der Reinigung wurden aktive Fraktionen durch eine Mikroanpassung des im Vorhergehenden beschriebenen Tests mit HMPHP-SCoA (Beispiel 2) erfasst; die Reaktionen wurde in 100  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch etwa 4 min bei Raumtemperatur in Mikrotitervertiefungen durchgeführt, und die Extinktion wurde dann in einer MR 5000-Mikrotiterplattenlesevorrichtung (Dynatech, Guernsey, Channel Islands), die mit einem 340-nm-Filter ausgestattet war, ermittelt. Die Aktivität der gepoolten Fraktionen wurde mittels HPLC ermittelt, um die Reaktionsprodukte von sowohl HMPHP-SCoA (0,4 mM) als auch trans-Feruloyl-SCoA (0,28 mM) als Substrate zu bestimmen. Reaktionsgemische, die 10  $\mu\text{l}$  Enzym enthielten, wurden wie im Vorhergehenden beschrieben in 100  $\mu\text{l}$  Volumen inkubiert; die Reaktion wurde mit 100  $\mu\text{l}$  angesäuertem  $\text{McOH}$  (pH 3) nach 2 minütiger (HMPHP-SCoA) oder 5 minütiger (trans-Feruloyl-SCoA) Inkubation bei 24 °C beendet. Die Proportionalität der Reaktionen zur Zeit und zur Enzymmenge wurde in Vorbestimmungen festgestellt.

**[0223]** Enzymproben (10  $\mu\text{l}$  in jedem Stadium der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE mit Coomassie- oder Silberanfärbung im Wesentlichen gemäß der Beschreibung bei H. Schägger und G. von Jagow, Ana1. Biochem. 166, 368-379 (1987) analysiert. Ein Atto AE6450 Gel Apparatus wurde verwendet (geliefert von Genetic Research Instrumentation, Dunmow, Essex, UK).

**[0224]** Die Elektroelution von Proteinbanden von festen gefärbten Gelen wurde unter Verwendung eines Bio-Rad Model 422 Electroeluter gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Eluiertes Protein wurde dann durch Zentrifugation auf einer Pro-Spin-Membran (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), die gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet wurde, abgeschieden. Die N-terminale Sequenzierung wurde durch Alta Bioscience, University of Birmingham, Birmingham, UK) durchgeführt.

#### Ergebnisse

**[0225]** Der Zeitverlauf der Induktion von trans-Ferulat:CoASH-Ligase in Stamm AN103 ist in **Fig. 7** gezeigt. Nach der Übertragung von auf Vanillat gewachsenen Zellen in trans-Ferulat enthaltendes Medium nahm die spezifische Aktivität der Ligase in Extrakten etwa linear über einen Zeitraum von 8 Stunden zu. Ein im wesentlicher identischer Zeitverlauf wurde erhalten, wenn die Zellen stattdessen auf ein Medium, das sowohl trans-Ferulat als auch Vanillat enthielt, übertragen wurden. Vanillat, ein Katabolit von trans-Ferulat, hemmte daher den Induktionsprozess nicht.

**[0226]** Die Induktion der Fähigkeit, auf einem unterschiedlichen Substrat zu wachsen, bedeutet eine signifikante Verschiebung des primären Metabolismus, was im Prinzip durch Elektrophorese eines rohen Proteinextrakts erfassbar sein könnte. Zellfreie Extrakte, die mittels SDS-PAGE mit Coomassie-Anfärbung analysiert

wurden (siehe Experimentelles), zeigten tatsächlich einen deutlichen Unterschied der Proteinbanden zwischen mit trans-Ferulat gewachsenen Zellen und mit Vanillat gewachsenen Zellen (**Fig. 8**). Extrakte von mit trans-Ferulat gewachsenen Zellen zeigten eine neue oder sehr stark verstärkte Bande, die einem Polypeptid eines Molekulargewichts von etwa 31 kD entsprach.

**[0227]** Die Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuren dieses Polypeptids nach dessen Entfernung aus dem Gel durch Elektroblotting ergab die folgende Sequenz: Ser-Thr-Tyr-Glu-Gly-Arg-Trp-Lys-Thr-Val-Lys-Val-Glu-Ile-Gln-Asp-Gly-Ile-Ala-Phe (SEQ ID No: 13).

**[0228]** Die Reinigung der HMPHP-SCoA nutzenden Aktivität wurde durch Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC – Pharmacia) erreicht. Wie im Vorhergehenden beschrieben, wurden an den Fraktionen ein Screening auf Aktivität gegenüber HMPHP-SCoA unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Scanners durchgeführt; aktive Fraktionen wurden dann gepoolt und die Aktivität wurde dann sowohl gegenüber HMPHP-SCoA als auch trans-Feruloyl-SCoA ermittelt, wobei die Reaktionsprodukte mittels HPLC bestimmt wurden.

**[0229]** Die Ergebnisse der Reinigung sind in den Tabelle VI und VII angegeben. Vanillin und Acetyl-SCoA wurden in etwa äquimolaren Mengen während der ganzen Reinigung mit entweder HMPHP-SCoR oder trans-Feruloyl-SCoA als Substrat produziert. Es gab eine näherungsweise gemeinsame Reinigung der Aktivitäten mit trans-Feruloyl-SCoA und HMPHP-SCoA als Substrat, die die Bildung von Feruloyl-SCoA aus HMPHP-SCoA umfasste (Dehydratasereaktion; Umkehrung der Reaktion II): die aus trans-Feruloyl-SCoA Vanillin bildende Aktivität (Reaktionen II + III) wurde 11,5-fach gereinigt, die aus HMPHP-SCoA Vanillin bildende Aktivität (Reaktion III) wurde 11,7-fach gereinigt und die Dehydratasereaktion (Umkehrung der Reaktion II) wurde 9,1-fach gereinigt. Etwa 20 – 25 % jeder dieser Aktivitäten wurde schließlich gewonnen.

**[0230]** Tabelle VI: Reinigung des trans-Feruloyl-SCoA-Hydratase/-Aldol-Spaltungsenzym

**[0231]** Die Reinigung aus Zellen von *Ps. fluorescens* bi.ovar. V, Stamm AN103 wurde gemäß der Beschreibung in Experimentelles durchgeführt, wobei die Aktivität – Vanillin als Produkt – mit sowohl trans-Feruloyl-SCoA als auch HMPHP-CoA als Substrate ermittelt wurde. Die Werte in Klammern zeigen die Aktivität, wobei Acetyl-SCoA als Produkt ermittelt wurde.

#### Teil 1

Reini-gungs-stufe	Gesamtaktivität (nkat)		Gesamtprotein (mg)	spezifische Aktivität (nkat/mg)	
	trans-Feruloyl-SCoA	HMPHP-SCoA		trans-Feruloyl-SCoA	HMPHP-SCoA
Rohextrakt	85,2 (68,2)	59,2 (54,9)	20,5	4,16	2,89
Mono-Q-Fraktionen	80,6 (66,2)	45,1 (42,9)	4,37	18,4	10,3
Mono-P-Fraktionen	56,9 (51,9)	35,4 (33,4)	1,61	34,1	21,2
Phenyl-Superose-Fraktionen	22,1 (19,8)	15,5 (15,1)	0,46	48,0	33,7

Reini-gungs-stufe	Verhältnis der Aktivitäten	Reinigung (-fach)		Gewinnung (%)	
		trans-Feruloyl-SCoA	HMPHP-SCoA	trans-Feruloyl-SCoA	HMPHP-SCoA
Rohextrakt	1,44	1,00	1,00	100	100
Mono-Q-Fraktionen	1,79	4,42	3,56	94,6	76,2
Mono-P-Fraktionen	1,61	8,20	7,34	66,8	59,8
Phenyl-Superose-Fraktionen	1,42	11,5	11,7	25,9	26,2

**[0232]** Tabelle VII: HMPHP-SCoA-Dehydratase-Aktivität während der Reinigung des trans-Feruloyl-SCoA-Hydrtatase/Aldolspaltungsenzyms

**[0233]** Bedingungen und sonstige Daten wie Tabelle VI. Die Dehydratasereaktion wurde als die Feruloyl-SCoA-Produktion ermittelt.

Reini-gungs-stufe	Gesamt-aktivität (nkat)	spezifische Aktivität (nkat/mg)	Reinigung (-fach)	Verhältnis zur HMPHP-SCoA-Spaltungsaktivität*
Rohextrakt	171	8,34	1,00	2,89
Mono-Q-Fraktionen	121	27,7	3,32	2,69
Mono-P-Fraktionen	101	60,5	7,25	2,85
Phenyl-Superose-Fraktionen	34,9	75,9	9,10	2,25

\* siehe Tabelle VI

**[0234]** SDS-PAGE der vereinigten in jeder Stufe aktiven Fraktionen ergab die Verstärkung einer 31 kD-Proteinbande (**Fig. 8**), was die Reinigung zu scheinbarer Homogenität nach der Chromatographie auf Phenyl5uperose (Pharmacia) anzeigen. Diese Bande wanderte gemeinsam mit der mit dem Wachstum von Stamm AN103 auf trans-Ferulat verbundenen Bande und ergab die gleiche N-terminale Aminosequenz:

Ser-Thr-Tyr-Glu-Gly-Arg-Trp (SEQ ID No: 14).

**[0235]** Der definitive Beweis für die Katalyse der beiden Reaktionen II und III durch dieses Protein wurde als Ergebnis der Expression des Gens in Escherichia coli erhalten (siehe Beispiel 5).

**[0236]** Das Mono-P-gereinigte Enzym konnte als zu trans-Feruloyl-SCoA alternative Substrate trans-Caffeoyl-SCoA und trans-4-Cumaroyl-SCoA akzeptieren (Tabelle VIII).

**[0237]** Tabelle VIII. Nutzung von trans-p-Hydroxycinnamoyl-SCoA-Athioestern durch das trans-Feruloyl-SCoA-Hydratase/Aldolspaltungsenzym. Die Aktivität wurde bei 30 °C und mit 0,4 mM Substrat unter Verwendung des Enzyms von *Ps. fluorescens* AN103 (2,8 µg Enzymprotein, partiell gereinigt durch Mono-Q- und Mono-P-Chromatographie) wie bei Experimentelles beschrieben bestimmt.

Substrat	Aktivität (nkat/mg Protein)
Feruloyl-SCoA	0,60
Caffeoyl-SCoA	0,36
p-Cumaroyl-SCoA	0,72

Beispiel 5: Isolierung der für die Umwandlung von trans-Feruloyl-SCoA in Vanillinsäure (Vanillat) erforderlichen Gene in *Ps. fluorescens* Stamm AN103

**[0238]** Ein Stamm von *Ps. fluorescens* (biovar. AN103), der auf trans-Ferulasäure wachsen konnte, wobei er diese über Vanillin in Vanillinsäure umwandelt, wurde aus Erde am Institute of Food Research, Norwich Laboratory, isoliert. Der vorgeschlagene biochemische Pfad zur Umwandlung von trans-Ferulasäure in Vanillinsäure, der in **Fig. 1** angegeben ist, wurde bei den im Vorhergehenden beschriebenen Experimenten in den Experimenten 2 – 4 substanziert.

**[0239]** Um die zur Umwandlung von trans-Feruloyl-SCoA in Vanillinsäure erforderlichen Gene zu klonieren, wurde die Strategie der Komplementierung mutierter Derivate von *Ps. fluorescens* AN103, die zum Wachstum auf trans-Ferulat als einziger Kohlenstoffquelle unfähig waren, verwendet. Die Isolierung und Charakterisierung von Mutanten ist im Vorhergehenden in Beispiel 3 beschrieben, und die Mutanten Van 10 und Van 11 wurden zur Klonisolierung verwendet. Wie in Beispiel 3 beschrieben, schien diesen Mutanten ein an der Umwandlung von trans-Feruloyl-SCoA in Vanillin beteiligtes Gen zu fehlen.

**[0240]** Eine Genombibliothek von *Ps. fluorescens* AN103-DNA wurde in dem mobilisierbaren Cosmidklonierungsvektor pLAFR3 hergestellt (B. Staskawicz, D. Dahlbeck, N. Keen und C. Napoli, J. Bact. 169, 5789-5794 (1987)). Genomische DNA wurde aus *Ps. fluorescens* AN103 isoliert und mit Sau3A1 bei 37 °C 7 – 10 min partiell verdaut. Die DNA wurde dann auf einem NaCl-Gradienten (1,25 – 5 M) großenfraktioniert. Die DNA mit 20 – 40 kb enthaltene Fraktion wurde selektiert und 0,5 µg wurden in die dephosphorylierte BamH1-Stelle des Cosmidklonierungsvektors mit breitem Wirtsbereich pLAFR3 ligiert. Eine Hälfte des Ligationsgemisches wurde unter Verwendung eines Ligapack II XL Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in Bakteriophagen-Lambda-Partikel gepackt. Die gepackten Cosmide wurden in *Escherichia coli* Stamm 803 (W. B. Wood, J. Mol. Biol. 16, 118-133 (1966)) transfiziert. Etwa 10000 primäre Transfektanten wurden erhalten. Der erhaltene Zellrasen wurde von den Selektionsplatten abgewaschen und glycerinhaltige Stammlösungen wurden zur Aufbewahrung bei –70 °C hergestellt.

**[0241]** Die Genombibliothek von *Ps. fluorescens* AN103-DNA im Cosmid pLAFR3 wurde in die zwei mutierten *Ps. fluorescens*-Derivatstämme Van 10 und Van 11 unter Verwendung des Helferplasmids pRK2013 (D. Fugurski und D. R. Helinski, Proc Natl. Acad. Sci. USA 76, 1648-1652 (1979)) eingeführt. Die mutierten Stämme wurden in Minimal Medium MM, das 10 mM Vanillinsäure enthielt, überimpft und 2 Tage bei 25 °C inkubiert. Der das Helferplasmid tragende *Escherichia coli*-Stamm (E. coli 803pRK2013) wurde in LB-Mod-Medium (10 ml) überimpft und 6 h bei 37 °C inkubiert. Gleichzeitig wurden 0,1 ml der glycerinhaltigen Stammlösung der AN103-Genombibliothek in ähnlicher Weise überimpft und inkubiert. Das Wachstum aller drei Kulturen wurde durch Ermittlung von OD<sub>600</sub> überwacht und entsprechende Volumina wurden in einem Zentrifugenröhren ver-einigt, um gleiche Populationen der drei Organismen zu erhalten. Das Zellengemisch wurde zentrifugiert, in einem minimalen Volumen der überstehenden Lösung resuspendiert und auf einem sterilen, mit einem Gitter versehenen Cellulosenitratmembranfilter (47 mm Durchmesser, Whatman, Maidstone, Kent, UK) auf einer feuchten LB-Mod-Agarplatte ausgebreitet. Die Suspension wurde einige Minuten auf dem Filter an Luft trock-

nen gelassen und dann über Nacht bei 25 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann unter Verwendung von 2 ml H<sub>2</sub>O von dem Filter abgewaschen und Aliquots (0,1 ml) wurden auf Selektionsplatten appliziert, die aus MM-Agar mit 10 mM Vanillinsäure und 5 µg/ml Tetracyclin bestanden. Diese wurden 2 Tage bei 25 °C inkubiert, und die erhaltenen Kolonien (> 1000 pro Platte) wurden auf ähnliche Platten, die trans-Ferulasäure anstelle von Vanillinsäure enthielten, replikaplattiert; diese wurden in ähnlicher Weise inkubiert. Kolonien (2 – 3 pro Platte), die zu Wachstum auf den trans-Ferulasäure enthaltenden Platten fähig waren, wurden selektiert und in frisches MM-Medium, das 10 mM trans-Ferulasäure und 5 µg/ml Tetracyclin enthielt, überimpft. Vier derartige Isolate, bei denen die Mutation in den *Ps. fluorescens*-Stämmen Van 10 und Van 11 durch das eingeführte Cosmid komplementiert wurde, wurden zur weiteren Analyse selektiert. Diese Stämme wurden gereinigt, und die Cosmid-DNA wurde durch das Minipräparationsverfahren von F. G. Grosveld, H. H. M. Dahl, E. Deboer und R. A. Flavell (Gene 13, 227-231 1981)) extrahiert. Die Cosmid-DNA wurde in *E. coli*-Stamm 803 transformiert und erneut gemäß der Beschreibung bei D. S. Holmes und M. Quigley (Anal. Biochem. 114, 193-197 (1981)) isoliert. Zwei der Cosmidklone, pFI 793 und pFI 794, wurden als den mutierten Stamm Van 10 von *Ps. fluorescens* komplementierend isoliert, während die Cosmidklone pFI 795 und pFI 796 den mutierten Stamm Van 11 von *Ps. fluorescens* komplementierten.

**[0242]** Um zu testen, ob die Plasmidklone pFI 793, pFI 794, pFI 795 und pFI 796 eine der anderen *Ps. fluorescens*-Mutanten komplementieren, wurde jedes Plasmid in die *Ps. fluorescens*-Mutantenstämme Van 1, Van 2, Van 3, Van 10 und Van 11 eingeführt. Wie im Vorhergehenden im Beispiel beschrieben, scheint den Mutantenstämmen Van 1, Van 2 und Van 3 eine regulatorische Funktion zu fehlen, die mindestens zwei unterschiedliche Enzymaktivitäten eliminiert. Die *Ps. fluorescens*-Vanmutanten wurden zwei Tage bei 25 °C auf MMO + 10mM Vanillinsäure-Agarmedium gezüchtet. Der das Helferplasmid tragende Stamm (803pK2013) wurde über Nacht bei 37 °C auf LB-Mod-Agar + Kanamycin (25 µg/ml) gezüchtet. Die pFI 793, pFI 794, pFI 795 und pFI 796 tragenden *E. coli* 803-Cosmidklone wurden über Nacht bei 37 °C auf LB-Mod-Agarmedium + Tetracyclin (5 µg/ml) gezüchtet. Die Bakterien wurden einer Chargenreifung unterzogen (d. h. eine Öse von Donor-, Empfänger- und Helferstamm wurden auf LB-Mod-Agar zusammengemischt und über Nacht bei 25 °C inkubiert). Die Bakterien wurden auf Selektionsmedium (MMO + 10 mM trans-Ferulasäure + Tetracyclin und MMO + 10 mM Vanillinsäure + Tetracyclin) ausplattiert und zwei Tage bei 25 °C inkubiert. Alle vier Cosmidklone pFI 793, pFI 794, pFI 795 und pFI 796 komplementierten alle Vanmutanten (Van 1, Van 2, Van 3, Van 10 und Van 11), wodurch sie fähig wurden, auf Itrans-Ferulat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

**[0243]** Die Cosmidklon-DNAs wurden durch Verdauung mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Eco RI analysiert, um Insert-DNA festzustellen. Jeder der vier Klone pFI 793, pFI 794, pFI 795 und pFI 796 trug Inserts mit zwischen 20 und 30 kb. Die vier Cosmidklone ergaben unterschiedliche Restriktionsmuster, schienen jedoch einige Restriktionsfragmente der gleichen Größe zu teilen. Um den Cosmidklonen gemeinsame Restriktionsfragmente zu identifizieren, wurde das Cosmid pFI 793 als Sonde gegenüber DNA von allen vier Cosmid-DNA-Präparaten, die mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI zweifach verdaut worden waren, verwendet. Die Cosmid-DNA wurde unter Verwendung von Qiagen Midi Columns gemäß den Vorschriften der Hersteller isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI verdaut. Die gebildeten Fragmente wurden durch Agarosegelektrophorese getrennt und gemäß der Beschreibung bei Sambrook et al. (J. Sambrook, E. F. Fitzsch und T. Maniatis, Molecular Cloning• A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor, NY, 1989) einem Southern Blotting auf ein Hybond-N-Filter unterzogen. Die Cosmid-pFI 793-DNA wurde linearisiert, denaturiert und mit Digoxigenin markiert, bevor sie als Sonde für die Southern Blotting unterzogene DNA gemäß den Vorschriften von Boehringer (Lewes, Sussex, UK) verwendet wurde. Die PFI 793-Sonde hybridisierte mit allen EcoRI/PstI-Restriktionsfragmenten von pFI 795, was anzeigt, dass diese zwei Klone identisch sind. Die Vektorbande ausgenommen, schienen mindestens sechs EcoRI/PstI-Fragmente pFI 793, pFI 794, pFI 795 und pFI 796 gemeinsam zu sein. Dies waren die Fragmente mit .6,6 kb, 2,9 kb, 1,8 kb, 1,4 kb, 1,25 kb und 1,1 kb. Das 1,25 kb-Fragment schien ein Dublett oder Triplett zu sein. Die DNA-Fragmentmuster der vier Cosmidklone nach der Restriktionsverdauung mit EcoRI/PstI sind in **Fig. 9** angegeben. Der Klarheit wegen sind die Ethidiumbromid-angefärbten DNA-Banden als Diagramm dem ursprünglichen Agarosegel überlagert.

**[0244]** Wie im Vorhergehenden in Beispiel 4 beschrieben zeigte die Proteinanalyse von *Ps. fluorescens* biovar. V, Stamm AN103, dass auf trans-Ferulat gewachsene Zellen im Vergleich zu auf Vanillinsäure gewachsene Zellen viel größere Mengen eines Protein von etwa 31 kD enthielten. Die 20 N-terminalen Aminosäuren dieses Proteins wurden sequenziert. Diese Aminosäuresequenz wurde dann zur Modellierung entarteter Oligonucleotidprimer verwendet, die eine Amplifizierung der 60-bp-Sequenz von DNA mit Codierung für diesen N-Terminus von pFI 793 mittels PCR ermöglichten (**Fig. 10**). Diese Sequenz wurde zur Sondierung von Eco-RI/PstI-Verdau der Cosmidklone verwendet. Durch diese Technik konnte das die Region von DNA mit Codierung für das 31-kD-Protein enthaltende Fragment in jedem der Cosmidklone identifiziert werden (**Fig. 11**). Dies

erwies sich als ein Fragment mit 6 kb in den Cosmiden pFI 793 und pFI 795, ein Fragment mit 4,3 kb in Cosmid pFI 794 und ein Fragment mit 5,5 kb in Cosmid pFI 796.

**[0245]** Das 4,3-kb-EcoRI/PstI-Fragment von pFI 794 wurde unter Verwendung des Stamms XLI(Blue) in den *E. coli*-Vektor pUC19 subkloniert, und dessen Nucleotidsequenz wurde unter Verwendung eines Applied Bio-systems DNA-Sequencers (Modell 373, Perkin Elmer, Warrington, UK) zusammen mit den Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit des Herstellers bestimmt. Eine Primer Walking-Strategy wurde mit Oligonucleotidprimern, die auf einem ABI 392-Synthesizer (Perkin Elmer, Warrington, UK) synthetisiert wurden, verwendet. Die DNA-Sequenz des 4,3 kb-Fragments ist in **Fig. 12** angegeben. Das offene Leseraster mit Codierung für den gleichen Aminotermminus, der bereits bestimmt wurde, beginnt bei Position 2872 und wird durch ein Stopcodon an Position 3700 beendet. Dieses offene Leseraster von 828 bp codiert für ein Protein eine Länge von 276 Aminosäuren mit einer Molekülgröße von 31,010 kD in guter Übereinstimmung mit der Proteingelanalyse. Die translatierte Aminosäuresequenz dieses Gens ist auch in **Fig. 12** angegeben. Um die Funktion dieses Gels festzustellen, wurde es subkloniert und in *E. coli* exprimiert. Ausgehend von der DNA-Sequenz wurden PCR-Primer modelliert, um das Gen derart zu amplifizieren, dass es durch die Restriktionsendonukleasestellen EcoRI und BamHI flankiert wurde. Das amplifizierte Gen behielt dessen native Ribosombindungsstelle, die bei Base -29 begann und 6 bp stromabwärts des Stopcodons endete, bei. Das amplifizierte Fragment wurde in die äquivalenten Stellen des *E. coli*-Expressionsvektors pSP72 (Promega, Southampton, UK) kloniert und in *E. coli* JM109 (DE3) transformiert.

**[0246]** Die das Hydratase/Spaltungsenzymgen tragenden *E. coli* 803-Klone + ein vermutlicher Promotor wurden als PCR-Produkt im Vektor pRK415 in einem drei Ausgangsstoffe umfassenden Teileverbindungsexperiment im Wesentlichen gemäß der früheren Beschreibung in Bezug auf die Komplementierung durch die Cosmidklone pFI 793-6 verwendet. Es wurde gezeigt, dass der komplementierte Van 10-Stamm die Fähigkeit zum Wachsen auf trans-Ferulasäure zurückgewonnen hatte, was direkt bestätigt, dass die Mutation in Van 10 in dem Gen mit Codierung für das trans-Feruloyl-SCoA-Hydratase/Spaltungsenzym saß.

**[0247]** Das Vorhandensein einer neuen Enzymaktivität (vergleiche Beispiel 4) in dem *E. coli*-Klon wurde aufgezeigt. *E. coli*-Zellen wurden 3 h bei 37 °C in 50 ml L-Medium, das Ampicillin (50 µg/ml) enthielt, mit und ohne Induktion durch IPTG gezüchtet. Extrakte wurden wie im Vorhergehenden in Beispiel 2 für *Ps. fluorescens* AN103 beschrieben, jedoch ohne Zentrifugation hergestellt. Der Rohextrakt wurde für den Test verwendet. Die Enzymaktivität gegenüber sowohl HMPHP-SCoA als auch trans-Feruloyl-SCoA wurde wie im Vorhergehenden in Beispiel 4 unter Verwendung von HPLC zur Bestimmung der Reaktionsprodukte bestimmt. Die in Tabelle IX angegebenen Ergebnisse zeigen klar, dass Vanillin und Acetyl-SCoA in äquimolaren Verhältnissen sowohl mit trans-Feruloyl-SCoA als auch mit HMPHP-SCoA als Substrat produziert wurden. Außerdem wurde HMPHP-SCoA auch zu Feruloyl-SCoA, vermutlich trans-Feruloyl-SCoA, dehydratisiert, was die Umkehrung der Aktivität II zeigt. Diese Ergebnisse sind sehr ähnlich denen, die mit dem Vanillin bildenden Spaltungsenzym, das aus *Ps. fluorescens* AN103 gereinigt wurde, erhalten wurden, obwohl die Verhältnisse der Aktivitäten gegenüber trans-Feruloyl-SCoA und HMPHP-SCoA zwischen den zwei Präparaten leicht unterschiedlich sind. Es gab keine Aktivität gegenüber entweder trans-Feruloyl-SCoA oder HMPHP-SCoA in Extrakten eines nicht-manipulierten *E. coli*-Stamms, ungeachtet dessen, ob sie induziert wurde oder nicht. In dem manipulierten Stamm *E. coli* 1039, der das *Pseudomonas*-Gen exprimiert, war die spezifische Aktivität in dem nach einer Induktion hergestellten Extrakt etwas niedriger als in dem aus nicht-induzierten Bakterien hergestellten. Da der Test nur aktives Enzym ermittelt, ist begreiflich, dass eine erhöhte Proteinexpression bei einer Induktion erfolgt, doch kann dies zu einem nicht-korrekt gefalteten und daher inaktiven Enzym führen. Ein visueller Nachweis der Expression des 31 kD-Proteins auf Coomassie-angefärbten eindimensionalen SDS-Gelen war wegen dessen gleichzeitiger Wanderung mit der stark exprimierten β-Lactamase, die durch den Ampicillinresistenzmarker des Vektors codiert wird, nicht möglich.

**[0248]** Tabelle IX: Expression des trans-Feruloyl-SCoA-Hydratase/ Aldolspaltungsenzyms in *Escherichia coli*

**[0249]** Das Enzym wurde wie in Beispiel 2 beschrieben extrahiert und die Aktivität wurde wie in Beispiel 4 beschrieben bestimmt, wobei trans-Feruloyl-SCoA (0,28 mM) und HMPHP-SCoA (0,4 mM) als Substrate verwendet wurden. Die Reaktionsgemische enthielten etwa ca. 10 µg Protein.

n.d. - nicht nachweisbar

<i>E. coli</i> -Zelllinie	spezifische Aktivität (nkat/mg Protein)				
	trans-Feruloyl-SCoA als Substrat	HMPHP-SCoA als Substrat			
			Vanillinbildung	Acetyl-SCoA-Bildung	Feruloyl-SCoA-Bildung
Kontrolle	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kontrolle (induziert)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1039	1,53	1,80	1,52	1,80	3,35
1939 (induziert)	1,24	1,34	1,27	1,46	3,16

**[0250]** Die DNA stromwärts des Gens mit Codierung für das 31 kD-Protein wurde als Ziel zur Klonierung und Sequenzierung und zur Analyse zusätzlicher offener Leseraster gewählt. Eine durch PCR-erzeugte Sonde wurde zur Identifizierung eines überlappenden Xhol-Fragments mit 1,5 kb verwendet. Die Sequenzierung von diesem Fragment und anschließend direkt von dem Ausgangscosmidklon pFI794 ergab ein zweites offenes Leseraster mit 1449 bp mit Beginn bei Base 3804. Die Translation dieser Nucleotidsequenz ergab ein Polypeptid mit 483 Aminosäuren. Der Vergleich mit Sequenzen in den Datenbanken ergab eine beträchtliche Homologie mit Salicylaldehyd:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase.

**[0251]** Um die Funktion dieses Gens festzustellen, wurde die Expression in *E. coli*-Stamm DH5, der den Vektor pUC18 enthielt, in den das offene Leseraster voller Länge derart insertiert worden war, dass die Expression ausgehend von lac-Promotor auf dem Vektor erfolgte, bestimmt. Vanillin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase-Aktivität wurde festgestellt, und sie fehlte bei einem Kontrollstamm, der den nicht-modifizierten pUC-18-Vektor trug. Unter Verwendung des in Beispiel 2 beschriebenen Enzymtests wurde die Aktivität mit Vanillin als Substrat als 3,0 nkat/mg Protein bestimmt; die Aktivität mit Salicylaldehyd betrug 2,8 nkat/mg.

**[0252]** Eine zusätzliche Sequenzanalyse von DNA, die aus *Ps. fluorescens* AN103 kloniert wurde, wurde unter Verwendung des Cosmidklons pFI 793 unternommen. Die EcoRI/PstI-Fragmente mit 1,8, 0,9 und 0,8 kb wurden in den *E. coli*-Vektor pUC18 subkloniert, und deren Nucleotidsequenzen wurden bestimmt. Die Sequenzierung der 0,9-kb-Subklone ergab, dass zwei unterschiedliche Fragmente der gleichen Größe vorhanden sind. Die Nucleotidsequenzen von DNA-Fragmenten mit 1837 bp, 960 bp, 959 bp und 854 bp in den Subklonen pFI 901, pFI 912, pFI 913 bzw. pFI 911 sind in **Fig. 13** bis 16 angegeben. Outward Reading PCR-Primer wurden von den Enden von jeder der vier Sequenzen wie in **Fig. 17** angegeben gestaltet. Die Verwendung dieser Primer in jeder möglichen paarweisen Kombination mit pFI 793 als Templat zeigte, dass das 1,8 kb-Fragment von pFI 901 von dem 959 bp-Fragment von pFI 913 durch 1,5 kb auf der Cosmid-DNA getrennt war (**Fig. 18**). Die direkte Sequenzanalyse dieses 1,5-kb-PCR-Produkts ermöglichte die Verschmelzung von diesem mit dem 1,8-kb- und 959-bp-Fragment zu einem größeren Fragment von 4,3 kb (**Fig. 19**).

**[0253]** Beispiel 6: Produktion von Vanillin aus trans-Feruloyl-SCoA und den Enzymaktivitäten II und III

**[0254]** trans-Feruloyl-SCoA wurde wie in Beispiel 2 beschrieben synthetisiert und als Substrat des trans-Feruloyl-SCoA-Hydratase/Aldolspaltungsenzyms (d. h. ein einziges Polypeptid mit den Enzymaktivitäten II und III), das durch das in Beispiel 4 beschriebene Verfahren gereinigt wurde, verwendet. Vanillin wurde aus trans-Feruloyl-SCoA produziert.

## Beispiel 7: Transgene Tabakpflanze, die Vanillin produziert

**[0255]** Nicotiana tabacum (Tabak) wird unter Verwendung eines Stamms von Agrobacterium tumefaciens, der so modifiziert wurde, dass er das Ps. fluorescens-Gen mit Codierung für die Enzymaktivitäten II und III (siehe Beispiel 5) auf die Tabakpflanze überträgt, transformiert. Die Tabakpflanze produziert Vanillin in den Teilen der Pflanze, in denen trans-Feruloyl-SCoA vorhanden ist, zumindest in der Form eines Vanillinglycosids.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Vanillin, umfassend:

- (1) Bereitstellen von trans-Feruloyl-SCoA;
- (2) Bereitstellen von trans-Feruloyl-SCoA-Hydrataseaktivität (Enzymaktivität II) und HMPHP-SCoA-Spaltungsaktivität (Enzymaktivität III); und
- (3) Abtrennen von Vanillin von den anderen Reaktionskomponenten.

2. Verfahren zur Herstellung von Vanillin gemäß Anspruch 1, wobei trans-Feruloyl-SCoA von Stufe (1) durch Bereitstellen von trans-Ferulasäure oder eines Salzes derselben und trans-Ferulat:CoASH-Ligaseaktivität (Enzymaktivität I) bereitgestellt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei ein Mittel zur Umwandlung von Vanillin in ein Nichtvanillinprodukt nicht vorhanden oder verringert ist.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei die Enzymaktivitäten I, II und III durch Pseudomonas fluorescens biovar. v, Stamm AN103, der nach dem Budapest Treaty bei National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited, Scotland unter der Hinterlegungsnr. NCIMB 40783 hinterlegt ist, oder eine Mutante oder Variante desselben bereitgestellt werden.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei die Enzymaktivitäten I, II und III durch ein von intakten Zellen freies System von Pseudomonas fluorescens biovar. V, Stamm AN103, der nach dem Budapest Treaty bei National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited, Scotland unter der Hinterlegungsnr. NCIMB 40783 hinterlegt ist, oder einer Mutante oder Variante desselben bereitgestellt werden.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, das ferner die Stufe (4) Bereitstellen von einem der Cofaktoren Coenzym ASH, ATP oder  $Mg^{2+}$  oder anderen funktional äquivalenten Cofaktoren umfasst.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei einer der beiden Cofaktoren Coenzym ASH und ATP wiederaufbereitet oder erzeugt wird.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei Coenzym ASH unter Verwendung der Enzyme Citralsynthase und Citratlyase wiederaufbereitet wird.

9. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei ATP unter Verwendung der Enzyme Adenylatkinase und Acetatkinase erzeugt wird.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, wobei die trans-Ferulasäure oder ein Salz derselben durch Einwirken von trans-Ferulasäure-Esterase auf Pflanzenmaterial, wobei das Pflanzenmaterial einen Ester von trans-Ferulasäure enthält, bereitgestellt wird.

11. Verfahren zur Herstellung von Vanillin, das die Stufen (1) und (2) und optional (3) von Anspruch 1 umfasst, wobei mindestens eine der Enzymaktivitäten von trans-Feruloyl-SCoA-Hydratase- und HMPHP-SCoA-Spaltungsenzymaktivitäten durch ein im Wesentlichen gereinigtes Enzym bereitgestellt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, das ferner die Stufe des Bereitstellens einer von trans-Ferulasäure verschiedenen Verbindung oder eines Salzes derselben, die bzw. das ein Substrat für eine der Enzymaktivitäten I, II oder III ist und durch eine der Enzymaktivitäten I, II oder III in ein gewünschtes Produkt umgewandelt werden kann, umfasst, wobei die Verbindung beliebig trans-4-Cumarinsäure oder ein Salz derselben, trans-4-Cumaroyl-S-CoA, trans-Kaffeesäure oder ein Salz derselben, trans-Caffeoyl-SCoA oder 3,4-Methylendioxy-trans-zimtsäure oder ein Salz derselben ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Verbindung trans-4-Cumarinsäure oder ein Salz derselben

oder trans-4-Cumaroyl-SCoA ist.

14. Pseudomonas fluorescens biovar. V, Stamm AN103, der nach dem Budapest Treaty bei National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited, Scotland unter der Hinterlegungsnr. NCIMB 40783 hinterlegt ist, oder eine Mutante oder Variante desselben.

15. Mutante von Pseudomonas fluorescens biovar. V, Stamm AN103, gemäß Anspruch 14, die Vanillin an- sammelt, wenn sie mit trans-Ferulasäure oder einem Salz derselben versorgt wird.

16. Isoliertes Polypeptid, das die folgende Aminosäuresequenz umfasst:

**MetSerThrTyrGluGlyArgTrpLysThrValLysValGluIleGluAspGlyIleAla  
PheValIleLeuAsnArgProGluLysArgAsnAlaMetSerProThrLeuAsnArgGlu  
MetIleAspValLeuGluThrLeuGluGlnAspProAlaAlaGlyValLeuValLeuThr  
GlyAlaGlyGluAlaTrpThrAlaGlyMetAspLeuLysGluTyrPheArgGluValAsp  
AlaGlyProGluIleLeuGlnGluLysIleArgArgGluAlaSerGlnTrpGlnTrpLys  
LeuLeuArgMetTyrAlaLysProThrIleAlaMetValAsnGlyTrpCysPheGlyGly  
GlyPheSerProLeuValAlaCysAspLeuAlaIleCysAlaAspGluAlaThrPheGly  
LeuSerGluIleAsnTrpGlyIleProProGlyAsnLeuValSerLysAlaMetAlaAsp  
ThrValGlyHisArgGlnSerLeuTyrTyrIleMetThrGlyLysThrPheGlyGlyGln  
LysAlaAlaGluMetGlyLeuValAsnGluSerValProLeuAlaGlnLeuArgGluVal  
ThrIleGluLeuAlaArgAsnLeuLeuGluLysAsnProValValLeuArgAlaAlaLys  
HisGlyPheLysArgCysArgGluLeuThrTrpGluGlnAsnGluAspTyrLeuTyrAla  
LysLeuAspGlnSerArgLeuLeuAspThrGluGlyGlyArgGluGlnGlyMetLysGln  
PheLeuAspAspLysSerIleLysProGlyLeuGlnAlaTyrLysArg**

(SEQ ID NO: 2) oder ein Fragment oder eine Variante desselben, das trans-Feruloyl-SCoA-Hydratase- und HMPHP SCoA-Spaltungsenzymaktivitäten aufweist.

17. Polypeptid gemäß Anspruch 16, das im Wesentlichen rein ist.

18. Isoliertes Polynucleotid, das für ein Polypeptid gemäß der Definition in den Ansprüchen 16 oder 17 codiert.

19. Cosmid pFI 793, das nach dem Budapest Treaty bei National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited, Scotland unter der Hinterlegungsnr. NCIMB 40777 hinterlegt wurde, oder ein Polynucleotid, das mindestens einen Teil der Pseudomonas fluorescens-DNA, die in dem Cosmid enthalten ist, oder ein Fragment oder eine Variante derselben umfasst, das für ein Polypeptid, das die in Anspruch 1 definierten Enzymaktivitäten II und III aufweist, codiert.

20. Polynucleotid gemäß Anspruch 18 oder 19, das die folgende Nucleotidsequenz umfasst:

ATGAGCACATACGAAGGTCGCTGGAAAACGGTCAAGGTCGAAATCGAAGACGGCATCGCG  
 TTTGTCATCCTCAATCGCCCGGAAAAACGCAACCGCATGAGCCGACCCCTGAACCGCGAG  
 ATGATCGATGTTCTGGAAACCTCGAGCAGGACCCCTGCCGCCGTGTGCTGGTGTGACC  
 GGTGCGGGCGAAGCCTGGACCGCAGGCATGGACCTCAAGGAATACTTCCGCGAAGTGGAC  
 GCCGGCCCGGAAATCCTCCAGGAAAAAAATCCGCCGGAAGCCTCGCAATGGCAATGGAAA  
 CTGCTGCGCATGTACGCCAAGCCGACCATGCCATGGTCAATGGCTGGTGTGCTCGCGGC  
 GGTTTCAGCCCCTGGTGGCCTGCGACCTGGCGATCTGCGCCGACGAAGCAACCTTCGGT  
 CTCTCGGAAATCAACTGGGTATCCCGCCGGCAACCTGGTGAGCAAGGCCATGGCCGAC  
 ACCGTGGGCCACCGCCAGTCGCTCTACTACATCATGACCGGCAAGACCTTCGGTGGGCAG  
 AAAGCCGCCGAGATGGGCCTGGTCAACGAAAGCGTGCCCTGGCGCAACTGCGCGAAGTC  
 ACCATCGAGCTGGCGCGTAACCTGCTCGAAAAAAACCCGGTGGTGCTGCGTGGGCCAAA  
 CACGGTTCAAACGCTGCCGGAACCTGACCTGGGAGCAGAACGAGGATTACCTGTACGCC  
 AAGCTCGATCAGTCGCGTTGCTGGACACCGAAGGCGGTGCGAGCAGGGCATGAAGCAA  
 TTCCCTCGACGACAAGAGCATCAAGCCTGGCCTGCAAGCGTATAAACGC

(SEQ ID NO: 1) oder ein Fragment oder eine Variante desselben, das bzw. die mit dem angegebenen Polynucleotid unter hochstringenten Bedingungen hybridisiert.

21. Nucleinsäurevektor, der ein Polynucleotid gemäß einem der Ansprüche 18 bis 20 umfasst.
22. Wirtszelle, die ein Polynucleotid gemäß der Definition in einem der Ansprüche 18 bis 20 oder eine Nucleinsäure, die für eines der Polypeptide gemäß der Definition in Anspruch 16 oder 17 codiert, umfasst.
23. Wirtszelle gemäß Anspruch 22, die ein Bacterium oder eine Hefe ist.
24. Wirtszelle gemäß Anspruch 23, die ein Bacterium oder eine Hefe von Nahrungsmittelqualität ist.
25. Wirtszelle gemäß Anspruch 24, die eine Lactococcus spp. oder eine Lactobacillus spp. oder Saccharomyces cerevisiae oder eine Biovarität desselben ist.
26. Wirtszelle gemäß Anspruch 25, die eine Pflanzenzelle ist.
27. Wirtszelle gemäß Anspruch 26, wobei die Pflanzenzelle eine Zelle von einer der Arten von Nicotiana spp., Solanum tuberosum, Brassica spp., Beta spp., Capsicum spp. und Vanilla spp. ist.
28. Wirtszelle gemäß Anspruch 26 oder 27, wobei die Zelle in einer Pflanze enthalten ist.
29. Verfahren nach Anspruch 1 bis 13, wobei die Enzymaktivitäten II und III durch die Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 22 bis 28 oder eine transgene Pflanze gemäß einem der Ansprüche 36 bis 38 oder 40 oder einen Extrakt derselben bereitgestellt werden.
30. Verfahren gemäß den Ansprüchen 2 bis 13, wobei die Enzymaktivitäten I, II und III durch einen Mikroorganismus, der trans-Ferulasäure in Vanillin umwandeln kann, bereitgestellt werden.
31. Verwendung von Pseudomonas fluorescens biovar. V, Stamm AN103 oder einer Mutante oder einem Derivat desselben, oder einem Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 16 oder 17, oder einem Polynucleotid gemäß einem der Ansprüche 18 bis 21, oder einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 22 bis 28, oder einer transgenen Pflanze gemäß einem der Ansprüche 36 bis 38 oder 40 zur Herstellung von Vanillin oder Vanillin-

säure oder einem Salz derselben und/oder zur Umwandlung einer Verbindung (die von trans-Ferulasäure oder einem Salz derselben verschieden ist), die ein Substrat für das Polypeptid ist und durch das Polypeptid in ein gewünschtes Produkt umgewandelt werden kann, wobei die Verbindung beliebig trans-4-Cumarinsäure oder ein Salz derselben, trans-4-Cumaroyl-S-CoA, trans-Kaffeesäure oder ein Salz derselben, trans-Caffeoyl-SCoA oder 3,4-Methyldioxy-trans-zimtsäure oder ein Salz derselben ist.

32. Verwendung gemäß Anspruch 31, wobei das gewünschte Produkt ein Duftstoff oder Aroma ist.

33. Verwendung gemäß Anspruch 31 oder 32, wobei die Verbindung beliebig trans-4-Cumaroyl-SCoA oder trans-Caffeoyl-SCoA ist.

34. Nahrungsmittel oder Getränk, das eine Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 22 bis 28 und/oder eine transgene Pflanze gemäß Anspruch 36 bis 38 oder 40 oder einen Teil oder ein Extrakt der Wirtszelle oder transgenen Pflanze umfasst.

35. Gen, das in der *Pseudomonas fluorescens*-DNA des Cosmid-Clons pFI793 gemäß der Definition in Anspruch 19 enthalten ist, oder eine Variante desselben, das bzw. die für ein Protein codiert, das bei einem Verfahren zur Herstellung von Vanillin verwendbar ist, wobei das Verfahren die Stufen

(1) Bereitstellen von trans-Ferulasäure oder einem Salz derselben und

(2) Bereitstellen von trans-Ferulat:CoASH-Ligaseaktivität (Enzymaktivität I), trans-Feruloyl-SCoA-Hydrataseaktivität (Enzymaktivität II) und 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxy-propionyl-SCoA (HM-PHP-SCoA)-Spaltungsaktivität (Enzymaktivität III) umfasst.

36. Transgene Pflanze, die transgen hinsichtlich eines Polynucleotids, das für mindestens eine der Enzymaktivitäten I, die in Anspruch 2 definiert ist, II und III, die in Anspruch 1 definiert sind, codiert, ist.

37. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 36, die infolge des Vorhandenseins des Polynucleotids die Enzymaktivitäten II und III, die in Anspruch 1 definiert sind, exprimiert.

38. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 36, wobei die Enzymaktivitäten II und III, die in Anspruch 1 definiert sind, an einer Stelle in der Pflanze, die 4-trans-Cumaroyl-SCoA enthält, exprimiert werden.

39. Transgene Pflanze gemäß einem der Ansprüche 36 bis 38, die durch das Vorhandensein eines Transgens p-Hydroxybenzoësäure produzieren kann.

40. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 36, wobei die Pflanze aus *Nicotiana* spp., *Solanum tuberosum*, *Brassica* spp., *Beta* spp., *Capsicum* spp. und *Vanilla* spp. ausgewählt ist.

41. Verfahren zur Herstellung von p-Hydroxybenzoësäure oder einem β-D-Glykosid oder einen β-D-Glycoseester derselben unter Verwendung einer transgenen Pflanze gemäß einem der Ansprüche 36 bis 40.

Es folgen 27 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

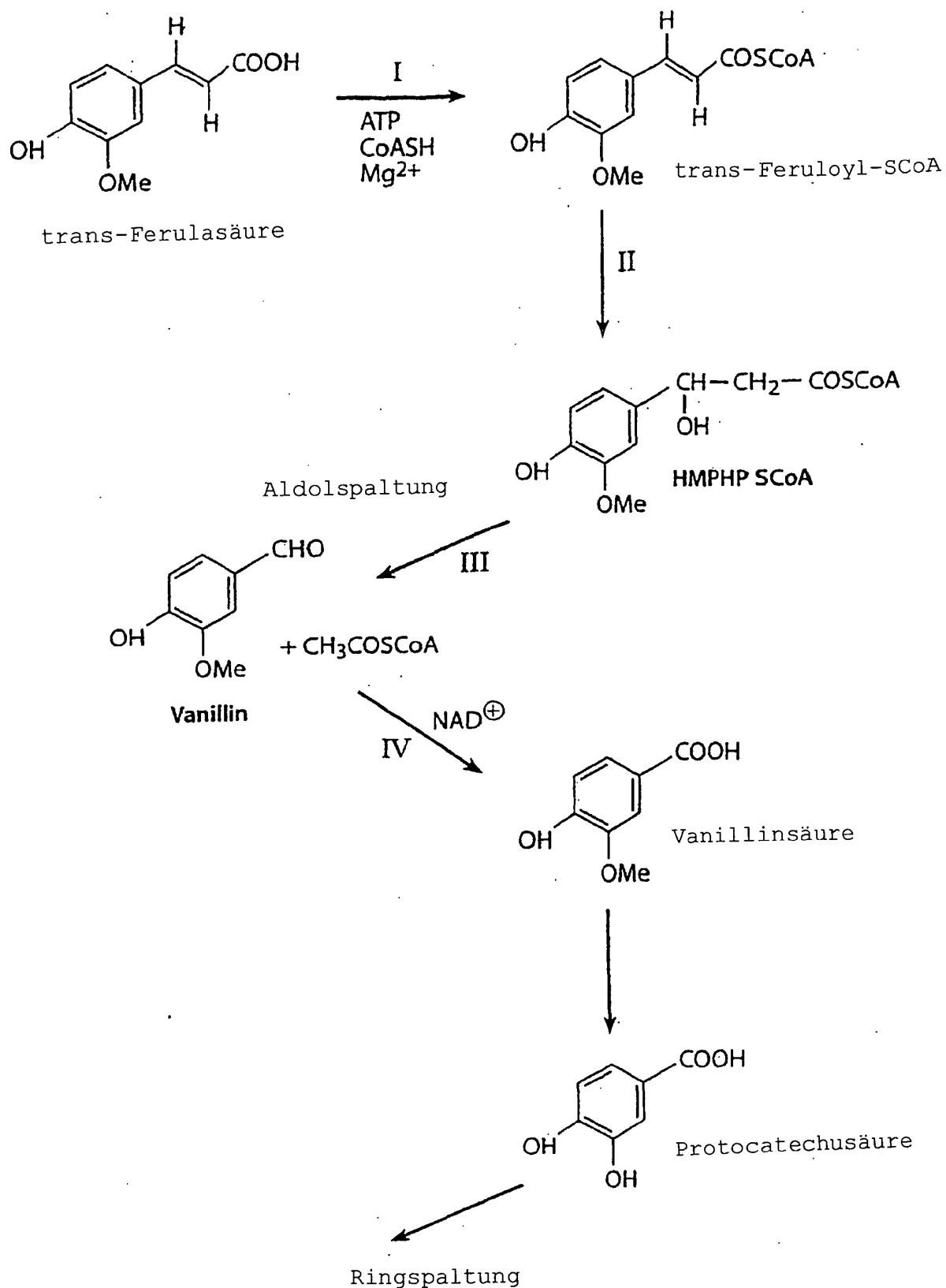
Vanillin-Pfad in *Ps. fluorescens*, biovar. V, Stamm AN103

Fig. 1

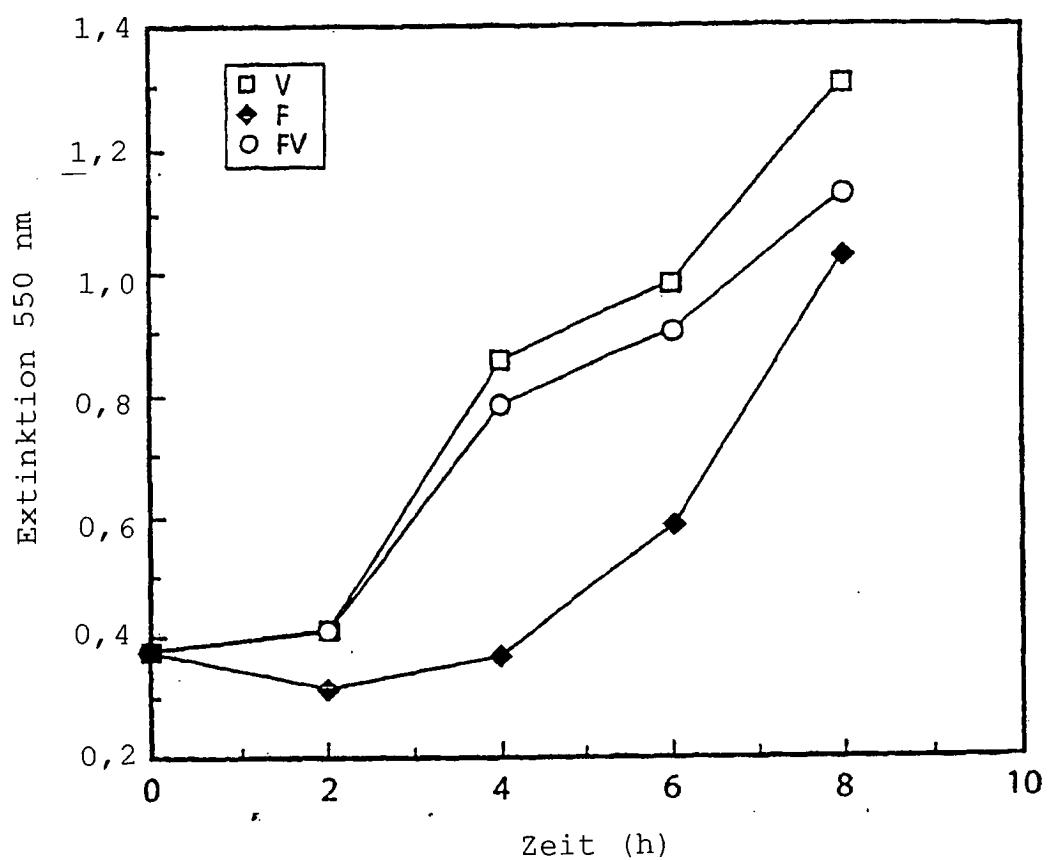


Fig. 2

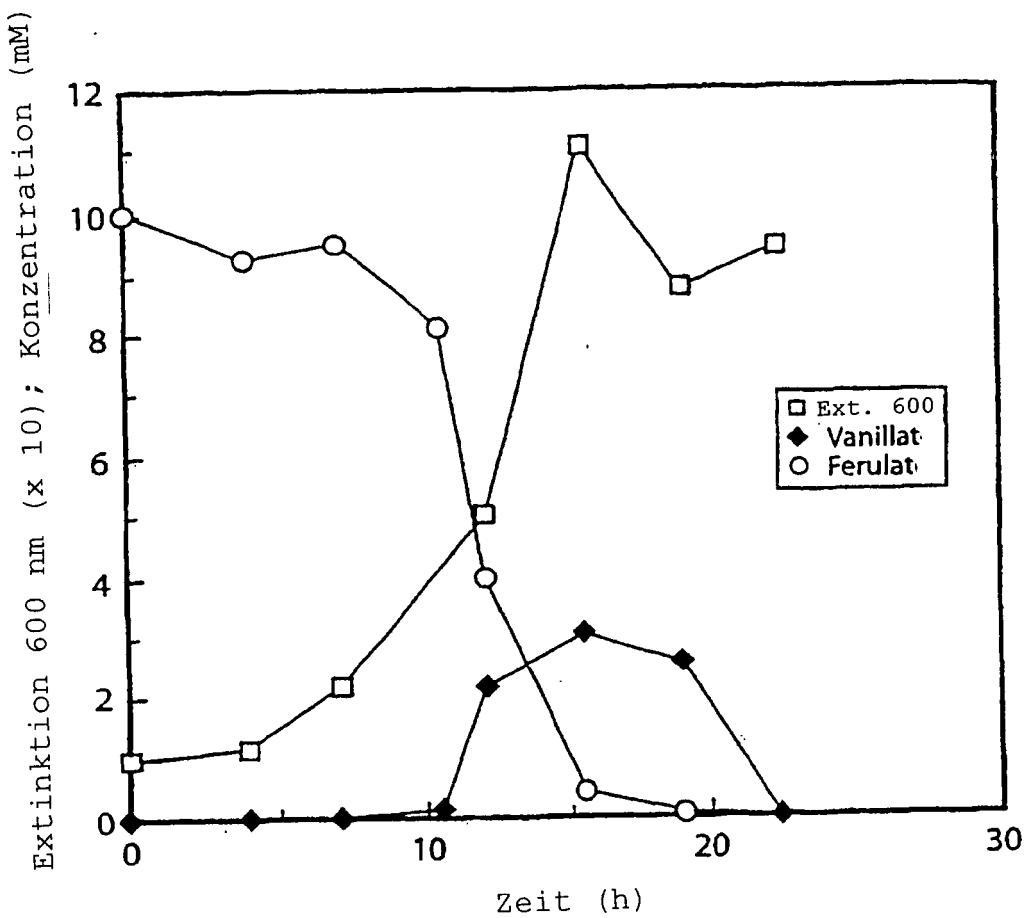


Fig. 3

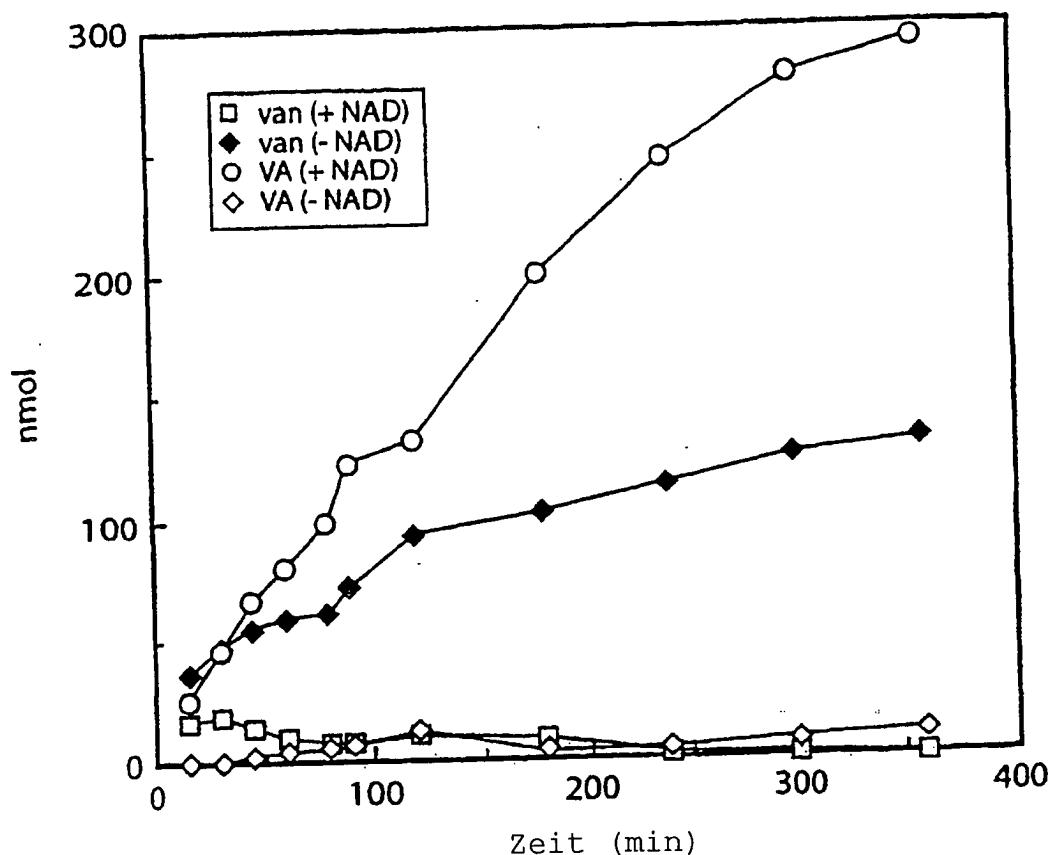


Fig. 4

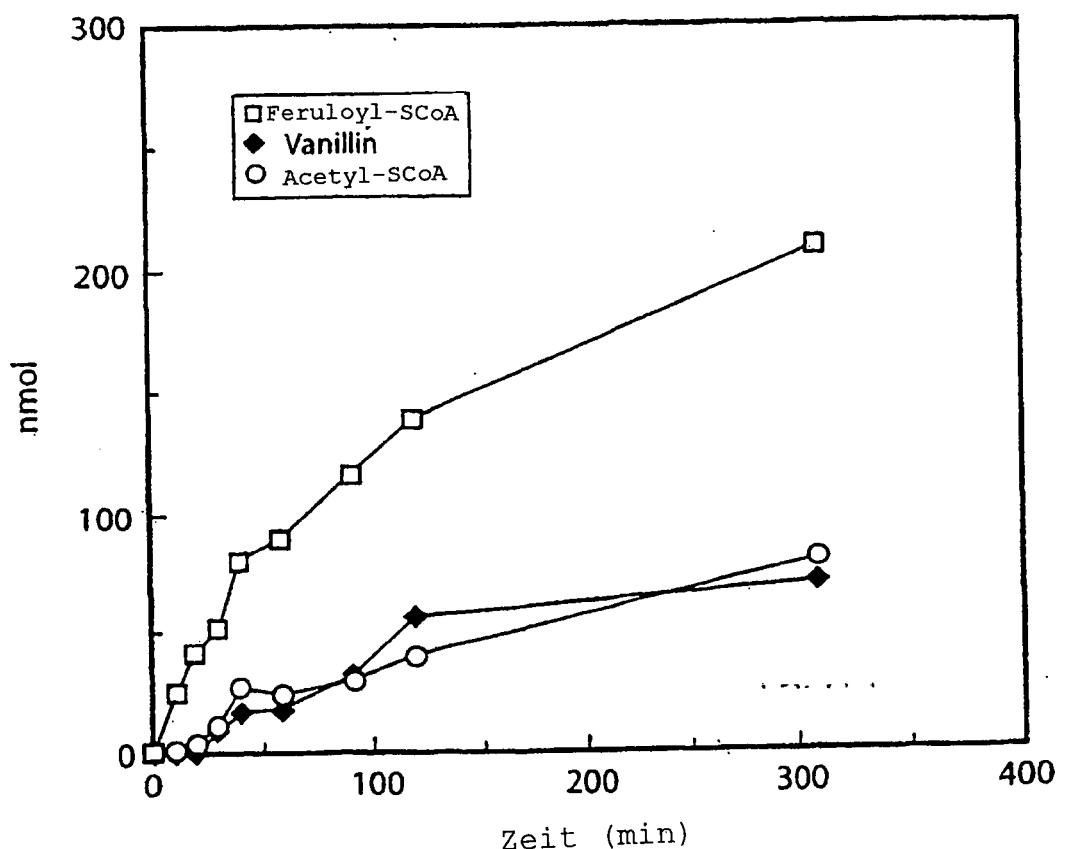


Fig. 5

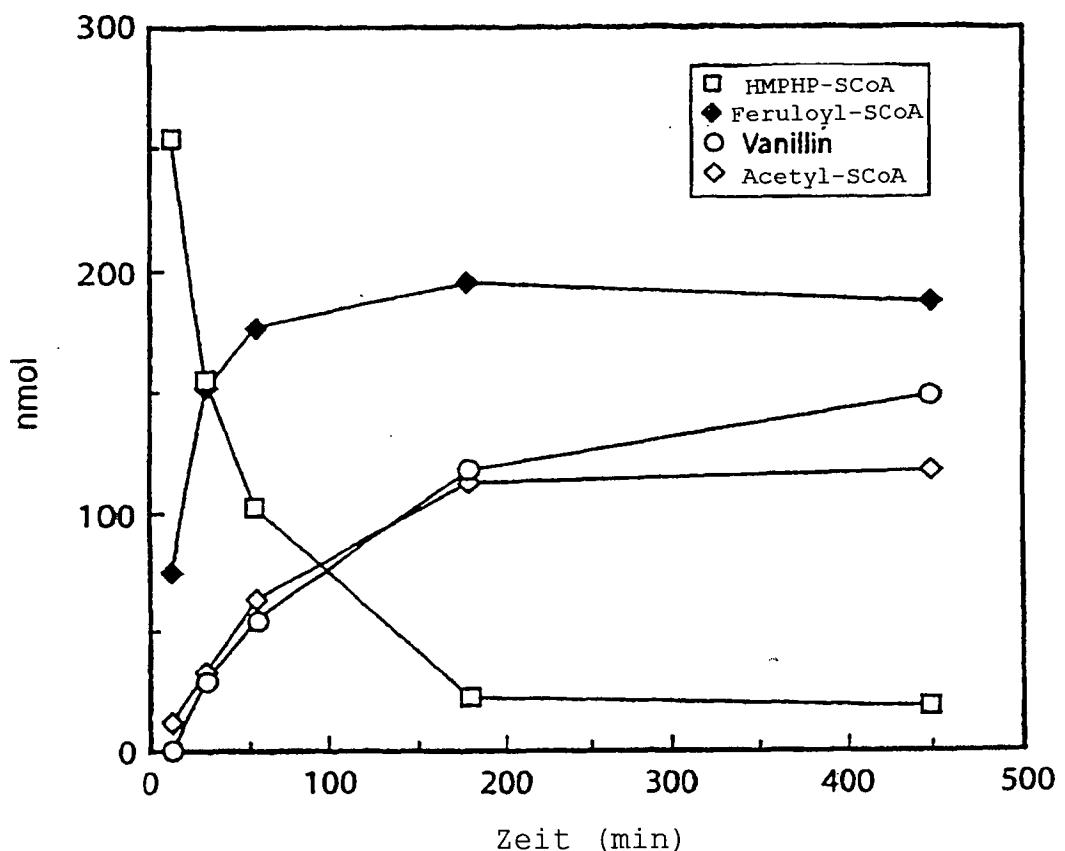


Fig. 6

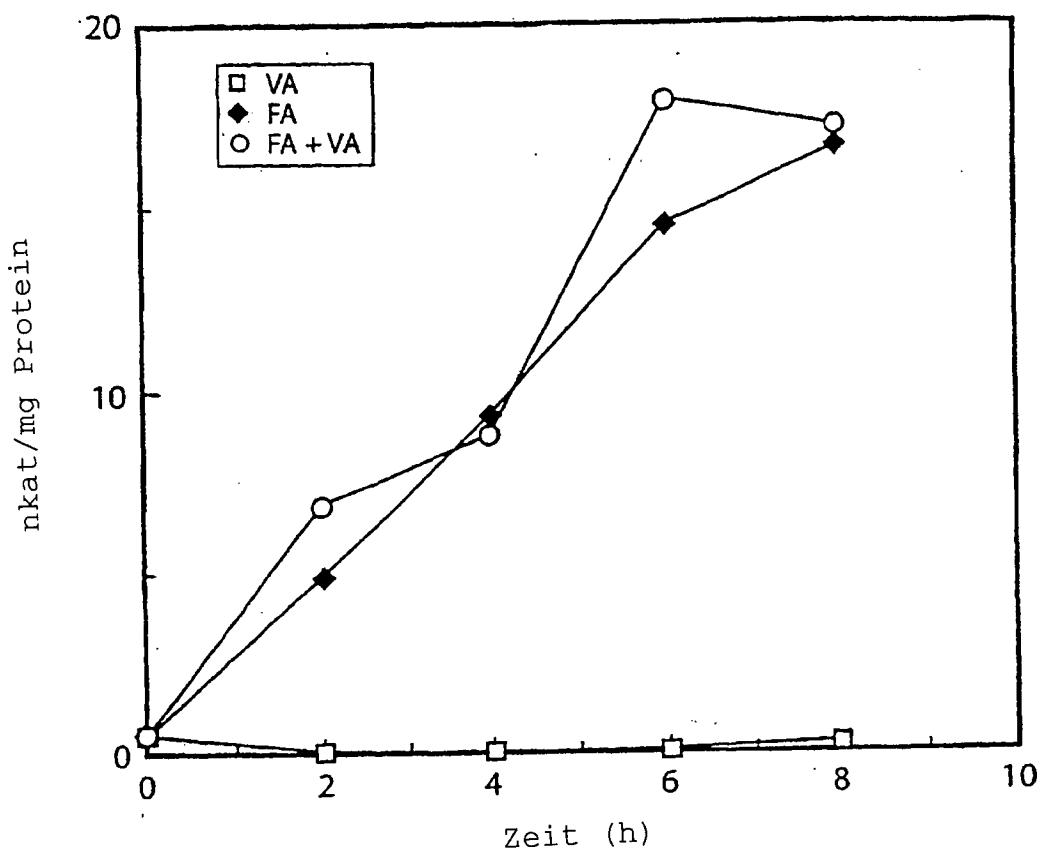
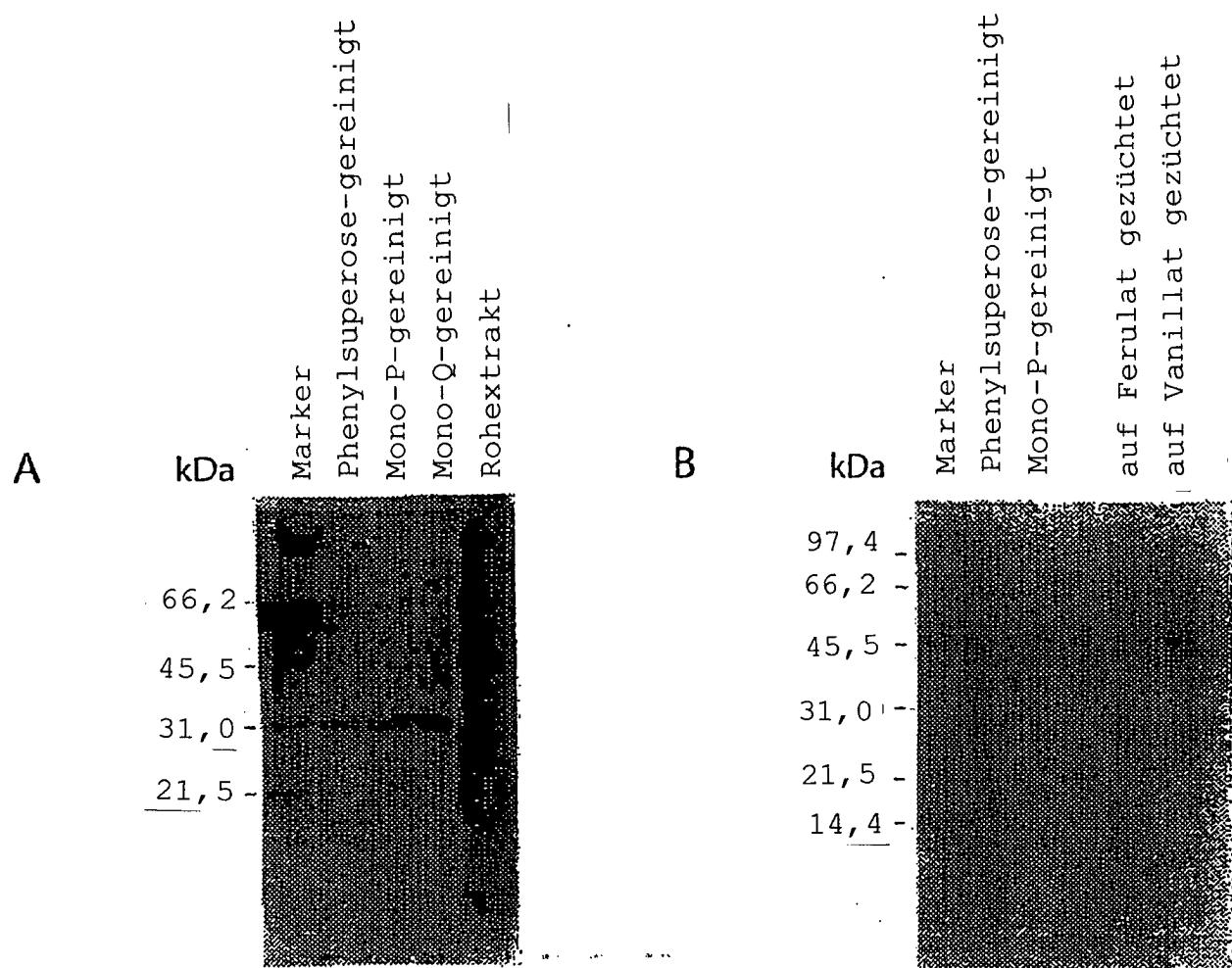


Fig. 7



97,4 kDa	Phosphorylase b
66,2 kDa	Rinderserumalbumin
45,5 kDa	Hühnereiweiß-Ovalbumin
31,0 kDa	Rindercarbonsäureanhydrase
21,5 kDa	Soja-Trypsin-Inhibitor
14,4 kDa	Hühnereiweiß-Lysozym

Fig. 8

EcoRI/PstI-Verdaus von Cosmidclonen

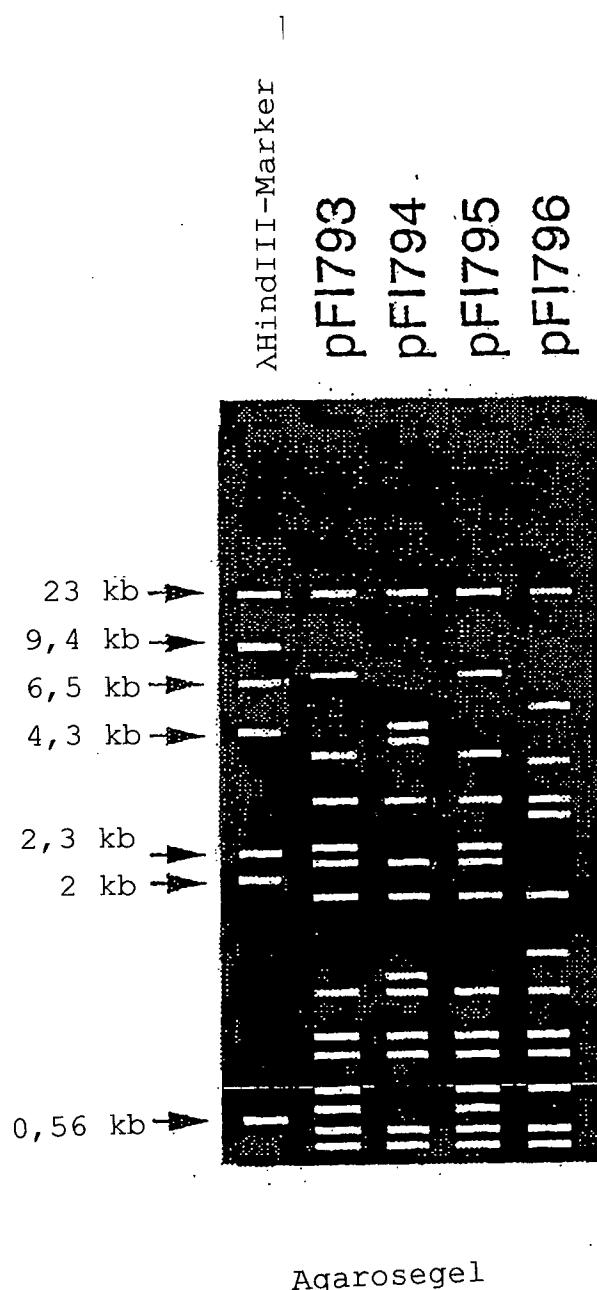


Fig. 9

Ausgehend von der Sequenz der 20 N-terminalen Aminosäuren  
gestaltete redundante Primer

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ser	Thr	Tyr	Glu	Gly	Arg	Trp	Lys	Thr	Val	Lys	Val	Glu	Ile	Gln	Asp	Gly	Ile	Ala	Phe
Primer P66										Primer P67									
TCC	ACG	TAC	GAG	GGC	CGC	TGG	AAG	ACG	GTC	AAG	GTC	GAG	ATC	CAG	GAC	GGC	ATC	GCG	TTT
GG	C	T	A	T	G	A	A	C	G	A	G	A	T	A	T	T	T	C	C

Fig. 10

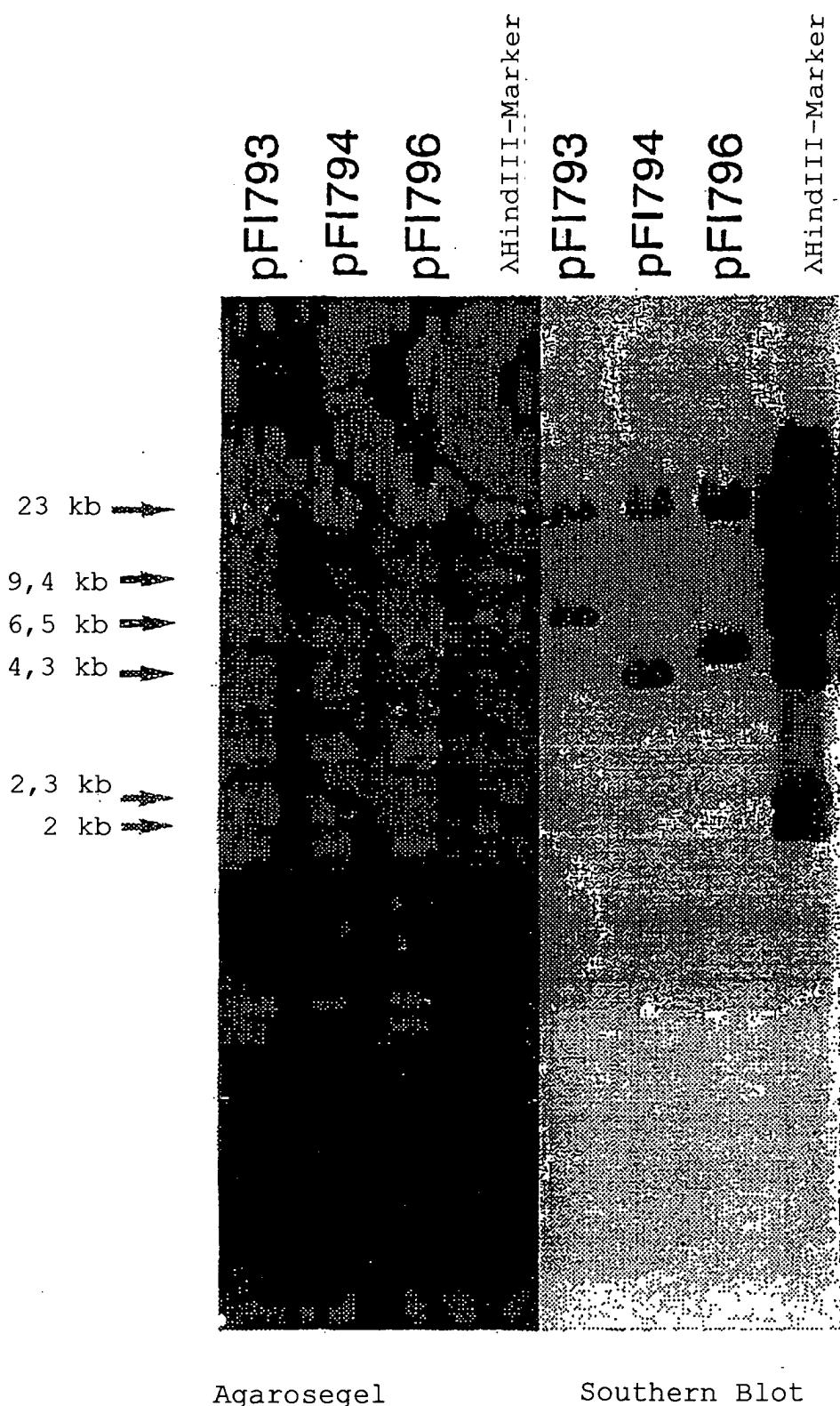


Fig. 11

Nucleotid- und Aminosäuresequenz des Spaltungsenzyms  
und von Vanillinhydrogenase.  
Die Sequenz wurde aus den subklonierten Fragmenten pFI989 und  
pFI1056 und aus dem Cosmidklon pFI794 bestimmt

1	GAATTCTCTCGCGCTTGCCCAGTCTACCCGCTGGTGCAGATCGAGGTG	50
51	CATTGCGAGTCGTCCAAGCAACTTCTCTTGCGCCAGGACCTCGACCTGTC	100
101	CATCGTGACCCCGAACCCGGCAACGAAATCGGCCAGCTGTTGCGCAAGG	150
151	AGCGTTTGTCTGGGCCAGGCCAGTGCTACAACCCGTGAGCAATCA	200
201	CCCTTGCCGCTGGCGATGTTCAACAGTGACTGCTTCTGCCGTCTTGGC	250
251	CTGTAATGCGCTGGATGCCGCCGGACGTGAATACCGCATCGCCTACAACA	300
301	GTTCGAGCCTGTCGGCGCTGATGGCAGTGGTCAGCGCCGGCTGGCGGTG	350
351	ACCGCTCAATTGAAAGCCTGATCCCGCAGGACATGCGCATCCTCGCGA	400
401	GGCCGAAGGCCTGCCCAACTGCCGAGGCGAGCATTGCTGCTGCGCA	450
451	ATCTGCATAATCCGTCGCCGATTACCGAATGTCCTGGCGGAGCACATCGTC	500
501	GAAGGCTTCAAACTTAAAGCGAGCATCACCAGCAGAGCACCAAGAAAA	550
551	CCCGAGAACAAACCGCGTAGTAGCCGCTCCGGCAGGGCGTGGCAATCTT	600
601	CACGCCCAACTGATACTGAGCAGACCGCCCACCGCCATGGCAACCGA	650
651	TGTGCCAGTCGACTTGCTGGTCAGGGCGTAGGTGCCAGGGTTACACCG	700
701	GTGCTGGTAAAGCCAGTGCCAACGACAGGCCCTGGCCACCACCTGGT	750
751	GGTGCCAAACAAGCTGGCAATACCGCGTTGCGACCACAGCGCCGCCA	800
801	CCCCGAACAAGCCACCCATGACGCCGGACGCCGCCAGCACCCGAGC	850
851	CAGGCCACGAATAGCGCATCTGCCAGTCGGTGCCGCCAGTCATGAA	900
901	CATGCGCATCAGGTTGTAGACCGACAAGGCCACCAGAAACACCACGAACC	950
951	CGATGCGCATCACCTGAGCGTCGATCCCCACCGCCAGATCGAACCGAGC	1000
1001	CAGGCAAAGCAGAACCCATGGAGGCCAACGGCAGCGCGTGGCGCAACTC	1050
1051	GATGCGATTACGTTGGTGATAACGCCATAACGCCAGCATCACGTTGGCA	1100
1101	CCACCATGACCAGAGCTGTGCCCTGGCAAGCTGCTGATCCAGGCCAAAT	1150
1151	AAACACGCCAGAGCGGGATGGCGATCAAGCCACCGCCGATTCAAACAA	1200
1201	ACCACTACGGTCCCCAAGGCTGCACCGAGCAGCAGGTACATCGTCAACT	1250
1251	CAATCACAGGTCAAATTCCCTCACGTCAATGGTGCACTCCTACGCAGTCG	1300

Fig. 12 (Teil 1 von 5)

1301	GGGCTAGCGGGAAACGCACAGCACAGCACAAATGGCTATGCCAATTGCG	1350
1351	ACAAGCAATCCTCCATGAACCCCACAACGCTCACCGATCAATTGGGTCTA	1400
1401	TTCCCTTGATGTCGTGAAACCGGAGTTTCCGCTGCGTCCGACGCCA	1450
1451	TCCGCTGACACCCCTCCGCCGTCGCCAGGCATCGATAGTCTGGAACAGG	1500
1501	CGCTCGACAGCCAATTGTTCGTGCACCACTCATGCTGTGCGTCCCTACG	1550
1551	CCAGCGGGATTGGCGTTGCCGAGCGAGCCCCGACGCATTGTCGGCGAGTT	1600
1601	GCGCCTGGCGCGGGCCGAGGTCGCCTCCCTGAGCAGCGCGCCTGAAGGAC	1650
1651	TGATTGGGTCGACGCCCGCAGCCTCGGCCGCAGGCACCTGGCGCCG	1700
1701	GTGATCTATGACTACGACTTCGCCCTCCGGCGTGCCTGGGGCTGCGGGG	1750
1751	CCGGTTGCGCTACCTGCGCGGACAACATCGAGTTGAAAGCCTCAACG	1800
1801	CCGAAGACCGCAAGGAGCGCGAGTTCCAGATGGAGCTGGCTACGTGGTG	1850
1851	CAAAGCGGTCCGCTGAAAACGTCGGCCTGGTGGCGCGAAGGCAATCTA	1900
1901	CCGCAATGACTCCCCACTGGCGCCGCTCCCGCATGAAAACCAGACGC	1950
1951	GGTTTCTGGTGACCTATACCTGCCGATCTGGTGAGTGCCTGTTGCGG	2000
2001	TGGGGCTGATGGCCCCATCGCGAGCGGGCTCGCTCCTACAGTGGGTTTGG	2050
2051	TGTTAACACAGAGGCTGTGGAGCCTGAGCCCCTGTAAGCGCTGGCTTG	2100
2101	CCAGCGAGCGTAGGCAGTGCTGGCGCAAGGCTCAAGGCCCCACAGGCCC	2150
2151	GCTCCCACCCCTTCAGATTTCTATTCCCTGATAAAATCTTCTTCAGCAGCCG	2200
2201	CAGCAGCTCGCGCTTCCTGGCGTCCAGTGGCGAGGTGGCGTCGAGGT	2250
2251	CGCTTTGGCGCGATCTGGTCAGTTCCCTGAGCAGGGTCTCGCCGGTC	2300
2301	TTGCTGAGGAATATCCGTACGAGCGCTTGTCCGGCTTGAGCGCACACG	2350
2351	CACCGCCAGCGCCCGGCTTCAGCTTATTCAAGCAGCGGTACCACTGGG	2400
2401	GCGGCTCGATGCTCAGAGCCCCGGCCAGGTGGCCTGCATCAGGCCGGG	2450
2451	TTCTGATTGATGATGCCAGCGCCAGAATTGCGCGGGCGCAGATCGTG	2500
2501	GGCCGAGAGCGGGCTGATCAGGTTCTGGAACAGTTCAAGTGCACGGC	2550
2551	GCATGGCGTAGCCGATCAGATCATTAGCGCCGAATCCATGGCGCCTGG	2600
2601	GTCTCGCGGGAGTCGACGCAGCCTCGACCGACTCGCGAGGGGGAGGG	2650
2651	CTTGGCCATTGCGGGAAAGTCCTGAAGATGGAGGTTAACAGACTATCTA	2700
2701	GTTTGCCGACCTGGCGGGTATTGCTACGCCAATATCGCTCGCGCCA	2750

Fig. 12 (Teil 2 von 5)

2751	AGACCGACCAGTCATCACCTGCGAGAAAATTGGTTAAATCAATTAATAG	2800
2801	TTAATTGACATAACTAATTGCTGCTTAATTCGAGTCATCTTCAAAAC	2850
2851	CCAGAACAAAGAGAGCATGCCATGAGCACATACGAAGGTCGCTGGAAAAC MetSerThrTyrGluGlyArgTrpLysTh	2900
2901	GGTCAAGGTCGAAATCGAAGACGGCATCGCTTGTCAATCGCC rValLysValGluIleGluAspGlyIleAlaPheValIleLeuAsnArgP	2950
2951	CGGAAAAACCGAACCGCAGTGAGCCCGACCCTGAACCGCAGATGATCGAT roGluLysArgAsnAlaMetSerProThrLeuAsnArgGluMetIleAsp	3000
3001	GTTCTGGAAACCCCTCGAGCAGGACCCTGCCGCCGGTGTGCTGGTGCTGAC ValLeuGluThrLeuGluGlnAspProAlaAlaGlyValLeuValLeuTh	3050
3051	CGGTGCGGGCGAAGCCTGGACCGCAGGCATGGACCTCAAGGAATACTTCC rGlyAlaGlyGluAlaTrpThrAlaGlyMetAspLeuLysGluTyrPheA	3100
3101	GCGAAGTGGACGCCGGCCCGAAATCCTCCAGGAAAAAATCCGCCGCAA rgGluValAspAlaGlyProGluIleLeuGlnGluLysIleArgArgGlu	3150
3151	GCCTCGCAATGGCAATGGAAACTGCTGCGCATGTACGCCAAGCCGACCAT AlaSerGlnTrpGlnTrpLysLeuLeuArgMetTyrAlaLysProThrIi	3200
3201	CGCCATGGCAATGGCTGGTGGCTTCGGCGGGTTTCAGCCCGCTGGTGG eAlaMetValAsnGlyTrpCysPheGlyGlyPheSerProLeuValA	3250
3251	CCTGCGACCTGGCGATCTGCGCCGACGAAGCAACCTTCGGTCTCTGGAA laCysAspLeuAlaIleCysAlaAspGluAlaThrPheGlyLeuSerGlu	3300
3301	ATCAACTGGGTATCCCGCCGGCAACCTGGTGAGCAAGGCCATGGCCGA IleAsnTrpGlyIleProProGlyAsnLeuValSerLysAlaMetAlaAs	3350
3351	CACCGTGGGCCACCGCCAGTCGCTCTACTACATCATGACCGGCAAGACCT pThrValGlyHisArgGlnSerLeuTyrTyrIleMetThrGlyLysThrP	3400
3401	TCGGTGGGCAGAAAGCCGCCAGATGGCCTGGTCAACGAAAGCGTGCCC heGlyGlyGlnLysAlaAlaGluMetGlyLeuValAsnGluSerValPro	3450
3451	CTGGCGCAACTGCGCGAAGTCACCATCGAGCTGGCGCTAACCTGCTCGA LeuAlaGlnLeuArgGluValThrIleGluLeuAlaArgAsnLeuLeuGl	3500
3501	AAAAAACCCGGTGGTGTGCGTGCGGCCAAACACGGTTCAAACGCTGCC uLysAsnProValValLeuArgAlaAlaLysHisGlyPheLysArgCysA	3550
3551	GCGAACTGACCTGGGAGCAGAACGAGGATTACCTGTACGCCAAGCTCGAT rgGluLeuThrTrpGluGlnAsnGluAspTyrLeuTyrAlaLysLeuAsp	3600
3601	CAGTCGCGTTGCTGGACACCGAAGGCGGTGCGGAGCAGGGCATGAAGCA GlnSerArgLeuLeuAspThrGluGlyGlyArgGluGlnGlyMetLysG1	3650
3651	ATTCCCTCGACGACAAGAGCATCAAGCCTGGCCTGCAAGCGTATAAACGCT nPheLeuAspAspLysSerIleLysProGlyLeuGlnAlaTyrLysArgE	3700
3701	GAAGGACGACGCTGCCGGCGATTGCGCAAGGCGAGTGCCTGGCCCTGAAGC nd	3750

Fig. 12 (Teil 3 von 5)

3751	TCCGTTTACATCACTGCTAACGATTCGATAAAAGACGATAAAAGAGGAATC	3800
3801	ACCATGCTGGACGTGCCCTGCTGATTGGCGGCCAGTCGTGCCCGCGCG MetLeuAspValProLeuLeuIleGlyGlyGlnSerCysProAlaAr	3850
3851	CGACGGTCGAACCTTCAGCGCCGCAACCCGGTGACTGGCGAGTTGGTGT gAspGlyArgThrPheGluArgArgAsnProValThrGlyGluLeuVals	3900
3901	CGCGGGTTGCCGCCGCCACCTGGAAAGATGCCGACGCCCGTGGCCGCT erArgValAlaAlaAlaThrLeuGluAspAlaAspAlaAlaValAlaAla	3950
3951	GCCCAGCAAGCGTTCCCGCGTGGGCCGCGCTGGCGCCAATGAACGGCG AlaGlnGlnAlaPheProAlaTrpAlaAlaLeuAlaProAsnGluArgAr	4000
4001	CAGCCGTTGCTCAAGGCCGCGAACAAATTGCAGGGCGCAGCGCGAGT gSerArgLeuLeuLysAlaAlaGluGlnLeuGlnAlaArgSerGlyGluP	4050
4051	TCATCGAGGCCGGCGGGCGAGACCGCGCCATGGCCAATGGTACGGTTTC heIleGluAlaAlaGlyGluThrGlyAlaMetAlaAsnTrpTyrGlyPhe	4100
4101	AACGTACGGCTGGCGGCCAACATGCTGCGTGAAGCGGCATCGATGACCAC AsnValArgLeuAlaAlaAsnMetLeuArgGluAlaAlaSerMetThrTh	4150
4151	CCAGGTCAATGGTGAAGTGATTCCCTCGGACGTTCCCGCAGTTTCGCCA rGlnValAsnGlyGluValIleProSerAspValProGlySerPheAlaM	4200
4201	TGGCCCTGCGCCAGCCCTGTGGCGTGGTGCCTGGGCATGCCCTGGAAC etAlaLeuArgGlnProCysGlyValValLeuGlyIleAlaProTrpAsn	4250
4251	GCCCCGGTGATTCTGCCACCCGGCGATTGCCATGCCCTGGCTGTGG AlaProValIleLeuAlaThrArgAlaIleAlaMetProLeuAlaCysG1	4300
4301	CAACACCGTGGTGCTGAAGGCTTCCGAGCTGAGTCCGGCGATCGCT yAsnThrValValLeuLysAlaSerGluLeuSerProAlaValHisArgL	4350
4351	TGATCGGCCAGGTGCTGCAGGACGCCCTGGCGATGGCGTGGTCAAC euIleGlyGlnValLeuGlnAspAlaGlyLeuGlyAspGlyValValAsn	4400
4401	GTCATCAGTAATGCCGGCGGATGCCACAGATTGTCGAGGCCCTGAT ValIleSerAsnAlaProAlaAspAlaAlaGlnIleValGluArgLeuI1	4450
4451	TGCCAACCCGGCGTACGCCGGTCAATTCAACGGTTCGACCCACGTCG eAlaAsnProAlaValArgArgValAsnPheThrGlySerThrHisValG	4500
4501	GGCGCATTGTCGGCGAGCTCTGGCGGCCACCTCAAACCGCGTTGCTC lyArgIleValGlyGluLeuSerAlaArgHisLeuLysProAlaLeuLeu	4550
4551	GAGCTGGCGGCAAGGCACCGTTGCTGGTGCACGATGCCGACCTGGA GluLeuGlyGlyLysAlaProLeuLeuValLeuAspAspAlaAspLeuG1	4600
4601	GGCTGCCGTGCAGGCCGGCGCTTGGCGCCTACTTCAACCAGGGACAGA uAlaAlaValGlnAlaAlaAlaPheGlyAlaTyrPheAsnGlnGlyGlnI	4650
4651	TCTGTATGTCCACCGAGGCCCTGATTGTCGATGCCAAGGTGGCCGACGCC leCysMetSerThrGluArgLeuIleValAspAlaLysValAlaAspAla	4700

Fig. 12 (Teil 4 von 5)

4701	TTTGTGCCAGTTGGCGGCCAAGGTCGAGACCCTGCGCGCCGGTGATCC	4750
	PheValAlaGlnLeuAlaAlaLysValGluThrLeuArgAlaGlyAspPr	
4751	TGCCGACCCGGAGTCGGTGCTCGGTTCGCTGGTGGACGCCAGCGCTGGCA	4800
	oAlaAspProGluSerValLeuGlySerLeuValAspAlaSerAlaGlyT	
4801	CGCGGATCAAAGCGTTGATCGATGATGCCGTGCCAAGGGCGCGCCTG	4850
	hrArgIleLysAlaLeuIleAspAspAlaValAlaLysGlyAlaArgLeu	
4851	GTAATCGGCAGGCAACTGGAGGGCAGCATTTGCAGCCGACCTGCTCGA	4900
	ValIleGlyGlnLeuGluGlySerIleLeuGlnProThrLeuLeuAs	
4901	CGGTGTGACCGAGCATGCGTTGTACCGCGAAGAGTCCTCGGCCCGG	4950
	pGlyValAspAlaSerMetArgLeuTyrArgGluGluSerPheGlyProV	
4951	TGGCGGTGGTGCCTGCGCGCGAGGGCGAAGAAGCGCTGTTGCAACTGGCC	5000
	alAlaValValLeuArgGlyGluGlyGluGluAlaLeuLeuGlnLeuAla	
5001	AACGACTCCGAGTTCGGTTGTGGCGCGATTTCACTCGTGACACCGG	5050
	AsnAspSerGluPheGlyLeuSerAlaAlaIlePheSerArgAspThrG1	
5051	CCGTGCCCTGGCCCTGGCCCAGCGGGCGAACATGGGCATCTGCCACATCA	5100
	yArgAlaLeuAlaLeuAlaGlnArgValGluSerGlyIleCysHisIleA	
5101	ACGGCCCGACCGTGCACGACGAAGCGCAAATGCCTTTGGCGGGGTCAAG	5150
	snGlyProThrValHisAspGluAlaGlnMetProPheGlyGlyValLys	
5151	TCCAGCGGCTACGGCAGTTTGGCGGCAGGCATCGATTGAGCATTTCAC	5200
	SerSerGlyTyrGlySerPheGlyGlyLysAlaSerIleGluHisPheTh	
5201	TCAGTTGCGCTGGGTACCCCTCCAGAATGGTCCACGGCACTATCCGATCT	5250
	rGlnLeuArgTrpValThrLeuGlnAsnGlyProArgHisTyrProIleE	
5251	GA 5252	
	nd	

Fig. 12 (Teil 5 von 5)

## Nucleotidsequenz von pFI901 (1,8-kb-EcoRI/PstI-Fragment aus pFI973)

1 GAATTCCGGGA TCTGGGCTGC CAACCAGTTG GAAGAAAAGA TTCTCGAAGT  
 51 CGGTGTCGAC AACGTCGGCG CCTTCATTGC CGAGCCGATC CAGGGCGCCG  
 101 GCGGC GTGAT CGTGCCGCCA GAAAGCTACT GGCCGCGCAT CAAGGAAATC  
 151 CTCGCCAAGT ACGACATCCT GTTCGTCGCC GATGAAGTGA TTTGCGGTTT  
 201 CGGCCGTACC GGCGAGTGGT TCGGCAGCGA TTTCTACGAC CTCAAGCCCG  
 251 ACATGATGAC CATGCCAAG GGCTGACTT CCGGCTACAT CCCGATGGGT  
 301 GGTCTGATCG TCGCGATTG GGTGGTCGAA GTGCTGAACG AAGGCGCGA  
 351 TTTCAACCAC GGATTACCT ACTCCGGTCA CCCGGTAGCG GCGGCTGTTG  
 401 CCCTGGAAAA CATCCGCATC ATGCGCGAAG AGAAGATTAT CGAGCGCGTC  
 451 CAGGAAGAAA CGGCACCGTA TTTGCAAAAG CGTCTGCGTG AACTCAACGA  
 501 TCATCCATTG GTGGGTGAAG TTGGCGGGGT AGGGTTGCTG GGCGCTATCG  
 551 AACTGGTTCA GGACAAAGCC ACGCGCAAAC GTTACGAAGG CAAGGGCGTG  
 601 GGCATGATCT GCCGGCAGTT CTGCTTCGAC AACGGGCTGA TCATGCGCGC  
 651 GGTGGCGAC ACCATGATCA TCGCGCCGCC ACTGGTGATT ACCAAGGC GG  
 701 AAATCGATGA GCTGGTGAGC AAGGCACGCA AGTGCCTGGA CCTGACCCCTG  
 751 AGTGTGTTGC AGGGCTAAGT GCTAGGCTCT GAGCGGGAGT TGTATGAACT  
 801 TTGGCTCAGA GCGGTCAGAA AGCTTGGCT TTCCCTGAAA GACCGCCATG  
 851 GATGTTGCCA GACTAGCCAC CGTTCCAAAT GCGGGGTTG GGCGCGGAAC  
 901 AGGTGGTTCA AAAAAGCAA AATTTGGAGC ATTACGCATG AAGGCACCTCG  
 951 GTAAAAAGCT CGCCGGCAAG ACACTCCTTG CCATGTCCCT GATGGGCATC  
 1001 ATGGCGGGCG CGGTTCAAGC AGATGACAAA GTCTTGACG TGTACAACCTG  
 1051 GTCCGATTAC ATCGCGCCGG ACACCATCAA GAAGTTGAA GACGAGTCGG  
 1101 GCATCAAGGT GGTCTACGAC GTCTTCGACA GTAACGAAAC CCTCGAAGCC  
 1151 AAGTTGCTGG CGGGCAAGTC CGGTTACGAC ATCGTGGTGC CTTCGAACAA  
 1201 CTTCCCTGGCC AAGCAGATCA AGGCCGGCGT CTACCAGAAG CTGGACAAGT  
 1251 CCAAGCTGCC GAACTGGAAG AACCTGAACA CCGATCTGCT CAAGGGCGTT  
 1301 TCGGTCAAGCG ACCCTGGTAA CGACGACGCC TTCCCGTACA TGTGGGGCTT

Fig. 13 (Teil 1 von 2)

1351 GATCGGCATC GGCTTCAACG CCGAGAAGGT CAAGGCCGG CTGGGTCCGG  
1401 ATGCACCGAC CAATTCTGG GACCTGATCT TCAAACCGGA AAACGCCGCC  
1451 AAGCTGAAAT CCTGTGGCAT CAGCGTGCTG GATTGCCAA CCGAGATGAT  
1501 TCCGGTGGCC CTGCAC TACC TGGGCTACCC GACCGACAGC CAGGACAAGA  
1551 AACAACTGGC CGAGGCCGAG GCACTGTTCC TCAAAGTTCG TCCTTCGATC  
1601 GGTTACTTCC ACTCCTCCAA GTACATTCC GACCTGGCCA ACGGCAACAT  
1651 CTGCGTGGCG ATCGGCTACT CGGGTGACAT CTATCAGGCC AAGACTCGCG  
1701 CCGCCGAAGC CGGTGACAAG GTCAAGGTCA GCTACAACAT TCCCAAAGAA  
1751 GGTGCAGGCA GCTTCTACGA CATGGTCGCC ATCCCTAAAG ATGCCGAAAA  
1801 CGTCGAAGGC GCCTACAAGT TCATGACCTT CCTGCAG

Fig. 13 (Teil 2 von 2)

Nucleotidsequenz von pFI911 (850-bp-EcoRI/PstI-Fragment aus pFI973)

```

1  CTGCAGACCT TCTGCCAGGC GCACCGGCTC AC6CAGGGTT TTGACTTCCT
51  GGATCATCAG GCGCTGGTTG CGTTTGACCG ACTGGCCAAT CATCAGGCGA
101 AACGCATTGG AGCCCAGGTC GATAGCGGCG AATAGCGATG CGTCTTCTTT
151 CACGTGAGGA ACTCCTGGCA ACTTCGTCCG CCGAGGGCAA AAAACCCGTT
201 TTGCCGATCC TGCACGGGT AGATGACATC AGGATGACAT TGGAAATTTT
251 TCTGACAGAC GTTTCGTCAC CAGAACGTCA CAGTCGCGGG GCTAGCATCG
301 GGGCTTCCAA TCGGGTCGGG AGCCTTGAAC ATGCTGTTAA CCAACGACAC
351 CCTGATGCAT CGCATCCACC GCGAGTTGCT CGACCCACAGT GACGAAGAGC
401 TGGAACTGGA GTTGCCTGGAA GACGATCACG ACCTGGCTTC GCTGTTCGCG
451 GATCAACCGG GCGATAACCC GGCCAAGGCC GAGCGCCGTC GTTACTTCAG
501 CGAGTTGTC CGTTGCAGG GCGAGTTGGT CAAGTTGCAA AGCTGGGTGG
551 TGAAGACCGG GCACAAGGTG GTGATTCTGT TCGAAGGCCCG CGATGCCGCT
601 GGCAAAGGGG GCGTGATCAA GCGCATCACC CAGCGTCTTA ATCCACGGGT
651 CTGCCGGGTC CGGGCGCTTC CCGCGCCGAG TGACCGCGAG CGCACCCAGT
701 GGTATTTCCA GCGTTATGTC TCGCACCTGC CCGCCGCCGG CGAGATCGTC
751 CTGTTCGACC GCAGCTGGTA CAACCGCGCC GGTGTCGAGC AGGTGATGGG
801 CTTTGCAAC GAGGAACAGT ACGAAGAATT TTTCCGCAGC GTGCCGGAAT
851 TC

```

Fig. 14

## Nucleotidsequenz von pFI912 (958-bp-EcoRI/PstI-Fragment aus pFI973)

1 CTGCAGGGCC TGGGGCATGC CGAGTCGGCG TCGCAGAACG CCTCTGCCTA  
 51 TCGCCTGGAA CGCAAGCAAA TGCCTGCGCC CGCTCGCCCG GTCGGAGTCG  
 101 AAGCCGAAGT GGCCGACCCC ATTCAATTTC ATCCGGCCAT GCGCCGGGTG  
 151 TTGCTGGAAC TGAGGGCCTA TGCCGAGGGC ATGCGTGCAG TCGGTTACTG  
 201 GGCAGCGCAT TTGTTGGATC AGTCCGAGCA GGCCGAGGAT CTGCCCACTC  
 251 GTCAGCGCGC CTTGCAACTG GCGGAGCTGC TGACGCCGGT GATCAAGGCG  
 301 TTCTTCACCG AGCAGGGTTT TCGCCTGCC AGCAACGCCT TGCAGGTGTT  
 351 CGGTGGCTAC GGCTACGTCA GCGAGTTCGC CATCGAACAG ACCCTGCGCG  
 401 ACAGCCGGAT CGCGATGATT TACGAGGGCA GCAACGAAAT CCAGGCCAAT  
 451 GACCTGCTGC TGCAGCAAAGT GCTGGGGAT GAAGGTCGCG CCTTTGGCCA  
 501 ACTGTTGGCG GTCATGCGCG AAGAGGCCGA ACTGGCCTGT AACGACACCC  
 551 GCTTTGGCGC TGAGCTGGTG CAGCTGTGCG ACAAACTCGA GACAGTGCAA  
 601 CTTGAGATAG GGGACCTCGC CGTCACGGAG CGCGAACATACC CGTATCGAGC  
 651 CGCTGGCGAT TTCTGCGCC TGTGTGGCGT GGCCTGTTG GGGTTTCCT  
 701 GGGCGAGAGC GCCACGGGTG TCTCGCTGT TACCTGACAG CGATCCACTG  
 751 CGTCCCAACA AACTGGAAAC CGCGCTTTC TTCTTGCCT ACCTGCTGCC  
 801 AGAAGCCGAT CAACGCCCTCG CAGCCATTG GGCAGCGAGA GCGCCGTTGC  
 851 CGTTTTGAT CTGAAAAAAC GCGCGCCAGG CCCAATGTGG CTCGCTCCCA  
 901 CAAACAGCGC GAACCACATC GAGCCACCGC CGCCACGCCA GTTGTACAGG  
 951 CCGAATTG

Fig. 15

## Nucleotidsequenz von pFI913 (959-bp-EcoRI/PstI-Fragment aus pFI973)

1 CTGCAGGCTT GCCATATCAG TGGGACAGC TTCGTCCGG CTCCAGGCGC  
 51 AAGGGCCAAC GACCTGCCGA CGGTGCCGAA TAGGCTGTG GCGTCCGTTA  
 101 TTCTGGACGC ACCGAAAAAA CTGTTATTTA CCCGGTCTTC TTCCACTGTA  
 151 GAACCTTTTC ACTATAGCGG CCCTGCGTGT TCTGCGGGAG CTGCTCATGA  
 201 TTCTGCACGC GATTCCACTT CCAGCCCGTT GCGCGCCGT GCTGTTGCGG  
 251 TTTCTGCACG CACGGCTTT GCATCAGGCT TGCAAGCCA GCCACAAGGG  
 301 CAGGTAAGCT CTAGCTCGCA CGTCCTGGC GTCTCCCAGG TCTGCCAACG  
 351 CGACGCGGAC GCGTCAAACA ACGCCCGGCC CCTAATGAAG CCGGGACACT  
 401 CAGCCCAGAG GCATTTATGA GTAACAAACCT CGACCAGCTC ACCGATTGGT  
 451 TGAAAGACCA CAAGATCACA GAAGTCGAAT GCATGATTGG CGACTTGACC  
 501 GGGATCACCC GCGGCAAGAT CTCGCCAACC AACAAAGTCA TTGCCGAAAA  
 551 AGGCATGCCG CTGCCCGAGA GTGTGCTGTT GCAGACAGTG ACGGGCGACT  
 601 ATGTCGAAGA CGACATCTAT TACGAACCTGC TCGACCCGGC CGACATCGAC  
 651 ATGATCTGCC GCCCGACCA GAACCCGGTG TTCCTCGTGC CATGGCCAT  
 701 CGAGCCGACC GCGCAGGTGA TTCACGACAC CTACGACAAG CAGGGCAACC  
 751 CGATCGAGCT GTGCCACGC AACGTCTCA AGAAAGTCCT CAAACTCTAT  
 801 TCCGACAAGG GCTGGCAGCC GATCGTGGCG CCGGAAATGG AGTTCTACCT  
 851 GACCAAGCGC AGTGACGACC CGGATTACCC ATTGCAACCG CCGGTTGGCC  
 901 GTTCCGGACG TCCGAAATC GGTGCCAAT CGTTCTCTAT CGAACGGGCC  
 951 AACGAATTG

Fig. 16

Outward Reading PCR-Primer

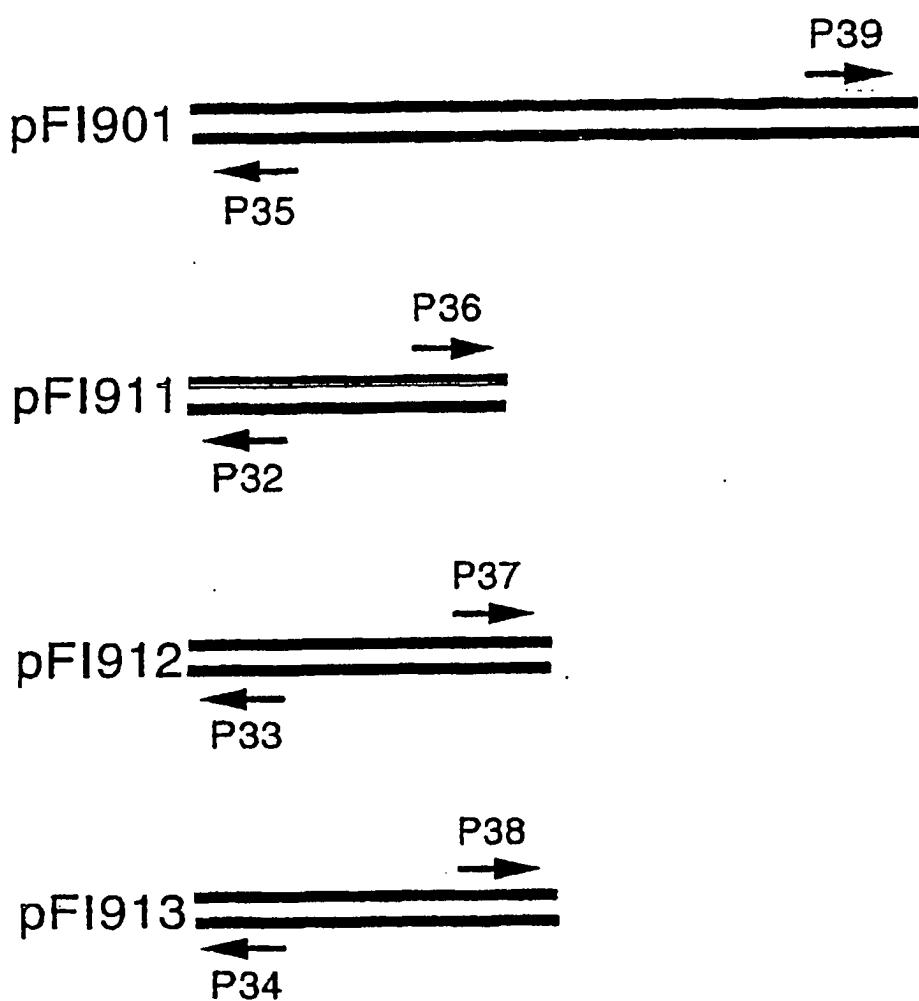


Fig. 17

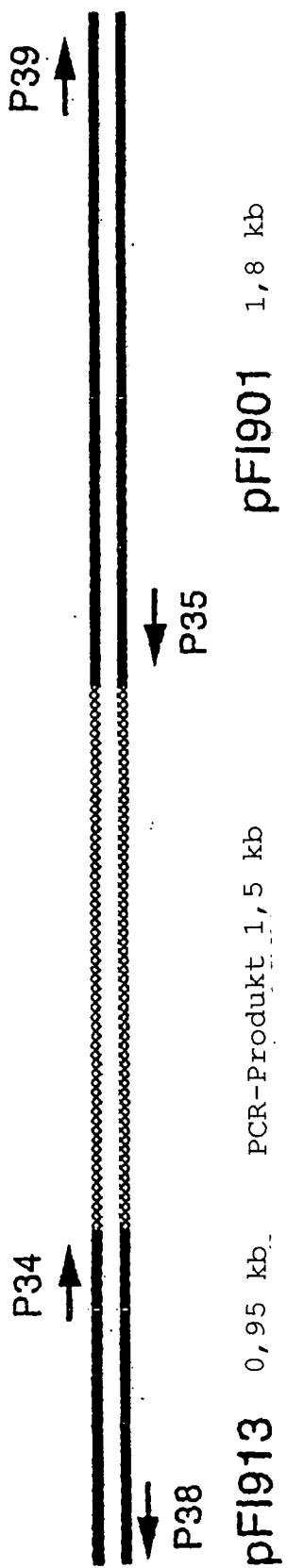


Fig. 18

Nucleotidsequenz der verschmolzenen fortlaufenden  
Teile pFI913/PCR-Produkt/pFI901 (4259 bp)

```

1  CTGCAGGCTT GCCATATCAG TGGCGACAGC TTCCGTCGCG CTCCAGGCC
51  AAGGGCCAAC GACCTGCCGA CGGTGCCGAA TAGGCTGTCG GCGTCCGTTA
101  TTCTGGACGC ACCGCAAAAA CTGTTATTTA CCCCCGTCTTC TTCCACTGTA
151  GAACCTTTTC ACTATAGCGG CCCTGCGTGT TCTGCGGGAG CTGCTCATGA
201  TTCTGCACGC GATTCCACTT CCAGCCCCTT GCCCGGCCGT GCTGTTGCCG
251  TTTCTGCACG CACGGCTTTT GCATCAGGCT TGCACAGCCA GCCACAAGGG
301  CAGGTAAGCT CTAGCTCGCA CGTCCTGGC GTCTCCCAGG TCTGCCAACG
351  CGACGCGGAC GCGTCAAACA ACGCCCGGCC CCTAATGAAG CCGGGACACT
401  CAGCCCAGAG GCATTTATGA GTAACAACCT CGACCAGCTC ACCGATTGGT
451  TGAAAGACCA CAAGATCACA GAAGTCGAAT GCATGATTGG CGACTTGACC
501  GGGATCACCC GCGGCAAGAT CTCGCCAACC AACAAAGTTCA TTGCCGAAAA
551  AGGCATGCGC CTGCCCAGA GTGTGCTGTT GCAGACAGTG ACGGGCGACT
601  ATGTCGAAGA CGACATCTAT TACGAACTGC TCGACCCGGC CGACATCGAC
651  ATGATCTGCC GCCCGACCA GAACGCGGTG TTCCTCGTGC CATGGGCCAT
701  CGAGCCGACC GCGCAGGTGA TTCACGACAC CTACGACAAG CAGGGCAACC
751  CGATCGAGCT GTCGCCACGC AACGTCTCA AGAAAGTCCT CAAACTCTAT
801  TCCGACAAGG GCTGGCAGCC GATCGTGGCG CCGGAAATGG AGTTCTACCT
851  GACCAAGCGC AGTGACGACC CGGATTACCC ATTGCAACCG CCGGTTGGCC
901  GTTCCGGACG TCCGAAATC GGTCGCCAAT CGTTCTCTAT CGAAGGGGCC
951  AACGAATTCTG ACCCGCTGTT CGAAGACGTC TACGACTGGT GCGAACTGCA
1001  GGAGCTGGAT CTCGATACGC TGATCCACGA AGACGGCACG GCGCAGATGG
1051  AAATCAACTT CCGTCACGGC GACGCGCTGT CCCTGGCCGA CCAGATCCTG
1101  GTGTTCAAGC GCACCATGCG CGAGGCCCGC CTCAGGCCACA ACGTGGCCGC
1151  CACGTTCATG GCCAAGCCGA TGACCCGGCA GCCTGGCAGC GCCATGCACC
1201  TGCACCAAGAG CATCATCGAT ATCGAGACCG GCAAGAACGT CTTCTCCAAT
1251  GAAGACGGGA CCATGAGCCA CTTGTTCTC AACCACATCG GCGGCGTGCA
1301  GAAATTCATC CCTGAACTGC TGCCGCTGTT CGGGCCCCAAC CTCAACTCGT

```

Fig. 19 (Teil 1 von 4)

1351 TCCGCCGCTT CCTGCGGAC ACTTCGGCGC CGGTGAACGT CGAGTGGGC  
 1401 GAAGAAAACC GTACCGTGGG CCTGCCGGTG CGGATGCCG GCCCTCAAAA  
 1451 CCGTCGGGTG GAAAACCGCC TGCCGGGTGC CGACGCCAAC CCGTACCTGG  
 1501 CGATTGCCGC GAGCCTGCTG TGCGGCTACA TCGGCATGGT CGAAGGTATC  
 1551 AACCCAAGCG CGCCTGTGGT GGGTCGTGGT TACGAGCGGC GCAACCTGCG  
 1601 TCTGCCGCTG ACCATCGAAG ACGCTCTGGA ACCGATGGAA AACAGCAAGA  
 1651 CCATCGAGAA ATACCTGGGT CACAACCTCA TCACTGGCTA CGTCGCGGTC  
 1701 AAGCGGGCCG AGCATGAAAA CTTCAAGCGC GTGATCAGCT CATGGGAACG  
 1751 GGAATTCCCTG TTGTTCGCCG TCTGACACGC CGGGTGCAGGC CCTCAAAAGC  
 1801 CGCACTCCAA CCTCACTAGG AGAGCTTTAT GAGCAACAAC CCCAAACCC  
 1851 GTGAATGGCA GAACCTGAGC GCCGAACACC ACCTGGCCCC CTTCAGTGAC  
 1901 TTCAAGCAAT TGAAGGAAAA AGGCCCCGCGC GTCAATCACCA GCGCCAAGGG  
 1951 CGTTTACCTG TGGGACAGCG AAGGCAATCA GATCCTCGAC GCCATGGCCG  
 2001 GCCTGTGGTG CGTGGCCATC GGTTACGGCC GCGACGAGTT GGCGGAGGCT  
 2051 GCCAGCAAGC AGATGCGCGA GTTGCCTAC TACAACCTGT TTTTCCAGAC  
 2101 CGCTCACCCG CCCGTCCCTCG AGCTGGCAA GGCAATTTC GATATCGCGC  
 2151 CAGCAGGCAT GAACCACGTG TTCTTCACCG GTTCCGGCTC CGAAGGCAAT  
 2201 GACACCATGC TGCGCATGGT TCGCCACTAC TGGCGATCA AAGGTCAGCC  
 2251 AAACAAGAAA GTCATTATCA GCCGCAAGAA CGGCTACCAC GGTTCGACCG  
 2301 TGGCCGGCGC CAGCCTGGGC GGCGATGACCT ACATGCACGA ACAGGGCGAC  
 2351 TTGCCGATCC CGGGCATCGT GCACATTCCG CAGCCGTACT GGTTCGGTGA  
 2401 AGGCAGCGAC ATGACCCCGG AAGAATTCCGG GATCTGGGCT GCCAACCACT  
 2451 TGGAAAGAAA GATTCTCGAA GTCGGTGTG ACAACGTCGG CGCCTTCATT  
 2501 GCCGAGCCGA TCCAGGGCGC CGGCGGCGTG ATCGTGCAGC CAGAAAGCTA  
 2551 CTGGCCGGCGC ATCAAGGAAA TCCTGCCAA GTACGACATC CTGTTCGTCG  
 2601 CCGATGAAGT GATTGCGGT TTGGCCGTA CGGGCGAGTG GTTCGGCAGC  
 2651 GATTTCCTACG ACCTCAAGCC CGACATGATG ACCATGCCA AGGGCCTGAC  
 2701 TTCCGGCTAC ATCCCGATGG GTGGTCTGAT CGTGGCGAT TCGGTGGTCG  
 2751 AAGTGCTGAA CGAAGGGCGC GATTCAACC ACGGATTAC CTAACCCGGT

Fig. 19 (Teil 2 von 4)

2801 CACCCGGTAG CGGEGGCTGT TGCCCTGGAA AACATCCGCA TCATGCCGA  
 2851 AGAGAAGATT ATCGAGCGCG TCCAGGAAGA AACGGCACCG TATTTCGCAAA  
 2901 AGCGTCTGCG TGAACCTAAC GATCATCCAT TGCTGGGTGA AGTCGCGGG  
 2951 GTAGGGTTGC TGGCGCTAT CGAACTGGTT CAGGACAAAG CCACGCGCAA  
 3001 ACGTTACGAA GGCAAGGGCG TGGGCATGAT CTGCCGGCAG TTCTGCTTCG  
 3051 ACAACGGCT GATCATGCCG GCGGTTGGCG ACACCATGAT CATGCCCG  
 3101 CCACTGGTGA TTACCAAGGC GGAAATCGAT GAGCTGGTGA GCAAGGCACG  
 3151 CAAGTGCCTG GACCTGACCC TGAGTGTGTT GCAGGGCTAA GTGCTAGGCT  
 3201 CTGAGCGGGA GTTGTATGAA CTTTCGCTCA GAGCGGTCAG AAAGCTTGGC  
 3251 CTTTCCTGTA AAGACCGCCA TGGATGTTGC CAGACTAGCC ACCGTTCCAA  
 3301 ATGCCCGGGT TCGGCGCGGA ACAGGTGGTT CAAAAAAGCA AAAATTTGGA  
 3351 GCATTACGCA TGAAGGCACT CGGTAAAAAG CTCGCCGGCA AGACACTCCT  
 3401 TGCCATGTCC CTGATGGGCA TCATGGCGGG CGCGGTTCAAG GCAGATGACA  
 3451 AAGTCTTGCA CGTGTACAAC TGGTCCGATT ACATCGCGCC GGACACCATC  
 3501 AAGAAGTTTG AAGACGAGTC GGGCATCAAG GTGGTCTACG ACGTCTTCGA  
 3551 CAGTAACGAA ACCCTCGAAG CCAAGTTGCT GGCGGGCAAG TCCGGTTACG  
 3601 ACATCGTGGT GCCTTCGAAC AACTTCCTGG CCAAGCAGAT CAAGGCCGGC  
 3651 GTCTACCAGA AGCTGGACAA GTCCAAGCTG CCGAACTGGA AGAACCTGAA  
 3701 CACCGATCTG CTCAAGGCCG TTTCGGTCAG CGACCCCTGGT AACGAGCACG  
 3751 CCTTCCCGTA CATGTGGGGC TCGATCGGCA TCGGCTTCAA CGCCGAGAAG  
 3801 GTCAAGGCCG CGCTGGGTCC GGATGCACCG ACCAATTCTT GGGACCTGAT  
 3851 CTTCAAACCG GAAAACGCCG CCAAGCTGAA ATCCTGTGGC ATCAGCGTGC  
 3901 TGGATTCGCC AACCGAGATG ATTCCGGTGG CCCTGCACCA CCTGGGCTAC  
 3951 CCGACCGACA GCCAGGACAA GAAACAACG GCCGAGGCCG AGCCACTGTT  
 4001 CCTCAAAGTT CGTCCTTCGA TCGGTTACTT CCACCTCCTCC AAGTACATT  
 4051 CCGACCTGGC CAACGGCAAC ATCTGGTGG CGATCGGCTA CTCGGGTGAC  
 4101 ATCTATCAGG CCAAGACTCG CGCCGCCGAA CCCGGTGACA AGGTCAAGGT  
 4151 CAGCTACAAC ATTCCCAGG AAGGTGCAGG CAGCTTCTAC GACATGGTCG  
 4201 CCATCCCTAA AGATGCCGAA AACGTCGAAC CCGCCTACAA CTTCATGACC

Fig. 19 (Teil 3 von 4)

4251' TTCCCTGCAG

Fig. 19 (Teil 4 von 4)