



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 364 110**

② Número de solicitud: 200803451

⑤ Int. Cl.:

A23L 1/015 (2006.01)

A23C 19/097 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **04.12.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.08.2011

⑦ Solicitante/s: **BIOGES STARTERS, S.A.**
Paseo Condesa de Sagasta, 10 - 1^oC
24001 León, ES

⑦ Inventor/es: **Arcos Rodríguez, Mario;**
Rodríguez Olivera, Elías;
Naharro Carrasco, Germán y
Luengo Rodríguez, José María

⑦ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

⑤ Título: **Procedimiento para eliminar tiramina de diferentes fuentes.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para eliminar tiramina de diferentes fuentes. El procedimiento se basa en las reacciones catalizadas por los genes presentes en las agrupaciones génicas *tyn* y *hpa* de *Pseudomonas putida U*, partiendo de transformar tiramina y dopamina en 4-hidroxifenilacetaldehído y 3,4-dihidroxifenilacetaldehído, reacción que puede continuarse a los ácidos 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético respectivamente, mediante las enzimas del cluster *tyn* y que, si se complementa con las enzimas del cluster *hpa*, permite la degradación y tiramina y dopamina en ácido pirúvico y ácido succínico. La invención se refiere además a las enzimas que catalizan el proceso, moléculas de ácido nucleico que las codifican, vectores que permitan su expresión y, especialmente a microorganismos recombinantes transformados con dichos vectores. Además, la invención se refiere al uso de microorganismos que posean los genes adecuados para expresar las proteínas implicadas en el proceso para reducir la tiramina y dopamina de alimentos.

ES 2 364 110 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para eliminar tiramina de diferentes fuentes.

5 **Campo técnico de la invención**

El campo técnico de la invención pertenece a la Biotecnología. La invención consiste se refiere a un nuevo procedimiento para disminuir el contenido de tiramina y/o dopamina en una muestra que se basa en una vía de degradación bacteriana de estos compuestos desconocida hasta ahora que lleva a cabo la transformación de tiramina y de dopamina en los ácidos 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético respectivamente, compuestos que, al ser degradados por las enzimas de otro *cluster* complementario, son finalmente degradados en ácido pirúvico y ácido succínico: La invención se refiere al procedimiento basado en las enzimas que catalizan las reacciones de dicha vía, así como a las proteínas que intervienen en la vía, las secuencias que las codifican, los vectores a partir de los cuales pueden expresarse y los microorganismos recombinantes en los que se expresen las proteínas implicadas en la ruta, así como en el uso de estos microorganismos recombinantes y los que expresen las enzimas de la ruta de forma natural para disminuir el contenido de tiramina y/o dopamina en muestras que las contengan, preferentemente alimentos y bebidas.

20 **Estado de la técnica**

Aminas biogénicas. Aspectos generales

Las aminas son compuestos químicos derivados del amoniaco que resultan de la sustitución de los hidrógenos de esa molécula por radicales alquilo. Según se sustituyan uno, dos o tres hidrógenos, las aminas serán primarias, secundarias o terciarias. Cuando son originadas como consecuencia de la actividad de organismos vivos y poseen actividad biológica (cumplen importantes funciones en las células) reciben el nombre de aminas biogénicas o biogénicas. En función del número de grupos amino presentes en la molécula podemos diferenciar, monoaminas, diaminas y poliaminas. Las monoaminas alifáticas están muy extendidas en la naturaleza donde también es abundante la diamina putrescina, mientras que las poliamidas espermidina y espermina son producidas por animales, por plantas y por la mayoría de las bacterias (1).

Las aminas aromáticas, originadas por descarboxilación de aminoácidos, son las aminas más comunes en los alimentos (histamina, 2-feniletilamina, tiramina, etc.) y también tienen gran importancia como transmisores dentro del sistema nervioso central (dopamina, noradrenalina, epinefrina, serotonina, etc.).

Podemos hacer una distinción entre aminas biogénicas endógenas, que son aquellas que son sintetizadas en diferentes tejidos de los organismos superiores (como por ejemplo la adrenalina producida en la médula adrenal o la histamina en los mastocitos) y aminas biogénicas exógenas, que son las ingeridas en la dieta. Estas aminas biogénicas exógenas pueden estar presentes en los alimentos de origen vegetal (frutas y hortalizas), o bien pueden aparecer en los alimentos como consecuencia de la actividad microbiana durante el procesado (cura de carnes y quesos) o durante el almacenaje de los mismos. Debido a que pueden provocar efectos nocivos tanto en el hombre como en los animales, son consideradas sustancias tóxicas.

Las aminas biogénicas más importantes que pueden encontrarse en los alimentos son la histamina, la putrescina, la cadaverina, la tiramina, la triptamina, la feniletilamina, la espermina y la espermidina; y los alimentos que las contienen pueden ser muy variados (pescado, carne, huevos, quesos, bebidas fermentadas, etc.) (2).

Afortunadamente, los organismos cuentan con diferentes sistemas naturales de destoxicación (monoaminoxidasa -MAO- o la diaminoxidasa -DAO-) que les permiten eliminar las aminas biogénicas, evitando los efectos perjudiciales causados por estos compuestos. Sin embargo, puede haber casos en que estos sistemas no funcionan correctamente, o se encuentran inhibidos por la acción de determinados fármacos, por lo que la presencia de aminas biogénicas en los alimentos puede suponer un grave problema para la salud.

Por todas estas razones es muy interesante seleccionar microorganismos que al ser utilizados en los procesos de elaboración de alimentos (curados, fermentaciones, etc.), no acumulen aminas biogénicas, o que lo hagan en concentraciones que no sean peligrosas para la salud. La Ingeniería Genética y la Ingeniería Metabólica podrían contribuir a obtener este tipo de cepas asegurando, además, que se conserven otra serie de propiedades y características que son necesarias para mantener los estándares de identidad y calidad de los alimentos.

60 *Las aminas biogénicas como neurotransmisores*

Desde hace décadas se tiene constancia de que la transmisión catecolaminérgica está mediada por aminas biogénicas entre las que se incluyen las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina) derivadas del aminoácido tirosina; la indolamina serotonina, sintetizada a partir del triptófano; y la histamina, producida a partir del aminoácido histidina.

Catecolaminas

Bajo el término catecolaminas se engloban todas aquellas aminas biogénicas derivadas de la tirosina que contienen un grupo catecol y un grupo amino en su molécula. El primer paso en la síntesis de catecolaminas está catalizado por la enzima tirosinahidroxilasa mediante una reacción que requiere oxígeno como sustrato y tetrahidrobiopterina como cofactor, y permite obtener como producto final dihidroxifenilalanina (DOPA) (Figura 1). Por lo tanto, la tasa de tirosinahidroxilasa va a ser el factor limitante para la síntesis de las tres aminas neurotransmisoras catecolaminérgicas (dopamina, noradrenalina y adrenalina).

La dopamina se produce por la descarboxilación de L-DOPA. Esta reacción se lleva a cabo por la enzima DOPA descarboxilasa. El área del cerebro donde se encuentra en mayor abundancia es en el *corpus striatum*, jugando un papel esencial en la coordinación de los movimientos corporales (3). En pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, se ha observado degeneración de las neuronas dopaminérgicas, lo que va a dar lugar a la característica disfunción motora asociada a esta enfermedad (4).

La noradrenalina, también llamada norepinefrina, requiere para su síntesis, a partir de dopamina, la acción de la dopamina- β -hidroxilasa. Esta catecolamina se produce mayoritariamente en las neuronas de los ganglios simpáticos y su acción está relacionada con el sueño, la vigilia, la atención y la conducta.

La adrenalina, también llamada epinefrina, está presente en el cerebro en niveles más bajos que las otras dos catecolaminas. La enzima que sintetiza la adrenalina, la feniletanolamina-N-metiltransferasa, se localiza solo en las neuronas secretoras de esta catecolamina.

Las enzimas más importantes en el catabolismo de catecolaminas son la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol O-metiltransferasa (COMT) (5). Estas enzimas se encuentran respectivamente en las mitocondrias y en el citoplasma tanto de las células neuronales como de las gliales. Los inhibidores de estas enzimas se utilizan en clínica como antidepresivos (6).

Histamina

Esta amina biogénica neurotransmisora se produce por descarboxilación de la histidina debido a la acción de la histidinadecarboxilasa (Figura 2A). En su metabolismo intervienen tanto la histidinametiltransferasa como la MAO. La mayor concentración de este neurotransmisor se encuentra en las neuronas del hipotálamo y su acción está relacionada con los procesos de alerta y atención. La histamina también es liberada por los macrófagos en respuesta a reacciones alérgicas o a daños en los tejidos.

Serotonina

Esta indolamina, también llamada 5-hidroxitriptamina, se sintetiza en las neuronas a partir del triptófano ingerido con los alimentos tras ser hidroxilado a 5-hidroxitriptófano mediante una reacción catalizada por la enzima triptófano-5-hidroxilasa. Posteriormente, el 5-hidroxitriptófano se descarboxila por medio de la acción de una 5-hidroxitriptófano descarboxilasa para dar lugar a la serotonina (Figura 2B). La principal enzima encargada de su degradación es la MAO, al igual que sucede en las demás aminas biogénicas. La serotonina está implicada en la regulación del sueño y de la vigilia.

Además de las monoaminas neurotransmisoras, existen otras aminas biogénicas que poseen una estructura molecular parecida y que actúan como neuromoduladores o “falsos neurotransmisores”. Estas aminas endógenas, también denominadas aminas “traza” o microaminas, se encuentran en pequeñas cantidades en el sistema nervioso central y su estudio está adquiriendo una importante relevancia en los últimos años.

Aminas “traza”

Con el término aminas “traza” o microaminas, se hace referencia a una familia de aminas endógenas, estructural y metabólicamente relacionadas con la dopamina, la noradrenalina y la serotonina (7-8). En este grupo se incluyen p- y m-octopamina, p- y m-tiramina, triptamina y β -feniletilamina (Figura 3). Todas estas moléculas están heterogéneamente distribuidas en el cerebro de mamíferos en concentraciones muy bajas (0,1-100 ng/g de tejido) (9), pero juegan un papel importante en la coordinación de la respuesta sináptica mediada por las aminas biogénicas neurotransmisoras.

Recientemente se han caracterizado dos receptores específicos de estas aminas “traza” que no pueden ser activados por las monoaminas neurotransmisoras. Estos receptores se denominan TA1 y TA2, pertenecen a la familia de receptores asociados a las proteínas G (GPCRs) y se encuentran localizados en la membrana plasmática pre- y post-sináptica de las neuronas receptoras. Son activados por triptamina, p-tiramina y por β -feniletilamina, así como por anfetamina, 3,4-metilenedioximetanfetamina (MDMA) y otros tipos de drogas alucinógenas. (10). Este descubrimiento ha despertado un gran interés por estos compuestos a los que, dada su relevancia fisiológica, se les denomina “anfetaminas endógenas” (11-12).

ES 2 364 110 A1

Además de estos aspectos recientemente descubiertos, desde hace años se conoce la función co-transmisora jugada por estas aminas “traza” en los sistemas de neurotransmisión mediados por dopamina, noradrenalina o por serotonina (8). La similitud estructural de estas aminas “traza” con las monoaminas neurotransmisoras, les va a permitir actuar como sustitutos o “falsos neurotransmisores” en los sistemas de dopamina y noradrenalina. Además, debido a su similitud funcional están siendo utilizados en el tratamiento de la encefalopatía hepática (13) o en la enfermedad de Parkinson (14).

Finalmente las aminas “traza” pueden servir de neuromoduladores en el sistema nervioso central, pero antes de explicar esta actividad debería hacerse una clara distinción entre neurotransmisor y neuromodulador (15).

Se denomina neurotransmisor, a la molécula liberada por una neurona al canal sináptico en respuesta a una actividad eléctrica y que posteriormente se va a unir específicamente a sus receptores post-sinápticos, provocando la inducción de un cambio en la excitabilidad de la célula post-sináptica y de este modo, permitir el paso de la información.

Un neuromodulador es también una molécula liberada por una neurona, pero que en este caso no es capaz de provocar un cambio en la excitabilidad de la membrana de la célula post-sináptica por sí mismo, ya que necesita de la presencia de un neurotransmisor. La liberación de un neuromodulador actúa modificando la acción (incrementándola o disminuyéndola) de un neurotransmisor coexistente.

Por lo tanto, no es extraño que las aminas “traza”, hayan estado implicadas en la mayoría de los trastornos neuropsiquiátricos asociados a disfunciones en los sistemas de catecolaminas e indolaminas, ya que estos compuestos modulan los procesos de señalización que ocurren en los terminales post- y pre-sinápticos de estos sistemas. Se cree que alteraciones en la función de estas “aminas traza” están involucradas en la etiología de una gran variedad de trastornos neuropatológicos, incluidas las alucinaciones, esquizofrenia, depresión, estados de ansiedad, hiperactividad, trastorno bipolar, etc. (11, 16-18).

Presencia de aminas biogénicas en los alimentos

Las aminas biogénicas, además de estar presentes en el sistema nervioso central cumpliendo funciones neurotransmisoras y neuromoduladoras, se encuentran presentes en los alimentos y bebidas fermentadas, donde se generan mediante la descarboxilación de sus aminoácidos precursores. Su acumulación (especialmente la de aminas biogénicas aromáticas) puede hacer que la ingesta de estos alimentos resulte perjudicial para la salud. Las principales aminas biogénicas que pueden provocar toxicidad cuando se acumulan en alimentos, aparecen reflejadas en la figura 4.

Las aminas y poliaminas (PAs) solamente se encuentran de forma natural en los alimentos de origen vegetal, ya que estas moléculas se encuentran en las plantas y en sus frutos, formando parte de las paredes celulares de éstos o actuando como sistema defensivo frente al ataque de patógenos o de depredadores (19). Debido a su naturaleza química, estos compuestos participan en numerosos procesos celulares básicos, así como en diferentes eventos relacionados con el crecimiento, con el desarrollo y con la respuesta de las plantas a determinadas condiciones de estrés. Las PAs además de ser esenciales para el crecimiento de las plantas, bajo condiciones apropiadas, pueden ejercer funciones específicas de control de la morfogénesis (20).

La amina predominante dependerá del tipo de fruto o planta que se considere; así por ejemplo, en frutos como el limón, la mandarina y la fresa, predomina la putrescina, mientras que en la frambuesa y en las setas, la amina predominante es la tiramina (21). Se ha comprobado, además, que entre distintas variedades de un mismo fruto puede haber una gran variación de los niveles de aminas (22).

Sin embargo, las aminas biogénicas presentes en muchos alimentos también pueden tener un origen exógeno, siendo generadas mediante descarboxilación de los aminoácidos precursores. Así, aparecen en una gran variedad de alimentos, ya sean estos no fermentados (pescado, productos lácteos, carne, etc.) o bien aquellos otros que han sufrido algún tipo de fermentación durante su elaboración (vino, cerveza, queso, etc.). Su acumulación es un aspecto a tener muy en cuenta debido a los problemas toxicológicos que puede generar su ingestión.

Hay factores que van a limitar la acumulación de aminas biogénicas (sobre todo las que son debidas a la actividad microbiana) en los alimentos. Así, por ejemplo, la disponibilidad de sustrato, el pH del medio, la concentración de sales y la temperatura también van a tener una gran influencia en la producción de aminas. El piridoxal fosfato es un factor requerido para que se lleve a cabo la descarboxilación de aminoácidos en la mayoría de las bacterias y, por consiguiente, su presencia o ausencia será determinante para la síntesis de aminas biogénicas.

Presencia de aminas en alimentos no fermentados

La presencia de aminas biogénicas en los alimentos no fermentados es un indicador de la presencia de actividad microbiana no deseada, y por lo tanto, el nivel de aminas presente puede ser utilizado como un indicador del deterioro del alimento por acción de los microorganismos. Normalmente, la cantidad de histamina, putrescina y cadaverina se incrementa durante el deterioro del alimento, mientras que los niveles de espermina y espermidina disminuyen. Debido

ES 2 364 110 A1

a esta característica, se ha utilizado el Índice de Aminas Biogénicas (IAB), definido por Karmas (23) y expresado en mg/Kg, para calcular el grado calidad de un alimento. En la actualidad la detección y cuantificación de aminas biogénicas se realiza mediante técnicas de HPLC, tal y como se describirá más adelante en este trabajo.

$$5 \quad \text{IAB} = [\text{histamina}] + [\text{putrescina}] + [\text{cadaverina}] / 1 + [\text{espermina}] + [\text{espermidina}]$$

Pescados o carne con un valor de IBA por debajo de 1 son considerados de primera calidad, mientras que valores alrededor de 10 indican una pobre calidad microbiológica del producto.

10 Entre los alimentos no fermentados que acumulan aminas endógenas cabe destacar el pescado y la carne, que se caracterizan por acumular grandes concentraciones de histamina y tiramina, respectivamente, durante su almacenamiento, aunque éste no sea prolongado. Más aún, se ha demostrado que la acumulación de aminas como consecuencia de la actividad microbiana, no puede evitarse con el envasado al vacío del producto (24). La única medida efectiva para evitar la acumulación de aminas biogénicas es el almacenamiento de los productos a bajas temperaturas (24).

15

Presencia de aminas en alimentos fermentados

20 Durante los procesos de preparación de alimentos fermentados, el producto suele ser incubado durante días, semanas e incluso meses, hasta alcanzar el grado necesario de fermentación o maduración, por lo que cabe esperar una mayor proliferación de microorganismos y, por consiguiente, una mayor presencia de aminas biogénicas en esos productos. Además, en la elaboración de estos alimentos se necesita la participación de microorganismos que modifiquen las propiedades de la materia prima original, por lo que la eliminación de estos microorganismos desvirtuaría la calidad, propiedades y características de los productos. Esto es lo que ocurre con alimentos tan populares como el queso, los embutidos, el chucrut o el vino (25).

30 La amina más importante que se acumula en el queso durante la maduración del mismo es la tiramina (26) y, en menor medida, la feniletilamina. Durante este proceso, la caseína es lentamente degradada por enzimas proteolíticas, incrementando de este modo el contenido de aminoácidos libres que pueden ser susceptibles de servir de sustrato a descarboxilasas bacterianas específicas, para dar lugar a la formación de CO₂ y una amina.

35 En cambio, la amina que se acumula mayoritariamente en los embutidos es la histamina (21), pero en este caso su acumulación dependerá del proceso de elaboración, del tipo de carne utilizada, de su proporción y de la calidad de la misma, así como del tiempo de maduración. En el caso de los embutidos, se puede disminuir en gran medida la cantidad de aminas acumuladas en el producto final mediante la utilización de cultivos iniciadores (starters) que contienen los microorganismos adecuados para llevar a cabo la fermentación requerida, pero que no producen estas aminas indeseables. Esta medida, que ha supuesto un gran avance en la regularización de los procesos de fermentación, no siempre es eficaz, ya que la flora microbiana endógena (presente en las materias primas originales) puede ser ya capaz de producir aminas biogénicas por sí misma.

40

Un grupo de productos importantes en cuanto a la acumulación de aminas biogénicas son las bebidas fermentadas. Tal es el caso de, la cerveza y especialmente, del vino. La presencia de aminas en estas bebidas es la responsable del característico dolor de cabeza que se experimenta después de un consumo abusivo (26).

45 En el vino se encuentran principalmente histamina, tiramina y putrescina, en cantidades muy variables según el tipo de vino. La concentración de estas aminas es baja durante la fermentación alcohólica y aumenta durante la fermentación maloláctica. Esto explica que los vinos tintos tengan concentraciones superiores de estas aminas con respecto a los vinos blancos, ya que estos últimos no sufren la fermentación maloláctica. Después de esta fermentación, el vino suele ser sulfatado para eliminar las poblaciones de bacterias y levaduras indeseables a partir ese momento, pero aún así, la concentración de aminas biogénicas sigue evolucionando y puede llegar hasta los 50 mg/l durante la crianza (27). Aunque no existe una regulación definida en relación a la concentración de aminas biogénicas en el vino, hay países que han establecido límites para la importación (Canadá y Suiza 10 mg/l, Holanda 5 mg/l). Esto es debido a que la presencia de aminas en el vino entraña más riesgo que en otros alimentos, ya que al interactuar con ellas el alcohol, se van a ver afectados los mecanismos de detoxificación del organismo y se incrementan las posibilidades de intoxicación por ingesta de aminas.

55

Los niveles de aminas biogénicas en bebidas alcohólicas elaboradas mediante fermentaciones con levaduras, son generalmente más bajos que los hallados en bebidas en cuya elaboración tiene lugar una fermentación ácido láctica (excepto el yogurt), pero aun así estas pueden contener cantidades considerables de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina (2).

60

En resumen, las principales conclusiones que se pueden sacar acerca de la presencia de aminas biogénicas en los alimentos son las siguientes:

65 La mayoría de los alimentos son susceptibles de deteriorarse por la acción de microorganismos capaces de producir aminas biogénicas.

Concentraciones elevadas de ciertas aminas en los alimentos pueden resultar nocivos para la salud.

ES 2 364 110 A1

Se debe dar gran importancia a la evaluación del contenido en aminas de los alimentos, así como a la presencia de otros agentes potenciadores del efecto de éstas, tales como otras aminas, el alcohol o ciertas drogas.

Se pueden y se deben evitar las concentraciones elevadas de aminas biogénicas en los alimentos, mediante buenas prácticas de fabricación y almacenaje de los mismos (control de la higiene, de la contaminación, de la temperatura, etc.).

En la producción de alimentos que precisen de una fermentación acidoláctica, se deben utilizar cultivos iniciadores (starters) de microorganismos que sean aminoácido descarboxilasa negativos. En este sentido, resultaría de gran utilidad la elaboración de cultivos starters que presenten en su composición microorganismos que no solamente no produzcan esas aminas sino que sean capaces de degradarlas.

Toxicología de las aminas biogénicas

Como se ha indicado con anterioridad, la histamina, la tiramina, la triptamina y la β -feniletilamina son aminas biológicamente activas que pueden provocar importantes efectos fisiológicos en el ser humano, tanto psicoactivos (neuromoduladores) como vasoactivos. El consumo de alimentos con un elevado contenido en aminas biogénicas puede provocar un gran número de efectos farmacológicos (Tabla 1) que caracterizan a determinadas enfermedades, como por ejemplo la intoxicación con histamina o la "reacción del queso" producida por la ingesta de tiramina. Además, las aminas están siendo actualmente estudiadas como precursores de compuestos carcinogénicos (21).

TABLA 1

Aminas biogénicas presentes en los alimentos y sus efectos en el organismo

Amina biogénica	Efectos farmacológicos
<p>Histamina</p>	<p>Liberación de adrenalina y noradrenalina Estimulación de la musculatura uterina, intestinal y del aparato respiratorio.</p>
<p>Tiramina</p>	<p>Estimulación de neuronas sensoriales y motoras. Incremento de la presión sanguínea. Control de la secreción gástrica. Vasoconstricción periférica. Incremento del ritmo cardiaco y respiratorio. Estimulación de la lacrimación y de la salivación. Liberación de noradrenalina. Migraña.</p>
<p>Putrescina y cadaverina</p>	<p>Hipotensión. Bradycardia. Potenciación del efecto de otras aminas.</p>
<p>β-feniletilamina</p>	<p>Liberación de noradrenalina. Incremento de la presión sanguínea. Migraña.</p>
<p>Triptamina</p>	<p>Incremento de la presión sanguínea.</p>

ES 2 364 110 A1

De entre todas las aminas biogénicas presentes en los alimentos, cabe destacar por su elevada toxicidad (consecuencia del mayor número de efectos fisiológicos que provocan), la histamina y la tiramina.

La histamina es una amina muy activa biológicamente, ya que desempeña muchas acciones dentro del organismo. Aunque los mastocitos y los basófilos sanguíneos contienen grandes cantidades de histamina, ésta se encuentra almacenada en gránulos característicos y no se liberarán a menos que se produzcan reacciones especiales (reacción alérgica). La histamina puede estimular el ritmo cardíaco y este efecto tiene como consecuencia la liberación de adrenalina y noradrenalina por las glándulas suprarrenales, excitación de la musculatura uterina y del tracto respiratorio, estimulación tanto de neuronas motoras como sensoriales y control de la secreción gástrica (28). Por lo tanto, no es sorprendente que en la intoxicación con histamina se manifiesten síntomas cutáneos como son la urticaria y la aparición de edemas o erupciones, además de síntomas gastrointestinales, como por ejemplo, náuseas, vómitos y diarrea. También se pueden dar otros síntomas como hipotensión, dolor de cabeza o palpitaciones (29).

A pesar del carácter tóxico ocasionado por un exceso de histamina, la presencia de esta amina en los alimentos no tiene porqué ser peligrosa. Existen muchos alimentos que contienen pequeñas cantidades de histamina y que, por lo tanto, van a ser fácilmente toleradas por el organismo gracias a la existencia de eficientes sistemas de detoxificación en el tracto digestivo, que van a metabolizar tanto la histamina ingerida como la histamina formada por la propia flora intestinal. Este sistema de detoxificación está compuesto por dos enzimas diferentes: la diamino oxidasa y la histidina-N-metiltransferasa. Estas dos enzimas se encargan de convertir la histamina en productos sin actividad biológica, y su eficiencia es elevada cuando existe un consumo de aminas normal en la dieta. Sin embargo, estos mecanismos son menos eficaces si se ingieren grandes cantidades de aminas, o en presencia de otras aminas que potencien el efecto tóxico causado por la histamina.

La presencia de tiramina induce la liberación de noradrenalina desde el sistema nervioso simpático, lo que va a provocar un incremento de la presión sanguínea mediante la vasoconstricción periférica y un aumento del ritmo cardíaco. También puede causar dilatación de las pupilas, aumento de la salivación, de la respiración y de los niveles de azúcar en sangre (30).

En lo referente a la presencia de tiramina en los alimentos, cabe destacar no sólo su propia toxicidad, sino también sus efectos nocivos en presencia de inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO), pudiendo provocar estados críticos de hipertensión (31-33). La MAO se encarga de la desaminación oxidativa de las aminas derivadas de los alimentos, y constituyen el mejor sistema defensivo endógeno frente a estos compuestos tóxicos, permitiendo la degradación de los mismos antes de que estos pasen al torrente circulatorio. La utilización de drogas inhibitorias de la MAO durante el tratamiento de determinadas enfermedades mentales (depresión, esquizofrenia, etc.) va a provocar la inhibición de este sistema natural de detoxificación y, como consecuencia de esta inhibición, se producirá la acumulación de tiramina en la sangre, lo que generará estados críticos de hipertensión en los pacientes. El primer alimento que se asoció con este proceso fue el queso, por lo que este incremento de la presión sanguínea es conocido como "reacción del queso" y puede causar graves dolores de cabeza, hemorragias cerebrales o fallo cardíaco (1).

Además de poder actuar como agentes tóxicos, actualmente se está estudiando la implicación de las aminas en la síntesis de derivados que podrían actuar como agentes mutagénicos. Al añadir nitratos a los alimentos como conservantes, y al reaccionar éstos con las aminas presentes en dichos alimentos, se van a generar N-nitrosaminas, que son compuestos carcinogénicos y constituyen un serio riesgo para la salud humana. Algunos ejemplos de estos procesos son la reacción entre la tiramina y nitritos que va a originar 3-diazotiramina, compuesto que induce la aparición de cáncer en la cavidad oral de ratas (30), y la reacción entre tiramina y nitratos que cuando transcurre en condiciones ácidas da lugar a un compuesto mutagénico identificado como 4-(2-aminoetil)-6-diazo-2,4-ciclohexadienona (34).

Producción de aminas biogénicas en los alimentos

Como ya hemos indicado, la mayoría de las aminas presentes en los alimentos son generadas por descarboxilación de sus correspondientes aminoácidos precursores, mediante la acción de enzimas específicas (aminoácido descarboxilasas) producidas por los microorganismos presentes en esos alimentos. Estas descarboxilasas están presentes en un gran número de especies pertenecientes a diferentes géneros bacterianos.

Para que se lleve a cabo la formación de aminas biogénicas en los alimentos se necesitan los siguientes requisitos: a) disponibilidad de aminoácidos libres (generalmente originados por acción proteolítica); b) presencia de microorganismos que posean enzima descarboxilasa (descarboxilasa positivos); y c) que se den las condiciones fisicoquímicas oportunas que permitan tanto el crecimiento bacteriano como la síntesis y la actividad descarboxilasa. Los microorganismos descarboxilasa positivos, pueden estar formando parte de la flora endógena de los alimentos, o ser introducidos por contaminación durante los procesos de elaboración o de almacenaje. En el caso de alimentos y bebidas que durante su elaboración sufren procesos de fermentación, la introducción de cultivos iniciadores puede afectar a la producción de aminas biogénicas interaccionando, directa o indirectamente, tanto con la flora endógena como con la flora contaminante (2).

La mayoría de las descarboxilasas mantienen su actividad incluso después del proceso de pasteurización. Este hecho, unido a que la mayor parte de las aminas son termoestables, implica no solo que la cantidad de aminas ya formadas en los alimentos no se va a eliminar con el proceso de pasteurización, sino que, incluso, aumentará durante el almacenaje.

ES 2 364 110 A1

Descarboxilación de aminoácidos

5 En la descarboxilación de aminoácidos se produce la eliminación del grupo α -carboxilo del aminoácido en cuestión para dar lugar a CO_2 y a la amina correspondiente. Esta reacción está catalizada por descarboxilasas bacterianas que son específicas para cada aminoácido. Así, por ejemplo, la ornitina puede ser degradada a putrescina y la lisina a cada-
10 verina mediante la acción de la ornitina descarboxilasa (35) y la lisina descarboxilasa (36) respectivamente. Del mismo modo y siempre que se den las condiciones adecuadas, la histidina, la tirosina, el triptófano y la fenilalanina se descarboxilarán a histamina, tiramina, triptamina y β -feniletilamina mediante la acción de la histidina descarboxilasa (37), la triptófano descarboxilasa (38), la tirosina descarboxilasa (39) y la fenilalaninadescarboxilasa (40), respectivamente. También existe una descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AADC) que cataliza la reacción de descarboxilación irreversible de L-DOPA a dopamina, pero que presenta una menor especificidad de sustrato que las anteriores, ya que es capaz de llevar a cabo la descarboxilación tanto de tirosina, como de fenilalanina, 5-hidroxitriptófano y triptófano (41).

15 Las aminoácido descarboxilasas han sido ampliamente estudiadas en los últimos años (42). La mayoría de ellas utilizan piroxal-5'-fosfato o piruvato como coenzima, y son dependientes de vitamina B₆. Actualmente se dispone de un gran número de secuencias correspondientes a aminoácido descarboxilasas que están recogidas en las diferentes bases de datos. El análisis comparativo de las mismas ha permitido clasificarlas en cuatro grupos (Tabla 2) e identificar regiones funcionalmente importantes dentro de esas secuencias.

20 Se han propuesto dos mecanismos de acción para la descarboxilación de aminoácidos, uno está basado en una reacción dependiente de piridoxal fosfato, y otro requiere una molécula de piruvato como cofactor (43).

25 En las reacciones de descarboxilación dependientes de piridoxal-5-fosfato, se forma una base de Schiff debido a la reacción del grupo aldehído del piridoxal con uno de los grupos amino pertenecientes a una lisina localizada en el centro activo de la enzima (aldimina interna). El grupo carbonilo del piridoxal-5-fosfato reacciona fácilmente con los aminoácidos para formar una nueva base de Schiff (aldimina externa) que funciona como intermediario, y que permite que éstos sean posteriormente descarboxilados para dar lugar a la correspondiente amina y a la molécula de piridoxal fosfato original.

30 En las reacciones de descarboxilación no dependientes de piridoxal-5-fosfato, está implicada una molécula de piruvato (101). En este caso será el grupo piruvil el que se une covalentemente al grupo amino del aminoácido formando una base de Schiff, permitiendo que sean posteriormente descarboxilados mediante una reacción muy similar a la reacción de descarboxilación dependiente de piridoxal-5-fosfato.

35 La descarboxilación de aminoácidos tiene una importante función energética para las bacterias en aquellos ambientes pobres en nutrientes, ya que al tratarse de una reacción endotérmica, constituye un sistema de generación de ATP, a la vez que conduce a la síntesis de aminas. Por otro lado, la formación de aminas provocará un aumento del pH del medio, favoreciendo el crecimiento bacteriano. Por todas estas razones, se puede considerar la descarboxilación de aminoácidos como un mecanismo muy ventajoso que permite la adaptación al medio a un gran número de microorganismos.

45 (Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 364 110 A1

TABLA 2

α-aminoácido descarboxilasas dependientes de piridoxal-P con sus secuencias conocidas (Sandmeier et al., 1994)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Enzima	Números de acceso en GenBank y fuentes
<p>Grupo I Glicina descarboxilasa (EC 1.4.4.2)</p>	<p>P23378, humana; P15505, pollo; P26969, <i>Pisum sativum</i></p>
<p>Grupo II Glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15)</p>	<p>M84024, <i>Escherichia coli</i> (GAD-a) ; M84025, <i>Escherichia coli</i> (GADp); P20228, <i>Drosophila melanogaster</i>; mouse"; JH0423, rata (GAD65); P18088, rata (GAD67); P14748, gato; M74826, humana (GAD65); M81883, humana (GAD67)</p>
<p>Histidina descarboxilasa (EC 4.1.1.22)</p>	<p>P28577, <i>Enterobacter aerogenes</i>; P28578, <i>Klebsiella planticola</i>; P05034, <i>Morganella morganii</i>; X70644,</p>

Enzima	Números de acceso en GenBank y fuentes
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60	<p><i>Drosophila melanogaster</i>; P23738, ratón; P16453, rata; P19113, humana.</p> <p>M96070, <i>Petroselinum crispum</i>'</p> <p>S19796, <i>Caenorhabditis elegans</i> ; P05031, <i>Drosophila melanogaster</i> ; P14173, rata; P22781; cerdo de Guinea, P80041, cerdo P27718, bovina; P20711, humana</p> <p>P17770, <i>Catharanthus roseus</i></p> <p>P21169, <i>Escherichia coli</i> ; P24169, <i>Escherichia coli</i> (inducible)</p> <p>P05033, <i>Hafnia alvei</i>; P26934, <i>Bacillus subtilis</i>; P23892, <i>Escherichia coli</i></p> <p>P28629, <i>Escherichia coli</i></p> <p>P28629, <i>Escherichia coli</i> (biodegradative) P07805, <i>Trypanosoma brucei</i>; P27116, <i>Leishmania donovani</i>; P27121, <i>Neurospora crassa</i>; P08432, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>; P27120, <i>Xenopus laevis</i>; P27118, pollo; P00860, ratón; P27119, <i>Mus pahari</i>; P09057, rata; P14019, hamster; P27117, bovina; P11926, humana.</p> <p>P21170, <i>Escherichia coli</i>; P22220, <i>Avena sativa</i></p>

Microorganismos productores de aminas biogénicas

65 Enzimas con actividad descarboxilante han sido encontradas en un gran número de bacterias entre las que se incluyen especies de enterobacterias, pseudomonádidos, enterococos y lactobacilos, entre otras (44).

ES 2 364 110 A1

Existen varias enterobacterias con actividad descarboxilásica (fundamentalmente relacionada con la producción de cadaverina y putrescina). Los estudios llevados a cabo *in vitro* con *Enterobacter cloacae* y con diferentes especies de Serratia, así como en *Citrobacter freundii* y *Enterobacter aerogenes*, han puesto de manifiesto la capacidad de estos microorganismos para formar grandes cantidades de putrescina y de cadaverina (45). Otras enterobacterias se caracterizan, en cambio, por ser grandes productoras de histamina; tal es el caso de *Klebsiella oxytoca* (46), *Escherichia coli* (47) o de *Morganella morganii* (45). Aunque estas enterobacterias se encuentran en muy baja proporción en los productos finales, unas malas prácticas de almacenamiento, o una fermentación incontrolada durante la elaboración, pueden provocar una importante proliferación de las mismas.

Existen otros microorganismos que producen aminas biogénicas de diferente naturaleza. Tal es el caso de *Pseudomonas putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomonas shigelloides*, microorganismos que suelen encontrarse en el pescado en mal estado de conservación (21).

Las bacterias acidolácticas, se utilizan profusamente en procesos destinados a obtener diversos alimentos (embutidos, vino, quesos, etc.) mediante fermentaciones, y aunque no pueden ser consideradas especies tóxicas ni patogénicas, muchas de ellas son capaces de producir aminas biogénicas. Así por ejemplo, algunas cepas de *Lactococcus* y *Leuconostoc* producen cantidades apreciables de tiramina e histamina (39) y cepas de lactobacilos pertenecientes a las especies *Lactobacillus buchneri*, *L. alimentarius*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. bavaricus*, *L. homohiochii*, *L. reuteri* y *L. sakei*, son grandes productoras de aminas, especialmente de tiramina (48-50). Muchas de estas bacterias lácticas son utilizadas en la fabricación de quesos, y están incluidas en los cultivos iniciadores empleados por la industria de productos lácteos. Tal es el caso de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Streptococcus faecium*, *S. mitis*, *Lactobacillus helveticus*, *L. casei*, *L. acidophilus* y *L. arabinose*, todas ellas identificadas como productoras de histamina (26).

Cuando se estudia la acumulación de aminas biogénicas en la carne, se ha observado que especies como *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola* y *C. gallinarum* son responsables de la presencia de elevadas concentraciones de tiramina en ella (51).

Otros estudios han demostrado que *Enterococcus faecalis* es responsable de la acumulación de aminas biogénicas (β -feniletilamina entre otras) en los alimentos fermentados (52).

También se ha puesto de manifiesto la producción de aminas biogénicas por parte de hongos y levaduras en alimentos fermentados. Este es el caso de *Debaryomyces* y *Candida*, dos levaduras aisladas de carne fermentada, que presentan una actividad histidina-decarboxilasa mayor incluso que la observada en las bacterias acidolácticas (50).

Métodos analíticos aplicados a la valoración de la capacidad de producción de aminas por parte de los microorganismos: Detección y cuantificación.

Debido a los efectos tóxicos que pueden ocasionar las aminas presentes en los alimentos, ha sido necesario el diseño de métodos y técnicas que permitan detectar capacidades productoras de aminas en los microorganismos utilizados en los procesos de elaboración de productos alimenticios, así como cuantificar la presencia de aminas en estos alimentos.

Métodos empleados para detectar microorganismos con capacidad aminobiogénica

Se han desarrollado varios métodos bioquímicos que permiten la detección de cepas productoras de histamina y de tiramina procedentes de carnes fermentadas y quesos (45, 53-54). Estos métodos se basan en un ensayo que implica el uso de un medio sólido que contiene el aminoácido precursor de la amina a investigar y un indicador de pH. Dado que la formación de aminas a partir de aminoácidos implica una elevación del pH del medio, si la cepa de estudio tiene capacidad para formar aminas, ésta se verá reflejada por un cambio de color del indicador de pH presente en el medio.

También existen métodos de detección molecular que se basan en el diseño de cebadores específicos para las secuencias de los genes que codifican las descarboxilasas responsables de la formación de aminas. Hasta el momento se han desarrollado tres métodos de detección de genes implicados en la producción de aminas:

Sistema de detección del gen *hdc* que codifica una histidina descarboxilasa (54). Para el diseño de los cebadores se compararon las secuencias de nucleótidos del gen *hdcA* de *Lactobacillus sp30A*, de *Clostridium perfringens* y las secuencias de aminoácidos de la histidina descarboxilasas de estos dos microorganismos junto con las de *Lactobacillus buchneri* y de *Micrococcus*. El análisis de las distintas secuencias reveló la existencia de un alto grado de homología entre los genes *hdc* de las diferentes bacterias lácticas, lo que permitió diseñar cebadores específicos para la detección de este gen.

Sistema de detección del gen *tdc* que codifica una tirosina descarboxilasa (55). Para el diseño de los cebadores se compararon las secuencias de nucleótidos del gen *tdc* de *Enterococcus faecalis*, de *Carnobacterium divergens* y de *Lactobacillus brevis*.

Sistema de detección del gen *ocd* que codifica una ornitina descarboxilasa (56). Para el diseño de los cebadores se utilizó la secuencia de nucleótidos del gen de la ornitina descarboxilasa en una cepa de *Oenococcus oeni*.

ES 2 364 110 A1

Métodos analíticos empleados para detectar aminas en alimentos

Hasta el momento, se han descrito varias metodologías que nos permiten detectar y cuantificar la presencia de aminas en los alimentos. Aunque el método más utilizado es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la primera valoración de aminas, se realizó mediante cromatografía en capa fina y tuvo por objeto la determinación de histamina en comida de gatos (57). Actualmente, se han descrito multitud de métodos específicos de detección y cuantificación de aminas en multitud de alimentos, basados todos ellos en técnicas de HPLC (58-63). En los últimos años han aparecido métodos ELISA comerciales para el análisis de histamina en vinos y otros alimentos (64).

Algunos países han fijado valores máximos para la presencia de aminas en determinados alimentos. Así, por ejemplo, Suiza ha establecido una concentración máxima de 10 mg/L de histamina en vino como valores tolerables para la salud humana, mientras que otros países como Alemania, Bélgica y Francia recomiendan valores máximos más bajos (2 mg/L, 5-6 mg/L y 8 mg/L, respectivamente). No se han impuesto límites máximos permitidos sobre el resto de aminas biogénicas, aunque dada la importancia de los efectos de la tiramina en el organismo, es muy probable la pronta aparición de recomendaciones o reglamentaciones sobre valores máximos permitidos para esta amina.

Degradación de aminas biogénicas

La presencia de aminas en el medio ambiente se está viendo incrementando de forma considerable en los últimos años como consecuencia de la actividad industrial. Algunas de estas aminas, especialmente las metiladas, son muy volátiles y están implicadas en la formación de óxido nítrico, un importante gas causante del “efecto invernadero” (65-66). En cambio, otras aminas que están presentes en gran variedad de alimentos, pueden causar, como ya se ha explicado anteriormente, efectos tóxicos en el organismo.

La identificación de las rutas y enzimas implicadas en el metabolismo de estas aminas pueden ser de gran ayuda para la conversión de estos compuestos tóxicos en otros compuestos menos perjudiciales y evitar, de este modo, su efecto perjudicial en los organismos y en el medio ambiente.

Muchos microorganismos pueden oxidar las aminas primarias generando productos que pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía, como fuente de nitrógeno, o como ambas (67) y que ya no son tóxicos.



Este mecanismo de oxidación de aminas primarias es un proceso ampliamente distribuido en la naturaleza, ya que se ha identificado tanto en organismos eucariotas como en procariotas y es catalizado por diferentes enzimas, entre las que se incluyen quinoproteínas amino oxidasas y quinoproteínas o quinohemoproteínas amino deshidrogenasas (68). Tanto las amino oxidasas como las amino deshidrogenasas catalizan la conversión de las aminas en sus correspondientes aldehídos. La diferencia radica en que mientras las amino oxidasas (presentes tanto en eucariotas como en procariotas) producen peróxidos tóxicos, las amino deshidrogenasas (presentes exclusivamente en bacterias) producen equivalentes reducidos que transfieren directamente los e^- a la cadena respiratoria (69-70).

En cuanto a la localización de estas enzimas; parece ser que presentan una localización periplasmática en los microorganismos G-; algunas son solubles y otras están unidas a la cara externa de la membrana citoplasmática. Sin embargo, en microorganismos G+ estas enzimas se encuentran en el citoplasma o unidas a la membrana citoplasmática por su cara interna. Por otro lado, en determinadas levaduras, se ha visto que su localización es exclusivamente peroxisomal (68).

Como se ha mencionado anteriormente, las enzimas responsables de la desaminación oxidativa de las aminas utilizan distintos cofactores que son reducidos tras la oxidación del sustrato y que participan en la transferencia de e^- a uno o dos aceptores exógenos, tales como, el citocromo c, las cupredoxinas (azurina o amocianina) o el oxígeno molecular. En función de quien sea aceptor natural de e^- puede hacerse la distinción natural entre amino oxidasas y amino deshidrogenasas.

La mayoría de las enzimas implicadas en la oxidación de las diferentes aminas a sus correspondientes aldehídos, son oxidoreductasas que se caracterizan por utilizar cofactores diferentes a $NAD(P)^+$ o FAD^+ (aunque existen excepciones de flavoproteínas amino oxidasas que utilizan FAD como cofactor y que se explicaran más adelante). Estas enzimas se denominan quinoproteínas, porque utilizan cofactores que presentan un grupo quinona (71) tales como TPQ (topaquinona), TTQ (triptófano triptofilquinona), LTQ (lisina tirosilquinona) o CTQ (cisteína triptofilquinona). Estos cofactores se caracterizan porque cada uno de ellos se forma a partir de uno o dos aminoácidos presentes en la propia enzima tras sufrir una modificación química postranscripcional (72-74).

En función de la identidad del cofactor utilizado podemos diferenciar varios tipos de enzimas que catalizan reacciones de desaminación oxidativa de aminas: amino oxidasas, quinohemoproteínas amino deshidrogenasas y quinoproteínas amino deshidrogenasas.

Quinoproteínas amino oxidasas

Estas enzimas reciben también la denominación de amino oxidasas dependientes de cobre (Q-AmO). En cuanto a la estructura, son generalmente homodímeros formados por dos subunidades idénticas del mismo tamaño. Se caracterizan porque en cada subunidad presentan una molécula de TPQ, un cofactor enzimático que se forma mediante modificación postranscripcional a partir de uno de los residuos de triptófano existentes en la enzima. Poseen, además, una molécula de cobre, Cu(II) que está coordinada con tres residuos de histidina y dos moléculas de agua (75-76). El Cu(II) es necesario, tanto para la biosíntesis del cofactor de la enzima, como para la catálisis enzimática (76).

Estas enzimas se caracterizan porque son las únicas que están ampliamente distribuidas tanto en bacterias como en organismos superiores y catalizan la oxidación de un gran número de aminas primarias. Así, en *Klebsiella oxytoca* se ha caracterizado una Q-AmO y que está relacionada con la degradación de PhEtNH₂ y de tiramina (68). Cuando *E. coli* (77) o *Klebsiella aerogenes* (*K. pneumoniae*) se cultivan en presencia de tiramina también se ha observado que se expresa una Q-AmO similar a la de *Klebsiella oxytoca* (68). Así mismo, se han identificado otras Q-AmO, en bacterias G+ y en levaduras. Por ejemplo, en *Arthrobacter globiformis* se ha caracterizado una Q-AmO que contiene cobre y que utiliza como sustrato PhEtNH₂ (75, 78), y en la levadura *Hansenula polymorpha* se ha identificado una metilamina oxidasa implicada en la degradación de metilamina (76).

La reacción catalítica llevada a cabo por estas quinoproteínas amino oxidasas, transcurre mediante un mecanismo ping-pong de transaminación que puede dividirse en dos hemirreacciones o etapas, en función del estado de oxidación del cofactor (75, 78).

I. Hemirreacción reductiva: Desaminación oxidativa del sustrato

Ia. El cofactor TPQ participa en esta etapa formando un enlace covalente con el sustrato (a través del grupo carbonilo del C₅), dando lugar a la formación una base de Schiff con el sustrato.

Ib. La base de Schiff es entonces desprotonada por un residuo de aspartato próximo al sitio activo y al mismo tiempo se reduce el cofactor. En este paso se forma otra base de Schiff, pero ahora es el producto el que forma la base de Schiff.

Ic. Posteriormente, se produce la hidrólisis de esta base de Schiff, liberándose el aldehído y dejando la forma aminoresorcinol del TPQ reducido.

La estereoespecificidad de la abstracción del protón de la posición C₁ del sustrato ha sido estudiada en diferentes enzimas, tanto bacterianas como de plantas y de animales. Se ha visto que la especificidad varía en función de la naturaleza de la enzima y de los sustratos utilizados. Así por ejemplo, en el caso de la dopamina, en ocasiones se abstrae el protón pro-R y en ocasiones el pro-S, dependiendo de si la reacción transcurre en plantas o en animales (78).

II. Hemirreacción oxidativa: reducción del oxígeno molecular

En esta etapa se produce la re-oxidación del TPQ reducido (TPQ_{red}) y la liberación de amonio. La participación del Cu(II) en esta etapa se apuntó tras el descubrimiento de la forma Cu(I)/topa semiquinona (TPQ_{sq}). Debido a que la transferencia de e⁻ desde el TPQ_{red} al Cu(II) para formar Cu(I)/TPQ_{seq} es muy rápida, y debido a que el Cu(I) reacciona fácilmente con el O₂, el estado Cu(I)/TPQ_{seq} ha sido propuesto como un intermediario cinéticamente competente con Cu(I) que oxida directamente al O₂. De este modo, se establece un equilibrio entre la forma Cu(II)TPQ_{red} y Cu(I)/TPQ_{sq} para la transferencia intramolecular de e⁻ (75). Posteriormente, el aldehído generado tras la desaminación del sustrato es oxidado al correspondiente ácido.

Quinohemoproteínas amino deshidrogenasas

Son enzimas heterotriméricas constituidas por tres subunidades ($\alpha\beta\gamma$) que utilizan como cofactor el CTQ, el cual se forma a partir de un residuo de cisteína presente en la subunidad pequeña (γ). No se descarta la posibilidad de que una cuarta proteína, cuya función es todavía desconocida, podría intervenir facilitando la formación del cofactor.

Estas enzimas presentan, además del grupo quinona, dos grupos hemo c, unidos a una de las subunidades de la enzima, que actúan como grupos redox activos (69, 79). En este caso, los e⁻ liberados durante el proceso de oxidación son transferidos en último término a una citocromo oxidasa presente en la cadena de transporte, vía el citocromo c₅₅₀, como se ha visto en *Paracoccus denitrificans*; o vía la azurina como sucede en *P. putida* (80-81).

A este grupo pertenece la quinohemoproteína amino deshidrogenasa (QH-AmDH) de *Pseudomonas putida* U, responsable de la desaminación oxidativa de la 2-feniletilamina (82) y la de *Paracoccus denitrificans*. Esta última bacteria posee dos enzimas con actividad amino deshidrogenasa en su periplasma. Una metilamina deshidrogenasa (MADH) que reconoce metilamina y una QH-AmDH que reconoce aminas primarias alifáticas y aromáticas, aunque parece que muestra mayor actividad con n-butilamina y bencilamina (81, 83-84). Otra QH-AmDH que se encuentra dentro de este grupo ha sido purificada a partir de *P. putida* IFO 15633 y ATCC 12633 (69, 79-80).

ES 2 364 110 A1

Los cuatro genes que codifican la QH-AmDH de *P. putida* y de *Paracoccus denitrificans* han sido identificados y secuenciados. El ORF1 codifica la subunidad α , que presenta dos grupos hemo que actúan como grupos redox durante la oxidación; el ORF2 codifica una proteína, cuya función es desconocida, pero que desempeña un papel esencial en la oxidación de estos compuestos; el ORF3 codifica la subunidad pequeña (a la que se encuentra unido el cofactor); y el ORF4 codifica la subunidad β . Estos genes se transcriben conjuntamente, por lo que constituyen un único operón (69).

El mecanismo de las reacciones catalizadas por este grupo de enzimas es el siguiente (80-81) (Figura 5):

La reacción se inicia mediante el ataque nucleofílico del nitrógeno del grupo amino al C_6 perteneciente al grupo carbonilo del cofactor CTQ, dando lugar a la formación de un intermediario carbinolamina (a).

La carbinolamina pierde una molécula de agua y se forma una imina (b).

A continuación un residuo del sitio activo (probablemente el Asp₃₃₇) abstrae un protón del C_α de la amina para formar el intermediario carbaniónico (c). Al mismo tiempo se reduce el CTQ tras captar una molécula de H₂O, dando lugar al intermediario d.

El producto resultante de esta oxidación, el aldehído (e), es finalmente liberado mediante la hidrólisis del nuevo enlace imina que se había formado entre el C_α y el grupo amino.

Parece ser, por lo tanto, que hay una transferencia intramolecular de e^- desde el complejo generado por el sustrato reducido-CTQ al hemo I, desde aquí al hemo II, y a partir de él se produce una transferencia intermolecular al aceptor exógeno. Esta reacción oxidativa tendrá lugar a través de dos reacciones secuenciales hasta que se produce la oxidación del cofactor y de los grupos hemo.

Se ha comprobado que la QH-AmDH de *P. putida* puede ser inhibida por p-nitrofenilhidrazina. Este compuesto se une al sitio activo de la enzima, situado entre la subunidad β y γ , del mismo modo que lo haría el sustrato. Esta unión, provoca algunos cambios importantes en el cofactor CTQ y también cambios conformacionales en las cadenas laterales de los residuos pertenecientes a los aminoácidos del sitio activo, causando así la modificación del centro activo y, con ello, la pérdida de la actividad enzimática (80).

Quinoproteínas amino deshidrogenasas

Estas enzimas (Q-AmDH) utilizan como cofactor el TTQ que se forma a partir de dos residuos de triptófano presentes en la subunidad pequeña de la enzima. Presentan una estructura $\alpha_2\beta_2$, donde el cofactor se encuentra unido a las subunidades β (83).

Dentro de este grupo se incluyen la metilamina deshidrogenasa (MADH) de *Methylobacterium extorquens* AM1 o de *Paracoccus denitrificans* (65) y la amino deshidrogenasa de aminoácidos aromáticos (AADH) descrita en *Alcaligenes faecalis* y que parece estar implicada en el catabolismo de diferentes aminas primarias tales como la PhEtNH₂, la tiramina y la triptamina (65).

Estas enzimas suelen utilizar como aceptor de e^- las proteínas azules de cobre de tipo I (cupredoxinas). Así las MADH utilizan la amicianina y las AADH la azurina (83, 85).

En cuanto a su organización genética, en *Alcaligenes faecalis* se han identificado nueve genes que se transcriben en el mismo sentido y que, aparentemente, están implicados en la degradación de aminas (ORF1, aauBEDA, ORF2, ORF3, ORF4 y hemE). Los genes aauA y aauB codifican la subunidad pequeña y la grande de la AADH, respectivamente, y son homólogos de los genes mauA y mauB que codifican la MADH. Los genes aauE y aauD son homólogos de mauE y mauD y, aparentemente, codifican proteínas que llevan a cabo la misma función (el transporte y plegamiento de la subunidad pequeña en el periplasma, respectivamente). Los genes homólogos de mauF, mauG, mauL, mauM y mauN, que participan en la biosíntesis del cofactor TTQ, no se encuentran en el cluster aau. Sin embargo, se han identificado otros ORFs, tales como el ORF2, que codifica un citocromo monohemo de tipo c, y los ORF1, ORF3, y ORF4, a los que todavía no se les ha asignado ninguna función, pero que parecen ser esenciales para la degradación de ciertas aminas, ya que su disrupción es letal en esta bacteria (65).

El mecanismo catalítico descrito para las AADH y las MADH es similar al propuesto para las QH-AmDH, aunque estas enzimas carecen de los dos grupos hemo.

En las reacciones catalizadas por las Q-AmDH, la transferencia de $2e^-$ desde el cofactor TTQ reducido hasta el aceptor externo de e^- se produce mediante dos reducciones consecutivas. El aceptor de e^- es la azurina en el caso de las AADH y la amicianina en el caso de las MADH. Ambos aceptores fisiológicos median la transferencia de e^- hasta diferentes tipos de citocromo c solubles. En el caso de las AADH, la reacción se favorece cuando la fuerza iónica es alta, mientras que la actividad de las MADH disminuye cuando aumenta la fuerza iónica (85).

ES 2 364 110 A1

En ambos casos, tras la liberación del producto, se genera una forma quinol del TTQ. Por ejemplo, en la reducción del TTQ por metilamina, el formaldehído es liberado pero el grupo amino permanece unido al cofactor. Por lo tanto, la reducción del sustrato implica la formación de una forma aminoquinol del TTQ en el que uno de los oxígenos del grupo carbonilo es reemplazado por el grupo amino derivado del sustrato. La liberación del grupo amino se produce tras la segunda transferencia de e⁻ que permite la regeneración de la quinona (85).

Desaminación de tiramina

La desaminación de la tiramina es llevada a cabo fundamentalmente por amino oxidasas. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en todos los organismos vivos y permiten la conversión, mediante oxidación, de tiramina y otras aminas primarias en sus correspondientes aldehídos liberando una molécula de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada). Debido a la elevada reactividad de estos productos (aldehído y peróxido de hidrógeno), deben ser rápidamente transformados, mediante reacciones mediadas por una fenilacetaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD y por una catalasa de localización citoplasmática respectivamente.



Las amino oxidasas (AOs) que llevan a cabo esta reacción de desaminación de la tiramina, se pueden clasificar en dos subgrupos: Flavoproteínas amino oxidasas (EC 1.4.3.4), que utilizan el FAD como cofactor, y quinoproteínas amino oxidasas (EC 1.4.3.6) que, como se ha explicado anteriormente, se caracterizan por contener Cu(II) y TPQ como cofactor.

Entre las flavoproteínas amino oxidasas, cabe destacar las monoamino oxidasas (MAOs) que se encuentran en infinidad de organismos, y que como la tiramina oxidasa de *Klebsiella aerogenes* (86), la de *Salmonella typhimurium* (87) o la de *Sarcina lutea* (88), son capaces de oxidar tiramina, dopamina y noradrenalina. Estas enzimas se inducen por la presencia de tiramina y sus genes están sometidos a represión catabólica en presencia de glucosa. Pero la MAO también está presente en organismos superiores, y en ellos se han descrito dos isoenzimas, MAOA y MAOB, esta clasificación se realizó en función de la inhibición específica de la MAOA por el antidepresivo clogilina y de la MAOB por el deprenil (89). Ambas isoformas son enzimas mitocondriales que juegan un importantísimo papel en la inactivación de aminas biogénicas, tales como la adrenalina, noradrenalina, serotonina, dopamina y varias “aminas traza” (entre ellas la tiramina).

Estas dos isoformas de la MAO están distribuidas de forma muy heterogénea en los diferentes tejidos del cuerpo humano, por ejemplo, en el hígado la forma MAOB es predominante, mientras que en la mucosa del duodeno la isoforma mayoritaria es la MAOA, siendo esta isoenzima la encargada de la desaminación de las aminas introducidas con la dieta. Por esta razón se provocarán procesos de hipertensión críticos en aquellos pacientes que consuman alimentos ricos en aminas y sigan tratamientos con inhibidores de la MAOA. Esta es una de las causas por las que los tratamientos con fármacos inhibidores de la MAO, actualmente están dirigidos a la inhibición de la actividad de la isoforma MAOB (90).

Pero no siempre la desaminación de tiramina es catalizada por flavoproteínas amino oxidasas. En muchos organismos se han identificado quinoproteínas amino oxidasas, (cuyo mecanismo de acción ya se ha explicado anteriormente), responsables de la desaminación de tiramina, tal es el caso de *Klebsiella oxytoca* (68), *E. coli* (77) y de *Euphorbia characias* (91). En este último caso la enzima es un homodímero soluble que contiene en el centro activo un ión Cu (II) y TPQ como cofactor.

En cambio otras bacterias G⁻ desaminan la tiramina mediante la actividad de enzimas amino deshidrogenasas. Este es el caso de *Alcaligenes faecalis* y de *Pseudomonas aeruginosa* (68) que poseen una amina deshidrogenasa periplásmica que utiliza TTQ como cofactor.

Por último, cabe destacar la existencia de otro sistema de desaminación de tiramina que está mediado por una peroxidasa (EC 1.11.1.7) y que en presencia de H₂O₂ cataliza, como paso previo a la oxidación de la tiramina, la formación de un dímero intermediario (ditiramina). Esta peroxidasa requiere la presencia de H₂O₂ para llevar a cabo su acción y se ha comprobado que esta enzima trabaja cooperativamente con las amino oxidasas, actuando estas últimas como donadoras de H₂O₂. Posteriormente, el intermediario generado sufrirá una oxidación mediada por la acción de la (flavoproteína o quinoproteína) amino oxidasa correspondiente en los dos grupos amino, dando lugar a la formación de un di-p-hidroxifenilacetaldehído. (91-93). También puede ocurrir que esta peroxidasa utilice como sustratos el aldehído y el H₂O₂ obtenidos como productos de la desaminación de tiramina por acción de las amino oxidasas, dando lugar al di-p-hidroxifenilacetaldehído sin la formación previa de ditiramina (Figura 6).

Degradación microbiana de tiramina

Como se indicó anteriormente, la tiramina, puede desencadenar efectos tóxicos en enfermos tratados con inhibidores de la MAO, o en personas sanas cuando su aporte en la dieta es muy elevado. Por ello, el conocimiento de las

vías responsables de la degradación de este compuesto por un agente microbiano puede tener importantes aplicaciones en el campo de la salud pública. Por otra parte la transferencia de los genes responsables de esa vía podría dotar de capacidad para degradar tiramina a organismos empleados en la industria alimentaria, reduciendo de este modo, la concentración de tiramina en los alimentos (quesos, vinos, etc.). Por último, el hecho de que la tiramina sea una importante amina “traza” con función en el sistema nervioso central y que posea similitud estructural con importantes neurotransmisores (por ejemplo, la dopamina), hace que el estudio de la ruta metabólica responsable de la degradación de este compuesto pueda tener interesantes aplicaciones farmacológicas, pudiendo ser usada, por ejemplo, para el tratamiento de determinadas enfermedades neurológicas.

En determinados microorganismos tales como *Klebsiella aerogenes* (86), *Micrococcus luteus* (67), *Salmonella typhimurium* (87) y *E. coli* (62) se ha descrito la presencia de enzimas con actividad tiramina oxidásica que son capaces de oxidar la tiramina a 4-hidroxifenilacetaldehído. Además, varios de los genes y de las proteínas responsables de la degradación de este compuesto han sido ya caracterizados (62). Así, por ejemplo, en *E. coli* K12, la degradación de tiramina y de otras aminas aromáticas relacionadas (2-feniletilamina, dopamina) requiere la acción secuencial de una monoamino oxidasa (miembro de la familia de las quinoproteínas amino oxidasas) codificada por el gen *maoA*, y una fenilacetaldehído deshidrogenasa, producto del gen *padA*, que transforma el fenilacetaldehído generado por la proteína MAOA en 4-OH-PhAc, el cual será posteriormente degradado por una ruta específica (94). Corriente arriba del gen *maoA* se encuentra el gen *maoB* que se transcribe en el mismo sentido y que codifica un regulador transcripcional perteneciente a la familia AraC. El producto del gen *maoB* activa la expresión de *maoA* pero no la del gen *padA*, que se transcribe en sentido contrario. Esto indica que, aunque estos genes están físicamente próximos en el cromosoma y forman parte de la misma ruta catabólica, no constituyen un operón (94). Todos los microorganismos en los que se ha estudiado la degradación de tiramina utilizan las mismas enzimas descritas en *E. coli*.

25 Catabolismo de tiramina en *P. putida* U

Pseudomonas putida U (Colección Española de Cultivos Tipo CECT 4848) es una estirpe bacteriana capaz de crecer en numerosos medios de cultivo con composición química definida (medios mínimos o MM), que contienen como fuentes de carbono diferentes moléculas difícilmente degradables, algunas de las cuales pueden incluso llegar a ser perjudiciales o tóxicas para procariontes y para eucariontes (95-98). Esta versatilidad metabólica, ha hecho que esta bacteria fuese objeto de numerosos estudios bioquímicos y genéticos lo que ha conducido al esclarecimiento de algunas de las rutas catabólicas responsables de la degradación de esas moléculas. Así, se han identificado las rutas implicadas en la degradación del ácido fenilacético y de diferentes compuestos relacionados estructuralmente con él (ácidos n-fenilalcanoicos, fenilacetaldehído, 2-feniletanol, etc) (82,96-98). Adicionalmente, se ha comprobado que *P. putida* U es capaz de degradar eficientemente otros compuestos aromáticos tales como los aminoácidos fenilalanina, tirosina y el ácido 3-hidroxifenilacético, utilizando para ello una vía, caracterizada por nuestro grupo de investigación, que implica la conversión de todos esos compuestos en homogentísico que, posteriormente, es degradado hasta ácido fumárico y ácido acetoacético (99-100).

Esta bacteria es también capaz de crecer en MM que contienen como únicas fuentes de carbono aminas alifáticas (propil, butil, pentil, hexil, octal y nonilaminas) y aromáticas (2-feniletilamina, tiramina y dopamina). Las rutas responsables de la degradación de las aminas alifáticas y de la 2-feniletilamina han sido identificadas por nuestro grupo (82), mientras que la ruta responsable de la asimilación de tiramina y de dopamina en esta bacteria se desconocía hasta la fecha. De hecho, muchos investigadores proponían que la degradación de tiramina en bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* se realizaba mediante las mismas enzimas descritas en *E. coli*, y implicaban la participación de las enzimas codificadas por los genes *maoA*, *padA* y *maoB* (94). Sin embargo, los autores de la invención han demostrado fehacientemente que, sorprendentemente, *P. putida* U degrada tiramina y dopamina mediante una nueva ruta catabólica cuyas enzimas están codificadas por los genes *tyn* tal y como se describe más adelante. Esta nueva ruta catabólica es la base de la invención.

50

Referencias

1. SMITH, T.A. (1980) Amines in food. *Food Chem.* 6: 169-200.
2. TEN BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H.M.L.J., HUIS IN'T VELD, J.H.J. (1990) Occurrence and formation of biologically amines in food. *Int. J. Food Microbiol.* 11:73-84.
4. OLANOW, C.W., FREEMAN T.B., KORDOWER, J.H. (1997) Neural transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 74: 249-269.
5. HAAVIK, J., BLAU, N., THÖNY, B. (2008) Mutations in human monoamine-related neurotransmitter pathway genes. *Hum Mutat.* 29: 891-902.
6. FIBIGER, H.C. (1995). Neurobiology of depression: Focus on dopamine *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 49: 1-17.

ES 2 364 110 A1

7. **PHILIPS S.R., DAVIS B.A., DURDEN D.A., BOULTON A.A.** (1975) Identification and distribution of m-tyramine in the rat. *Can J Biochem.* 53: 65-69.
8. **AXELROD, J., SAAVEDRA, J.M.** (1977) Octopamine. *Nature.* 265: 501-504.
- 5 9. **BOULTON A.A.** (1980) Trace amines and mental disorders. *J Neurol Sci.* 7: 261-263.
- 10 10. **BOROWSKY, B., ADHAM, N., JONES, K. A., RADDATZ, R., ARTYMYSHYN, R., OGOZALEK, K.L., DURKIN, M.M., LAKHLANI, P.P., BONINI, JA. PATHIRANA, S.** (2001) Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 8966-8971.
11. **KIM, K.A., VON ZASTROW, M.** (2001) Old drugs learn new tricks: insights from mammalian trace amine receptors. *Mol Pharmacol.* 60: 1165-1167.
- 15 12. **PREMONT, R.T., GAINETDINOV, R. R., CARON, M.G.** (2001) Following the trace of elusive amines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 9474-9475.
13. **FOGEL, W.A., ANDRZEJEWSKI, W., MAŚLIŃSKI. C., FOGEL. W.A. ANDRZEJEWSKI. W.,**
20 **MAŚLIŃSKI. C.** (1990) Neurotransmitters in hepatic encephalopathy. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 50: 281-93.
14. **BALDESSARINI, R.J., VOGT, M BALDESSARINI, R.J., VOGT M** (1972) Regional release of aromatic amines from tissues of the rat brain *in vitro.* *J Neurochem.* 19: 755-761.
- 25 15. **BERRY, M.D.** (2004) Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *J. Neurochem.* 90: 257-271.
16. **BOULTON, A.A.** (1976) Identification, distribution, metabolism, and function of meta and para tyramine, phenylethylamine and tryptamine in brain. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 15: 57-67.
- 30 17. **DAVIS, B.A., BOULTON, A.A.** (1994) The trace amines and their acidic metabolites in depression an overview. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 18: 17-45.
18. **BRANCHEK, T.A., BLACKBURN, T P** (2003). Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3: 90-97.
- 35 19. **ROSS, W.F., WALTERS, D.R., ROBINS D.J.,** (2004). Synthesis and antifungal activity of five classes of diamines. *Pest Manag. Sci.* 60: 143-148.
- 40 20. **GALSTON, A.W.; KAUR-SHAWNEY, R.** (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* 94: 406-10.
21. **SHALABY, A.R.** (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International.* 29: 675-690.
- 45 22. **MAGA, J.A.** (1978) Amines in food. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* 10: 373-403.
23. **KARMAS, E.** (1981). Biogenic amines as indicators of seafood freshness. *Food Sci. Technol.* 5: 108-109.
- 50 24. **WEI, C.I., CHEN, C.M., KOBURGER, J.A., OTWELL, W.S., MARSHALL, M.S.** (1990) Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. *Journal of Food Science* 55: 59-63.
25. **ASKAR, A., TREPTOW, H.** (1986), Biogenic amine in lebensmittein vorkommen bedeutung und bestimmung. Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart.
- 55 26. **STRATTON, J.E., HUTKINS, R.W. TAYLOR, S.L.** (1991) Biogenic amine in cheese and other fermented foods: *J. Food Prot.* 54: 460-470.
27. **BUTEAU, C., DUISCHAEVER, C.L., ASHTON, G.C.** (1984). A study. of the biogenesis of amines in a Villard noir wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 228-235.
- 60 28. **TAYLOR, S.L., HUI, J.Y., LYOUS, D E.** (1984). Toxicology of scombroid poisoning. In. *Seafood Toxins*, ed. E.R. Ragils, ACS Symposium Series 262. Washington, DC. 1: 417.
- 65 29. **GILBERT, R.J.; HOBBS, G., MURRAY, C.K., CRUICKSHANK, J.G., YOUNG, S.E.** (1980) Scrombrotoxic fish poisoning: features of the first 50 incidents to be reported in Britain (1976-79). *Br. Med. J.* 281: 71-72.

30. **JOOSTEN, H.M.L.J.** (1988). The biogenic amines contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 42, pp. 329-357.
- 5 31. **GENERALI, J.A., HOGAN, L.C., MCFARLANE, M SCHWAB, S., HARTMAN, C.R.** (1981) Hypertensive crisis resulting from avocados and a MAO inhibitor. *Drug Intell Clin Pharm.* 15: 904-906.
32. **RAPAPORT, M.H.** (2007) Dietary restrictions and drug interactions with monoamine oxidase inhibitors: the state of the art. *J Clin Psychiatry.* 8: 42-46.
- 10 33. **SIMPSON, G.M., DE LEON, J.** (1989) Tyramine and new monoamine oxidase inhibitor drugs. *Br J Psychiatry Suppl.* 6: 32-37.
34. **OCHIAI, M., WAKABAYASHI, K., NAGAO, M., SUGIMURA, T** (1984) Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by nitrite. *Gann.* 75: 1-3.
- 15 35. **BELLO-FERNANDEZ, C., PACKHAM, G., CLEVELAND, J.L.** (1993) The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 7804-7808.
- 20 36. **KIKUCHI, Y., KOJIMA, H., TANAKA, T., TAKATSUKA, Y., KAMIO, Y.** (1997) Characterization of a second lysine decarboxylase isolated from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 179: 4486-4492.
37. **RECSEI, PA. SNELL, E.E.** (1972) Histidine decarboxylaseless mutants of *Lactobacillus* 30a: isolation and growth properties. *J Bacteriol.* 112: 624-626.
- 25 38. **MITOMA, C., UNDEFRIEND, S.** (1960) Bacterial tryptophan decarboxylase. *Biochim Biophys Acta.* 37: 356-357.
39. **CHOUDHURY, N., HANSEN, W., ENGESSER, D., HAMMES, W.P., HOLZAPFEL, W.H.** (1990). Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase medium. *Letters in Applied Microbiology.* 11: 278-281.
- 30 40. **KATO, Y., TSUDA, T., ASANO, Y.** (2007) Purification and partial characterization of N-hydroxy-1-phenylalanine decarboxylase/oxidase from *Bacillus* sp. strain OxB-1, an enzyme involved in aldoxime biosynthesis in the "aldoxime-nitrile pathway". *Biochim Biophys Acta.* 1774: 856-865.
- 35 41. **ISHII, S., HAYASHI, H., OKAMOTO, A., KAGAMIYAMA, H.** (1998) Aromatic L-amino acid decarboxylase: conformational change in the flexible region around Arg334 is required during the transaldimination process. *Protein Sci.* 7: 1802-1810.
- 40 42. **SANDMEIER E. HALE T I. CHRISTEN P.** (1994) Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *Eur J Biochem.* 221: 997-1002.
43. **TOLBERT, W.D., GRAHAM, D.E., WHITE, R.H., EALICK, S.E.** (2003) Pyruvoyl-dependent arginine decarboxylase from *Methanococcus jannaschii*: crystal structures of the self-cleaved and S53A proenzyme forms. *Structure.* 11: 285-294.
- 45 44. **SUZZI, G., GARDINI, F.** (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 41-54.
- 50 45. **BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU. M.C.** (2001). Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology.* 66: 185-189.
- 55 46. **ROIG-SAGUÉS, A.X., HERNÁNDEZ-HERRERO, M., LÓPEZ-SABATER, E.I., RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J., MORA-VENTURA, M.T.** (1996). Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened Salsichon, a Spanish cured sausage. *Journal of Food Protection* 59: 516-520.
47. **SILLA SANTOS, M.H.,** (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal Food Microbiology.* 39: 227-230.
- 60 48. **LE JEUNE, C., LONVAUD-FUNEL, A., TEN BRINK., HOFSTRA, H. Y VAN DER VOSSSEN. J.M.B.M.** (1995) Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 316-326.
- 65 49. **MASSON, F., TALON, R., MONTEL, M.C.** (1996) Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology.* 32: 199-207.

50. MONTEL, M.C., MASSON, F., TALON, R. (1999) Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. *Sciences des Aliments*. 19: 247-254.
51. MASSON, F., JOHANSSON, G., MONTEL, M.C. (1999). Tyramine production by a strain of *Carnobacterium divergens* inoculated in meat-fat mixture. *Meat Science*. 52: 65-69.
52. NOUT, M.J.R (1994) "Fermented foods and food safety". *Food Res. Int.* 27:
53. NIVEN, C.F., JEFFREY, M.R., CORLETT, D A. (1981) Differential plating médium for quantitative detection of histamine producing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 321-322.
54. JOOSTEN, H.M.L.J., NORTHOLT, M.D. (1989). Detection, growth, and amine capacity of lactobacilli in cheese. *Appl Environ. Bacteriol.* 55: 2356-2359.
55. CONNIL, N., LE BRETON, Y., DOUSSET, X., AUFRAY, Y., RINCÉ, A., PRÉVOST, H. (2002) Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl Environ Microbiol.* 68: 3537-3544.
56. MARCOBAL, A., DE LAS RIVAS B., MORENO-ARRIBAS, M.V., MUÑOZ, R. (2004) Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiol. Lett.* 239: 213-220.
57. GURAYA, H.S., KOEHLER, P.E. (1991). Histamine in cats foods: survey and comparison of methodologies. *Vet. Hum. Toxicol.* 33: 124-128.
58. VUORELA, H., HINKKANEN, R., HILTUNEN, R. (1989) Rapid determination of tyramine in fish feed and slaughter offal by HPLC using coulometric detection. *Z Lebensm Unters Forsch.* 189: 434-437.
59. LEHTONEN, P. (1996) A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 127-133.
60. ROMERO, R., GAZQUEZ, D., BAGUR, M.G., SÁNCHEZ-VINAS, M. (2000) Optimization of chromatography parameters for the determination of biogenic amines in wine by reversephase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 871: 75-83.
61. OGURI, S., ENAMI, M., SOGA, N. (2007) Selective analysis of histamine in food by means of solid-phase extraction cleanup and chromatographic separation. *J Chromatogr A.* 1139: 70-74.
62. FERRÁNDEZ, A., PRIETO, M. A., GARCÍA, J. L., DÍAZ, E. (1997) Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 406: 23-27.
63. GIANOTTI, V., CHIUMINATTO, U., MAZZUCCO, E., GOSETTI, F., BOTTARO, M., FRASCAROLO, P., GENNARO, M.C. (2008) A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. *J Chromatogr A.* 1185: 296-300.
64. MARCOBAL, A.; POLO, M.C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; MORENO-ARRIBAS, M.V. (2005). Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Res. Int.* 38: 387-394.
65. Chistoserdov, A.Y. (2001) Cloning, sequencing and mutagenesis of the genes for aromatic amine dehydrogenase from *Alcaligenes faecalis* and evolution of amine dehydrogenases. *Microbiology.* 147: 2195-2202.
66. VAN NESTE, A., DUCE, R. A., LEE, C. (1987) Methylamines in the marine atmosphere. *Geophys. Res. Lett.* 14: 711-714.
67. YAMADA, H., ADACHI, O., OGATA, K. (1965) Amine oxidases of microorganisms. Part II. Purification and crystallization of amine oxidases of *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* 29: 649-654.
68. HACISALIHOGU, A., JONGEJAN, J.A., DUINE, J.A. (1997) Distribution of amine oxidases in bacteria grown on primary amines and characterization of the amine oxidase from *Klebsiella oxytoca*. *Microbiology.* 143: 505-512.
69. VANDENBERGHE, I., KIM, J. K., DEVREESE, B., HACISALIHOGU, A., IWABUKI, H., OKAJIMA, T., KURODA, S., ADACHI, O., JONGEJAN, J.A., DUINE, J.A. (2001) The covalent structure of the small subunit from *Pseudomonas putida* amine dehydrogenase reveals the presence of three novel types of internal cross-linkages, all involving cysteine in a thioether bond. *J. Biol. Chem.* 276: 42923-42931.

70. **McINTIRE, W.S., HARTMANN, C.** (1992) Copper-containing amine oxidases. In Davidson, V. (ed.), Principles and Applications of Quinoproteins. pp.: 97-172. New York: *Marecl Dekker*.
71. **OUBRIE, A., ROZEBOOM, H.J., KALK, K.H., HUIZINGA, E.G.** (2002) Crystal structure of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *J. Biol. Chem.* 277: 3727-3732.
72. **STITES, T.E., MITCHELL, A.E., RUCKER, R.B.** (2000) Physiological importance of quinoenzymes and the O-quinone family of cofactors. *J. Nutri.* 130: 719-727.
73. **MATSUSHITA, K., TOYAMA, H., ADACHI, O.** (2002) Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *App. Microbiol. Biotechnol.* 58: 13-22.
74. **DAVIDSON, V.L.** (2004) Electron transfer in quinoproteins. *Archiv. Biochem. Biophys.* 428: 32-40.
75. **HIROTA, S., IWAMOTO, T., KISHISHITA, S., OKAJIMA, T., YAMAUCHI, O., TANIZAWA, K.** (2001) Spectroscopic observation of intermediates formed during the oxidative half-reaction of copper/topa quinone-containing phenylethylamine oxidase. *Biochemistry.* 40: 15789-15795.
76. **MATSUNAMI, H., OKAJIMA, T., HIROTA, S., YAMAGUCHI, H., HORI, H., KURODA, S., TANIZAWA, K.** (2004) Chemical rescue of a site-specific mutant of bacterial copper amine oxidase for generation of the topa quinone cofactor. *Biochemistry.* 43: 2178-2187.
77. **COOPER, R.A., KNOWLES, P.F., BROWN, D.E., MCGUIRL, M.A., DOOLEY, D.M.** (1992) Evidence for copper and 3,4,6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochem J.* 288:337-340.
78. **UCHIDA, M., OHTANI, A., KOHYAMA, N., OKAJIMA, T., TANIZAWA, K., YAMAMOTO, Y.** (2003) Stereochemistry of 2-phenylethylamine oxidation catalyzed by bacterial copper amine oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2664-2667.
79. **ONO, K., OKAJIMA, T., TAÑI, M., KURODA, S., SUN, D., DAVIDSON, V. L., TANIZAWA, K.** (2006) Involvement of a putative [Fe-S]-cluster-binding protein in the biogenesis of quinohemoprotein amine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 281: 13672-13684.
80. **SATOH, A., KIM, J.K., MIYAHARA, I., DEVREESE, B., VANDENBERGHE, I., HACISALIHOGU, A., OKAJIMA, T., KURODA, S., ADACHI, O., DUINE, J.A.** (2002) Crystal structure of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 277: 2830-2834.
81. **SUN, D., ONO, K., OKAJIMA, T., TANIZAWA, K., UCHIDA, M., YAMAMOTO, Y., MATHEWS, F.S., DAVIDSON, V.** (2003) Chemical and kinetic reaction mechanisms of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry.* 42: 10896-10903.
82. **ARIAS, S., OLIVERA, E R., ARCOS, M., NAHARRO, G., LUENGO, J.M.** (2008) Genetic analyses and molecular characterization of the pathways involved in the conversion of 2-phenylethylamine and 2-phenylethanol into phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U. *Environ Microbiol.* 10: 413-432.
83. **TAKAGI, K., TORIMURA, M., KAWAGUCHI, K., KANO, K., IKEDA, T.** (1999) Biochemical characterization of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry.* 38: 6935-6942.
84. **DATTA, S., MORI, Y., TAKAGI, K., KAWAGUCHI, K., CHEN, Z.W., OKAJIMA, T., KURODA, S., IKEDA, T., KANO, K., TANIZAWA, K., MATHEWS, F.** (2001) Structure of a quinohemoprotein amine dehydrogenase with an uncommon redox cofactor and highly unusual crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 14268-14273.
85. **HYUN, Y.L., DAVIDSON, V.L.** (1995) Electron transfer between aromatic amine dehydrogenase and azurin. *Biochemistry.* 34: 12249-12254.
86. **OKAMURA, H., MUROOKA, Y., HARADA, T.** (1976) Regulation of tyramine oxidase synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol.* 127: 24-31.
87. **MUROOKA, Y., HARADA, T.** (1981) Regulation of derepressed synthesis of arylsulfatase by tyramine oxidase in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 145: 796- 802.
88. **KUMAGAI, H., MATSUI, H., OGATA, K., YAMADA, H.** (1969) Properties of crystalline tyramine oxidase from *Sarcina lutea*. *Biochim Biophys Acta.* 171: 1-8.
89. **OCHIAI, Y., ITOH, K., SAKURAI, E., ADACHI, M., TANAKA, Y.** (2006) Substrate selectivity of monoamine oxidase A, monoamine oxidase B, diamine oxidase, and semicarbazide-sensitive amine oxidase in COS-1 expression systems. *Biol Pharm Bull.* 29: 2362-2366.

90. SAURA, J., NADAL, E., VAN DEN BERG, B., VILA, M., BOMBI JA. MAHY, N. (1996) Localizaron of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sci.* 59: 1341-1349.

91. MURA, A., PINTUS, F., FAIS, A., PORCU, S., CORDA, M., SPANÒ, D., MEDDA, R., FLORIS, G. (2008) Tyramine oxidation by copper/TPQ amine oxidase and peroxidase from *Euphorbia characias* látex. *Arch Biochem Biophys.* 475: 18-24.

92. GROSS, A.J., SIZER, I.W. (1959) The oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. *J Biol Chem.* 234 :1611-1614.

93. VALOTI, M., MORÓN, J.A., BENOCCI, A., SGARAGLI, G., UNZETA. M. (1998) Evidence of a coupled mechanism between monoamine oxidase and peroxidase in the metabolism of tyramine by rat intestinal mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 55: 37-43.

94. DÍAZ, E., FERRÁNDEZ, A., PRIETO, M.A., AND GARCÍA, J.L. (2001) Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. 65: 523-569.

95. Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L. B., and Luengo, J. M. (1990) Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid. *J Biol Chem* 265: 7084-7090.

96. LUENGO, J.M., GARCÍA, J.L., OLIVERA, E.R. (2001) The phenylacetyl-CoA catabolón: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* 39: 1434-1442.

97. Luengo, J. M., Arias, S., Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Arcos, M., Naharro, G., Olivera, E. R. (2004) From aromatics to bioplastics: the phenylacetyl-CoA catabolon as a model of catabolic convergence. In Gayathri, A. (ed.), *Recent Res. Devel. Biophys. Biochem.*, Vol. 4, pp.: 257-292. Research Signpost, Kerala, India.

98. OLIVERA, E.R., MIÑAMBRES, B., GARCÍA, B., MUNIZ, C., MORENO, M.A., FERRÁNDEZ, A., DÍAZ, E., GARCÍA, J.L. Y LUENGO, J.M. (1998) "Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 6419-6424.

99. ARIAS-BARRAU, E., OLIVERA, E.R., LUENGO, J.M., Fernández C., Galán B., García, J.L., Díaz, E., Miñambres, B. (2004) The homogentisate pathway: A central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenilacetate in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 186: 5062-5067.

100. ARIAS-BARRAU, E., SANDOVAL, A., NAHARRO, G., OLIVERA, E.R., LUENGO, J.M. (2005) A two-component hydroxylase involved in the assimilation of 3-hydroxyphenyl acetate in *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem.* 280: 26435-26447.

101. RECSEI, P.A., MOORE, W.M., SNELL, E.E. (1983) Pyruvoyl-dependent histidine decarboxylases from *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*. Comparative structures and properties. *J Biol Chem.* 258: 439-444.

102. KOVACH, M.E., ELZER, P.H., HILL, D.S., ROBERTSON, G.T., FARRIS, M.A., ROOP, R.M., PETERSON, K.M. (1995) Four new derivates of the broad-host range cloning vector pBBRIMCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* 166: 175-176.

103. QUANDT, J., HYNES, M.F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene.* 127: 15-21.

104. SCHÄFER, A., TAUCH, A., JÄGER, W., KALINOWSKI, J., THIERBACH, G., PÜHLER, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors from the *Escherichia coli* plasmids pK18 y pK19: selection of defined deletions in the cromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 145: 69-73.

105. HERRERO, M., DE LORENZO, V., TIMMIS, K.N. (1990) Transposon vector containing non-antibiotic selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign DNA in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6557-6567.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método alternativo para la degradación de tiramina y/o dopamina en muestras que las contengan. Se basa en el descubrimiento de una nueva ruta catabólica, identificada por los autores de la invención en *Pseudomonas putida* U, capaz de degradar estas dos moléculas hasta dar lugar a ácido pirúvico y ácido

succínico (o semialdehído succínico). La ruta completa implica la intervención de enzimas codificadas en dos clusters, *tyn* y *hpa*, que se encuentran contiguos en el genoma de dicha bacteria. Las enzimas del primero de los clusters, *tyn*, permiten la transformación tanto de tiramina como de dopamina en el correspondiente ácido 4-hidroxifenilacético (3,4-hidroxifenilacético en el caso de dopamina), en dos pasos: el primero implica la actuación de una tiramina oxidasa compuesta por dos subunidades, *TynA* y *TynB*, capaz de actuar tanto sobre tiramina como sobre dopamina, transformándolas en el correspondiente 4-hidroxifenilacetaldehído; la actuación sobre este compuesto de una deshidrogenasa, la enzima *TynC*, da lugar al correspondiente ácido 4-hidroxifenilacético (3,4-hidroxifenilacético en el caso de dopamina). La actuación sobre este compuesto de las enzimas codificadas en el cluster *hpa* permite, mediante una secuencia de reacciones catabólicas, su transformación en ácido pirúvico y ácido succínico (o semialdehído succínico), dos metabolitos generales, cruce de distintas vías metabólicas en cualquier organismo. La ruta completa necesita un paso más en la degradación de tiramina: mientras que la acción de las enzimas del cluster *tyn* sobre dopamina da lugar directamente a ácido 3,4-dihidroxifenilacético, sustrato de una reacción catalizada por la dioxigenasa *HpaD* (3,4-dihidroxifenilacético 2,3-dioxigenasa), la transformación de tiramina requiere la acción de una monooxigenasa compuesta por dos subunidades, *HpaB* y *HpaC* (4-hidroxifenilacético monooxigenasa) para transformar el compuesto obtenido tras la acción de las enzimas del cluster *tyn* sobre la tiramina, el ácido 4-hidroxifenilacético, en ácido 3,4-hidroxifenilacético. A partir de ahí, el procedimiento catabólico es común para ambos compuestos.

Tanto la ruta catabólica en sí como las enzimas que catalizan las reacciones que forman parte de la misma (y, en particular, la primera de las enzimas de la ruta, la tiramina oxidasa *TynAB*) son nuevas y su naturaleza no era obvia a partir del estado de la técnica pues, como se ha comentado previamente, la ruta responsable de la asimilación de dopamina y tiramina en *Pseudomonas putida U* se desconocía hasta la fecha. El descubrimiento de esta ruta, además, demuestra que la degradación de tiramina en *Pseudomonas* no se realiza mediante las mismas enzimas descritas en *E. coli*, como proponían muchos autores. Es por ello que, tanto el procedimiento de degradación de tiramina y dopamina que parte de la tiramina oxidasa de *Pseudomonas putida* (y que puede completarse hasta ácido pirúvico y succínico mediante la acción de las sucesivas enzimas de la ruta), como la secuencia de aminoácidos de las enzimas que catalizan dichas reacciones y las secuencias codificantes de dichas enzimas, forman parte de la presente invención. También son parte de la invención los vectores de expresión a partir de los cuales puedan sintetizarse dichas enzimas (o enzimas con un alto grado de homología con las mismas, que sean capaces de catalizar las mismas reacciones), así como los microorganismos recombinantes que hayan sido transformados con dichos vectores.

Dado el gran interés que la aplicación del procedimiento de la invención puede tener en alimentos, para disminuir su contenido en tiramina y/o dopamina, constituyen aspectos alternativos adicionales de la invención el uso de microorganismos capaces de sintetizar al menos la primera, un subconjunto o la totalidad de las enzimas necesarias para completar la ruta catabólica completa descrita para disminuir el contenido de tiramina y/o dopamina en alimentos que las contengan o, incluso, el uso de dichos microorganismos para actuar sobre materias primas que se vayan a transformar para ser convertidas en alimentos o bebidas listas para el consumo humano o animal y que, o bien contengan de forma natural tiramina o dopamina, o que sean susceptibles de generarlas durante el proceso de transformación de dichas materias primas en los alimentos finales. Esto es así tanto para el microorganismo que, según se divulga en la presente solicitud, contiene de forma natural todos los genes necesarios para sintetizar las enzimas que catalicen las reacciones de la ruta completa (*Pseudomonas putida U*), como para posibles microorganismos recombinantes que hayan sido transformados con algún vector que permita la expresión de al menos uno de los genes codificantes de las enzimas que catalizan las reacciones del procedimiento catabólico.

Los cluster *tyn* y *hpa* contienen además otros marcos abiertos de lectura que codifican polipéptidos que parecen estar implicados en la regulación de la ruta catabólica descrita. Dichos polipéptidos, las secuencias que los codifican, las realizaciones del procedimiento que se llevan a cabo estando presentes los polipéptidos reguladores codificados en el cluster *hpa* y/o los polipéptidos reguladores codificados en el cluster *tyn* están también incluidos dentro del alcance de la invención, así como los vectores de expresión que incluyen secuencias codificantes de los mismos y los microorganismos transformados con dichos vectores.

Así, la presente invención proporciona tanto el procedimiento alternativo descrito para la degradación de tiramina o dopamina en una muestra cualquiera, como las secuencias de las proteínas capaces de catalizar y regular el proceso de degradación de tiramina y/o dopamina hasta ácido pirúvico y ácido succínico (o semialdehído succínico), así como las secuencias nucleotídicas que codifican dichas proteínas. Los vectores de expresión que comprenden secuencias codificantes de al menos una de dichas proteínas y los microorganismos transformados con ellos constituyen también aspectos de la invención, así como el uso de *Pseudomonas putida U* o de cualquiera de dichos microorganismos recombinantes para disminuir el contenido de tiramina y/o dopamina en una muestra de un alimento o bebida destinada al uso humano o animal o en un algún producto intermedio de la transformación de las materias primas en el alimento o bebida final, incluidas las propias materias primas.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a las moléculas de ácido nucleico a partir de las cuales pueden sintetizarse las proteínas capaces de catalizar y/o regular el procedimiento de la invención, o que codifican proteínas con un alto grado de homología con las mismas (definida o bien por el porcentaje de coincidencia en los nucleótidos (al menos 60%), o por la capacidad de aparearse en condiciones estrictas de hibridación (las condiciones en las que hibridan cadenas de ácidos nucleicos complementarias, que son fácilmente identificables por el experto en la técnica en cada caso específico, pero que pueden resumirse como condiciones de temperaturas elevadas (65°C, por ejemplo) y baja concentración de sales)), siempre y cuando sean capaces de llevar a cabo la misma actividad. Concretamente, se refieren a las moléculas de ácido nucleico a partir de las cuales pueda sintetizarse la enzima que cataliza la etapa

ES 2 364 110 A1

imprescindible del procedimiento de degradación, la tiramina oxidasa TynAB, o proteínas homologas a la misma que presenten esa misma actividad. Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína o complejo proteico capaz de actuar como tiramina oxidasa, seleccionada del grupo que consiste en:

5 a) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 3 (correspondiente al DNA que codifica la subunidad TynA de TynAB) y una segunda secuencia que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 5 (DNA que codifica la subunidad TynB de TynAB);

10 b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con las secuencias de a);

15 c) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos de TynA) y una segunda secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos de TynB);

20 d) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 y una segunda secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende las secuencias mencionadas en a), o secuencias complementarias a las mismas.

25 En una realización preferida de la invención, la molécula de ácido nucleico comprende una primera y una segunda secuencias en las que el porcentaje de homología en la alternativa a) o en la alternativa c) es del 100%.

30 En una realización adicional preferida, la molécula de ácido nucleico aislada comprende también un fragmento de ácido nucleico a partir del cual pueda sintetizarse la enzima que cataliza la siguiente etapa del procedimiento de degradación, la 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa TynC, o una proteína homologa a la misma que realice la misma función. Así, en dicha realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende adicionalmente una secuencia que codifica una proteína capaz de actuar como 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa, seleccionada del grupo que consiste en:

35 a) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 7 (DNA codificante de TynC);

40 b) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de a);

45 c) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos de TynC);

50 d) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en a), o una secuencia complementaria a la misma.

De nuevo, se prefiere especialmente que la molécula de ácido nucleico se corresponda con la de la alternativa a) o c), en la que el porcentaje de homología es del 100%.

55 Otra realización adicional, complementaria de las anteriores, es aquella en la que la molécula de ácido nucleico comprende también las secuencias codificantes de los polipéptidos que parecen tener una función reguladora en la secuencia de reacciones catalizada por las enzimas TynAB y TynC, que puede seleccionarse entre TynR, TynD. Así, otra realización adicional se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, adicionalmente a la secuencia relacionada con TynC y/o las secuencias relacionadas con TynAB, una secuencia que codifica una proteína, seleccionada del grupo que consiste en:

60 a) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 9 (DNA codificante de TynR);

65 b) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de a);

ES 2 364 110 A1

c) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 10 (secuencia de aminoácidos de TynR);

5 d) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en a), o una secuencia complementaria a la misma.

10 De nuevo, se prefiere especialmente que la molécula de ácido nucleico se corresponda con la de la alternativa a) o c), en la que el porcentaje de homología es del 100%.

15 En otra posible realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende, adicionalmente a la secuencia correspondiente a TynAB, y, optativamente, TynC y TynR, una secuencia que codifica una proteína, seleccionada del grupo que consiste en:

20 a) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 11 (DNA codificante de TynD);

b) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de a);

25 c) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 12 (secuencia de aminoácidos de TynD);

30 d) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 12, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en a), o una secuencia complementaria a la misma.

35 De nuevo, se prefiere especialmente que la molécula de ácido nucleico se corresponda con la de la alternativa a) o c), en la que el porcentaje de homología es del 100%.

40 Adicionalmente a las combinaciones anteriores, la molécula de ácido nucleico aislada puede comprender también la secuencia codificante a alguno de los restantes polipéptidos identificados en el cluster tyn: TynF, TynE y TynG, o combinaciones de los mismos. Así, otra posible realización es aquella en la que la molécula de ácido nucleico aislada comprende adicionalmente una secuencia que codifica una proteína, seleccionada del grupo que consiste en:

45 a) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 13 (DNA codificante de TynF) y/o una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 15 (DNA codificante de TynE) y/o una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 17 (DNA codificante de TynG);

b) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con al menos una de las secuencias de a);

50 c) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 14 (secuencia de aminoácidos de TynF) y/o una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 16 (secuencia de aminoácidos de TynE) y/o una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 18 (secuencia de aminoácidos de TynG);

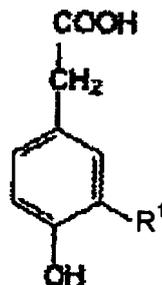
55 d) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 14 y/o una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16 y/o una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 18, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende al menos una de las secuencias mencionadas en a), o una secuencia complementaria a la misma.

65 De nuevo, se prefiere especialmente que la molécula de ácido nucleico se corresponda con la de la alternativa a) o c), en la que el porcentaje de homología es del 100%.

ES 2 364 110 A1

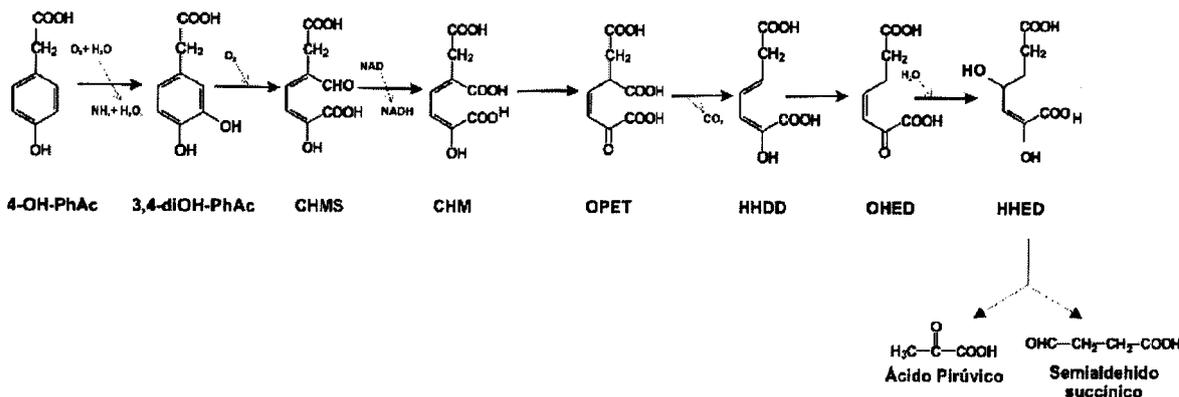
Para que la secuencia de reacciones catalizadas por las enzimas del cluster *tyn* se lleve a cabo en su totalidad, se prefiere particularmente que la molécula de ácido nucleico aislada comprenda secuencias codificantes de todos los polipéptidos que parecen estar codificados en el cluster: Así, en una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico aislada comprende las secuencias representadas por SEQ ID NO: 3 (DNA *TynA*), SEQ ID NO: 5 (DNA *TynB*), SEQ ID NO: 7 (DNA *TynC*), SEQ ID NO: 9 (DNA *TynR*), SEQ ID NO: 11 (DNA *TynD*), SEQ ID NO: 13 (DNA *TynF*), SEQ ID NO: 15 (DNA *TynE*) y SEQ ID NO: 17 (DNA *TynG*). Una posibilidad sería que la molécula de ácido nucleico comprendiera la secuencia representada por SEQ ID NO: 2, que corresponde al cluster *tyn* de *Pseudomonas putida* U.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico aislada comprende no sólo las secuencias de marcos abiertos de lectura identificadas en el cluster *tyn*, sino también las de las enzimas capaces de catalizar las reacciones que dan lugar a la transformación del compuesto obtenido por la acción de las enzimas del cluster *tyn* sobre la tiramina, transformándolo en ácido pirúvico y ácido succínico (o semialdehído succínico): las enzimas del cluster *hpa*, preferiblemente con las secuencias codificantes de los polipéptidos adicionales que parecen estar también codificados en ese mismo cluster, y que parecen tener función reguladora. Como en el caso del cluster *tyn*, están comprendidas también dentro del alcance de la invención las moléculas de ácido nucleico a partir de las cuales pueden sintetizarse las proteínas capaces de catalizar y/o regular la secuencia de reacciones que da lugar a la transformación del ácido 4-hidroxifenilacético en ácido pirúvico y ácido succínico, es decir, las moléculas que codifiquen proteínas con un alto grado de homología con las del cluster *hpa* de *Pseudomonas putida* U y que muestren la misma actividad (catalítica o reguladora) que dichas proteínas. Así, en una realización particularmente preferida de la molécula de ácido nucleico de la invención, la misma comprende, adicionalmente a las secuencias que codifican proteínas idénticas o análogas en función y homólogas en secuencia a las del cluster *Tyn*, al menos 13 secuencias, de las que cada una de las cuales codifica una proteína capaz de catalizar o regular una etapa de la transformación de un compuesto de Fórmula III,



en la que R^1 es H,

en ácido pirúvico y ácido succínico (o semialdehído succínico) o alguna de sus sales, siguiendo la siguiente secuencia de reacciones:



donde cada una de dichas secuencias se selecciona del grupo que consiste en:

a) una secuencia que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 19 (DNA *hpaB*), SEQ ID NO: 21 (DNA *hpaC*), SEQ ID NO: 23 (DNA *hpaD*), SEQ ID NO: 25 (DNA *hpaE*), SEQ ID NO: 27 (DNA *hpaF*), SEQ ID NO: 29 (DNA *hpaG1*), SEQ ID NO: 31 (DNA *hpaG2*), SEQ ID NO: 33 (DNA *hpaH*), SEQ ID NO: 35 (DNA *hpaI*), SEQ ID NO: 37 (DNA *hpaA*), SEQ ID NO: 39 (DNA *hpaX*), SEQ ID NO: 41 (DNA *hpaR1*), SEQ ID NO: 43 (DNA *hpaR2*);

b) una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con al menos una de las secuencias de a);

ES 2 364 110 A1

c) una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 20 (hpaB), SEQ ID NO: 22 (proteína hpaC), SEQ ID NO: 24 (proteína hpaD), SEQ ID NO: 26 (proteína hpaE), SEQ ID NO: 28 (proteína hpaF), SEQ ID NO: 30 (proteína hpaG1), SEQ ID NO: 32 (proteína hpaG2), SEQ ID NO: 34 (proteína hpaH), SEQ ID NO: 36 (proteína hpaI), SEQ ID NO: 38 (proteína hpaA), SEQ ID NO: 40 (proteína hpaX), SEQ ID NO: 42 (proteína hpaR1), SEQ ID NO: 44 (proteína hpaR2);

d) una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 44, donde la secuencia híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende al menos una de las secuencias mencionadas en a), o una secuencia complementaria a la misma.

La Fig. 7 permite observar la reacción concreta catalizada por cada una de las enzimas mencionadas. Se observa que la reacción catalizada por la 4-hidroxifenilacético monooxigenasa hpaBC sólo es necesaria en el caso de que el compuesto de partida sea tiramina, pues la acción de las enzimas del cluster tyn sobre la dopamina ya da lugar a ácido 3,4-dihidroxifenilacético, el producto resultante de la actividad de hpaBC.

De nuevo, se prefiere especialmente que la molécula de ácido nucleico se corresponda con la descrita en la alternativa a) o c), en la que el porcentaje de homología es del 100%. Aún se prefiere más el caso en el que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia representada por SEQ ID NO: 45 (secuencia que representa al cluster hpa de *Pseudomonas putida* U).

La inclusión en una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aislada de la invención de una secuencia codificante de una tirosina descarboxilasa permitiría que, al expresar las proteínas codificadas en ella, pudiera producirse la descarboxilación de tirosina presente en el medio para dar lugar a la tiramina, que, a continuación, podría ser degradada gracias a las restantes enzimas codificadas también en la molécula de ácido nucleico aislada: el compuesto hasta el que se llegara dependería de la molécula de ácido nucleico aislada concreta elegida entre las posibles realizaciones de la misma anteriormente descrita. Por ello, se prefiere el caso en el que la molécula de ácido nucleico aislada comprenda, además, una secuencia codificante de una tirosina descarboxilasa. Se prefiere particularmente el caso en el que la tirosina descarboxilasa es la tirosina descarboxilasa A de *Lactococcus lactis* (número de acceso en GenBank: CAF33980, comprendida en el locus AJ630043).

Otro aspecto de la invención lo constituyen las nuevas enzimas y polipéptidos reguladores identificados, que sirven para llevar a cabo el procedimiento de la invención: los correspondientes a los cluster tyn y/o hpa de *Pseudomonas putida* U, así como aquellos que guarden un alto grado de homología con sus secuencias proteicas y que realicen la misma función (actividad enzimática o reguladora). Por ello, un aspecto adicional de la invención se refiere a un polipéptido o complejo proteico purificado que se selecciona del grupo de:

a) una tiramina oxidasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 4 (proteína TynA) y a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 6 (proteína TynB), las cuales pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals;

b) una hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa, cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 8 (proteína TynC);

c) una proteína idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por una secuencia que se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 10 (proteína TynR), SEQ ID NO: 12 (proteína TynD), SEQ ID NO: 14 (proteína TynF), SEQ ID NO: 16 (proteína TynE) y SEQ ID NO: 18 (proteína TynG);

d) una hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 20 (proteína hpaB) y a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 22 (proteína hpaC), hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa en la que la secuencia idéntica al menos en un 60% a SEQ ID NO: 20 y la secuencia idéntica al menos en un 60% a SEQ ID NO: 22 pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals;

e) una hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa, cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 24 (proteína hpaD),

f) una deshidrogenasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 26 (proteína hpaE),

g) una isomerasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 28 (proteína hpaF),

ES 2 364 110 A1

h) una descarboxilasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 30 (proteína hpaG1);

5 i) una descarboxilasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 32 (proteína hpaG2),

j) una hidratasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 34 (proteína hpaH),

10 k) una aldolasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 36 (proteína hpaI),

15 l) una proteína idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por una secuencia que se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 38 (proteína hpaA), SEQ ID NO: 40 (proteína hpaX), SEQ ID NO: 42 (proteína hpaR1), SEQ ID NO: 44 (proteína hpaR2),

o combinaciones de los mismos.

20 Se prefiere el caso en el que el polipéptido o complejo proteico comprende al menos una secuencia que es idéntica a la mencionada en uno de los apartados a) a l).

También están comprendidas dentro del alcance de la invención las composiciones que comprendan al menos uno de los polipéptidos o complejos proteicos mencionados. Se prefieren aquellas composiciones que comprendan al menos la primera enzima del procedimiento, la que actúa sobre tiramina o dopamina: una tiramina oxidasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 4 (proteína TynA) y a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 6 (proteína TynB), las cuales pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals; de entre ellas, se prefieren particularmente aquellas que comprendan adicionalmente una enzima capaz de catalizar la segunda etapa del procedimiento, una hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa, cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 8 (proteína TynC); más preferiblemente, la composición contendrá, además de esas dos enzimas, polipéptidos idénticos o análogos a los restantes polipéptidos codificados en el cluster tyn de *Pseudomonas putida* U, es decir, al menos una proteína idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por una secuencia que se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 10 (proteína TynR), SEQ ID NO: 12 (proteína TynD), SEQ ID NO: 14 (proteína TynF), SEQ ID NO: 16 (proteína TynE) y SEQ ID NO: 18 (proteína TynG) y preferiblemente, todas ellas. Las composiciones que más se prefieren son aquellas que comprenden los polipéptidos o complejos proteicos mencionados y, adicionalmente, polipéptidos o complejos proteicos idénticos o análogos en función y homólogos en secuencia (al menos un 60%) a los codificados en el locus hpa de *Pseudomonas putida*, es decir:

40 - una hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 20 (proteína hpaB) y a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 22 (proteína hpaC), hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa en la que la secuencia idéntica al menos en un 60% a SEQ ID NO: 20 y la secuencia idéntica al menos en un 60% a SEQ ID NO: 22 pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals;

50 - una hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa, cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 24 (proteína hpaD),

- una deshidrogenasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 26 (proteína hpaE),

55 - una isomerasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 28 (proteína hpaF),

- una descarboxilasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 30 (proteína hpaG1);

60 - una descarboxilasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 32 (proteína hpaG2),

- una hidratasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 34 (proteína hpaH),

65 - una aldolasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 36 (proteína hpaI),

ES 2 364 110 A1

- una proteína idéntica al menos en un 60% a cada una de las secuencias polipeptídicas representadas por las secuencias SEQ ID NO: 38 (proteína hpaA), SEQ ID NO: 40 (proteína hpaX), SEQ ID NO: 42 (proteína hpaR1), SEQ ID NO: 44 (proteína hpaR2).

5

Como en los casos anteriores, se prefiere especialmente que los polipéptidos o complejos proteicos comprendidos en la composición comprenda una secuencia cuya homología con la secuencia representada en el grupo de SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 44 sea del 100%.

10

Otro aspecto de la invención es el relativo a un vector de expresión que comprende al menos una de las posibles realizaciones de la molécula de ácido nucleico de la invención descritas anteriormente. En una realización preferida, dicho vector es un plásmido. Se prefiere particularmente el caso en el que dicho plásmido comprende un fragmento de ácido nucleico que comprende las secuencias codificantes comprendidas en el cluster Tyn de *Pseudomonas putida* U. Una realización particular se refiere al caso en el que dicho fragmento de ácido nucleico está insertado en el plásmido pK18::mob, que es un plásmido con capacidad de permanecer como forma replicativa autónoma en algunas especies bacterianas y con capacidad integrativa en otras.

15

20

Otra realización preferida corresponde al caso en el que dicho plásmido comprende adicionalmente un fragmento de ácido nucleico que comprende las secuencias codificantes presentes en el cluster hpa de *Pseudomonas putida*. Aún se prefiere más el caso en el que el cluster hpa está insertado en el plásmido es pK18::mob.

En otra realización adicional el plásmido comprende además una secuencia codificante de una tirosina descarboxilasa. Se prefiere el caso en el que la tirosina descarboxilasa es la tirosina descarboxilasa A de *Lactococcus lactis*.

25

En un aspecto adicional de la invención, se describe un organismo hospedador transformado con uno cualquiera de los vectores de expresión descritos anteriormente. Un caso preferido es aquel en el que el organismo hospedador es una bacteria, siendo ésta, preferiblemente, una bacteria capaz de transformar un azúcar en ácido láctico (bacteria acidoláctica). Estos microorganismos son importantes porque la formación de ácido láctico en distintas materias primas da lugar en ella a desnaturalización y gelificación de proteínas, iniciando su transformación en derivados alimenticios tales como queso, yogur, embutidos, etc. actúan como iniciadores de la transformación de muchas materias primas y, en algunos casos (yogur), son responsables de su culminación; en otros, como el queso, particularmente las variedades de queso curado, favorecen la acción de otros microorganismos, mohos en muchos casos, que son los responsables, por ejemplo, de la aparición de sustancias sápidas características. Dado que en el proceso de transformación de materias primas como la leche o la carne en queso o embutidos se producen a menudo cantidades de tiramina que podrían hacer aconsejable disminuir el contenido presente de dicha amina, disponer de bacterias lácticas que, además de realizar su función en el proceso de transformación del alimento, dispongan de las enzimas para catalizar la ruta catabólica divulgada en la presente solicitud, que permite la degradación de tiramina y/o dopamina, facilitaría la disminución de los niveles finales de estas aminas biógenas presentes en el alimento final destinado al consumo humano o animal.

30

35

40

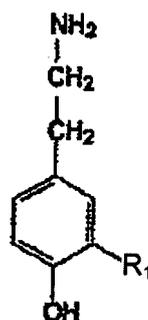
Una posible realización de este aspecto de la invención contempla el caso en el que el vector de expresión está insertado en el genoma del hospedador. En otra realización alternativa, dicho vector de expresión permanece como forma replicativa autónoma.

Otro aspecto de la invención, de gran importancia, se refiere a procedimientos que emplean las secuencias polipeptídicas descritas anteriormente, para disminuir el contenido de tiramina y/o dopamina en una muestra cualquiera, con preferencia por los alimentos y las bebidas para consumo humano o animal, las materias primas a partir de las cuales se originan o los productos intermedios de transformación de dichas materias primas en los alimentos o bebidas finales. El procedimiento contempla todos los pasos de transformación de tiramina y/o dopamina de la ruta catabólica descubierta por los inventores. Se consideran incluidas dentro del alcance de la invención todas las variantes del mismo que comprendan la primera etapa, la transformación de tiramina y/o dopamina en su correspondiente 4-hidroxifenilacetaldehído. Así, un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para disminuir el contenido en una muestra de un compuesto de la Fórmula I

55

60

65



Fórmula I

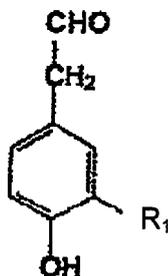
donde R_1 es H (tiramina) u OH (dopamina)

que comprende una etapa en la que el compuesto de Fórmula I se transforma en un compuesto de Fórmula II,

5

10

15



20

Fórmula II

donde R_1 es H u OH,

25

caracterizado por que la transformación del compuesto de Fórmula I en un compuesto de Fórmula II está catalizada por una tiramina oxidasa codificada por una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 o por una tiramina oxidasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 4 y al menos en un 60% a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 6, tiramina oxidasa en la que la secuencia idéntica al menos en un 60% a SEQ ID NO: 4 y la secuencia idéntica al menos en un 60% a SEQ ID NO: 6 pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals.

30

35

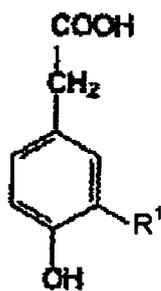
Una realización preferida se refiere al caso en el que la tiramina oxidasa está formada por dos subunidades, una de las cuales comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 (subunidad TynA de la tiramina oxidasa TynAB de *Pseudomonas putida* U) y la segunda de las cuales comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6 (subunidad TynB de la tiramina oxidasa TynAB de *Pseudomonas putida* U).

40

En otra realización, se incluye una etapa en la que el compuesto de Fórmula II se transforma en un compuesto de Fórmula III,

45

50



55

Fórmula III

donde R^1 es H u OH,

60

en el que la transformación del compuesto de Fórmula II en un compuesto de Fórmula III está catalizada por una 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de:

a) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 7;

65

b) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de a);

ES 2 364 110 A1

c) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 8;

5 d) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en a), o una secuencia complementaria a la misma;

10 o cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 8.

15 En el caso de que intervenga una 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa en el procedimiento, se prefiere que comprenda una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (proteína TynC de *Pseudomonas putida* U).

20 Se prefiere particularmente que, adicionalmente a las enzimas presentes que catalizan las etapas de transformación, esté presente en la muestra al menos una proteína cuya secuencia de aminoácidos comprenda una secuencia idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por una secuencia que se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 18 o combinaciones de las mismas (los restantes polipéptidos sintetizables a partir de las secuencias que forman parte del cluster tyn, y que parecen tener actividad reguladora). Se prefiere el caso en el que los porcentajes de homología son del 100%. Se prefiere particularmente que esté presente al menos una proteína que comprenda la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10 (TynR).

25 Se prefiere particularmente que el procedimiento no culmine con la obtención del compuesto de Fórmula III, sino que continúe hasta su degradación en ácido pirúvico y ácido succínico (o semialdehído succínico), especialmente siguiendo la secuencia de reacciones catalizada por las enzimas del cluster hpa de *Pseudomonas putida* U: Cuando el compuesto de partida es tiramina ($R_1 = H$), el procedimiento requiere una etapa de transformación del ácido 4-hidroxifenilacético en 3,4-dihidroxifenilacético, mientras que, cuando el compuesto de partida es dopamina ($R_1 =$
30 OH), el compuesto de Fórmula III obtenido tras las reacciones catalizadas por las enzimas del cluster tyn es ya ácido 3,4-dihidroxifenilacético; a partir de ahí, las reacciones son idénticas tanto si se ha partido de tiramina como si se ha partido de dopamina. Por ello, una realización adicional del procedimiento de la invención se refiere al caso en el que el compuesto de Fórmula III obtenido es aquel en el que R_1 es H, que comprende una etapa posterior en el que dicho compuesto se transforma en el compuesto de Fórmula III, en el que R_1 es OH, mediante una reacción catalizada por una enzima con actividad 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa. Dentro de esta realización, se prefiere que la 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa capaz de catalizar esa reacción tenga un alto grado de homología con la correspondiente enzima de *Pseudomonas putida* U, HpaBC, enzima compuesta por dos subunidades. Así, en ese caso, se prefiere que la secuencia de aminoácidos de la 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa sea idéntica al menos en un 60% a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 20 (HpaB) y a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 22 (HpaC), dichas secuencias pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals. Con mayor preferencia, la 4-hidro-
40 xifenilacetaldehído monooxigenasa está formada por dos subunidades, una de las cuales comprende una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y la segunda de las cuales comprende una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

50 Como se ha comentado, se prefieren las realizaciones del procedimiento en las que el compuesto de Fórmula III, en el que R, es OH (ácido 3,4-dihidroxifenilacético), se transforma en ácido pirúvico y ácido succínico o semialdehído succínico, o alguna de sus sales, siguiendo una secuencia de reacción análoga a la catalizada por las enzimas del cluster hpa de *Pseudomonas putida* U. En dicha realización, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) transformar ácido 3,4-dihidroxifenilacético en semialdehído 5-carboximetil-2-hidroximucónico;
- b) transformar semialdehído 5-carboximetil-2-hidroximucónico en ácido 5-carboximetil-2-hidroximucónico,
- 55 c) transformar ácido 5-carboximetil-2-hidroximucónico en ácido 5-oxo-pent-3-ene-1,2,5-tricarboxílico,
- d) transformar ácido 5-oxo-pent-3-ene-1,2,5-tricarboxílico en ácido 2-hidroxi-hept-2,4-diene-1,7-dioico,
- 60 e) transformar ácido 2-hidroxi-hept-2,4-diene-1,7-dioico en ácido 2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioico,
- f) transformar ácido 2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioico en ácido 2,4-hidroxi-hept-2-ene-1,7-dioico,
- g) escindir ácido 2,4-hidroxi-hept-2-ene-1,7-dioico en ácido pirúvico y ácido succínico o semialdehído succínico,
- 65 donde cualquiera de los ácidos citados puede estar en forma de cualquiera de sus sales.

ES 2 364 110 A1

En una realización preferida, las enzimas utilizadas en las respectivas etapas son enzimas con una actividad análoga a las del cluster hpa y con un alto grado de homología con las mismas (al menos 60%), es decir:

- 5 a) una hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 24,
- b) una deshidrogenasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 26,
- 10 c) una isomerasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 28,
- d) una descarboxilasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 30,
- 15 e) una descarboxilasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 32,
- f) una hidratasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 34,
- 20 g) una aldolasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 36.

25 Más preferido aún es el caso en el que los citados porcentajes de homología son del 100%.

Con mayor preferencia, en las realizaciones del procedimiento que comprenden estas etapas, llevadas a cabo mediante las enzimas descritas, está presente en la muestra, adicionalmente a las enzimas que catalizan la secuencia de reacciones, al menos una proteína análoga en función y con alta homología con al menos uno de los restantes polipeptidos codificados en el cluster hpa, es decir, una proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende una secuencia idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por una secuencia que se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, o combinaciones de las mismas. Más preferido aún es el caso en el que los citados porcentajes de homología son del 100%.

35 Como se comentó previamente, en una posible realización adicional del procedimiento de la invención el compuesto de Fórmula I es aquel en el que R₁ es H (tiramina) y el procedimiento comprende una etapa previa en la que el compuesto de Fórmula I es el resultado de una reacción de descarboxilación de tirosina. Se prefiere el caso en el que la descarboxilación de tirosina está catalizada por la tirosina descarboxilasa A de *Lactococcus lactis*.

40 En una realización del procedimiento de la invención, las enzimas que catalizan el procedimiento se añaden a la muestra formando parte de una composición de la invención.

En otra realización, las enzimas que catalizan las etapas de dicho procedimiento se sintetizan en la muestra a partir de uno de los vectores de expresión de la invención descrito anteriormente.

45 Se prefiere la realización en la que las enzimas que catalizan las reacciones del procedimiento de la invención son sintetizadas por un microorganismo presente en la muestra o que se añade a la misma. En ese caso, una posibilidad es que las secuencias codificantes de las enzimas sintetizadas por el microorganismo estén presentes en su genoma de forma natural: es lo que sucede con *Pseudomonas putida* U (CECT 4848), cuya presencia en la muestra en la que se quiere reducir el contenido en tiramina y/o dopamina es una de las posibles alternativas para realizar el procedimiento de la invención.

Otra posible realización, por la cual se tiene también particular preferencia, corresponde al caso en el que el microorganismo es uno de los organismos hospedadores recombinantes de la invención: ello da muchas posibilidades para elegir los genes exógenos introducidos en el mismo y, con ello, las etapas del procedimiento de la invención. Por otro lado, la elección del microorganismo otorga también mucha versatilidad para elegir las características adicionales de las que se quiera dotar a la muestra, además de la disminución de tiramina y/o dopamina; esta característica es de especial interés para su aplicación en la industria alimentaria.

60 De acuerdo con ello, son realizaciones del procedimiento de la invención de particular interés, aquellas en las que el procedimiento de la invención se realiza en el marco de la industria alimentaria, siendo la muestra en la que se quiere disminuir el contenido del compuesto de la Fórmula I (tiramina o dopamina) un alimento o bebida destinados al consumo por seres humanos o animales, una materia prima de partida para la obtención de dicho alimento o bebida o un producto intermedio en la obtención del alimento o bebida.

65 Un caso preferido es aquel en el que el alimento, materia prima o producto intermedio se selecciona entre un derivado lácteo, leche o mezcla de leches procedente de cualquier mamífero, o un producto intermedio de la transformación de la leche o mezcla de leches y el compuesto de la Fórmula I que se desea transformar es aquel en el que

ES 2 364 110 A1

R₁ es H (tiramina), pues los derivados lácteos, y los quesos en particular, son productos en los que pueden aparecer concentraciones de tiramina que aconsejen su disminución para hacerlos más apropiados para el consumo humano, evitando posibles efectos secundarios. Por ello, en una realización preferida de la anterior, el alimento, materia prima o producto intermedio se selecciona entre queso, leche procedente de vaca, oveja o cabra (las especies de las habitualmente procede la leche que se utiliza como materia prima en la elaboración del queso), una mezcla de leche procedente de al menos dos de las especies anteriores; o un producto intermedio de la transformación de la leche o mezcla de leches en queso. Es preferible el caso en el que las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento son sintetizadas por un microorganismo presente en la muestra o que se añade a la misma. Un caso específico es aquel en el que el microorganismo es un organismo hospedador recombinante descrito anteriormente, preferiblemente una bacteria capaz de transformar un azúcar en ácido láctico, aún más preferiblemente perteneciente al género seleccionado entre *Lactobacillus*; *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*. Esto aporta la ventaja, por una parte que la transformación se lleve a cabo con un microorganismo de una especie de las que intervienen de forma natural en el proceso de transformación del alimento; por otra, si el microorganismo se añade desde el principio, como cultivo iniciador, estará presente desde el inicio del proceso para controlar la tiramina que se vaya produciendo. Así, otra realización adicional se refiere al procedimiento descrito, en el que el microorganismo actúa como iniciador (starter) de la transformación de la leche en derivado lácteo.

Otra realización alternativa del procedimiento de la invención es aquella en la que se realiza en una bebida alcohólica, en la que la bebida, materia prima o producto intermedio se selecciona entre mosto, cebada, malta, vino, cerveza, un producto intermedio de la transformación de la cebada en cerveza, un producto intermedio de la transformación de mosto en vino, cualquier otra bebida alcohólica que requiera fermentación alcohólica por levaduras o cualquier producto intermedio de transformación de la misma. De nuevo, se prefiere el caso en el que las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento son sintetizadas por un microorganismo presente en la muestra o que se añade a la misma, que es un organismo hospedador recombinante de la invención. En una realización particularmente preferida, la bebida es vino y el microorganismo se añade al vino durante la fermentación maloláctica.

Otra realización alternativa describe un procedimiento, en el que el alimento, materia prima o producto intermedio se selecciona entre un embutido; un producto intermedio de la transformación de la carne en el embutido o carne de vacuno; porcino o cérvido o mezclas de las mismas destinadas a la preparación de un embutido.

Otra realización alternativa es aquella relativa a un procedimiento, en el que el alimento, materia prima o producto intermedio se selecciona entre el chucrut; la materia prima del mismo o un producto intermedio de la obtención del chucrut.

Aún más preferida es una realización en que en los dos últimos procedimientos citados, las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento son sintetizadas por un microorganismo presente en la muestra o que se añade a la misma que es un organismo hospedador recombinante descrito anteriormente. Se prefiere el caso en el que el microorganismo actúa como iniciador (starter) de la transformación de la materia prima en el embutido o chucrut.

Por su importancia en la aplicación en la industria alimentaria, un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de microorganismos que sinteticen las enzimas adecuadas para llevar a cabo el procedimiento de la invención para disminuir el contenido de tiramina y/o dopamina en un alimento o bebida destinada al consumo humano o animal. Una primera posibilidad es que el organismo sintetice esas enzimas de forma natural; por ello, una posible realización es el uso de *Pseudomonas putida* U para disminuir el contenido de tiramina o dopamina en un alimento o bebida destinada al consumo humano o animal, en la materia prima utilizada para su obtención o en un producto intermedio de la transformación de la materia prima en el alimento o bebida.

La segunda posibilidad es que el microorganismo sea un microorganismo recombinante, en el que se hayan introducido los genes adecuados para que sintetice las enzimas y polipéptidos reguladores deseados. Así, un último aspecto se refiere al uso de un organismo hospedador recombinante de la invención, para disminuir el contenido de tiramina o dopamina en un alimento o bebida destinada consumo humano o animal, en la materia prima utilizada para su obtención o en un producto intermedio de la transformación de la materia prima en el alimento o bebida.

El control de los microorganismos *starters* que inician los procesos de transformación de determinadas materias primas en alimentos o bebidas (derivados lácteos, embutidos, bebidas alcohólicas, otros alimentos en los que se dan procesos de fermentación tales como el chucrut, los pepinillos o las aceitunas) ha cobrado gran interés en los últimos años en la industria alimentaria, pues permite controlar las condiciones del proceso, dotar a los productos finales de características deseadas y, en particular, facilita la obtención de productos finales cuyas características sean más homogéneas e identificables por el consumidor como las características esperables en una determinada marca, hecho más difícil de conseguir cuando se parte de los organismos iniciadores que contiene la materia prima de forma natural. La utilización de iniciadores (*starters*) capaces de llevar a cabo el procedimiento de transformación de tiramina y/o dopamina de la invención es una ventaja más dentro del control del proceso, permitiendo el control de la concentración de estas aminas biogénicas desde el principio del proceso, según se van produciendo e, incluso, según los casos, que sean los mismos microorganismo susceptibles de producirlas los que permitan su eliminación. Es por todo ello que una realización preferida del uso de la invención es aquella en la que el organismo hospedador actúa como iniciador (starter) del proceso de transformación de la materia prima en el alimento o bebida destinada al consumo humano o animal. Se prefiere particularmente que el alimento sea un derivado lácteo (más preferiblemente queso), un embutido, o un alimento durante cuya obtención se produce fermentación tal como chucrut, pepinillos o aceitunas.

Descripción detallada de la invención

Se ha caracterizado en la bacteria *P. putida* U (CECT 4848) una nueva ruta catabólica responsable de la degradación de las aminas biogénicas tiramina y dopamina. Los diferentes genes que codifican las enzimas que componen tal ruta, se han identificado mediante el aislamiento de diferentes mutantes de *Pseudomonas putida* U incapaces de crecer en medios que contenían como únicas fuentes de carbono tiramina o dopamina. El agente mutagénico utilizado fue el transposon Tn5, que actúa integrándose al azar en el cromosoma de la bacteria (98, 105). Mediante este procedimiento se aislaron once mutantes diferentes que fueron agrupados en tres tipos en función de su capacidad para degradar diferentes fuentes de carbono. Los mutantes de tipo 1 incluían aquellos que eran incapaces de crecer en medios químicamente definidos cuando contenían tiramina o dopamina como únicas fuentes de carbono. Sin embargo, estos mutantes degradaban eficazmente los ácidos 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético, así como otras muchas fuentes de carbono. El segundo tipo (tipo 2) incluía un grupo de mutantes que no crecía en aquellos medios que contenían como únicas fuentes de carbono tiramina o 4-hidroxifenilacético, pero que sí lo hacían en aquellos otros a los que se había añadido dopamina u otras fuentes de carbono susceptibles de ser utilizadas por la cepa parental (*P. putida* U CECT 4848). El tercer grupo de mutantes, aquellos incluidos en el tipo 3, se caracterizaban porque no podían crecer en aquellos medios de cultivo en los que se utilizaban como únicas fuentes de carbono tiramina, dopamina, 4-hidroxifenilacético o 3,4-dihidroxifenilacético. Sin embargo, estos mutantes crecían eficazmente en esos mismos medios cuando estos compuestos se sustituían por otras fuentes de carbono que podían ser asimilados por la cepa silvestre.

Todos estos resultados nos indicaban que en los mutantes de tipo 1, el transposón se había integrado en una secuencia de DNA perteneciente a alguno de los genes necesarios para la transformación de tiramina y de dopamina en los ácidos 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético respectivamente (Fig. 7), o bien el transposón se había integrado en alguna zona que afectaba la expresión de alguno de esos genes. Además, el hecho de que estos mutantes crecieran bien en medios suplementados con 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético, sugería que en ellos el transposón estaba afectando genes que tenían que ver con la desaminación de esas dos aminas pero no con etapas catabólicas posteriores.

En los mutantes de tipo 2, el transposón debe haberse integrado en una secuencia de DNA correspondiente a alguno de los genes que codifique enzimas requeridas para el catabolismo de tiramina y del ácido 4-hidroxifenilacético, pero no para la degradación de dopamina. Teniendo en cuenta que sólo existe una etapa catalítica cuya alteración justifique ese comportamiento metabólico, esos mutantes deberían estar afectados en el gen que codifica la 4-hidroxifenilacético hidroxilasa (HpaBC en Fig. 7).

Los mutantes de tipo 3 no pueden catabolizar tiramina, dopamina, 4-hidroxifenilacético ni 3,4-dihidroxifenilacético, lo que indica que en ellos el transposón está afectando la expresión de alguno de los genes que codifican las enzimas responsables de la transformación de 3,4-dihidroxifenilacético en los productos finales (ácido pirúvico y ácido succínico) (Fig. 7).

La identificación del punto de inserción del transposón en cada uno de los mutantes y la secuenciación de las zonas adyacentes, nos ha permitido la identificación de todos los genes necesarios para la degradación de tiramina, dopamina, 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético en *P. putida* U. Todos ellos se localizan en un fragmento de DNA de 25132 pares de bases que incluye dos agrupaciones génicas (clusters) consecutivas (Fig. 8). El cluster *tyn* (12339 pares de bases) agrupa los genes requeridos en *P. putida* U para la transformación de tiramina y dopamina de los ácidos 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético respectivamente, siendo ésta la primera descripción de este conjunto de genes (*tynABFECGRD*) y, además, la primera evidencia de la que se pone de manifiesto que esta nueva ruta está implicada en la desaminación de esos dos compuestos. Al lado del cluster *tyn* se halla el cluster *hpa* (12722 pares de bases), que contiene todos los genes (*hpaR₁TetRBCIHXFDEG₂G₁AR₂*) necesarios para el catabolismo del ácido 4-hidroxifenilacético (incluyendo su derivado 3,4-dihidroxifenilacético) en esta bacteria (Fig. 8). Las secuencias de todos esos genes (*tyn* y *hpa*) se incluyen en la Fig. 9.

En resumen, hemos demostrado que en *P. putida* U la transformación de tiramina y dopamina en ácido pirúvico y en ácido succínico requiere los genes correspondientes a los clusters *tyn* y *hpa*, y que la degradación de tiramina en esta bacteria implica la participación de un mayor número de genes de los descritos para otros microorganismos (68,77, 86-88, 91, 94). Otra diferencia importante es que en *P. putida* U la desaminación de tiramina y de 2-feniletilamina se lleva a cabo mediante la acción de diferentes complejos enzimáticos (82). En cambio los genes responsables de la degradación del 4-OH-PhAc en *P. putida* U, tienen una organización muy similar a la descrita para la misma ruta de *E. coli*.

La identificación de los genes *tyn* puede tener importantes implicaciones biotecnológicas ya que como hemos indicado en el apartado "Estado de la Técnica", el consumo de alimentos con un elevado contenido en tiramina puede provocar un gran número de efectos farmacológicos. Por lo tanto, la obtención de una construcción genética que permitiese a los organismos portadores degradar este compuesto, podría ser utilizada para transformar aquellos microorganismos que participan en la fermentación. Evitando, de este modo, que se produzca la acumulación de tiramina en esos alimentos.

Esas cepas recombinantes con capacidad para degradar la tiramina se podrían utilizar incluso en la elaboración de cultivos iniciadores (starters), dotando a los mismos de una mayor eficiencia, ya que los starters, aunque suelen

estar constituidos por cepas no productoras de aminas biogénicas, no pueden evitar la acumulación de las aminas producidas por la flora microbiana presente en las materias primas originales. En cambio, si estos starters contaran con la presencia de bacterias capaces de degradar la tiramina y la dopamina evitarían la acumulación de estos compuestos en los alimentos con independencia de las materias primas utilizadas en la elaboración de los mismos.

Además, analizada desde un punto de vista estrictamente económico, la posibilidad de dotar a cepas bacterianas con interés para la industria alimentaria con la capacidad requerida para degradar la tiramina, puede ser esencial para la elaboración de nuevos productos y la apertura de nuevos mercados ya que muchos países (Canadá, Suiza o Holanda entre otros) están estableciendo límites para la concentración de aminas biogénicas en los alimentos importados, especialmente en el vino. La presencia de aminas en el vino entraña más riesgo que en otros alimentos, ya que al contener alcohol, se van a ver afectados los mecanismos de detoxificación del organismo, incrementándose las posibilidades de intoxicación por ingesta de aminas.

Mediante transferencia de las agrupaciones génicas *tyn* y *hpa* como cassettes genéticos aislados o en tándem (clusters *tyn* y *hpa*) o genes idénticos, cuyas secuencias sean similares y que cumplan la misma función que los genes *tyn* y *hpa* de *P. putida* U 4848 podríamos conferir a cualquier bacteria, tanto G+ como G-, de la capacidad requerida para degradar tiramina y dopamina, evitando de este modo, la acumulación de este compuesto en aquellos alimentos en cuyo proceso de elaboración interviniese dicha bacteria. La transferencia de los clusters *tyn* y *hpa* o genes idénticos, cuyas secuencias sean similares y que cumplan la misma función que los genes *tyn* y *hpa* de *P. putida* U 4848 a cepas de *Lactococcus lactis* prevendrían la acumulación de la tiramina (generada mediante descarboxilación de la tirosina por la tirosina descarboxilasa presente en este organismo) en aquellos quesos y derivados en cuyo proceso de elaboración intervenga esta bacteria.

Adicionalmente, el hecho de que las enzimas codificadas en los clusters *tyn* y *hpa* sean también capaces de degradar la dopamina, permitirá disponer de organismos manipulados genéticamente que puedan asimilar este importante neurotransmisor, lo que podría tener importantes aplicaciones en alimentación y en terapia génica ya que alguno de los genes *tyn* podrían ser utilizados para el tratamiento de determinadas enfermedades degenerativas o de aquellas relacionadas con trastornos mentales causadas por concentraciones elevadas de estas aminas.

Por último, mediante Ingeniería Metabólica, hemos logrado establecer una nueva ruta útil para la degradación del aminoácido L-tirosina mediante la participación conjunta de las enzimas codificadas por los clusters *tyn* y *hpa* de *P. putida* U y el gen *tdcA* que codifica la tirosind Descarboxilasa de *Lactococcus lactis* (ver Ejemplo 5). Una aplicación interesante de la confluencia en un mismo microorganismo de los genes *tyn* y *hpa* y *tdcA*, que permiten catabolizar tirosina a través del intermediario tiramina, podría ser la de elaboración de alimentos con bajo contenido en este aminoácido. Para la obtención de éstos podrían utilizarse cultivos iniciadores (starters) conteniendo microorganismos diseñados explícitamente para que expresen las actividades enzimáticas *Tyn*, *Hpa* y *TdcA*. De esta forma dispondríamos de alimentos que podrían ser aptos para el consumo de aquellos enfermos aquejados de alcaptonuria (enfermedad metabólica caracterizada por la ausencia de la enzima homogentisato dioxigenasa que provoca el bloqueo de la ruta degradativa de fenilalanina y tirosina y que lleva implícita la acumulación de ácido homogentísico en los tejidos provocando degeneración del tejido afectado) y de otras enfermedades relacionadas con la existencia de un excesivo acumulo de catabolitos de de tirosina en diferentes tejidos (99-100).

Ejemplo 1

Identificación de los genes responsables de la degradación de tiramina y de dopamina en *P. putida* U

Pseudomonas putida U (CECT 4848) es una bacteria que puede crecer utilizando tiramina (5 mM) o dopamina (5 mM) como únicas fuentes de carbono, cuando se cultiva en un medio de composición química definida que contiene (en g/L) KH_2PO_4 (13,6); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0005). Si el medio de cultivo era sólido, se añadía, además, agar al 2,5% (p/v). La incubaciones se realizaban en un agitador orbital, a 30°C y a 250 rpm, utilizando matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio (Fig. 10). Cuando se mutó *P. putida* U con el transposón Tn5, siguiendo la metodología descrita por nosotros en otras publicaciones (82, 95, 98-100, 1005), aislamos varios mutantes incapaces de degradar tiramina y dopamina (Fig 10) pero que, sin embargo, crecían bien cuando al medio se añadían otras fuentes de carbono (ácidos 4-hidroxifenilacético, 3,4-dihidroxifenilacético, fenilacético, benzoico, octanoico, glutámico, succínico, 2-feniletilamina). La localización mediante secuencia (98) del transposón en el cromosoma de los diferentes mutantes, nos permitió comprobar que este elemento genético móvil se había insertado en dos marcos abiertos de lectura u open reading frames (ORFs) (genes *tynA* y *tynB*) que codifican dos proteínas (*TynA* y *TynB*) (Fig 7 y Fig 8) que, a tenor de estos resultados, eran imprescindibles para el catabolismo de tiramina y dopamina en *P. putida* U.

La secuenciación adicional de las zonas adyacentes a esos genes nos permitió identificar los ORFs indicados en la figura 8 como *tyn* y cuya secuencias se incluyen en la Fig. 9. Todos esos genes (*tynABFECGRD*) se encuentran próximos a otro cluster ya conocido (*hpa*), responsable de la transformación del ácido 4-hidroxifenilacético (y de sus derivados) en metabolitos generales (ácidos pirúvico y succínico) (Fig 8 y Fig. 9).

Ejemplo 2

Identificación de la unidad genética mínima funcional requerida para la desaminación oxidativa de tiramina y de dopamina en P. putida U

5 El análisis funcional de los genes que componen el cluster tyn se realizó mediante la interrupción de cada uno de ellos siguiendo un procedimiento que supone un evento de recombinación sencillo, y que se basa en la utilización de un fragmento interno de cada gen tal y como se ha descrito en diferentes publicaciones (82, 98-100). Cuando la interrupción de alguno de esos genes implicaba falta de función (ausencia de crecimiento en medios suplementados con tiramina o con dopamina), una copia silvestre del gen que había sido afectado en cada mutante se clonaba en un plásmido replicativo en Pseudomonas (pBBR1MCS-3, abreviadamente pMC) (102) y se expresaba, en trans, en ese mutante, estableciendo si se revertía, o no, el efecto observado tras la mutación de ese gen concreto. Siguiendo este método, comprobamos que en *P. putida U* los genes tynA, tynB, tynC y tynR eran imprescindibles para que se produjera la desaminación de la tiramina y la dopamina y para la ulterior oxidación de los aldehídos generados a los ácidos 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético, respectivamente (Fig. 7).

En otros casos, la interrupción de ciertos genes (tyn F, tynE, tynG y tynD) no afectaba la capacidad de los diferentes mutantes para degradar tiramina y dopamina, por lo que concluimos que, al menos en *P. putida U*, éstos no son indispensables para asimilar esas aminas (probablemente porque existan en su genoma otros genes que codifiquen enzimas homólogas).

Estos resultados indican que la construcción genética que posee la información mínima necesaria para catalizar la desaminación oxidativa de la tiramina y de la dopamina en *P. putida U*, es tynABCR.

Ejemplo 3

Obtención de una construcción genética que permita degradar tiramina y dopamina en otras bacterias

30 Con objeto de disponer de una construcción genética que pudiera ser transferida a diferentes microorganismos de tal modo que les confiriese la capacidad de degradar parcial o totalmente la tiramina y la dopamina, se clonaron los genes que integran todo el cluster tyn en los plásmidos pK18::mob (replicativo en *E. coli* e integrativo en Pseudomonas). (82, 98-100,103) (Fig 11). Este plásmido carece de origen de replicación en Pseudomonas. El proceso de obtención del cluster tyn se llevó a cabo por recombinación de un fragmento de ADN (clonado en pK18::mob) homólogo a la región de uno de los extremos del cluster, por posterior digestión a totalidad del ADN con XbaI y por religamiento final del ADN digerido. La selección de clones que contenían clonado el cluster tyn se realizó mediante selección del marcador del plásmido (resistencia a km). Con ellos se transformaron *E. coli* W14 (un mutante incapaz de degradar feniletilamina y tiramina por carecer de los genes maoA y maoB) (62, 94) y *P. putida* KT2440 una cepa silvestre muy parecida metabólica y genéticamente a *P. putida U*, pero que carece de los genes tyn y hpa. Los resultados expuestos en las Fig 12 revelan que la cepa de *E. coli* recombinante (*E. coli* W14 pKtyn), a diferencia de la cepa parental (*E. coli* W14 o de esta cepa transformada con el plásmido sin inserto -*E. coli* W14 pK18::mob-) crecía en medios mínimos suplementados con tiramina o con dopamina. Sin embargo, *P. putida* KT2440 pKtyn no podía hacerlo a no ser que se suplementase otra fuente de carbono a los cultivos (Fig 13). En tal caso, al acabar de crecer, el análisis de los caldos de cultivo mediante HPLC (ver condiciones al final del ejemplo) revelaba que *P. putida* KT2440 pKtyn había transformado tanto la tiramina como la dopamina en 4-hidroxifenilacético y en 3,4-dihidroxifenilacético respectivamente y que esta conversión no la llevaba a cabo la cepa silvestre (*P. putida* KT2440) ni esa misma cepa transformada con el plásmido sin inserto (*P. putida* KT2440 pK18::mob). Estos resultados indican que en presencia de otra fuente de carbono, la cepa recombinante *P. putida* KT2440 pKtyn expresa los genes tyn, pero, al no poseer los genes hpa, no puede seguir degradando los productos generados (4-hidroxifenilacético, 3,4-dihidroxifenilacético) por lo que los excreta acumulándolos en el caldo. En ausencia de una fuente de carbono adicional, *P. putida* KT2440 pKtyn no puede crecer porque no puede obtener energía ni desde tiramina ni desde dopamina (Fig 13). Sin embargo, *E. coli* W14 pKtyn, degrada ambos compuestos ya que *E. coli* W14 posee un cluster hpa que le permite continuar degradando el 4-hidroxifenilacético y el 3,4-dihidroxifenilacético generados a través de la ruta Tyn (Fig. 12).

55 Adicionalmente, comprobamos que la expresión en *E. coli* W14 de una construcción que contenía todos los genes tyn excepto el tynD era incapaz de crecer utilizando tiramina o dopamina como únicas fuentes de carbono a 37°C, mientras que si lo hacía a 30°. Estos resultados sugieren que el gen tynD que codifica una presunta tiramina desaminasa, podría constituir una subunidad catalítica que facilitase o acelerase la velocidad de desaminación a temperaturas restrictivas para *P. putida U*.

Análisis de los caldos de cultivo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

65 El consumo de de tiramina, dopamina, 4-hidroxifenilacético, 3,4-dihidroxifenilacético y de otros compuestos, así como la acumulación de los intermediarios catabólicos acumulados por los diferentes mutantes cuando se cultivaban en medio líquido, se realizó mediante análisis de HPLC. Para ello, se tomaron muestras de los caldos de cultivo (1 ml) a diferentes tiempos. Éstas se centrifugaron (31.000 x g, 20 minutos) para eliminar los restos celulares y se filtraron a través de filtros Millipore (tamaño de poro de 0,2 µm). Diferentes alícuotas de 20 µl fueron analizadas mediante

HPLC (Beckman System Gold Mod 126. Progamable Solvent Module) equipado con un detector de longitud de onda variable UV/visible (Beckman System Gold Diode Array Detector Module Mod 168), un integrador con el sistema de análisis informático Waters Millenium 32 y una columna de fase reversa (Nucleosil C-18, 250 x 4,6 mm de diámetro interno) microparticulada (tamaño de partícula 10 μm , tamaño de poro 1 μm) (Phenomenex Laboratorios U.S.A.) con una precolumna Analytical Guard Cartridge System, (KJO-4282).

La fase móvil empleada contenía KH_2PO_4 (50 mM, pH 4) y acetonitrilo (CH_3CN), en una proporción 99:1 (vol/vol). El flujo se mantuvo a 2,5 ml/min y el eluyente se monitorizó a 210 nm. En estas condiciones, los tiempos de retención para dopamina, tiramina, 2-feniletilaminamPhEtNH₂, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, 4-hidroxifenilacético, y ácido fenilacético fueron de 3; 4,5; 9,6; 13; 24 y 54 minutos, respectivamente.

Ejemplo 4

15 *Obtención y utilización de una construcción genética que contiene todos los genes tyn y hpa y que confiere al organismo receptor la capacidad para asimilar tiramina y dopamina*

Dado que la utilización de los genes tyn sólo permitía crecer a expensas de tiramina o de dopamina a aquellos microorganismos que poseyesen una ruta hpa funcional, procedimos a diseñar una construcción genética que nos permitiese transferir ambos clusters (tyn y hpa) a otros organismos, confiriéndoles la capacidad para degradar estas dos aminas biogénicas hasta piruvato y succinato.

Para conseguirlo seguimos el procedimiento esquematizado en la Fig. 14 y que implicaba: (i) la clonación de los genes adyacentes a los clusters tyn y hpa en sendos - plásmidos (pK18::mob y pJQ200KS) (104); (ii) dos eventos de recombinación, sencillos e independientes, mediante los que se lograba insertar ambos plásmidos en el cromosoma bacteriano (uno a cada lado, ver Fig. 14); (iii) la digestión a totalidad del cromosoma bacteriano con las endonucleasas de restricción XbaI o HindIII, y (iv) la liberación de un fragmento de DNA que llevaba el plásmido pK18::mob y un inserto de algo más de 25 kilobases que contenía los clusters tyn y hpa (Fig. 14). La transformación de *P. putida* KT2440 con este plásmido integrativo mediante mating triparental (98, 105) confería a la bacteria recombinante la capacidad para crecer en medios que contenían tiramina o dopamina como únicas fuentes de carbono (Fig 13).

Ejemplo 5

35 *Diseño de un protocolo de deriva metabólica que confiere a diferentes microorganismos la capacidad de degradar el aminoácido L-tirosina por la vía de la tiramina*

El catabolismo del aminoácido L-tirosina (un aminoácido proteínogénico precursor de muchas aminas con extraordinaria importancia biológica) ha sido estudiada en numerosos seres vivos. En ciertas bacterias (como por ejemplo Pseudomonas) y en todas las células eucariotas, la degradación transcurre a través de una ruta bien conocida que implica su desaminación (transaminación) a p-hidroxifenilpirúvico; la descarboxilación y reordenación intramolecular de este compuesto para dar homogentísico (2,5-dihidroxifenilacético); la apertura del anillo bencénico originando maleilacetoacético; su isomerización a fumarilacetoacético y, finalmente, la hidrólisis de este compuesto para dar fumárico y acetoacético (99). Sin embargo, muchas bacterias, como es el caso de la paradigmática *E. coli*, no poseen una ruta catabólica para transformar ese aminoácido en intermediarios generales y por consiguiente no puede crecer en aquellos medios en que sólo exista como fuente de carbono tirosina. Otras bacterias degradan sólo parcialmente la tirosina mediante reacciones que implican su desaminación o su descarboxilación (ver estado de la técnica).

Nosotros hemos desarrollado un procedimiento que permite combinar los genes tyn y hpa de *P. putida* U y el tdcA, que codifica la tirosind Descarboxilasa de *Lactococcus lactis*, de modo que la expresión de unos o de otros en diferentes microorganismos (en función de su capacidad catabólica) confiera al microorganismo receptor la capacidad de degradar el aminoácido L-tirosina, vía tiramina, hasta piruvato y succinato.

P. putida U es capaz de degradar L-tirosina por la vía del homogentísico (99), sin embargo un mutante en el que se ha delecionado el cluster hmg (99) no puede catabolizar completamente la tirosina, puesto que es incapaz de degradar el ácido homogentísico, compuesto que se acumula en el caldo y que en contacto con el oxígeno del aire se oscurece (como sucede a los pacientes alcaptonúricos). Sin embargo, este mutante *P. hmg* posee las rutas Tyn y Hpa funcionales. Por consiguiente, si esa bacteria fuese capaz de descarboxilar la tirosina a tiramina, podría crecer a expensas de esta fuente de carbono. Para comprobarlo, clonamos el gen tdcA de *Lactococcus lactis* en el plásmido pBBR1MCS-3 (pMC) y esa construcción fue utilizada transformar *P. putida* U Δ hmg. La cepa recombinante obtenida *P. putida* U Δ hmg pMCtdcA era capaz de degradar eficientemente L-tirosina cuando se cultivaba en diferentes medios conteniendo este aminoácido como única fuente de carbono (Fig. 15). Además, se observaba que la derivación metabólica hacia tiramina era muy alta ya que apenas se acumulaba homogentísico en el medio de cultivo. Cuando esta misma construcción (pMCtdcA) se utilizó para transformar un mutante de *P. putida* U en el que además del cluster hmg, se había delecionado el gen hpd que codifica la enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (responsable de la síntesis de homogentísico desde 4-hidroxifenilpirúvico), la cepa recombinante obtenida (*P. putida* Δ hmg Δ hpd pMCtdcA) degradaba la tirosina incluso más eficazmente que aquella otra que carecía sólo del cluster hmg (Fig. 15). Este efecto puede explicarse asumiendo que, al estar bloqueada la ruta degradativa en una etapa anterior a la formación del ácido

homogentísico, la pérdida de intermediarios catabólicos excretables es menor y, por consiguiente, un mayor porcentaje de L-tirosina será descarboxilado y degradado a través de las vías Tyn y Hpa.

Como ya hemos indicado anteriormente, *E. coli* W14 posee el cluster hpa por lo que esta bacteria puede degradar 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético, pero no puede asimilar L-tirosina ni tiramina (todas las cepas de *E. coli* carecen de las ruta del homogentísico y esta cepa en particular ha perdido, tras sufrir un evento de delección, los genes maoA y maoB). Por lo tanto, para que *E. coli* W14 pueda crecer en L-tirosina utilizando tiramina como intermediario, precisa de una actividad tirosin Descarboxilasa que genere tiramina, y de las enzimas codificadas por los genes tyn para transformar esa amina en 4-hidroxifenilacético.

La transformación de *E. coli* W14 con las construcciones pKtyn y pMCtdcA nos permitió obtener una cepa recombinante (*E. coli* W14 pKtyn pMCtdcApMCtdcA) que crecía en medios de composición definida que contenían L-tirosina o L-fenilalanina como únicas fuentes de carbono (Fig. 16).

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la ruta biosintética de los neurotransmisores dopaminérgicos. En dicha ruta, el aminoácido tirosina es hidroxilado por la tirosina hidroxilasa en dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que a su vez es descarboxilado a dopamina por la enzima DOPA descarboxilasa. La dopamina, por hidroxilación con dopamina hidroxilasa, da lugar a noradrenalina, y ésta, a su vez, por acción de una feniletanolamina N-etiltransferasa, da lugar a adrenalina.

La Figura 2 es la representación esquemática de la síntesis de histamina (A) a partir de histidina por acción de una histidina descarboxilasa, y serotonina (B) a partir de triptófano, gracias a dos enzimas: la triptófano 5-hidroxilasa y la 5-dihidroxitriptófano descarboxilasa.

La Figura 3 muestra la estructura de las aminas “traza” más importantes. La β -feniletilamina, la tiramina y la triptamina son sintetizadas por descarboxilación de los correspondientes aminoácidos precursores por la acción de una L-aminoácido aromático descarboxilasa. La octamina es sintetizada por hidroxilación de la tiramina por la acción de una tiramina- β -hidroxilasa.

La Figura 4 representa las principales aminas biogénicas presentes en los alimentos y sus aminoácidos precursores.

La Figura 5 es una representación esquemática del mecanismo de reacción utilizado por las QH-AmDH para oxidar las aminas primarias (figura modificada de Sun *et al.*, 2003, ref. 81).

La Figura 6 es una representación esquemática de la oxidación de tiramina en *Euphorbia characias*.

La Figura 7 es la representación esquemática de los pasos metabólicos responsables de la degradación de tiramina, dopamina, ácido 4-hidroxifenilacético y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (homoprotocatéuico) en *P. putida* U y de las enzimas que catalizan cada uno de ellos. Las distintas abreviaturas corresponden a: 4-OH-PhAc (ácido 4-hidroxifenilacético), 3,4-diOH-PhAc (ácido homoprotocatéuico), CHMS (semialdehído 5-carboximetil-2-hidroximucónico), CHM (ácido 5-carboximetil-2-hidroximucónico), OPET (ácido 5-oxo-pent-3-ene-1,2,5-tricarboxílico), HHDD (ácido 2-hidroxi-hept-2,4-diene-1,7-dioico), OHED (ácido 2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioico) y HHED (ácido 2,4-dihidroxi-hept-2-ene-1,7-dioico). Las enzimas son: TynAB (tiramina oxidasa), TynC (4-OH-Fenilacetaldehído deshidrogenasa), HpaBC (4-OH-PhAc monooxigenasa), HpaD (3,4-diOH-PhAc 2,3-dioxigenasa), HpaE (CHMS deshidrogenasa), HpaF (CHM isomerasa), HpaG1G2 (OPET descarboxilasa), HpaH (hidratasa) y HpaI (HHED aldolasa). En este esquema también se muestra la organización de los genes implicados en esta ruta catabólica en *P. putida* U. También se indica en la figura el punto de bloqueo metabólico en los diferentes tipos de mutantes.

La figura 8 es el esquema de la organización genética de los dos *clusters* (*tyn* y *hpa*) implicados en la degradación de tiramina y 4-OH-PhAc en *P. putida*. En este esquema, también se indica el punto de inserción del transposón Tn5, en cada uno de los mutantes, así como algunos de los cortes de restricción utilizados para la elaboración de diferentes construcciones genéticas.

La figura 9 es la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA que contiene los genes *tyn* y *hpa* en *Pseudomonas putida* U (CECT 4848). Las regiones de la secuencia que poseen una estructura secundaria de tipo lazo (loop) se encuentran recuadradas.

En la Figura 10, el diagrama de curvas de la izquierda representa las curvas de crecimiento medidas como como ($A_{540\text{ nm}}$) en medio MM + dopamina (5 mM) correspondientes a las cepas *P. putida* U CECT 4848 (silvestre) (■), *P. putida* U tynR::pK18mob (Δ) y de uno de los mutantes de tipo I (A0) (●), de tipo II (A2) (○) y de tipo III (A7) (□). Las 5 gráficas de la derecha representan la concentración residual de dopamina en el caldo de cultivo de las distintas cepas cultivadas en medio MM + dopamina (5 Mm). El comportamiento de los distintos mutantes incluidos en los diferentes grupos, fue similar a cada uno de los indicados en la figura.

ES 2 364 110 A1

La figura 11 es una representación esquemática de la construcción genética pK_{tyn}. En esta construcción, se clonaron los genes que integran todo el cluster *tyn* en los plásmidos pK18::mob (replicativo en *E. coli* e integrativo en *Pseudomonas*). (82, 98-100,103) (Fig 11).

5 En la Figura 12, el diagrama de curvas de la izquierda representa las curvas de crecimiento medidas como ($A_{540\text{ nm}}$) medidas en la cepa *E. coli* W14 pK_{tyn} (●, ○) y de la cepa control *E. coli* W14 pK18::mob (■, □) cuando se cultivaban a 30°C (●, ■) y a 37°C (○, □) en un medio que contenía tiramina (5 mM) como única fuente de carbono. El panel de la derecha representa la concentración residual de tiramina en el caldo de cultivo de *E. coli* W14 pK_{tyn} crecida a 30°C y a 37°C. Se obtuvieron resultados similares al cultivar dichas cepas en medio mínimo suplementado con dopamina.

10 La Figura 13 representa las curvas de crecimiento correspondientes a las cepas *P. putida* KT2440 pK_{tynhpa} XbaI (○, ●) y *P. putida* KT2440 pK_{tyn} (□, ■) cuando se cultivan en un medio que contiene tiramina (5 mM) (○, □) o 4-OH-PhAc (5 mM) (●, ■). El crecimiento se midió como $A_{540\text{ nm}}$.

15 La Figura 14 muestra la representación esquemática de la estrategia seguida para la obtención de las construcciones pK_{tynhpa} HindIII y pK_{tynhpa} XbaI que contienen la información genética necesaria para degradar tiramina, dopamina, 4-OH-PhAc y 3,4-diOH-PhAc.

20 La Figura 15 representa las curvas de crecimiento medidas como ($A_{540\text{ nm}}$) correspondientes a las cepas: *P. putida* U Δ hmgABC pMCtdcA (●); *P. putida* U Δ hpd Δ hmgABC pMCtdcA (○) y a sus respectivas cepas control: *P. putida* U Δ hmgABC pMC (■) y *P. putida* U Δ hpd Δ hmgABC pMC (□), cuando se cultivan en un medio de composición definida que contiene L-tirosina (5 mM) como única fuente de carbono.

25 La Figura 16 Curvas de crecimiento medidas como ($A_{540\text{ nm}}$) correspondientes a la cepa *E. coli* W14 pK_{tyn} pMCtdcA (●) y a su respectiva cepa control *E. coli* W14pK_{tyn} pMC (■), cuando se cultivan en un medio de composición definida que contiene L-tirosina (5 mM) como única fuente de carbono.

30

35

40

45

50

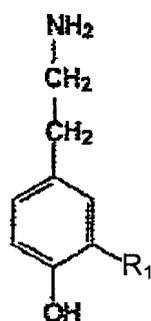
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para transformar un compuesto de la Fórmula I



Fórmula I

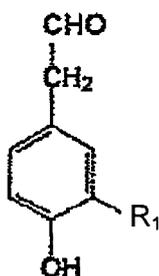
20 donde R₁ es H (tiramina),

25 contenido en una muestra,

en ácido pirúvico y ácido succínico, o alguna de sus sales,

que comprende las siguientes etapas:

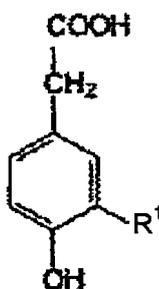
30 a) transformar el compuesto de Fórmula I en un compuesto de Fórmula II,



Fórmula II

45 donde R₁ es H, por la acción catalítica de una tiramina oxidasa;

50 b) transformar el compuesto de Fórmula II en un compuesto de Fórmula III,



Fórmula III

65 donde R¹ es H, por la acción catalítica de una 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa;

ES 2 364 110 A1

c) transformar del compuesto de Fórmula III en el que R¹ es H, en el compuesto de Fórmula III en el que R¹ es OH (ácido 3,4-dihidroxifenilacético), por la acción catalítica de una 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa

5 d) transformar el ácido 3,4-dihidroxifenilacético en semialdehído 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico, por la acción catalítica de una hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa;

e) transformar el semialdehído 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico en ácido 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico, por la acción catalítica de una deshidrogenasa,

10 f) transformar ácido 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico en ácido 5-oxo-pent-3-ene-1,2,5-tricarboxílico, por la acción catalítica de una isomerasa,

15 g) transformar el ácido 5-oxo-pent-3-ene-1,2,5-tricarboxílico en ácido 2-hidroxi-hept-2,4-diene-1,7-dioico, por la acción catalítica de una descarboxilasa,

h) transformar el ácido 2-hidroxi-hept-2,4-diene-1,7-dioico en ácido 2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioico, por la acción catalítica de una descarboxilasa,

20 i) transformar el ácido 2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioico en ácido 2,4-hidroxi-hept-2-ene-1,7-dioico, por la acción catalítica de una hidratasa,

j) transformar el ácido 2,4-hidroxi-hept-2-ene-1,7-dioico en ácido pirúvico y ácido succínico o semialdehído succínico, por la acción catalítica de una aldolasa;

25 procedimiento donde cualquiera de los ácidos citados puede estar en forma de cualquiera de sus sales, **caracterizado** porque, adicionalmente a las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento, están presentes en la muestra las proteínas cuyas secuencias polipeptídicas están representadas por SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 44.

30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la tiramina oxidasa que cataliza la etapa a) está codificada por una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo de:

35 i) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 3 y una segunda secuencia que es idéntica; al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 5;

40 ii) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con las secuencias de i);

45 iii) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 4 y una segunda secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 6;

50 iv) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 y una segunda secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende las secuencias mencionadas en i), o secuencias complementarias a las mismas;

55 o es una tiramina oxidasa que comprende dos fragmentos de secuencia de aminoácidos, un primer fragmento cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 4 y un segundo fragmento cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 6, tiramina oxidasa en la que el fragmento de secuencia idéntica al menos en un 60% a SEQ ID NO: 4 y el fragmento de secuencia idéntica al menos en un 60% a SEQ ID NO: 6 pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals.

65 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la tiramina oxidasa que cataliza la etapa a) está formada por dos subunidades, una de las cuales tiene una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y la segunda de las cuales tiene una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

ES 2 364 110 A1

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa que cataliza la etapa b) está codificada para una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de:

- 5 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 7;
- ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con
10 la secuencia de i);
- iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 8;
- 15 iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 20 o es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 8.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa que cataliza la etapa b) es idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 8.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa que cataliza la etapa c) comprende dos fragmentos de secuencia de aminoácidos, un primer fragmento cuya secuencia es idéntica, al menos en un 60%, a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 20 y un segundo fragmento cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 22, hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa en la que dichos fragmentos de secuencia pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa que cataliza la etapa c) está formada por dos subunidades, una de las cuales tiene una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y la segunda de las cuales tiene una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa que cataliza la etapa d) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 24.

9. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa que cataliza la etapa d) tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 24.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la deshidrogenasa que cataliza la etapa e) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 26.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la secuencia de la deshidrogenasa que cataliza la etapa e) es idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 26.

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de la isomerasa que cataliza la etapa f) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 28.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la secuencia de la isomerasa que cataliza la etapa f) es idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 28.

14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la descarboxilasa que cataliza la etapa g) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 30.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la descarboxilasa que cataliza la etapa g) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 30.

ES 2 364 110 A1

16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la descarboxilasa que cataliza la etapa h) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 32.

5 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la descarboxilasa que cataliza la etapa h) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 32.

10 18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la hidratasa que cataliza la etapa i) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 34.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que la hidratasa que cataliza la etapa i) es idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 34.

15 20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la aldolasa que cataliza la etapa j) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 36.

20 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que la aldolasa que cataliza la etapa j) es idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 36.

22. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

25 a) la tiramina oxidasa que cataliza la etapa a) está formada por dos subunidades, una de las cuales tiene una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y la segunda de las cuales tiene una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6,

30 b) la 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa que cataliza la etapa b) es idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 8;

35 c) la 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa que cataliza la etapa c) está formada por dos subunidades, una de las cuales tiene una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y la segunda de las cuales tiene una secuencia polipeptídica idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;

40 d) la hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa que cataliza la etapa d) tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 24,

45 e) la deshidrogenasa que cataliza la etapa e) tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 26,

50 f) la isomerasa que cataliza la etapa f) tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 28,

55 g) la descarboxilasa que cataliza la etapa g) tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 30,

60 h) la descarboxilasa que cataliza la etapa h) tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 32,

65 i) la hidratasa que cataliza la etapa i) tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 34,

70 j) la aldolasa que cataliza la etapa j) tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 36.

23. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que las enzimas que catalizan o regulan las etapas del procedimiento se sintetizan en la muestra a partir de un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende las siguientes secuencias codificantes:

60 a) la secuencia codificante de una proteína o complejo proteico capaz de actuar como tiramina oxidasa, seleccionada del grupo que consiste en:

65 i) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 3 y una segunda secuencia que es idéntica; al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 5;

ES 2 364 110 A1

- ii) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con las secuencias de i);
- 5 iii) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 4 y una segunda secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 6;
- 10 iv) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 y una segunda secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 6, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende las secuencias mencionadas en i), o secuencias complementarias a las mismas;
- 15
- b) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 20 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 7;
- ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
- 25 iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 8;
- 30 iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma
- 35
- c) la secuencia codificante de una proteína o complejo proteico capaz de actuar como 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 40 i) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia, que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 19 y una segunda secuencia que es idéntica; al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 21;
- ii) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con las secuencias de a);
- 45 iii) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 20 y una segunda secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 22;
- 50 iv) una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20 y una segunda secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 22, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende las secuencias mencionadas en a), o secuencias complementarias a las mismas;
- 55
- d) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 60 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 23;
- ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
- 65

ES 2 364 110 A1

- iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 24;
- 5 iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 24, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 10 e) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como; deshidrogenasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 25;
- ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
- 20 iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 26;
- 25 iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 26, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 30 f) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como isomerasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 35 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 27;
- 40 ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
- 45 iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 28;
- 50 iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 55 g) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como descarboxilasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 60 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 29;
- 65 ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
- iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 30;
- iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 30, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;

ES 2 364 110 A1

- h) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como descarboxilasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 31;
 - ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
 - 10 iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 32;
 - 15 iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 32, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 20 i) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como hidratasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 25 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 33;
 - ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
 - 30 iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 34;
 - 35 iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 34, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 40 j) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como aldolasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 45 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 35;
 - ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
 - 50 iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 36;
 - 55 iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 36, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 60 k) la secuencia codificante de cada una de las proteínas cuya secuencia codificante cumple al menos una de las condiciones del grupo que consiste en ser:
- 65 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia representada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43;
 - ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con una secuencia de i);

ES 2 364 110 A1

iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia representada por SEQ ID NO: 10, SEQ ID: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID: NO: 42 o SEQ ID NO: 44;

iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10, SEQ ID:12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 44, donde la molécula de ácido nucleico híbrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma.

24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que las secuencias codificantes son idénticas a las representadas por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID:11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43.

25. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 24, en el que el vector de expresión es un plásmido.

26. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en el que el vector de expresión está en un organismo hospedador recombinante transformado con el vector de expresión, organismo hospedador que está presente en la muestra o que se añade a la misma.

27. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que el vector de expresión está insertado en el genoma del hospedador.

28. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que el vector de expresión permanece como forma replicativa autónoma.

29. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que las enzimas que catalizan o regulan las etapas de procedimiento son sintetizadas por un microorganismo presente en la muestra o que se añade a la misma.

30. Procedimiento según la reivindicación 29, en el que las secuencias codificantes de las enzimas sintetizadas por el microorganismo están presentes en su genoma de forma natural.

31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que el microorganismo es *Pseudomonas putida* U (CECT 4848) y el procedimiento es el de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

32. Procedimiento según las reivindicaciones 26 y 29, en el que el microorganismo es un microorganismo hospedador recombinante.

33. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en el que la muestra en la que se quiere disminuir el contenido del compuesto de la Fórmula I en el que R¹ es H es un alimento para seres humanos o animales, una bebida destinada al consumo de seres humanos o animales, una materia prima de partida en la obtención del alimento o bebida o un producto intermedio en la preparación del alimento o bebida.

34. Procedimiento según la reivindicación 33, en el que el alimento, materia prima o producto intermedio se selecciona entre un derivado lácteo, leche procedente de cualquier mamífero, mezcla de leches procedente de más de una especie de mamífero o un producto intermedio de la transformación de la leche o mezcla de leches.

35. Procedimiento según la reivindicación 34, en el que el alimento, materia prima o producto intermedio se selecciona entre queso, leche procedente de vaca, oveja o cabra, una mezcla de leche procedente de al menos dos de las especies anteriores; o un producto intermedio de la transformación de la leche o mezcla de leches en queso.

36. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en el que en el que las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento son sintetizadas por un microorganismo presente en la muestra o que se añade a la misma.

37. Procedimiento según las reivindicaciones 26 y 36, en el que el microorganismo es un organismo hospedador recombinante.

38. Procedimiento según la reivindicación 37, en el que el microorganismo recombinante es una bacteria capaz de transformar un azúcar en ácido láctico.

ES 2 364 110 A1

39. Procedimiento según la reivindicación 38, en el que la bacteria pertenece a un género que se selecciona entre *Lactobacillus*; *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*.

5 40. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 39, en el que el microorganismo actúa como iniciador (starter) de la transformación de la leche en derivado lácteo.

41. Procedimiento según la reivindicación 33, en el que la bebida, materia prima o producto intermedio se selecciona entre mosto, cebada, malta, vino, cerveza, un producto intermedio de la transformación de la cebada en cerveza, un producto intermedio de la transformación de mosto en vino, cualquier otra bebida alcohólica que requiera fermentación alcohólica por levaduras o cualquier producto intermedio de transformación de la misma

10

42. Procedimiento según la reivindicación 41, en el que en el que las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento son sintetizadas por un microorganismo presente en la muestra o que se añade a la misma.

15 43. Procedimiento según la reivindicación 42, en el que el microorganismo es un organismo hospedador recombinante.

44. Procedimiento según la reivindicación 43, en el que la bebida es vino y el microorganismo se añade al vino durante la fermentación maloláctica.

20

45. Procedimiento según la reivindicación 33, en el que el alimento, materia prima o producto intermedio se selecciona entre un embutido; un producto intermedio de la transformación de la carne en el embutido o carne de vacuno; porcino o cérvido o mezclas de las mismas destinadas a la preparación de un embutido.

25 46. Procedimiento según la reivindicación 33, en el que el alimento, materia prima o producto intermedio se selecciona entre el chucrut; la materia prima del mismo o un producto intermedio de la obtención del chucrut.

47. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 45 ó 46, en el que las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento son sintetizadas por un microorganismo presente en la muestra o que se añade a la misma que es un organismo hospedador recombinante.

30

48. Procedimiento según la reivindicación 47, en el que el microorganismo actúa como iniciador (starter) de la transformación de la materia prima en el embutido o chucrut.

35 49. Uso de *Pseudomonas putida* U para disminuir el contenido de tiramina en un alimento o bebida destinada al consumo humano o animal, en la materia prima utilizada para su obtención o en un producto intermedio de la transformación de la materia prima en el alimento o bebida.

50. Uso de un organismo hospedador transformado con un vector de expresión que comprende las secuencias codificantes de las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento de la reivindicación 2 y las de los polipéptidos representados por las secuencias SEQ ID NO: 10, SEQ ID:12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 44, para disminuir el contenido de tiramina en un alimento o bebida destinada consumo humano o animal, en la materia prima utilizada para su obtención o en un producto intermedio de la transformación de la materia prima en el alimento o bebida.

45

51. Uso según la reivindicación 50, en el que el organismo hospedador actúa como iniciador (starter) del proceso de transformación de la materia prima en el alimento o bebida destinada al consumo humano o animal.

52. Uso según la reivindicación 51, en el que el alimento es un derivado lácteo.

50

53. Uso según la reivindicación 52, en el que el derivado lácteo es un queso.

54. Uso según la reivindicación 51, en el que alimento es un embutido.

55 55. Uso según la reivindicación 51, en el que el alimento es un alimento en el que se produce fermentación en su proceso de elaboración, que se selecciona entre chucrut, pepinillos o aceitunas.

56. Una composición que comprende al menos los siguientes polipéptidos o complejos proteicos:

60 a) una tiramina oxidasa que comprende dos fragmentos de secuencia de aminoácidos, un primer fragmento cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 4 y un segundo fragmento cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 6, tiramina oxidasa en la que el fragmento de secuencia idéntico al menos en un 60% a SEQ ID NO: 4 y el fragmento de secuencia idéntico al menos en un 60% a SEQ ID NO: 6 pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals;

65

ES 2 364 110 A1

b) una 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa cuya secuencia es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 8;

5 c) una 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa que comprende dos fragmentos de secuencia de aminoácidos, un primer fragmento cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una primera secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 20 y un segundo fragmento cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a una segunda secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 22, 4-hidroxifenilacetaldehído monooxigenasa en la que el fragmento de secuencia idéntico al menos en un 60% a SEQ ID NO: 20 y el fragmento de secuencia idéntico al menos en un 60% a SEQ ID NO: 22 pueden formar parte de una única secuencia polipeptídica o
10 pueden estar formando un complejo proteico, asociadas por enlaces distintos del enlace peptídico, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro o fuerzas de van der Waals.

d) una hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa, cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 24,
15

e) una deshidrogenasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 26,

20 f) una isomerasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 28,

g) una descarboxilasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 30;

25 h) una descarboxilasa cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 32,

i) una hidratasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 34,
30

j) una aldolasa cuya secuencia es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO: 36,

35 k) las proteínas cuyas secuencias están representadas por SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 44.

40 57. Composición según la reivindicación 56, en la que el porcentaje de identidad de las proteínas citadas en los apartados a) a k) con la correspondiente secuencia representada por SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 44 es del 100%.

45

50

55

60

65

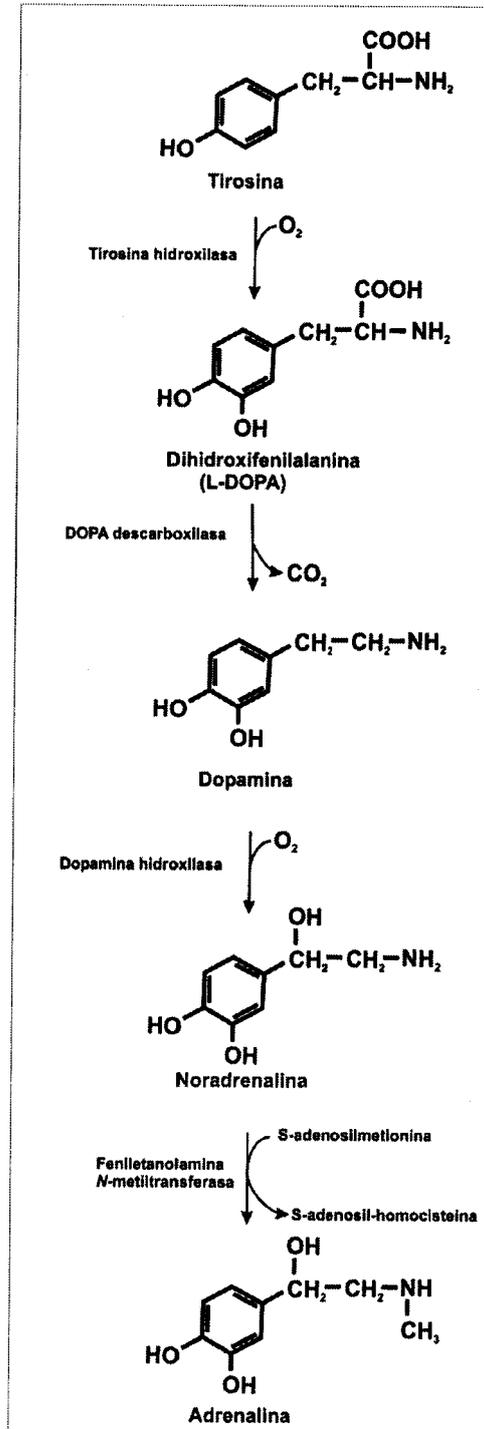


Figura 1

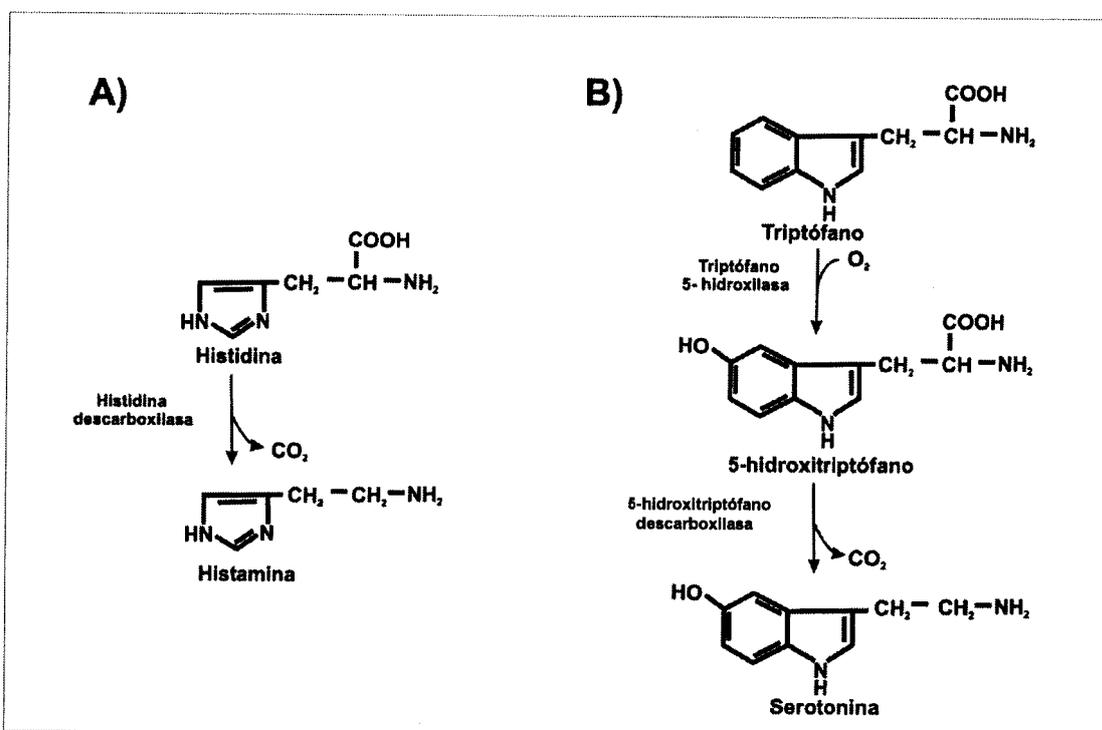


Figura 2

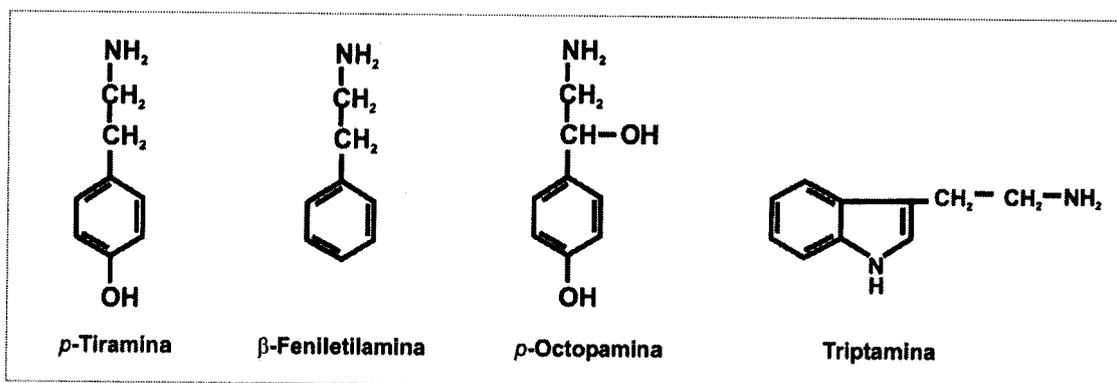


Figura 3

Amina biogénica		Precursor
Aminas alifáticas		
Putrescina	<chem>NCCCCCN</chem>	Ornitina
Cadaverina	<chem>NCCCCCN</chem>	Lisina
Aminas aromáticas		
Tiramina	<chem>NCCc1ccc(O)cc1</chem>	Tirosina
Feniletilamina	<chem>NCCc1ccccc1</chem>	Fenilalanina
Aminas heterocíclicas		
Histamina	<chem>NCC1=CN=CN=C1</chem>	Histidina
Triptamina	<chem>NCCc1c[nH]c2ccccc12</chem>	Triptófano

Figura 4

97

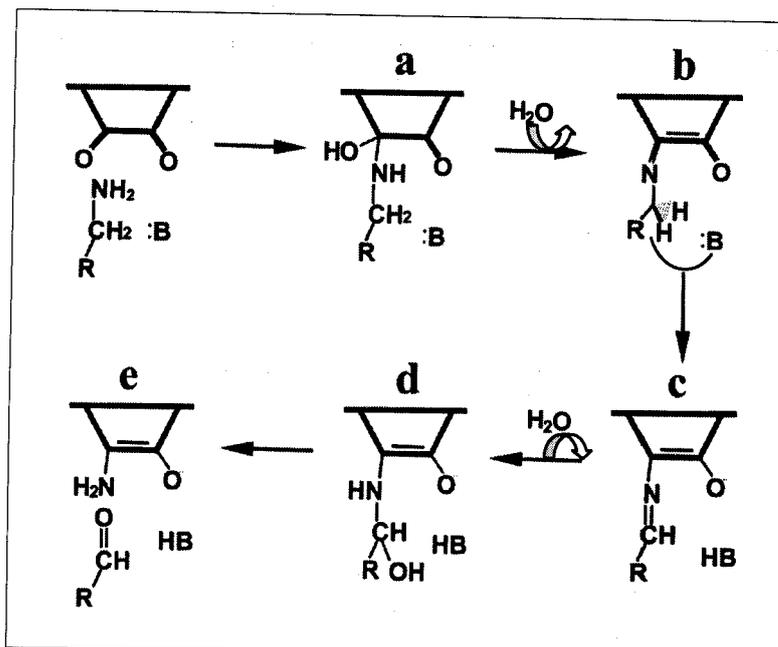


Figura 5

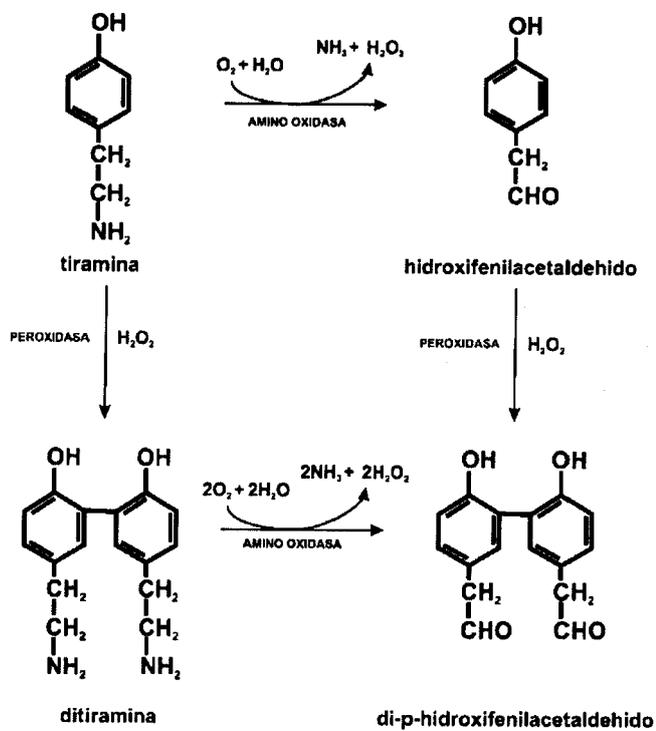


Figura 6

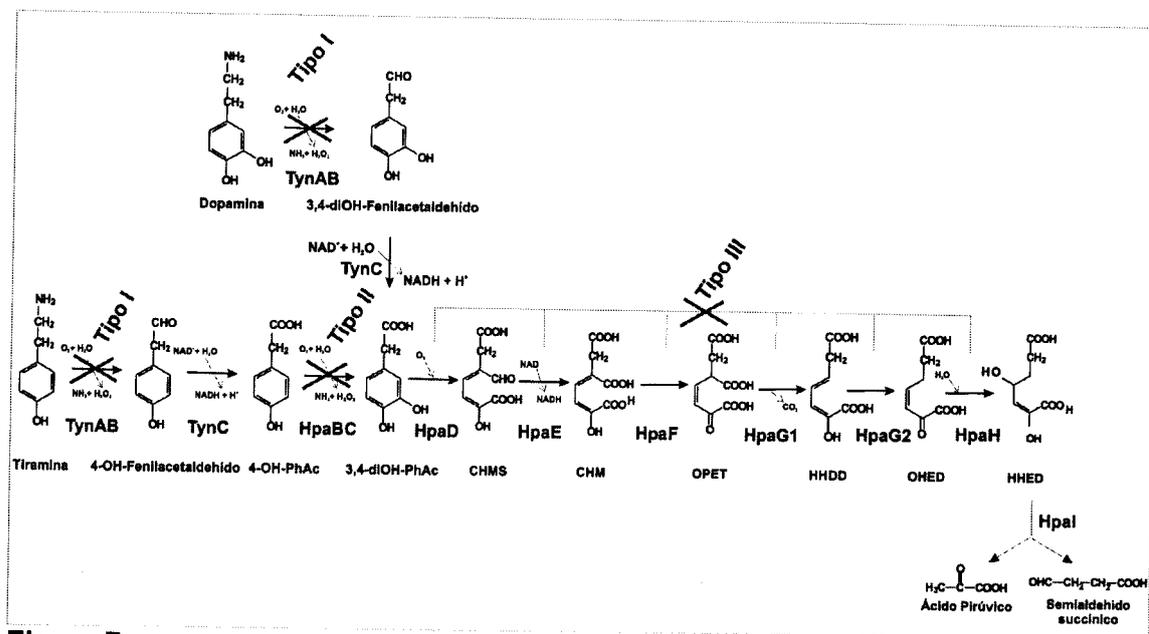


Figura 7

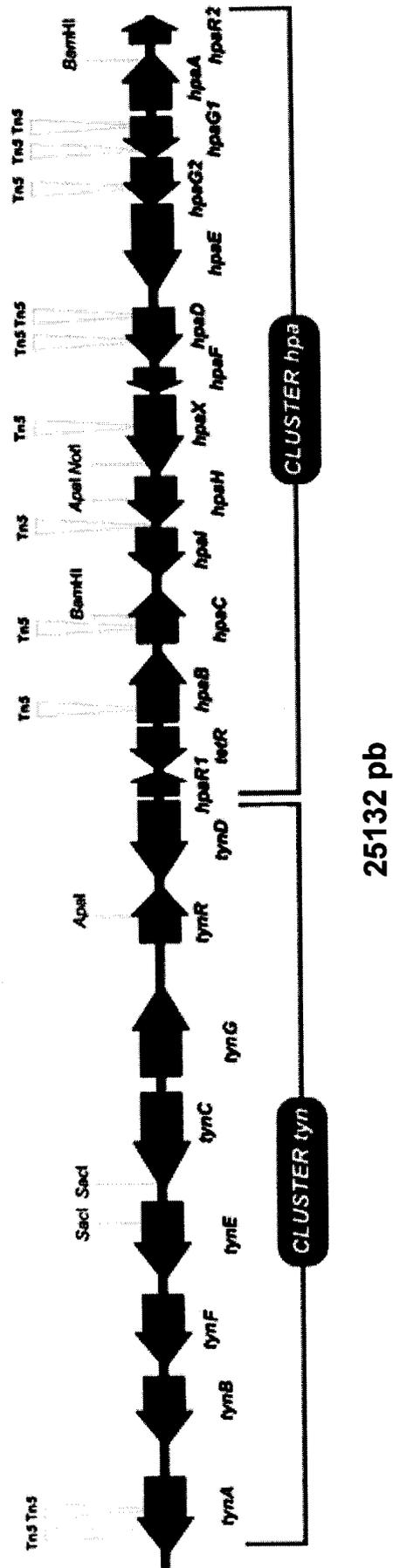


Figura 8

Figura 9

1 TCAGGCGAAACGCTCGAAGCGGTACGGTGACGGGTGCGATCAGCGGGTGGCCTGGGCCACCAGGTCTGCCGCCAG
 AGTCCGCTTTGCGAGCTTCGCCATGCCACTGCCAGCTAGTCGCCCCACCGGACCCGGTGGTCCAGACGGCGGTC
 -2 ■ A F R E F R Y P S P D I L P T A Q A V L D A A L

76 CTGGCCAGCAGCAGGCGAGGTGCCGAAGCCATGCCCGGAAAAGCCGGTGGCCAGGGTCAGGCCCGGAATACTGGC
 GACCGGTGTCGTCGCTCCACGGCTTCGGTACGGGCTTTTCGGCCACCGGTCCAGTCCGGGCTTATGACCG
 -2 Q G A A P S T G F G H G S F G T A L T L G P I S A

151 CACCGGGCCGATACCGGGTTGGAGTCGGGGGTGACGTCAATCGTGCCGGCCAGGCGTGGCGATACGGGCTG
 GTGGCCCCGCTACTGGCCCAACCTCAGCCCCACTGCAGTTAGCACGGCCGGTCCGCGACCGCTATGCCCGGAC
 -2 V P G I V P N S D P T V D I T G A W A S A I R A Q

226 TTCGAACACCGGCCAGGCGCTTTTCAGGTTGCCATGGCCTCGTCGTTGAGGGCCGGGTTGGCGTGCGGGTCTTG
 AAGCTTGTGGCCGGTCCGGCGAAAAGTCCACGCGTACCGGAGCAGCAACTCCCGCCCAACCGCACGCCAGAAC
 -2 E F V P W A A K L N R M A E D N L A P N A H P D Q

301 TACCCGTACACGCTCGAAGGGGTTACATCCGTTGCCCTCCAGCGCCGGGCCAGGGCCAGGTCTTGAAGAAGTA
 ATGGGCATGTGCGAGCTTCCCCAATGTAGGCAACGGAAGGTGCGGGCCGGTCCCGGTCCAGGAACTTCTTCAT
 -2 V R V R E F P T V D T A K W R R A L A L D K F F Y

376 CTTGCCAAAGCTGATGCGCAAAAAGTCCCGCTGGGCACGCAGCTGGGGCAGGTAACGCTTGCCAGCAGCAGGTC
 GAACGGTTTCGACTACGGTTTTTCAGGGCGACCCGTGCGTGCACCCCGTCCATTGCGAACGGGTGTCGTCAC
 -2 K G F S I R L F D R Q A R L Q P L Y R K G L L L H

451 ATCGAGGGTGAGGAAGGCGTCCAGCGCGCCGCGTGGGTGATGATGTAGCCGCGTCCTTGTGCTTGGGAAGGA
 TAGCTCCCACTCCTTCCGAGGTGCGCGGGCGGACCCACTACTACATCGGCGGAGGAACAGCAACGCTTCTCT
 -2 D L T L F A D L A G R Q T I I Y G G D K H K R F S

526 AAAATCTGGTGGCCCCACGGCGATGTCGGTTGGCCCGTCCATGGGCTCTGTGCGCAGCACGGAACAGGTGACGG
 TTTTAGACCACCGGGTCCCGCTACAGCCAACCGGCGAGGTACCCGAGACACGGTCTGTCCTTGTCCAGTCCGC
 -2 F D P A G V A I D T P G D M P E T R L V S C T L P

601 CAAGGTCGGCAGGTTGATGCCAGGTTGCCGAGGAACTTGCGCGACCACAGGCCACCGGCCAGCAACACCTGGTC
 GTTCCAGCCGTCACACTACGGGTCCACGGCTCCTTGAACGCGTGGTGTCCGGTGGCCGGTCTGTGGACCAG
 -2 L T P L N I G L N G L F K R S W L G G A L L V Q D

676 GCAGCGGATTTACCTTGCTCGGTGACCACCCCGCTGACACGGCCGGTGGCGGTGACCAGCGTGGCACCCGCGCA
 CGTCGCCATAAAGTGAACGAGCCACTGGTGGGGCGACTGTGCCGGCCGACCCACTGGTGCACGCGTGGCGCGT
 -2 C R I E G Q E T V V G S V R G A A T V L T R V A C

751 GTTCTCCACTACCACTGCACCTTTGGCGATCGCCGCCCCGGCGATGGCGCTGGCGGCCAGGGTCGGTTCGGCGCG
 CAAGAGGTGATGGTACGTTGAAACCGCTAGCGGGCGGCCCCGTACCCGCGACCGCGGTCCAGCCAAGCCGCGC
 -2 N E V V V A G K A I A A R A I A S A A L T P E A R

826 GGCCTCGGAGGGGGTGAAGATGCCACCTGCCCAATCCGCCGACCACCCGGCACCATCCGGGTGATTTCCCGCGT
 CCGCAGCTCCCCACTTCTACGGTGGACGGTTAGGGCGGCTGGTGGCCGTTGGTAGGCCACTAAAGGGCGCA
 -2 A D S P T F I G G A W D A R G G P V M R T I E R T

901 GCTCAGCAGGCGCAATCCAGGCCAGCGCCTCGACGCTTTTCAGCCAGCCTTCATGCATGCCCATCTGCGTGTG
 CGAGTCGTCGCGCTTAGGTCCGGTCCGCGGAGCTGCGAAAAGTCGGTCCGGAAGTACGTACGGGTAGACGCACAG
 -2 S L L R S D L G L A E V S K L W G E H M G M Q T D

976 GTTACGGCCGATGAACATGATGCCGGCTTGCCGATAGCCAACGTCGCTGCCAACCCTGCGGGCATCTCGGCCCA
 CAATGCCGGCTACTTGTACTACGGCCGAACGGCTATCGGTTGCAGCGACGGTTGGGCACGCCCTAGAGCCGGT
 -2 N R G I F M I G A Q R Y G V D S G V R A P M E A W

1051 CAGCCGATCAGCCGCCAGTGCCAGGGGAATGTCATGGGCGTGGCGGTTGGTCTTGCGCACCCAGCCAGGTTGCG
 GTCGGCTAGTCGGCGGTACGGTCCCCCTTACAGTACCCGACCCGCCAACCAGAACCGGTGGGTCCGGTCCAAACG
 -2 L R D A A L A L P I D H A H R N T K R V W G L N R

1126 GCAGACTGCTCCCAGCGATGCGCCCTTCTCCAGCACCACCACCGTATGTTGCGTTGCGGAGGCTCAGTGC
 GCTGCTGACGAGGGGTGCTACGCGGGGAAGAGGTGTTGGTGGCCATACACGCAAGCCGTCAGTACAG
 -2 S S Q E G A I R G K E L V V V P I N R E A L S L A

1201 GGCGGTGGGCGGATAATGCCGCCACCGATGATCACCAGGTAGTGGCGTGGGGTGGCGGGTGTGTTGTCAC
 CCGCCACTCCGGCTATTACGGCGGTGGCTACTAGTGGTGCATCACCAGCCACCACCGCCACGACCAACCGT
 -2 A T L G I I G G G I I V V T T A D P H R T S T Q V

ES 2 364 110 A1

1276 AGGGGCATCGTGGGAGACATGGCTTTACTCTTTGTTGTGCGTGCAGGGGGAGTGTTCAGCGCCAGCCAGCAGCC
 TCCCCGCTAGCACCCCTGTACCGAAATGAGAAACAACACGCACGTCCCCCTCACAAGTCGGCGGTGCGTCTCGG
 -2 P A I T P S █
 ← *tynA*

1351 TCACTGGCCAAGGCGGATCAGGGTCACTTGGCCTTGCCCCGCACCGCGGTAGGCGGTGACCTCCAGCTCGACCTT
 AGTGACCGGTTCGCGCTAGTCCCAGTGAACCGGAACGGGGCGTGGCGCCATCCGCCACTGGAGGTGAGCTGGAA

1426 GTAAACGGTGGAGCCCAGCGGGGGCAGGTGACCGTGGTGGCCGGTTCGATGCCCGGAACCTTCTCGCCGATCAC
 CATTGGCCACCTCGGGTCGCCGCCCTCCACTGGCACCACCGGCCAGCTACGGCGCCTTGAAGAGCGGCTAGTG

1501 GTCCATGACCCGTGGTACATCGGCAGGGTCTGGATGAACACGCGGAGTTGATGACATCGGCCAGGCTGGCATC
 CAGGTACTGGGCACCATGTAGCCGTCCAGGACCTACTTGTGCGCGTCAACTACTGTAGCCGGTCCGACCGTAG

1576 GACTGCGGCCAGCGCGGTTTCGATGTTGGCGAACACCTGGTGGGTCTGTTTCGATGACGTCTCTGGAATGACCTG
 CTGACCGCGGTGCGGCCAAAGCTACAACCGCTTGTGGACCACCCAGACAAGCTACTGCAGGAGACCTTACTGGAC

1651 GGCTGCGGGTTCGCTCCGGCGGTGTTGGAGACGTGAATCCAGTTGTCCACCGCCACCAGGCGGGAGTAGCTGGC
 CCAGACGCCCAACGCAGGCCGCCACAACCTCTGCACCTTAGGTCAACAGGTGGCGGTGGTCCGCCCTCATCGACCG

1726 CATGGCTTCGAACCTGGAGCCGGTTTTTCAGTTTGTGATGATCTGTGTCATGGGCTTTGCCTTGTATCCGGTTGGGG
 GTACCGAAGCTTGAACCTCGGCCAAAAGTCAAACCTACTAGACACAGTACCCGAAACGGAACAATAGGCCAACGCC

1801 GGATCAGCTGAGAACGGGGTTTCCCAGAGGTTGAGCTTTACGCGGATGCCTTGCTCGAGCGCCTTGCGGTACAC
 CCTAGTCGACTCTTGCCTCCAAAGGTTCTCAAACCTCGAAATGCGGCTACGGAACGAGCTCGCGGAACGCCATGTG
 -2 █ S L V P T E W L N L K V G I G Q E L A K R Y V

1876 CACGGTGCCCCAGGCCACGTCTTCGACGGGCATGCCGCCACCGACATCAGGATGATTTTCGTCGTCATGCAGGGC
 GTGCCACGGGGTCCGGTGCAGAAGCTGCCCGTACGGCGGGTGGCTGTAGTCTACTAAAGCAGCAGTACGTCGGC
 -2 V T G W A V D E V P M G G V S M L I I E D D H L R

1951 GCGCGGTGCGTCCGCGTGTGATGATCTTGCCTGATGTTCCACCTGCTCGGGCGCCAGCGTGCCTTCGGCAATCAT
 CGGGCCACGCAGCGCGGACTACTAGAACGGTACAGAAGGTGGACGAGCCCGGTGCGACGGAAGCCGTTAGTA
 -2 G P A D G S I I K G I D E V Q E A A L T G E A I M

2026 GTCCATGAAGCGCACACCTACCAGCGGTACGTGGTTGTGCGCAGGCTTGGGCAGCTCTTCGAACAGGCCTCGTA
 CAGGTACTTCGCGTGTGGATGGTTCGCCATGCACCAACACCGCTCCGAACCCGTCGAGAAGCTTGGTCCGGAGCAT
 -2 D M F R V G V L P V H N H A P K P L E E F W A E Y

2101 GAGGCCGGTGTGTCACACCTTGGCGACGTCGCTTCCATGCCGGCGTCGATACTGCACGGGCTGGCAT
 CTCCGGCCACAACAGGTGGTGAACCGGTGACGACGAGGACGAGTACGGCCGCGAGCTATGACGTGCCCGGACCGTA
 -2 L G T N D V V K R V D D Q E M G A D I S C P A P M

2176 GGCCAGGAACGCGCCAGGCTTGACCCACTCGCGGCGCACCAGCGGGTACTGGCTGGGGTTCGCGACTTCGCCCCGA
 CCGGTCTTGCCTGGTCCGAACTGGGTGAGCGCGCGTGGTCCGCCATGACCGACCCAGCGGCTGAAGCGGGCT
 -2 A L F A G P K V W E R R V L P Y Q S P D G V E G S

2251 GCTGCAGTAGCTGACCAGGTCCGAACCGCGTACCCTTCTTCCAGGGTTTCCACCACCTGGACATGAGTGATTTG
 CGACGTATCGACTGGTCCAGCCTTGGCGCATGGTGAAGAAGGTCCCAAAGGTGGTGGACCTTACTCACTAAAC
 -2 S C Y S V L D S G R V V E E L T E V V Q V H T I Q

2326 CGGGAAGCTGGTTTTACCCAGGCGAGCAAGGCATCCAGGTTCTTCTGGCCACGGCCCTTGACCTTGAGGGTGTG
 GCCTTCGACCAAAAAGTGGGTCCGCTGCTTCCGTAGGTCCAAGAAGACCGGTGCCGGGAACCTGGAACCTCCACAG
 -2 P F S T K V W A V F A D L N K Q G R G K V K L T D

2401 GATCAGCGGGCAGACGGCCATGAACGCAGCGACCGTGGTCTTGGCCATCACCCCGGGCCGCGCCAGGCCGATCAC
 CTAGTCGCCCCGTCTGCCGTACTTGGTTCGCTGGCACCAGAACGGGTAGTGGGGGCCGCGCGGTCCGGCTAGTG
 -2 I L P C V A M F A A V T T K G M V G P G A L G I V

2476 CTTGGCGTCTTGGCGCCAGGTGGCGGGCGCCAGCGCCGGATGGCGCCGGTGGCGTAGGCCGACAGCAGGTT
 GAACCGAGGAACGCGCGGTCCACCGCCGCGGCTGCGGGCCCTACCAGCGCCACGCCATCCGGCTGTGCTCCAA
 -2 K A D K R A L H R A G V G P I A G T R Y A S L L N

2551 GGCCGACATGTGTGCCAGTGGCGCGCGGTGTGCGCATCGTTGAGGGTGAACATCAGGATCGAGCGGGGCAGGCC
 CCGGCTGTACACACGGTACCGCGCGGCCACAGCCGTAGCAACTCCCACTTGTAGTCTAGCTCGCCCCGTCCGG
 -2 A S M H A L P A G T D A D N L T F M L I S R P L G

2626 TTTCTCACGGTTGGCGATGTTTCGAGCCGTACCCTTGGCGCCTGCGGCTGGAAGTTGCCCGGAGGTACGCCGG
 AAAGAGTGCCAAACCGCTACAAGCTCGGCATGGTGAACCGCGGACGCCAGACTTCAACGGCGGCTCCATGCGGCC
 -2 K E R N A I N S G Y W K A G A T Q F N G G L Y A P

2701 CATCGCCATCATGCGCCGGTCCGGCGTGGGCTTGGGCATGTTGGGAATGGCGAGTGTTCGGGGAAGGTAATCAT
 GTAGCGGTAGTACGCGGCCAGCCGCCACCCGAACCCGTACAACCCCTTACCCTCACGAGCCCTTCCATTAGTA
 -2 M A M M R R D A T P K P M N P F P S H E P F T I M

ES 2 364 110 A1

2776 CGCGCCGTGCGAGTCGCTGTTCCGGCCGGCCATGCGGTAGTCACCCTGGTACAGCAGGCCGAACATTTCTTCCAT
 GCGCGGCACGCTCAGCGACAAGCCCGGCGGTACGCCATCAGTGGGACCATGTCGTCCGGCTTGTAAAGAAGGTA
 -2 A G H S D S N P G A M R Y D G Q Y L L G F M E E M

2851 GGTGTCGACACAGGCCGGCATGTCGGTGACGCCGGCACGGATCATGTCTGCTCGGACAGGTAGATGAAGTCAAT
 CCACAGCTGTGTCCGGCCGTACAGCCACTGCGGCCGTGCCTAGTACAGGACGAGCCTGTCATCTACTTCAGTTA
 -2 T D V C A P M D T V G A R I M D Q E S L Y I F D I

2926 TCTGGTATCGAGGGTTCATGGCGGGTCTCGCAGGGCTGGCTGCCGTCCGATTTGTTGTTGGTTTCGAGGCAACCAG
 AGACCATAGCTCCCAGTACCGCCAGAGCGTCCCAGCCAGCGGACGCTAAACAACAACCAAGCTCCGTTGGTC
 -2 R T D L T ■

← *tynB*

3001 TTTGCTAACGACTGGTAGGTCGTCTTGTGTCTGCCTGCCAGCCGAGTTGACCGTCAGTGCCAGGGCTTCAATGG
 AAAGCGATTGCTGACCATCCAGCAGAACAGACGGACGGTCGGCTCAACTGGCAGTCACGGTCCCGAAGTTACC
 -3 ■ H

3076 CCCGCGAGCGAGAAGCTGGCCGGGTGTGGCGCAGGCTGAGGGCGGTACAGCAGGCACACCACAGGGTGCACAGG
 GGGCGCTCGCTCTTCGACCGGCCACACCGCGTCCGACTCCCAGTCGTCGTTGGTGGTCCCACGTTGCTC
 -3 G A L S F S A P T H R L S L A T L L C V V L T C L

3151 GCCAGCAGCGCGGCCATGCGGTGCGGCCGTGGTTGAGTACCACTGCGGCCAGCGGGCGGCCGCGCAGACGCC
 CGGTGTCGCGCGGGTACGCCAGCCCGCACCAACTCATGGTACGCCGGTCCGCCCGCGCGCGGCTCTGCGG
 -3 A L L A A W A T P G H N L V V A A L P A A G A S A

3226 GACAGCTGGATGGCGCCAGCAGCGCTGCGGTGGAACCCAGTGCCTTTTCTTGGAGGCCATCACCAGCGACATC
 CTGTCGACTACCGCGGGTCCGTCGCGACGCCACCTTGGGTACGGAAAAGAACGCTCCGGTAGTGGTCCGTTAG
 -3 S L Q I A G L L A A T S G L A K E Q S A M V L S M

3301 AGCGTCGACTCGGCTATCCCCAGGCCAACAGGGCTATCACCATGCCGCGGCCACACCTGGCAGCCCCAGGCCG
 TCGCAGCTGAGCCGATAGGGTCCGGCTTGTCCGATAGTGGTACGGCGCCGGTGTGGACCGTCCGGGTCCGGC
 -3 L T S E A I G L G F L A I V M G G A V G P L G L G

3376 GTCAGTGCACCGAGCAGGCTGATGCAGGCACCGCCGGCCATGCACAGCAGCCCCACCCGAGTCAAGGTATTGAGG
 CAGTCACGTGGCTCGTCCGACTACGTCCGTGGCGCCGGTACGTGTCGTGCGGGTGGGCTCAGTTCCATAACTCC
 -3 T L A G L L S I C A G G A M C L V G V R T L T N L

3451 CCCAGCCGGCTGATCAGGTGGCTGGCCGTCATGGCGCCAGCAGGATCGACACCCCGGTGGCGCCAAACAGCAGG
 GGGTCCGGCCGACTAGTCCACCGACCGGCAGTACCGCGGCTCGTCTAGCTGTGGGGCCACCGCGGTTTGTCTCC
 -3 G L R S I L H S A T M A G L L I S V G T A G F L L

3526 CCGAAGGCCTGGGCGCTCAGGCCGTAGTGGCCCTGGTACACCAGGGTGGCACCGCCGATGTAGGCGAACAGGAAG
 GGCTTCCGGACCCGCGAGTCCGGCATACCCGGACCATGTGGTCCACCGTGGCGGCTACATCCGCTTGTCTCTC
 -3 G F A Q A S L G Y H A Q Y V L T A G G I Y A F L F

3601 AAGAATACCGCAGCAACCGCCAGGGTCCGGCGCAGGAAGCGCGGTCCGGCAGGATGGCCAGGTAGGTGCTGCAG
 TTCTTATGGCGTCTTGGCGGTCCAGCCCGCTCTTCGCGCCAGCCGCTCTACCGTCCATCCACGACGTC
 -3 F F V A A V A L T P R L F R R D A L I A L Y T S C

3676 GCGTGGCCAGCGCAGGGTTCGCGTTTGTGGCGGCAGGGTTTCGGGCAGGTTACGACGGCTGTTGACCAGC
 CGCACCGGTCCGCGTCCCAAGCGCAAACGACCCCGCTCCCAAGCCCGTCCAAGTCTCCGACAACCTGGTCCG
 -3 A H G L R L P E R K S P P L T E P L N L L S N V L

3751 ACCGTCACGCCCATGCCGGGAGTACCAGCATTACTGCACGCCAGCCGAAATGTGCGTCGATCAGCCGCCAGG
 TGGCAGTGCGGGTACGGCCGCTCATGGTCTGTAATGACGTGCGGTGCGGCTTACACGCAGCTAGTGGCGGGTCC
 -3 V T V G M G A L V L M V A R W G F H A D I V G G L

3826 GCAGGTGCCAGGATCGGTGCGACGCCTTCGATGGTTCATCAGCAGGGCGAACAGTTTGGTCCGCGCCACGCCCTGG
 CGTCCACGTCCTAGCCACGCTGCGGAAGCTACCAGTAGTCCGCTTGTCAAACCAGCGCCGGTGGCGGGACC
 -3 A P A L I P A V G E I T M L L A F L K T A A V G Q

3901 CTCACATCAGCACCATGCTCATGATCACCACCAGGGTACGCGCACTGCCAGGCCCTGGA AAAAGCGCAGCATG
 GAGTGTAGTGCCTGACGACTACTAGTGGTGGTCCAGTCCGCTGACGGTCCGGGACCTTTTTCGCGTCTGTAC
 -3 S V D R V M S M I V V L T L A S G L G Q F F R L M

3976 ATCAGGGTGTGAGGCTGGGGCTGCGGCTGCCCCAGCGAGCACAGGATGAACAGCAGCAGGCCGGCCAGCAGC
 TAGTCCCACAGCTCCGACCCCGACCGCGGGTCCGTCGTCGTCCTACTTGTGCTGTCGCGCCGGTCCGTCG
 -3 I L T D L S P A A A A G L S C L I F L L L G A L L

4051 GGCTTGGCGCGGCCATAAGCGTCGACGATGGGGCCGAAGATCAGCTGGCCGGCGCCATGGCCAGCAGGAAGAAG
 CCGAACCGCGCCGGTATTCGACGCTGCTACCCCGGCTTCTAGTCGACCGGCCCGGGTACCGTCTGCTCTCTTC
 -3 P K R R G Y A D V I P G F I L Q G A G M A L L F F

ES 2 364 110 A1

4126 GTCAGTGTCAAGCTGTACGCGGGTGAAGCTAGCCTGATAGTGGCTGGCGATTTCGGCAGGCTCGACAGGTACATG
 CAGTCACAGTGCACATGCGCCCACTTCGATCGGACTATCACCAGCCGCTAAAGGCCGTCGAGCTGTCCATGTAC
 -3 T L T L Q V R T F S A Q Y H S A I E P L S S L Y M

4201 TCGACGGCGGAAGGGCCGAGGGCGCCGATCAGGCCTAGGCCAGGGCGAAGCTGAAGGGTATGGGAGGGGAGGGA
 AGCTGCCGCTTCCCGGCTCCCGGGCTAGTCCGGATCCGGGTCCCGCTTCGACTTCCCATACCTCCCTCCCT
 -3 D V A S P G L A G I L G L G L A F S F P I P P S P

4276 TTGGCTTGCATGGTTTTCTCTGGCTGATTTTTTCGCCTACCGACCGGTAGGTTTTCGGAATATTATTCCGCCAGTGC
 AACCGAACGTACCAAAGAGACCGACTAAAAGCGGATGGCTGGCCATCCAACGCTTATAATAAGCGGCTCAGC
 -3 N A Q

4351 GCCAAGGTCAAACCTTCCGCAAGGCCACTGATTCCTGTGGGGAGCGGGCATGCCCGCAACCGGCAAGCCG
 CGGTTCCAGTTTGGGAAGCGTTCGGTGACTAAGGACACCCCTCGCCCGTACGGGCGCTTGTGGCCGTTCCGGC

4426 GTGCCACCGAGTCGCCTTCTTCGCGGGCATGCCCGCTCCACATTGACCGCAGAGGTTGGTTACCGTGGTTGCGT
 CACGGTGGCTCAGCGGAAGAAGCGCCCGTACGGGCGAGGGTGTAACTGGCGTCTCCAACC AATGGCACCAACGCA

4501 CAGAACGGCACAGCCACGGTACAGTGGCTATACACATTTGGTACCATTCCCGCCACCTGGTTGCCGCCGTTGCTC
 GTCTTGGCGTGTGGTGCAGTCGACCGATATGTGTAACCATGGTAAGGGCGGGTGGACCAACGGCGGCAACGAG
 -3 F P V A V T L Q S Y V N T G N G G V Q N G G N S

4576 TCGTCTTTCGCGGGCTGGTAAAGGCCACCAGCGGGTATTATCAGGTGCTCGTTGACTGCCATTCCACATAC
 AGCAGGAACGGCGCCACCATTTCGGGTGGTCCCGGACTAATAGTCCACGAGCAACTGACGGGTAAGGTGTATG
 -3 E D K R P Q Y L G V L P S I I L H E N V A W E V Y

4651 AGGTCCAGTCCCGCGCATCGAGGTTGAGGCTTTCGCGGGTGCCTACGGTGTGGAAGTCAAGTACAGCGCCCCG
 TCCAGGTCGAGGGCGCTAGCTCCAACCCGAAAGCGCCACGCATGCCACAGCTTCAGCTTCAATGTCGCGGGG
 -3 L D L E R A D L N L S E R T R V T D F D F Y L A G

4726 ACTGTGAGATTTTCCAGCGGTGTGCCTTACAGCCACATGGTGGATACCCGTTGCTGTTGAAGGGGCGGGG
 TGACACTCTAAAAGGTGCGCACAGCGGAAGTGGCGGTGTACCACCTATGGGCACAACGACAACCTCCCGGCCG
 -3 V T L N E L P T A K V G V H H I G T N S N F P G A

4801 TAGTTGGCAGCGACTTCCACCTGGAACAGGTGCGGTAACCGTGGACAGGCCGCTGAACAGCGCGTCCAGCCT
 ATCAACCGTCGCTGAAGTGGGACCTTGGTCCACGGCATTGGCGACCTGTCCGGCGACTTGTCCGCGAGGTCGGA
 -3 Y N A A V E G Q F W T G Y G S S L G S F L A D W G

4876 GCGGAGTAGCGGTGTAGCGGTAGGTAACCTGCGGTGCCACGGCAGGTGCGGCAAGGTGTAGCCGGCCTCGAGG
 CGGCTCATCGCCACATCGCCATCCATTGGACGCCACGGGTGCCGTCCAGCCGCTTCCACATCGCCCGGACGTC
 -3 A S Y R T Y R Y T V Q P A W P L D A F T Y G A Q L

4951 TACCAGGCTTGTCCGGGCGTGGTCTTGTCTGCCAGCGTATTGGAAGCGAAACTGGCATTGTGATGCCA
 ATGGTCCGAACGAGCCCCGGCAGCCAGAACAGGACGGTCCGCATAAGCTTCCGCTTTGACCGTAACAGCTACGGT
 -3 Y W A Q E P G D T K D Q W A Y E F A F S A N D I G

5026 GCGTTGCCCTTCCCGCGCACGCTATACAGTCCATGCTTTCGCGGGCTTCTGAAAGTGCCTGGCCCATTTGGTGC
 CGCAACGGAAAGCGGCGCGTGCATATGTGCAGGTACGGAAGCGCCGAAAGACTTTCAGCGACGGGTAACCCAG
 -3 A N G E G R V S Y V D M G E R A K Q F D S A W Q D

5101 GTGACGTCGATGCCGTGAATCCAGGTGAGCCGAGGGTGGCCAAAGGCTTGGGTGTAGTCCAGCGTCCCGCGGCC
 CACTGCAGTACGGCACTTAGGTCCAGTCCGGTCCACGGGTTCCGAACCCACATCAGGTGCGACGGCCCGCCG
 -3 T V D I G H I W T L G L T G L A Q T Y D L T G A A

5176 AGTTCCGGTTTCCGGCTGGGCGCGGTTGTCCGATTTTCCAGCCACAGGCTGCCATGCAGGCCATCGCTGCCCC
 TCAAGCCAAAGCCGACCCGCGCAACAGCCTAAAGTCCGGTGTGCTCCGACGGTACGTCCGGTAGCGACGGGGG
 -3 L E T E A Q A R N D S K L W L L S G H L G D S G G

5251 AGGCGCAGCATTGCGGTGCGGTGGAAGCGTGGCGGGCGGCCAGGTAGTAGGCCCGCGGGTCCAGCGCACCG
 TCCCGCTGCTAACGCCACGCCAGCTTCCGACCCCGCCGGTCCATCATCCGGGGCGGCGCCAGGTCCGCTGGC
 -3 L R L M A T R D F A H R A A L Y Y A G G R D L A G

5326 TCGGCGACCGGTTGCCAGGTTCCGGCCGTCGCTGTTGATCAAAAACCACTGCCAGGCGAATGGTCTGGCGG
 AGCCGCTGCCGCAACGGGTCGAAGCCCGGACGACCAACTAGTTTTTGGTGACGGGTCGCTTACCAGACCGCC
 -3 D A V G N G L N P G D D N I L F G S G L R I T Q R

5401 CCGGCGAAACGTCCACTCCATCCTTGGCCAGCACCGGAAACAGGTCCGCGGAGCGCCAGCCAGGAAAGCGTCT
 GGCCGCTTTCGAGGTGAGGTAGGAACGGTCCGTGGCCCTTGTCCAGCCGGCTCGCGGTCCGCTCCTCCGCGA
 -3 G A S V D V G D K G L V P F L D A S R W G L F A D

5476 TCGATCTTGGTGGTGGTTCGGAGCCATCGGTGTTGCCGGCCGATCGCCATCGCCCGAGGTGCCGAGCTCACC

ES 2 364 110 A1

AGCTAGAACCACCACGCAAGCCTCGGTAGCCACAACGGCCGGCGTAGCGGTAGCGGGGTCCACCGGCTCGAGTGG
-3 E I K T T R E S G D T N G A A D G D G W T A S S V

5551 CAGTTCAGGCTGCCGTACAGCGTGCCGTTGCCGGCCAGGCCCTGGTCACCGGTGAGGCCATACTTGATAAAGCCT
GTCAAGTCCGACGGCATGTGCGACGGCAACGGCCGGTCCGGGACCAGTGGCGACTCCGGTATGAACTATTTCCGGA
-3 W N L S G Y L T G N G A L G Q D G S L G Y K I F G

5626 TCACGCCAGGTGCAACCCCTGTGGTGCCGTCGTAGTTCTTGCGGCTGTTGAACATGCCCCATACCGCCAGCATG
AGTGGCTCCAGCTTGGGGACACCACGGCAGCATCAAGAACGCCGACAACCTGTACGGGGTATGGCGGTCTGATC
-3 E R W T S G G T T G D Y N K R S N F M G W V A L M

5701 TCGGCGTTCAGTGGTGTTCATCGTCGGCGTACAGCTCAACGGCCGGCGGGCTGGCTGGCCAGCAAGGTTGCC
AGCCGCAAGTCCACCGACAGTAGCAGCCGATGTGCGAGTTGCCGGCCGGCGGACCAGCCGGTCTGTTCCAACGG
-3 D A N L H S D D D A Y L E V A P A A Q S A L L T A

5776 AGGGCCAGGCTGGACAGCGTCTGTGGTTTGACCATTTGCACATCCCTCGTTTGTTCGCGCCACCTTCACAGGGG
TCCCGGTCCGACCTGTGCGAGACCAAACCTGTAACGTGTAGGGAGCAAACAAGAGCCGGTGAAGTGTCCCC
-3 L A L S S L T Q P K V

← *tynE*

5851 CCTTTGTGTTTCGGGGGACCCCTCGGTTCTGGCGAGGGGCCATCGCGGTTGGCGGCATGGCCATTAGGGCGTG
GGAAACAACAAGCCCCGTGGGAGCCAAGACCCTCCCGGTAGCGCCAACCGCGCTACCGGATAATCCCGCAC

5926 TCGGTTGGGGGGGGTCTTGTTCGTGGCTGCCAAGGCCTTGACAGCCTTGCCACAGGCGGGTCACTAGCGGA
ACGCCACCCCGCCCAAGAACAAGCACCAGCGTTCCCGGAACGTGCGGAACCGGTGTCCGCGCCAGTCAATCGCCT
-1 Y R I

6001 TCATCACCGACTTGAGCTCGGTGAAGTCATCGATGAAGGCCAGCCGAACCTCGCGGCAATGCCGGAAGCCTTGA
AGTAGTGGCTGAACTCGAGCCACTTCAGTAGCTACTCCGGCTCGGCTTGAGCGCCGGTTACGGCCTTCGGAAC
-1 M V S K L E T F D D I F A S G F E R G I G S A K I

6076 TGCCCCAAACGGTACAGCCGGTTCGAGCAGGGTGTGCATGTTGACCCACAGGGTACCGGCTGGATTGCGGGA
ACGGGGGTTTGCATGTGCGCCAGCTCGTCCACACGTACAACCTGGGTGCCATGGCCGGACCTAAACGCCCT
-1 G G F P V A P D L L T H M N V W L T G A Q I Q P I

6151 TCATGCGCATGGCCTTGCCAGGTCGTTGGTCCACAGGCTGGCGCTGAGGCCGTAGGGCGAGGCGTTCATCAGGT
AGTACCGGTACCGGAACGGTCCAGCAACCAGGTGTCCGACCAGGACTCCGGCATCCCGTCCGCAAGTAGTCCA
-1 M R M A K G L D N T W L S A S L G Y P S A N M L H

6226 GCAGCAGTTCGTTCTCGTCGTATAAGGCAGGAAGTTCGCCACAGGGCCGAAGTTTCTGGGTGAGCAGGGTGT
CGTCGTCAAGCAGAAGCAGCAGTATCCGTCCTTCCAGCGGTGTCCCGGCTTCCAAAGGACCCACTCGTCCACCA
-1 L L E D E D D Y P L F T A V P G F T E Q T L L T D

6301 CGCAGGCTGACCGGGCAGGATTACCGTGGGTTTCGACGAAACAGCCGGGCGCTCGCCAGGGTGCAGCCGTGAA
GCGTCCGACTGGCCCGCTCCTAATGGCACCAAGCTGCTTTGTGCGCCCGGCAGCGGGTCCCACGGCGGCACTT
-1 C A S R A L I V T P E V F C G P G D G L T G G H I

6376 TGATCTGGCTGCCCTTCGGCGGGCGATGGCGAACAGTTTCGGCCAGCTTCTGCTGGTGGCGCTTGTGGCCACGG
ACTAGACCAGCGAAGCCCGCCCGCTACCGCTTGTCAAGCCGGTCAAGACGACCAGCCGCAACAACCGGTGCC
-1 I Q S G E A R A I A F L E A L K Q Q H P K N A V P

6451 GGCCGAACCTGGGTGGCCTCGTCCAGTGGCGAGCCGATTTTCAGTTGGCCAGGCGCTGGGACAGGGCGTCCAGCA
CCGGCTTACCCACCGGAGCAGGTACCAGCTCGGCTAAAAGTCAACCGGGTCCGCGACCCTGTCCCGCAGGTGCT
-1 G F Q T A E D L P S G I K L Q G L R Q S L A D L L

6526 GCGGGTCGATGCGCGAGCGGTGCACATAGAAGCGCTCGCCCGGGCGCAGATTTGCCCCGAGTGCAGGAAGCCGG
CGCCAGCTACCGCTCGCCACGTGATCTTCGCGAGCGGGCGCCGCTTAAACGGGGTCAAGTCTTCCGGC
-1 P D I R S R H V Y F R E G A A C I Q G S H L F G A

6601 CCTCGATGATGCCGTCCACAGCCTTGTGCGTTGCCACGTGCGGCGAGGAAGGCCACCGGTTCTTGCCGCCAGTT
GGAGCTACTACGGCAGGTGTCGGAACAGCCAACGGTGCAGCCCGTCTTCCGGTGGCGCAAGAAGCGGGTCAA
-1 E I I G D V A K D T A V D P L F A V A N K G G L E

6676 CCAGTGTGCGCAGGGTCAAGTGGCGCCATGGCAGCCTGGCCTACGGCGATGCCAGTGGGACAGGACCGGTTGA
GGTCAAGCGTGGCCAGTCAAGCCGGGTACCGTCCGACCGGATGCCGTACGGTCAACCGTGCCTCGGCCACT
-1 L T A R T L K A G M A A Q G V A I G T P V S G T F

6751 ACGAGACCTTGTGCGTACCTGCGTGTGATCAGTGCCTTGGCCACAGGCCACCAGGTCAGCACGTTTCAGTG
TGCTCTGGAACAGCCATGGACGCAGAGCTAGTCAAGCCGGTGGTCCGGTGGTGGCCAGTCTGCAAGTCAAC
-1 S V K D T G A H E I L A K G V L G G G T L V N L A

6826 CACCGCGGGCAGGCTGCTTCCGGTGGCCAGTTCGGCAATGCGCAGCAGCTCAGCGGGTGAATTCGCTGGGCT
GTGGCCGGCGTCCGGACGAAGCCACCGGTCAAGCCGTTACCGCTGTCGAGTCCGCCACTTAAAGCGACCCGA
-1 G A P L G A E T A L E A I R L L T L P T F E S P K

ES 2 364 110 A1

6901 TGAGGATAATGCTGCAGCCGGTTGTCAGGGCCGAGGCCAGCTTCCAGATGGCGATCATGCTGGCGAAGTTCACG
ACTCCTATTACGACGTGGGCCAACAGTCCCGGCTCCGGTCGAAGGTCTACCGCTAGTACGACCGCTTCAAGGTGC
-1 L I I S C G T T L A S A L K W I A I M S A F N W P

6976 GCACGATGCCACCACCACGCCAATCGGCTCGCGCAGGGTGAAGGCGCTGTAGCGCTCACCGGCGAACGAGGGCA
CGTGCTACGGGTGGTGGTTCGGTTAGCCGAGCGCGTCCCCTTCCGCGACATCGCGAGTGGCGCTTGTCTCCCGT
-1 V I G V V V G I P E R L T F A S Y R E G A F S P L

7051 GCGACGGGTGATGGTCTGGCCGGTATCTTGGTCGCCCAGCCGGCTAGTAGCGCAGGAAGTGGCGGCGCTGT
CGTGCCCCACTACCAGACCGGCCACTAGAACAGCGGGTGGCCGCATCATCGCGTCTTACGCGCCGGACGA
-1 S P T I T Q G T I K T A W G A Y Y R L F H A A Q Q

7126 GTACTTCGAACGCACGGGAAATGCCGATGAGCTTGCCGGATTGCAAGGTTTCCAGCTGGCCAGTCTCTCGCGGT
CATGAAGCTTGCCTGCCCTTACGGCTACTCGAACGGCTAACGTTCCAAAGGTGACGCGGTCAAGAAGCGCCA
-1 V E F A R S I G I L K G S Q L T E L Q A L E E R N

7201 TGGCTTCCAGCAGGTGGCCAGCTTGAACAGCACTGGCGCGGGCGGGGGCTGGTGTGCGACCAGGCGGTAA
ACCGAAGTTCGTCAGCCGGTGCAGCTTGTGCTGACCGCGCCCGCCCGCCCGACACACGCTGGTCCGCCATT
-1 A E L L D A L K F L V A A R A A P S T H S W A T F

7276 AGCCTTGGCGGAGGAGCTGACGGCATGGTCGACATCGGCCTGGTGGCGTGGCGATGTGGCGATGGTCTGGC
TCGGAACCGCGCTCCTCGACTGCGGTACCAGCTGTAGCCGGACCAACCGCAGCCGCTACACCCGCTACCAGACCG
-1 G Q R S S S V A H D V D A Q N A D A I H A I T Q G

7351 CGTTGGCCGGTTGACCACGGCAATGTTTCGACGACGACTGGCTGGCGAGGTGCTGGCCGTGGATGAACACGCCAT
GCAACCGGCCAACTGGTGGTGGTACAAGCTGCTGCTGACCGACCGCTCCACGACCGGCACCTACTTGTGGCGTA
-1 N A P N V V A I N S S S Q S A L H Q G H I F V G H

7426 GCTCGCGGGCCAGGAAGGCCGTGACGGCAGGTAGGAGGGTATGTCGCTCATGCAGACTCCGGGGCAGTTGGCCA
CGAGCGCCCGGTCTTCCGGCACTGCCGTCCATCTCCACTACAGCGAGTACGCTGAGGCCCGCTCAACCGGT
-1 E R A L F A T V A P L L T I D S

7501 AAGTTTGCAGCTTAATAAGCGGGGCGAGTGGTGGTGTGTCCTGCGTGACAGGTGCATGACTGTGGCTGCCAAC
TTCAAACGTGCAATTATTCGCCCGTACGCCACGAACACGGACGCACTGTCCACGTACTGACACCACCGGTTGG
← *tynG*

7576 GCACTGGGTAAGCCTTGTGGGAGCGGCCTTGTGTCGCGATAGGGCCGAGAGCGGCCCGGGCGATGTTGGCGGGC
CGTGACCCATTCCGAACACCCCTCGCCGGAACACAGCGCTATCCCGCGCTCTCGCCGGGGCCGCTACAACCGCCG

7651 AAGCTGAAAATGCTGGGGCCGCTTCGCGCCCTATCGCGACGCAAGGCCGCTCCCACAAAAAAGCGAGCGTAGG
TTCGACTTTTACGACCCCGCGAAGCGCGGGGATAGCGTGCCTCCGGCGAGGGTGTTCGCTCGCATCC

7726 CCGGGCTGATTGCTGGCAGGCAGCAACAAGCCCGCGGCAGCCATCGGCAAGACGCCATGCCACCGGCAGCGCAC
GGCCCGACTAACGACCGTCCGTCGTTGTTTCGGGCCCGCTCGGTAGCCGTCTCGCGGTACGGTGGCCGTCGCGTG

tynG →

+3 T S L N N K L T E H

7801 AGTAATCACTCGTTCAACGCCACAAAAACAAGCCGGGGCATAACGATGTCACCTCAATAACAGCTCACCGAGCACC
TCATTAGTGAGCAAGTTGCGGTGTTTTGTTTCGGCCCCGATGCTACAGTGAGTTATTGTTTCGAGTGGCTCGTGG

+3 L N R G T V G F P T A L A S T V G L I M A S P V I

7876 TCAACCGCGGCACTGTCGGTTCCTCCACCGCACTGGCCAGCACTGTCGGGCTGATCATGGCCAGCCCGGTGATCC
AGTTGGCGCCGTGACAGCCAAGGGGTGGCGTGACCGGTGTCGACAGCCGACTAGTACCGGTGCGGGCCACTAGG

+3 L T A T M G F G I G G S A F A V A M V I A A L M M

7951 TCACCGGACCATGGGCTTTGGCATCGGCCGCGCAGCCCTTCGCGGTGGCCATGGTCATCGCCGCACTGATGATGC
AGTGGCGCTGGTACCCGAAACCGTAGCCGCGTCCGCGAAGCGGCACCGGTACCAGTAGCGGCGTACTACTACG
+3 L A Q S T T F A E A A S I L P T T G S V Y D Y I N

8026 TGGCGCAGTCCACCACCTTTGCCGAGGCTGCGTCGATCCTGCCGACCAGGGCTCGGTATACGACTACATCAACT
ACCGCGTCAGGTGGTGGAAACGGCTCCGACGCACTAGGACGGCTGGTGGCCGAGCCATATGCTGATGTAGTTGA

+3 C G M G R F F A I T G T L S A Y L I V H V F A G T

8101 GTGGCATGGGCGGTTTCTTCGCCATTACCGGCACGCTGTCGGCTACCTGATCGTGCATGTGTTCCGGGATACCG
CACCGTACCCGGCAAAGAAGCGGTAATGGCCGTGCGACAGCCGGATGGACTAGCAGCTACACAAGCGGCCATGGC

+3 A E T I L S G V M A L V N F E H L N T L A E S A G

8176 CCGAAACCATCTGTCGGGGGTGATGGCGCTGGTGAACCTCGAGCACCTCAATACCCTGGCGGAATCCGCGGGCG
GGCTTTGGTAGGACAGCCCCACTACCGCGACCACTTGAAGCTCGTGGAGTTATGGGACCGCCTTAGCGGGCCG

+3 G S W L L G V C F V V A F A V L N A F G V S A F S

8251 GTTCGTGGCTGCTGGGGGTGCTTTCGTTGGTGGCGTTTCGGGTGCTCAATGCCTTTGGCGTCAGCGCCTTCAGCC
CAAGCACCGACACCCACACGAAGCACCCCGCAACCGCCAGGTTACGGAAACCGCAGTCCGCGGAAGTCCG

ES 2 364 110 A1

```

+3 R A E V V L T F G M W T T L M V F G V L G L I A A
8326 GCGCGGAAGTGGTCTCACCTTCGGCATGTGGACCACCTTGATGGTGTTCGGCGTGCTTGGCCTGATCGCCGCAC
CGCGCCTTACCAGGAGTGAAGCCGTACACCTGGTGAAGTACCACAAGCCGCACGAACCCGACTAGCGGGCGT

+3 P A V E L D G P F G V S L V G T D L M T I L S L V
8401 CCGCAGTGGAACTGGACGGCCCGTTCGGCGTGTGCTGGTGGGCACCGACCTGATGACCATCCTCTCGCTGGTCCG
GGCGTCACCTTGACCTGCCGGGCAAGCCGCACAGCGACCACCCGTGGCTGGACTACTGGTAGGAGAGCGACCAGC

+3 G M A M F M F V G C E F V T P L A P E L R R S A W
8476 GCATGGCCATGTTTATGTTCTGGTGGCTGCGAGTTCGTGTCACCCGCTGCCCCGAAGTGCCTGCGCTGGCCTGGG
CGTACCGGTACAAGTACAAGCAACCGACGCTCAAGCAGTGCGGCGAACGGGGCTTGACGCAGCGAGCCGGACCC

+3 V L P R A M A L G L F G V A S C M F I Y G A A M K
8551 TGCTGCCCGGGCCATGGCGCTGGGCTGTTTGGCGTGGCCAGCTGCATGTTTATCTACGGAGCGCGATGAAGC
ACGACGGCGCCCGGTACCGGACCCGGACAACCCGACCCGCTGACGCTACAAGTAGATGCCTCGCCGCTACTTCCG

+3 R Q V E N V V L D A A S G V H L L D T P M A I P R
8626 GCCAGGTGGAACACGTGGTGTGGATGCCGCCAGTGGCGTGCACCTGCTGGACACGCCCATGGCCATCCCGCGGT
CGGTCCACCTTTTGCACCACGACCTACGGCGGTACCGCACGCTGGACGACCTGTGCGGGTACCGGTAGGGCGCGA

+3 F A E Q V M G D I G P V W L G I G F L F A G A A T
8701 TCGCCGAGCAGGTGATGGGTGATATTGGCCAGTGTGGTGGGTATCGGCTTCTGTTCGCCGGCGCGCCACCA
AGCGGCTCGTCCACTACCCACTATAACCGGGTACACCGACCCATAGCCGAAGGACAAGCGGGCGCGCCGGTGGT

+3 I N T L M A G V P R I L Y G M A V D G A L P K V F
8776 TCAACACGCTGATGGCCGGTGTGCCACGATCTTTTACGGCATGGCGGTGGACGGCGCGTTCGCCAAGTGTTC
AGTTGTGCGACTACCGGCCACAGGTGCGTAAGAAATGCCGTACCGCCACCTGCCGCGCAACCGGTTCCACAAGT

+3 T Y L H P R F K T P L L C I L V V A L I P C L H A
8851 CCTACCTGCACCCGCGCTTCAAGACGCGCTGCTGTGCATCCTGGTGGTGGCGTGTATCCCTTGCCTGCATGCCT
GGATGGACGTGGGCGGAAGTCTGCGGCGACGACAGTACGACCCACCGCAACTAGGGAACGGACGTACCGA

+3 W Y L G G N P D N I L H L V L A A V C A W S T A Y
8926 GGTACCTGGGCGGCAACCCGGACAACATCCTGCACCTGGTGTGGCCCGCTGTGCGCTGGAGACCCGCTTACC
CCATGGACCCCGCTTGGGCTGTTGTAGGACCTGGACACGACCGGGCGCACAGCGGACCTCGTGGCGGATGG

+3 L L V T L S V V I L R I R R P D L P R A Y R S P L
9001 TGCTGGTGAACCTGTGCGTGGTGGTATATGCGCATCCGCGCCAGACCTGCCGCGTGCCTACCGCTCGCCGCTGT
ACGACCACTGGGACAGCCACTATAACCGGTAGGCGCGGGTCTGGACGGCGCACGGATGGCGAGCGCGGACA

+3 F P L P Q I F S S S G I L I G M A F I T P P G M N
9076 TCCCGTTGCCGAGATATCTCCAGTAGCGGTATCCTCATCGGCATGGCGTTCATCACACCCCGGGCATGAACC
AGGGCAACGGCGTCTATAAGAGGTATCGCCATAGGAGTAGCCTACCGCAAGTAGTGTGGCGGCGGCTACTTGG

+3 P A D V Y V P F A I M L G A T A A Y A L F W T L W
9151 CTGCCGATGTCTACGTGCGGTTCCGCATCATGCTTGGCGCCACTGCGGCTATGCATTGTTCTGGACGCTGTGGG
GACGGCTACAGATGCACGGCAAGCGGTAGTACGAACCGCGGTGACGCGGATACGTAACAAGACCTGCGACACCC

+3 V Q K V N P F K P A R V E D V L E K E F A A E P G
9226 TGCAGAAGTCAACCCGTTCAAGCCGGCGCGGGTFCAGGATGTGCTCGAAGAGTTTCTGCGGAGCCTGGCC
ACGTCTTCCAGTTGGGCAAGTTCGGCCGCGCCAGCTCTACACGAGCTCTTCTCAACGACGGCTCGGACCGG

+3 H A V E H V L H D Q K F A
9301 ACGCCGTGGAGCACGCTGCTGCATGATCAGAAATTTGCGTGAACGCTTGCTGGCGCCCCGAGCGCCTTACGGCTAT
TGCGGCACCTCGTGCACGAGTACTAGTCTTTAAACGCACTTGCGAACGACCCGCGGGCTCGCGGAAGTCCGATA

9376 CGCCAGGCGCCACGCTGGCATGCCTGGCGCGCAACCTGGGGCAGCAGAACCTGGTGGCGGCGGGGTGATCCAC
GCGGGTCCGCGGTGCGACCGTACGGACCGCGGTTGGACCCCGTCTTGGACACCCGCGGCCCACTAGGTG

9451 GACCCGCGCCAGGGTGGCAGGCCACGGTGCACGAACGCGTFCAGGCCCACCTGCTGATGCACATCGTACCTGT
CTGGGCGGGTCCCAACCGTCCGGTGCCACGTGCTTGGCAGCTCCGGTGGACGACTACGTGTAGCAGTGGACA

9526 GAGTTCAGCTGCAGTTGCTGCTCCGCAAGGGGGCAGGTCAGCCTGGAGCTGCGCCATACCGGTGCGCTTCCG
CTCAAGGTGCAGTCAACGGACGAGGCGTTCGCCGCTCCAGTCCGACCTCGACGCGGTATGGCCACGCGAAGCG

9601 CGTGCCGGCCTGGCCTGTGTGTACCGCAAGGGCGACCGGGCGCGTTCGCCGACTGCGCGACCGGTTGCTGCAG
GCACGGCCCGGACCGGACACACATGGCGTTCCCGTGGCCCGCGGAAGCGGGTGCACGCGTGGCCAACGACGTC

9676 CAGCCGCACTGGTGGCGCGCTGATGCCGCTGGATTTCAAGCGCCTGACCTTGGCCTGGCGCGACGGCCAATGG
TTCCGGCGTGACACCCCGCGACTACGGCGACTAAAGTTCGGGACTGGAACCGGACCGCTGCCGTTACC

9751 TTGCTGACCTGGAGCACATGGCGGTAGCGAAGTGGTCAACCGCATGCCAGCTTTCGCCGCTACATCCCCATC
AACGACTGGGACCTCGTGTACCCGCCATCGCTTACCAGTTGGCGTACGGTGCAGAACCGGGATGTAGGGGTAG

```

ES 2 364 110 A1

9826 AGCCCGCAACAGCGGGCGCACCTGATGGCCAGCCTGGCCAGTTCAACACTTTGCTACCTAACCTTTGACGCAA
TCGGGCGTTGTCGCCCCGCTGGACTACCGGTTCGGACCGGGTCAAGTTGTGAAACGATGGATTGGAACCTGCGTTT

9901 CTGGCATAACGCTTGTCTGTATCAAGCGACGAATGATGACAGTTGTGCGCACATAGATAACATGTTAACAATGTGC
GACCGTATGCGGAACGACATAGTTCGCTGCTTACTACTGTCAACACCGCTGTATCTATTGTACAATTGTTACACG

+3 **tynR** → **H T Q Q S N R Q G L E R W**

9976 GCATAACAACAAATCCTGCGTCGAGGGCAGCCATGCATACTCAACAATCCAACCGTCAGGGGCTGGAACGCTGGA

+3 T T A M Q Q I C G R F E T E L A S N H S L F I G E

10051 CCACGGCCATGCAACAGATCTGTGGCCGTTTCGAGACGGAACCTGCGTCCAATCACTCGCTGTTTCATCGGCCGAGG
GGTGCCGGTACGTTGTCTAGACACCGGCAAGCTCTGCCTTGACGCAGGTTAGTGAGCGACAAGTAGCCGCTCC

+3 V S T F S R A G L P L A N L R T N A G N I R R L G

10126 TTTCTACCTTTTCCCGTGGCCGCTTGGCCGCTGGCCAACTGGCCACCAATGCCGGCAACATCCGCCCGCTGGGGC
AAAGATGGAAAAGGGCACGGCCGAACGGCGACCGGTTGGACGCGTGGTTACGGCCGTTGTAGGCCGCCGACCCCG

+3 E N P T L D D D Q H C F L V S Q R A G H S T V S Q

10201 AAAACCCGACCTTGCAGATGACCAGCATTGTTTCTCGGTGACCCAGCGTGGGGGCAATTCACCGTGTCCACAG
TTTTGGGCTGGGAACCTGCTACTGGTCGTAACAAGGACCACTGGTTCGCACGCCCCGTAAGGTGGCACAGGGTCC

+3 G G M Q V S L A P G E L L L M D S V G R C E I T P

10276 GGGGCATGCAGGTGACCGTGGCCGCGGGTGGAGCTGCTGCTGATGGATTCGGTGGGGCGCTGCGAAATCACCCCGA
CCCCGTACGTCCAGTCCGACCGCGGCCACTGCAGCAGGACTACCTAAGCCAGCCCGGACGCTTTAGTGGGGGT

+3 S G L I E H V S L A L S R E Q V R K Y V Q G S G P

10351 GTGGGTTGATCGAACATGTCTCGCTGGCCCTGTCGCTGAGCAGGTACGCAAGTATGTGCAAGCAGCGGCCCGA
CACCAACTAGCTTGTACAGAGCGACCGGGACAGCGCACTCGTCCATGCGTTCATACAGCTTCCGTCGCGGGCT

+3 M F G K I S S S N A C G R M L H V L M D Q L C K D

10426 TGTTTGGCAAGATCTCCTCGAGCAACGCTGCGGGCCATGCTGCATGTGCTGATGGACCACTGTGCAAGGAGC
ACAAACCGTTCAGAGGAGCTCGTTGCGGACCGCCGCTACGACGTACACGACTACCTGGTTGACACGTTCTCTCG

+3 G N V S G D G A Q G D A L Q T A F I A L L E P G F

10501 GCAATGTAAGCGGTGATGGGGCCAGGGCGACGCGTGCAGACCGCCTTCATGCCCCGCTGGAGCCAGGCTTCG
CGTTACATTCGCCACTACCCCGGTTCCCGTGGCGACGCTTGGCGGAAGTAACGGGACGACCTCGGTCCGAAGC

+3 E R H G E A L G N L G A L N G A N L R G Y V Q Q V

10576 AGCGCCATGGCGAAGCGCTGGGCAACCTTGGGGCCTTGAACGGGGCCAACCTGCGGGGCTACGTGCAGCAGGTGA
TCGCGGTACCCTTCGCGACCCGTTGGAACCCGGAACCTTGGCCCGTTGGACGCCCCGATGCACGTCGTCCTACT

+3 I D E S L S Q P G L T P S N L A G R L N I S V R H

10651 TCGACGAGTCCCTGTACAGCCCGGCTGACCCCGTCCAACCTGGCCGGTCCCTGAACATTCGCGTGGTCCAC
AGCTGCTCAGGGACAGTGTGCGGCCGACTGGGGCAGGTTGGACCGGCCAGCGGACTTGTAGAGCCACGCAAGTGG

+3 L Y R L F E E E G D S V C R Y I Q R A R L K R S A

10726 TGTACCGGCTGTTTCAGGAGGAGGGCGATAGTGTGTGCCGCTACATTCAGCGGGCGGCGCTGAAGCGAGTGGG
ACATGGCCGACAAGTCTCCTCCTCCCGCTATCACACCGGCGATGTAAGTCGCCCCGCGGACTTCCGCTCACGCC

+3 D D L A N P F F R S E S I T S I A Y K W G F T D S

10801 ATGACCTGGCCAACCCGTTCTTTCAGGAGCGAGTTCGATTACCTCGATTGCCTACAAGTGGGGGTTTACCGACTCGG
TACTGGACCGGTTGGGAAGAAGTCTCGCTCAGCTAATGGAGCTAACGGATGTTACCCCCAAATGGCTGAGCC

+3 A H F S R S F K K Q F E R S P K D Y R A Q A M V

10876 CGCATTTACGCCGCTCGTTCAAGAAACAGTTCGAACGCTCGCCCAAGGACTACCGGGCGCAGGCGATGGTTTGG
GCGTAAAGTCGGCGAGCAAGTCTTTGTCAAGCTTGCAGCGGGTTCTGATGGCCCGCTCCGCTACCAAACCT

10951 TGTGATGGTGTGCTGTTGTGCGGGCCTCATCGCCGCAAGTCACTTGGCGGCGGTTTCAGCGACGGCCGTTGAAGTA
ACACTACCACGACGAACACGCCCGGAGTAGCGCCGTTTCAAGTGAACCGCCGCAAGTCCGCTGCCGCAACTTCAT

-2 **R R G N F Y**

11026 GCCCGACAGCTGGTGACCGTCTTGGCCGAGTGAGCAGCAGCGGGCGGAAATGGTCTTGGCCGAGGATGCGCGC
CGGGCTGTGACCCAGTGCAGAACGGCCGTCCTGCTGCTGCGCCGCTTACCAGGAACGGCTCCTACGCGCG

-2 G S L Q H V T K G A T L L L P R F H D K G L I R A

11101 ATGCTTGACCGAGCTGACCAGGTATAGCGCTTCGATCCCTCCTGCATACCCCTCGGCGAGTATCTTGCAAATGAT
TACGAACCTGGCTCGACTGTTCCAGTATCGCGAAGCTAGGGAGGACGTATGGGAGCCGCTCATAGAACGTTTACTA

-2 H K V S S V L D Y R K S G E Q M G E A L I K C I I

11176 GTGGCTGGGCGTGACGCCAAAGCCGGAGTAGCCCTGCACATAGAAAGCGTTGGGGCGGTTGTGAGGGTGCCTAT
CACCGACCCGACTGCGGTTTCGGCTCATCGGGACGTGTATCTTTCGCAACCCCGCAACAGCTCCACGGATA

-2 H S P T V G F G S Y G Q V Y F A N P R N D L T G I

11251 CTGCGGAACAGGTTGGCACTGGTGGCCATCGGGCCCGCCAGGCCAGGTCGATGCGCACGCTTTTCAGGTAGGG

ES 2 364 110 A1

GAGCGCTTTGTCCAACCGTGACCACCGGTAGCCCGGGCGGGTCCGGTCCAGCTACCGGTGCAGAAAGTCCATCCC
-2 Q P F L N A S T A M P G G W A L D I R V D K L Y P

11326 GAAAATCTTCAGCATCAGCGCGGGTTCACGCCTTCAGGTCACGCGGGAAGTGCTCGACGAAGGGCGTGGCGGC
CTTTTAGAAGTCGTAGTCGCGGCCAAGGTGCGGAAGTCCAGGTCGCGCTTCACGAGCTGCTTCCCGCACCGCGC
-2 F I K L M L A R N W A K L D L P F H E V F P T A A

11401 GCCAAACAGCAGCGGGTTCGCGGGTGACCCGGTAGTAGTCGATCACCGGGCGGATGTCGCTGTAGGCCCCGGC
CGGTTTGTGTCGCGCAAGAGCGCCACTGGCCATCATCAGCTAGTGGCCCGCTACAGCGACATCCGGGGCGC
-2 G F L L R N E R T V R Y Y D I V P R I D S Y A G R

11476 TATCGGGCTGATGCGCTCGATCAGCTCATCCGGCAATGGCTCGGTTCATCTGGAAGGCATAGGTGTTTATAGT
ATAGCCCGACTACCGGAGCTAGTCGAGTAGGCCGTTACCGAGCCAGTAGTAGACCTCCGATCCACAAATATCA
-2 I P S I R E I L E D P L P E T M M Q F A Y T N I T

11551 GCGTGCCTGCAGCTGCGGCTCCAGCTTGTGAGGAAGCTGTGCGACGCCACAGCAGCTTGCTGGCGGTACCGA
CGCACGCACGTGACGCCGAGGTGGAACAACCTCTTCGACAGCGGTGCGGGTGTGTCGCAACCGCGCATGGCT
-2 R A H L Q P E L K N L F S D C A W L L K S A R V S

11626 GCCACGGCCGGTGCCTACCGTGATGCGCTCGCGGTAGGTCACCTCCAGGGCCGGGCTGTGTTGGAAGATGCGCGC
CGGTGCCGGCCACGCATGGCACTACCGGAGCGGCATCCAGTGAAGTCCCGGCCGACACAAGCTTCTACGCGCG
-2 G R G T R V T I R E G Y C T V E L A P S H E F I R A

11701 ACCATGGCCACCAGTGCCTGCGCTTCGCCACGAGCAGGTTGAGGAATGCACATGGCCACCGCCATGTGCA
TGGTACCGGGTGGTACGCGACGCGAAGCGGGTGTGTCGTCGAAGTCCCTACGTTACGTTACCGGTGGCGGGTACACGTA
-2 G H G V L A Q A E G L L L N L S H V H G G G M H M

11776 CAGGGCGCTGCTGTAGGCGTGTGCTGCCGATGATCTGGCGCACTTCGCTGCCACCGAGAAAACGGATCTCGTCCGG
GTCCCGCGACGACATCCGCAACGACGCGCTACTAGACCGGTGAAGCGACGGTGGCTCTTTTGCCTAGAGCAGCGC
-2 L A S S Y A N S G I I Q R V E S G G L F R I E D R

11851 GGTATTGATCGCCTTGAACGCCTTCTCCCATTTGCGCAGGGTCTGTTCTCGCGGGCGGTGAAGCCCATGTAGCC
CCATAACTAGCGGAACCTGCGGAAGAGGGTAAACGCGTCCAGACAAGGACCGCCCAACTTCGGGTACATCGG
-2 T N I A K F A K E W K R L T Q E Q R R N F G M Y G

11926 ATAGCCGTGGCAGAAGTGGCGTCGATGGCGTAGCGGGCGATGCGGTCCTTGATGATGCCGGCGCCAGTTCGCT
TATCGGCACCGTCTTCAGCGCAGCTACCGCATCGCCGCTACGCCAGGAACACTACCGCCCGGGTCAAGCGA
-2 Y G H C F D A D I A Y R A I R D K I I G A G L E S

12001 GATTTGCAAAATATCCCTCACGCCCTGATCACCGACGCTGCTGCGGATCTTCTCCAGGTCGTGGCCGATGCCCGC
CTAAAGCTTTTATAGGAGTGGCGGACTAGTGCTGCGACGACGCTAGGAAGAGTCCAGCACCAGGCTACGGGGC
-2 I E F I D R V G Q D G V S S R I K E L D H G I G A

12076 CATGATCTGCCCCGCTTGGCGCCGCTACCGCCGTAGCCAGATAACGGCCCTCGAGCAGACGATATTGGTCAC
GTACTAGACGGGCGCAACCGGGCGATGGCGCATCGGGTCTATTGCGGGAGCTCGTGTCTATAACCAAGT
-2 M I Q G G N R G S G G Y G L Y R G E L V V I N T V

12151 GCCTTGTTCGCGCAGCTCCAGGGCGGTGTTAATGCCGGAGAAACCGCCACCGATCACCACGACATCGGCCCTCGAT
CGGAACAAGGGCGTTCGAGGTCGCCACAATTACGGCTCTTTGGCGGTGGCTAGTGGTCTGTAGCCGAGCTA
-2 G Q E A L E L A T N I G S F G G G I V V V D A E I

12226 GTCGCTTCAGGGTTGGGAAGCTCAGGTTGTAATCTTGGTCGCCGAGTAGTAGTGGGGCTCTCGAGGGTGT
CAGCGCAAGGTCCTCAACCCCTTCAGTCCAACATGAAGAACCAGCGGCTCATCATCCACCCGAGAGCTCCACTA
-2 D R E L T P F S L N Y K K T A S Y Y T P S E L T I

12301 CATGACCCCGCTGCTGACTGGAAATGGGTAGAAATCTTATTAATGATTAATGATTTGCTGACTGGCATACT
GTACTGCGGGGACGACTGACCTTTACCCATCTTTAGTAAGATAATTACATAATTACTAACACGTGACCGTATGA
-2 M V G G A S Q F H T S I

← *tynD*
hpaR →

+3
12376 CGCCGGTTTGTCTATTTCCAGCCTCCTTGAGCCCGCATGACCACACCGAGACCCTCCCTGACCCTGACCTTGCTGC
CGGCCAAACGATAAAGGTCGGAGGAACCTCGGGCTACTGGTGTGGCTCTGGGAGGACTGGGACTGGAACGACG

+3 Q A R E A T M A F F R P A L N A H D L T E Q Q W R

12451 AGGCGCGCAAGCCACCATGGCGTTCCTCCGCCCGGGCGTGAATGCCATGACCTGACCAGCAGCAATGGCGGG
TCCGCGCGCTTCGGTGGTACCACAAGAAGCGGGCCGCACTTACGGTACTGGACTGGCTCGTCTTACCGCC

+3 V I R I L R Q Q G E L E S H Q L A E L A C I L K P

12526 TAATCCGTATCTGCGCCAGCAAGGCGAGCTGGAAGCCATCAGTTGGCGGAGCTGGCCTGTATCTCAAAACCA
ATTAGGCATAGGACCGGTCGTTCCGCTCGACCTTCGTTAGTCAACCGCTCGACCGGACATAGGAGTTTGGGT

+3 S M S G V L K R L E R D G I V A R R K S P E D Q R

12601 GTATGAGCGGGTGTCTCAAGCGCTGGAGCGTGACGGCATCGTAGCGGGCGCAAGTCCCGGAGGACAGCGCC

ES 2 364 110 A1

CATACTCGCCCCACGAGTTTCGGGACCTCGCACTGCCGTAGCATCGCGCCGCGTTCAGCGGCCTCCTGGTCGCGG

+3 R V F I S L T E A G Q Q A F L A M S E E M T R N Y
 12676 GGGTGTTCATCAGCCTGACCGAGGCCGCGCCAGCAAGCGTTTCTGGCGATGAGCGAGGAGATGACCCGCAACTACG
 CCCACAAGTAGTCGGACTGGCTCCGGCCGGTTCGTCGCAAGACCGCTACTCGCTCCTCTACTGGGCGTTGATGC

+3 D K I L A Q F G D D K L Q Q L M Q L L G E M K K I
 12751 ACAAGATCCTCGCCCAGTTTGGCGATGACAAGCTGCAGCAGCTGATGCAGCTGCTGGGTGAAATGAAGAAGATCA
 TGTTCCTAGGAGCGGGTCAAACCCTACTGTTTCGACGTCGTCGACTACGTGACGACCCACTTTACTTCTTCTAGT

+3 K P ■
 12826 AACCTGACGCGCCAGGGCTCAGCGGTTGAGTGACAGCGAGTCTTCCAGCACTTTCAGCAGTGTGCCGCGCGCC
 TTGGGACTGCGCGGTCGCGAGTCGCAACTCACTGTGCGCTCAGAAGGTCGTGAAAGTCGTACGACGCGCGCGCG
 -1 ■ R N L S L S D E L V K L L A A A R R

12901 GCTCATAGGCGTCGGGGCCTGCGTACATCAGCTTACATACAGGCTGTGATGATGCCAGGTAGGCATCGGCAT
 CGAGTATCCGACGCCCCGACGCGATGTAGTTCGAGATGTATGTCGACAGCTACTACGGGTCCATCCGTAGCCGTA
 -1 E Y A D P G A Y M L E V Y L S D I I G L Y A D A Y

12976 ACAGCGCCAGGCGGCTGTGCTGCTCATGGCCAGCCGTGGCGAGCTTGCAAGGCGCCAGCTGAAACCTTCGCGTA
 TGTCGCGTCCGCGGACAGCAGGATACGCGGGTCGGCACCGCTCGAACCTCCCGGTGCGACTTGGGAAGCGCAT
 -1 L A L R S H Q E H A W G H R A Q L A V S F G E R I

13051 TGCCGTCAGGTACTGTTCAAAGCCGAAGTGACAATCGGCTTGATGCCCGCCGGGGCAGGAACCCGTGCGCA
 ACGGCAGTCCATGACAAGTTTCGGGCTTCACTGTAGCCGAACACGGGCGGCCCGCTTGTGCGGCACGCGT
 -1 G D L Y Q E F G S T V I P K I G A P P L F A T R L

13126 ACACGAAGCGCAGTTGGGCCGAGTCGCGATAACGTTCCGGCCAGGTGCAGGGCCAGCCAGTCCCCCGCCAGGC
 TGTGCTTCGCGTCAACCCGGCTCAGCGCTATTGCAAGCCGGTCCACGTCGCCGTCGCGGGCGCGGTCGCG
 -1 V F R L Q A S D R Y R E A L H L A L W H G A A L G

13201 CGTCGCGGGCTTCTGCGCAAAGCCGTGCTCGACAAGGCCGTTTCTGCAAGCGCACGCTGGAACACCTCCA
 GCAGCGCCGAAGGACGCGTTTCGCGCACGAGCTGTTCCGGCAAAGGACGTGTTCCGCTGCGACCTTGTGGAGGT
 -1 D R A E Q A F G H E V F A T E Q V L A R Q F V E V

13276 CGAACAAGGCGTCTTGTGGCGAAATGCGCATAACGCGATGCCCTGCGCATGCCCGCAACTGGGCGATTTGCT
 GCTTGTTCGCGAGGAACAACCGCTTACGCGTATGTCGCTACGGAACCGGTACGGGCGGTTGACCCGCTAAAGCA
 -1 F L A D K N A F H A Y L S A K R M G A L Q A I E N

13351 TCAGCGAAGAGGCGTCATAACCGTACTCGGCGAAGTGGCCGACGGCGGCATCGCACACACGCACCGCAGAAGGG
 AGTCGCTTTCGCGAGTATTGGCATGAGCCGCTTACCAGGCTGCCCGGTAGCGTGTGTCGCTGGCGTCTTCCCC
 -1 L S S A D Y G Y E A F H G V A A D C V R V A S P S

13426 AAAGGTCTTTCAACAGCATCACTCCGTAGGGGCGCGGGCGCGCGCGTCTTGAGGGTGGGATTGTGGTGTAT
 TTTCCAGAAAGTTGTCGTAGTGAGGCAGTCCCCGCGCCCGCGCGCAGAACTCCACCCCTAACACCACTA
 -1 L D K L L ■

← tetR

13501 CGAAAATGCAGGGTCAATGCTTGTGCGCAAGGCAATTTCCGGGCGCCATGGAAAAGTCAATGTTCCCTCGTAAC
 GCTTTTACGTGCCAGTTACGAACAGCGTTCGTTAAAGGCCGCGGTACCTTTACGTTACAAGGGGAGCATTG
 hpaB →

+3
 13576 GTGCATTCTCCACCAATCGCCGCTCACATACTGATCGCGTCTTCAATCCAATAAGAAAGAGACCCTCATGA
 CACGTAAGGAGGTGGGTTAGCGGCGAGTGTATGACTAGCGCAGAAGCTTAGGTTATCTTTCTCTGGCGAGTACT

+3 K K P N P L L E D L K S V L P T I A A N A M R A E
 13651 AAAAGCCAAACCCCTGCTGGAAGACCTGAAGTCCGTCCTGCCGACCATGCCGCAATGCCATGCGTGCAGAGC
 TTTTCGGTTTGGGGACGACCTTCTGGACTTCAGGCGAGCAGCGCTGGTAACGGCGGTTACGGTACGCACGTCCTCG

+3 Q D R S V P A E N I A L L K S I G M H R A F L P K
 13726 AGGACCGCAGTGTGCCGGCAGAGAATATCGCCTTGCTGAAAAGCATCGGCATGCACCGCGCTTCTTGCCTAAAC
 TCCTGGCGTCACACGGCCGTCTCTTATAGCGGAACGACTTTCGTAGCCGTACGTGGCGCGAAAGAACGGGTTG

+3 H F G G M E I T L P E F A Q C I A L L A G A C A S
 13801 ACTTCGGCGGCATGGAAATCACCCCTGCCGAGTTCGCCCAGTGCATCGCCTTGCTGGCGGGGCGCTGCGCCAGCA
 TGAAGCCCGCGTACCTTTAGTGGGACGGCTCAAGCGGTCACGTAGCGGAACGACCCCGCCGACCGCGGTCGT

+3 T A W A M S L L C T H S H Q M A M F S P K L Q Q E
 13876 CAGCCTGGGCCATGAGCCTGCTGTGCACCCACAGCCACAGATGGCAATGTTCTCGCCCAAGCTACAACAGGAGG
 GTCGGACCCGGTACTCGGACGACAGTGGGTGTCGGTGGTCTACCGTTACAAGAGCGGGTTGATGTTGTCCTCC

+3 V W G S D P D A T A S S S I A P F G R T E E V E G

ES 2 364 110 A1

13951 TGTGGGGTAGCGACCCGGATGCTACCGCCAGCAGCATATCGCGCGTTCGGCCGCACTGAAGAGGTTGAGGGTG
ACACCCCATCGCTGGGCCACGATGGCGGTCGTCGTCATAGCGCGGCAAGCCGGCGTGACTTCTCCAACCTCCCAC

+3 G V S F S G E M G W S S G C D H A E W A I L G F R
14026 GCGTGTCTTCAGCGGCAAAATGGGCTGGAGTTCGGGTTGCGACCACGCCGAATGGGCGATTCTCGGTTTCCGCC
CGCACAGCAAGTCGCCGCTTTACCCGACCTCAAGGCCAACGCTGGTGGCGCTTACCCGCTAAGAGCCAAAGGCGG

+3 R K N A E G A Q D Y C F A I L P R S D Y E I R D D
14101 GCAAGAATGCCGAAGGCGCTCAGGATTACTGCTTCGCCATCTGCCTCGCAGTGACTATGAAATCCGTGATGACT
CGTTCCTACGGTTCGCGAGTCCATAATGACGAAGCGGTAGGACGGAGCGTCACTGATACTTTAGGCACTACTGA

+3 W Y A V G M R G S G S K T L I V R D A F V P E H R
14176 GGTATGCCGTGGGCATGCGCGGAGCGGCAGCAAGACCTGATCGTGCCTGATGCCTTCGTGCCGAGCACCAGCA
CCATACGGCACCCGTACGCGCCGTCGCCGTCGTTCTGGGACTAGCACGCACTACGGAAGCACGGGCTCGTGGCGT

+3 I Q K A K D M M E G K S A G F G L Y P D S K I F F
14251 TCCAGAAGGCCAAGGACATGATGGAGGGCAAGTCGGCGGGCTTTGGTTTGTACCCGACAGCAAGATTTCTTCCG
AGGTCCTCCGGTTCCTGTACTACCTCCCGTTCAGCCGCCGAAACCAACATGGGGCTGTCGTTCTAAAAGAAGC

+3 A P Y R P Y F A S G F S T V S L G V A E R M L E V
14326 CCCCCTATCGCCGATTTTGGCAGCGGCTTCTCCACGGTCAGCTTGGGCGTTGCCGAGCGCATGCTGGAGGTTG
GGGCATAGCGGCATAAAACGGTCGCCGAAGAGGTGCCAGTCGAACCCGCAACGGCTCGCGTACGACCTCCACA

+3 F R E K T R N R V R A Y T G A A V G A A T P A L M
14401 TCCGCGAGAAAACCCGCAACCCGCTGCCTACACCGGTGCTGCCGTTGGGCGCCGCCACCCCGGCGTGCATGC
AGGCGCTCTTTTGGGCGTTGGGCGACGCACGGATGTGGCCACGACGGCACCCCGGCGGTGGGCGCCGACTACG

+3 R L A E S T H Q V A A A R A L L E K S W D E I A E
14476 GCCTGGCCGAGTCGACCCATCAGGTGGCCGCTGCCCGGCGATTGCTGGAAAAGAGCTGGGACGAGATTGCCGAGC
CGGACCCGCTCAGCTGGGTAGTCCACCGGCGACGGCCCGTAACGACCTTTTCTCGACCTGCTCTAACGGCTCG

+3 H S A R H E Y P S R G T L A F W R T N Q G Y A V K
14551 ACAGTGCCTTCACGAATACCCGTCGCGTGGCAGCTGGCGTTCTGGCGTACCAACCAGGGCTACGCCGTTGAAGA
TGTCACGGGCGTCTTATGGGAGCGCACCGTGGCAGCCGCAAGACCGCATGGTTGGTCCCGATCGGGCACTTCT

+3 M C I Q A V D R L M E A A G G G A W F E S N E L Q
14626 TGTGCATCCAGGCCGTCGACCCCTGATGGAAGCGGGCGGTGGTGGCGCCTGGTTCGAGAGCAACGAATCGCAGC
ACACGTAGGTCGGCAGCTGGCGGACTACCTTCGCCGGCCACCACCGGACCAAGCTCTCGTTGCTTGACGTCC

+3 R L F R D S H M T G A H A Y T D Y D V C A Q I L G
14701 GGCTGTCCCGGATTTCGCACATGACCCGTGCCATGCCTACACCGATTACGACGTGTGTGCGCAAAATCCTCGGCC
CCGACAAGGCGCTAAGCGTGTACTGGCCACGGGTACGGATGTGGCTAATGCTGCACACACGCGTTTAGGAGCCGG

+3 R E L M G L E P D P A M V █
14776 GCGAGCTGATGGGCTGGAGCCTGACCCGGCGATGGTCTGAGCCGCCACTTGTTCACCCATCCCTACAAGCA
CGCTCGACTACCCGACCTCGGACTGGGCCGCTACGAGACTCGGCGGTGAACAAAAGTGGGTAGGGGATGTTCTG

hpaC → █

+1 █ S K E T F D S R A
14851 CAACAACAACAGGGCAGGCTGCCAGGCTGCCCGGGAGTCTTGATGTCCAAAGAAACCTTCGATTACGTGCC
GTTGTTGTTTTCGCCGTCGACGGTCCGGACGGCCCTCAGAACGTACAGGTTCTTTTGAAGCTAAGTGCACGG

+1 F R R A L G N F A T G V T V V T A A G P S G R K V
14926 TTCGCCCGCCCTGGGCAACTTCGCCACCGCGTGACCGTGGTGACTGCCCGCGCCCAAGTGGCCGCAAGGTC
AAGGCGGCGGGACCCGTTGAAGCGTGGCCGCACTGGCACCACTGACGGCGCCGGGTCACCGCGCTCCAG

+1 G V T A N S F N S V S L D P A L I L W S I D K R S
15001 GCGTACCGCCAACAGCTTCAACTCGGTGTCGCTGGACCCGGCGTGCATCTGTGGAGCATCGACAAGCGCTCC
CCGCAATGGCGGTTGTGCAAGTTGAGCCACAGCGACCTGGGCGCGACTAGGACACCTCGTAGCTGTTCCGGAG

+1 T S H E V F E E A S H F A V N I L A A D Q I D L S
15076 ACCAGCCATGAAGTGTTCGAAGAGGCTCGCACTTTGCCGTGAACATCTGGCTGGGACAGATCGACCTGTCC
TGGTCGTTACTTCAAGCTTCTCCGAGCGTGAACGGCACCTGTAAGACCGACGCTGGTCTAGCTGGACAGG

+1 N N F A R P K E D R F A G I D Y E T G T G G A P L
15151 AACAACTTTGCCGCCGAAGGAAGATCGCTTTGCCGGTATCGACTACGAGACCGGCACTGGCGCGCGCGGTTG
TTGTTGAAACGGGCGGCTTCTTCTAGCGAAACGGCCATAGCTGATGCTCTGGCCGTGACCCGCGCGGCAAC

+1 F A D C A A R F E C E K Y Q Q L D G G D H W I L V
15226 TTCGCCGATTGCGCGCGCGCTTTGAGTGTGAAAAGTACCAGCAGCTGGACGGTGGCGATCACTGGATCCTGGT
AAGCGGCTAACCGCCGCGGAAACTCACACTTTTCATGGTCTGACCTGCCACCGCTAGTGACCTAGGACCAAC

ES 2 364 110 A1

+1 G K V V A F D D F G R S P L L Y H Q G A Y S M V L
15301 GGC AAGGTAGTGGCCTTTGATGACTTTGGCCGCTCGCCGCTGTGTATCACCAGGGCGCCTATTCAATGGTGTCT
CCGTTCATACCCGGAACTACTGAAACCGGGCAGCGGGCAGCAGCATAGTGGTCCCGCGGATAAGTTACCACGAC

+1 P H T R M T Q G A E G Q A P S S H F Q G R L Q H N
15376 CCGCATACCCGCATGACCCAAGGCGCAGAGGGGCGAGGCACCCGAGCAGCCACTTCCAGGGCCGCCTGCAGCACAAC
GGCGTATGGGCGTACTGGGTTCCGCGTCTCCCGTCCGTGGCTCGTCCGTGAAGTCCCGGCGGACGTCTGTGTTG

+1 L Y Y L M T Q A L R A Y Q A D Y Q P R Q L C T G L
15451 CTGTACTACCTGATGACCCAGGCGCTGCGTGCCTACCAGGCTGACTACCAGCCACGCCAGCTGTGTACCCGGCTG
GACATGATGGACTACTGGGTCCGCGACGCACGGATGGTCCGACTGATGGTCCGTGCGGTGACACATGGCCGGAC

+1 R T S E A R M L M V L E N D A G L S L N D L Q R E
15526 CGCACCAGCGAGGCACGCATGCTGATGGTGTGGAGAACGATGCGGGCCTGAGCCTGAACGACCTGCAACGCGAA
CGGTGGTGCCTCCGTGCGTACGACTACCAGACCTTGTGTACGCCCGGACTCGGACTTGTGTGACGTTGCGCTT

+1 V A M P A R E I E E A V A N L K R K G L I A D D E
15601 GTGCGATCCCGGCGGGAGATCGAGGAAGCGGTGCGAACCTCAAGCGCAAAGGGCTGATTGCCGATGACGAA
CACCGCTACGGCCGCGCCCTCTAGCTCCTCGCCAACGGTGGAGTTCGCGTTTCCCGACTAACGGCTACTGCTT

+1 G R V R L S V K G V D E T E A L W T I A R Q Q Q D
15676 GGGCGAGTCCGGCTATCGGTGAAGGGCGTGGACGAGACCGAGCGTGTGGACCATGCCCGGCAACAGCAGGAC
CCGCTACGCCGATAGCCACTTCCCGCACCTGTCTGGTCCGCAACACCTGGTAACGGGCGGTGTGCTGCTG

+1 K V F G Q F S E Q Q L E T F K T V L K A L I N I
15751 AAGTGTTCGGCAGTTCAGTGAACAGCAGCTGGAGACTTCAAGACCGTGTCAAGGCCCTTATCAACATCTGA
TTCCACAAGCCCGTCAAGTCACTTGTGTCGACCTCTGAAAGTTCTGGCACGAGTCCGGGAATAGTTGTAGACT

15826 ACACGCTTTGGGATGGCACC GGCTTTTGGATGGCACC GGCTGTGCCGGTGTTCGCGGATGAACCCGCTCCAC
TGTGCGAAACCCTACCGTGGCCGA CAAAACCTACCGTGGCCGACACGGCCACAAGCGCCTACTTGGGCGAGGGTG

15901 AAGTCCAGCGCCAGTAGCAACTTCGGCGCGGTACCTGTGGGAGCGGCTTTAGCCGCGAACACCCGGCAAAGCCGGT
TCCAGGTCCGGTTCATCGTTGAAGCCGCGCCATGGACACCTCGCGGAAATCGGCGTGTGTGCCGCTTCGGCCA

15976 GCCATCCAACAGAAAGCCTCAGTAGGCACCACCCCGGCACTGGGGACTACCCTGTATCCTTGAACCTCCCGCG
CGGTAGGTTGGTCTTCGGAGTCATCCGTGGTGGGGCGCGTACCCCTGATGGTGACATAGGAACCTGAAGGGGCG
-2 G D L W F G Y A G G G A S P V V V T D K F K G A

16051 CAGCTCGCGCAGCCCGCGCATCAGCACCGTGGTATCCACACCCACCGCCACAACGCCGACCCAGCTCGATGTA
GTCGAGCGCGTCCGGCGCGTAGTCTGGCACCATAGGTGTGGGTGGCGGTGTTTCCGGCGTGGGTTCGAGCTACAT
-2 L E R L G R M L V T T D V G V A V F A A G L E I Y

16126 CGCTCGCGCCAGTTTCTCGTCCGCGCTGAGAATGCCGGCGGCTTTGCCCGCCTTGCCAATGGCAGCAGATTGCGTC
CGCAGCGCGGTCAAAGAGCAGGCGGACTCTTACGCGCGCGAAACGGGCGGAACGGTTACGCGTGTAAACGAG
-2 R R A L K E D A S L I G A A K G A K G I R V I A D

16201 TTCAATCGCCGCTGCACCTCCGGGTGCCCGGGTGTGCCGCGATGCCCCATGGCCGCACTCAGGTCTGCAGGCC
AAGTTAGCGCGGACGTGGAGGCCACCGGCCAACCGGCGTACGGGTTACCGCGGTGAGTCCAGACGCTCCGGG
-2 E I A A Q V E P H G P N G R H G M A A S L D A P G

16276 GATGAACACGCCATCCACACCTTCCACTGCAACGATCTCGTCCAGGTTGGCCAGGCCTTCCTTGTCTCGATCTG
CTACTTGTGCGGTAGGTGTGAAGGTGACGTTGCTAGAGCAGGTCCAACCGTCCGGAAGGAACAAGAGCTAGAC
-2 I F V G D V G E V A V I E D L N A L G E K N E I Q

16351 CACCAGCAGGCACATTTGCTCATCGGCGTGGTCCAGGTAACCGGGGAGGGTGTCCAGCGCGAAGCCCGCGCCAG
GTGGTCCGTTAAACGAGTAGCCGACCCAGGTCCTATTGGCCCTCCCAAGGTCGCGCTTCGGGCGCGGTG
-2 V L L C M Q E D A H D L Y G P L T N W R S A R A L

16426 CGCGCTGCCACCCCGCAATGCCCTTGGGCGGGTAATGCATGGCCTTGACCAGTTGCCGCGCCTGTTCGGCAGT
GCGCGACGGTGGGCGCTTACGGGAACCCGCCCCATTACGTACCGGAACCTGGTCAACGCGCGGACAGCCGTC
-2 A S G V G R I G K P P Y H M A K V L Q R A Q E A T

16501 TTCCACCATCGGCACCAGCAAGGTTTGTGCGCCGATATCCAGCACCTGCTTGATCAGCGCGGTATCGCCGATCAC
AAGTGGTAGCCGTTGCTTCCAAACACGGGCTATAGGTGCTGGACGAACTAGTCCGCGCATATCGGCGCTAGTG
-2 E V M P V L L T Q A G I D L V Q K I L A T D G I V

16576 CGGGCGGATCACTGCCTGGGTGGGGTAGGGTGCACCCGCTGCAACTGGGCGAGCATGCCGCGCAGGTGCTGGG
GCCCCCTAGTGACGGACCCACCCATCCACGGTGGCGGACGTTGACCCGCTCGTACGGCGCTCCAGCAACCC
-2 P R I V A Q S P Y P A V A Q L Q A L M G R L D N P

16651 CGCGTGTTCGCGCTCGATCAGCAGCCAGTCGAAACCGGCATTTGGCCGCGCAGCTCGGCGCAGTAGGCATCGGCCAG

ES 2 364 110 A1

GCGCACAAAGCGGCAGCTAGTCGTCGGTCAGCTTTGGCCGTAACCGCGGTCGAGCCGCGTCATCCGTAGCCGGTC
-2 A H E G D I L L W D F G A N A A L E A C Y A D A L

16726 GCCGAGCCACAGGCCGATTGTCGGTTTCCACCGTGTGCAGGCGTCGCTTGAAGTGGTTGATGGGCATGTCCATGAG
CGGCTCGGTGTCGGCTAAACGCCAAGTGGCGACACGTCCGCAGCGAACTTCACCAACTACCCGTACAGGTACTC
-2 G L W L G I Q P E G S H L R R K F H N I P M D  ← *hpaI*

16801 CAGGTCCTTAAACGAAGCGGCAGGCGATGGAGCCGAGCATGTCGTAGTCGACGTGGAAGGTGTACCTGGGCGAG
GTCCAGGAATTTGCTTCGCCGTCGGCTACCTCGGCTCGTACAGCATCAGCTGCACCTTCCACAGTGGACCCGCTC
-1 # V F R C A I S G L M D Y D V H F T D G P R A

16876 GCGCGACCGGGCGGGTGAACGAACCCCAAGGATGATCTGGCCGGGCTGCAAGGTGACGTCGTACGGCGCCAGTT
GCCGCTGGCCCGCCACTTGGCTTGGGGGTTCCCTACTAGACCGGCCGACGTTCCACTGCAGCATGCCGCGGTCAA
-1 A V P R T F S G G L I I Q G P Q L T V D Y P A L K

16951 TGGTGGCCAGCCAGGCAACGCCTTTGGCCGGGTGGTTGAGCACGGCAGCGCTGACCCCGATTCTCGATCACGC
ACAACCGGTCGGTCCGTTGCGGAAACCGGCCACCAACTCGTGCCGTCGCGACTGGGGCTAAGGAGCTAGTGGC
-1 N A L W A V G K A P H N L V A A S V G S E E I V G

17026 CATTGCGGTAGAGCACCGCCGCACTTTGCGCAGGTCGATTTGCGTGGGGCGCACGGCCCGCCGCCATCACCA
GTAACGCCATCTCGTGGCGGGCGTAAACGCGTCCAGCTAAAGCCACCCCGCTGCCGGGCGGGCGGTTAGTGGT
-1 N R Y L V A P V K R L D I E T P R V A R G G M V V

17101 CGCCGGCATTGGCGCGCTTGTGCGGAGATGGTGTGGAACACCTTGGGGTGGCCTGGGTTTGGCGGTCCACTGCT
GGGCGGTAACCGCCGCAACAGCCTTACCACAGCTTGTGGAACGCCACCCGACCCAAACGCCAGGTGGACGA
-1 G A N A A N D S I T D F V K R T A Q T Q P D V Q Q

17176 GGATGCGCGCGTCAATGATTTCCAGCGCCGGGATCACCCACTCGGTGGCGTCCAGCACATCAAACACGGTGTGT
CCTACGCGCGCAGTTACTAAAGGTGCGCGCCCTAGTGGGTGAGCCACCGCAGGTGCTGTAGTTTGTGCCACTACA
-1 I R A D I I E L A P I V W E T A D L V D F V T I N

17251 TCGGGCCCTTCAGCGGCTTCCGAGGATGAACGCCAATCCACTTCAACCCGCGGCAGATGAAGCGCTCGAAGG
AGCCCGGAAGTCGCGCAACGGCTCCTACTTGGCGTTGAGGTGAAGTTGGGCGCGTGTACTTCCGAGCTTCC
-1 P G K L P K G L I F A L E V E V R P V I F R E F P

17326 GGATGTCGCTGCCTTCGTCGAACAGCATGTCGTCGAGCAAGGCGCCGTAGTCGGGCTCGGTGATGTTTCGACGATA
CCTACAGCGCAGGAAGCAGCTTTCGTCGACAGCAGCTCGTTCGCGGCATCAGCCCGAGCCACTACAAGCTGCTAT
-1 I D S G E D F L M D D L L A G Y D P E T I N S S V

17401 CCTGCATGGCGCGGAGGTGAGGCGCATCTTGTGGCCACCAGCTTGGCGCCGGCGGCGATCTTTTTTGGCACCC
GGACGTACCGCGCGCTCCAGTCCGGCTAGAACACCGGGTGGTTCGAACCGGGCCCGCGCTAGAAAAACGGTGGG
-1 Q M A R S T L G I K H G V L K R G A A I K K A V W

17476 AGGCGCGCTGGATGGCGTAGGCGTCTTCGATGGTGTGATGCGGTTGCTCCAGCGAGAAGTGGCGCACTTGTCTCGC
TCGCGCGACCTACCGCATCCGCAAGCTACCCACTAACGGCCACGAGGTGCTCTTGACCGCGTGAACGAGCG
-1 A R Q I A Y A D E I T I A P Q E L S F Q R V Q E R

17551 GGGAGCGTTCCGGCTGGTCGAGGCGGTGCGCGCGGTGCTGGATGAAAGCGTGTCTAGCATGGGGCGGTCTCTT
CCCTCGCAAGCCGACAGCTCCGCCAGCCGCGCAGCCTACTTTCGCAACAGATCGTACCCCGCCAGAGAA
-1 S R E A Q D L R D A A H Q I F A N D L  ← *hpaH*

17626 GATTCAAGGGTTGACGATGGCAGCCTGGGTGCGCAACACCAGCAGGCCGCCCAGGGCGATGAAGACGGCGAGTAC
CTAAGTTCCCAACTGCTACCGTCGGACCCACGCGTGTGGTTCGTCGGCGGGTCCCGCTACTTCTGCCGCTCATG
-2  P N V I A A Q T R L V L L G G L A I F V A L V

17701 GTACAGAGCAAGGCTGGCGCTGTGGGTGGTGTGCGCACCCAGCCGATGAAGTAGGGCGTGAAGAACGAGGCGAT
CATGTCTCGTTCCGACCGCGACACCCACAGCGGTGGGTGCGCTACTTTCATCCCGCACTTCTTGTCTCCGCTA
-2 Y L A L S A S H T T D R V W G I F Y P T F F S A I

17776 GCTGCCACGCGAGCTGATCAGGGCAATGCGGGCGGCTGGGTACGGGCGTTGAGGAACGCCGGCGGCACTTGCCA
CGACGGGTCGCTCGACTAGTCCCGTTACGGCCGCGGACCCATGCCCGCAACTCCTTGGCGCCGCGTCAACGGT
-2 S G L S S I L A I G A A Q T R A N L F A P P L Q W

17851 GAACATCGGCAGCGCAGCGCTGGGCGCCATGCGCGCCAGCACCAGCCGCGCATTACCGGCAGCGCTGCTCGGG
CTTGTAGCGCTCGGTCGCGACCGGGTACGGCCGCTGCTGGTCCGGCCGGTAAATGGCCGTCGCGGACGAGCCC
-2 F M P L A A S A G M G A L V L G A M V P L A Q E P

17926 GGCAATGGCCGAATAGCGATGCCGATGGCAGCCATCAGCAGCGGTACGCACAGGTGCCAGCGGCTTCGCGTTG
CCGTTACCGCGTTATCGTACGGCTACCGTCGGTAGTCGTCGCCATGCGTGTCCACGGTCCGCCAAGCGCAAC

ES 2 364 110 A1

-2 A I A A I A I G I A A M L L P V C L H W R R E R Q

18001 GCGGTCGCTGGAGCGGCCGACGCCAGCATGAACACGCAGCCGGCCACGTACGGCACAGCGCTGAGCAGGCCGAC
CGCCAGCGACCTCGCCGGCGTGGGTCGTAAGTGTGCGTGGCCGGTGCATGCCGTGTCGCGACTCGTCCGGCTG
-2 R D S S R G C A L M F V C G A V Y P V A S L L G V

18076 ACTGGCGTCGCTGGCCACACCGGCACTGTGAATCAGGCTGGGCATCCAGAACGCAAGGGTATTCACCGCCAGCAT
TGACCGCAGCGACCGGTGTGGCCGTGACACTTAGTCCGACCCGTAGGTCTTGCCTCCATAAGTGGCGGTCTGTA
-2 S A D S A V G A S H I L S P M W F A L T N V A L M

18151 CACCGCGCAATACACGGCCACCAACAGCCACAGCGCACGGCTTGCAGAAATGGCGCCGACGAGGTTACGGGCTT
GTGGCGCGTATGTGCGCGGTGGTGTGCGGTGTCGCGTGCAGAACGCTTTTACCGCGGCTTGCTCCAATGCCCGAA
-2 V A C Y V A V L L W L A R S A F I A G F S T V P K

18226 GCGCTGTCTTCCCTACCGAATTGCGCGCGCAGCGTGGCTTTCTGCTGCTCATCCAGCCAGCTCACCCGCTCGAA
CGCGACAAGAAGGAGTGGCTTAACGCGCGCGTGCACCCGAAAGACGACGAGTAGGTGCGGTGAGTGGCGGAGCTT
-2 R Q E E E G F Q A R L T A K Q Q E D L W S V R E F

18301 GTGCTCCGGCAAACGGCCAGTACCACCAGGCCAGCAACACCACCGGCGCCCTTCGAGCAGGAACATCCACTG
CAGGAGCCGTTTTCGCGGTGATGGTGGTCCGGTCTGTGTTGGCCGCGGGGAAAGCTCGTCCCTGTAGGTGAC
-2 H E P L V A L V V L G L L V V P A G E L L F M W Q

18376 CCAGCCACGCAGCCCGCCCGTGTGTCATGAAGCCAGTATGGCCCCGACACTGGCCCGCCGACACTCCGGC
GGTCCGTGCGTGGGCGGGCACAGCACGTAAGTCCGGTTCATACGGGGCTGTGACCGGGCGGCTGGTGGGCGG
-2 W G R L G G T D H M F A L I A G S V P G G V V G A

18451 CAACGGCAGCGCAATGGCGAACAGCGCGGTGACCTGGGCGCGGCCCGCGGGTACCAGCGGTTGAGGTAAAC
GTTGCCGTGCCGTTACCGCTTGTGCGGCCACTGGACCCGCGCGGGGCGGCCCATGGTCGCCAACTCCATTTG
-2 L P V A I A F L A T V Q A R R G A P Y W R N L Y V

18526 CAGAATGCCCGGGAAGAACCAGCGCTCGGCCGCGCCAGGGCAAAGCGCAACAGGTAGAACCGCTGCTGCTTTC
GTCTTACGGGCGCTTCTTGGGCGGAGCCGGCGGGTCCCGTTTCGCGTTGTCATCTTGCAGCACGACGAAAG
-2 L I G P F F G A E A A G L A F R L L Y F A S S S E

18601 GATCAGCAGCATGCTGGTTCGACAACAGCCCCACACCACCATCAGGCAGGCGATCCAGCGCGTGGGCCAACCGG
CTAGTCTGTCGACGACGCTGTTGTCGGGGTGTGGTGGTAGTCCGTCGCTAGGTCCGCGCACCCGCTGCGC
-2 I L L M S T S L L G W V V M L C A I W R R P G V R

18676 GTCGAGCATCAGGTTGCTGGGACGCCGAACAGCGCATAGGCAATGAAGAACAGCCCGCACCCAGGCCATAGAC
CAGCTCGTAGTCAACGACCCCTGCGGCTTGTGCGGTATCCGTTACTTCTTGTGGGCGGTGGTCCGGTATCTG
-2 D L M L N S P V G F L A Y A I F F L G A G L G Y V

18751 CGTGTCCGACAAATGCAGGTCCTGGCTCATCTGCATCTTGGCGAAGCCAATGTTGATGCGGTCCAGGTGGGCGAA
GCACAGCTGTTTACGTCAGGACCGAGTAGAGGTAGAACCGCTTCGGTTACAACACTACGCCAGGTCCACCCGCTT
-2 T D S L H L D Q S M Q M K A F G I N I R D L H A F

18826 CAGGTAGCACACCAQAGCAGCGGCATCAGCCGCCAGGTGACTGCCGATGGGTACTGTGCGCCCGTTCAACGTG
GTCCATCGTGTGGTGTGTCGCGTAGTCCGGGTCCTACTGACGGGTACCCATGACAGCCGGGCAAGTTGCAC
-2 L Y C V L L L P M L R W T V A R H T S D A R E V H

18901 TGCCTCGCGCGCGAGGCTTGTTCGAGTGTGCTCATGTTTTTTGTAAGTATTCTGTAATGAGTCCGGGAGGGCGTG
ACGGAGCGCGCGCTCCGAACAAGCTCACACGAGTACAAAACATGAATAAGACATTACTCAGCCCTCCCGCAC
-2 A E R P S A Q E L T S ■

18976 GTTTGAGCCGGCGCGCTAGCGGTTGAACAGTGGGTGCAAGGTGCTGTGCTTGGCGTCTGAGACCTGGCGGCTGCT
CAAACCTCGGCCGCGCATCGCCAACTTGTACCCACGTTCCACGACACGAACCGCAGCATCTGGACCCGCCACGA
-2 ■ R N F L P H L T S H K A D Y V Q A T S ← hpaX

19051 GTGGTCGATCTGCACGGTGTATGCCGATCGGGCGCTGTTGCAGCAGTGGGTCCAGGCGCGCTTCAACACTGCCAG
CACCAGCTAGACGTGCCACTACGGCTAGCCCGGACAACTGCTCACCAGGTCCGCGCGAAAGTTGTGACGGCT
-2 H D I Q V T I G I P R Q Q L L P D L R A K L V A L

19126 CAAGCTGTGCGCCACTGTTTTGTGCACCTCGGCGCTACGGCCGGTAGCCATGCGCAGGTTGGCGTACAGAAAGCC
GTTTCGACAGCGGGTGACAAAACAGTGGAGCCCGATGCCGGCATCGGTACGCGTCCAAACCGATGCTTTTCGG
-2 L S D G V T K H V E A S R G T A M R L N A Y L F G

19201 GTATTCGCTTTGCCGTGCGCCACCCGCAATGGGCGGCGGGTAGGCCAGCAGCGGTGTACCGCCAGTGGGGAA
CATAAGCGGAAACGGCAGCCGGTGGCGGTTACCCGCGCCCATCCGGTCTGCGCACATGGCGGTACCCCTT
-2 Y E G K G D A V A C H A A P Y A L V R T G G T P F

19276 CACGGCTTTGCCTTCGGCATCGCGCTGTTTCGAGCATGGTGTGCGCCAGGGCGGGCACAGGCCGGGGATGTGCGG

ES 2 364 110 A1

GTGCCGAAACGGAAGCCGTAGCGCGACAAGCTCGTACCACAGCCGGTCCCGCGCCGTGTCCGGCCCTACAGCCG
 -2 V A K G E A D R Q E L M T D A L A R C L G P I D A

19351 GTCGGTTTCCAGGTCCGGGGTATAGAGCAGAACCAGGTGTGGCATGGGGCCCTCTCGGTGAGGGGGCGGTGGCC
 CAGCCAAAGTCCAGCCCCATATCTCGTCTTGGTCCACACCGTACCCCCGGAGGAGCCACTCCCCGCCGACCGG
 -2 D T E L D P T Y L L V L H P

← *hpaF*

19426 ACCCGCCAGGGCGACCAGCCGCGAACGGGTGGGTACAGCGCGTGGTGGGCACCCAGCGCGCGGGTGGCGGC
 TGGGGGTCCCGCTGGTCCGGCGTTGCCACCCAAATGTCCGCCAGCACCCCGTGGTGGCGCCCAACCGCCG
 -2 L R S T P V V A A P N A A

19501 CTGGGCAGCGGGATGGCACCACCGTCCCTGCGGGGTGACCGGGAAGATCGCGTTGATCTGGCCGGTGCCGGAAGA
 GACCCGTGCCCTTACCCTGGTGGCAGGACGCCCCACTGGCCCTTCTAGCGCAACTAGACCGCCACGGCCTTCT
 -2 Q A A P I A G G D Q P T V P F I A N I Q G T G S S

19576 GCCGAAGTAGGGCGTGACCACTTCGGCCTTGGCGTTCGTAATCGGACCAGCCAGCGCACCCAGCAGCATTGCCGT
 CGGCTTCATCCCGCACTGGTGAAGCCGGAACGGCAGCATTAGCCTGGTCCGGTCCGCTGGGTGCTCGTAACGGCA
 -2 G F Y P T V V E A K G D Y D S W G L A G L L M A T

19651 GTCGTGCATGAAGCCTTACCGTGGCCTTGGCGGCGTACTCCGGCAGCATCCCGCAGAACGCTTCCCACTCGCC
 CAGCAGTACTTCGGAAGTGGCACCAGGAAACCGCCGATGAGGCCGTGCTAGGGCGCTTGGCAAGGTGAGCGG
 -2 D H M F G E G H G K A A Y E P L M G C F A E W E G

19726 GTCCTGCCACATTTGCACCACCGGTGGTCCGAGGGTTTCGAGGAACGGGCTCCACACCTTGGTGGCAAAGTCCGG
 CAGGACGGGTGTAACGTGGTGTGCCACCAGCTCCCAAAGCTCCTTGCCCGAGGTGTGGAACCACCGTTTCAGGCC
 -2 D Q W M Q V V R H D L T E L F P S W V K T A F D P

19801 CGCCTGGCCGTTCTGCGCGAAGCGGTGCGACAGCGAGCCGCTGGCCAGGAACGCCAGGTGCGCTGATGTTGTC
 CGGACCGGCAAGACGCGCTTCGCCACGCTGTCGCTCGGCGACCCGCTTGGCGGTGCCACGGCAGCATCACCAG
 -2 A Q G N Q A F R H S L S G S A L F A V T G D Y H D

19876 TTCTACTGCCTTGCGCATGGCCCAGCCAGCGGGGCACTGTGCGCCAGGTAGTGGCAGGTGCACAGGGCCGAGAC
 AAGATGACGGAACGCGTACCAGGTCCGGTCCGCGGTGACAGCCGTTCCATCAGCTCCACGTGTCCCGGCTCTG
 -2 E V A K R M A W G L R A S D A L Y H S T C L A S V

19951 CGAGACCACTTTGAAGTGTGGTCCCTGGTTCATGTAGCGCATGGGCACCAGGGTGGCCTATTCGGGGCGAGGGT
 GCTCTGGTGAACCTCAGCACCAGGACCAAGTACATCGCGTACCCTGGTCCCACGGCATAAGGCCCGCTCCCA
 -2 S V V K F H Q D Q N M Y R M P V L T G Y E P A L T

20026 GGTGGCGTGGTGGCCATGGTTTCGACGTTGAAGCGGTTGCACTCCTCGGCCAGCAGCTTGCCAGCTCGGGATT
 CCACCGCACCCCGGTACCAAGCTGCAACTTCGCCAAGTGGAGAGCCGGTCCGTCGAACGGGTGCGAGCCCTAA
 -2 T A H H A M T E V N F R N C E E A L L K G L E P N

20101 GCCGGGAATGCGTAGGGCATGTTGCTGATGAAGTGGCGGCACTTGGTGTGCTGATACACGCCCTCGAAATGCGG
 CGGCCCTTACGCATCCCGTACAACGACTACTTCACGCCGTCAAGCAACGACCATGTGCGGGAGCTTTACGCC
 -2 G P F A Y P M N S I F H P L E N S T Y V G E F H P

20176 CCCGCACAGCAGTGGTAGTTGGCGTTGACCAGCCAGTGGTGTGCGAACACGACGATGGTGTCCACGCCAGCTC
 GGGCGTGTGTCGACCATCAACCGCACTGGTCCGTCACGCACAGCTTGTGCTGCTACCACAGGTGCGGGTCCGAG
 -2 G C L V H Y N A N V L W H T D F V V I T D V G L E

20251 ACGGCAACGGCGGCTGATTTGCTGATGCCCGTGCATGGCCGCTGGCGAAAGCCTTGGCGCGGGCTGGCAGTTC
 TGCCGTTGCCCGGACTAAAGCACTACGGGCAGCTACGGCGGACCGCTTTCGGAACCGCGCCCGGACCGTCAAG
 -2 R C R R S I E H G D I A A Q R F G Q R P G P L E

20326 GGACATGTACATGGACGGTACATGGGTAATCTTGGCAGTGAGAGCGAGTTTGGCCATGGGGGTCTCCGATAAGAC
 CCTGTACATGTACCTGCCATGTACCCATTAGAACCGTCACTCTCGCTCAAACGGGTACCCCCAGAGGCTATTCTG
 -2 S M Y M S P V H T I K A T L A L K G

← *hpaD*

20401 GCTGTGTTGTTTTGGGGCTGACCCGGTCCCTTGTAGGAGCGGCTTGTCCGGGATGGGGCGCACAGCGGCCCC
 CGACAACAACAAACCCGACTGGGCCAGGGAACATCCTCGCCGGAACAAGGCCCTACCCCGCTGTGCGCGGGG

20476 GCGCATATCTGCGCGAGGCTGAAATCCAGGGGCGCTGCGCGCCCATCGCGGGCACAAAGCCGCTCTACACC
 CCGCTATAGACCGCTCCGACTTTAGGTCCCGCGCAGCGCGGGGTAGCGCCGTTTCCGCGGAGGATGTGG

20551 CCGGGCGGTGTAACCGCACAGAGGGTTAGATGCCCCAGCGAGGAATGTGGTATTACCCATGGAATAACACAGT
 GCCCGCCACATTTGGCGTGTCTCCCAATCTACGGGGTGGCTCCTTACACCACTAATGGGTACCTTTATGTGTGCA
 -1 I G W R P I H H N G M S I C V N

20626 TCTTGATCTCTGCAAAGACCTCGAAGCTGTACTGCCCGCCCTCACGCCCGGTACCGGAACCTTTCACGCCGCCGA
 AGAAGTAGAGACGTTTCTGGAGCTTCGACATGACGGGGGGAGTGGGGCCATGGCCTTGGAAAGTGGCGGGCT

ES 2 364 110 A1

-1 K I E A F V E F S Y Q G G E R G T G S G K V G G F

20701 ACGGCTGGCGCAGGTCGCGTACGTTCTGGCTGTGTGATGAACACCATGCCGGCCTCGATGCCACGGGCCAGGCGAT
TGCCGACCGCGTCCAGCGCATGCAAGACCGACAACACTACTTGTGGTACGGCCGGAGCTACGGTGCCTGGTCCGCTA
-1 P Q R L D R V N Q S N I F V M G A E I G R A L R H

20776 GGGCTTTGCCGATGTCCTGGGTCCAGATGTACGAGGCCAGGCCATACTCGGTGTCGTTGGCCAGTTGCAGCGCCT
CCCCAAACGGCTACAGGACCCAGGTCTACATGCTCCGGTCCGGTATGAGCCACAGCAACGGTCAACGTCGCGGA
-1 A K G I D Q T W I Y S A L G Y E T D N A L Q L A E

20851 CGGCTTCGTCCTTGAACGGGATCAGGCACACCACCGGGCCAAAGATTTCTTCTGGGCAATGCGCATCTTGTGTG
GCCGAAAGCAGGAACCTGCCCTAGTCCGTTGGTGGCCCGTTTCTAAAGAAGGACCGGTTACGCGTAGAACAA
-1 A E D K F P I L C V V P G F I E E Q A I R M K N N

20926 TCACGTCCGCGAATACGGTGGGCTGGATGAAGTCCCTTGGCCAGGTGCGCAGGCAGGTTGGCCGGGCGCTCCA
AGTGCAGCCGCTTATGCCACCCGACCTACTTACGCGGGAACCGGTCACGCGTCCGTCACCGCCGCGGAGT
-1 V D A F V T P Q I F Q G K A L H A P L N A P R E L

21001 GGCCCCGCGCACCAGGCGTGCACCTTCTTCGATGCCAATGCGGATGTACCCGGTGACCTTGTGCATAGTGTGCT
CCGGGGGCGCTGGTCCGACGTGGAAGAAGCTACGGTTACGCTACATGGGCCACTGGAACAGTATCAGCAGCA
-1 G G A V L R A G E E I G I R I Y G T V K D Y H Q Q

21076 GGGTGTATCGAACCACCTGGGTTTTCGGGTCCGGTCCGGTACCTACGATCAGGCGCTTGGCGCGCGCCGCAA
CCCACTAGTAGCTTGGTGGACCCAAAAGCCAGCCAGCCAGTGGATGCTAGTCCGCGAACGCGCGCGCGCTT
-1 T I M S G V Q T K P D T P D G V I L R K A R A A F

21151 ACTCTGCGACAACTGCGGGTACACGCTTCTTCCGATGAAGATGCGGCTGCCGGCGGTGCAGCGCTCGCCGTTCA
TGAGACGCTGTTTACGCGCCATGTGCGAAAGGACCTACTTCTACGCCGACGGCCGCCAGTCCGCGAGCGCAAGT
-1 E A V F Q P Y V S E Q I F I R S G A T C R E G N L

21226 GCGAGAAGATGGTGAACAGCGCGCGTCCAGCGCAGCTCAAGGTCTGCGTCTTGAAGATCAGCACGGGCGACT
CGCTCTTCTACCACTTGTGCGCGCGCAGGTGCGGTGCGAGTTCCAGACGCGAAGCTTCTAGTGTGCGCGCTGA
-1 S F I T F L A A D L A R E L D A D E F I L V P S K

21301 TGCCGCCAGTTCATCGAGTACTTTTTAAGGCTTGGGCTGTCATGATCTTCTTCCGGTGGCGGTACCGCCGG
ACGGCGGGTCAAGGTAGCTCATGAAAAATTCCGGACGCCAGACGCTACTAGAAGAACGCCACCGCCATGGCGGCC
-1 G G L E M S Y K K L G A T Q M I K K G T A T G G T

21376 TGAAGGAAATGGCGCGCACATCGGGTGGCGGACAGGGCATCGCCGGCGGTAGCGCCGTAACCTGGATCACGT
ACTTCTTTTACCGCGGTGTAGCCCCACCGCTGGTCCCGTAGCGCGCCCATCGCGCATTGGGACCTAGTGA
-1 F S I A R V D P H R V L A D G A T A G Y G Q I V N

21451 TCAGCACCCCGTTGGGGATGCCGGCTTCTACCGCCAGGCGGCCAGTTCGTTGGCGGTGAGAGGCGACAGCTCGC
AGTCTGGGGCAACCCCTACGCGCAAGATGGCGGTCCGCGGGTCAAGCAACCGCCAGTCTCCGCTGTGAGCG
-1 L V G N P I G A E V A L R G L E N A T L P S L E S

21526 TCATCTTCAGCACGGCGGTGTGCCAGCGCCAGGCACGGCGCAGTCTTCCAGGTAGCCGTCATGAACGGCACGT
AGTAGAAGTCTGCGCCACACGGGTGCGGTCCGTCGCGGTGCGAGGTCCATCGGCAGTACTTGCCTGTGCA
-1 M K L V A T N G L A L C P A T K W T A T M F P V N

21601 TCCATGGGCTTACCAGGCCGACACACCCACCGCTGGTACAGGTTGAGTTCGATCTGGTCTGACCGGGT
AGGTACCCGAATGGTCCGGCTGTGTGGGTGGCCGACCATGTCACATCAACTCTAGACCAGCAGCTGGCCCA
-1 W P S V L G C V G V P Q Y L T Y N L M Q D D V P Y

21676 AGGTATGGCCGTCATGCGCGTGCACACTTCGGCGAAGAAGTCAAGTTGTGCGAGGCACGCGGGATCAGCACGT
TCCATACCGGCAGGTACGCGCACGTGTGAAGCCGCTTCTTACGCTTCAACACGCTCCGTCGCCCTAGTCTGTGCA
-1 T H G D M R T C V E A F F D F N H S A R P I L V N

21751 TCTTGGTCTGGTGGATCGGCAGGCCGTTGTCGAGGGTTTCCAGCTCGGCGAGTTTCGGCACGTTCTGCTCAATCA
AGAACCAGACCACCTAGCCGTCCGGCCACAGCTCCCAAAGGTGAGCCGCTCAAAGCCGTCGAAGACAGCTAGT
-1 K T Q H I P L G T D L T E L E A L K P V N Q E I L

21826 GCTCACCCAGCTTGGCATCAGCCGGGACGTTCTTGGCCGGGGTGTGGCCCACTGGGGGAGGGCTTCTCTGG
CGAGTGGGTGCAACCGGTAGTCCGGCCCGTCAAGGAACCGGCCCAACCGGGTGAACCCCTTCCGAAGGAACC
-1 E G L K R M L R A R E K A P T N A W K P F A E K A

21901 CCGCAGCCACAGCCTGGGCCACTTCTCGGCGCCGCGCTGGCGACTTCGCAGATGGCGTCCGCGGTGGCCGGT
GGCTCGGTGTCGGACCCGTTGAAGGAGCCGCGCGCGGCGGCTGAAGCGTCTACCGCAGCGCCACCGCCCA
-1 A A V A Q A V E E A G G S A V E C I A D G T A P N

21976 TGTAGTTGACGAAGGTGCTTTGCTCTCGACCTCACGGCCGTTGATCCAGTGTGATCATGCTGCTCATGCCTT
ACATCAACTGCTTCCACAGAAACGAGAGCTGGAGTCCGGCAACTAGTACGAACTAGTACGAGGATACGGAA
-1 Y N V F T D K S E V E R G N I W H K I

ES 2 364 110 A1

← **hpaE**

-2
 22051 GTTGTTCCTGAAGAAGTCAGCTTCGCTGACGATACGGTTGACCAGGCGACCGACGCTTCCACTTCCACCACCAC
 CAACAAGAACTTCTTCAGTCGAAGCGACTGCTATGCCAACTGGTCCGCTGGCTGCGGAAGGTGAAGGTGGTGGTG
 -2 N N K F F D A E S V I R N V L R G V G E V E V V V

22126 TTCGTCAACCCGGCACCACATCGGCCAGGCTTCTGGCGTGCCGGTGGCGATCATGTGCGCCGGTTGCAGGGTCAT
 AAGCAGTGGGCGTGGTGTAGCCGGTCCGGAAGACCGCACGGCCACCCTAGTACAGCGGGCCAACGTCCAGTA
 -2 E D G P V V D A L G E P T G T A I M D G P Q L T M

22201 GAAGCTGGAGAAGTATTCGATGAGGTGCGGGATGTGCAAGATCATGTCCGCGGTGGTGCCTTCTGCTTCAGCTC
 CTTGACCTCTTCATAAGCTACTCCACGCCCTACAGCTTCTAGTACAGCGGCCACCACGGAAGGACGAAGTCGAG
 -2 F S S F Y E I L H P I D F I M D A T T G E Q K L E

22276 ACCGTTGATCCAGGTGCGCAGCTTCAGTTGCTGACGCTTGGCACATCGGCCGCATCGACGATCCACGGGCGCAC
 TGGCAACTAGTCCACGCGTGAAGTCAACGACTGCAGACCGTGTAGCCGGGTAGCTGCTAGGTGCCCGGCTG
 -2 G N I W T R L K L N S V D P V D A A D V I W P G V

22351 CGGGGTGGTGGCATCGCGTTTTTCCACCCGAGGTTGGGGCGGTAGTAGTTTTCCAGGTAGTCGCGGATGGCGTA
 GCCCCACCACCGTAGCGCCAAAAGTGGGCGTCCAACCCCGCCATCATAAAAGTCCATCAGCGCTACCAGTA
 -2 P T T A D R N K V R L N P R Y Y N E L Y D R I A Y

22426 GTCGTTGCACACGGTGTAGCCGGCAACGTAGGCCAGGGCGTCTCACGCTTGACGTTCTTCGCCGCTTTGCCGAT
 CAGCAACGTGTGCCACATCGGCCGTGCATCCGGTCCCGCAGGAGTGCGAAGTCAAGAAGCGGCAACGGTA
 -2 D N C V T Y G A V Y A L A D E R K V N K A A K G I

22501 CACCGCCACCAGCTCGCACTCGTAGTGCATGTATTGACGTTGTCGGGGCGCCAGGTGACCTGGATGTGGCCGGT
 GTGGCGGTGGTTCGAGCGTGCATCACGTACATAAGCTGCAACAGGCCCGCGGTCCACTGGACCTACACGGCCA
 -2 V A V L E C E Y H M Y E V N D P R W T V Q I H G T

22576 GTAGGTGCCTGGCGACTTGATGAAAGCCAACGGTTCGGTGGGGCGCGGAAGGCCAGTCCCTGGCGTGGTGGC
 CATCCACGGACCGTGAACACTTTTCGGTTGCCAAGCCACCCGCCGCGCTTCCGGTTCGAGGACCGCACAGCGG
 -2 Y T G P S K I F A L P E T P P A F A L E R A H D A

22651 GTAGTTCAGGCCAGGGCGAACATGCTGCCGGTGGCGGGTGGCAGCCAGGTGACCTGGTCCCTGATGGACCAGGGC
 CATCAAGTCCGGTCCCGCTTGTACGACGCCACCGCCACCGTCCGGTCCACTGGACAGGACTACCTGGTCCGC
 -2 Y N L G L A F M S G T A P P L W T V Q D Q H V L R

22726 GCCGTCCGCAAGGCGCAGGTGATCGTCTTCGACCGTGACATCGTGGGCCTGGCCGTCGAAGTGGATACGGGCGTG
 CGGACGCCGTTCCCGCTCCACTAGCAGAAGCTGGCACTGTAGCACCCGGACCGGCAGCTTGACCTATGCCCGCAC
 -2 G D A L R L H D D E V T V D H A Q G D F Q I R A H

22801 TTTACAGGTAATTCCTCACTCGGCGACGATGTGGTTGGTTCAGCTTGCCAGGCCGTCGATCTCGATGTCGACGC
 AAAGTGTCCATTAAGGAGTGAGCCGCTGTACACCAACCAGTCAAGCGGTCGCGGACGCTAGAGCTACAGTCCG
 -1 E A V I H N T L K G L G D I E I D V R
 -2 K

← **hpaG2**

22876 GGTACCTGGCTGTACATCGACGCGGCCCTCGGGGTTCCGGTGTGATCAGGATGTCCGGCGGTGCAGGGTCATGA
 CCGTGGACCGACATGTAGCTGCGCCGGAGCCCCAAGGCCACTAGTCTACAGCGGCCGACGTCACAGTACT
 -1 D G P Q V D V R G E P T G T I L I D G A H L T M F

22951 ACTCGTGTATTCGGCAATCAGCTGCGCCACCGTGCCTGACGAGTGGCGGTGTTGTTGTGCTGGCGCAGTTCGC
 TGAGCGACTAAAGCCGTTAGTCGACGCGGTGGCAGCATCGCTCAACCGCCACAACAACAGCAGCCGCTCAAGCG
 -1 E S I E A I L Q A V T R V C N A T N H Q R L E G

23026 CGTTACATACAGGCGCAGGCCAGGGCATCGGGGTTGGCCACTTGGCTGGCGGGCACCAGTTCAGGGCCGACCG
 GCAAGTGTATGTCGCGTCCGGTCCCGTAGCCCAACCGGTGAACCGCCCGCTGGTCAAGTCCCGCTGGC
 -1 N V Y L R L G L A D P N A V Q S A P V L E P V P

23101 GGCAAAAACCATCACGGCACTTGGCCTTGACTGCAGGGCGGTAGTAGCTGGCTTCGGGCAGGCTCACTTCGTTGA
 CCGTTTTTGGTAGTGCCGTGAACCGAAGTACGCTCCCGCCATCATCGACCGAAGCCCGTCCGAGTGAAGCACT
 -1 C F G D R C K A K V A P R Y Y S A E P L S V E N V

23176 CGATGGTGTAGCCCGCCACATGCTCCAGGGCATCGGCCACGCTGACGCGGTGGCGTCCCTTGCCAAATCACCACTC
 GCTACCACATCGGGCGGTGTACGAGTCCCGTAGCCGGTGGCACTGCGCCGACCGCAGGAACGGTTAGTGGTGG
 -1 I T Y G A V H E L A D A V S V R S A D K G I V V G

23251 CCAGCGCCGGGCGGGTTGCACGCGCTGCACGCGGCCGGGAATACCACCTGGCCTTCATGCTGGTGGCGGGTGT
 GGTCCGCGCCCGCCCAACGTGCGGACGCTGCGGCCGGCCCTTATGGTGGACCGGAAGTACGACCAACGCCACA
 -1 L A P G P Q V R Q V G A P F V V Q G E H Q N R T N

23326 TCGGGTCTTGACGAACAACACCGGCTTGACCGGCGAGTGTCTTGTACGGTGTCCACGAACCGCGCTTGGTGTCT
 AGCCCCAGAAGTGTGTTGTGGCCGAAGTGGCCGTCAACGAACATGCCACGAAGGTGCTTGGCGGCAACACGA

ES 2 364 110 A1

-1 P T K V F L V P K V P L Q K Y P A E V F A A Q H Q

23401 GCTGCAGCAAACCTGGTAGTTCAGCGCGACGCCGAACAGGGTGCCGCTGGCAACGTCAAGCAGGGCATGGCTCA
CGACGTCGTTTGGACCATCAAGTCGCGCTGCGGCTTGTCCCACGGCGACCGTTGCAGTTCGTCCCGTACCGAGT

-1 Q L L G Q Y N L A V G F L T G S A V D L L A H S **hpaG1** ←

23476 TGCTCTTCTCCTGGCAGTGCAGGGCGGTGGCCGCTCTGCGGATTTTCGTTAATGTGTTAATGTTATAGTTAATATG
ACGAGAAGAGGACCGTCACGTCCCGCCACCGCAGGACCGCTAAAGCAATTACACAATTACAATATCAATTATAC

23551 TTAACGATGGTCAAGGGGTGGCCAGTGGCGCCTGCCGGCAAGGCACCATGGGCCATCGTCAACAGGGTCA
AATTGCTACCAGTTCGCCACCGGTACCGCGGACGGCCGTTCCGTTCCGTGGTACCCGGTAGCAGTTGTCCAGT

hpaA →

+2 **S** D R H P I P N I N I G Q V Y D Q

23626 AGCGATTTGCGAGCAAGCAGCCATGAGCGACCGGCATCCGATACCGAACATCAACATTTGGCCAGGTTTACGACCA
TCGCTAAACGCTCGTTCGTGCGTACTCGTGGCCGTAGGCTATGGCTTGTAGTTGTAACCGGTCCAATGCTGCT

+2 R Y S D S E V H Y D R L G N L A G F F G R N M P V

23701 GCGTACAGCGACAGCGAGGTGCATTACGACCGGCTGGGCAACCTGGCGGGCTTTTTCGGGCGCAACATGCCGGT
CGCGATGTCGCTGTGCTCCACGTAATGCTGGCCGACCCGTTGGACCGCCGAAAAAGCCCGGTTGTACGGCCA

+2 H R H D R F F Q V H Y V K S G T V R V Y L D D Q Q

23776 GCACCGCATGACCGGTTTTTCCAGGTGCATTACGTGAAGTCGGGCACAGTACGGGTGTATCTGGATGACCAGCA

+2 Y I E A G P M F F L T P P T V A H A F V T E A D S

23851 GTACATCGAGGCCGGCCGATGTTCTTCTCACGCCACCCACGGTGGCGCACGCGTTCGTACCCGAAGCTGACAG
CATGTAGCTCCGGCCCGGTACAAGAAGGAGTGCAGTGGGTGCCACCGCGTGCAGCAAGCAGTGGCTTCGACTGTC

+2 D G H V L T V R Q Q L V W Q L I E A D A S L L P A

23926 CGACGGGCATGTGCTGACGGTGCGCCAGCAACTGGTGTGGCAATTGATCGAAGCCGACGCCAGCCTGCTGCCGGC
GCTGCCCGTACAGACTGCCACGCGGTGCTTGACCACACCGTTAACTAGCTTCGGCTGCGGTGCGACGACGGCCG

+2 G M Q V Q P A C V A L G N L P A E Y K A E A Q R L

24001 GGGCATGCAGGTGCAGCCAGCCTGTGTGGCGTGGGCAACCTGCCGGCCGAATACAAGCCGAGGCGCAGCGCCT
CCCGTACGTCCACGTGCGTCCGACACACCGCGACCCGTTGGACGGCCGGCTTATGTTCCGGCTCCGCGTCCGCGA

+2 Q G W L D A L S D E F A T Q Q P G R E A A L Q S L

24076 GCAAGGCTGGCTGGACGCGTGTAGTGACGAGTTTGCACGCAAGCAACCGGTCGCGAGGCGGCGTTGACGTGCT
CGTTCCGACCGACTGCCAATCACTGCTCAAACGGTGCCTGCTTGGCCAGCGCTCCGCGCAACGTCAGCGA

+2 T R L I M I S L L R L C P N S L E S T P A R H E D

24151 GACCCGCTGATCATGATCAGCCTGCTGCGGCTGTGCCCCAACTCGCTGGAATCGACCCCGGCGGCGCATGAAGA
CTGGGGGACTAGTACTAGTCGGACGACGCCGACCGGGTTGAGCGACCTTAGCTGGGGCCGCGCGTACTTCT

+2 L K I F H R F N A L I E A H Y L E H W P L A R Y A

24226 CCTGAAGATCTTCCACCGTTTCAATGCCCTGATCGAAGCGCATTACCTTGAGCATGGCCGCTGGCCCGTACGC
GGACTTCTAGAAGGTGGCAAAGTTACGGGACTAGCTTCGCGTAATGGAACCTGTAACCGCGACCGGGCGATGCC

+2 Q Q I G V T E A R L N D V C R R I A D L P S K R L

24301 GCAGCAGATTGGCGTGACCGAGGCACGGCTGAACGATGTGTGCCGCGCATCGCCGACTTGCATCCAAGCGCCT
CGTCGTCTAACCGCACTGGCTCCGTTGCCGACTTGCTACACACGGCCGCTAGCGGCTGAACGGTATGTTCCGCGA

+2 V L E R L M Q E A K R L L L F S G S T A N E I C Y

24376 GGTGCTGGAACGGCTGATGCAGGAGGCCAAGCGTTTGTGCTGTGTTTTCCGGCAGCACGGCCAACGAAATCTGTTA
CCACGACCTTGGCGACTACGTCTCCGGTTCGCAACGACAACAAAAGCCGCTGCTGCCGGTGTGCTTTAGACAAT

+2 Q L G F K D P A Y F S R F F N R Y A K L T P G E Y

24451 CCAGTCCGGCTTCAAGGATCCGGCCTATTTAGCCGCTTCTTCAACCGCTACGCCAAGCTCACACCCGGGGAGTA
GGTCGAGCCGAAGTTCCTAGGCCGATAAAGTCGGCAAGAAGTTGGCGATGCGGTTTCGAGTGTGGGCCCTCAT

+2 R Q R Q A E L Q **hpaR** →

24526 CCGCCAGCGGCAGGCAGAATTGCAGTGAATGGCCATGGCGGCTCACCCGGGTGCTGTTGTTGTTTACAGCGGAT
GGCGGTCGCCGTCCTTAACTCACTTTACCGGTACCGCCGAGTGGGCCACGACAACAACAATGTCCGCTA

24601 GGTCCGACCCCGCGCCGGCTTGAATGGTTTTCCGTTGGAACAGATTGCACTTCCATCGTGCATGCCCTTAA
CCAGCGTCCGGCGCGCCGCGCAACTTACCCAAAAGCCACTTGTCTAACGTGAAAGGTAGCAGTACGGGAATT

+2 **T** K T Q P S L T L S L L Q

24676 ATTCGTGAATTGAGAAAAGCCACAGGTTTACCATGACCAAGACGCAACCTTCGCTCACGCTAAGCCTGTTGCA
TAAGCACTTAACTCTTTTCCGGTGTCCAACTGCTACTGGTTCGCGTTGGAAGCGAGTGCAGTTCGGACACCT

ES 2 364 110 A1

+2 A R E A A M A F F R P L L N Q H D L T E Q Q W R V
24751 GGCCCGAGAAGCCGCGATGGCATTTCAGGCCGCTGTTGAACCAGCACGACCTGACCGAGCAGCAATGGCGGGT
CCGGGCTCTTCGGCGCTACCGTAAAAAGTCCGGCGACAACCTGGTCGTGCTGGACTGGCTCGTCTACCGCCA

+2 I R I L K Q H G E L E N Y Q L A E L A C I L K P S
24826 AATCCGCATCCTCAAGCAGCACGGCGAGCTGGAGAATTATCAGTTGGCGGAACCTGGCCTGCATCCTCAAGCCGAG
TTAGGCGTAGGAGTTCGTGCTGCCGCTCGACCTCTTAATAGTCAACCGCCTTGACCGGACGTAGGAGTTCGGCTC

+2 M T G V L G R L E R D G L V R R Q K A A Q D Q R R
24901 CATGACCGGGTACTGGGGCGCCTGGAGCGAGACGGGCTGTTGCGGCGGAGAGGCCGCGCAGGACCAGCGACG
GTACTGGCCCCATGACCCCGGGACCTCGCTCTGCCGACCACGCCCGCTCTTCGGCGCGTCTGGTCGCTGC

+2 V F V S L T E R G E A C F A S M K E G M E A N Y Q
24976 GGTGTTTCGTCAGCCTGACCGAAAGAGGGGAGGCGTGCTTGCCTCGATGAAGGAAGGCATGGAGGCCAACTACCA
CCACAAGCAGTCGGACTGGCTTCTCCCTCCGACGAAACGGAGCTACTTCTTCCGTACCTCCGGTTGATGGT

+2 K I Q A Q F G E E K L Q Q L M G L L N D L K R I A
25051 GAAGATTCAGGCGCAGTTTGGTGAAGAGAAGCTGCAGCAGCTGATGGGTTGTTGAATGACCTGAAGCGCATCGC
CTTCTAAGTCCGGTCAAACCACTTCTCTCGAGTCGTCGACTACCCCAACAACCTACTGGACTTCGGGTAGCG

+2 P ■
25126 GCCATAA
CGGTATT

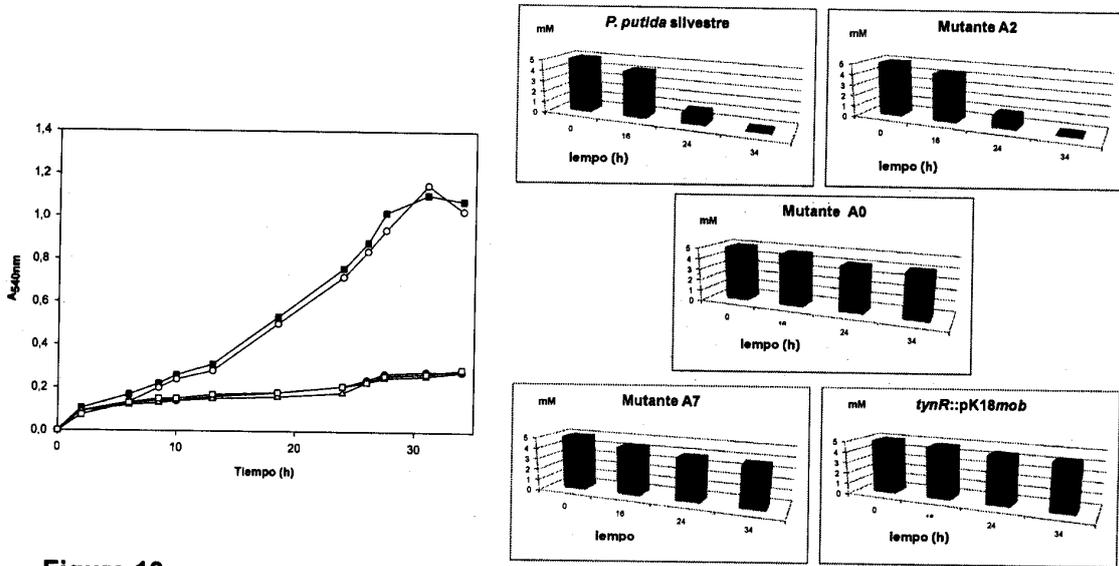


Figura 10

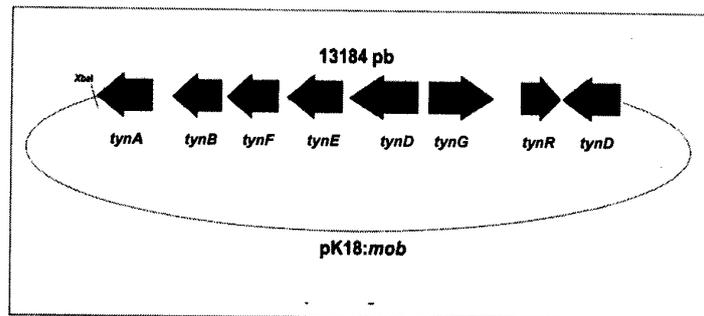


Figura 11

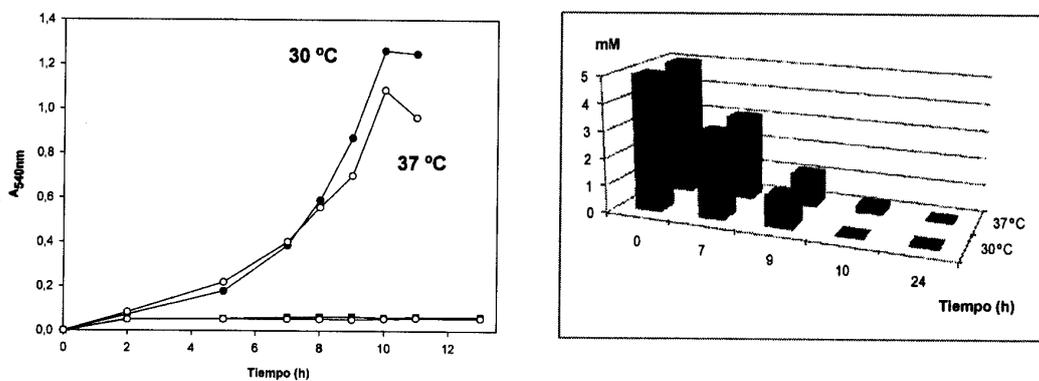


Figura 12

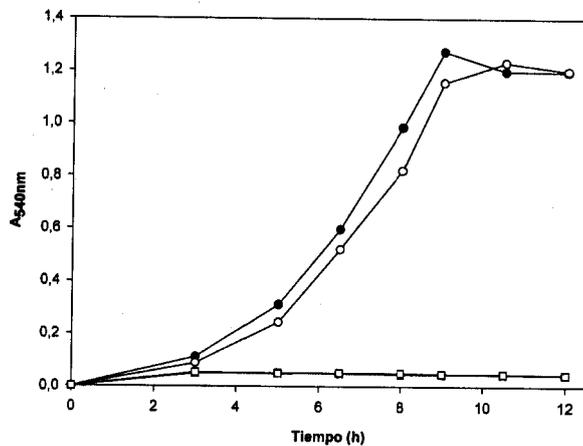


Figura 13

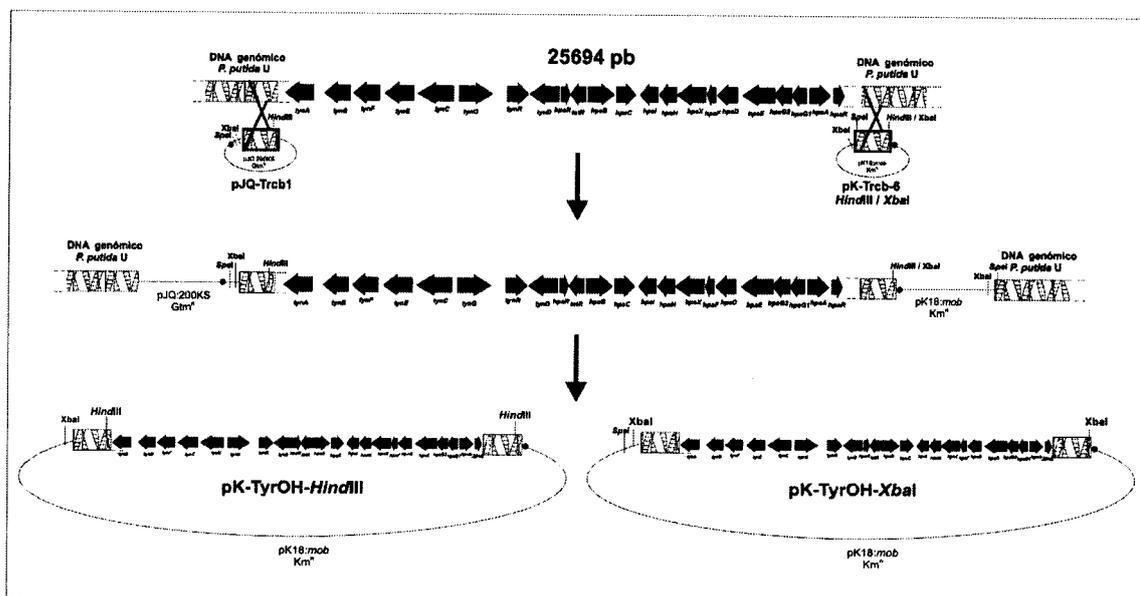


Figura 14

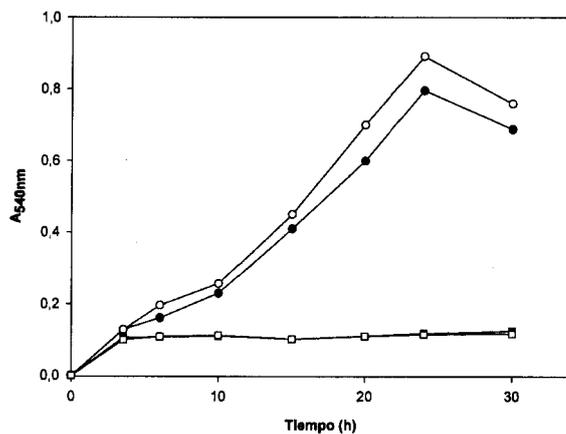


Figura 15

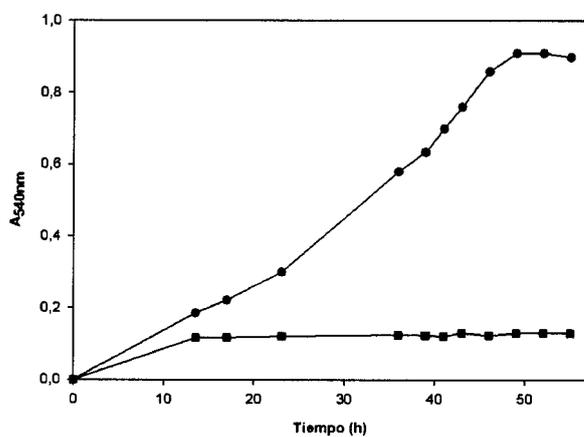


Figura 16

ES 2 364 110 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BIOGES STARTERS S.A.

5 <120> PROCEDIMIENTO PARA ELIMINAR TIRAMINA Y DOPAMINA DE DIFERENTES FUENTES

<130> P-100764

10 <160> 45

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 25132

<212> DNA

20 <213> *Pseudomonas putida* U

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (1)..(25132)

<223> Secuencia que contiene los cluster tyn y hpa

<400> 1

```
30   tcagggcгаа  cgctcгааgс  ggtaсggtgа  cgggtсgаtс  агсggggtgг  сctgggссac      60
   caggctctgсс  gccagctggс  cagcagсagg  сgaggtgссg  аagccatgсс  сggaaaagсс      120
   ggtggссagg  gtcaggсссg  gaatactggс  сaccgggссg  atgaccgggt  tggagtcggg      180
   ggtgacgtca  atcgtgссгг  ссcaggгсgt  ggcgatacгг  gсctgttcга  асaccggгсca      240
   ggссgсtttc  aggttgсгca  tggсctсgtс  gttgaggгсс  gggttggсgt  gсgggtcttg      300
35   taccсgtaca  сgctcгааgг  gggttacatс  сgttgсcttc  cagcгссггг  ссaggгссag      360
   gtccttгааg  аagtaсttgс  сaaagctgаt  gсgсaaaaag  tсссgctggg  сacгсagctg      420
   gggсaggtaa  сgcttgссca  cagcagggtg  atcгagggtg  аaggaaaat  сtggtgсгсс      480
   гсгctgggtg  atgаtgtagс  сgссgtсctt  gtgcttgсгг  аaggaaaat  сtggtgсгсс      540
40   сagggсgatg  tcggttggсс  сgtссatggg  сtctgtgсгс  агсacггaac  агgtcagсгг      600
   caaggtcggс  aggttgatgс  ссaggttgсс  gaggaaсttg  сгсgaccaca  ggссaccггс      660
   сagcaacacc  tggtcгсgаc  ggatttcacc  ttgtсгgtg  accacсссгс  tgacacггсс      720
   ggctгсгgtg  accagсgtgс  gсaccгсгca  gttctсcaсt  accactgсac  сtttgгсgat      780
   сгссгсссгг  gсgatggгсг  tggсггссag  ggtсгgttg  gсгсggгсgt  сгgagggggt      840
45   gaagatgсca  сctgссcaat  сгсссгacc  accгггсacс  atссgggtgа  tttсссгсgt      900
   gctcagсagg  сгсgаatсca  ggссcagсгс  сtcгacгctt  ttcagссagс  сttcatgсat      960
   gcccatctgс  gtgtсgttac  ggссgatgaa  catgatgссg  gcttgссgat  агсcaacгtc      1020
   gctgсcaacc  сgtгсгggгca  tctгггссca  сagссgatca  gсггссagtg  ссaggggaat      1080
50
   gtcатggггг  tggгсгgttg  tcttgгсгсac  ссagсссagg  ttgггггagс  actgctсссс      1140
   агсgatgггс  ссcttctсca  gсaccaccac  сggtatggtg  сgttgгггga  ggctcagtgс      1200
55   ggсгgtgagg  сгgataatgс  сгссaccgat  gatcaccacг  gtagtggгgt  сggggtgггг      1260
   ggtgctggtt  tgсacaggгг  сgatсgtggg  агacatgggt  ttactctttg  ttgtgгgtgс      1320
   агggggagtг  ttcagгссca  gссcagггс  tсactggгca  агgсggatca  gggtcacttg      1380
   сгcttgсссс  gсaccггgt  аггсggtgac  сtcсagctгс  асcttgtaaa  сggtgгagсс      1440
   сagгггггг  сaggtgaccг  tggtgгссгг  gtсgatgссг  сggaacttct  сгссgatсac      1500
60   gtссatgacc  сgtggtagat  сggсagggtс  сtggatgaac  агсгсгagt  tgatgacatс      1560
   ggссaggctg  gсatггactg  сggссagгсг  ggtttсgatg  ttggггaacа  сctggtgгgt      1620
   сtgttсgatg  агgtсctctg  gaatgacctg  ggtctгсггг  ttgгггсгг  сgggtgttgga      1680
   gacgtgаatс  сagttgtсca  сггссaccag  gсgggagtгг  сtgгссatgg  сttгgаactt      1740
   ggagссгgtt  ttcagtttgа  tgatctgtgt  сatggгcttt  gсcttgttat  сгggttгггг      1800
65   ggatcagctg  агaacggggг  tttсссagag  gttgagcttt  агсссgatgс  сttgctггag      1860
   сгсcttgггг  tacaccagгг  tgссссaggс  сacgtcttcг  агсggгсatgс  сгсссaccga      1920
```

ES 2 364 110 A1

	catcaggatg	atctcgtcgt	catgcaggcg	gcccgggtgcg	tgcgcgctga	tgatcttgcc	1980
	gatgtcttcc	acctgctcgg	cggccagcgt	gccttcggca	atcatgtcca	tgaagcgcac	2040
	acctaccagc	ggtacgtggt	tgtgcgcagg	cttgggcagc	tcttcgaacc	aggcctcgta	2100
5	gagggccggtg	ttgtccacca	ccttgccgac	gtcgtcctgc	tccatgccgg	cgtcgatact	2160
	gcacggggct	ggcatggcca	ggaacgcgcc	aggcttgacc	cactcgccgg	gcaccagcgg	2220
	gtactggctg	gggtcgcgga	cttcgcccga	gctgcagtag	ctgaccaggt	cggaaccgcg	2280
	taccacttct	tccagggttt	ccaccacctg	gacatgagtg	atctgcggga	agctggtttt	2340
10	cacccaggcg	acgaaggcat	ccaggttctt	ctggccacgg	cccttgacct	tgagggtgtc	2400
	gatcagcggg	cagacggcca	tgaacgcagc	gaccgtggtc	ttgcccatca	ccccggggcc	2460
	ggccaggccg	atcaccttgg	cgctccttgcg	cgccagggtg	cgggcgccga	cgcccgggat	2520
	ggcgccgggtg	cggtaggccg	acagcaggtt	ggccgacatg	tgtgccagtg	gcgcgcccgt	2580
	gtcggcatcg	ttgagggtga	acatcaggat	cgagcggggc	aggcctttct	cacggttggc	2640
15	gatgttcgag	ccgtaccact	tggcgctgc	ggtctggaag	ttgccgccga	ggtacgccgg	2700
	catcgccatc	atgcgccggt	cggcggtggg	cttgggcatg	ttggggaatg	gcgagtgtct	2760
	ggggaaggta	atcatcgcgc	cgctgcgagtc	gctgttcggg	ccggccatgc	ggtagtacc	2820
	ctggtacagc	aggccgaaca	tttcttccat	ggtgtcgaca	caggccggca	tgtcgggtgac	2880
20	gcccgcacgg	atcatgtcct	gctcggacag	gtagatgaag	tcaattctgg	tatcgagggt	2940
	catggcgggtg	ctcgcagggt	tggctgccc	cctgatttgtt	gttggtttcg	aggcaaccag	3000
	tttcgctaac	gactggtagg	tcgtcttgtg	tctgctgcc	agccgagttg	accgtcagtg	3060
	ccagggtctc	aatggcccgc	gagcgcgag	ctggcccggg	tgtggcgag	gctgagggtg	3120
25	gtcagcaggg	acaccaccag	ggtgcacagg	gccagcagcg	cggcccatgc	ggtcggggcc	3180
	tggttgagta	ccaactgcggc	cagcggggcg	gcgccggcag	acgccgacag	ctggatggcg	3240
	cccagcagcg	ctgcgggtgga	accagtgcc	ttttcttgcg	aggccatcac	cagcgacatc	3300
	agcgtcgact	cggctatccc	caggccgaac	aggctatca	ccatgccgcc	ggccacacct	3360
	ggcagcccca	ggccgggtcag	tgcaccgagc	aggctgatgc	aggcaccgcc	ggccatgcac	3420
30	agcacgcccc	cccaggtcaa	ggtattgagg	cccagccggc	tgatcaggtg	gctggccgtc	3480
	atggcgccga	gcaggatcga	caccccggtg	gcgccaaca	gcaggccgaa	ggcctggggc	3540
	ctcaggccgt	agtgggcctg	gtacaccagg	gtggcaccgc	cgatgtaggc	gaacaggaag	3600
	agaataaccg	cagcaaccgc	cagggtcggg	cgcaggaagc	ggcggtcggc	gaggatggcc	3660
35	aggtagggtg	tgcaggcggtg	gcccaggcgc	aggggttcgc	gtttgctggg	cggcagggtt	3720
	tcgggagaggt	tcagcagget	gttgaccagc	accgtcacgc	ccatgccggc	gagtaccagc	3780
	attactgcac	gccagccgaa	atgtgcgtcg	atcacgccgc	ccagggcagg	tgccaggatc	3840
	ggtgcgacgc	cttcgatggt	catcagcagg	gcgaacagtt	tggtcgcggc	cacgccctgg	3900
	ctcacatcac	gcaccatgct	catgatcacc	accagggtca	gcgcaactgc	caggccctgg	3960
40	aaaaagcgca	gcatgatcag	ggtgtcgagg	ctgggggctg	cggtcgcgcc	cagcgagcac	4020
	aggatgaaca	gcagcagggc	ggccagcagc	ggcttgcgcc	ggccataagc	gtcgcagatg	4080
	gggccaaga	tcagctggcc	ggcgcccctg	gccagcagca	agaaggtcag	tgtcagctgt	4140
	acgcgggtga	agctagcctg	atagtggctg	gcgatttcgg	gcaggctcga	caggtacatg	4200
45	tcgacggcgg	aagggccgag	ggcgccgatc	aggcctaggc	ccagggcgaa	gctgaagggt	4260
	atgggagggg	agggattggc	ttgcatgggt	ttctctgggt	gatttttcgc	ctaccgaccg	4320
	gtaggtttgc	gaatattatt	cgccgagtcg	gccaagggtca	aaccttccg	caaggccact	4380
	gattcctgtg	gggagcgggc	atgcccgcga	acaccggcaa	agccgggtgcc	accgagtcgc	4440
	cttcttcgcg	ggcatgcccg	ctcccacatt	gaccgcagag	gttgggtacc	gtgggttgcgt	4500
50	cagaacggca	cagccacgggt	cagctggcta	tacacattgg	taccattccc	gcccacctgg	4560
	ttgccgccgt	tgctctcgtc	cttgcgcggc	tggtaaaggc	ccaccagcgg	gctgattatc	4620
	aggtgctcgt	tgactgcccc	ttccacatac	aggtccagct	cccgcgcac	gaggttgagg	4680
	cttctgcggg	tgcgtacgggt	gtcgaagtcg	aagtacagcg	cccgcactgt	gagattttcc	4740
55	agcgggtgctg	ccttcacgcc	cacatggtgg	ataccctgtg	tgctgttgaa	ggggccggcg	4800
	tagttggcag	cgacttcacc	ctggaaccag	gtgccgtaac	cgctggacag	gcccgtgaac	4860
	agcgcgtccc	agcctgccga	gtagcgggtg	tagcggtagg	taacctgcgg	tgccaccggc	4920
	aggtcggcga	aggtgtagcc	ggcctgcagg	taccaggctt	gctcggggcc	gtcgggtcttg	4980
	tcctgccagg	cgtattcgaa	ggcgaaactg	gcattgtcga	tgccagcgtt	gccttcgcgg	5040
60	cgacgcctat	acacgtccat	gccttcgcgg	gctttctgaa	agtcgctggc	ccattggctg	5100
	gtgacgtcga	tgccgtgaat	ccaggctcagc	ccgaggggtg	ccaaggcttg	ggtgtagtcc	5160
	agcgtgcggc	cggccagttc	ggtttcggcc	tgggcgcgggt	tgtcggatctt	cagccacagc	5220
	aggctgccc	gcaggccatc	gctgcccccc	aggtccagca	ttgcgggtgcg	gtcgaaggcg	5280
	tggcggggcg	ccaggtagta	ggcccccccg	ggctccagcg	caccgtcggc	gacgcggttg	5340
65	ccagggttcg	ggcgtcgtc	gttgatcaaa	aaaccactgc	ccaggcgaat	ggtctggcgg	5400
	ccggcgggaaa	cgtccactcc	atccttgccc	agcaccggga	acaggtcggc	cgagcggccag	5460

ES 2 364 110 A1

ccgaggaagg cgtcttcgat cttggtggtg cgttcggagc catcgggtgtt gccggccgca 5520
 tcgccatcgc cccaggtggc cgagctcacc cagttcaggc tgccgtacag cgtgccgttg 5580
 ccggccaggc cctggtcacc gctgaggcca tacttgataa agccttcacg ccaggtcгаа 5640
 5 cccctgtgg tgccgtcgta gttcttgagg ctggtgaaca tgccccatac cgccagcatg 5700
 tcggcgttca ggtggctgtc atcgtcggcg tacagctcaa cggccggcgc ggccctggctg 5760
 gccagcaagg ttgccagggc caggctggac agcgtctgtg gtttgaccat ttgcacatcc 5820
 ctcgtttggt ctcgccacc ttcacagggg cctttggtgt tcggggggcac cctcggttct 5880
 ggcgaggggc catcgcgggt ggcggcgatg gcctattagg gcgtgtgcgg tggggcgggg 5940
 10 tcttgttcgt ggctgccaag gcgcttgcac gccttgcca caggcgcggg cagtagcgga 6000
 tcatcaccga cttgagctcg gtgaagtcat cgatgaaggc cgagccgaac tcgcgccaa 6060
 tgccggaagc cttgatgcc ccaaaccggt cagccgggtc gagcagggtg tgcatgttg 6120
 cccacagggt accggcctgg atttgcggga tcatgcgat ggccctggcc aggtcgttg 6180
 15 tccacaggct ggcgctgagg ccgtaggggc aggcgttcat cagggtcagc agttcgtctt 6240
 cgtcgtcata aggcaggaag gtcgccacag ggccgaagggt ttccctgggtg agcagggtgt 6300
 cgcaggctga cggggcgagg attaccgtgg gttcgacgaa acagccgggg ccgtcgccca 6360
 gggtgccgcc gtgaatgatc tggctgcctt cggcgcgggc gatggcgaac agttcggcca 6420
 20 gcttctgctg gtgcggctt tggccaccgg ggcggaactg ggtggcctcg tccagtggcg 6480
 agccgatttt cagttggccc aggcgctggg acagggcgtc cagcagcggg tcgatgcgcg 6540
 agcggtgcac atagaagcgc tcgcccgcgg cgcagatttg ccccgagtgc aggaagccgg 6600
 cctcgatgat gccgtccaca gccttgcgg ttgccaactg gggcaggaag gccaccgcgt 6660
 tcttgccgcc cagttccagt gtgcacggg tcagcttggc gcccatggca gcctggccta 6720
 25 cggcgatgcc agtgggcacg gagccgggtg acgagacct gtcggtacct gcgtgctcga 6780
 tcagtgcctt gccaccagg ccaccaccgg tcagcacgtt cagtgcaccg gccggcaggc 6840
 ctgcttcggt ggccagttcg gcaatgcgca gcagcgtcag cggggtgaat tcgctgggct 6900
 tgaggataat gctgcagccg gttgtcaggg ccagggccag ctccagatg gcgatcatgc 6960
 30 tggcgaagt tccacggcac atgcccacca ccaocgcaat cggctcgcgc aggtgaaagg 7020
 cgctgtagcg ctaccggcg aacgagggca ggcacggggg gatggtctgg ccggtgatct 7080
 tggtcgccc gccggcgtag tagcgcagga agtgcgcggc ctgctgtact tcgaacgcac 7140
 gggaaatgcc gatgagcttg ccgattgca aggtttccag ctgcgccagt tcttcgcggt 7200
 tggcttccag caggtcggcc agcttgaaca gcaactgcgg gcggggcggc gggctggtgt 7260
 35 gcgaccaggc ggtaaagcct tggcgcgagg agctgacggc atggctgaca tcggcctggt 7320
 tggcgtcggc gatgtggggc atggctggtc cgttggccgg gttgaccacg gcaatgctc 7380
 acgacgactg gctggcgagg tgcctggcgt ggatgaacac gccatgctcg cgggcccagga 7440
 aggcctgac ggcaggtagg aggggtgatg ogctcatgca gactccgggg cagttggcca 7500
 40 aagtttgca ctttaataagc ggggcagtg ggtgcttgtg cctgcgtgac aggtgcatga 7560
 ctgtggctgc caaccgcaact gggtaagcct tgtgggagcg gccttgtgtc gcgatagggc 7620
 cgcagagcgg ccccgccgat gttggcggcg aagctgaaaa tgctggggcc gcttcgcgcc 7680
 cctatcgca cgaaggccg ctcccacaaa aaaagcgagc gtaggcgggg ctgattgctg 7740
 gcaggcagca acaagcccgg ccggcagccat cggcaagaag ccatgccacc ggcagcgcac 7800
 45 agtaatacct cgttcaacgc cacaaaaaca agccggggca tacgatgtca ctcaataaca 7860
 agctcaccga gcacctcaac ccgggcaactg tcggtttccc caccgcaactg gccagcaactg 7920
 tcgggctgat catggccagc ccgggtgatcc tcaccgcgac catgggcttt ggcatcggcg 7980
 gcagcgcctt ccgctggtcc atggtcatcg ccgcaactgat gatgctggcg cagtcacca 8040
 50 cctttgcccga ggcgtgcgtc atcctgcccga ccacgggctc ggtatacgcac tacatcaact 8100
 gtggcatggg ccgtttcttc gccattaccg gcaocgtgtc ggccctacctg atcgtgcatg 8160
 tgttcgcccg taccgcccga accatcctgt cgggggtgat ggcgctggtg aacttcgagc 8220
 acctcaatac cctggcggaa tccgcggcg gttcgtggct gctgggggtg tgcttcgtgg 8280
 tggcgtttgc ggtgctcaat gcctttggcg tcagcgcctt cagccgcgcg gaagtggtec 8340
 55 tcaccttcgg catgtggacc accttgatgg tgttcggcgt gcttggcctg atcgcgcac 8400
 ccgcaagtga actggacggc ccgttcggcg tgcctgctgt gggcaccgac ctgatgacca 8460
 tcctctcgct ggtcggcatg gccatgttca tgttcgttgg ctgcgagttc gtcacgccgc 8520
 ttgccccga actgcgtcgc tcggcctggg tgcctgcgcg ggccatggcg ctgggctgt 8580
 60 ttggcgtggc cagctgcatg tcatctacg gagcggcgat gaagcggccag gtggaaaacg 8640
 tgggtgctgga tgcgccagt ggcgtgcacc tgctggacac gcccatggcc atcccgcgt 8700
 tcgcccagca ggtgatgggt gatattggcc cagtggtggct gggtatcggc ttctgttctg 8760
 ccggcgcggc caccatcaac acgotgatgg ccggtgtgcc acgcaattct tacggcatgg 8820
 cgggtggacgg cgcgttgccc aagggtgtca cctacctgca cccgcgcttc aagacggccg 8880
 65 tgctgtgcat cctgggtggtg gcgttgatcc cttgcctgca tgccctggtac ctgggcccga 8940
 acccggaaca catcctgcac ctgggtgctgg ccgccgtgtg gcctggagc accgcctacc 9000

ES 2 364 110 A1

	tgctggtgac	cctgtcgggtg	gtgatattgc	gcateccgccc	cccagacctg	ccgcgtgcct	9060
	accgctcgcc	gctgttcccc	ttgccgcaga	tattctccag	tagcgggtatc	ctcatcggca	9120
	tggcgttcat	cacaccgccc	ggcatgaacc	ctgccgatgt	ctacgtgccg	ttcgccatca	9180
5	tgcttggcgc	caactgcggcc	tatgcattgt	tctggacgct	gtgggtgcag	aaggtcaacc	9240
	cgttcaagcc	ggcgcgggtc	gaggatgtgc	tcgagaaaga	gtttgctgcc	gagcctggcc	9300
	acgccgtgga	gcacgtgctg	catgatcaga	aatttgctg	aacgcttgct	ggcgcgccga	9360
	gcgccttcag	gctatcgccc	aggcgccacg	ctggcatgcc	tggcgcgcaa	cctggggcag	9420
10	cagaacctgg	tggcggcccg	ggtgatccac	gaccgggccc	agggttggca	ggccacggtg	9480
	cacgaacgcg	tcgaggccca	cctgctgatg	caatcgtca	cctgtgagtt	ccagctgcag	9540
	ttgcctgctc	cgcaaggggg	cgaggtcagc	ctggagctgc	gccataccgg	tgcgcttcgc	9600
	cgtgccggcc	tggcctgtgt	gtaccgcaag	ggcgaccggg	cgcgcttcgc	ccgactgcgc	9660
	gaccggttgc	tcgagcaggc	cgactctggt	gcggcgctga	tgccgctgga	tttcaagcgc	9720
15	ctgaccttgg	cctggcgcga	cgccaatgg	ttgtcgacc	tggagcacat	ggcggtagc	9780
	gaagtggtea	accgcatgcc	agcgtttcgc	cgctacatcc	ccatcagccc	gcaacagcgg	9840
	gcgcacctga	tggccagcct	ggcccagttc	aacactttgc	tacctaacct	ttgacgcaaa	9900
	ctggcatacg	ccttgctgta	tcaagcgacg	aatgatgaca	gttgtgcgca	catagataac	9960
20	atgttaacaa	tgtgcgcata	acaacaaatc	ctgcgtcgag	ggcagccatg	catactcaac	10020
	aatccaaccg	tcaggggctg	gaacgctgga	ccacggccat	gcaacagatc	tgtggccggt	10080
	tcgagacgga	acttgcgctc	aatcactcgc	tgttcacg	cgaggtttct	accttttccc	10140
	gtgccggcct	gocgctggcc	aacctgcgca	ccaatgccgg	caacatccgc	cggtggggcg	10200
25	aaaaccgcgac	ccttgacgat	gaccagcatt	gtttcctggt	cagccagcgt	gcggggcatt	10260
	ccaccgtgtc	ccagggggggc	atgcaggtea	gcctggcgcc	gggtgagctg	ctgctgatgg	10320
	attcggctcg	gcgctgcgaa	atcaccoccca	gtgggttgat	cgaacatgct	tcgctggccc	10380
	tgtcgcgtga	gcaggtacgc	aagtatgtgc	aaggcagcgg	cccgatgttt	ggcaagatct	10440
	cctogagcaa	cgctgcggg	cgcatgctgc	atgtgctgat	ggaccaactg	tgcaaggacg	10500
30	gcaatgtaag	cggtgatggg	gcccagggcg	acgcgctgca	gaccgccttc	attgccctgc	10560
	tggagccagc	cttcgagcgc	catggcgaag	cgctgggcaa	ccttggggcc	ttgaacgggg	10620
	ccaacctgag	gggctacgtg	cagcaggtga	tcgacgagtc	cctgtcacag	cccgggctga	10680
	ccccgtccaa	cctggccggt	cgctgaaca	tctcggtgcc	tcacctgtac	cggtcttcg	10740
35	aggaggagg	cgatagtgtg	tgcogctaca	tccagcgggc	gcgcctgaag	cgcagtcggg	10800
	atgacctggc	caaccgcttc	ttcaggagcg	agtcgattac	ctcgattgcc	tacaagtggg	10860
	ggtttaaccga	ctcggcgcac	ttcagccgct	cgttcaagaa	acagttcgaa	cgctcgccca	10920
	aggactaccg	ggcgcagggc	atggtttgag	tgtgatggg	ctgcttgtgc	gggcctcatc	10980
	gccggcaagt	cacttggcgg	cggttcagcg	acggcogttg	aagtagcccg	acagctgggt	11040
40	cacggtcttg	ccggcagtg	gcagcagcgg	gcggaaatgg	tccttgccga	ggatgcgcgc	11100
	atgcttgacc	gagctgacca	ggtcatagcg	cttcgatccc	tcctgcatac	cctcggcgag	11160
	tatcttgcaa	atgatgtggc	tgggcgtgac	gccaaagccg	gagtagccct	gcacatagaa	11220
	agcgttgggg	cggttgtcga	gggtgcctat	ctgoggaaac	aggttggcac	tgggtggccat	11280
	cgggccgccc	caggccaggt	cgatgcgcac	gtctttcagg	taggggaaaa	tcttcagcat	11340
45	cagcgcgcgg	ttccacgcct	tcaggtccag	cggaagtgc	tcgacgaagg	gcgtggcggc	11400
	gccaaacagc	aggcggttct	cgcggtgac	ccggtagtag	tcgatcaccg	ggcggatgct	11460
	gctgtaggcc	ccgcgtatcg	ggctgatgcg	ctcgatcagc	tcacocggca	atggtctggt	11520
	catcatctgg	aaggcatagg	tgtttatagt	gcgtgogtgc	agctgcggct	ccagcttgtt	11580
50	gaggaagctg	tcgcacgccc	acagcagctt	gctggcgcgt	accgagccac	ggcgggtgcg	11640
	taccgtgatg	cgctcgccgt	aggtcacttc	cagggccggg	ctgtgttcga	agatgcgcgc	11700
	accatggccc	accagtgcct	gcgcttcgcc	cagcagcagg	ttcagggaat	gcacatggcc	11760
	accgcccattg	tgcatacagg	cgctgctgta	ggcgttgctg	ccgatgatct	ggcgcacttc	11820
	gctgccaccg	agaaaacgga	tctcgtcgcg	ggtattgatc	gccttgaacg	ccttctccca	11880
55	tttgcgcagg	gtctgttctc	ggcggcggtt	gaagcccatg	tagccatagc	cgtggcagaa	11940
	gtcggcgtcg	atggcgtagc	gggcgatgcg	gtccttgatg	atgccggcgc	ccagttcgct	12000
	gatttcgaaa	atatccctca	cgccctgate	accgacgctg	ctgcggatct	tctccaggtc	12060
	gtggccgatg	cccgccatga	tctgcccgc	ggttgcgccc	ctaccgcccgt	agcccagata	12120
60	acggccctcg	agcacgacga	tattggtcac	gccttgctcc	gccagctcca	ggcgggtggt	12180
	aatgccggag	aaaccgccac	cgatcaccac	gacatcggcc	tcgatgtcgc	gttccagggt	12240
	tgggaagctc	aggttgaact	tcttggctgc	cgagtagtag	gtggggctct	cgagggtgat	12300
	catgacgccg	cctgctgact	ggaaatgggt	agaaatcatt	ctattaatgt	attaatgatt	12360
	gtgcaactggc	atactcgccg	gtttgctatt	tccagcctcc	ttgagcccgc	atgaccacac	12420
65	cgagaccctc	cctgaccctg	accttgctgc	aggcgcgcga	agccaccatg	gcgttcttcc	12480
	gcccggcgct	gaatgcccat	gacctgaccg	agcagcaatg	gcgggtaatc	cgtatcctgc	12540

ES 2 364 110 A1

	gccagcaagg	cgagctggaa	agccatcagt	tggcggagct	ggcctgtatc	ctcaaaccce	12600
	gtatgagcgg	ggtgctcaag	cgcttgagc	gtgacggcat	cgtagcgcgg	cgcaagtccg	12660
	cggaggacca	gcgcgggtg	ttcatcagcc	tgaccgaggc	cgccagcaa	gcgtttctgg	12720
5	cgatgagcga	ggagatgacc	cgcaactacg	acaagatcct	cgcccagttt	ggcgatgaca	12780
	agctgcagca	gctgatgcag	ctgctgggtg	aatgaagaa	gatcaaacc	tgacgcgcca	12840
	ggcgtcagcg	gttgagtgac	agcgagtctt	ccagcacttt	cagcagtgtc	gccgcgcgcc	12900
	gctcataggc	gtcggggcct	gcgtacatca	gctctacata	caggctgtcg	atgatgccca	12960
10	ggtaggcate	ggcatacagc	gccaggcggc	tgtgctgctc	atgcgcccag	ccgtggcgag	13020
	cttgacggggc	cacgctgaac	ccttcgcgta	tgcgctccag	gtactgttca	aagcccgaag	13080
	tgacaatcgg	cttgatgccc	gccgggggca	ggaacgccgt	gcgcaacacg	aagcgcagtt	13140
	gggcgagatc	gcgataacgt	tcgccaggt	gcagggccag	ccagtgcccc	gccgccaggc	13200
	cgtcgcggggc	ttcctgcgca	aagcgtgct	cgacaaaggc	cgtttctctg	acaagcgcac	13260
15	gctggaacac	ctccacgaac	aaggcgtcct	tgttggcgaa	atgcgcatac	agcgatgcct	13320
	tgcgcatgcc	cgccaactgg	gcgatttctg	tcagcgaaga	ggcgtcataa	ccgtactcgg	13380
	cgaagtggcc	gacggcggca	tcgcacacac	gcaccgcaga	aggggaaagg	tctttcaaca	13440
	gcatcactcc	gtcagggggcg	cggcggggccg	cgcgcgtctt	gaggggtgga	ttgtggtgat	13500
20	cgaaaatgca	cgggtcaatg	cttgtcgcaa	ggcaatttcc	gggcgccatg	gaaagtgcaa	13560
	tgttcccctc	gtaacgtgca	ttcctccacc	caatcgccgc	tcacatactg	atcgcgtctt	13620
	cgaatccaat	aagaaagaga	ccgctcatga	aaaagccaaa	ccccctgctg	gaagacctga	13680
	agtcogtcc	gcccagcatt	gcccaccaatg	ccatgcgtgc	agagcaggac	cgcagtgtgc	13740
	cggcagagaa	tatcgccttg	ctgaaaagca	tcggcatgca	ccgcgctttc	ttgcccaaac	13800
25	acttcggcgg	catggaaatc	accctgccgg	agttcgccca	gtgcatcgcc	ttgctggcgg	13860
	gggcctgcgc	cagcacagcc	tgggccaatga	gcctgctgtg	caccacagc	caccagatgg	13920
	caatgttctc	gcccagcta	caacaggagg	tgtgggtag	cgaccggat	gctaccgcca	13980
	gcagcagtat	cgcgcgcttc	ggcgcgactg	aagaggttga	gggtggcgtg	tcgttcagcg	14040
30	gcgaaatggg	ctggagtcc	ggttcgaccc	acgcogaatg	ggcgattctc	ggtttccgcc	14100
	gcaagaatgc	cgaaggcgt	caggattact	gcttcgccat	cctgcctcgc	agtgtactatg	14160
	aaatccgtga	tgactggtat	gccgtgggca	tgcgcggcag	cggcagcaag	accctgatcg	14220
	tgcgtgatgc	cttcgtgccc	gagcacccga	tccagaaggc	caaggacatg	atggagggca	14280
	agtcggcggg	ctttggtttg	taccocgaca	gcaagatttt	cttcgccccg	tatcgcccgt	14340
35	atthtgccag	cggcttctcc	acggtcagct	tgggcgttgc	cgagcgcgatg	ctggaggtgt	14400
	tccgcgagaa	aaccgcgaac	cgcgtgcgtg	cctacacccg	tgtgcgctg	ggcgcgccca	14460
	ccccggcgt	gatgcgcctg	gccgagtoga	cccatcaggt	ggccgctgcc	cgggcattgc	14520
	tggaaaagag	ctgggacgag	attgccgagc	acagtgcccg	tcacgaatac	ccgtcgcgtg	14580
40	gcacgctggc	gttctggcgt	accaaccagg	gctacgccgt	gaagatgtgc	atccaggccg	14640
	tcgaccgct	gatggaagcg	gccggtggtg	gocctggtt	cgagagcaac	gaactgcagc	14700
	ggctgttccg	cgattcgcac	atgaccggtg	cccatgccta	caccgattac	gacgtgtgtg	14760
	cgcaaatcct	cggccgcgag	ctgatgggccc	tggagcctga	cccggcgatg	gtctgagccg	14820
	ccacttgttt	tcaccatecc	cctacaagca	caacaacaaa	cagggcaggc	tgccaggcct	14880
45	gcccgggagt	cttgcatgtc	caaagaaacc	ttogattcac	gtgccttccg	ccgcgccctg	14940
	ggcaacttcg	ccaccggcgt	gaccgtggtg	actgcccgcg	gcccagtggtg	ccgcaaggtc	15000
	ggcgttaccg	ccaacagctt	caactcgggtg	tcgctggacc	cggcgtgat	cctgtggagc	15060
	atcgacaagc	gctccaccag	ccatgaagtg	ttogaagagg	cctcgcactt	tgccgtgaac	15120
50	tttgcgggta	tcgactacga	gaccggcact	ggcggcgcgc	cgttgttcgc	cgattgcgcg	15240
	gcgcgctttg	agtgtgaaaa	gtaccagcag	ctggacggtg	gcgatcactg	gatcctggtg	15300
	ggcaaggtag	tggcctttga	tgactttggc	cgtcgcgcgc	tgctgtatca	ccagggcgcc	15360
	tattcaatgg	tgtgcgcga	taccgcgatg	acccaaggcg	cagaggggca	ggcaccgagc	15420
55	agccacttcc	agggccgcct	gcagcacaac	ctgtaactacc	tgatgaccca	ggcgtgcgt	15480
	gcctaccagg	ctgactacca	gccacgccag	ctgtgtaocg	gootgogcac	cagcagggca	15540
	cgcatgctga	tgggtgctgga	gaacgatgcg	ggcctgagcc	tgaacgacct	gcaacgcgaa	15600
	gtggcgatgc	cggcgcggga	gatcgaggaa	gcggttgcca	acctcaagcg	caaagggtctg	15660
60	attgccgatg	acgaagggcg	agtgcggcta	tcggtgaagg	gcgtggacga	gaccgaggcg	15720
	ttgtggacca	ttgcccggca	acagcaggac	aaggtgttcg	ggcagttcag	tgaacagcag	15780
	ctggagactt	tcaagaccgt	gctcaaggcc	cttatcaaca	tctgaacacg	ctttgggatg	15840
	gcaccggctg	ttttggatgg	caccggctgt	gccggtgttc	gcggatgaac	ccgctcccac	15900
	aggtccagcg	ccagtagcaa	cttcggcgcg	gtacctgtgg	gagcggcttt	agccgcgaa	15960
65	accggcaag	cgggtgccat	ccaaccagaa	gcctcagtag	gcaccacccc	cggcactggg	16020
	gactaccact	gtatccttga	acttccccgc	cagctcgcgc	agcccgcgca	tcagcaccgt	16080

ES 2 364 110 A1

	ggtatccaca	cccaccgcca	caaacgccgc	accagctcgc	atgtagcgtc	gcgccagttt	16140
	ctcgtccgcg	ctgagaatgc	cggcggcttt	gcccgccttg	ccaatgcgca	cgattgcgtc	16200
	ttcaatcgcc	gcctgcacct	ccgggtgcc	ggggtgccc	cgatgcccc	tggccgact	16260
5	caggtctgca	ggcccgatga	acacgccatc	cacaccttcc	actgcaacga	tctcgtccag	16320
	gttggccagg	ccttccctgt	tctcgatctg	caccagcagg	cacatttgct	catcggcgtg	16380
	gtccaggtaa	ccggggagg	tgttccagcg	cgaagcccgc	gccagcgcgc	tgcccacccc	16440
	gcgaatgccc	ttgggagggt	aatgcatggc	cttgaccagt	tgccgcgcct	gttcggcagt	16500
10	ttccaccatc	ggcaccagca	aggtttgtgc	gccgatatcc	agcacctgct	tgatcagegc	16560
	ggtatcgccg	atcaccgggc	ggatcactgc	ctggctgggg	tagggtgcca	ccgcctgcaa	16620
	ctgggcgagc	atgcccgcga	ggtcgttggg	cgcgtgttcg	ccgtcgatca	gcagccagtc	16680
	gaaaccggca	ttggccgcca	gctcggcgca	gtaggcatcg	gccaggccga	gccacaggcc	16740
	gatttgccgt	taccgcgtg	gcaggcgtcg	ctggaagtgg	ttgatgggca	tgtccatgag	16800
15	caggtcctta	aacgaagcgg	caggcgatgg	agccgagcat	gtcgtagtcg	acgtggaagg	16860
	tgtcacctgg	gcgagcggcg	accgggcggg	tgaaccgaac	ccaaggatg	atctggccgg	16920
	gctgcaagg	gacgtcgtac	ggcgccagtt	tgttggccag	ccaggcaacg	ccttggcccg	16980
	ggtggttgag	cacggcagcg	ctgaccccgg	attcctcgat	cacgccattg	cggtagagca	17040
20	ccgccggcac	tttgccgagg	tcgatttcgg	tggggcgcac	ggcccggccc	cccatcacca	17100
	cgccggcatt	ggcggcgctg	tcggagatgg	tgtcgaacac	cttgccgggtg	gcctgggttt	17160
	gcggttccac	ctgctggatg	cgcgcgtcaa	tgatttccag	cgccgggatc	accactcggg	17220
	tggcgtccag	cacatcaaac	acggtgatgt	tcgggccctt	cagcggcttg	ccgaggatga	17280
	acgccaaact	cacttcaacc	cgcggcacga	tgaagcgtc	gaaggggatg	tcgctgcctt	17340
25	cgtcgaacag	catgtcgtcg	agcaaggcgc	cgtagtcggg	ctcggtgatg	ttcgacgata	17400
	cctgcatggc	gcgcgaggtc	aggccgatct	tgtggcccac	cagcttgcgc	ccggcggcga	17460
	tcttttttgc	caccagggcg	cgctggatgg	cgtaggcgte	ttcgatgggtg	attgccgggtt	17520
	gctccagcga	gaactggcgc	acttgctcgc	gggagcgctt	ggcctgggtcg	aggcggtcgg	17580
30	cggcgtgctg	gatgaaagcg	ttgtctagca	tggggggcgg	ctcttgattc	aagggtgac	17640
	gatggcagcc	tgggtgcgca	acaccagcag	gcccggccagg	gcgatgaaga	cggcgagtac	17700
	gtacagagca	aggctggcgc	tgtgggtggt	gtcgcgcacc	cagccgatga	agtagggcgt	17760
	gaagaacgag	gcgatgctgc	ccagcagact	gatcagggca	atgccggcgg	cctgggtacg	17820
	ggcgttgagg	aacgcggcgg	gcagttgcc	gaacatcggc	agcgcagcgc	tggcggccat	17880
35	gccggccagc	accagggcgg	ccattaccgg	cagcgcctgc	tcgggggcaa	tggccgcaat	17940
	agcgtgccc	atggcagcca	tcagcagcgg	taagcagcgg	tgccagcggc	gttcgcgttg	18000
	gcggtcgtg	gagcggccc	acgccagcat	gaacacgcag	ccggccacgt	acggcacagc	18060
	gctgagcagg	ccgacactgg	cgctcgtggc	cacaccggca	ctgtgaatca	ggctgggcat	18120
40	ccagaacgca	agggtattca	ccgccagcat	caccgcgcaa	tacacggcca	ccaacagcca	18180
	cagcgcacgg	cttgcgaaaa	tggcgcgcaa	cgaggttacg	ggcttgcgct	gttcttctct	18240
	accgaattgc	gcgcgcagcg	tggctttctg	ctgctcatcc	agccagctca	cccgtctgaa	18300
	gtgctccggc	aaaacggcca	gtaccaccag	gcccagcaac	accaccggcg	ccccttcgag	18360
	caggaacatc	cactgccagc	cacgcagccc	gcccgtgtcg	tgcatgaagg	ccagtatggc	18420
45	cccggacact	ggcccggcca	ccactccggc	caacggcacg	gcaatggcga	acagcgcgg	18480
	gacctgggcg	cggcggccc	ccgggtacca	gcggttgagg	taaaccagaa	tgcccgggaa	18540
	gaaccgggcc	tcggccgcgc	ccagggcaaa	gcgcaacagg	tagaacgcgc	tgctgctttc	18600
	gatcagcagc	atgctggtcg	acaacagccc	ccacaccacc	atcaggcagg	cgatccagcg	18660
50	gcgtgggcca	acgcggtcga	gcatcaggtt	gctggggacg	ccgaacagcg	cataggcaat	18720
	gaagaacagc	ccggcaccca	ggccatagac	cgtgtcggac	aaatgcaggt	cctgggtcat	18780
	ctgcatcttg	gcgaagccaa	tgttgatgcg	gtccaggtgg	gcgaacaggt	agcacaccag	18840
	cagcagcggc	atcagccgcc	agggtactgc	ccgatgggta	ctgtcggccc	gttcaacgtg	18900
	tgctcgcgc	ggcgaggctt	gttcgagtgt	gctcatgttt	ttgtacttat	tctgtaatga	18960
55	gtcggggagg	gcgtggtttg	agccggcgcg	ctagcggttg	aacagtgggt	gcaaggtgct	19020
	gtgcttgggc	tcgtagacct	gggcgggtgct	gtggtcgatc	tgacaggtga	tgccgatcgg	19080
	gcgctgttgc	agcaagtggg	ccaggcgcgc	tttcaact	gccagcaagc	tgctgcccac	19140
	tgttttgtgc	acctcggcgc	tacggccggt	agccatgcgc	aggttggcgt	acagaagacc	19200
60	gtattgcct	ttgccgctcg	ccaccgcgca	atgggcggcg	gggtaggcca	gcacgcgtgt	19260
	accgccagtg	gggaacacgg	ctttgccttc	ggcatcgcgc	tggtcgagca	tggtgtcggc	19320
	cagggcgcgg	cacaggccgg	ggatgtcggc	gtcggtttcc	aggctcgggg	tatagagcag	19380
	aaccaggtgt	ggcatggggg	cctcctcgg	gaggggcggc	tggccacccc	ccagggcgac	19440
	cagccgcgaa	cggttggttt	acaggcggct	ggtgggcacc	acggcggccc	ggttggcggc	19500
65	ctgggcagcg	gggatggcac	caccgtcctg	cggggtgacc	gggaagatcg	cgttgatctg	19560
	gccgggtgcc	gaagagccga	agtagggcgt	gaccacttcg	gccttgccgt	cgtaatcgga	19620

ES 2 364 110 A1

	ccagcccagc	gcacccagca	gcattgccc	gtcgtgcatt	aagccttcac	cgtggccttt	19680
	ggcggcgtac	tccggcagca	tcccgcagaa	cgcttcccac	tgcgccctct	gccacatttg	19740
	caccacacgg	tggctgaggg	tttcgagggaa	cgggctccac	accttggtgg	caaagtccgg	19800
5	cgcttgccg	ttctgcccga	agcggtgcca	cagcagaccg	ctggccagga	acgccacggg	19860
	gccgtcgtag	tggctcttcta	ctgccttgcc	catggcccag	cccaggcggg	cactgtcggc	19920
	caggtagtgc	gaggtgcaca	gggcccagac	cgagaccact	ttgaagtgtc	ggtcctgggt	19980
	catgtagcgc	atgggcacca	gggtgccgta	ttccggggcg	agggtggtgg	cgtggggggc	20040
10	catggtttcg	acggtgaagc	ggttgcactc	ctcggccagc	agcttgccca	gctcgggatt	20100
	gccggggaat	gcgtagggca	tgttgctgat	gaagtgcggc	agttcgttgc	tgggtgtacac	20160
	gccctcgaaa	tgcggcccgc	acagcaactg	gtagttggcg	ttgaccagcc	agtgcgtgtc	20220
	gaacacgacg	atggtgtcca	cgcccagctc	acggcaacgg	cggtctgatt	cgtgatgccc	20280
	gtcgtatggc	gcctggcgaa	agccttggcg	cgggcctggc	agttcggaca	tgtacatgga	20340
15	cggtacatgg	gtaatcttgg	cagtgcagagc	gagtttggcc	atgggggtct	ccgataagac	20400
	gctgtttgtg	ttttggggct	gacccggctc	cttgcaggag	cgcccttgtt	ccgggatggg	20460
	gcccacagcg	gccccggcga	tatctgcccg	gaggtgaaa	tccaggggcc	gctgcgcgcc	20520
	ccatcgcggg	cacaaggccg	ctctacacc	cgggcggtgt	aaaccgcaca	gagggttaga	20580
20	tgccccagcg	aggaatgtgg	tgattaccca	tggaaataca	cacgttcttg	atctctgcaa	20640
	agacctgaa	gctgtactgc	ccgccctcac	gcccggtagc	ggaacctttc	acgccgccga	20700
	acggctggcg	caggtcgcgt	acgttctggc	tgttgatgaa	cacatgcccg	gcctcgtatc	20760
	cacgggccag	gcatggggct	ttgcgatgtg	cctgggtcca	gatgtacgag	gccaggccat	20820
	actcgggtgc	gttggccagt	tgcagcgcct	cggcttcgct	cttgaacggg	atcaggcaca	20880
25	ccaccggggc	aaagatttct	tccctgggca	tgcgcattct	gttgttcacg	tccggcaata	20940
	cggtgggctg	gatgaactgc	cccttggcca	ggtgcgcagg	caggttggcc	gggcgctcca	21000
	ggccccggc	gaccaggcgt	gcaacttctt	cgatgccaat	gaggatgtac	ccggtgacct	21060
	tgtcatagtg	ctgctgggtg	atcatcgaa	cgacctgggt	tttcgggtcg	gctcgggtcac	21120
30	ctacgatcag	gcgcttggcg	cgccgcgcaa	actctgcgac	aaactgcggg	tacacgcttt	21180
	cctggatgaa	gatgcggctg	ccggcggctg	agcgtcctcc	ggtcagcag	aagatgggtg	21240
	acagcgcggc	gtccagcgca	cgctcaagg	ctcgcctctc	gaagatcag	acggggcact	21300
	tgcgccccag	ttccatcgag	tactttttaa	ggcctgcggg	ctgcatgatc	ttcttgcggg	21360
	tggcggtagc	gcccgtgaa	gaaatggcgc	gcacatcggg	gtggcggacc	agggcatcgc	21420
35	cgccggtagc	gcccgtgaa	gggatcagct	tcagcaccct	gttggggatg	ccggcttcta	21480
	ccgccaggcg	gcccagttcg	ttggcgggca	gaggcgcag	ctcgcctcat	ttcagcacgg	21540
	cggtgttgcc	cagcgcagg	caaggcgcag	tcttccagg	agccgtcatg	aacggcacgt	21600
	tccatgggct	taccaggccg	cacacaccca	ccggctggta	caggtgtgag	ttgagcatct	21660
40	ggtcgtcgac	cggttaggta	tggcgcgcca	tgcgcgtgca	cacttcggcg	aagaagtcca	21720
	agttgtgcga	ggcacgcggg	atcagcacgt	tcttgggtct	gtggatcggc	aggccgggtg	21780
	cgagggtttc	cagctcggcg	agtttcggca	cgcttctgct	aatcagctca	cccagcttgc	21840
	gcatcagccg	ggcacgcttc	ttggccgggg	tgttgcccca	cttgggggag	gcttccctgg	21900
	ccgcagccac	agcctggggc	acttccctcg	gcgcgcgct	ggcgacttcc	cagatggcgt	21960
45	cgccgggtgg	cggtttgtag	ttgacgaagg	tgtctttgct	ctcgacctca	cgccggttga	22020
	tccagtgcct	gatcatgctg	ctcatgcctt	gttgttcttg	aagaagtccg	cttcgctgac	22080
	gatacgggtg	accaggcgcg	cgacgccttc	cacttccacc	accacttctg	caccggccac	22140
	cacatcggcc	aggccttctg	gcgtgcgggt	ggcgatcatg	tgcgccgggt	gcaggggtcat	22200
50	gaagctggag	aagtattcga	tgaggtgcgg	gatgtcgaag	atcatgtccg	cggtgggtgc	22260
	ttcctgcttc	agctcaccgt	tgatccagg	gcccagcttc	aggttgcctg	cgtctggcac	22320
	atcggccgca	tcgacgatcc	acgggcccag	cggggtgggt	gcacgcgggt	ttttcaccgg	22380
	caggttgggg	cggtagttag	tttccaggta	gtcgcgggat	gcgtagtctg	tgcacacggg	22440
	gtagccggca	acgtaggcca	gggcgtcttc	acgcttgacg	ttcttcggcg	ctttgccgat	22500
55	caccgccacc	agctcgcact	cgtagtgcat	gtattcgacg	ttgtccgggg	gccaggtgac	22560
	ctggatgtgg	ccggtgtagg	tgcctggcga	cttgatgaaa	gccaacgggt	cggtgggccc	22620
	cgcaaggcc	agctccctgg	cggtgtcggc	gtagttcagg	cccagggcga	acatgctgcc	22680
	ggtggcgggt	ggcagccagg	tgacctggct	ctgatggacc	aggcggccgt	cgccaaggcg	22740
60	caggtgatcg	tcttcgaccg	tgacatcgtg	ggcctggccg	tccaactgga	tacgggcctg	22800
	tttcacaggt	aattcctcac	tcgggcagca	tgtggttggg	cagcttggcc	aggcctcga	22860
	tctcgtatgc	gacgcggctc	cctggctgta	catcagcgcg	gccctcgggg	gttccgggtg	22920
	tcaggatgtc	gccggcgtgc	agggctcatg	actcgtgat	ttcggcaatc	agctgcgcca	22980
	ccgtgcgtac	gcagttggcg	gtgttgttgg	gctggcgcag	ttcggcgttc	acatacaggc	23040
65	gcaggccag	ggcatcgggg	ttggccactt	ggctgggggg	caccagttca	gggccgaccg	23100
	ggcaaaaacc	atcacggcac	ttggccttga	ctgcagggcg	gtagtagctg	gcttcgggca	23160

ES 2 364 110 A1

	ggctcaettc	ggtgacgatg	gtgtagcccc	ccacatgctc	cagggcatcg	gccacgctga	23220
	cgcggtggc	gtccttgcca	atcaccactc	ccagcgccgg	gcccgggttc	acgcgctgca	23280
	cgccggccgg	gaataccacc	tggccttcat	gctggttcgc	ggtgttcggg	gtcttgacga	23340
	acaacaccgg	cttgaccggc	agttgcttgt	acggtgcttc	cacgaacgcc	gcttgggtgct	23400
5	gctgcagcaa	accctggtag	ttcagcgcga	cgccgaacag	ggtgccgctg	gcaacgtcaa	23460
	gcagggcatg	gctcatgctc	ttctcctggc	agtgcagggc	ggtggccctc	ctgcggatth	23520
	cgtaaatgtg	ttaatgttat	agttaatatg	ttaacgatgg	tcaaggggtg	gccagtggcg	23580
	cctgccggca	aggcaaggca	ccatgggcca	tcgtcaacag	ggtcaagcga	tttgcgagca	23640
10	agcagccatg	agcgaccggc	atccgatacc	gaacatcaac	attggccagg	tttacgacca	23700
	gcgctacagc	gacagcgagg	tgcattacga	ccggctgggc	aacctggcgg	gctttttcgg	23760
	gcgcaacatg	ccggtgcacc	ggcatgaccg	gtttttccag	gtgcattacg	tgaagtcggg	23820
	cacagtacgg	gtgtatctgg	atgaccagca	gtacatcgag	gcccggccga	tgttcttctc	23880
	caogccaccc	acggtggcgc	acgcgttcgt	caccgaagct	gacagcgacg	ggcatgtgct	23940
15	gacggtgctc	cagcaactgg	tgtggcaatt	gatcgaagcc	gacgccagcc	tgctgccggc	24000
	gggcatgcag	gtgcagccag	cctgtgtggc	gctgggcaac	ctgccggccc	aatacaaggc	24060
	cgaggcgcag	cgctgcaag	gctggctgga	cgctgtgagt	gacgagtttg	ccacgcagca	24120
	accgggtcgc	gaggcggcgt	tgcagtctgt	gaccgcctcg	atcatgatca	gcctgctgcg	24180
20	gctgtgcccc	aactcgctgg	aatcgacccc	ggcggccat	gaagacctga	agatcttcca	24240
	ccgtttcaat	gccctgatcg	aagcgcatta	ccttgagcat	tggccgctgg	cccgctacgc	24300
	gcagcagatt	ggcgtgaccg	aggcacggct	gaacgatgtg	tgccggcgca	tcgccgactt	24360
	gccatccaag	cgctgtgtgc	tggaaacggct	gatgcaggag	gccaaagcgtt	tgctgttggt	24420
	ttccggcagc	acggccaacg	aaatctgtta	ccagctcggc	ttcaaggatc	cggcctatth	24480
25	cagccgcttc	ttcaaccgct	acgccaagct	cacaccocgg	gagtaccgcc	agcggcaggc	24540
	agaattgcag	tgaaatggcc	atggcggctc	accocgggtc	tgttgttggt	tacagcggat	24600
	ggtcgcagcc	cgcgcgccgg	gcttgaatgg	gttttccgtg	gaacagattg	cactttccat	24660
	cgtgcatgcc	cttaaattcg	tgaattgaga	aaaagccaca	ggtttgacca	tgaccaagac	24720
30	gcaaccttcg	ctcacgctaa	gcctgttgca	ggcccagaaa	gccgcgatgg	catttttcag	24780
	gccgctgttg	aaccagcacg	acctgaccga	gcagcaatgg	cgggtaatcc	gcatcctcaa	24840
	gcagcacggc	gagctggaga	attatcagtt	ggcggaaactg	gcctgcatcc	tcaagccgag	24900
	catgaccggg	gtactggggc	gcctggagcg	agacgggctg	gtgcggcggc	agaaggccgc	24960
35	gcaggaccag	cgacgggtgt	tcgtcagcct	gaccgaaaga	ggggaggcgt	gctttgcctc	25020
	qatqaaqaaa	qgcatggagg	ccaactacca	gaagattcag	gcgcagtttg	gtgaagagaa	25080
	gctgcagcag	ctgatgggg	tgttgaatga	cctgaagcgc	atcgcgccat	aa	25132

<210> 2

40 <211> 12339

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

45 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(12339)

50 <223> Cluster tyn

<400> 2

55	tcaggcgaaa	cgctogaagc	ggtacgggtga	cgggtcgcac	agcgggggtg	cctgggccac	60
	caggtctgcc	gccagctggc	cagcagcagg	cgaggtgccg	aagccatgcc	cggaaaagcc	120
	ggtggccagg	gtcaggcccg	gaatactggc	caccggcccg	atgaccgggt	tggagtcggg	180
	ggtgacgtca	atcgtgccgg	cccaggcgc	ggcgatacgg	gcctgttcga	acaccggcca	240
	ggcgcctttc	aggttgogca	tggcctcgtc	ggtgagggcc	gggttggcgt	gcccgtcttg	300
60	taccctgaca	cgctcgaagg	gggttacatc	cgttgccttc	cagcgcgggg	ccagggccag	360
	gtccttgaag	aagtaacttg	caaagctgat	gcgcaaaaag	tcccgcctgg	cacgcagctg	420
	gggcaggtaa	cgcttgccca	gcagcaggtg	atcgagggtg	aggaaggcgt	ccagcgcgcc	480
	gcgctgggtg	atgatgtagc	cgccgtcctt	gtgcttgccg	aaggaaaaat	ctggtgcgcc	540
	cacggcagtg	tcggttggcc	cgccatggg	ctctgtgcgc	agcacggaac	aggtcagcgg	600
	caaggtcggc	aggttgatgc	ccaggttgcc	gaggaacttg	cgcgaccaca	ggccaccggc	660
65	cagcaacacc	tggtcgcagc	ggatttcacc	ttgctcgggtg	accaccccgc	tgacacggcc	720
	ggctgcgggtg	accagcgtgc	gcaccgcgca	gttctccact	accactgcac	ctttggcqtat	780

ES 2 364 110 A1

	cgccgccccg	gcgatggcgc	tggcggccag	ggtcggttcg	gcgcgggcgt	cggagggggt	840
	gaagatgccca	cctgoccaa	ccgcccagacc	accgggcacc	atccgggtga	ttcccccgct	900
	gctcagcagg	cgcgaatcca	ggcccagcgc	ctcgacgctt	ttcagccagc	cttcatgcat	960
5	gcccattctgc	gtgtcgttac	ggccgatgaa	catgatgccg	gcttgccgat	agccaacgtc	1020
	gctgccaaacc	cgtgcgggca	tctcggccca	cagccgatca	gccgccagt	ccaggggaat	1080
	gtcatgggcg	tggcggttgg	tcttgccac	ccagcccag	ttgcccagc	actgctcccc	1140
	agcgatgcgc	cccttctcca	gcaccaccac	cggatggtg	cgttcggcga	ggctcagtgc	1200
	ggcggtgagg	ccgataatgc	cgccaccgat	gatcaccacg	gtagtggcgt	cgggtggcg	1260
10	ggtgctggtt	tgcacagggg	cgatcgtggg	agacatggct	ttactctttg	ttgtgctgtc	1320
	agggggagtg	ttcagcgcca	gccagcagcc	tactggcca	aggcggatca	gggtcacttg	1380
	cgcttgcccc	gcaccgcggt	aggcggtgac	ctccagctcg	accttgtaaa	cgggtggagcc	1440
	cagcggcggg	caggtgaccg	tggtgccgg	gtcgatgccg	cggaacttct	cgccgatcac	1500
15	gtccatgacc	cgtggtacat	cgccagggtc	ctggatgaac	acgcgcgagt	tgatgacatc	1560
	ggccaggctg	gcatcgactg	cgccagcgc	ggtttcgatg	ttggcgaaca	cctggtgggt	1620
	ctgttcgatg	acgtcctctg	gaatgacctg	ggtctgcggg	ttgctccgg	cgggtgtgga	1680
	gacgtgaatc	cagttgtcca	ccgccaccag	gcgggagtag	ctggccatgg	cttogaactt	1740
	ggagccggtt	ttcagtttga	tgatctgtgt	catgggcttt	gccttgttat	ccggttgccg	1800
20	ggatcagctg	agaacggggg	tttcccagag	ggtgagcttt	acgcgatgc	cttgctcgag	1860
	cgecttgccg	tacaccacgg	tgccccaggc	cacgtcttcg	acgggcatgc	cgccccaccga	1920
	catcaggatg	atttcgtcgt	catgcaggcg	gcccggtgcg	tcgccgctga	tgatcttgcc	1980
	gatgtcttcc	acctgctcgg	cgccagcgt	gccttcggca	atcatgtcca	tgaagcgcac	2040
25	acctaccagc	ggtacgtggt	tgtgcgcagg	cttgggcagc	tcttgaacc	aggcctcgta	2100
	gaggccgggtg	ttgtccacca	ccttgccac	gtcgtcctgc	tccatgccgg	cgtcgatact	2160
	gcacggggct	ggcatggcca	ggaacgcgcc	aggcttgacc	cactcgcggc	gcaccagcgg	2220
	gtactggctg	gggtcggcga	cttcgcccga	gctgcagtag	ctgaccaggt	cggaaccgcg	2280
	taccacttct	tccagggttt	ccaccacctg	gacatgagtg	atctgcggga	agctggtttt	2340
30	caccagggcg	acgaaggcat	ccaggttctt	ctggccacgg	cccttgacct	tgagggtgtc	2400
	gatcagcggg	cagacggcca	tgaacgcagc	gaccgtggtc	ttgcccata	cccccgggcc	2460
	ggccagggccg	atcaccttgg	cgctcttgcg	cgccaggtgg	cgggcgcgca	cgccccggat	2520
	ggcgcgggtg	cggtaggccg	acagcaggtt	ggccgacatg	tgtgccagt	gcgcgcgggt	2580
35	gtcggcatcg	ttgaggggtga	acatcaggat	cgagcggggc	aggcctttct	cacggttggc	2640
	gatgttcgag	ccgtaccact	tggcgcctgc	ggtctggaag	ttgccgcgca	ggtacgcggg	2700
	catcgccatc	atgcgcgggt	cgccgggtgg	cttgggcatg	ttggggaatg	gcgagtgctc	2760
	ggggaaggta	atcatcgcgc	cgtgcgagtc	gctgttcggg	ccggccatgc	ggtagtcacc	2820
40	ctggtacagc	aggccgaaca	tttcttccat	ggtgtcgaca	caggccggca	tgtcggtgac	2880
	gccggcacgg	atcatgtcct	gctcggacag	gtagatgaag	tcaattctgg	tatcgagggt	2940
	catggcgggt	ctcgcagggc	tggctgccgt	cggatattgt	gttggtttcg	aggcaaccag	3000
	tttcgctaac	gactggtagg	tcgtcttgtg	tctgcctgcc	agccgagttg	accgtcagt	3060
	ccagggcttc	aatggcccgc	gagcgagaag	ctggccgggg	tgtggcgcag	gctgagggcg	3120
45	gtcagcaggc	acaccaccag	ggtgcacagg	gccagcagcg	cgcccatgc	ggtcggggccg	3180
	tggttgagta	ccactgcggc	cagcggggcg	gcgcggcag	acgccgacag	ctggatggcg	3240
	cccagcagcg	ctcgggtgga	accagtgcc	tttcttgcg	aggccatcac	cagcgacatc	3300
	agcgtcgact	cggctatccc	caggccgaac	agggtatca	ccatgcgcgc	ggccacaact	3360
50	ggcagcccca	ggccggtcag	tgaccagagc	aggctgatgc	aggcaccgcc	ggccatgcac	3420
	agcacgcccc	cccaggtcaa	ggtattgagg	cccagccggc	tgatcaggtg	gctggccgctc	3480
	atggcggccga	gcaggatcga	cacccgggtg	gcccgaaca	gcaggccgaa	ggcctgggog	3540
	ctcaggccgt	agtgggcctg	gtaccaccag	gtggcaccgc	cgatgtaggc	gaacaggaag	3600
	aagaataaccg	cagcaaccgc	cagggtcggg	cgcaggaagc	ggcggtcggc	gaggatggcc	3660
55	aggtaggtgc	tgcaggcgtg	gcccagggcg	aggggttcgc	gtttgctggg	cggcaggggt	3720
	tcgggcaggt	tcagcaggct	gtgaccagc	accgtcacgc	ccatgccggc	gagtaccagc	3780
	attactgcac	gccagccgaa	atgtgcgtcg	atcacgcgc	ccagggcagg	tgccaggatc	3840
	ggtgcgacgc	cttcgatggt	catcagcagg	gcgaacagtt	tggctcgggc	cacgccttgg	3900
60	ctcacatcac	gcaccatgct	catgatcacc	accagggtea	gcgcaactgc	caggccctgg	3960
	aaaaagcgc	gcatgatcag	ggtgtcgagg	ctgggggctg	cggctgcgcc	cagcgagcac	4020
	aggatgaaca	gcagcaggcc	ggccagcagc	ggcttgcgcc	ggccataagc	gtcagcagtg	4080
	gggcccgaaga	tcagctggcc	ggcggccatg	gccagcagga	agaaggtcag	tgtcagctgt	4140
	acgcgggtga	agctagcctg	atagtggctg	gcatattccg	gcaggctcga	caggtacatg	4200
65	tcgacggcgg	aagggccgag	ggcggcagtc	aggcctaggc	ccagggcgaa	gctgaagggt	4260
	atgggagggg	agggatggc	ttgcatggtt	ttctctggct	gatttttcgc	ctaccgaccg	4320

ES 2 364 110 A1

	gtaggtttgc	gaatattatt	cgccgagtcg	gccaaaggtca	aacccttccg	caaggccact	4380
	gattcctgtg	gggagcgggc	atgcccgcga	acaccggcaa	agccggtgcc	accgagtcgc	4440
	cttcttcgcg	ggcatgcccc	ctcccacatt	gaccgcagag	gttggttacc	gtggttgcgt	4500
5	cagaacggca	cagccacggt	cagctggcta	tacacattgg	taccattccc	gcccacctgg	4560
	ttgccgccgt	tgctctcgtc	cttgccgggc	tggtaaaggc	ccaccagcgg	gctgattatc	4620
	aggtgctcgt	tgactgcccc	ttccacatac	aggtccagct	cccgcgcatac	gaggttgagg	4680
	ctttcgcggg	tgcgtacggt	gtcgaagtcg	aagtacagcg	ccccgactgt	gagattttcc	4740
10	agcgggtcgc	ccttcacgcc	cacatggtag	ataccctgtg	tgctgttgaa	ggggccggcg	4800
	tagttggcag	cgacttcacc	ctggaaccag	gtgccgtaac	cgctggacag	gcccacggaac	4860
	agcgcgtccc	agcctgccga	gtagcgggtg	tagcggtagg	taacctgcgg	tgcccacggc	4920
	aggtcggcga	aggtgtagcc	ggcctgcagg	taccaggctt	gctcggggcc	gtcgggtctt	4980
	tcctgccagc	cgtattcgaa	ggcgaactg	gcattgtcga	tgccagcgtt	gccttcgccc	5040
15	cgcacgctat	acacgtccat	gccttcgccc	gctttctgaa	agtcgctggc	ccattggctg	5100
	gtgacgtcga	tgccgtgaat	ccaggtcagc	ccgaggggtg	ccaaggcttg	ggtgtagtcc	5160
	agcgtgccgg	cggccagttc	ggtttcggcc	tgggcgcggt	tgctcgattt	cagccacagc	5220
	aggtcggcat	gcaggccatc	gctgcccccc	agggcgagca	ttgcgggtgc	gtcgaaggcg	5280
20	tggcggggcg	ccaggtagta	ggccccgccg	cggtccagcg	caccgtcggc	gacgccggtt	5340
	cccaggttcg	ggcgtcgtc	gttgatcaaa	aaaccactgc	ccaggcgaat	ggtctggcgg	5400
	ccggcggaaa	cgtccactcc	atccttgccc	agcaccggga	acaggtcggc	cgagcggcag	5460
	ccgaggaagg	cgtcttcgat	cttgggtggt	cgttcggagc	catcgggtgt	gcccggccga	5520
	tcgccatcgc	cccaggtggc	cgagctcacc	cagttcaggc	tgccgtacag	cgtgccggtt	5580
25	ccggccaggc	cctggtcacc	gctgaggcca	tacttgataa	agccttcacg	ccaggtcgaa	5640
	ccccctgtgg	tgccgtcgta	gttcttgccc	ctggtgaaca	tgccccatac	cgccagcatg	5700
	tcggcgttca	ggtggctgtc	atcgtcggcg	tacagctcaa	cgccgggcgc	ggcctggctg	5760
	gccagcaagg	ttgccagggc	caggtcggac	agcgtctgtg	gtttgaccat	ttgcacatcc	5820
30	ctcgtttggt	ctcggccacc	ttcacagggg	cctttgttgg	tcgggggcac	cctcggttct	5880
	ggcgagggcg	catcgcgggt	ggcggcgatg	gcctattagg	gcgtgtgcgg	tggggcgggg	5940
	tcttggtcgt	ggctgccaag	gcgcttgcac	gccttgcca	caggcgcggt	cagtagcgga	6000
	tcacaccoga	cttgagctcg	gtgaagtcat	cgatgaaggc	cgagccgaac	tcgcgccaa	6060
	tgccggaagc	cttgatgccc	ccaaacggta	cagccgggtc	gagcaggggt	tgcatgttga	6120
35	cccacagggg	accggcctgg	atgtgcggga	tcagtcgcat	ggccttgccc	aggtcgttgg	6180
	tccacagggc	ggcgtgagg	ccgtagggcg	aggcgttcat	caggtgcagc	agttcgtctt	6240
	cgctgtcata	aggcaggaag	gtcgccacag	ggccgaagg	ttcctgggtg	agcaggggtg	6300
	cgcagggctg	ccgggcgagg	attaccgtgg	gttcgacgaa	acagccgggg	ccgtcgcccc	6360
40	gggtgcccgc	gtgaatgate	ttggtgcctt	cggcgcgggc	gatggcgaac	agttcggcca	6420
	gcttctgctg	gtgcggcctt	ttggccacgg	ggccgaactg	ggtggcctcg	tcagtgggcg	6480
	agccgatttt	cagttggccc	agggcgtggg	acagggcgtc	cagcagcggg	tcgatgcgcg	6540
	agcgggtgac	atagaagcgc	tcgcccgcgg	cgagatttg	ccccgagtgc	aggaagccgg	6600
45	cctcogatgat	gcccgtccaca	gccttgcgg	ttgccacgtc	gggcaggaag	gccaccgcgt	6660
	tcttgcccgc	cagttccagt	gtcgcaacgg	tcagcttggc	gcccattggc	gcctggccta	6720
	cggcgatgcc	agtgggcacg	gagccgggtg	acgagacctt	gtcggtaacct	gcgtgctcga	6780
	tcagtgcctt	gcccaccagg	ccaccaccgg	tcagcagctt	cagtgcaccg	gcccggcaggc	6840
	ctgcttcggg	ggccagttcg	gcaatgcgca	gcagcgtcag	cgggggtgaat	tcgctgggct	6900
50	tgaggataat	gctgcagccg	gttgtcaggg	ccgagggccag	cttccagatg	gcgatcatgc	6960
	tggcgaagtt	ccacggcacg	atgccacca	ccacgccaat	cggtcgcgc	aggggtgaagg	7020
	cgctgtagcg	ctcaccggcg	aacgagggca	gcgacggggg	gatggctctg	ccggtgatct	7080
	tggtcgcccc	gcccggcgtg	tagcgcagga	agtgcgcggc	ctgctgtact	tcgaacgcac	7140
55	gggaaatgcc	gatgagcttg	ccggattgca	agtttccag	ctgcgccagt	tcttcgcggt	7200
	tggcttccag	caggtcggcc	agcttgaaca	gcaactgcgg	gcgggcggcg	gggctggtgt	7260
	gcgaccaggc	ggtaaagcct	tggcgcgagg	agctgacggc	atggtcgaca	tcggcctggt	7320
	tggcgtcggc	gatgtggggc	atggtctggc	cgttggccgg	gttgaccacg	gcaatgttct	7380
	acgacgactg	gctggcgagg	tgctggccgt	ggatgaacac	gccatgctcg	cgggcccagga	7440
60	aggccgtgac	ggcaggtagg	agggtagatg	cgctcatgca	gactccgggg	cagttggcca	7500
	aagtttgacg	cttaataagc	ggggcagtg	ggtgcttctg	cctgcgtgac	aggtgcatga	7560
	ctgtggctgc	caaccgcact	gggtaagcct	tgtgggagcg	gccttgtgtc	gcgatagggc	7620
	cgcagagcgg	ccccggcgat	ggtggcggcg	aagctgaaaa	tgctggggcc	gcttcgcgcc	7680
65	cctatcgcga	cgcaaggccg	ctcccacaaa	aaaagcgagc	gtaggcgggg	ctgattgctg	7740
	gcaggcagca	acaagcccgg	cggcagccat	cggcaagacg	ccatgccacc	ggcagcgcac	7800
	agtaatcact	cgttcaacgc	cacaaaaaca	agccggggca	tacgatgtca	ctcaataaca	7860

ES 2 364 110 A1

	agctcaccga	gcacctcaac	cgcgggcactg	tgggtttccc	caccgcactg	gccagcactg	7920
	tcgggctgat	catggccagc	ccgggtgatcc	tcaccgcgac	catgggcttt	ggcatcggcg	7980
	gcagcgcctt	cgccgtggcc	atgggtcatcg	ccgcactgat	gatgctggcg	cagtocacca	8040
5	cctttgccga	ggctgcgtcg	atcctgcccga	ccacgggctc	ggtatacgac	tacatcaact	8100
	gtggcatggg	ccgtttcttc	gccattaccg	gcacgctgtc	ggcctacctg	atcgtgcatg	8160
	tgttcgcogg	taccgcccga	accatcctgt	cgggggatg	ggcgtgggtg	aacttcgagc	8220
	acctcaatac	cctggcggaa	tccgcccggc	gttcgtggct	gctgggggtg	tgcttcgtgg	8280
	tggcgtttgc	ggtgctcaat	gcctttggcg	tcagcgcctt	cagccgcgog	gaagtgggtc	8340
10	tcaccttcgg	catgtggacc	accttgatgg	tgctcggcgt	gcttggcctg	atcgcgcgac	8400
	ccgcagtgga	actggacggc	ccgttcggcg	tgtcgtgggt	gggcaccgac	ctgatgacca	8460
	tcctctcgct	ggtcggcatg	gccatgttca	tgctcgttgg	ctgcgagttc	gtcacgccgc	8520
	ttgccccga	actgcgtcgc	tccgcctggg	tgctgcgcg	ggccatggcg	ctgggcctgt	8580
15	ttggcgtggc	cagctgcatg	ttcatctacg	gagcggcgat	gaagcggccag	gtggaaaaacg	8640
	tggtgctgga	tgccgccagt	ggcgtgcacc	tgctggacac	gcccattggcc	atcccgcgct	8700
	tcgccgagca	ggtgatgggt	gatattggcc	cagtgtggct	gggtatcggc	ttcctgttcg	8760
	ccggcgcggc	caccatcaac	acgctgatgg	ccggtgtgcc	acgcattctt	tacggcatgg	8820
	cggtggacgg	cgcgttgccc	aagggtttca	cctacctgca	cccgcgcttc	aagacgccgc	8880
20	tgctgtgcat	cctggtgggtg	gcgttgatcc	cttgccctgca	tgccctggta	ctgggcggca	8940
	acccggacaa	catcctgcac	ctggtgctgg	ccgccgtgtg	cgccctggagc	accgcctacc	9000
	tgctggtgac	cctgtcgggtg	gtgatattgc	gcacccggcg	cccagacctg	ccgcgtgcct	9060
	accgctcgcc	gctgttcccg	ttgccgcaga	tattctccag	tagcgggtatc	ctcactggca	9120
25	tggcgttcat	cacaccggcg	ggcatgaacc	ctgccgatgt	ctacgtgccc	ttcccatca	9180
	tgcttgccgc	cactgcggcc	tatgcattgt	tctggacgct	gtgggtgcag	aaggtaaac	9240
	cgttcaagcc	ggcgcgggtc	gaggatgtgc	tcgagaaaga	gtttgctgcc	gagcctggcc	9300
	acgccgtgga	gcacgtgctg	catgatcaga	aatttgctg	aacgcttgct	ggcgcgccga	9360
	gcgccttcag	gctatcgcgc	aggcgcacg	ctggcatgcc	tgccgcgcaa	cctggggcag	9420
30	cagaacctgg	tggcggccgg	ggtgatccac	gaccgcgccc	agggttggca	ggccacgggtg	9480
	cacgaacgcg	tcgaggccca	cctgctgatg	cacatcgtca	cctgtgagtt	ccagctgcag	9540
	ttgcctgctc	cgcaaggggg	cgaggtcagc	ctggagctgc	gccataccgg	tgcccttcgc	9600
	cgtgccggcc	tggcctgtgt	gtaccgcaag	ggcgaccggg	cgcccttcgc	ccgactgcgc	9660
35	gaccggttgc	tgcagcaggc	cgcaactggtg	ggcgcgctga	tgccgctgga	tttcaagcgc	9720
	ctgaccttgg	cctggcgcga	cgcccaatgg	ttgctgacct	tggagcacat	gggcggtagc	9780
	gaagtgggtca	accgcatgcc	agcgtttcgc	cgctacatcc	ccatcagccc	gcaacagcgg	9840
	gcgcacctga	tggccagcct	ggcccagttc	aacactttgc	tacctaacct	ttgacgcaaa	9900
40	ctggcatacg	ccttgctgta	tcaagcgacg	aatgatgaca	gttgtgcgca	catagataac	9960
	atgttaacaa	tgtgcgcata	acaacaaatc	ctgcgtcgag	ggcagccatg	catactcaac	10020
	aatccaaccg	tcaggggctg	gaacgctgga	ccacggccat	gcaacagatc	tgtggccggt	10080
	tcgagacgga	acttgcgtcc	aatcaactgc	tgttcatcgg	cgaggtttct	accttttccc	10140
	gtgccggctt	gccgctggcc	aacctgcgca	ccaatgcggg	caacatccgc	cggctgggcg	10200
45	aaaaccggac	ccttgacgat	gaccagcatt	gtttcctgggt	cagccagcgt	gcggggcatt	10260
	ccaccgtgtc	ccaggggggc	atgcaggtca	gcccgtgcgc	gggtgagctg	ctgctgatgg	10320
	attcggtcgg	gcgctgcgaa	atcaccccga	gtgggttgat	cgaacatgtc	tcgctggccc	10380
	tgtcgcgtga	gcaggtacgc	aagtatgtgc	aaggcagcgg	cccgatgttt	ggcaagatct	10440
50	cctcgagcaa	cgccctgcggg	cgcatgctgc	atgtgctgat	ggaccaactg	tgcaaggacg	10500
	gcaatgtaag	cggtgatggg	gcccagggcg	acgcgctgca	gaccgccttc	attgccctgc	10560
	tggagccagg	cctcagagcg	catggcgaag	cgctgggcaa	ccttggggcc	ttgaacgggg	10620
	ccaacctgcg	gggctacgtg	cagcaggtga	tcgacgagtc	cctgtcacag	cccgggctga	10680
	ccccgtccaa	cctggccgggt	cgccgaaca	tctcgggtcg	tcacctgtac	cggctgttcg	10740
55	aggaggaggg	cgatagtgtg	tgccgctaca	ttcagcgggc	gcgcctgaag	cgcagtgccg	10800
	atgacctggc	caaccgcttc	ttcaggagcg	agtcgattac	ctcgattgcc	tacaagtggg	10860
	ggtttaccga	ctcggcgcac	ttcagccgct	cgttcaagaa	acagttcgaa	cgctcgccca	10920
	aggactaccg	ggcgcaggcg	atggtttgag	tgtgatgggtg	ctgcttgtgc	gggcctcatc	10980
60	gccggcaagt	cacttgccgg	cggttcagcg	acggccgctt	aagtagcccg	acagctgggtg	11040
	cacggtcttg	ccggcagtg	gcagcagcgg	gcggaatgg	tccttgccga	ggatgcgcgc	11100
	atgcttgacc	gagctgacca	ggtcatagcg	cctcgatecc	tcctgcatac	cctcggcgag	11160
	tatcttgcaa	atgatgtggc	tgggcgtgac	gcccagccg	gagtagccct	gcacatagaa	11220
	agcgttgggg	cggttgtcga	gggtgcctat	ctgcggaaac	aggttggcac	tggtggccat	11280
65	cgggccgccc	caggccaggt	cgatgcgcac	gtctttcagg	taggggaaaa	tcttcagcat	11340
	cagcgcgcgg	ttccacgcct	tcaggtccag	cgggaagtgc	tcgacgaagg	gcgtggcggc	11400

ES 2 364 110 A1

```

gccaaacagc aggcggttct cgcgggtgac ccggtagtag tcgatcaccg ggcggatgtc 11460
gctgtaggcc ccgcgtatcg ggctgatgcg ctcgatcagc tcatccggca atggctcggg 11520
catcatctgg aaggcatagg tgtttatagt gcgtgcgtgc agctgcggct ccagcttggt 11580
5 gaggaagctg tcgcacgccc acagcagctt gctggcgcgt accgagccac ggccgggtgcg 11640
taccgtgatg cgctcgccgt aggtcacttc cagggccggg ctgtgttcga agatgcgcgc 11700
accatggccc accagtgcct gcgcttcgcc cagcagcagg ttcagggaat gcacatggcc 11760
accgcccattg tgcattcagg cgctgctgta ggcgttgctg ccgatgatct ggcgcacttc 11820
10 gctgccaccg agaaaacgga tctcgtcggg ggtattgatc gccttgaacg ccttctccca 11880
tttgccgagg gtctgttcct ggccggcggt gaagcccatg tagccatagc cgtggcagaa 11940
gtcggcgctg atggcgtagc gggcgatgcg gtccttgatg atgccggcgc ccagttcgct 12000
gatttcgaaa atatccctca cgccctgatc accgacgctg ctgcggatct tctccaggtc 12060
gtggccgatg cccgccatga tctgcccgcc gttgcgcccg ctaccgcccgt agcccagata 12120
15 acggccctcg agcacgacga tattggtcac gccttgttcc gccagctcca gggcggtggt 12180
aatgccggag aaaccgccac cgatcaccac gacatcggcc tcgatgtcgc gttccagggt 12240
tgggaagctc aggttgact tcttggtcgc cgagtagtag gtggggctct cgagggtgat 12300
catgacgccg cctgctgact ggaaatgggt agaatcat 12339

```

20 <210> 3

<211> 1296

<212> DNA

25 <213> *Pseudomonas putida* U

<220>

<221> CDS

30 <222> (1)..(1296)

<223> Secuencia codificante de TynA

<400> 3

```

35      atg tct ccc acg atc gcc cct gtg caa acc agc acc cgc cac ccc gac      48
      Met Ser Pro Thr Ile Ala Pro Val Gln Thr Ser Thr Arg His Pro Asp
      1              5              10              15
40      gcc act acc gtg gtg atc atc ggt ggc ggc att atc ggc ctc acc gcc      96
      Ala Thr Thr Val Val Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu Thr Ala
              20              25              30
45      gca ctg agc ctc gcc gaa cgc aac ata ccg gtg gtg gtg ctg gag aag      144
      Ala Leu Ser Leu Ala Glu Arg Asn Ile Pro Val Val Val Leu Glu Lys
              35              40              45
50      ggg cgc atc gct ggg gag cag tcg tcg cgc aac ctg ggc tgg gtg cgc      192
      Gly Arg Ile Ala Gly Glu Gln Ser Ser Arg Asn Leu Gly Trp Val Arg
              50              55              60
55      aag acc aac cgc cac gcc cat gac att ccc ctg gca ctg gcg gct gat      240
      Lys Thr Asn Arg His Ala His Asp Ile Pro Leu Ala Leu Ala Ala Asp
      65              70              75              80
60      cgg ctg tgg gcc gag atg ccc gca cgg gtt ggc agc gac gtt ggc tat      288
      Arg Leu Trp Ala Glu Met Pro Ala Arg Val Gly Ser Asp Val Gly Tyr
              85              90              95
65      cgg caa gcc ggc atc atg ttc atc ggc cgt aac gac acg cag atg ggc      336
      Arg Gln Ala Gly Ile Met Phe Ile Gly Arg Asn Asp Thr Gln Met Gly
              100              105              110
70      atg cat gaa ggc tgg ctg aaa agc gtc gag gcg ctg ggc ctg gat tcg      384
      Met His Glu Gly Trp Leu Lys Ser Val Glu Ala Leu Gly Leu Asp Ser

```

ES 2 364 110 A1

	115		120		125	
5	Arg Leu Leu 130	ctg agc acg cgg gaa atc acc cgg atg gtt Ser Thr Arg Glu Ile Thr Arg Met Val	ctg agc acg cgg gaa atc acc cgg atg gtt Leu Ser Thr Arg Glu Ile Thr Arg Met Val	ctg agc acg cgg gaa atc acc cgg atg gtt Leu Ser Thr Arg Glu Ile Thr Arg Met Val	ctg agc acg cgg gaa atc acc cgg atg gtt Leu Ser Thr Arg Glu Ile Thr Arg Met Val	432
10	Ala Asp Trp 145	gat tgg gca ggt ggc atc ttc acc ccc tcc gac gcc cgc gcc gaa Asp Trp Ala Gly Gly Ile Phe Thr Pro Ser Asp Ala Arg Ala Glu	gat tgg gca ggt ggc atc ttc acc ccc tcc gac gcc cgc gcc gaa Asp Trp Ala Gly Gly Ile Phe Thr Pro Ser Asp Ala Arg Ala Glu	gat tgg gca ggt ggc atc ttc acc ccc tcc gac gcc cgc gcc gaa Asp Trp Ala Gly Gly Ile Phe Thr Pro Ser Asp Ala Arg Ala Glu	gat tgg gca ggt ggc atc ttc acc ccc tcc gac gcc cgc gcc gaa Asp Trp Ala Gly Gly Ile Phe Thr Pro Ser Asp Ala Arg Ala Glu	480
15	Pro Thr Leu 165	acc ctg gcc gcc agc gcc atc gcc cgg cgc gcg atc gcc aaa ggt Thr Leu Ala Ala Ser Ala Ile Ala Arg Ala Ala Ile Ala Lys Gly	acc ctg gcc gcc agc gcc atc gcc cgg cgc gcg atc gcc aaa ggt Thr Leu Ala Ala Ser Ala Ile Ala Arg Ala Ala Ile Ala Lys Gly	acc ctg gcc gcc agc gcc atc gcc cgg cgc gcg atc gcc aaa ggt Thr Leu Ala Ala Ser Ala Ile Ala Arg Ala Ala Ile Ala Lys Gly	acc ctg gcc gcc agc gcc atc gcc cgg cgc gcg atc gcc aaa ggt Thr Leu Ala Ala Ser Ala Ile Ala Arg Ala Ala Ile Ala Lys Gly	528
20	Ala Val Val 180	gtg gta gtg gag aac tgc gcg gtg cgc acg ctg gtc acc gca gcc Val Val Val Glu Asn Cys Ala Val Arg Thr Leu Val Thr Ala Ala	gtg gta gtg gag aac tgc gcg gtg cgc acg ctg gtc acc gca gcc Val Val Val Glu Asn Cys Ala Val Arg Thr Leu Val Thr Ala Ala	gtg gta gtg gag aac tgc gcg gtg cgc acg ctg gtc acc gca gcc Val Val Val Glu Asn Cys Ala Val Arg Thr Leu Val Thr Ala Ala	gtg gta gtg gag aac tgc gcg gtg cgc acg ctg gtc acc gca gcc Val Val Val Glu Asn Cys Ala Val Arg Thr Leu Val Thr Ala Ala	576
25	Gly Arg Val 195	cgt gtc agc ggg gtg gtc acc gag caa ggt gaa atc cgc tgc gac Arg Val Ser Gly Val Val Thr Glu Gln Gly Glu Ile Arg Cys Asp	cgt gtc agc ggg gtg gtc acc gag caa ggt gaa atc cgc tgc gac Arg Val Ser Gly Val Val Thr Glu Gln Gly Glu Ile Arg Cys Asp	cgt gtc agc ggg gtg gtc acc gag caa ggt gaa atc cgc tgc gac Arg Val Ser Gly Val Val Thr Glu Gln Gly Glu Ile Arg Cys Asp	cgt gtc agc ggg gtg gtc acc gag caa ggt gaa atc cgc tgc gac Arg Val Ser Gly Val Val Thr Glu Gln Gly Glu Ile Arg Cys Asp	624
30	Gln Val Leu 210	gtg ttg ctg gcc ggt ggc ctg tgg tgc cgc aag ttc ctc ggc aac Val Leu Leu Ala Gly Gly Leu Trp Ser Arg Lys Phe Leu Gly Asn	gtg ttg ctg gcc ggt ggc ctg tgg tgc cgc aag ttc ctc ggc aac Val Leu Leu Ala Gly Gly Leu Trp Ser Arg Lys Phe Leu Gly Asn	gtg ttg ctg gcc ggt ggc ctg tgg tgc cgc aag ttc ctc ggc aac Val Leu Leu Ala Gly Gly Leu Trp Ser Arg Lys Phe Leu Gly Asn	gtg ttg ctg gcc ggt ggc ctg tgg tgc cgc aag ttc ctc ggc aac Val Leu Leu Ala Gly Gly Leu Trp Ser Arg Lys Phe Leu Gly Asn	672
35	Leu Gly Ile 225	atc aac ctg ccg acc ttg ccg ctg acc tgt tcc gtg ctg cgc Ile Asn Leu Pro Thr Leu Pro Leu Thr Cys Ser Val Leu Arg	atc aac ctg ccg acc ttg ccg ctg acc tgt tcc gtg ctg cgc Ile Asn Leu Pro Thr Leu Pro Leu Thr Cys Ser Val Leu Arg	atc aac ctg ccg acc ttg ccg ctg acc tgt tcc gtg ctg cgc Ile Asn Leu Pro Thr Leu Pro Leu Thr Cys Ser Val Leu Arg	atc aac ctg ccg acc ttg ccg ctg acc tgt tcc gtg ctg cgc Ile Asn Leu Pro Thr Leu Pro Leu Thr Cys Ser Val Leu Arg	720
40	Thr Glu Pro 245	gag ccc atg gac ggg cca acc gac atc gcc gtg ggc gca cca gat Glu Pro Met Asp Gly Pro Thr Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro Asp	gag ccc atg gac ggg cca acc gac atc gcc gtg ggc gca cca gat Glu Pro Met Asp Gly Pro Thr Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro Asp	gag ccc atg gac ggg cca acc gac atc gcc gtg ggc gca cca gat Glu Pro Met Asp Gly Pro Thr Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro Asp	gag ccc atg gac ggg cca acc gac atc gcc gtg ggc gca cca gat Glu Pro Met Asp Gly Pro Thr Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro Asp	768
45	Phe Ser Phe 260	tcc ttc cgc aag cac aag gac ggc ggc tac atc atc acc cag cgc Ser Phe Arg Lys His Lys Asp Gly Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Arg	tcc ttc cgc aag cac aag gac ggc ggc tac atc atc acc cag cgc Ser Phe Arg Lys His Lys Asp Gly Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Arg	tcc ttc cgc aag cac aag gac ggc ggc tac atc atc acc cag cgc Ser Phe Arg Lys His Lys Asp Gly Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Arg	tcc ttc cgc aag cac aag gac ggc ggc tac atc atc acc cag cgc Ser Phe Arg Lys His Lys Asp Gly Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Arg	816
50	Gly Ala Leu 275	gcg ctg gac gcc ttc ctc acc ctc gat cac ctg ctg ctg ggc aag Ala Leu Asp Ala Phe Leu Thr Leu Asp His Leu Leu Leu Gly Lys	gcg ctg gac gcc ttc ctc acc ctc gat cac ctg ctg ctg ggc aag Ala Leu Asp Ala Phe Leu Thr Leu Asp His Leu Leu Leu Gly Lys	gcg ctg gac gcc ttc ctc acc ctc gat cac ctg ctg ctg ggc aag Ala Leu Asp Ala Phe Leu Thr Leu Asp His Leu Leu Leu Gly Lys	gcg ctg gac gcc ttc ctc acc ctc gat cac ctg ctg ctg ggc aag Ala Leu Asp Ala Phe Leu Thr Leu Asp His Leu Leu Leu Gly Lys	864
55	Arg Tyr Leu 290	tac ctg ccc cag ctg cgt gcc cag cgg gac ttt ttg cgc atc agc Tyr Leu Pro Gln Leu Arg Ala Gln Arg Asp Phe Leu Arg Ile Ser	tac ctg ccc cag ctg cgt gcc cag cgg gac ttt ttg cgc atc agc Tyr Leu Pro Gln Leu Arg Ala Gln Arg Asp Phe Leu Arg Ile Ser	tac ctg ccc cag ctg cgt gcc cag cgg gac ttt ttg cgc atc agc Tyr Leu Pro Gln Leu Arg Ala Gln Arg Asp Phe Leu Arg Ile Ser	tac ctg ccc cag ctg cgt gcc cag cgg gac ttt ttg cgc atc agc Tyr Leu Pro Gln Leu Arg Ala Gln Arg Asp Phe Leu Arg Ile Ser	912
60	Phe Gly Lys 305	aag tac ttc ttc aag gac ctg gcc ctg gcc cgg cgc tgg aag Gly Lys Tyr Phe Phe Lys Asp Leu Ala Leu Ala Arg Arg Trp Lys	aag tac ttc ttc aag gac ctg gcc ctg gcc cgg cgc tgg aag Gly Lys Tyr Phe Phe Lys Asp Leu Ala Leu Ala Arg Arg Trp Lys	aag tac ttc ttc aag gac ctg gcc ctg gcc cgg cgc tgg aag Gly Lys Tyr Phe Phe Lys Asp Leu Ala Leu Ala Arg Arg Trp Lys	aag tac ttc ttc aag gac ctg gcc ctg gcc cgg cgc tgg aag Gly Lys Tyr Phe Phe Lys Asp Leu Ala Leu Ala Arg Arg Trp Lys	960
65	Ala Thr Asp 325	gat gta acc ccc ttc gag cgt gta cgg gta caa gac ccg cac Thr Val Thr Pro Phe Glu Arg Val Arg Val Gln Asp Pro His	gat gta acc ccc ttc gag cgt gta cgg gta caa gac ccg cac Thr Val Thr Pro Phe Glu Arg Val Arg Val Gln Asp Pro His	gat gta acc ccc ttc gag cgt gta cgg gta caa gac ccg cac Thr Val Thr Pro Phe Glu Arg Val Arg Val Gln Asp Pro His	gat gta acc ccc ttc gag cgt gta cgg gta caa gac ccg cac Thr Val Thr Pro Phe Glu Arg Val Arg Val Gln Asp Pro His	1008
70	Ala Asn Pro 340	aac ccg gcc ctc aac gac gag gcc atg cgc aac ctg aaa gcg gcc Asn Pro Ala Leu Asn Asp Glu Ala Met Arg Asn Leu Lys Ala Ala	aac ccg gcc ctc aac gac gag gcc atg cgc aac ctg aaa gcg gcc Asn Pro Ala Leu Asn Asp Glu Ala Met Arg Asn Leu Lys Ala Ala	aac ccg gcc ctc aac gac gag gcc atg cgc aac ctg aaa gcg gcc Asn Pro Ala Leu Asn Asp Glu Ala Met Arg Asn Leu Lys Ala Ala	aac ccg gcc ctc aac gac gag gcc atg cgc aac ctg aaa gcg gcc Asn Pro Ala Leu Asn Asp Glu Ala Met Arg Asn Leu Lys Ala Ala	1056
75	tgg ccg gtg 350	ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc gcc acg ccg gtg ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc gcc acg	ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc gcc acg ccg gtg ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc gcc acg	ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc gcc acg ccg gtg ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc gcc acg	ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc gcc acg ccg gtg ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc gcc acg	1104

ES 2 364 110 A1

	Trp	Pro	Val	Phe	Glu	Gln	Ala	Arg	Ile	Ala	Ser	Ala	Trp	Ala	Gly	Thr	
			355					360					365				
5	att	gac	gtc	acc	ccc	gac	tcc	aac	ccg	gtc	atc	ggc	ccg	gtg	gcc	agt	1152
	Ile	Asp	Val	Thr	Pro	Asp	Ser	Asn	Pro	Val	Ile	Gly	Pro	Val	Ala	Ser	
		370					375					380					
10	att	ccg	ggc	ctg	acc	ctg	gcc	acc	ggc	ttt	tcc	ggg	cat	ggc	ttc	ggc	1200
	Ile	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Gly	His	Gly	Phe	Gly	
		385				390					395					400	
15	acc	tcg	cct	gct	gct	ggc	cag	ctg	gcg	gca	gac	ctg	gtg	gcc	cag	gcc	1248
	Thr	Ser	Pro	Ala	Ala	Gly	Gln	Leu	Ala	Ala	Asp	Leu	Val	Ala	Gln	Ala	
				405					410					415			
20	acc	ccg	ctg	atc	gac	ccg	tca	ccg	tac	cgc	ttc	gag	cgt	ttc	gcc	tga	1296
	Thr	Pro	Leu	Ile	Asp	Pro	Ser	Pro	Tyr	Arg	Phe	Glu	Arg	Phe	Ala		
			420						425					430			
	<210> 4																
	<211> 431																
25	<212> PRT																
	<213> <i>Pseudomonas putida</i> U																
	<400> 4																
30	Met	Ser	Pro	Thr	Ile	Ala	Pro	Val	Gln	Thr	Ser	Thr	Arg	His	Pro	Asp	
	1				5					10					15		
35	Ala	Thr	Thr	Val	Val	Ile	Ile	Gly	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	Leu	Thr	Ala	
				20				25						30			
40	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala	Glu	Arg	Asn	Ile	Pro	Val	Val	Val	Leu	Glu	Lys	
			35					40						45			
45	Gly	Arg	Ile	Ala	Gly	Glu	Gln	Ser	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Trp	Val	Arg	
	50						55					60					
50	Lys	Thr	Asn	Arg	His	Ala	His	Asp	Ile	Pro	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Asp	
	65					70					75					80	
55	Arg	Leu	Trp	Ala	Glu	Met	Pro	Ala	Arg	Val	Gly	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	
					85					90					95		
60	Arg	Gln	Ala	Gly	Ile	Met	Phe	Ile	Gly	Arg	Asn	Asp	Thr	Gln	Met	Gly	
			100						105					110			
65	Met	His	Glu	Gly	Trp	Leu	Lys	Ser	Val	Glu	Ala	Leu	Gly	Leu	Asp	Ser	
			115					120					125				
70	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Met	Val	Pro	Gly	Gly	Arg	
		130					135					140					
75	Ala	Asp	Trp	Ala	Gly	Gly	Ile	Phe	Thr	Pro	Ser	Asp	Ala	Arg	Ala	Glu	
		145				150					155					160	
80	Pro	Thr	Leu	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Ala	Arg	Ala	Ala	Ile	Ala	Lys	Gly	
						165				170					175		

ES 2 364 110 A1

Ala Val Val Val Glu Asn Cys Ala Val Arg Thr Leu Val Thr Ala Ala
 180 185 190

5 Gly Arg Val Ser Gly Val Val Thr Glu Gln Gly Glu Ile Arg Cys Asp
 195 200 205

Gln Val Leu Leu Ala Gly Gly Leu Trp Ser Arg Lys Phe Leu Gly Asn
 210 215 220

10 Leu Gly Ile Asn Leu Pro Thr Leu Pro Leu Thr Cys Ser Val Leu Arg
 225 230 235 240

15 Thr Glu Pro Met Asp Gly Pro Thr Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro Asp
 245 250 255

Phe Ser Phe Arg Lys His Lys Asp Gly Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Arg
 260 265 270

20 Gly Ala Leu Asp Ala Phe Leu Thr Leu Asp His Leu Leu Leu Gly Lys
 275 280 285

25 Arg Tyr Leu Pro Gln Leu Arg Ala Gln Arg Asp Phe Leu Arg Ile Ser
 290 295 300

Phe Gly Lys Tyr Phe Phe Lys Asp Leu Ala Leu Ala Arg Arg Trp Lys
 305 310 315 320

30 Ala Thr Asp Val Thr Pro Phe Glu Arg Val Arg Val Gln Asp Pro His
 325 330 335

35 Ala Asn Pro Ala Leu Asn Asp Glu Ala Met Arg Asn Leu Lys Ala Ala
 340 345 350

40 Trp Pro Val Phe Glu Gln Ala Arg Ile Ala Ser Ala Trp Ala Gly Thr
 355 360 365

Ile Asp Val Thr Pro Asp Ser Asn Pro Val Ile Gly Pro Val Ala Ser
 370 375 380

45 Ile Pro Gly Leu Thr Leu Ala Thr Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Gly
 385 390 395 400

50 Thr Ser Pro Ala Ala Gly Gln Leu Ala Ala Asp Leu Val Ala Gln Ala
 405 410 415

Thr Pro Leu Ile Asp Pro Ser Pro Tyr Arg Phe Glu Arg Phe Ala
 420 425 430

55 <210> 5
 <211> 1140
 <212> DNA
 60 <213> *Pseudomonas putida* U
 <220>
 <221> CDS
 65 <222> (1)..(1140)
 <223> TynB

ES 2 364 110 A1

<400> 5

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

ES 2 364 110 A1

	Asp	Leu	Val	Ser	Tyr	Cys	Ser	Ser	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Gln	
	225					230					235					240	
5	tac	ccg	ctg	gtg	cgc	cgc	gag	tgg	gtc	aag	cct	ggc	gcg	ttc	ctg	gcc	768
	Tyr	Pro	Leu	Val	Arg	Arg	Glu	Trp	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Leu	Ala	
					245					250					255		
10	atg	cca	gcc	ccg	tgc	agt	atc	gac	gcc	ggc	atg	gag	cag	gac	gac	gtg	816
	Met	Pro	Ala	Pro	Cys	Ser	Ile	Asp	Ala	Gly	Met	Glu	Gln	Asp	Asp	Val	
				260					265					270			
15	cgc	aag	gtg	gtg	gac	aac	acc	ggc	ctc	tac	gag	gcc	tgg	ttc	gaa	gag	864
	Arg	Lys	Val	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Leu	Tyr	Glu	Ala	Trp	Phe	Glu	Glu	
			275					280					285				
20	ctg	ccc	aag	cct	gcg	cac	aac	cac	gta	ccg	ctg	gta	ggt	gtg	cgc	ttc	912
	Leu	Pro	Lys	Pro	Ala	His	Asn	His	Val	Pro	Leu	Val	Gly	Val	Arg	Phe	
		290					295					300					
25	atg	gac	atg	att	gcc	gaa	ggc	acg	ctg	gcc	gcc	gag	cag	gtg	gaa	gac	960
	Met	Asp	Met	Ile	Ala	Glu	Gly	Thr	Leu	Ala	Ala	Glu	Gln	Val	Glu	Asp	
	305					310					315					320	
30	atc	ggc	aag	atc	atc	agc	ggc	gac	gca	ccg	ggc	cgc	ctg	cat	gac	gac	1008
	Ile	Gly	Lys	Ile	Ile	Ser	Gly	Asp	Ala	Pro	Gly	Arg	Leu	His	Asp	Asp	
				325						330					335		
35	gaa	atc	atc	ctg	atg	tcg	gtg	ggc	ggc	atg	ccc	gtc	gaa	gac	gtg	gcc	1056
	Glu	Ile	Ile	Leu	Met	Ser	Val	Gly	Gly	Met	Pro	Val	Glu	Asp	Val	Ala	
				340				345						350			
40	tgg	ggc	acc	gtg	gtg	tac	cgc	aag	gcg	ctc	gag	caa	ggc	atc	ggc	gta	1104
	Trp	Gly	Thr	Val	Val	Tyr	Arg	Lys	Ala	Leu	Glu	Gln	Gly	Ile	Gly	Val	
			355				360						365				
45	aag	ctc	aac	ctc	tgg	gaa	acc	ccc	gtt	ctc	agc	tga					1140
	Lys	Leu	Asn	Leu	Trp	Glu	Thr	Pro	Val	Leu	Ser						
		370				375											
50	<210>	6															
	<211>	379															
	<212>	PRT															
	<213>	<i>Pseudomonas putida</i>	U														
55	<400>	6															
	Met	Thr	Leu	Asp	Thr	Arg	Ile	Asp	Phe	Ile	Tyr	Leu	Ser	Glu	Gln	Asp	
	1				5					10					15		
60	Met	Ile	Arg	Ala	Gly	Val	Thr	Asp	Met	Pro	Ala	Cys	Val	Asp	Thr	Met	
				20					25					30			
65	Glu	Glu	Met	Phe	Gly	Leu	Leu	Tyr	Gln	Gly	Asp	Tyr	Arg	Met	Ala	Gly	
			35					40					45				
	Pro	Asn	Ser	Asp	Ser	His	Gly	Ala	Met	Ile	Thr	Phe	Pro	Glu	His	Ser	
		50					55					60					

ES 2 364 110 A1

	Pro	Phe	Pro	Asn	Met	Pro	Lys	Pro	Thr	Ala	Asp	Arg	Arg	Met	Met	Ala	65 70 75 80
5	Met	Pro	Ala	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asn	Phe	Gln	Thr	Ala	Gly	Ala	Lys	Trp	85 90 95
	Tyr	Gly	Ser	Asn	Ile	Ala	Asn	Arg	Glu	Lys	Gly	Leu	Pro	Arg	Ser	Ile	100 105 110
10	Leu	Met	Phe	Thr	Leu	Asn	Asp	Ala	Asp	Thr	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	His	115 120 125
	Met	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Tyr	Arg	Thr	Gly	Ala	Ile	Pro	Gly	130 135 140
	Val	Gly	Ala	Arg	His	Leu	Ala	Arg	Lys	Asp	Ala	Lys	Val	Ile	Gly	Leu	145 150 155 160
20	Ala	Gly	Pro	Gly	Val	Met	Gly	Lys	Thr	Thr	Val	Ala	Ala	Phe	Met	Ala	165 170 175
	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	Gln	Lys	180 185 190
	Asn	Leu	Asp	Ala	Phe	Val	Ala	Trp	Val	Lys	Thr	Ser	Phe	Pro	Gln	Ile	195 200 205
30	Thr	His	Val	Gln	Val	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Val	Arg	Gly	Ser	210 215 220
	Asp	Leu	Val	Ser	Tyr	Cys	Ser	Ser	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Gln	225 230 235 240
	Tyr	Pro	Leu	Val	Arg	Arg	Glu	Trp	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Leu	Ala	245 250 255
40	Met	Pro	Ala	Pro	Cys	Ser	Ile	Asp	Ala	Gly	Met	Glu	Gln	Asp	Asp	Val	260 265 270
	Arg	Lys	Val	Val	Asp	Asn	Thr	Gly	Leu	Tyr	Glu	Ala	Trp	Phe	Glu	Glu	275 280 285
	Leu	Pro	Lys	Pro	Ala	His	Asn	His	Val	Pro	Leu	Val	Gly	Val	Arg	Phe	290 295 300
50	Met	Asp	Met	Ile	Ala	Glu	Gly	Thr	Leu	Ala	Ala	Glu	Gln	Val	Glu	Asp	305 310 315 320
	Ile	Gly	Lys	Ile	Ile	Ser	Gly	Asp	Ala	Pro	Gly	Arg	Leu	His	Asp	Asp	325 330 335
	Glu	Ile	Ile	Leu	Met	Ser	Val	Gly	Gly	Met	Pro	Val	Glu	Asp	Val	Ala	340 345 350
60	Trp	Gly	Thr	Val	Val	Tyr	Arg	Lys	Ala	Leu	Glu	Gln	Gly	Ile	Gly	Val	355 360 365
	Lys	Leu	Asn	Leu	Trp	Glu	Thr	Pro	Val	Leu	Ser	370 375					

ES 2 364 110 A1

<210> 7

<211> 1488

<212> DNA

5 <213> *Pseudomonas putida* U

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1488)

<223> TynC

<400> 7

15

atg agc gac atc acc ctc cta cct gcc gtc acg gcc ttc ctg gcc cgc 48
Met Ser Asp Ile Thr Leu Leu Pro Ala Val Thr Ala Phe Leu Ala Arg
1 5 10 15

20

gag cat ggc gtg ttc atc cac ggc cag cac ctc gcc agc cag tcg tcg 96
Glu His Gly Val Phe Ile His Gly Gln His Leu Ala Ser Gln Ser Ser
20 25 30

25

tcg aac att gcc gtg gtc aac ccg gcc aac ggc cag acc atc gcc cac 144
Ser Asn Ile Ala Val Val Asn Pro Ala Asn Gly Gln Thr Ile Ala His
35 40 45

30

atc gcc gac gcc aac cag gcc gat gtc gac cat gcc gtc agc tcc tcg 192
Ile Ala Asp Ala Asn Gln Ala Asp Val Asp His Ala Val Ser Ser Ser
50 55 60

35

cgc caa ggc ttt acc gcc tgg tcg cac acc agc ccc gcc gcc cgc gcc 240
Arg Gln Gly Phe Thr Ala Trp Ser His Thr Ser Pro Ala Ala Arg Ala
65 70 75 80

40

gca gtg ctg ttc aag ctg gcc gac ctg ctg gaa gcc aac cgc gaa gaa 288
Ala Val Leu Phe Lys Leu Ala Asp Leu Leu Glu Ala Asn Arg Glu Glu
85 90 95

45

ctg gcg cag ctg gaa acc ttg caa tcc ggc aag ctc atc ggc att tcc 336
Leu Ala Gln Leu Glu Thr Leu Gln Ser Gly Lys Leu Ile Gly Ile Ser
100 105 110

50

cgt gcg ttc gaa gta cag cag gcc gcg cac ttc ctg cgc tac tac gcc 384
Arg Ala Phe Glu Val Gln Gln Ala Ala His Phe Leu Arg Tyr Tyr Ala
115 120 125

55

ggc tgg gcg acc aag atc acc gcc cag acc atc acc ccg tcg ctg ccc 432
Gly Trp Ala Thr Lys Ile Thr Gly Gln Thr Ile Thr Pro Ser Leu Pro
130 135 140

60

tcg ttc gcc ggt gag cgc tac agc gcc ttc acc ctg cgc gag ccg att 480
Ser Phe Ala Gly Glu Arg Tyr Ser Ala Phe Thr Leu Arg Glu Pro Ile
145 150 155 160

65

ggc gtg gtg gtg ggc atc gtg ccg tgg aac ttc gcc agc atg atc gcc 528
Gly Val Val Val Gly Ile Val Pro Trp Asn Phe Ala Ser Met Ile Ala
165 170 175

atc tgg aag ctg gcc tcg gcc ctg aca acc ggc tgc agc att atc ctc 576
Ile Trp Lys Leu Ala Ser Ala Leu Thr Thr Gly Cys Ser Ile Ile Leu

ES 2 364 110 A1

	180		185		190	
5	aag ccc agc gaa ttc acc ccg ctg acg ctg ctg cgc att gcc gaa ctg Lys Pro Ser Glu Phe Thr Pro Leu Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu Leu 195 200 205					624
10	gcc acc gaa gca ggc ctg ccg gcc ggt gca ctg aac gtg ctg acc ggt Ala Thr Glu Ala Gly Leu Pro Ala Gly Ala Leu Asn Val Leu Thr Gly 210 215 220					672
15	ggt ggc ctg gtg ggc aag gca ctg atc gag cac gca ggt acc gac aag Gly Gly Leu Val Gly Lys Ala Leu Ile Glu His Ala Gly Thr Asp Lys 225 230 235 240					720
20	gtc tcg ttc acc ggc tcc gtg ccc act ggc atc gcc gta ggc cag gct Val Ser Phe Thr Gly Ser Val Pro Thr Gly Ile Ala Val Gly Gln Ala 245 250 255					768
25	gcc atg ggc gcc aag ctg acc cgt gcg aca ctg gaa ctg ggc ggc aag Ala Met Gly Ala Lys Leu Thr Arg Ala Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys 260 265 270					816
30	aac gcg gtg gcc ttc ctg ccc gac gtg gca acc gac aag gct gtg gac Asn Ala Val Ala Phe Leu Pro Asp Val Ala Thr Asp Lys Ala Val Asp 275 280 285					864
35	ggc atc atc gag gcc ggc ttc ctg cac tcg ggg caa atc tgc gcc gcg Gly Ile Ile Glu Ala Gly Phe Leu His Ser Gly Gln Ile Cys Ala Ala 290 295 300					912
40	ggc gag cgc ttc tat gtg cac cgc tcg cgc atc gac ccg ctg ctg gac Gly Glu Arg Phe Tyr Val His Arg Ser Arg Ile Asp Pro Leu Leu Asp 305 310 315 320					960
45	gcc ctg tcc cag cgc ctg ggc caa ctg aaa atc ggc tcg cca ctg gac Ala Leu Ser Gln Arg Leu Gly Gln Leu Lys Ile Gly Ser Pro Leu Asp 325 330 335					1008
50	gag gcc acc cag ttc ggc ccc gtg gcc aac aag ccg cac cag cag aag Glu Ala Thr Gln Phe Gly Pro Val Ala Asn Lys Pro His Gln Gln Lys 340 345 350					1056
55	ctg gcc gaa ctg ttc gcc atc gcc cgc gcc gaa ggc agc cag atc att Leu Ala Glu Leu Phe Ala Ile Ala Arg Ala Glu Gly Ser Gln Ile Ile 355 360 365					1104
60	cac ggc ggc acc ctg ggc gac ggc ccc ggc tgt ttc gtc gaa ccc acg His Gly Gly Thr Leu Gly Asp Gly Pro Gly Cys Phe Val Glu Pro Thr 370 375 380					1152
65	gta atc ctc gcc cgg tca gcc tgc gac acc ctg ctc acc cag gaa acc Val Ile Leu Ala Arg Ser Ala Cys Asp Thr Leu Leu Thr Gln Glu Thr 385 390 395 400					1200
70	ttc ggc cct gtg gcg acc ttc ctg cct tat gac gac gaa gac gaa ctg Phe Gly Pro Val Ala Thr Phe Leu Pro Tyr Asp Asp Glu Asp Glu Leu 405 410 415					1248
75	ctg cac ctg atg aac gcc tcg ccc tac ggc ctc agc gcc agc ctg tgg					1296

ES 2 364 110 A1

	Leu	His	Leu	Met	Asn	Ala	Ser	Pro	Tyr	Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Trp	
				420					425					430			
5	acc	aac	gac	ctg	ggc	aag	gcc	atg	cgc	atg	atc	ccg	caa	atc	cag	gcc	1344
	Thr	Asn	Asp	Leu	Gly	Lys	Ala	Met	Arg	Met	Ile	Pro	Gln	Ile	Gln	Ala	
			435				440						445				
10	ggt	acc	ctg	tgg	gtc	aac	atg	cac	acc	ctg	ctc	gac	ccg	gct	gta	ccg	1392
	Gly	Thr	Leu	Trp	Val	Asn	Met	His	Thr	Leu	Leu	Asp	Pro	Ala	Val	Pro	
			450				455					460					
15	ttt	ggg	ggc	atc	aag	gct	tcc	ggc	att	ggc	cgc	gag	ttc	ggc	tcg	gcc	1440
	Phe	Gly	Gly	Ile	Lys	Ala	Ser	Gly	Ile	Gly	Arg	Glu	Phe	Gly	Ser	Ala	
	465				470					475					480		
20	ttc	atc	gat	gac	ttc	acc	gag	ctc	aag	tcg	gtg	atg	atc	cgc	tac	tga	1488
	Phe	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Glu	Leu	Lys	Ser	Val	Met	Ile	Arg	Tyr		
				485						490				495			
	<210> 8																
	<211> 495																
25	<212> PRT																
	<213> <i>Pseudomonas putida</i> U																
	<400> 8																
30	Met	Ser	Asp	Ile	Thr	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	Ala	Arg	
	1				5					10					15		
35	Glu	His	Gly	Val	Phe	Ile	His	Gly	Gln	His	Leu	Ala	Ser	Gln	Ser	Ser	
				20					25					30			
40	Ser	Asn	Ile	Ala	Val	Val	Asn	Pro	Ala	Asn	Gly	Gln	Thr	Ile	Ala	His	
			35					40					45				
45	Ile	Ala	Asp	Ala	Asn	Gln	Ala	Asp	Val	Asp	His	Ala	Val	Ser	Ser	Ser	
		50					55					60					
50	Arg	Gln	Gly	Phe	Thr	Ala	Trp	Ser	His	Thr	Ser	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	
	65					70					75					80	
55	Ala	Val	Leu	Phe	Lys	Leu	Ala	Asp	Leu	Leu	Glu	Ala	Asn	Arg	Glu	Glu	
					85					90					95		
60	Leu	Ala	Gln	Leu	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	Gly	Ile	Ser	
				100					105					110			
65	Arg	Ala	Phe	Glu	Val	Gln	Gln	Ala	Ala	His	Phe	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Ala	
			115					120					125				
70	Gly	Trp	Ala	Thr	Lys	Ile	Thr	Gly	Gln	Thr	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	
		130						135				140					
75	Ser	Phe	Ala	Gly	Glu	Arg	Tyr	Ser	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Glu	Pro	Ile	
	145					150					155					160	
80	Gly	Val	Val	Val	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Asn	Phe	Ala	Ser	Met	Ile	Ala	
					165					170					175		

ES 2 364 110 A1

	Ile	Trp	Lys	Leu	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Gly	Cys	Ser	Ile	Ile	Leu	
				180					185					190			
5	Lys	Pro	Ser	Glu	Phe	Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Ala	Glu	Leu	
			195					200					205				
	Ala	Thr	Glu	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Gly	Ala	Leu	Asn	Val	Leu	Thr	Gly	
		210					215					220					
10	Gly	Gly	Leu	Val	Gly	Lys	Ala	Leu	Ile	Glu	His	Ala	Gly	Thr	Asp	Lys	
	225					230					235					240	
	Val	Ser	Phe	Thr	Gly	Ser	Val	Pro	Thr	Gly	Ile	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	
15					245					250					255		
	Ala	Met	Gly	Ala	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	Thr	Leu	Glu	Leu	Gly	Gly	Lys	
				260					265					270			
20	Asn	Ala	Val	Ala	Phe	Leu	Pro	Asp	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ala	Val	Asp	
			275					280					285				
	Gly	Ile	Ile	Glu	Ala	Gly	Phe	Leu	His	Ser	Gly	Gln	Ile	Cys	Ala	Ala	
25		290					295					300					
	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr	Val	His	Arg	Ser	Arg	Ile	Asp	Pro	Leu	Leu	Asp	
	305					310					315					320	
30	Ala	Leu	Ser	Gln	Arg	Leu	Gly	Gln	Leu	Lys	Ile	Gly	Ser	Pro	Leu	Asp	
				325						330					335		
	Glu	Ala	Thr	Gln	Phe	Gly	Pro	Val	Ala	Asn	Lys	Pro	His	Gln	Gln	Lys	
35				340					345					350			
	Leu	Ala	Glu	Leu	Phe	Ala	Ile	Ala	Arg	Ala	Glu	Gly	Ser	Gln	Ile	Ile	
			355					360					365				
40	His	Gly	Gly	Thr	Leu	Gly	Asp	Gly	Pro	Gly	Cys	Phe	Val	Glu	Pro	Thr	
		370					375					380					
	Val	Ile	Leu	Ala	Arg	Ser	Ala	Cys	Asp	Thr	Leu	Leu	Thr	Gln	Glu	Thr	
45						390					395					400	
	Phe	Gly	Pro	Val	Ala	Thr	Phe	Leu	Pro	Tyr	Asp	Asp	Glu	Asp	Glu	Leu	
					405					410					415		
50	Leu	His	Leu	Met	Asn	Ala	Ser	Pro	Tyr	Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Trp	
				420					425					430			
	Thr	Asn	Asp	Leu	Gly	Lys	Ala	Met	Arg	Met	Ile	Pro	Gln	Ile	Gln	Ala	
55			435					440					445				
	Gly	Thr	Leu	Trp	Val	Asn	Met	His	Thr	Leu	Leu	Asp	Pro	Ala	Val	Pro	
		450					455					460					
60	Phe	Gly	Gly	Ile	Lys	Ala	Ser	Gly	Ile	Gly	Arg	Glu	Phe	Gly	Ser	Ala	
	465					470					475					480	
	Phe	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Glu	Leu	Lys	Ser	Val	Met	Ile	Arg	Tyr		
65					485					490							

ES 2 364 110 A1

<210> 9

<211> 942

<212> DNA

5 <213> *Pseudomonas putida* U

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(942)

<223> TynR

<400> 9

15

atg cat act caa caa tcc aac cgt cag ggg ctg gaa cgc tgg acc acg 48
 Met His Thr Gln Gln Ser Asn Arg Gln Gly Leu Glu Arg Trp Thr Thr
 1 5 10 15

20

gcc atg caa cag atc tgt ggc cgt ttc gag acg gaa ctt gcg tcc aat 96
 Ala Met Gln Gln Ile Cys Gly Arg Phe Glu Thr Glu Leu Ala Ser Asn
 20 25 30

25

cac tcg ctg ttc atc ggc gag gtt tct acc ttt tcc cgt gcc ggc ttg 144
 His Ser Leu Phe Ile Gly Glu Val Ser Thr Phe Ser Arg Ala Gly Leu
 35 40 45

30

ccg ctg gcc aac ctg cgc acc aat gcc ggc aac atc cgc cgg ctg ggc 192
 Pro Leu Ala Asn Leu Arg Thr Asn Ala Gly Asn Ile Arg Arg Leu Gly
 50 55 60

35

gaa aac ccg acc ctt gac gat gac cag cat tgt ttc ctg gtc agc cag 240
 Glu Asn Pro Thr Leu Asp Asp Asp Gln His Cys Phe Leu Val Ser Gln
 65 70 75 80

40

cgt gcg ggg cat tcc acc gtg tcc cag ggg ggc atg cag gtc agc ctg 288
 Arg Ala Gly His Ser Thr Val Ser Gln Gly Gly Met Gln Val Ser Leu
 85 90 95

45

gcg ccg ggt gag ctg ctg ctg atg gat tcg gtc ggg cgc tgc gaa atc 336
 Ala Pro Gly Glu Leu Leu Leu Met Asp Ser Val Gly Arg Cys Glu Ile
 100 105 110

50

acc ccc agt ggg ttg atc gaa cat gtc tcg ctg gcc ctg tcg cgt gag 384
 Thr Pro Ser Gly Leu Ile Glu His Val Ser Leu Ala Leu Ser Arg Glu
 115 120 125

55

cag gta cgc aag tat gtg caa ggc agc ggc ccg atg ttt ggc aag atc 432
 Gln Val Arg Lys Tyr Val Gln Gly Ser Gly Pro Met Phe Gly Lys Ile
 130 135 140

60

tcc tcg agc aac gcc tgc ggg cgc atg ctg cat gtg ctg atg gac caa 480
 Ser Ser Ser Asn Ala Cys Gly Arg Met Leu His Val Leu Met Asp Gln
 145 150 155 160

65

ctg tgc aag gac ggc aat gta agc ggt gat ggg gcc cag ggc gac gcg 528
 Leu Cys Lys Asp Gly Asn Val Ser Gly Asp Gly Ala Gln Gly Asp Ala
 165 170 175

ES 2 364 110 A1

Arg Ala Gly His Ser Thr Val Ser Gln Gly Gly Met Gln Val Ser Leu
 85 90 95
 5 Ala Pro Gly Glu Leu Leu Leu Met Asp Ser Val Gly Arg Cys Glu Ile
 100 105 110
 Thr Pro Ser Gly Leu Ile Glu His Val Ser Leu Ala Leu Ser Arg Glu
 115 120 125
 10 Gln Val Arg Lys Tyr Val Gln Gly Ser Gly Pro Met Phe Gly Lys Ile
 130 135 140
 Ser Ser Ser Asn Ala Cys Gly Arg Met Leu His Val Leu Met Asp Gln
 15 145 150 155 160
 Leu Cys Lys Asp Gly Asn Val Ser Gly Asp Gly Ala Gln Gly Asp Ala
 165 170 175
 20 Leu Gln Thr Ala Phe Ile Ala Leu Leu Glu Pro Gly Phe Glu Arg His
 180 185 190
 Gly Glu Ala Leu Gly Asn Leu Gly Ala Leu Asn Gly Ala Asn Leu Arg
 195 200 205
 25 Gly Tyr Val Gln Gln Val Ile Asp Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Leu
 210 215 220
 Thr Pro Ser Asn Leu Ala Gly Arg Leu Asn Ile Ser Val Arg His Leu
 30 225 230 235 240
 Tyr Arg Leu Phe Glu Glu Glu Gly Asp Ser Val Cys Arg Tyr Ile Gln
 245 250 255
 35 Arg Ala Arg Leu Lys Arg Ser Ala Asp Asp Leu Ala Asn Pro Phe Phe
 260 265 270
 Arg Ser Glu Ser Ile Thr Ser Ile Ala Tyr Lys Trp Gly Phe Thr Asp
 40 275 280 285
 Ser Ala His Phe Ser Arg Ser Phe Lys Lys Gln Phe Glu Arg Ser Pro
 290 295 300
 45 Lys Asp Tyr Arg Ala Gln Ala Met Val
 305 310

<210> 11

50 <211> 1335

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

55 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1335)

60 <223> TynD

<400> 11

65 atg att tct acc cat ttc cag tca gca ggc ggc gtc atg atc acc ctc
 Met Ile Ser Thr His Phe Gln Ser Ala Gly Gly Val Met Ile Thr Leu

48

ES 2 364 110 A1

	Arg	Ala	Ser	Lys	Leu	Leu	Trp	Ala	Cys	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn	Lys	Leu	
				245						250					255		
5	gag	ccg	cag	ctg	cac	gca	cgc	act	ata	aac	acc	tat	gcc	ttc	cag	atg	816
	Glu	Pro	Gln	Leu	His	Ala	Arg	Thr	Ile	Asn	Thr	Tyr	Ala	Phe	Gln	Met	
				260					265					270			
10	atg	acc	gag	cca	ttg	ccg	gat	gag	ctg	atc	gag	cgc	atc	agc	ccg	ata	864
	Met	Thr	Glu	Pro	Leu	Pro	Asp	Glu	Leu	Ile	Glu	Arg	Ile	Ser	Pro	Ile	
			275					280					285				
15	cgc	ggg	gcc	tac	agc	gac	atc	cgc	ccg	gtg	atc	gac	tac	tac	cgg	gtc	912
	Arg	Gly	Ala	Tyr	Ser	Asp	Ile	Arg	Pro	Val	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Val	
		290					295					300					
20	acc	cgc	gag	aac	cgc	ctg	ctg	ttt	ggc	gcc	gcc	acg	ccc	ttc	gtc	gag	960
	Thr	Arg	Glu	Asn	Arg	Leu	Leu	Phe	Gly	Ala	Ala	Thr	Pro	Phe	Val	Glu	
	305				310					315					320		
25	cac	ttc	ccg	ctg	gac	ctg	aag	gcg	tgg	aac	cgc	gcg	ctg	atg	ctg	aag	1008
	His	Phe	Pro	Leu	Asp	Leu	Lys	Ala	Trp	Asn	Arg	Ala	Leu	Met	Leu	Lys	
					325					330					335		
30	att	ttc	ccc	tac	ctg	aaa	gac	gtg	cgc	atc	gac	ctg	gcc	tgg	ggc	ggc	1056
	Ile	Phe	Pro	Tyr	Leu	Lys	Asp	Val	Arg	Ile	Asp	Leu	Ala	Trp	Gly	Gly	
				340					345					350			
35	ccg	atg	gcc	acc	agt	gcc	aac	ctg	ttt	ccg	cag	ata	ggc	acc	ctc	gac	1104
	Pro	Met	Ala	Thr	Ser	Ala	Asn	Leu	Phe	Pro	Gln	Ile	Gly	Thr	Leu	Asp	
			355					360					365				
40	aac	cgc	ccc	aac	gct	ttc	tat	gtg	cag	ggc	tac	tcc	ggc	ttt	ggc	gtc	1152
	Asn	Arg	Pro	Asn	Ala	Phe	Tyr	Val	Gln	Gly	Tyr	Ser	Gly	Phe	Gly	Val	
		370				375						380					
45	aoc	ccc	agc	cac	atc	att	tgc	aag	ata	ctc	gcc	gag	ggt	atg	cag	gag	1200
	Thr	Pro	Ser	His	Ile	Ile	Cys	Lys	Ile	Leu	Ala	Glu	Gly	Met	Gln	Glu	
	385				390					395					400		
50	gga	tcg	aag	cgc	tat	gac	ctg	gtc	agc	tcg	gtc	aag	cat	gcg	cgc	atc	1248
	Gly	Ser	Lys	Arg	Tyr	Asp	Leu	Val	Ser	Ser	Val	Lys	His	Ala	Arg	Ile	
					405					410					415		
55	ctc	ggc	aag	gac	cat	ttc	cgc	ccg	ctg	ctg	ctc	act	gcc	ggc	aag	acc	1296
	Leu	Gly	Lys	Asp	His	Phe	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Lys	Thr	
				420					425					430			
60	gtg	cac	cag	ctg	tcg	ggc	tac	ttc	aac	ggc	cgt	cgc	tga				1335
	Val	His	Gln	Leu	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asn	Gly	Arg	Arg					
			435					440									

<210> 12

60 <211> 444

<212> PRT

<213> *Pseudomonas putida* U

65

ES 2 364 110 A1

<400> 12

5	Met	Ile	Ser	Thr	His	Phe	Gln	Ser	Ala	Gly	Gly	Val	Met	Ile	Thr	Leu
	1				5					10						15
10	Glu	Ser	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Thr	Lys	Lys	Tyr	Asn	Leu	Ser	Phe
				20					25					30		
15	Pro	Thr	Leu	Glu	Arg	Asp	Ile	Glu	Ala	Asp	Val	Val	Val	Ile	Gly	Gly
			35					40					45			
20	Gly	Phe	Ser	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Ala	Glu	Gln	Gly	Val
		50					55					60				
25	Thr	Asn	Ile	Val	Val	Leu	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Gly	Gly	Ser
	65					70					75					80
30	Gly	Arg	Asn	Gly	Gly	Gln	Ile	Met	Ala	Gly	Ile	Gly	His	Asp	Leu	Glu
				85						90					95	
35	Lys	Ile	Arg	Ser	Ser	Val	Gly	Asp	Gln	Gly	Val	Arg	Asp	Ile	Phe	Glu
			100						105					110		
40	Ile	Ser	Glu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ile	Ile	Lys	Asp	Arg	Ile	Ala	Arg	Tyr
			115				120						125			
45	Ala	Ile	Asp	Ala	Asp	Phe	Cys	His	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Met	Gly	Phe	Asn
		130					135					140				
50	Arg	Arg	Gln	Glu	Gln	Thr	Leu	Arg	Lys	Trp	Glu	Lys	Ala	Phe	Lys	Ala
	145					150					155					160
55	Ile	Asn	Thr	Arg	Asp	Glu	Ile	Arg	Phe	Leu	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Arg
					165					170					175	
60	Gln	Ile	Ile	Gly	Ser	Asn	Ala	Tyr	Ser	Ser	Ala	Leu	Met	His	Met	Gly
				180					185					190		
65	Gly	Gly	His	Val	His	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Ala
			195					200					205			
70	Leu	Val	Gly	His	Gly	Ala	Arg	Ile	Phe	Glu	His	Ser	Pro	Ala	Leu	Glu
		210					215					220				
75	Val	Thr	Tyr	Gly	Glu	Arg	Ile	Thr	Val	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Ser	Val
	225					230					235					240

ES 2 364 110 A1

Arg Ala Ser Lys Leu Leu Trp Ala Cys Asp Ser Phe Leu Asn Lys Leu
 245 250 255

5
 Glu Pro Gln Leu His Ala Arg Thr Ile Asn Thr Tyr Ala Phe Gln Met
 260 265 270

10
 Met Thr Glu Pro Leu Pro Asp Glu Leu Ile Glu Arg Ile Ser Pro Ile
 275 280 285

15
 Arg Gly Ala Tyr Ser Asp Ile Arg Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Arg Val
 290 295 300

20
 Thr Arg Glu Asn Arg Leu Leu Phe Gly Ala Ala Thr Pro Phe Val Glu
 305 310 315 320

25
 His Phe Pro Leu Asp Leu Lys Ala Trp Asn Arg Ala Leu Met Leu Lys
 325 330 335

30
 Ile Phe Pro Tyr Leu Lys Asp Val Arg Ile Asp Leu Ala Trp Gly Gly
 340 345 350

35
 Pro Met Ala Thr Ser Ala Asn Leu Phe Pro Gln Ile Gly Thr Leu Asp
 355 360 365

40
 Asn Arg Pro Asn Ala Phe Tyr Val Gln Gly Tyr Ser Gly Phe Gly Val
 370 375 380

45
 Thr Pro Ser His Ile Ile Cys Lys Ile Leu Ala Glu Gly Met Gln Glu
 385 390 395 400

50
 Gly Ser Lys Arg Tyr Asp Leu Val Ser Ser Val Lys His Ala Arg Ile
 405 410 415

55
 Leu Gly Lys Asp His Phe Arg Pro Leu Leu Leu Thr Ala Gly Lys Thr
 420 425 430

60
 Val His Gln Leu Ser Gly Tyr Phe Asn Gly Arg Arg
 435 440

<210> 13

60 <211> 1218

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

65 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1218)

ES 2 364 110 A1

<223> TynF

<400> 13

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

ES 2 364 110 A1

	Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Asp	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Pro	Thr	Leu	Ala	Val	
	210						215					220					
5	gct	gcg	gta	ttc	ttc	ttc	ctg	ttc	gcc	tac	atc	ggc	ggt	gcc	acc	ctg	720
	Ala	Ala	Val	Phe	Phe	Phe	Leu	Phe	Ala	Tyr	Ile	Gly	Gly	Ala	Thr	Leu	
	225					230					235					240	
10	gtg	tac	cag	gcc	cac	tac	ggc	ctg	agc	gcc	cag	gcc	ttc	ggc	ctg	ctg	768
	Val	Tyr	Gln	Ala	His	Tyr	Gly	Leu	Ser	Ala	Gln	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu	
					245					250					255		
15	ttt	ggc	gcc	acc	ggg	gtg	tcg	atc	ctg	ctc	ggc	gcc	atg	acg	gcc	agc	816
	Phe	Gly	Ala	Thr	Gly	Val	Ser	Ile	Leu	Leu	Gly	Ala	Met	Thr	Ala	Ser	
				260					265					270			
20	cac	ctg	atc	agc	cgg	ctg	ggc	ctc	aat	acc	ttg	act	cgg	gtg	ggc	gtg	864
	His	Leu	Ile	Ser	Arg	Leu	Gly	Leu	Asn	Thr	Leu	Thr	Arg	Val	Gly	Val	
				275				280					285				
25	ctg	tgc	atg	gcc	ggc	ggt	gcc	tgc	atc	agc	ctg	ctc	ggt	gca	ctg	acc	912
	Leu	Cys	Met	Ala	Gly	Gly	Ala	Cys	Ile	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Thr	
		290					295					300					
30	ggc	ctg	ggg	ctg	cca	ggt	gtg	gcc	ggc	ggc	atg	gtg	ata	gcc	ctg	ttc	960
	Gly	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Met	Val	Ile	Ala	Leu	Phe	
	305					310					315					320	
35	ggc	ctg	ggg	ata	gcc	gag	tcg	acg	ctg	atg	tcg	ctg	gtg	atg	gcc	tcg	1008
	Gly	Leu	Gly	Ile	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	Ser	Leu	Val	Met	Ala	Ser	
					325				330						335		
40	caa	gaa	aag	gca	ctg	ggt	tcc	acc	gca	gcg	ctg	ctg	ggc	gcc	atc	cag	1056
	Gln	Glu	Lys	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Ile	Gln	
				340					345					350			
45	ctg	tcg	gcg	tct	gcc	ggc	gcc	gcc	ccg	ctg	gcc	gca	gtg	gta	ctc	aac	1104
	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Asn	
						355			360				365				
50	cac	ggc	ccg	acc	gca	tgg	gcc	gcg	ctg	ctg	gcc	ctg	tgc	acc	ctg	gtg	1152
	His	Gly	Pro	Thr	Ala	Trp	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Cys	Thr	Leu	Val	
		370					375					380					
55	gtg	tgc	ctg	ctg	acc	gcc	ctc	agc	ctg	cgc	cac	acc	ccg	gcc	agc	ttc	1200
	Val	Cys	Leu	Leu	Thr	Ala	Leu	Ser	Leu	Arg	His	Thr	Pro	Ala	Ser	Phe	
	385					390					395					400	
60	tcg	ctc	gcg	ggc	cat	tga											1218
	Ser	Leu	Ala	Gly	His												
					405												

<210> 14

60 <211> 405

<212> PRT

<213> *Pseudomonas putida* U

65

ES 2 364 110 A1

<400> 14

5 Met Gln Ala Asn Pro Ser Pro Pro Ile Pro Phe Ser Phe Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Ile Gly Ala Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Met Tyr Leu
 20 25 30
 10 Ser Ser Leu Pro Glu Ile Ala Ser His Tyr Gln Ala Ser Phe Thr Arg
 35 40 45
 Val Gln Leu Thr Leu Thr Phe Phe Leu Leu Ala Met Gly Ala Gly Gln
 50 55 60
 15 Leu Ile Phe Gly Pro Ile Val Asp Ala Tyr Gly Arg Arg Lys Pro Leu
 65 70 75 80
 20 Leu Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Leu Cys Ser Leu Gly Ala Ala Ala
 85 90 95
 Ala Pro Ser Leu Asp Thr Leu Ile Met Leu Arg Phe Phe Gln Gly Leu
 100 105 110
 25 Gly Ser Ala Leu Thr Leu Val Val Ile Met Ser Met Val Arg Asp Val
 115 120 125
 30 Ser Gln Gly Val Ala Ala Thr Lys Leu Phe Ala Leu Leu Met Thr Ile
 130 135 140
 Glu Gly Val Ala Pro Ile Leu Ala Pro Ala Leu Gly Gly Val Ile Asp
 145 150 155 160
 35 Ala His Phe Gly Trp Arg Ala Val Met Leu Val Leu Ala Gly Met Gly
 165 170 175
 40 Val Thr Val Leu Val Asn Ser Leu Leu Asn Leu Pro Glu Thr Leu Pro
 180 185 190
 Pro Ser Lys Arg Glu Pro Leu Arg Leu Gly His Ala Cys Ser Thr Tyr
 195 200 205
 45 Leu Ala Ile Leu Ala Asp Arg Arg Phe Leu Arg Pro Thr Leu Ala Val
 210 215 220
 50 Ala Ala Val Phe Phe Phe Leu Phe Ala Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Tyr Gln Ala His Tyr Gly Leu Ser Ala Gln Ala Phe Gly Leu Leu
 245 250 255
 55 Phe Gly Ala Thr Gly Val Ser Ile Leu Leu Gly Ala Met Thr Ala Ser
 260 265 270
 60 His Leu Ile Ser Arg Leu Gly Leu Asn Thr Leu Thr Arg Val Gly Val
 275 280 285
 Leu Cys Met Ala Gly Gly Ala Cys Ile Ser Leu Leu Gly Ala Leu Thr
 290 295 300
 65 Gly Leu Gly Leu Pro Gly Val Ala Gly Gly Met Val Ile Ala Leu Phe
 305 310 315 320

ES 2 364 110 A1

Gly Leu Gly Ile Ala Glu Ser Thr Leu Met Ser Leu Val Met Ala Ser
 325 330 335

5 Gln Glu Lys Ala Leu Gly Ser Thr Ala Ala Leu Leu Gly Ala Ile Gln
 340 345 350

Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ala Ala Val Val Leu Asn
 355 360 365

10 His Gly Pro Thr Ala Trp Ala Ala Leu Leu Ala Leu Cys Thr Leu Val
 370 375 380

15 Val Cys Leu Leu Thr Ala Leu Ser Leu Arg His Thr Pro Ala Ser Phe
 385 390 395 400

Ser Leu Ala Gly His
 405

20

<210> 15
 <211> 1311
 <212> DNA
 25 <213> *Pseudomonas putida* U

<220>
 <221> CDS
 30 <222> (1)..(1311)
 <223> TynE

<400> 15

atg gtc aaa cca cag acg ctg tcc agc ctg gcc ctg gca acc ttg ctg 48
 Met Val Lys Pro Gln Thr Leu Ser Ser Leu Ala Leu Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15

40 gcc agc cag gcc gcg ccg gcc gtt gag ctg tac gcc gac gat gac agc 96
 Ala Ser Gln Ala Ala Pro Ala Val Glu Leu Tyr Ala Asp Asp Ser
 20 25 30

45 cac ctg aac gcc gac atg ctg gcg gta tgg ggc atg ttc aac agc cgc 144
 His Leu Asn Ala Asp Met Leu Ala Val Trp Gly Met Phe Asn Ser Arg
 35 40 45

50 aag aac tac gac ggc acc aca ggg ggt tcg acc tgg cgt gaa ggc ttt 192
 Lys Asn Tyr Asp Gly Thr Thr Gly Gly Ser Thr Trp Arg Glu Gly Phe
 50 55 60

55 atc aag tat ggc ctc agc ggt gac cag ggc ctg gcc ggc aac ggc acg 240
 Ile Lys Tyr Gly Leu Ser Gly Asp Gln Gly Leu Ala Gly Asn Gly Thr
 65 70 75 80

60 ctg tac ggc agc ctg aac tgg gtg agc tcg gcc acc tgg ggc gat ggc 288
 Leu Tyr Gly Ser Leu Asn Trp Val Ser Ser Ala Thr Trp Gly Asp Gly
 85 90 95

65 gat gcg gcc ggc aac acc gat ggc tcc gaa cgc acc acc aag atc gaa 336
 Asp Ala Ala Gly Asn Thr Asp Gly Ser Glu Arg Thr Thr Lys Ile Glu
 100 105 110

ES 2 364 110 A1

	gac gcc ttc ctc ggc tgg cgc tcg gcc gac ctg ttc ccg gtg ctg ggc	384
5	Asp Ala Phe Leu Gly Trp Arg Ser Ala Asp Leu Phe Pro Val Leu Gly 115 120 125	
	aag gat gga gtg gac gtt tcc gcc ggc cgc cag acc att cgc ctg ggc	432
10	Lys Asp Gly Val Asp Val Ser Ala Gly Arg Gln Thr Ile Arg Leu Gly 130 135 140	
	agt ggt ttt ttg atc aac gac gac ggc ccg aac ctg ggc aac ggc gtc	480
15	Ser Gly Phe Leu Ile Asn Asp Asp Gly Pro Asn Leu Gly Asn Gly Val 145 150 155 160	
	gcc gac ggt gcg ctg gac cgc ggc ggg gcc tac tac ctg gcc gcc cgc	528
20	Ala Asp Gly Ala Leu Asp Arg Gly Gly Ala Tyr Tyr Leu Ala Ala Arg 165 170 175	
	cac gcc ttc gac cgc acc gca atg ctg cgc ctg ggg ggc agc gat ggc	576
25	His Ala Phe Asp Arg Thr Ala Met Leu Arg Leu Gly Gly Ser Asp Gly 180 185 190	
	ctg cat ggc agc ctg ctg tgg ctg aaa tcc gac aac cgc gcc cag gcc	624
30	Leu His Gly Ser Leu Leu Trp Leu Lys Ser Asp Asn Arg Ala Gln Ala 195 200 205	
	gaa acc gaa ctg gcc gcc ggc acg ctg gac tac acc caa gcc ttg ggc	672
35	Glu Thr Glu Leu Ala Ala Gly Thr Leu Asp Tyr Thr Gln Ala Leu Gly 210 215 220	
	acc ctc ggg ctg acc tgg att cac ggc atc gac gtc acc gac caa tgg	720
40	Thr Leu Gly Leu Thr Trp Ile His Gly Ile Asp Val Thr Asp Gln Trp 225 230 235 240	
	gcc agc gac ttt cag aaa gcc cgc gaa ggc atg gac gtg tat agc gtg	768
45	Ala Ser Asp Phe Gln Lys Ala Arg Glu Gly Met Asp Val Tyr Ser Val 245 250 255	
	cgc ggc gaa ggc aac gct ggc atc gac aat gcc agt ttc gcc ttc gaa	816
50	Arg Gly Glu Gly Asn Ala Gly Ile Asp Asn Ala Ser Phe Ala Phe Glu 260 265 270	
	tac gcc tgg cag gac aag acc gac ggc ccc gag caa gcc tgg tac ctg	864
55	Tyr Ala Trp Gln Asp Lys Thr Asp Gly Pro Glu Gln Ala Trp Tyr Leu 275 280 285	
	cag gcc ggc tac acc ttc gcc gac ctg ccg tgg gca ccg cag gtt acc	912
60	Gln Ala Gly Tyr Thr Phe Ala Asp Leu Pro Trp Ala Pro Gln Val Thr 290 295 300	
	tac cgc tac acc cgc tac tcg gca ggc tgg gac gcg ctg ttc agc ggc	960
65	Tyr Arg Tyr Thr Arg Tyr Ser Ala Gly Trp Asp Ala Leu Phe Ser Gly 305 310 315 320	
	ctg tcc agc ggt tac ggc acc tgg ttc cag ggt gaa gtc gct gcc aac	1008
70	Leu Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Trp Phe Gln Gly Glu Val Ala Ala Asn 325 330 335	
	tac gcc ggc ccc ttc aac agc aac acg ggt atc cac cat gtg ggc gtg	1056
75	Tyr Ala Gly Pro Phe Asn Ser Asn Thr Gly Ile His His Val Gly Val 340 345 350	

ES 2 364 110 A1

```

5   aag gcg aca ccg ctg gaa aat ctc aca gtc ggg gcg ctg tac ttc gac   1104
    Lys Ala Thr Pro Leu Glu Asn Leu Thr Val Gly Ala Leu Tyr Phe Asp
        355                      360                      365

10  ttc gac acc gta cgc acc cgc gaa agc ctc aac ctc gat gcg cgg gag   1152
    Phe Asp Thr Val Arg Thr Arg Glu Ser Leu Asn Leu Asp Ala Arg Glu
        370                      375                      380

15  ctg gac ctg tat gtg gaa tgg gca gtc aac gag cac ctg ata atc agc   1200
    Leu Asp Leu Tyr Val Glu Trp Ala Val Asn Glu His Leu Ile Ile Ser
    385                      390                      395                      400

20  ccg ctg gtg ggc ctt tac cag ccg cgc aag gac gag agc aac ggc ggc   1248
    Pro Leu Val Gly Leu Tyr Gln Pro Arg Lys Asp Glu Ser Asn Gly Gly
        405                      410                      415

25  aac cag gtg ggc ggg aat ggt acc aat gtg tat agc cag ctg acc gtg   1296
    Asn Gln Val Gly Gly Asn Gly Thr Asn Val Tyr Ser Gln Leu Thr Val
        420                      425                      430

30  gct gtg ccg ttc tga
    Ala Val Pro Phe
        435

35  <210> 16
    <211> 436
    <212> PRT
    <213> Pseudomonas putida U

40  <400> 16
    Met Val Lys Pro Gln Thr Leu Ser Ser Leu Ala Leu Ala Thr Leu Leu
    1                      5                      10                      15

45  Ala Ser Gln Ala Ala Pro Ala Val Glu Leu Tyr Ala Asp Asp Asp Ser
    20                      25                      30

50  His Leu Asn Ala Asp Met Leu Ala Val Trp Gly Met Phe Asn Ser Arg
    35                      40                      45

55  Lys Asn Tyr Asp Gly Thr Thr Gly Gly Ser Thr Trp Arg Glu Gly Phe
    50                      55                      60

60  Ile Lys Tyr Gly Leu Ser Gly Asp Gln Gly Leu Ala Gly Asn Gly Thr
    65                      70                      75                      80

65  Leu Tyr Gly Ser Leu Asn Trp Val Ser Ser Ala Thr Trp Gly Asp Gly
    85                      90                      95

70  Asp Ala Ala Gly Asn Thr Asp Gly Ser Glu Arg Thr Thr Lys Ile Glu
    100                      105                      110

75  Asp Ala Phe Leu Gly Trp Arg Ser Ala Asp Leu Phe Pro Val Leu Gly
    115                      120                      125

80  Lys Asp Gly Val Asp Val Ser Ala Gly Arg Gln Thr Ile Arg Leu Gly
    130                      135                      140

```

ES 2 364 110 A1

Ser Gly Phe Leu Ile Asn Asp Asp Gly Pro Asn Leu Gly Asn Gly Val
 145 150 155 160
 5
 Ala Asp Gly Ala Leu Asp Arg Gly Gly Ala Tyr Tyr Leu Ala Ala Arg
 165 170 175
 10
 His Ala Phe Asp Arg Thr Ala Met Leu Arg Leu Gly Gly Ser Asp Gly
 180 185 190
 Leu His Gly Ser Leu Leu Trp Leu Lys Ser Asp Asn Arg Ala Gln Ala
 195 200 205
 15
 Glu Thr Glu Leu Ala Ala Gly Thr Leu Asp Tyr Thr Gln Ala Leu Gly
 210 215 220
 20
 Thr Leu Gly Leu Thr Trp Ile His Gly Ile Asp Val Thr Asp Gln Trp
 225 230 235 240
 Ala Ser Asp Phe Gln Lys Ala Arg Glu Gly Met Asp Val Tyr Ser Val
 245 250 255
 25
 Arg Gly Glu Gly Asn Ala Gly Ile Asp Asn Ala Ser Phe Ala Phe Glu
 260 265 270
 30
 Tyr Ala Trp Gln Asp Lys Thr Asp Gly Pro Glu Gln Ala Trp Tyr Leu
 275 280 285
 Gln Ala Gly Tyr Thr Phe Ala Asp Leu Pro Trp Ala Pro Gln Val Thr
 290 295 300
 35
 Tyr Arg Tyr Thr Arg Tyr Ser Ala Gly Trp Asp Ala Leu Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 40
 Leu Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Trp Phe Gln Gly Glu Val Ala Ala Asn
 325 330 335
 Tyr Ala Gly Pro Phe Asn Ser Asn Thr Gly Ile His His Val Gly Val
 340 345 350
 45
 Lys Ala Thr Pro Leu Glu Asn Leu Thr Val Gly Ala Leu Tyr Phe Asp
 355 360 365
 50
 Phe Asp Thr Val Arg Thr Arg Glu Ser Leu Asn Leu Asp Ala Arg Glu
 370 375 380
 Leu Asp Leu Tyr Val Glu Trp Ala Val Asn Glu His Leu Ile Ile Ser
 385 390 395 400
 55
 Pro Leu Val Gly Leu Tyr Gln Pro Arg Lys Asp Glu Ser Asn Gly Gly
 405 410 415
 60
 Asn Gln Val Gly Gly Asn Gly Thr Asn Val Tyr Ser Gln Leu Thr Val
 420 425 430
 Ala Val Pro Phe
 435
 65

<210> 17

<211> 1497

ES 2 364 110 A1

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1497)

<223> TynG

10

<400> 17

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

ES 2 364 110 A1

```

ggc atg aac cct gcc gat gtc tac gtg ccg ttc gcc atc atg ctt ggc      1344
Gly Met Asn Pro Ala Asp Val Tyr Val Pro Phe Ala Ile Met Leu Gly
      435                                440                                445

5
gcc act gcg gcc tat gca ttg ttc tgg acg ctg tgg gtg cag aag gtc      1392
Ala Thr Ala Ala Tyr Ala Leu Phe Trp Thr Leu Trp Val Gln Lys Val
      450                                455                                460

10
aac ccg ttc aag ccg gcg cgg gtc gag gat gtg ctc gag aaa gag ttt      1440
Asn Pro Phe Lys Pro Ala Arg Val Glu Asp Val Leu Glu Lys Glu Phe
      465                                470                                475                                480

15
gct gcc gag cct gcc cac gcc gtg gag cac gtg ctg cat gat cag aaa      1488
Ala Ala Glu Pro Gly His Ala Val Glu His Val Leu His Asp Gln Lys
      485                                490                                495

20
ttt gcg tga
Phe Ala
      1497

<210> 18
25 <211> 498
   <212> PRT
   <213> Pseudomonas putida U

30 <400> 18
      Met Ser Leu Asn Asn Lys Leu Thr Glu His Leu Asn Arg Gly Thr Val
      1          5          10          15
35
      Gly Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ser Thr Val Gly Leu Ile Met Ala Ser
      20          25          30
40
      Pro Val Ile Leu Thr Ala Thr Met Gly Phe Gly Ile Gly Gly Ser Ala
      35          40          45
45
      Phe Ala Val Ala Met Val Ile Ala Ala Leu Met Met Leu Ala Gln Ser
      50          55          60
50
      Thr Thr Phe Ala Glu Ala Ala Ser Ile Leu Pro Thr Thr Gly Ser Val
      65          70          75          80
55
      Tyr Asp Tyr Ile Asn Cys Gly Met Gly Arg Phe Phe Ala Ile Thr Gly
      85          90          95
60
      Thr Leu Ser Ala Tyr Leu Ile Val His Val Phe Ala Gly Thr Ala Glu
      100          105          110
65
      Thr Ile Leu Ser Gly Val Met Ala Leu Val Asn Phe Glu His Leu Asn
      115          120          125
70
      Thr Leu Ala Glu Ser Ala Gly Gly Ser Trp Leu Leu Gly Val Cys Phe
      130          135          140
75
      Val Val Ala Phe Ala Val Leu Asn Ala Phe Gly Val Ser Ala Phe Ser
      145          150          155          160

```

ES 2 364 110 A1

	Arg	Ala	Glu	Val	Val	Leu	Thr	Phe	Gly	Met	Trp	Thr	Thr	Leu	Met	Val	
					165					170					175		
5	Phe	Gly	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Ala	Ala	Pro	Ala	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	
				180					185					190			
10	Pro	Phe	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Leu	Met	Thr	Ile	Leu	Ser	
			195					200					205				
15	Leu	Val	Gly	Met	Ala	Met	Phe	Met	Phe	Val	Gly	Cys	Glu	Phe	Val	Thr	
		210					215					220					
20	Pro	Leu	Ala	Pro	Glu	Leu	Arg	Arg	Ser	Ala	Trp	Val	Leu	Pro	Arg	Ala	
		225				230					235					240	
25	Met	Ala	Leu	Gly	Leu	Phe	Gly	Val	Ala	Ser	Cys	Met	Phe	Ile	Tyr	Gly	
				245						250					255		
30	Ala	Ala	Met	Lys	Arg	Gln	Val	Glu	Asn	Val	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	Ser	
				260					265					270			
35	Gly	Val	His	Leu	Leu	Asp	Thr	Pro	Met	Ala	Ile	Pro	Arg	Phe	Ala	Glu	
			275					280					285				
40	Gln	Val	Met	Gly	Asp	Ile	Gly	Pro	Val	Trp	Leu	Gly	Ile	Gly	Phe	Leu	
		290					295					300					
45	Phe	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr	Ile	Asn	Thr	Leu	Met	Ala	Gly	Val	Pro	Arg	
		305				310					315					320	
50	Ile	Leu	Tyr	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Gly	Ala	Leu	Pro	Lys	Val	Phe	Thr	
				325						330					335		
55	Tyr	Leu	His	Pro	Arg	Phe	Lys	Thr	Pro	Leu	Leu	Cys	Ile	Leu	Val	Val	
			340						345					350			
60	Ala	Leu	Ile	Pro	Cys	Leu	His	Ala	Trp	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asn	Pro	Asp	
			355					360					365				
65	Asn	Ile	Leu	His	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Val	Cys	Ala	Trp	Ser	Thr	Ala	
		370					375					380					
70	Tyr	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Val	Ile	Leu	Arg	Ile	Arg	Arg	Pro	
		385				390					395					400	
75	Asp	Leu	Pro	Arg	Ala	Tyr	Arg	Ser	Pro	Leu	Phe	Pro	Leu	Pro	Gln	Ile	
				405						410					415		
80	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Leu	Ile	Gly	Met	Ala	Phe	Ile	Thr	Pro	Pro	
				420					425					430			
85	Gly	Met	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Tyr	Val	Pro	Phe	Ala	Ile	Met	Leu	Gly	
			435					440					445				
90	Ala	Thr	Ala	Ala	Tyr	Ala	Leu	Phe	Trp	Thr	Leu	Trp	Val	Gln	Lys	Val	
		450					455					460					
95	Asn	Pro	Phe	Lys	Pro	Ala	Arg	Val	Glu	Asp	Val	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe	
		465				470					475					480	

ES 2 364 110 A1

	tac tgc ttc gcc atc ctg cct cgc agt gac tat gaa atc cgt gat gac Tyr Cys Phe Ala Ile Leu Pro Arg Ser Asp Tyr Glu Ile Arg Asp Asp 165 170 175	528
5	tgg tat gcc gtg ggc atg cgc ggc agc ggc agc aag acc ctg atc gtg Trp Tyr Ala Val Gly Met Arg Gly Ser Gly Ser Lys Thr Leu Ile Val 180 185 190	576
10	cgt gat gcc ttc gtg ccc gag cac cgc atc cag aag gcc aag gac atg Arg Asp Ala Phe Val Pro Glu His Arg Ile Gln Lys Ala Lys Asp Met 195 200 205	624
15	atg gag ggc aag tcg gcg ggc ttt ggt ttg tac ccc gac agc aag att Met Glu Gly Lys Ser Ala Gly Phe Gly Leu Tyr Pro Asp Ser Lys Ile 210 215 220	672
20	ttc ttc gcc ccg tat cgc ccg tat ttt gcc agc ggc ttc tcc acg gtc Phe Phe Ala Pro Tyr Arg Pro Tyr Phe Ala Ser Gly Phe Ser Thr Val 225 230 235 240	720
25	agc ttg ggc gtt gcc gag cgc atg ctg gag gtg ttc cgc gag aaa acc Ser Leu Gly Val Ala Glu Arg Met Leu Glu Val Phe Arg Glu Lys Thr 245 250 255	768
30	cgc aac cgc gtg cgt gcc tac acc ggt gct gcc gtg ggc gcc gcc acc Arg Asn Arg Val Arg Ala Tyr Thr Gly Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr 260 265 270	816
35	ccg gcg ctg atg cgc ctg gcc gag tcg acc cat cag gtg gcc gct gcc Pro Ala Leu Met Arg Leu Ala Glu Ser Thr His Gln Val Ala Ala Ala 275 280 285	864
40	cgg gca ttg ctg gaa aag agc tgg gac gag att gcc gag cac agt gcc Arg Ala Leu Leu Glu Lys Ser Trp Asp Glu Ile Ala Glu His Ser Ala 290 295 300	912
45	cgt cac gaa tac ccg tcg cgt ggc acg ctg gcg ttc tgg cgt acc aac Arg His Glu Tyr Pro Ser Arg Gly Thr Leu Ala Phe Trp Arg Thr Asn 305 310 315 320	960
50	cag ggc tac gcc gtg aag atg tgc atc cag gcc gtc gac cgc ctg atg Gln Gly Tyr Ala Val Lys Met Cys Ile Gln Ala Val Asp Arg Leu Met 325 330 335	1008
55	gaa gcg gcc ggt ggt ggc gcc tgg ttc gag agc aac gaa ctg cag cgg Glu Ala Ala Gly Gly Gly Ala Trp Phe Glu Ser Asn Glu Leu Gln Arg 340 345 350	1056
60	ctg ttc cgc gat tcg cac atg acc ggt gcc cat gcc tac acc gat tac Leu Phe Arg Asp Ser His Met Thr Gly Ala His Ala Tyr Thr Asp Tyr 355 360 365	1104
65	gac gtg tgt gcg caa atc ctc ggc cgc gag ctg atg ggc ctg gag cct Asp Val Cys Ala Gln Ile Leu Gly Arg Glu Leu Met Gly Leu Glu Pro 370 375 380	1152
70	gac ccg gcg atg gtc tga Asp Pro Ala Met Val 385	1170

ES 2 364 110 A1

<210> 20

<211> 389

<212> PRT

5 <213> *Pseudomonas putida* U

<400> 20

```

10      Met Lys Lys Pro Asn Pro Leu Leu Glu Asp Leu Lys Ser Val Leu Pro
      1          5          10          15

      Thr Ile Ala Ala Asn Ala Met Arg Ala Glu Gln Asp Arg Ser Val Pro
15          20          25          30

      Ala Glu Asn Ile Ala Leu Leu Lys Ser Ile Gly Met His Arg Ala Phe
      35          40          45

20      Leu Pro Lys His Phe Gly Gly Met Glu Ile Thr Leu Pro Glu Phe Ala
      50          55          60

      Gln Cys Ile Ala Leu Leu Ala Gly Ala Cys Ala Ser Thr Ala Trp Ala
25      65          70          75          80

      Met Ser Leu Leu Cys Thr His Ser His Gln Met Ala Met Phe Ser Pro
      85          90          95

30      Lys Leu Gln Gln Glu Val Trp Gly Ser Asp Pro Asp Ala Thr Ala Ser
      100          105          110

      Ser Ser Ile Ala Pro Phe Gly Arg Thr Glu Glu Val Glu Gly Gly Val
35          115          120          125

      Ser Phe Ser Gly Glu Met Gly Trp Ser Ser Gly Cys Asp His Ala Glu
      130          135          140

40      Trp Ala Ile Leu Gly Phe Arg Arg Lys Asn Ala Glu Gly Ala Gln Asp
      145          150          155          160

      Tyr Cys Phe Ala Ile Leu Pro Arg Ser Asp Tyr Glu Ile Arg Asp Asp
45          165          170          175

      Trp Tyr Ala Val Gly Met Arg Gly Ser Gly Ser Lys Thr Leu Ile Val
      180          185          190

50      Arg Asp Ala Phe Val Pro Glu His Arg Ile Gln Lys Ala Lys Asp Met
      195          200          205

      Met Glu Gly Lys Ser Ala Gly Phe Gly Leu Tyr Pro Asp Ser Lys Ile
55          210          215          220

      Phe Phe Ala Pro Tyr Arg Pro Tyr Phe Ala Ser Gly Phe Ser Thr Val
      225          230          235          240

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

      Arg Asn Arg Val Arg Ala Tyr Thr Gly Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr
65          260          265          270

```

ES 2 364 110 A1

```

Pro Ala Leu Met Arg Leu Ala Glu Ser Thr His Gln Val Ala Ala Ala
      275                      280                      285
5   Arg Ala Leu Leu Glu Lys Ser Trp Asp Glu Ile Ala Glu His Ser Ala
      290                      295                      300
    Arg His Glu Tyr Pro Ser Arg Gly Thr Leu Ala Phe Trp Arg Thr Asn
    305                      310                      315                      320
10  Gln Gly Tyr Ala Val Lys Met Cys Ile Gln Ala Val Asp Arg Leu Met
      325                      330                      335
    Glu Ala Ala Gly Gly Gly Ala Trp Phe Glu Ser Asn Glu Leu Gln Arg
15  340                      345                      350
    Leu Phe Arg Asp Ser His Met Thr Gly Ala His Ala Tyr Thr Asp Tyr
    355                      360                      365
20  Asp Val Cys Ala Gln Ile Leu Gly Arg Glu Leu Met Gly Leu Glu Pro
      370                      375                      380
    Asp Pro Ala Met Val
25  385
<210> 21
<211> 930
<212> DNA
30 <213> Pseudomonas putida U
    <220>
    <221> CDS
35 <222> (1)..(930)
    <223> hpaC
    <400> 21
40   atg tcc aaa gaa acc ttc gat tca cgt gcc ttc cgc cgc gcc ctg ggc      48
    Met Ser Lys Glu Thr Phe Asp Ser Arg Ala Phe Arg Arg Ala Leu Gly
    1                      5                      10                      15
45   aac ttc gcc acc ggc gtg acc gtg gtg act gcc gcc ggc ccc agt ggc      96
    Asn Phe Ala Thr Gly Val Thr Val Val Thr Ala Ala Gly Pro Ser Gly
    20                      25                      30
50   cgc aag gtc ggc gtt acc gcc aac agc ttc aac tcg gtg tcg ctg gac      144
    Arg Lys Val Gly Val Thr Ala Asn Ser Phe Asn Ser Val Ser Leu Asp
    35                      40                      45
55   ccg gcg ctg atc ctg tgg agc atc gac aag cgc tcc acc agc cat gaa      192
    Pro Ala Leu Ile Leu Trp Ser Ile Asp Lys Arg Ser Thr Ser His Glu
    50                      55                      60
60   gtg ttc gaa gag gcc tcg cac ttt gcc gtg aac att ctg gct gcg gac      240
    Val Phe Glu Glu Ala Ser His Phe Ala Val Asn Ile Leu Ala Ala Asp
    65                      70                      75                      80
    cag atc gac ctg tcc aac aac ttt gcc cgc ccg aag gaa gat cgc ttt      288
65  Gln Ile Asp Leu Ser Asn Asn Phe Ala Arg Pro Lys Glu Asp Arg Phe

```

ES 2 364 110 A1

	85	90	95	
5	gcc ggt atc gac tac gag acc ggc act ggc ggc gcg ccg ttg ttc gcc Ala Gly Ile Asp Tyr Glu Thr Gly Thr Gly Gly Ala Pro Leu Phe Ala 100 105 110			336
10	gat tgc gcg gcg cgc ttt gag tgt gaa aag tac cag cag ctg gac ggt Asp Cys Ala Ala Arg Phe Glu Cys Glu Lys Tyr Gln Gln Leu Asp Gly 115 120 125			384
15	ggc gat cac tgg atc ctg gtg ggc aag gta gtg gcc ttt gat gac ttt Gly Asp His Trp Ile Leu Val Gly Lys Val Val Ala Phe Asp Asp Phe 130 135 140			432
20	ggc cgc tcg ccg ctg ctg tat cac cag ggc gcc tat tca atg gtg ctg Gly Arg Ser Pro Leu Leu Tyr His Gln Gly Ala Tyr Ser Met Val Leu 145 150 155 160			480
25	ccg cat acc cgc atg acc caa ggc gca gag ggg cag gca ccg agc agc Pro His Thr Arg Met Thr Gln Gly Ala Glu Gly Gln Ala Pro Ser Ser 165 170 175			528
30	cac ttc cag ggc cgc ctg cag cac aac ctg tac tac ctg atg acc cag His Phe Gln Gly Arg Leu Gln His Asn Leu Tyr Tyr Leu Met Thr Gln 180 185 190			576
35	gcg ctg cgt gcc tac cag gct gac tac cag cca cgc cag ctg tgt acc Ala Leu Arg Ala Tyr Gln Ala Asp Tyr Gln Pro Arg Gln Leu Cys Thr 195 200 205			624
40	ggc ctg cgc acc agc gag gca cgc atg ctg atg gtg ctg gag aac gat Gly Leu Arg Thr Ser Glu Ala Arg Met Leu Met Val Leu Glu Asn Asp 210 215 220			672
45	gcg ggc ctg agc ctg aac gac ctg caa cgc gaa gtg gcg atg ccg gcg Ala Gly Leu Ser Leu Asn Asp Leu Gln Arg Glu Val Ala Met Pro Ala 225 230 235 240			720
50	cgg gag atc gag gaa gcg gtt gcc aac ctc aag cgc aaa ggg ctg att Arg Glu Ile Glu Glu Ala Val Ala Asn Leu Lys Arg Lys Gly Leu Ile 245 250 255			768
55	gcc gat gac gaa ggg cga gtg cgg cta tcg gtg aag ggc gtg gac gag Ala Asp Asp Glu Gly Arg Val Arg Leu Ser Val Lys Gly Val Asp Glu 260 265 270			816
60	acc gag gcg ttg tgg acc att gcc cgg caa cag cag gac aag gtg ttc Thr Glu Ala Leu Trp Thr Ile Ala Arg Gln Gln Gln Asp Lys Val Phe 275 280 285			864
65	ggg cag ttc agt gaa cag cag ctg gag act ttc aag acc gtg ctc aag Gly Gln Phe Ser Glu Gln Gln Leu Glu Thr Phe Lys Thr Val Leu Lys 290 295 300			912
70	gcc ctt atc aac atc tga Ala Leu Ile Asn Ile 305			930

<210> 22

<211> 309

ES 2 364 110 A1

<212> PRT

<213> *Pseudomonas putida* U

5 <400> 22

	Met	Ser	Lys	Glu	Thr	Phe	Asp	Ser	Arg	Ala	Phe	Arg	Arg	Ala	Leu	Gly
	1				5					10					15	
10	Asn	Phe	Ala	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Pro	Ser	Gly
				20					25					30		
	Arg	Lys	Val	Gly	Val	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe	Asn	Ser	Val	Ser	Leu	Asp
15			35					40					45			
	Pro	Ala	Leu	Ile	Leu	Trp	Ser	Ile	Asp	Lys	Arg	Ser	Thr	Ser	His	Glu
		50					55					60				
20	Val	Phe	Glu	Glu	Ala	Ser	His	Phe	Ala	Val	Asn	Ile	Leu	Ala	Ala	Asp
	65					70					75					80
	Gln	Ile	Asp	Leu	Ser	Asn	Asn	Phe	Ala	Arg	Pro	Lys	Glu	Asp	Arg	Phe
25				85						90					95	
	Ala	Gly	Ile	Asp	Tyr	Glu	Thr	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Phe	Ala
				100					105					110		
30	Asp	Cys	Ala	Ala	Arg	Phe	Glu	Cys	Glu	Lys	Tyr	Gln	Gln	Leu	Asp	Gly
			115					120					125			
	Gly	Asp	His	Trp	Ile	Leu	Val	Gly	Lys	Val	Val	Ala	Phe	Asp	Asp	Phe
35		130					135					140				
	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Leu	Tyr	His	Gln	Gly	Ala	Tyr	Ser	Met	Val	Leu
	145				150						155					160
40	Pro	His	Thr	Arg	Met	Thr	Gln	Gly	Ala	Glu	Gly	Gln	Ala	Pro	Ser	Ser
					165					170					175	
	His	Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Gln	His	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met	Thr	Gln
45				180					185					190		
	Ala	Leu	Arg	Ala	Tyr	Gln	Ala	Asp	Tyr	Gln	Pro	Arg	Gln	Leu	Cys	Thr
			195					200					205			
50	Gly	Leu	Arg	Thr	Ser	Glu	Ala	Arg	Met	Leu	Met	Val	Leu	Glu	Asn	Asp
		210					215					220				
	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Gln	Arg	Glu	Val	Ala	Met	Pro	Ala
55						230					235					240
	Arg	Glu	Ile	Glu	Glu	Ala	Val	Ala	Asn	Leu	Lys	Arg	Lys	Gly	Leu	Ile
					245					250					255	
60	Ala	Asp	Asp	Glu	Gly	Arg	Val	Arg	Leu	Ser	Val	Lys	Gly	Val	Asp	Glu
				260					265					270		
	Thr	Glu	Ala	Leu	Trp	Thr	Ile	Ala	Arg	Gln	Gln	Gln	Asp	Lys	Val	Phe
65				275				280					285			

ES 2 364 110 A1

Gly Gln Phe Ser Glu Gln Gln Leu Glu Thr Phe Lys Thr Val Leu Lys
 290 295 300

5 Ala Leu Ile Asn Ile
 305

10 <210> 23
 <211> 924
 <212> DNA
 <213> *Pseudomonas putida* U

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(924)

20 <223> hpaD

<400> 23

25 atg ggc aaa ctc gct ctc act gcc aag att acc cat gta ccg tcc atg 48
 Met Gly Lys Leu Ala Leu Thr Ala Lys Ile Thr His Val Pro Ser Met
 1 5 10 15

30 tac atg tcc gaa ctg cca ggc ccg cgc caa ggc ttt cgc cag gcg gcc 96
 Tyr Met Ser Glu Leu Pro Gly Pro Arg Gln Gly Phe Arg Gln Ala Ala
 20 25 30

35 atc gac ggg cat cac gaa atc agc cgc cgt tgc cgt gag ctg ggc gtg 144
 Ile Asp Gly His His Glu Ile Ser Arg Arg Cys Arg Glu Leu Gly Val
 35 40 45

40 gac acc atc gtc gtg ttc gac acg cac tgg ctg gtc aac gcc aac tac 192
 Asp Thr Ile Val Val Phe Asp Thr His Trp Leu Val Asn Ala Asn Tyr
 50 55 60

45 cac gtg ctg tgc ggg ccg cat ttc gag ggc gtg tac acc agc aac gaa 240
 His Val Leu Cys Gly Pro His Phe Glu Gly Val Tyr Thr Ser Asn Glu
 65 70 75 80

50 ctg ccg cac ttc atc agc aac atg ccc tac gca ttc ccc ggc aat ccc 288
 Leu Pro His Phe Ile Ser Asn Met Pro Tyr Ala Phe Pro Gly Asn Pro
 85 90 95

55 gag ctg ggc aag ctg ctg gcc gag gag tgc aac cgc ttc aac gtc gaa 336
 Glu Leu Gly Lys Leu Leu Ala Glu Glu Cys Asn Arg Phe Asn Val Glu
 100 105 110

60 acc atg gcc cac cac gcc acc acc ctc gcc ccg gaa tac ggc acc ctg 384
 Thr Met Ala His His Ala Thr Thr Leu Ala Pro Glu Tyr Gly Thr Leu
 115 120 125

65 gtg ccc atg cgc tac atg aac cag gac cag cac ttc aaa gtg gtc tcg 432
 Val Pro Met Arg Tyr Met Asn Gln Asp Gln His Phe Lys Val Val Ser
 130 135 140

65 gtc tcg gcc ctg tgc acc tcg cac tac ctg gcc gac agt gcc cgc ctg 480
 Val Ser Ala Leu Cys Thr Ser His Tyr Leu Ala Asp Ser Ala Arg Leu

ES 2 364 110 A1

	145		150		155		160											
	ggc	tgg	gcc	atg	cgc	aag	gca	gta	gaa	gac	cac	tac	gac	ggc	acc	gtg		528
5	Gly	Trp	Ala	Met	Arg	Lys	Ala	Val	Glu	Asp	His	Tyr	Asp	Gly	Thr	Val		
				165					170					175				
	gcg	ttc	ctg	gcc	agc	ggc	tcg	ctg	tcg	cac	cgc	ttc	gcg	cag	aac	ggc		576
10	Ala	Phe	Leu	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	His	Arg	Phe	Ala	Gln	Asn	Gly		
			180						185					190				
	cag	gcg	ccg	gac	ttt	gcc	acc	aag	gtg	tgg	agc	ccg	ttc	ctc	gaa	acc		624
15	Gln	Ala	Pro	Asp	Phe	Ala	Thr	Lys	Val	Trp	Ser	Pro	Phe	Leu	Glu	Thr		
			195					200					205					
	ctc	gac	cac	cgt	gtg	gtg	caa	atg	tgg	cag	gac	ggc	gag	tgg	gaa	gcg		672
20	Leu	Asp	His	Arg	Val	Val	Gln	Met	Trp	Gln	Asp	Gly	Glu	Trp	Glu	Ala		
		210					215					220						
	ttc	tgc	ggg	atg	ctg	ccg	gag	tac	gcc	gcc	aaa	ggc	cac	ggt	gaa	ggc		720
25	Phe	Cys	Gly	Met	Leu	Pro	Glu	Tyr	Ala	Ala	Lys	Gly	His	Gly	Glu	Gly		
		225				230					235					240		
	ttc	atg	cac	gac	acg	gca	atg	ctg	ctg	ggt	gcg	ctg	ggc	tgg	tcc	gat		768
30	Phe	Met	His	Asp	Thr	Ala	Met	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Trp	Ser	Asp		
				245						250					255			
	tac	gac	ggc	aag	gcc	gaa	gtg	gtc	acg	ccc	tac	ttc	ggc	tot	tcc	ggc		816
35	Tyr	Asp	Gly	Lys	Ala	Glu	Val	Val	Thr	Pro	Tyr	Phe	Gly	Ser	Ser	Gly		
			260						265					270				
	acc	ggc	cag	atc	aac	gcg	atc	ttc	ccg	gtc	acc	ccg	cag	gac	ggt	ggt		864
40	Thr	Gly	Gln	Ile	Asn	Ala	Ile	Phe	Pro	Val	Thr	Pro	Gln	Asp	Gly	Gly		
			275					280					285					
	gcc	atc	ccc	gct	gcc	cag	gcc	gcc	aac	ccg	gcc	gcc	gtg	gtg	ccc	acc		912
45	Ala	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Ala	Ala	Asn	Pro	Ala	Ala	Val	Val	Pro	Thr		
		290				295						300						
	agc	cgc	ctg	taa														924
50	Ser	Arg	Leu															
	305																	

<210> 24

<211> 307

50 <212> PRT

<213> *Pseudomonas putida* U

<400> 24

55	Met	Gly	Lys	Leu	Ala	Leu	Thr	Ala	Lys	Ile	Thr	His	Val	Pro	Ser	Met		
	1				5					10					15			
	Tyr	Met	Ser	Glu	Leu	Pro	Gly	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Arg	Gln	Ala	Ala		
60				20					25					30				
	Ile	Asp	Gly	His	His	Glu	Ile	Ser	Arg	Arg	Cys	Arg	Glu	Leu	Gly	Val		
			35					40					45					
65	Asp	Thr	Ile	Val	Val	Phe	Asp	Thr	His	Trp	Leu	Val	Asn	Ala	Asn	Tyr		

ES 2 364 110 A1

	50		55		60											
5	His 65	Val	Leu	Cys	Gly	Pro 70	His	Phe	Glu	Gly	Val 75	Tyr	Thr	Ser	Asn	Glu 80
	Leu	Pro	His	Phe	Ile 85	Ser	Asn	Met	Pro	Tyr 90	Ala	Phe	Pro	Gly	Asn 95	Pro
10	Glu	Leu	Gly	Lys 100	Leu	Leu	Ala	Glu	Glu 105	Cys	Asn	Arg	Phe	Asn 110	Val	Glu
15	Thr	Met	Ala 115	His	His	Ala	Thr	Thr 120	Leu	Ala	Pro	Glu	Tyr 125	Gly	Thr	Leu
	Val	Pro	Met	Arg	Tyr	Met	Asn 135	Gln	Asp	Gln	His	Phe	Lys 140	Val	Val	Ser
20	Val	Ser	Ala	Leu	Cys	Thr 150	Ser	His	Tyr	Leu	Ala 155	Asp	Ser	Ala	Arg	Leu 160
25	Gly	Trp	Ala	Met	Arg 165	Lys	Ala	Val	Glu	Asp 170	His	Tyr	Asp	Gly	Thr	Val 175
	Ala	Phe	Leu	Ala 180	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser 185	His	Arg	Phe	Ala	Gln 190	Asn	Gly
30	Gln	Ala	Pro	Asp	Phe	Ala	Thr	Lys 200	Val	Trp	Ser	Pro	Phe 205	Leu	Glu	Thr
35	Leu	Asp 210	His	Arg	Val	Val	Gln 215	Met	Trp	Gln	Asp	Gly 220	Glu	Trp	Glu	Ala
	Phe	Cys	Gly	Met	Leu	Pro 230	Glu	Tyr	Ala	Ala	Lys 235	Gly	His	Gly	Glu	Gly 240
40	Phe	Met	His	Asp	Thr 245	Ala	Met	Leu	Leu	Gly 250	Ala	Leu	Gly	Trp	Ser	Asp 255
45	Tyr	Asp	Gly	Lys 260	Ala	Glu	Val	Val	Thr 265	Pro	Tyr	Phe	Gly	Ser 270	Ser	Gly
	Thr	Gly	Gln	Ile	Asn	Ala	Ile	Phe 280	Pro	Val	Thr	Pro	Gln 285	Asp	Gly	Gly
50	Ala	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Ala 295	Ala	Asn	Pro	Ala	Ala	Val	Val	Pro	Thr
55	Ser 305	Arg	Leu													

<210> 25

60 <211> 1461

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

65 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1461)

ES 2 364 110 A1

<223> hpaE

<400> 25

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

ES 2 364 110 A1

```

gtc ttt gca gag atc aag aac gtg tgt att tcc atg ggt aat cac cac      1440
Val Phe Ala Glu Ile Lys Asn Val Cys Ile Ser Met Gly Asn His His
465                               470                               475                               480

5   att cct cgc tgg ggc atc taa      1461
    Ile Pro Arg Trp Gly Ile
                                485

10  <210> 26
    <211> 486
    <212> PRT
    <213> Pseudomonas putida U

15  <400> 26

20  Met Ile Lys His Trp Ile Asn Gly Arg Glu Val Glu Ser Lys Asp Thr
    1                               5                               10                               15

    Phe Val Asn Tyr Asn Pro Ala Thr Gly Asp Ala Ile Cys Glu Val Ala
    20                               25                               30

25  Ser Gly Gly Ala Glu Glu Val Ala Gln Ala Val Ala Ala Ala Lys Glu
    35                               40                               45

30  Ala Phe Pro Lys Trp Ala Asn Thr Pro Ala Lys Glu Arg Ala Arg Leu
    50                               55                               60

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

35  Glu Leu Glu Thr Leu Asp Thr Gly Leu Pro Ile His Gln Thr Lys Asn
    85                               90                               95

40  Val Leu Ile Pro Arg Ala Ser His Asn Phe Asp Phe Phe Ala Glu Val
    100                              105                              110

    Cys Thr Arg Met Asp Gly His Thr Tyr Pro Val Asp Asp Gln Met Leu
    115                              120                              125

45  Asn Tyr Thr Leu Tyr Gln Pro Val Gly Val Cys Gly Leu Val Ser Pro
    130                              135                              140

50  Trp Asn Val Pro Phe Met Thr Ala Thr Trp Lys Thr Ala Pro Cys Leu
    145                              150                              155                              160

    Ala Leu Gly Asn Thr Ala Val Leu Lys Met Ser Glu Leu Ser Pro Leu
    165                              170                              175

55  Thr Ala Asn Glu Leu Gly Arg Leu Ala Val Glu Ala Gly Ile Pro Asn
    180                              185                              190

60  Gly Val Leu Asn Val Ile Gln Gly Tyr Gly Ala Thr Ala Gly Asp Ala
    195                              200                              205

    Leu Val Arg His Pro Asp Val Arg Ala Ile Ser Phe Thr Gly Gly Thr
    210                              215                              220

65

```

ES 2 364 110 A1

	Ala	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Met	Gln	Thr	Ala	Gly	Leu	Lys	Lys	Tyr	Ser
	225					230					235					240
5	Met	Glu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Pro	Val	Leu	Ile	Phe	Glu	Asp	Ala	Asp
				245						250					255	
	Leu	Glu	Arg	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Phe	Thr	Ile	Phe	Ser	Leu	Asn
10				260					265					270		
	Gly	Glu	Arg	Cys	Thr	Ala	Gly	Ser	Arg	Ile	Phe	Ile	Gln	Glu	Ser	Val
			275					280					285			
15	Tyr	Pro	Gln	Phe	Val	Ala	Glu	Phe	Ala	Ala	Arg	Ala	Lys	Arg	Leu	Ile
		290					295						300			
	Val	Gly	Asp	Pro	Thr	Asp	Pro	Lys	Thr	Gln	Val	Gly	Ser	Met	Ile	Thr
20	305					310					315					320
	Gln	Gln	His	Tyr	Asp	Lys	Val	Thr	Gly	Tyr	Ile	Arg	Ile	Gly	Ile	Glu
				325						330					335	
25	Glu	Gly	Ala	Arg	Leu	Val	Ala	Gly	Gly	Leu	Glu	Arg	Pro	Ala	Asn	Leu
				340					345					350		
	Pro	Ala	His	Leu	Ala	Lys	Gly	Gln	Phe	Ile	Gln	Pro	Thr	Val	Phe	Ala
30			355					360					365			
	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Met	Arg	Ile	Ala	Gln	Glu	Glu	Ile	Phe	Gly	Pro
		370					375					380				
35	Val	Val	Cys	Leu	Ile	Pro	Phe	Lys	Asp	Glu	Ala	Glu	Ala	Leu	Gln	Leu
	385					390					395					400
	Ala	Asn	Asp	Thr	Glu	Tyr	Gly	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ile	Trp	Thr	Gln	Asp
40				405						410					415	
	Ile	Gly	Lys	Ala	His	Arg	Leu	Ala	Arg	Gly	Ile	Glu	Ala	Gly	Met	Val
			420						425					430		
45	Phe	Ile	Asn	Ser	Gln	Asn	Val	Arg	Asp	Leu	Arg	Gln	Pro	Phe	Gly	Gly
			435					440					445			
	Val	Lys	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	Arg	Glu	Gly	Gly	Gln	Tyr	Ser	Phe	Glu
50		450					455					460				
	Val	Phe	Ala	Glu	Ile	Lys	Asn	Val	Cys	Ile	Ser	Met	Gly	Asn	His	His
	465					470					475					480
55	Ile	Pro	Arg	Trp	Gly	Ile										
					485											

<210> 27

60 <211> 405

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

65 <220>

<221> CDS

ES 2 364 110 A1

<222> (1)..(405)

<223> hpaF

5 <400> 27

10	atg cca cac ctg gtt ctg ctc tat acc ccc gac ctg gaa acc gac gcc	48
	Met Pro His Leu Val Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Leu Glu Thr Asp Ala	
	1 5 10 15	
15	gac atc ccc ggc ctg tgc cgc gcc ctg gcc gac acc atg ctc gaa cag	96
	Asp Ile Pro Gly Leu Cys Arg Ala Leu Ala Asp Thr Met Leu Glu Gln	
	20 25 30	
20	cgc gat gcc gaa ggc aaa gcc gtg ttc ccc act ggc ggt aca cgc gtg	144
	Arg Asp Ala Glu Gly Lys Ala Val Phe Pro Thr Gly Gly Thr Arg Val	
	35 40 45	
25	ctg gcc tac ccc gcc gcc cat tgc gcg gtg gcc gac ggc aaa ggc gaa	192
	Leu Ala Tyr Pro Ala Ala His Cys Ala Val Ala Asp Gly Lys Gly Glu	
	50 55 60	
30	tac ggc ttt ctg tac gcc aac ctg cgc atg gct acc ggc cgt agc gcc	240
	Tyr Gly Phe Leu Tyr Ala Asn Leu Arg Met Ala Thr Gly Arg Ser Ala	
	65 70 75 80	
35	gag gtg cac aaa aca gtg ggc gac agc ttg ctg gca gtg ttg aaa gcg	288
	Glu Val His Lys Thr Val Gly Asp Ser Leu Leu Ala Val Leu Lys Ala	
	85 90 95	
40	cgc ctg gac cca ctg ctg caa cag cgc ccg atc ggc atc acc gtg cag	336
	Arg Leu Asp Pro Leu Leu Gln Gln Arg Pro Ile Gly Ile Thr Val Gln	
	100 105 110	
45	atc gac cac agc acc gcc cag gtc tac gac gcc aag cac agc acc ttg	384
	Ile Asp His Ser Thr Ala Gln Val Tyr Asp Ala Lys His Ser Thr Leu	
	115 120 125	
50	cac cca ctg ttc aac cgc tag	405
	His Pro Leu Phe Asn Arg	
	130	

<210> 28

<211> 134

50 <212> PRT

<213> *Pseudomonas putida* U

55 <400> 28

60	Met Pro His Leu Val Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Leu Glu Thr Asp Ala	15
	1 5 10 15	
65	Asp Ile Pro Gly Leu Cys Arg Ala Leu Ala Asp Thr Met Leu Glu Gln	30
	20 25 30	
70	Arg Asp Ala Glu Gly Lys Ala Val Phe Pro Thr Gly Gly Thr Arg Val	45
	35 40 45	
75	Leu Ala Tyr Pro Ala Ala His Cys Ala Val Ala Asp Gly Lys Gly Glu	60
	50 55 60	

ES 2 364 110 A1

```

    Tyr Gly Phe Leu Tyr Ala Asn Leu Arg Met Ala Thr Gly Arg Ser Ala
    65                70                75                80
5    Glu Val His Lys Thr Val Gly Asp Ser Leu Leu Ala Val Leu Lys Ala
           85                90                95
10   Arg Leu Asp Pro Leu Leu Gln Gln Arg Pro Ile Gly Ile Thr Val Gln
           100                105                110
15   Ile Asp His Ser Thr Ala Gln Val Tyr Asp Ala Lys His Ser Thr Leu
           115                120                125
20   His Pro Leu Phe Asn Arg
           130

```

<210> 29

20 <211> 660

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(660)

30 <223> hpaG1

<400> 29

```

    atg agc cat gcc ctg ctt gac gtt gcc agc ggc acc ctg ttc ggc gtc      48
    Met Ser His Ala Leu Leu Asp Val Ala Ser Gly Thr Leu Phe Gly Val
    1                5                10                15
35   gcg ctg aac tac cag ggt ttg ctg cag cag cac caa gcg gcg ttc gtg      96
    Ala Leu Asn Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Gln His Gln Ala Ala Phe Val
           20                25                30
40   gaa gca ccg tac aag caa ctg ccg gtc aag ccg gtg ttg ttc gtc aag      144
    Glu Ala Pro Tyr Lys Gln Leu Pro Val Lys Pro Val Leu Phe Val Lys
           35                40                45
45   acc ccg aac acc cgc aac cag cat gaa ggc cag gtg gta ttc ccg gcc      192
    Thr Pro Asn Thr Arg Asn Gln His Glu Gly Gln Val Val Phe Pro Ala
           50                55                60
50   ggc gtg cag cgc gtg caa ccc ggc ccg gcg ctg gga gtg gtg att ggc      240
    Gly Val Gln Arg Val Gln Pro Gly Pro Ala Leu Gly Val Val Ile Gly
    65                70                75                80
55   aag gac gcc agc cgc gtc agc gtg gcc gat gcc ctg gag cat gtg gcg      288
    Lys Asp Ala Ser Arg Val Ser Val Ala Asp Ala Leu Glu His Val Ala
           85                90                95
60   ggc tac acc atc gtc aac gaa gtg agc ctg ccc gaa gcc agc tac tac      336
    Gly Tyr Thr Ile Val Asn Glu Val Ser Leu Pro Glu Ala Ser Tyr Tyr
           100                105                110
65   cgc cct gca gtc aag gcc aag tgc cgt gat ggt ttt tgc ccg gtc ggc      384
    Arg Pro Ala Val Lys Ala Lys Cys Arg Asp Gly Phe Cys Pro Val Gly
           115                120                125

```


ES 2 364 110 A1

	Leu	Arg	Leu	Tyr	Val	Asn	Gly	Glu	Leu	Arg	Gln	His	Asn	Asn	Thr	Ala
	145					150					155					160
5	Asn	Cys	Val	Arg	Thr	Val	Ala	Gln	Leu	Ile	Ala	Glu	Ile	Ser	Glu	Phe
					165					170					175	
	Met	Thr	Leu	His	Ala	Gly	Asp	Ile	Leu	Ile	Thr	Gly	Thr	Pro	Glu	Gly
10				180					185					190		
	Arg	Val	Asp	Val	Gln	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Asp	Ile	Glu	Ile	Asp	Gly
			195					200					205			
15	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Asn	His	Ile	Val	Ala	Glu					
		210					215									

<210> 31

<211> 765

20 <212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(765)

<223> hpaG2

30 <400> 31

	gtg	aaa	cac	gcc	cgt	atc	cag	ttc	gac	ggc	cag	gcc	cac	gat	gtc	acg
35	Val	Lys	His	Ala	Arg	Ile	Gln	Phe	Asp	Gly	Gln	Ala	His	Asp	Val	Thr
	1				5					10					15	
	gtc	gaa	gac	gat	cac	ctg	cgc	ctt	gcc	gac	ggc	cgc	ctg	gtc	cat	cag
40	Val	Glu	Asp	Asp	His	Leu	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	His	Gln
				20					25					30		
	gac	cag	gtc	acc	tgg	ctg	cca	ccc	gcc	acc	ggc	agc	atg	ttc	gcc	ctg
45	Asp	Gln	Val	Thr	Trp	Leu	Pro	Pro	Ala	Thr	Gly	Ser	Met	Phe	Ala	Leu
			35					40					45			
	ggc	ctg	aac	tac	gcc	gac	cac	gcc	agg	gag	ctg	gcc	ttc	gcg	ccg	ccc
50	Gly	Leu	Asn	Tyr	Ala	Asp	His	Ala	Arg	Glu	Leu	Ala	Phe	Ala	Pro	Pro
		50					55					60				
	acc	gaa	ccg	ttg	gct	ttc	atc	aag	tcg	cca	ggc	acc	tac	acc	ggc	cac
55	Thr	Glu	Pro	Leu	Ala	Phe	Ile	Lys	Ser	Pro	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gly	His
	65					70					75					80
	atc	cag	gtc	acc	tgg	cgc	ccg	gac	aac	gtc	gaa	tac	atg	cac	tac	gag
60	Ile	Gln	Val	Thr	Trp	Arg	Pro	Asp	Asn	Val	Glu	Tyr	Met	His	Tyr	Glu
					85					90					95	
	tgc	gag	ctg	gtg	gcg	gtg	atc	ggc	aaa	gcg	gcg	aag	aac	gtc	aag	cgt
65	Cys	Glu	Leu	Val	Ala	Val	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	Lys	Asn	Val	Lys	Arg
				100					105					110		
	gag	gac	gcc	ctg	gcc	tac	gtt	gcc	ggc	tac	acc	gtg	tgc	aac	gac	tac
65	Glu	Asp	Ala	Leu	Ala	Tyr	Val	Ala	Gly	Tyr	Thr	Val	Cys	Asn	Asp	Tyr
			115					120					125			

ES 2 364 110 A1

```

gcc atc cgc gac tac ctg gaa aac tac tac cgc ccc aac ctg cgg gtg      432
Ala Ile Arg Asp Tyr Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Pro Asn Leu Arg Val
    130                      135                      140

5
aaa aac cgc gat gcc acc acc ccg gtc ggc ccg tgg atc gtc gat gcg      480
Lys Asn Arg Asp Ala Thr Thr Pro Val Gly Pro Trp Ile Val Asp Ala
    145                      150                      155                      160

10
gcc gat gtg cca gac gtc agc aac ctg aag ctg cgc acc tgg atc aac      528
Ala Asp Val Pro Asp Val Ser Asn Leu Lys Leu Arg Thr Trp Ile Asn
                      165                      170                      175

15
ggt gag ctg aag cag gaa ggc acc acc gcg gac atg atc ttc gac atc      576
Gly Glu Leu Lys Gln Glu Gly Thr Thr Ala Asp Met Ile Phe Asp Ile
                      180                      185                      190

20
ccg cac ctc atc gaa tac ttc tcc agc ttc atg acc ctg caa ccg ggc      624
Pro His Leu Ile Glu Tyr Phe Ser Ser Phe Met Thr Leu Gln Pro Gly
                      195                      200                      205

25
gac atg atc gcc acc ggc acg cca gaa ggc ctg gcc gat gtg gtg ccg      672
Asp Met Ile Ala Thr Gly Thr Pro Glu Gly Leu Ala Asp Val Val Pro
    210                      215                      220

30
ggt gac gaa gtg gtg gtg gaa gtg gaa ggc gtc ggt cgc ctg gtc aac      720
Gly Asp Glu Val Val Val Glu Val Glu Gly Val Gly Arg Leu Val Asn
    225                      230                      235                      240

35
cgt atc gtc agc gaa gct gac ttc ttc aag aac aac aag gca tga      765
Arg Ile Val Ser Glu Ala Asp Phe Phe Lys Asn Asn Lys Ala
                      245                      250

<210> 32
<211> 254
40 <212> PRT
    <213> Pseudomonas putida U

45 <400> 32

Val Lys His Ala Arg Ile Gln Phe Asp Gly Gln Ala His Asp Val Thr
1      5      10      15

50
Val Glu Asp Asp His Leu Arg Leu Ala Asp Gly Arg Leu Val His Gln
    20      25      30

55
Asp Gln Val Thr Trp Leu Pro Pro Ala Thr Gly Ser Met Phe Ala Leu
    35      40      45

60
Gly Leu Asn Tyr Ala Asp His Ala Arg Glu Leu Ala Phe Ala Pro Pro
    50      55      60

65
Thr Glu Pro Leu Ala Phe Ile Lys Ser Pro Gly Thr Tyr Thr Gly His
    65      70      75      80

Ile Gln Val Thr Trp Arg Pro Asp Asn Val Glu Tyr Met His Tyr Glu
65      85      90      95

```

ES 2 364 110 A1

Cys Glu Leu Val Ala Val Ile Gly Lys Ala Ala Lys Asn Val Lys Arg
 100 105 110
 5 Glu Asp Ala Leu Ala Tyr Val Ala Gly Tyr Thr Val Cys Asn Asp Tyr
 115 120 125
 Ala Ile Arg Asp Tyr Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Pro Asn Leu Arg Val
 130 135 140
 10 Lys Asn Arg Asp Ala Thr Thr Pro Val Gly Pro Trp Ile Val Asp Ala
 145 150 155 160
 15 Ala Asp Val Pro Asp Val Ser Asn Leu Lys Leu Arg Thr Trp Ile Asn
 165 170 175
 Gly Glu Leu Lys Gln Glu Gly Thr Thr Ala Asp Met Ile Phe Asp Ile
 180 185 190
 20 Pro His Leu Ile Glu Tyr Phe Ser Ser Phe Met Thr Leu Gln Pro Gly
 195 200 205
 25 Asp Met Ile Ala Thr Gly Thr Pro Glu Gly Leu Ala Asp Val Val Pro
 210 215 220
 Gly Asp Glu Val Val Val Glu Val Glu Gly Val Gly Arg Leu Val Asn
 225 230 235 240
 30 Arg Ile Val Ser Glu Ala Asp Phe Phe Lys Asn Asn Lys Ala
 245 250

<210> 33

<211> 804

35 <212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

<220>

40 <221> CDS

<222> (1)..(804)

<223> hpaH

45 <400> 33

atg cta gac aac gct ttc atc cag cac gcc gcc gac cgc ctc gac cag 48
 Met Leu Asp Asn Ala Phe Ile Gln His Ala Ala Asp Arg Leu Asp Gln
 50 1 5 10 15
 gcc gaa cgc tcc cgc gag caa gtg cgc cag ttc tcg ctg gag caa ccg 96
 Ala Glu Arg Ser Arg Glu Gln Val Arg Gln Phe Ser Leu Glu Gln Pro
 55 20 25 30
 gca atc acc atc gaa gac gcc tac gcc atc cag cgc gcc tgg gtg gca 144
 Ala Ile Thr Ile Glu Asp Ala Tyr Ala Ile Gln Arg Ala Trp Val Ala
 35 40 45
 60 aaa aag atc gcc gcc ggg cgc aag ctg gtg ggc cac aag atc ggc ctg 192
 Lys Lys Ile Ala Ala Gly Arg Lys Leu Val Gly His Lys Ile Gly Leu
 50 55 60
 65 acc tcg cgc gcc atg cag gta tcg tcg aac atc acc gag ccc gac tac 240

ES 2 364 110 A1

Thr Ser Arg Ala Met Gln Val Ser Ser Asn Ile Thr Glu Pro Asp Tyr
65 70 75 80

5 ggc gcc ttg ctc gac gac atg ctg ttc gac gaa ggc agc gac atc ccc 288
Gly Ala Leu Leu Asp Asp Met Leu Phe Asp Glu Gly Ser Asp Ile Pro
85 90 95

10 ttc gag cgc ttc atc gtg ccg cgg gtt gaa gtg gag ttg gcg ttc atc 336
Phe Glu Arg Phe Ile Val Pro Arg Val Glu Val Glu Leu Ala Phe Ile
100 105 110

15 ctc ggc aag ccg ctg aag ggc ccg aac atc acc gtg ttt gat gtg ctg 384
Leu Gly Lys Pro Leu Lys Gly Pro Asn Ile Thr Val Phe Asp Val Leu
115 120 125

20 gac gcc acc gag tgg gtg atc ccg gcg ctg gaa atc att gac gcg cgc 432
Asp Ala Thr Glu Trp Val Ile Pro Ala Leu Glu Ile Ile Asp Ala Arg
130 135 140

25 atc cag cag gtg gac ccg caa acc cag gcc acc cgc aag gtg ttc gac 480
Ile Gln Gln Val Asp Pro Gln Thr Gln Ala Thr Arg Lys Val Phe Asp
145 150 155 160

30 acc atc tcc gac aac gcc gcc aat gcc ggc gtg gtg atg ggc ggg cgg 528
Thr Ile Ser Asp Asn Ala Ala Asn Ala Gly Val Val Met Gly Gly Arg
165 170 175

35 gcc gtg cgc ccc acc gaa atc gac ctg cgc aaa gtg ccg gcg gtg ctc 576
Ala Val Arg Pro Thr Glu Ile Asp Leu Arg Lys Val Pro Ala Val Leu
180 185 190

40 tac cgc aat ggc gtg atc gag gaa tcc ggg gtc agc gct gcc gtg ctc 624
Tyr Arg Asn Gly Val Ile Glu Glu Ser Gly Val Ser Ala Ala Val Leu
195 200 205

45 aac cac ccg gcc aaa ggc gtt gcc tgg ctg gcc aac aaa ctg gcg ccg 672
Asn His Pro Ala Lys Gly Val Ala Trp Leu Ala Asn Lys Leu Ala Pro
210 215 220

50 tac gac gtc acc ttg cag ccc ggc cag atc atc ctt ggg ggt tcg ttc 720
Tyr Asp Val Thr Leu Gln Pro Gly Gln Ile Ile Leu Gly Gly Ser Phe
225 230 235 240

55 acc cgc ccg gtc gcc gct cgc cca ggt gac acc ttc cac gtc gac tac 768
Thr Arg Pro Val Ala Ala Arg Pro Gly Asp Thr Phe His Val Asp Tyr
245 250 255

60 gac atg ctc ggc tcc atc gcc tgc cgc ttc gtt taa 804
Asp Met Leu Gly Ser Ile Ala Cys Arg Phe Val
260 265

60 <210> 34
<211> 267
<212> PRT
<213> *Pseudomonas putida* U

65

ES 2 364 110 A1

<400> 34

5 Met Leu Asp Asn Ala Phe Ile Gln His Ala Ala Asp Arg Leu Asp Gln
1 5 10 15
Ala Glu Arg Ser Arg Glu Gln Val Arg Gln Phe Ser Leu Glu Gln Pro
20 25 30
10 Ala Ile Thr Ile Glu Asp Ala Tyr Ala Ile Gln Arg Ala Trp Val Ala
35 40 45
Lys Lys Ile Ala Ala Gly Arg Lys Leu Val Gly His Lys Ile Gly Leu
50 55 60
15 Thr Ser Arg Ala Met Gln Val Ser Ser Asn Ile Thr Glu Pro Asp Tyr
65 70 75 80
20 Gly Ala Leu Leu Asp Asp Met Leu Phe Asp Glu Gly Ser Asp Ile Pro
85 90 95
Phe Glu Arg Phe Ile Val Pro Arg Val Glu Val Glu Leu Ala Phe Ile
100 105 110
25 Leu Gly Lys Pro Leu Lys Gly Pro Asn Ile Thr Val Phe Asp Val Leu
115 120 125
30 Asp Ala Thr Glu Trp Val Ile Pro Ala Leu Glu Ile Ile Asp Ala Arg
130 135 140
Ile Gln Gln Val Asp Pro Gln Thr Gln Ala Thr Arg Lys Val Phe Asp
145 150 155 160
35 Thr Ile Ser Asp Asn Ala Ala Asn Ala Gly Val Val Met Gly Gly Arg
165 170 175
40 Ala Val Arg Pro Thr Glu Ile Asp Leu Arg Lys Val Pro Ala Val Leu
180 185 190
Tyr Arg Asn Gly Val Ile Glu Glu Ser Gly Val Ser Ala Ala Val Leu
195 200 205
45 Asn His Pro Ala Lys Gly Val Ala Trp Leu Ala Asn Lys Leu Ala Pro
210 215 220
50 Tyr Asp Val Thr Leu Gln Pro Gly Gln Ile Ile Leu Gly Gly Ser Phe
225 230 235 240
Thr Arg Pro Val Ala Ala Arg Pro Gly Asp Thr Phe His Val Asp Tyr
245 250 255
55 Asp Met Leu Gly Ser Ile Ala Cys Arg Phe Val
260 265

60 <210> 35

<211> 804

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

65

<220>

<221> CDS

ES 2 364 110 A1

<222> (1)..(804)

<223> hpaI

5 <400> 35

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

ES 2 364 110 A1

	210	215	220														
5	Tyr 225	Ile 230	Glu 235	Leu 240	Gly 245	Ala 250	Ala 255	Phe 260	Val 265	Ala 270	Val 275	Gly 280	Val 285	Asp 290	Thr 295	Thr 300	
10	Val	Leu	Met	Arg	Gly 245	Leu	Arg	Glu	Leu	Ala 250	Gly	Lys	Phe	Lys	Asp 255	Thr	
15	Val	Val	Val	Pro 260	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly 265	Ala	Tyr						
20	<210> 37																
25	<211> 906																
30	<212> DNA																
35	<213> <i>Pseudomonas putida</i> U																
40	<220>																
45	<221> CDS																
50	<222> (1)..(906)																
55	<223> hpaA																
60	<400> 37																
30	atg	agc	gac	cgg	cat	ccg	ata	ccg	aac	atc	aac	att	ggc	cag	gtt	tac	48
35	Met	Ser	Asp	Arg	His	Pro	Ile	Pro	Asn	Ile	Asn	Ile	Gly	Gln	Val	Tyr	
40	1				5					10					15		
45	gac	cag	cgc	tac	agc	gac	agc	gag	gtg	cat	tac	gac	cgg	ctg	ggc	aac	96
50	Asp	Gln	Arg	Tyr	Ser	Asp	Ser	Glu	Val	His	Tyr	Asp	Arg	Leu	Gly	Asn	
55				20					25					30			
60	ctg	gcg	ggc	ttt	ttc	ggg	cgc	aac	atg	ccg	gtg	cac	cgg	cat	gac	cgg	144
65	Leu	Ala	Gly	Phe	Phe	Gly	Arg	Asn	Met	Pro	Val	His	Arg	His	Asp	Arg	
70			35					40					45				
75	ttt	ttc	cag	gtg	cat	tac	gtg	aag	tcg	ggc	aca	gta	cgg	gtg	tat	ctg	192
80	Phe	Phe	Gln	Val	His	Tyr	Val	Lys	Ser	Gly	Thr	Val	Arg	Val	Tyr	Leu	
85		50					55					60					
90	gat	gac	cag	cag	tac	atc	gag	gcc	ggg	ccg	atg	ttc	ttc	ctc	acg	cca	240
95	Asp	Asp	Gln	Gln	Tyr	Ile	Glu	Ala	Gly	Pro	Met	Phe	Phe	Leu	Thr	Pro	
100	65					70					75				80		
105	ccc	acg	gtg	gcg	cac	gcg	ttc	gtc	acc	gaa	gct	gac	agc	gac	ggg	cat	288
110	Pro	Thr	Val	Ala	His	Ala	Phe	Val	Thr	Glu	Ala	Asp	Ser	Asp	Gly	His	
115					85				90					95			
120	gtg	ctg	acg	gtg	cgc	cag	caa	ctg	gtg	tgg	caa	ttg	atc	gaa	gcc	gac	336
125	Val	Leu	Thr	Val	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Trp	Gln	Leu	Ile	Glu	Ala	Asp	
130				100				105					110				
135	gcc	agc	ctg	ctg	ccg	gcg	ggc	atg	cag	gtg	cag	cca	gcc	tgt	gtg	gcg	384
140	Ala	Ser	Leu	Leu	Pro	Ala	Gly	Met	Gln	Val	Gln	Pro	Ala	Cys	Val	Ala	
145			115					120				125					
150	ctg	ggc	aac	ctg	ccg	gcc	gaa	tac	aag	gcc	gag	gcg	cag	cgc	ctg	caa	432
155	Leu	Gly	Asn	Leu	Pro	Ala	Glu	Tyr	Lys	Ala	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Gln	
160		130					135					140					

ES 2 364 110 A1

ggc tgg ctg gac gcg ttg agt gac gag ttt gcc acg cag caa ccg ggt 480
 Gly Trp Leu Asp Ala Leu Ser Asp Glu Phe Ala Thr Gln Gln Pro Gly
 145 150 155 160

5 cgc gag gcg gcg ttg cag tcg ctg acc cgc ctg atc atg atc agc ctg 528
 Arg Glu Ala Ala Leu Gln Ser Leu Thr Arg Leu Ile Met Ile Ser Leu
 165 170 175

10 ctg cgg ctg tgc ccc aac tcg ctg gaa tcg acc ccg gcg cgg cat gaa 576
 Leu Arg Leu Cys Pro Asn Ser Leu Glu Ser Thr Pro Ala Arg His Glu
 180 185 190

15 gac ctg aag atc ttc cac cgt ttc aat gcc ctg atc gaa gcg cat tac 624
 Asp Leu Lys Ile Phe His Arg Phe Asn Ala Leu Ile Glu Ala His Tyr
 195 200 205

20 ctt gag cat tgg ccg ctg gcc cgc tac gcg cag cag att gcc gtg acc 672
 Leu Glu His Trp Pro Leu Ala Arg Tyr Ala Gln Gln Ile Gly Val Thr
 210 215 220

25 gag gca cgg ctg aac gat gtg tgc cgg cgc atc gcc gac ttg cca tcc 720
 Glu Ala Arg Leu Asn Asp Val Cys Arg Arg Ile Ala Asp Leu Pro Ser
 225 230 235 240

30 aag cgc ctg gtg ctg gaa cgg ctg atg cag gag gcc aag cgt ttg ctg 768
 Lys Arg Leu Val Leu Glu Arg Leu Met Gln Glu Ala Lys Arg Leu Leu
 245 250 255

35 ttg ttt tcc gcc agc acg gcc aac gaa atc tgt tac cag ctc gcc ttc 816
 Leu Phe Ser Gly Ser Thr Ala Asn Glu Ile Cys Tyr Gln Leu Gly Phe
 260 265 270

40 aag gat ccg gcc tat ttc agc cgc ttc ttc aac cgc tac gcc aag ctc 864
 Lys Asp Pro Ala Tyr Phe Ser Arg Phe Phe Asn Arg Tyr Ala Lys Leu
 275 280 285

45 aca ccc ggg gag tac cgc cag cgg cag gca gaa ttg cag tga 906
 Thr Pro Gly Glu Tyr Arg Gln Arg Gln Ala Glu Leu Gln
 290 295 300

45 <210> 38
 <211> 301
 <212> PRT

50 <213> *Pseudomonas putida* U

<400> 38

55 Met Ser Asp Arg His Pro Ile Pro Asn Ile Asn Ile Gly Gln Val Tyr
 1 5 10 15

Asp Gln Arg Tyr Ser Asp Ser Glu Val His Tyr Asp Arg Leu Gly Asn
 20 25 30

60 Leu Ala Gly Phe Phe Gly Arg Asn Met Pro Val His Arg His Asp Arg
 35 40 45

65 Phe Phe Gln Val His Tyr Val Lys Ser Gly Thr Val Arg Val Tyr Leu
 50 55 60

ES 2 364 110 A1

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

<210> 39

<211> 1308

55 <212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

<220>

60 <221> CDS

<222> (1)..(1308)

<223> hpaX

65

ES 2 364 110 A1

<400> 39

	atg agc aca ctc gaa caa gcc tcg ccg cgc gag gca cac gtt gaa cgg	48
5	Met Ser Thr Leu Glu Gln Ala Ser Pro Arg Glu Ala His Val Glu Arg 1 5 10 15	
	gcc gac agt acc cat cgg gca gtc acc tgg cgg ctg atg ccg ctg ctg	96
10	Ala Asp Ser Thr His Arg Ala Val Thr Trp Arg Leu Met Pro Leu Leu 20 25 30	
	ctg gtg tgc tac ctg ttc gcc cac ctg gac cgc atc aac att ggc ttc	144
15	Leu Val Cys Tyr Leu Phe Ala His Leu Asp Arg Ile Asn Ile Gly Phe 35 40 45	
	gcc aag atg cag atg agc cag gac ctg cat ttg tcc gac acg gtc tat	192
20	Ala Lys Met Gln Met Ser Gln Asp Leu His Leu Ser Asp Thr Val Tyr 50 55 60	
	ggc ctg ggt gcc ggg ctg ttc ttc att gcc tat gcg ctg ttc ggc gtc	240
25	Gly Leu Gly Ala Gly Leu Phe Phe Ile Ala Tyr Ala Leu Phe Gly Val 65 70 75 80	
	ccc agc aac ctg atg ctc gac cgc gtt ggc cca cgc cgc tgg atc gcc	288
30	Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Val Gly Pro Arg Arg Trp Ile Ala 85 90 95	
	tgc ctg atg gtg gtg tgg ggg ctg ttg tcg acc agc atg ctg ctg atc	336
35	Cys Leu Met Val Val Trp Gly Leu Leu Ser Thr Ser Met Leu Leu Ile 100 105 110	
	gaa agc agc agc gcg ttc tac ctg ttg cgc ttt gcc ctg ggc gcg gcc	384
40	Glu Ser Ser Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Arg Phe Ala Leu Gly Ala Ala 115 120 125	
	gag gcc ggg ttc ttc ccg ggc att ctg gtt tac ctc aac cgc tgg tac	432
45	Glu Ala Gly Phe Phe Pro Gly Ile Leu Val Tyr Leu Asn Arg Trp Tyr 130 135 140	
	ccg gcc ggg cgc cgc gcc cag gtc acc gcg ctg ttc gcc att gcc gtg	480
50	Pro Ala Gly Arg Arg Ala Gln Val Thr Ala Leu Phe Ala Ile Ala Val 145 150 155 160	
	ccg ttg gcc gga gtg gtc ggc ggg cca gtg tcc ggg gcc ata ctg gcc	528
55	Pro Leu Ala Gly Val Val Gly Gly Pro Val Ser Gly Ala Ile Leu Ala 165 170 175	
	ttc atg cac gac acg ggc ggg ctg cgt ggc tgg cag tgg atg ttc ctg	576
60	Phe Met His Asp Thr Gly Gly Leu Arg Gly Trp Gln Trp Met Phe Leu 180 185 190	
	ctc gaa ggg gcg ccg gtg gtg ttg ctg ggc ctg gtg gta ctg gcc gtt	624
65	Leu Glu Gly Ala Pro Val Val Leu Leu Gly Leu Val Val Leu Ala Val 195 200 205	
	ttg ccg gag cac ttc gag cgg gtg agc tgg ctg gat gag cag cag aaa	672
70	Leu Pro Glu His Phe Glu Arg Val Ser Trp Leu Asp Glu Gln Gln Lys 210 215 220	
	gcc acg ctg cgc gcg caa ttc ggt gag gaa gaa cag cgc aag ccc gta	720
75	Ala Thr Leu Arg Ala Gln Phe Gly Glu Glu Glu Gln Arg Lys Pro Val 225 230 235 240	

ES 2 364 110 A1

<400> 40

5 Met Ser Thr Leu Glu Gln Ala Ser Pro Arg Glu Ala His Val Glu Arg
 1 5 10 15
 Ala Asp Ser Thr His Arg Ala Val Thr Trp Arg Leu Met Pro Leu Leu
 20 25 30
 10 Leu Val Cys Tyr Leu Phe Ala His Leu Asp Arg Ile Asn Ile Gly Phe
 35 40 45
 Ala Lys Met Gln Met Ser Gln Asp Leu His Leu Ser Asp Thr Val Tyr
 50 55 60
 15 Gly Leu Gly Ala Gly Leu Phe Phe Ile Ala Tyr Ala Leu Phe Gly Val
 65 70 75 80
 20 Pro Ser Asn Leu Met Leu Asp Arg Val Gly Pro Arg Arg Trp Ile Ala
 85 90 95
 Cys Leu Met Val Val Trp Gly Leu Leu Ser Thr Ser Met Leu Leu Ile
 100 105 110
 25 Glu Ser Ser Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Arg Phe Ala Leu Gly Ala Ala
 115 120 125
 30 Glu Ala Gly Phe Phe Pro Gly Ile Leu Val Tyr Leu Asn Arg Trp Tyr
 130 135 140
 Pro Ala Gly Arg Arg Ala Gln Val Thr Ala Leu Phe Ala Ile Ala Val
 145 150 155 160
 35 Pro Leu Ala Gly Val Val Gly Gly Pro Val Ser Gly Ala Ile Leu Ala
 165 170 175
 40 Phe Met His Asp Thr Gly Gly Leu Arg Gly Trp Gln Trp Met Phe Leu
 180 185 190
 Leu Glu Gly Ala Pro Val Val Leu Leu Gly Leu Val Val Leu Ala Val
 195 200 205
 45 Leu Pro Glu His Phe Glu Arg Val Ser Trp Leu Asp Glu Gln Gln Lys
 210 215 220
 50 Ala Thr Leu Arg Ala Gln Phe Gly Glu Glu Glu Gln Arg Lys Pro Val
 225 230 235 240
 Thr Ser Phe Gly Ala Ile Phe Ala Ser Arg Ala Leu Trp Leu Leu Val
 245 250 255
 55 Ala Val Tyr Cys Ala Val Met Leu Ala Val Asn Thr Leu Ala Phe Trp
 260 265 270
 60 Met Pro Ser Leu Ile His Ser Ala Gly Val Ala Ser Asp Ala Ser Val
 275 280 285
 Gly Leu Leu Ser Ala Val Pro Tyr Val Ala Gly Cys Val Phe Met Leu
 290 295 300
 65 Ala Cys Gly Arg Ser Ser Asp Arg Gln Arg Glu Arg Arg Trp His Leu

ES 2 364 110 A1

	305	310	315	320
5	Cys Val Pro Leu	Leu Met Ala Ala Ile	Gly Ile Ala Ile Ala Ala Ile	
		325	330	335
10	Ala Pro Glu Gln	Ala Leu Pro Val Met	Ala Gly Leu Val Leu Ala Gly	
		340	345	350
15	Met Gly Ala Ser	Ala Ala Leu Pro Met Phe Trp	Gln Leu Pro Pro Ala	
		355	360	365
20	Phe Leu Asn Ala	Arg Thr Gln Ala Ala Gly	Ile Ala Leu Ile Ser Ser	
		370	375	380
25	Leu Gly Ser Ile	Ala Ser Phe Phe Thr Pro	Tyr Phe Ile Gly Trp Val	
		385	390	400
30	Arg Asp Thr Thr	His Ser Ala Ser Leu Ala	Leu Tyr Val Leu Ala Val	
		405	410	415
35	Phe Ile Ala Leu	Gly Gly Leu Leu Val	Leu Arg Thr Gln Ala Ala Ile	
		420	425	430
40	Val Asn Pro			
		435		

<210> 41

<211> 423

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(423)

<223> hpaR1

<400> 41

	atg	acc	aca	ccg	aga	ccc	tcc	ctg	acc	ctg	acc	ttg	ctg	cag	gcg	cgc		48
45	Met	Thr	Thr	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Ala	Arg		
	1				5					10					15			
50																		
	gaa	gcc	acc	atg	gcg	ttc	ttc	cgc	ccg	gcg	ctg	aat	gcc	cat	gac	ctg		96
	Glu	Ala	Thr	Met	Ala	Phe	Phe	Arg	Pro	Ala	Leu	Asn	Ala	His	Asp	Leu		
				20					25					30				
55																		
	acc	gag	cag	caa	tgg	cgg	gta	atc	cgt	atc	ctg	cgc	cag	caa	ggc	gag		144
	Thr	Glu	Gln	Gln	Trp	Arg	Val	Ile	Arg	Ile	Leu	Arg	Gln	Gln	Gly	Glu		
			35					40					45					
60																		
	ctg	gaa	agc	cat	cag	ttg	gcg	gag	ctg	gcc	tgt	atc	ctc	aaa	ccc	agt		192
	Leu	Glu	Ser	His	Gln	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Cys	Ile	Leu	Lys	Pro	Ser		
		50				55					60							
65																		
	atg	agc	ggg	gtg	ctc	aag	cgc	ctg	gag	cgt	gac	ggc	atc	gta	gcg	cgg		240
	Met	Ser	Gly	Val	Leu	Lys	Arg	Leu	Glu	Arg	Asp	Gly	Ile	Val	Ala	Arg		
						70					75				80			
70																		
	cgc	aag	tcg	ccg	gag	gac	cag	cgc	cgg	gtg	ttc	atc	agc	ctg	acc	gag		288

ES 2 364 110 A1

Arg Lys Ser Pro Glu Asp Gln Arg Arg Val Phe Ile Ser Leu Thr Glu
 85 90 95

5 gcc ggc cag caa gcg ttt ctg gcg atg agc gag gag atg acc cgc aac 336
 Ala Gly Gln Gln Ala Phe Leu Ala Met Ser Glu Glu Met Thr Arg Asn
 100 105 110

10 tac gac aag atc ctc gcc cag ttt ggc gat gac aag ctg cag cag ctg 384
 Tyr Asp Lys Ile Leu Ala Gln Phe Gly Asp Asp Lys Leu Gln Gln Leu
 115 120 125

15 atg cag ctg ctg ggt gaa atg aag aag atc aaa ccc tga 423
 Met Gln Leu Leu Gly Glu Met Lys Lys Ile Lys Pro
 130 135 140

<210> 42

20 <211> 140

<212> PRT

<213> *Pseudomonas putida* U

25 <400> 42

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

30 Glu Ala Thr Met Ala Phe Phe Arg Pro Ala Leu Asn Ala His Asp Leu
 20 25 30

35 Thr Glu Gln Gln Trp Arg Val Ile Arg Ile Leu Arg Gln Gln Gly Glu
 35 40 45

40 Leu Glu Ser His Gln Leu Ala Glu Leu Ala Cys Ile Leu Lys Pro Ser
 50 55 60

45 Met Ser Gly Val Leu Lys Arg Leu Glu Arg Asp Gly Ile Val Ala Arg
 65 70 75 80

Arg Lys Ser Pro Glu Asp Gln Arg Arg Val Phe Ile Ser Leu Thr Glu
 85 90 95

50 Ala Gly Gln Gln Ala Phe Leu Ala Met Ser Glu Glu Met Thr Arg Asn
 100 105 110

Tyr Asp Lys Ile Leu Ala Gln Phe Gly Asp Asp Lys Leu Gln Gln Leu
 115 120 125

55 Met Gln Leu Leu Gly Glu Met Lys Lys Ile Lys Pro
 130 135 140

<210> 43

60 <211> 423

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida* U

65 <220>

<221> CDS

ES 2 364 110 A1

<222> (1)..(423)

<223> hpaR2

5 <400> 43

```

    atg acc aag acg caa cct tcg ctc acg cta agc ctg ttg cag gcc cga      48
    Met Thr Lys Thr Gln Pro Ser Leu Thr Leu Ser Leu Leu Gln Ala Arg
    1          5          10          15
10   gaa gcc gcg atg gca ttt ttc agg ccg ctg ttg aac cag cac gac ctg      96
    Glu Ala Ala Met Ala Phe Phe Arg Pro Leu Leu Asn Gln His Asp Leu
          20          25          30
15   acc gag cag caa tgg cgg gta atc cgc atc ctc aag cag cac ggc gag      144
    Thr Glu Gln Gln Trp Arg Val Ile Arg Ile Leu Lys Gln His Gly Glu
          35          40          45
20   ctg gag aat tat cag ttg gcg gaa ctg gcc tgc atc ctc aag ccg agc      192
    Leu Glu Asn Tyr Gln Leu Ala Glu Leu Ala Cys Ile Leu Lys Pro Ser
          50          55          60
25   atg acc ggg gta ctg ggg cgc ctg gag cga gac ggg ctg gtg cgg cgg      240
    Met Thr Gly Val Leu Gly Arg Leu Glu Arg Asp Gly Leu Val Arg Arg
    65          70          75          80
30   cag aag gcc gcg cag gac cag cga cgg gtg ttc gtc agc ctg acc gaa      288
    Gln Lys Ala Ala Gln Asp Gln Arg Arg Val Phe Val Ser Leu Thr Glu
          85          90          95
35   aga ggg gag gcg tgc ttt gcc tcg atg aag gaa ggc atg gag gcc aac      336
    Arg Gly Glu Ala Cys Phe Ala Ser Met Lys Glu Gly Met Glu Ala Asn
          100          105          110
40   tac cag aag att cag gcg cag ttt ggt gaa gag aag ctg cag cag ctg      384
    Tyr Gln Lys Ile Gln Ala Gln Phe Gly Glu Glu Lys Leu Gln Gln Leu
          115          120          125
45   atg ggg ttg ttg aat gac ctg aag cgc atc gcg cca taa      423
    Met Gly Leu Leu Asn Asp Leu Lys Arg Ile Ala Pro
          130          135          140

```

<210> 44

<211> 140

<212> PRT

50 <213> *Pseudomonas putida* U

<400> 44

```

55   Met Thr Lys Thr Gln Pro Ser Leu Thr Leu Ser Leu Leu Gln Ala Arg
    1          5          10          15
60   Glu Ala Ala Met Ala Phe Phe Arg Pro Leu Leu Asn Gln His Asp Leu
          20          25          30
    Thr Glu Gln Gln Trp Arg Val Ile Arg Ile Leu Lys Gln His Gly Glu
          35          40          45
65   Leu Glu Asn Tyr Gln Leu Ala Glu Leu Ala Cys Ile Leu Lys Pro Ser
          50          55          60

```

ES 2 364 110 A1

	Met	Thr	Gly	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Asp	Gly	Leu	Val	Arg	Arg
	65					70					75					80
5	Gln	Lys	Ala	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Arg	Val	Phe	Val	Ser	Leu	Thr	Glu
					85					90					95	
	Arg	Gly	Glu	Ala	Cys	Phe	Ala	Ser	Met	Lys	Glu	Gly	Met	Glu	Ala	Asn
				100					105					110		
10	Tyr	Gln	Lys	Ile	Gln	Ala	Gln	Phe	Gly	Glu	Glu	Lys	Leu	Gln	Gln	Leu
			115					120					125			
	Met	Gly	Leu	Leu	Asn	Asp	Leu	Lys	Arg	Ile	Ala	Pro				
	130						135					140				

15 <210> 45
 <211> 12722
 <212> DNA
 20 <213> *Pseudomonas putida* U
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(12722)
 <223> cluster hpa
 <400> 45

	atgaccacac	cgagaccctc	cctgaccctg	accttgetgc	aggcgcgcga	agccaccatg		60
	gcgtttcttc	gcccggcgct	gaatgcccac	gacctgaccg	agcagcaatg	gcgggtaatc		120
	cgtatcctgc	gccagcaagg	cgagctggaa	agccatcagt	tggcggagct	ggcctgtatc		180
35	ctcaaaccce	gtatgagcgg	ggtgctcaag	cgcttgagc	gtgacggcat	cgtagcgcgg		240
	cgcaagtccg	cggaggacca	gcgcggggtg	ttcatcagcc	tgaccgaggc	cggccagcaa		300
	gcgtttctgg	cgatgagcga	ggagatgacc	cgcaactacg	acaagatcct	cgcccagttt		360
	ggcgatgaca	agctgcagca	gctgatgcag	ctgctgggtg	aaatgaagaa	gatcaaacc		420
	tgacgcgcc	ggcgtcagcg	ggtgagtgc	agcaggtctt	ccagcacttt	cagcagtgtc		480
40	gcccgcgcgc	gctcataggc	gtcggggcct	gcgtacatca	gctctacata	caggctgtcg		540
	atgatgcccc	ggtaggcatc	ggcatacagc	gccaggcggc	tgtgctgctc	atgcgcccag		600
	ccgtggcgag	cttgccagggc	caagctgaac	ccttcgcgta	tgccgtccag	gtactgttca		660
	aagcccgaag	tgacaatcgg	cttgatgcc	gccgggggca	ggaacgccgt	gcgcaacacg		720
45	aagcgcagtt	gggcccagtc	gcgataacgt	tggccaggt	gcagggccag	ccagtgtccc		780
	gcccgcaggg	cgtcgcgggc	ttcctgcgca	aagccgtgct	cgacaaaggc	cgtttcctgc		840
	acaagcgcac	gctggaacac	ctccacgaac	aagccgtcct	tgttgccgaa	atgcccatac		900
	agcgtatcct	tgcgcatgcc	cgccaactgg	gagatttctg	tcagcgaaga	ggcgtcataa		960
	ccgtactcgg	cgaagtggcc	gacggcggca	tcgcacacac	gcaccgcaga	aggggaaagg		1020
50	tctttcaaca	gcatcactcc	gtcaggggog	cggcgggocg	cgccgctctt	gaggggtggga		1080
	ttgtgggtgat	cgaaaatgca	cgggtcaatg	cttctgcgaa	ggcaatttcc	ggcgcctatg		1140
	gaaagtgcaa	tgttcccctc	gtaacgtgca	ttcctccacc	caatgcgcgc	tcacatactg		1200
	atcgcgtctt	cgaatccaat	aagaaagaga	ccgctcatga	aaaagccaaa	ccccctgctg		1260
55	gaagacctga	agtccgtcct	gccgaccatt	gccgccaatg	ccatgcgtgc	agagcaggac		1320
	cgcagtgtgc	cggcagagaa	tatcgccttg	ctgaaaagca	tggcatgca	ccgcgctttc		1380
	ttgcccaaac	acttcggcgg	catggaaatc	accctgccgg	agttcgccca	gtgcatcgcc		1440
	ttgctggcgg	gggectgcgc	cagcacagcc	tgggcatgca	gectgctgtg	cacccacagc		1500
	caccagatgg	caatgttttc	gcccagctca	caacaggagg	tgtggggtag	cgacccggat		1560
60	gctaccgcc	gcagcagtat	cgcgccttcc	ggcgcactg	aagaggttga	gggtggcgtg		1620
	tcgttcagcg	gcgaaatggg	ctggagttcc	ggttgcgacc	acgcgcaatg	ggcgattctc		1680
	ggtttccgcc	gcaagaatgc	cgaaggcgtc	caggattact	gcttgcocat	cctgcctcgc		1740
	agtgactatg	aaatccgtga	tgactggtat	gccgtgggca	tgccggcgag	cggcagcaag		1800
65	accctgatcg	tgcgtgatgc	cttcgtgccc	gagcaccgca	tccagaaggc	caaggacatg		1860
	atggagggca	agtcggcggg	ctttggtttg	taccccgaca	gcaagatgtt	cttcgccccg		1920

ES 2 364 110 A1

	tatcgcccg	atdddgccag	cggtctctcc	acggtcagct	tgggcggtgc	cgagcgcag	1980
	ctggagggtg	tccgcgagaa	aacccgcaac	cgctgctgtg	cctacaccgg	tgctgccgtg	2040
	ggcgccgcca	ccccggcgct	gatgcgcctg	gccgagtcga	cccatcaggt	ggccgctgcc	2100
5	cgggcattgc	tggaaaagag	ctgggacgag	attgccgagc	acagtgcccg	tcacgaatac	2160
	ccgtgcgctg	gcacgcctgg	gttctggcgt	accaaccagg	gctacgccgt	gaagatgtgc	2220
	atccaggccg	tcgaccgcct	gatggaagcg	gccggtgggt	gcgectgggt	cgagagcaac	2280
	gaactgcagc	ggctgttccg	cgattcgcac	atgaccgggt	cccatgccta	caccgattac	2340
10	gactgtgtg	cgcaaatcct	cgggccgcag	ctgatgggcc	tggagcctga	cccggcgatg	2400
	gtctgagccg	ccacttgttt	tcacccatcc	cctacaagca	caacaacaaa	cagggcaggc	2460
	tgccaggcct	gcccgggagt	cttgcatgtc	caaagaaacc	ttcgattcac	gtgccttccg	2520
	ccgcgccctg	ggcaacttcg	ccaccggcgt	gaccgtgggt	actgcccggc	gccccagtgg	2580
	ccgcaaggte	ggcgttaccg	ccaacagctt	caactcgggt	tcgctggacc	cggcgtgat	2640
15	cctgtggagc	atcgacaagc	gctccaccag	ccatgaagtg	ttcgaagagg	cctcgcactt	2700
	tgccgtgaac	attctggctg	cggaaccagat	cgacctgtcc	aacaactttg	cccgcccgaa	2760
	ggaagatcgc	tttgccggta	tcgactacga	gaccggcact	ggcggcgcgc	cgttgttcgc	2820
	cgattgcgcg	gcgcgctttg	agtgtgaaaa	gtaccagcag	ctggacgggt	gcgatcactg	2880
20	gatcctgggt	ggcaaggtag	tggcctttga	tgactttggc	cgctcgcggc	tgctgtatca	2940
	ccagggcgcc	tattcaatgg	tgctgcgcga	taccgcgatg	acccaaggcg	cagaggggca	3000
	ggcaccgagc	agccacttcc	agggccgcct	gcagcacaac	ctgtactacc	tgatgacca	3060
	ggcgtgcgt	gcctaccagg	ctgactacca	gccacgccag	ctgtgtaccg	gcctgcgcac	3120
	cagcgaggca	cgcatgctga	tggtgctgga	gaacgatgcg	ggcctgagcc	tgaacgacct	3180
25	gcaacgcgaa	gtggcgatgc	cggcgcggga	gatcgaggaa	gcggttgcca	acctcaagcg	3240
	caaagggctg	attgccgatg	acgaagggcg	agtgcggcta	tcgggtgaagg	gcgtggacga	3300
	gaccgaggcg	ttgtggacca	ttgcccggca	acagcaggac	aagggtgttcg	ggcagttcag	3360
	tgaacagcag	ctggagactt	tcaagaccgt	gctcaaggcc	cttatcaaca	tctgaacacg	3420
30	ctttgggatg	gcaccggctg	ttttgggatg	caccggctgt	gccggtgttc	gcggatgaac	3480
	ccgctcccac	aggtccagcg	ccagtagcaa	cttcggcgcg	gtacctgtgg	gagcggcttt	3540
	agcccgaaac	accggcaaag	ccggtgccat	ccaaccagaa	gcctcagtag	gcaccacccc	3600
	cggcactggg	gactaccact	gtatccttga	acttcccgcg	cagctcgcgc	agcccgcgca	3660
	tcagcaccgt	ggtatccaca	cccaccgcca	caaacgcgcg	accagctcgc	atgtagcgtc	3720
35	gcgccagttt	ctcgtcccg	ctgagaatgc	cggcggcttt	gcccgccttg	ccaatgcgca	3780
	cgattgcgct	ttcaatcgcc	gcctgcacct	ccgggtgccc	gggggtgccc	cgatgcccc	3840
	tgcccgcact	caggtctgca	ggcccgatga	acacgccatc	cacaccttcc	actgcaacga	3900
	tctcgtccag	gttgccagg	ccttccttgt	tctcgatctg	caccagcagg	cacatttgct	3960
40	catcggcgtg	gtccaggtaa	ccggggaggg	tgttccagcg	cgaagcccgc	gccagcgcgc	4020
	tgcccacccc	gcgaatgccc	ttggggcggg	aatgcatggc	cttgaccagt	tgccgcgcct	4080
	gttcggcagt	ttccaccatc	ggcaccagca	aggtttgtgc	gccgatatcc	agcacctgct	4140
	tgatcagcgc	ggtatcgccg	atcaccgggc	ggatcactgc	ctggctgggg	tagggtgcca	4200
	ccgctgcaa	ctgggcgagc	atgccgcgca	ggtcgttggg	cgctgtttcg	ccgtcgatca	4260
45	gcagccagtc	gaaaccggca	ttggccgcca	gctcggcgca	gtaggcatcg	gccaggccga	4320
	gccacaggcc	gatttgcggt	tcaccgctgt	gcaggcgtcg	cttgaagtgg	ttgatgggca	4380
	tgtccatgag	caggtcctta	aacgaagcgg	caggcgatgg	agccgagcat	gtcgtagctg	4440
	acgtggaagg	tgtcacctgg	gcgagcggcg	accgggcggg	tgaacgaacc	cccaaggatg	4500
50	atctggccgg	gctgcaaggt	gacgtcgtac	ggcgccagtt	tggtggccag	ccaggcaacg	4560
	cctttggccg	ggtggttgag	cacggcagcg	ctgaccccgg	attcctcgat	cacgccattg	4620
	cggtagagca	ccgcccggc	tttgccgagg	tcgatttcgg	tggggcgcac	ggcccgcggc	4680
	cccatcacca	cgccggcatt	ggcggcgttg	tcggagatgg	tgtcgaacac	cttgccgggtg	4740
	gcctgggttt	gcgggtccac	ctgctggatg	cgcgctcaa	tgatttccag	cgccgggatc	4800
55	accactcgg	tggcgtccag	cacatcaaac	acggtgatgt	tcgggcctt	cagcggcttg	4860
	ccgaggatga	acgccaactc	cacttcaacc	cgccggcacga	tgaagcgtc	gaaggggatg	4920
	tcgctgcctt	cgctgaacag	catgtcgtcg	agcaaggcgc	cgtagtcggg	ctcgggtgatg	4980
	ttcgacgata	cctgcatggc	gcgcgaggtc	aggccgatct	tgtggccac	cagcttgccg	5040
60	ccggcggcga	tcttttttgc	caccagggcg	cgctggatgg	cgtaggcgtc	ttcgatgggtg	5100
	attgccgggt	gctccagcga	gaactggcgc	acttgctcgc	gggagcgttc	ggcctggctg	5160
	aggcggctcg	cgccgtgctg	gatgaaagcg	ttgtctagca	tggggcgggt	ctcttgattc	5220
	aagggttgac	gatggcagcc	tgggtgcgca	acaccagcag	gcccccagg	gcgatgaaga	5280
	cgccgagtac	gtacagagca	aggctggcgc	tgtgggtggg	gtcgcgcacc	cagccgatga	5340
65	agtagggcgt	gaagaacgag	gcgatgctgc	ccagcgagct	gatcagggca	atgccggcgg	5400
	cctgggtacg	ggcgttgagg	aacgcccggc	gcagttgcca	gaacatcggc	agcgcagcgc	5460

ES 2 364 110 A1

	tggcgcccat	gccggccagc	accaggccgg	ccattaccgg	cagcgcctgc	tggggggcaa	5520
	tggccgcaat	agcgatgccg	atggcagcca	tcagcagcgg	tacgcacagg	tgccagcggc	5580
	gttcgcgttg	gcggtcgctg	gagcggccgc	acgccagcat	gaacacgcag	ccggccacgt	5640
5	acggcacagc	gctgagcagg	ccgacactgg	cgtcgctggc	cacaccggca	ctgtgaatca	5700
	ggctgggcat	ccagaacgca	agggtattca	ccgccagcat	caccgcgcaa	tacacggcca	5760
	ccaacagcca	cagcgcacgg	cttgcgaaaa	tggcgccgaa	cgaggttacg	ggcttgcgct	5820
	gttcttcctc	accgaattgc	gcgcgcagcg	tggctttctg	ctgctcatcc	agccagctca	5880
10	cccgctcgaa	gtgctccggc	aaaacggcca	gtaccaccag	gcccagcaac	accaccggcg	5940
	ccccttcgag	caggaacatc	cactgccagc	cacgcagccc	gcccgtgtcg	tgcataaagg	6000
	ccagtatggc	cccggacact	ggcccgccga	ccactccggc	caacggcacg	gcaatggcga	6060
	acagcgcggt	gacctggggc	cggcgcccgg	ccgggtacca	gcggttgagg	taaaccagaa	6120
	tgcccgggaa	gaaccgggcc	tcgcccgcgc	ccagggcaaa	gcgcaacagg	tagaacgcgc	6180
15	tgctgctttc	gatcagcagc	atgctggtcg	acaacagccc	ccacaccacc	atcaggcagg	6240
	cgatccagcg	gcgtgggcca	acgcggtcga	gcatacaggtt	gctggggacg	ccgaacagcg	6300
	cataggcaat	gaagaacagc	ccggcaccca	ggccatagac	cgtgtcggac	aaatgcaggt	6360
	cctggctcat	ctgcatcttg	gcgaagccaa	tgttgatgcy	gtccaggtgg	gcgaacaggt	6420
20	agcacaccag	cagcagcggc	atcagccgcc	agggtgactgc	ccgatgggta	ctgtcggccc	6480
	gttcaacgtg	tgcctcgcgc	ggcgaggctt	gttcgagtgt	gctcatgttt	ttgtacttat	6540
	tctgtaatga	gtcggggagg	gcgtggtttg	agccggcgcg	ctagcggttg	aacagtgggt	6600
	gcaaggtgct	gtgcttgggc	tcgtagacct	gggcggtgct	gtggtcgatc	tgcacggtga	6660
	tgecgatcgg	gcgctgttgc	agcagtgggt	ccaggcgcgc	tttcaacact	gccagcaagc	6720
25	tgtcgcceac	tgttttgtgc	acctcggcgc	tacggccggt	agccatgcgc	aggttggcgt	6780
	acagaaagcc	gtattgcctt	ttgccgtcgg	ccaccgcgca	atgggcggcg	gggtaggcca	6840
	gcacgcgtgt	accgccagtg	gggaacacgg	ctttgccttc	ggcatcgcgc	tgttcgagca	6900
	tgggtgoggc	cagggcgcg	cacaggccgg	ggatgtcggc	gtcggtttcc	aggtcggggg	6960
30	tatagagcag	aaccaggtgt	ggcatggggg	cctcctcggg	gaggggcggc	tggccaccgg	7020
	ccagggcgac	cagccgcgaa	cgggtgggtt	acaggcggct	ggtgggcacc	acggcggccc	7080
	ggttggcggc	ctgggcagcg	gggatggcac	caccgtcctg	cggggtgacc	gggaagatcg	7140
	cgttgatctg	gcgggtgccc	gaagagccga	agtagggcgt	gaccacttcg	gccttgccgt	7200
	gcgtaactcga	ccagcccagc	gcacccagca	gcattgccgt	gtcgtgcatg	aagccttcac	7260
35	cgtggccttt	ggcgcgctac	tccggcagca	tcccgcagaa	cgcttcccac	tcgccgtcct	7320
	gccacatttg	caccacacgg	tggtcgaggg	tttcgagga	cgggctccac	accttgggtg	7380
	caaagtccgg	cgccctggcc	ttctgcgcga	agcggtcgca	cagcagcccg	ctggccagga	7440
	acgccacggt	gcgctcgtag	tggctcttcta	ctgccttgcg	catggcccag	cccagggggg	7500
40	caactgtcggc	caggtagtgc	gaggtgcaca	gggcccagac	cgagaccact	ttgaagtgct	7560
	ggtcctgggt	catgtagcgc	atgggcacca	gggtgcccga	ttccggggcg	agggtgggtg	7620
	cgtggtgggc	catggtttcg	acgttgaagc	gggtgcactc	ctcggccagc	agcttgccca	7680
	gctcgggatt	gccggggaat	gcgtagggca	tgttgctgat	gaagtgcggc	agttcgttgc	7740
	tgggtgtacac	gccctcgaaa	tgcggcccgc	acagcaacgt	gtagttggcg	ttgaccagcc	7800
45	agtgcgtgtc	gaacacgcag	atgggtgtcca	cgcccagctc	acggcaacgg	cggctgattt	7860
	cgtgatgccc	gtcgatggcc	gcctggcgaa	agccttggcg	cgggcctggc	agttcggaca	7920
	tgtacatgga	cggtacatgg	gtaatcttgg	cagtgagagc	gagtttgccc	atgggggtct	7980
	ccgataagac	gctgttgttg	ttttggggct	gaccgcggtc	cttgtaggag	cggccttggt	8040
50	ccgggatggg	gcgcacagcg	gccccggcga	tatctgcggc	gaggctgaaa	tccagggggc	8100
	gctgcgcgcc	ccatcgccgg	cacaaggccg	ctcctacacc	cgggcgggtg	aaaccgcaca	8160
	gagggttaga	tgccccagcg	aggaatgtgg	tgattaccca	tggaaataca	cacgttcttg	8220
	atctctgcaa	agacctcgaa	gctgtactgc	ccgcctcac	gcccggtaac	ggaacctttc	8280
	acgccgccga	acggctggcg	caggtcgcgt	acgttctggc	tgttgatgaa	caccatgccg	8340
55	gcctcgatgc	cacgggccag	gcgatgggct	ttgccgatgt	cctgggtcca	gatgtaacag	8400
	gccagggcat	actcgggtgc	ggtggccagt	tgcagcgcct	cggcttcgct	cttgaacggg	8460
	atcaggcaca	ccaccgggcc	aaagatttct	tcctgggcaa	tgcgcactct	ggtgttcacg	8520
	tggcgaata	cgggtgggctg	gatgaactgc	cccttgccca	ggtgcgcagg	caggttggcc	8580
60	gggcgctcca	ggccccggc	gaccaggcgt	gcaccttctt	cgatgccaat	cggtatgtac	8640
	ccggtgacct	tgtcatagtg	ctgctgggtg	atcatcgaac	cgacctgggt	tttcgggtcg	8700
	gtcgggtcac	ctacgatcag	gcgcttggcg	cgccgcgcaa	actctgcgac	aaactgcggg	8760
	tacacgcttt	cctggatgaa	gatgcggctg	ccggcgggtg	agcgcctccc	gttcagcgag	8820
	aagatggtga	acagcgcggc	gtccagcgca	cgctcaaggt	ctgcgtcttc	gaagatcagc	8880
65	acgggcgact	tgccgccag	ttccatcgag	tactttttaa	ggcctgcggg	ctgcatgatc	8940
	ttcttgccgg	tggcgggtacc	gccgggtgaag	gaaatggcgc	gcacatcggg	gtggcggacc	9000

ES 2 364 110 A1

5 agggcatcgc cggcggtagc gccgtaacc tggatcacgt tcagcaccce gttgggggatg 9060
 ccggttcta ccgccaggcg gccagttcg ttggcgggca gaggcgacag ctogctcadc 9120
 tcagcacggy cgggtgtgce cagcgccagg cacggcgag tcttccagggt agcgcgcatg 9180
 aacggcacgt tccatgggct taccaggccg cacacacca ccggctggta cagggtgtag 9240
 ttgagcatct ggtcgtcgac cgggtaggta tggccgtcca tgcgcgtgca cacttcggcg 9300
 aagaagtcga agttgtgca ggcacgcyg atcagcacgt tcttggctg gtggatcggc 9360
 aggccgggtg cgagggtttc cagctcggcg agtttcggca cgttctgctc aatcagctca 9420
 10 cccagcttgc gcatcagccg ggcacgttcc ttggccgggg tgttgccca cttggggaag 9480
 gcttccttgg ccgcagccac agcctgggce acttctcgg cgccgcccgt ggcgacttcg 9540
 cagatggcgt cgccggtggc cgggtttag ttgacgaagg tgtctttgct ctcgacctca 9600
 cggccgttga tccagtgtt gatcatgctg ctcatgcctt gttgttcttg aagaagtcag 9660
 cttcgctgac gatacgggtg accaggcgac cgacgccttc cacttccacc accacttcgt 9720
 15 cacccgccac cacatcggcc aggccttctg gcgtgccggg ggcgatcatg tcgcccgggt 9780
 gcagggatcat gaagctggag aagtattcga tgagggtcgg gatgtcgaag atcatgtcog 9840
 cgggtgtgce ttctgcttc agctcacctg tgatccagggt gcgcagcttc aggttgctga 9900
 cgtctggcac atcggccgca tcgacgatcc acgggcccgc cggggtgggt gcatcgcgggt 9960
 20 ttttcacccg caggttgggg cggtagtagt ttccaggta gtcgaggatg gcgtagctgt 10020
 tgcaacgggt gtgaccggca acgtaggcca gggcgtctc acgcttgacg ttcttcgccc 10080
 ctttgccgat caccgccacc agctcgact cgtagtcat gtattcgacg ttgtccgggc 10140
 gccaggtgac ctggatgtgg ccggttagg tgccctggca cttgatgaaa gccaacgggt 10200
 cgggtggcgg cgcgaaggcc agctccctgg cgtggtcggc gtagttcagg ccaggggcga 10260
 25 acatgctgcc ggtggcgggt ggcagccagg tgacctggtc ctgatggacc agcggccgt 10320
 cggcaaggcg caggtgatcg tcttcgaccg tgacatcgtg ggcctggccc tcgaactgga 10380
 tacgggcgtg tttcacagggt aattcctcac tcggcgacga tgtggttgggt cagcttgccc 10440
 aggcgctga tctcgatgtc gacgcggtca cctggctgta catcgacgcy gccctcgggg 10500
 gttccgggtg tcaggatgtc gccggcgtgc aggtcatga actcgtgat ttcgcaatc 10560
 30 agctgcgcca ccgtgcgtac gcagttggcg gtgttgttgt gctggcgag ttccgcttc 10620
 acatacaggc gcaggcccag ggcacgggg ttggccactt ggcctggcggg caccagttca 10680
 gggccgaccg ggcaaaaacc atcacggcac ttggccttga ctgcaggcg gtatgactg 10740
 gcttcgggca ggctcacttc gttgacgatg gtgtagccc ccacatgctc cagggcacg 10800
 35 gccacgctga cgcggctggc gtccttgcca atcaccactc ccagcgcgg gccgggttgc 10860
 acgcgctgca cgcggccgg gaataccacc tggcctcat gctggttgcg ggtgttcggg 10920
 gtcttgacga acaacaccgg cttgaccggc agttgcttgt acggtgcttc cacgaacgcc 10980
 gcttgggtgt gctgcagcaa accctggtag ttcagcgcga cgcgcaacag ggtgccgctg 11040
 40 gcaacgtcaa gcaggcatg gctcatgctc ttctcctggc agtgacgggc ggtggccgtc 11100
 ctgcccgattt cgttaatgtg ttaatgttat agttaatatg ttaacgatgg tcaaggggtg 11160
 gccagtgccg cctgccggca aggcaaggca ccatgggcca tcgtcaacag ggtcaagcga 11220
 tttgcgagca agcagccatg agcagccggc atccgatacc gaacatcaac attggccagg 11280
 tttacgacca gcgcacacag gacagcgag tgcatcaga ccggtcggc aacctggcgg 11340
 45 gctttttcgg gcgcaacatg ccggtgcacc ggcattgacc gtttttccag gtgcattacg 11400
 tgaagtcggg cacagtacg gtgtatctgg atgacagca gtacatcgag gccggccgag 11460
 tgttcttctt cacgccacc acgggtggcg acgcgtcgt caccgaagct gacagcagc 11520
 ggcattgtgt gacggtgcgc cagcaactgg tgtggcaatt gatcgaagcc gacgccagcc 11580
 50 tgctgccggc gggcatgcag gtgcagccag cctgtgtggc gctgggcaac ctgccggccg 11640
 aatacaaggc cgaggcgcag cgcctgcaag gctggctgga cgcgttgagt gacgagttt 11700
 ccacgcagca accgggtcgc gaggcggcgt tgcagtcgt gaccgcctg atcatgatca 11760
 gcctgctgcy gctgtgccc aactcgtggt aatcgacccc ggcgcggcat gaagacctga 11820
 agatcttcca ccgtttcaat gccctgatcg aagcgcatta ccttgagcat tggccgctgg 11880
 55 cccgctacgc gcagcagatt ggcgtgacc aggcacggct gaacgatgtg tgccggcgca 11940
 tcgcccactt gccatccaag cgcctggtgc tggaaacggct gatgcaggag gccaaagcgtt 12000
 tgctgttgtt ttccggcagc acggccaacg aaatctgtta ccagctcggc ttcaaggatc 12060
 cggcctattt cagccgcttc ttcaaccgct acgccaagct cacaccggg gactaccgcc 12120
 agcggcagge agaattgcag tgaatggcc atggcggctc acccgggtgc tgttgttgtt 12180
 60 tacagcggat ggtcgcagcc cgcgcgcgg gcttgaatgg gttttccgtg gaacagattg 12240
 cactttccat cgtgcatgcc cttaaattcg tgaattgaga aaaagccaca ggttgacca 12300
 tgaccaagac gcaaccttcg ctcaagctaa gcctgttgca ggcccagaaa gccgcgatgg 12360
 catttttcag gccgctgttg aaccagcacg acctgaccga gcagcaatgg cgggtaatcc 12420
 65 gcatcctcaa gcagcacggc gagctggaga attatcagtt ggcggaactg gcctgcatcc 12480
 tcaagccgag catgaccggg gtactggggc gcctggagcy agacgggctg gtgcggcggc 12540

ES 2 364 110 A1

5 agaaggccgc gcaggaccag cgacgggtgt tcgtcagcct gaccgaaaga ggggagcgt 12600
gctttgcctc gatgaaggaa ggcattggag ccaactacca gaagattcag gcgcagtttg 12660
gtgaagagaa gctgcagcag ctgatggggt tgttgaatga cctgaagcgc atcgcgccat 12720
aa 12722

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200803451

②² Fecha de presentación de la solicitud: 04.12.2008

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 132674 A2 (BOVRIL LIMITED) 13.02.1985, resumen.	1-57
A	ES 483819 A1 (UNDERBERG, E.) 01.09.1980, reivindicaciones.	1-57
A	LEUSCHNER, R.G. et al. "Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms". INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY. 06.01.1998. Vol. 39, N°s 1-2, páginas 1-10. Tabla 1.	1-57

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
29.07.2011

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23L1/015 (2006.01)

A23C19/097 (2006.01)

A23B4/22 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23L, A23C, A23B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, PAJ, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-57	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-57	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en un procedimiento para eliminar o reducir la tiramina que se produce en la elaboración de alimentos por medio de procesos microbiológicos, como pueden ser la elaboración de productos lácteos, vino y col agria. En el procedimiento se utilizan las enzimas de una unidad catabólica de la bacteria *Pseudomonas putida* U CECT 4848.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 132674 A2 (BOVRIL LIMITED)	13.02.1985
D02	ES 483819 A1 (UNDERBERG, E.)	01.09.1980
D03	LEUSCHNER, R.G. et al. "Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms". INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY. 06.01.1998. Vol. 39, N°s 1-2, páginas 1-10. Tabla 1.	

El documento D01, describe un procedimiento enzimático para eliminar aminas de alimentos entre los que se encuentran queso, embutidos y vino. Las enzimas utilizadas son mono y di- amina oxidasas obtenidas de *Aspergillus niger*.

El documento D02, describe un procedimiento para obtener alimentos bajos en aminas biógenas añadiendo bacterias como *Pseudomonas* o *Lactobacillus* que desaminan la histidina. El procedimiento se utiliza en la fabricación de queso, bebidas y col fermentada.

El documento D03, presenta un estudio con distintos microorganismos que fermentan comida con la intención de identificar aquellos capaces de degradar histamina y tiramina. Entre los microorganismos estudiados no se encuentra *Pseudomonas putida*.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Las enzimas y la unidad metabólica de *Pseudomonas putida* U, que se utilizan en el procedimiento de la invención, no se han descrito previamente en el estado de la técnica.

Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no se consideran de particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia, no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal y como se menciona en las reivindicaciones 1-57. Por lo tanto, el objeto de la presente solicitud cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.