



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

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 cadaverina 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).

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 B_6 . 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.

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).

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.

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.

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.

(Tabla pasa a página siguiente)

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.

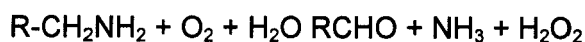
En las reacciones catalizadas por las Q-AmDH, la transferencia de $2e^-$ desde el cofactor TTQ reducido hasta el aceptor externo de e^- se produce mediante dos reducciones consecutivas. El aceptor de e^- es la azurina en el caso de las AADH y la amicianina en el caso de las MADH. Ambos aceptores fisiológicos 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., ENGESESSER, 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.
- 5 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.
- 10 92. GROSS, A.J., SIZER, I.W. (1959) The oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. *J Biol Chem.* 234 :1611-1614.
- 15 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.
- 20 94. DÍAZ, E., FERRÁNDEZ, A., PRIETO, M.A., AND GARCÍA, J.L. (2001) Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. 65: 523-569.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 100. 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.
- 55 101. 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.
- 60 102. 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.
- 65 103. 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

- 65 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);

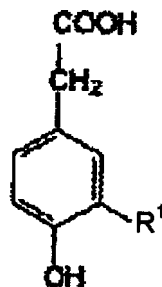
55 d) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 14 y/o una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada 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

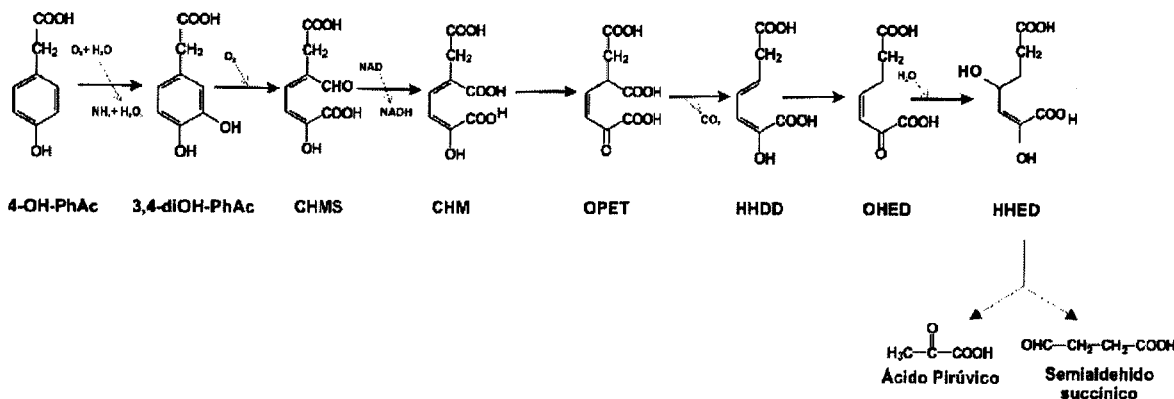
Para que la secuencia de reacciones catalizadas por las enzimas del cluster *tyn* se lleve a cabo en su totalidad, se prefiere particularmente que la molécula de ácido nucleico aislada comprenda secuencias codificantes de todos los polipéptidos que parecen estar codificados en el cluster: Así, en una 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),

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),

15 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

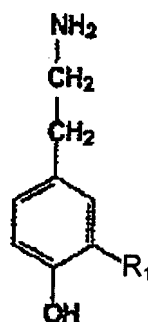
Una posible realización de este aspecto de la invención contempla el caso en el que el vector de expresión está insertado en el genoma del hospedador. En otra realización alternativa, dicho vector de expresión permanece como forma replicativa autónoma.

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

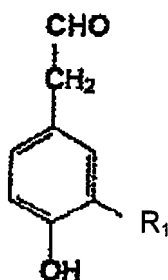
donde R_1 es H (tiramina) u OH (dopamina)

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

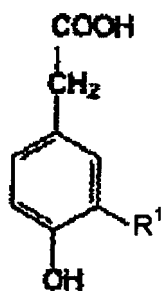
Una realización preferida se refiere al caso en el que la tiramina oxidasa está formada por dos subunidades, una de las cuales comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 (subunidad TynA de la tiramina oxidasa TynAB de *Pseudomonas putida* U) y la segunda de las cuales comprende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



Fórmula III

55

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 ($R_1 = OH$), 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-hidroxifenilacetaldehído 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 45 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 R_1 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 sintetizen 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-hidroxifenipirúvico; 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.

5 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.

10 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).

15 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.

20 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.

30 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.

35 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*.

40 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.

50 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.

55 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.

60 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.

65

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

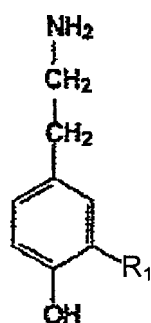
55

60

65

REIVINDICACIONES

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



Fórmula I

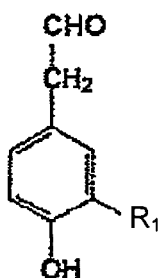
20 donde R₁ es H (tiramina),

25 contenido en una muestra,

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

que comprende las siguientes etapas:

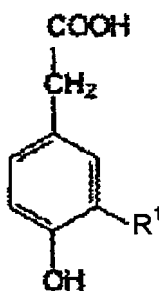
30 a) transformar el compuesto de Fórmula I en un compuesto de Fórmula II,



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 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: 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,

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

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

65 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:

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;
- 45 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;
- 50 g) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como descarboxilasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 55 i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: 29;
- 60 ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que híbrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
- 65 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;
- 65 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 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, 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

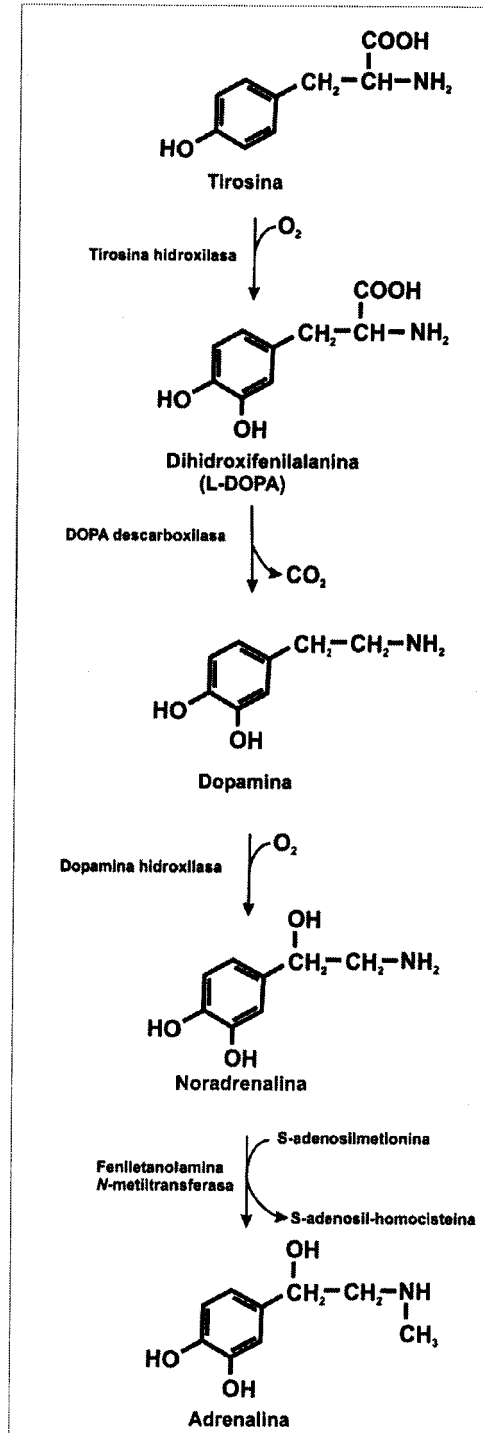


Figura 1

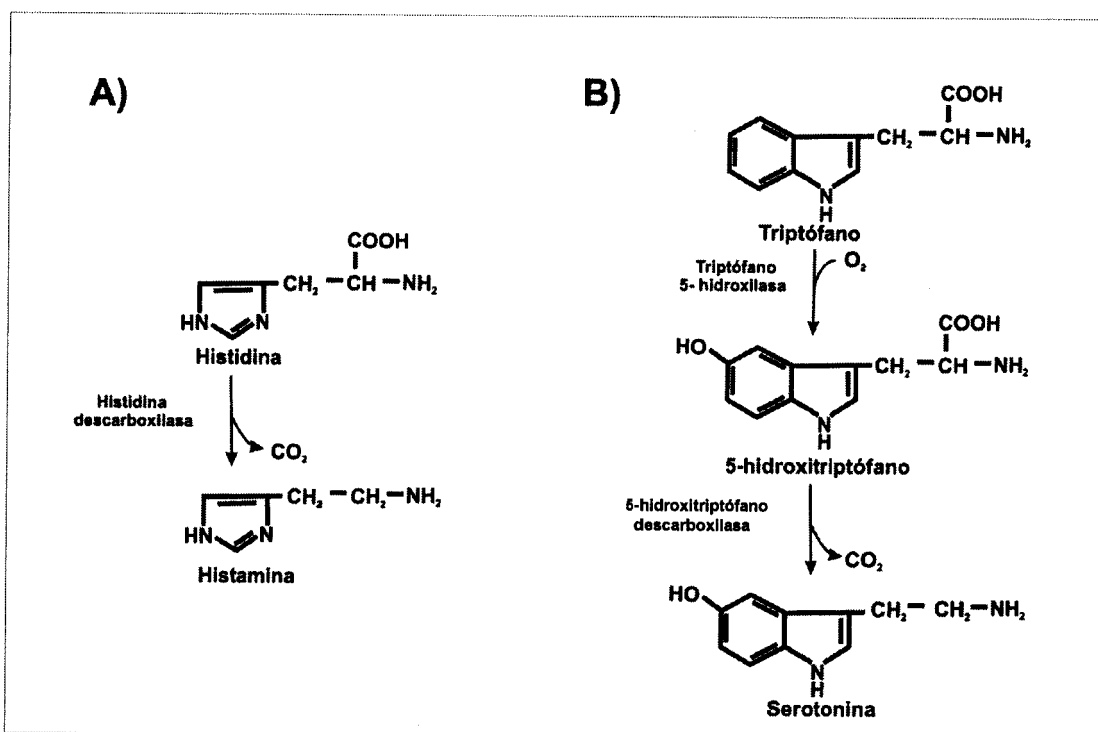


Figura 2

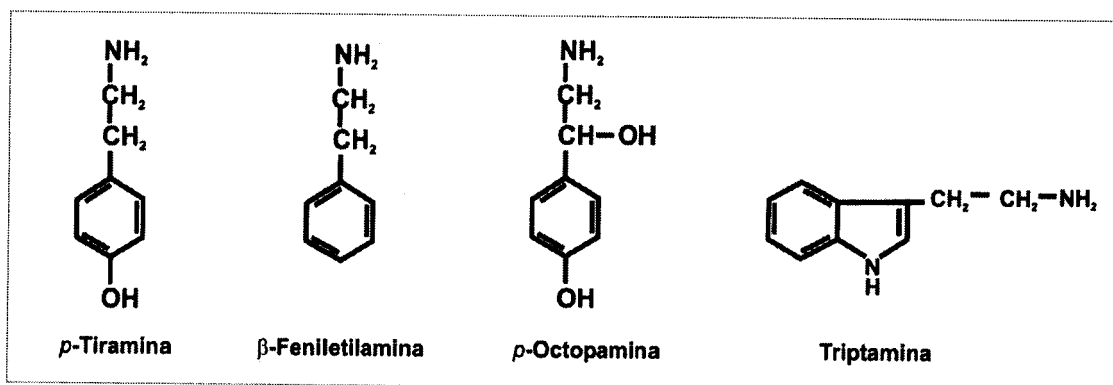


Figura 3

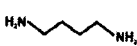

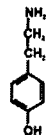
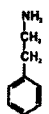
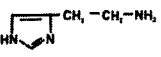
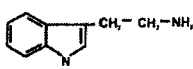
| Amina biogénica | | Precursor |
|------------------------------|---|--------------|
| Aminas alifáticas | | |
| Putrescina |  | Ornitina |
| Cadaverina |  | Lisina |
| Aminas aromáticas | | |
| Tiramina |  | Tirosina |
| Feniletilamina |  | Fenilalanina |
| Aminas heterocíclicas | | |
| Histamina |  | Histidina |
| Triptamina |  | Triptófano |

Figura 4

97

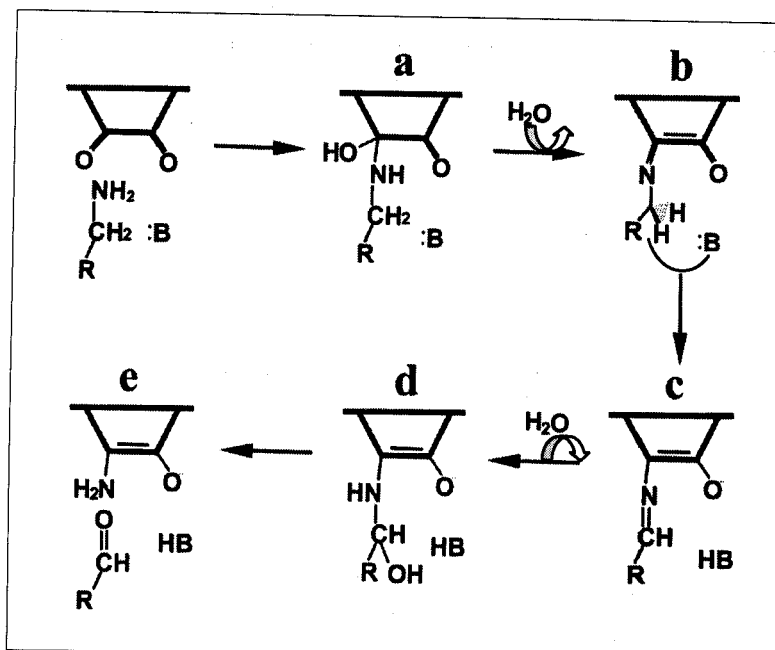


Figura 5

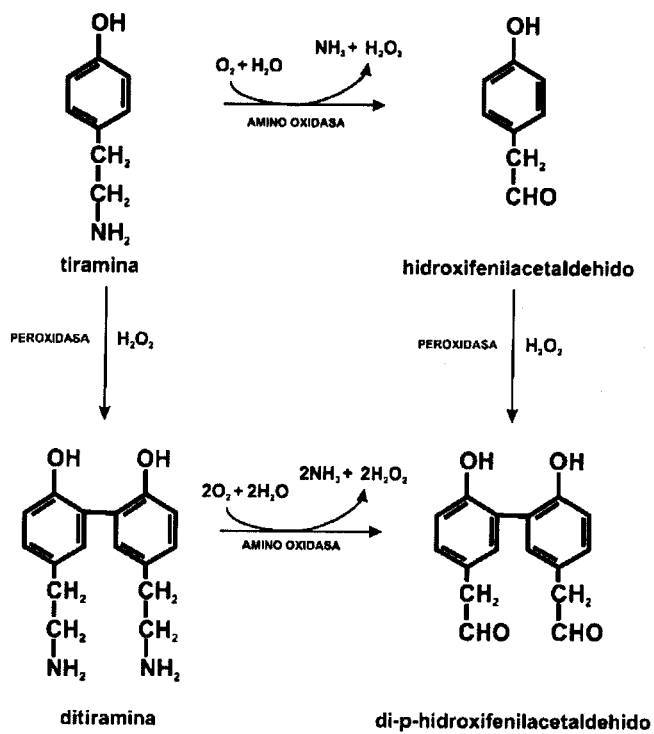


Figura 6

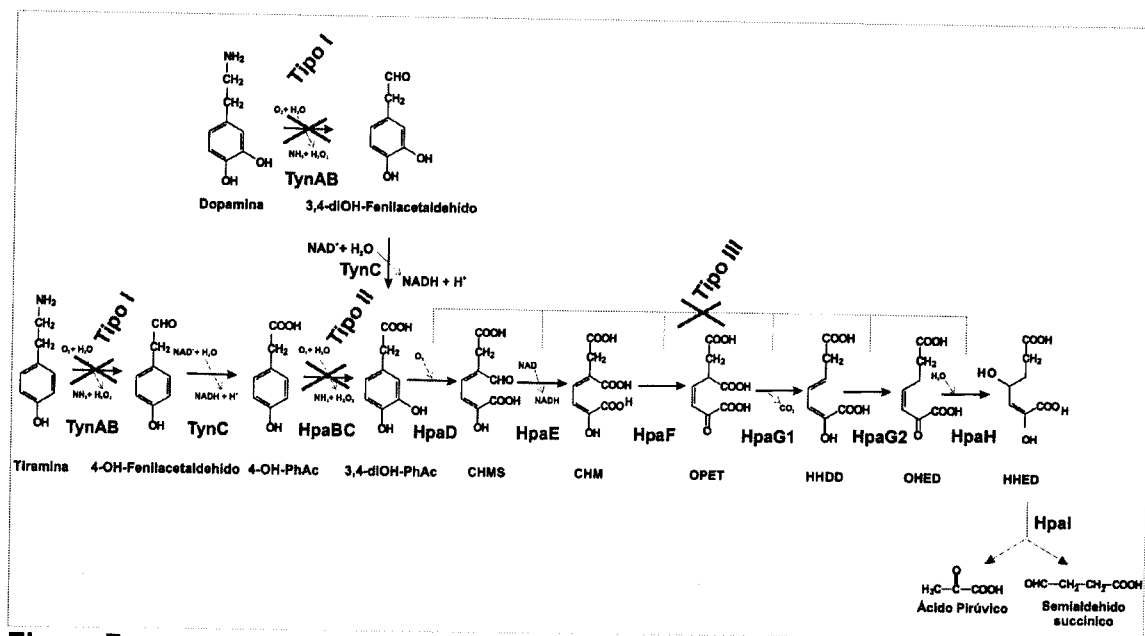


Figura 7

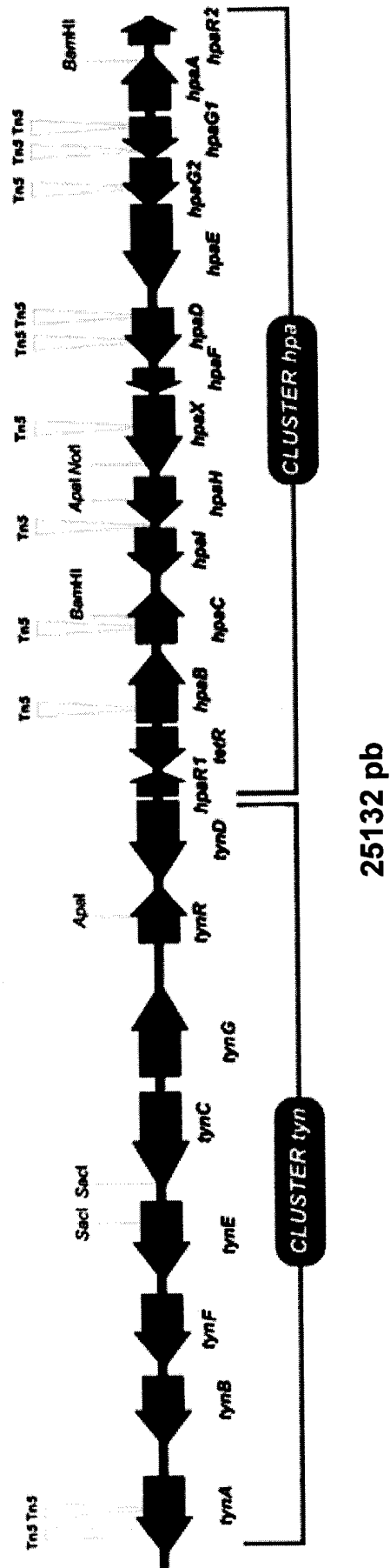


Figura 8

Figura 9

1 TCAGGCGAAACGCTCGAAGCGGTACGGTGACGGGTGCGATCAGCGGGTGGCCTGGGCCACCAGGTCTGCCGCCAG
 AGTCCCGTTTGCAGCTTCGCCATGCCACTGCCAGCTAGTCGCCCCACCGGACCCGGTGGTCCAGACGGCGGTC
 -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 CACCGGGCCGATACCGGGTTGGAGTCGGGGGTGACGTCAATCGTGCCGGCCAGGCGTGGCGATACGGGCCTG
 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 TTCGAACACCGGCCAGGCGGCTTTTCAGGTTGCCATGGCCTCGTCGTTGAGGGCCGGGTTGGCGTGGGGTCTTG
 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 CTTGCCAAAGCTGATGCGCAAAAAGTCCCGCTGGGCACGAGCTGGGGCAGGTAACGCTTGCCAGCAGCAGGTC
 GAACGGTTTCGACTACGGTTTTTCAGGGCGACCCGTGCGTGCACCCCGTCCATTGCGAAGGGTTCGTCGCCAC
 -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
 TTTTAGACCACGCGGGTCCCGCTACAGCCAACCGGCGAGGTACCCGAGACACGGTTCGTCGCTTGTCCAGTCCG
 -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 CAAGGTCGGCAGGTTGATGCCAGGTTGCCGAGGAACTTGCAGCAGCACAGGCCACCGGCCAGCAACACCTGGTC
 GTTCCAGCCGTCACACTACGGTCCACGGCTCCTTGAACGCGTGGTGTCCGGTGGCCGGTTCGTTGTGGACCAG
 -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 GCAGCGGATTTACCTTGCTCGGTGACCACCCCGCTGACACGCGCGGCTGCGGTGACCAGCGTGCACCCGCGCA
 CGTCGCCCTAAAGTGAACGAGCCACTGGTGGGGCGACTGTGCCGGCCGACCCACTGGTGCACGCGTGGCGCGT
 -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 GTTCTCCACTACCACTGCACCTTTGGCGATCGCCGCCCCGGGCGATGGCGCTGGCGGCCAGGGTCGGTTCGGCGCG
 CAAGAGGTGATGGTACGTTGAAACCGTACGGCGGGGCCGCTACCCGCGACCCGGTCCAGCCAAGCCGCGC
 -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
 CGAGTCGTCGCGCTTAGGTCCGGTCCGCGGAGCTGCGAAAAGTCGGTCGGAAGTACGTACGGGTAGACGCACAG
 -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 GTTACGGCCGATGAACATGATGCCGGCTTGCCGATAGCAACGTCGCTGCCAACCCTGCGGGCATCTCGGCCCA
 CAATGCCCGCTACTTGTACTACGGCCGAACGGCTATCGGTTGCAGCGACGGTTGGGCACGCCCTAGAGCCGGT
 -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 CAGCCGATCAGCCGCCAGTGCCAGGGGAATGTCATGGGCGTGGCGGTTGGTCTTGCACCCAGCCAGGTTGCG
 GTCGGCTAGTCGGCGGTACGGTCCCTTACAGTACCCGACCCGCCAACCAGAACCGGTGGGTCCGGTCCAAACG
 -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 GGCGGTGGGCGGATAATGCCGCCACCGATGATCACCAGGTAGTGGCGTGGGGTGGCGGGTGTGTTTGCAC
 CCGCCACTCCGGCTATTACGGCGGTGGCTACTAGTGGTGCATCACCAGCCACCACCCACGACCAACCGT
 -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
 TCCCCGCTAGCACCCCTCTGTACCGAAATGAGAAACAACAGCAGCTCCCCCTCACAAGTCGGCGGTGCGTCTCGG
 -2 P A I T P S █
 ← *tynA*

1351 TCACTGGCCAAGGCGGATCAGGGTCACTTGGCCTTGCCCCGCACCGCGGTAGGCGGTGACCTCCAGCTCGACCTT
 AGTGACCGGTTCGCGCTAGTCCCAGTGAACCGGAACGGGGCGTGGCGCCATCCGCCACTGGAGGTGAGCTGGAA

1426 GTAAACGGTGGAGCCCAGCGGGGGCAGGTGACCGTGGTGGCCGGTTCGATGCCCGGAACCTTCTCGCCGATCAC
 CATTTGCCACCTCGGGTCGCCGCCCTCCACTGGCACCACCGGCCAGCTACGGCGCCTTGAAGAGCGGCTAGTG

1501 GTCCATGACCCGTGGTACATCGGCAGGGTCTGGATGAACACGCGGAGTTGATGACATCGGCCAGGCTGGCATC
 CAGGTACTGGGCACCATGTAGCCGTCCAGGACCTACTTGTGCGCGTCAACTACTGTAGCCGGTCCGACCGTAG

1576 GACTGCGGCCAGCGCGGTTTCGATGTTGGCGAACACCTGGTGGTCTGTTTCGATGACGTCTCTGGAATGACCTG
 CTGACCGCGGTGCGGCCAAAGCTACAACCGCTTGTGGACCACCCAGACAAGCTACTGCAGGAGACCTTACTGGAC

1651 GGCTGCGGGTTCGCTCCGGCGGTGTTGGAGACGTGAATCCAGTTGTCCACCGCCACCAGGCGGGAGTAGCTGGC
 CCAGACGCCAACGCGAGCCGCCACAACCTCTGCACCTTAGGTC AACAGGTGGCGGTGGTCCGCCCTCATCGACCG

1726 CATGGCTTCGAACCTGGAGCCGGTTTTTCAGTTTGTATGATCTGTGTCATGGGCTTTGCCTTGTATCCGGTTGGGG
 GTACCGAAGCTTGAACCTCGGCCAAAAGTCAAACCTACTAGACACAGTACCCGAAACGGAACAATAGGCCAACGCC

1801 GGATCAGCTGAGAACGGGGGTTTCCCAGAGGTTGAGCTTTACGCGGATGCCTTGCTCGAGCGCCTTGCGGTACAC
 CCTAGTCGACTCTTGCCCCAAAGGTTCTCAAACCTCGAAATGCGGCTACGGAACGAGCTCGCGGAACGCCATGTG
 -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 GCGCGGTGCGTCCCGCTGATGATCTTGCAGATGCTTCCACCTGCTCGGGCGCCAGCGTGCCTTCGGCAATCAT
 CGGGCCACGCGAGCGCGACTACTAGAACGGCTACAGAAGGTGGACGAGCCCGGTGCGACGGAAGCCGTTAGTA
 -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
 CAGGTACTTCGCGTGTGGATGGTGCATGCACCAACACCGCTCCGAACCCGTCGAGAAGCTTGGTCCGGAGCAT
 -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 GAGGCCGGTGTGTCCACCACCTTGCGCACGTCCTGCTCCATGCCGGCGTCGATACTGCACGGGCTGGCAT
 CTCCGGCCACAACAGGTGGTGAACCGGTGCAGCAGGACGAGGTACGGCCGCGACTATGACGTGCCCCGACCGTA
 -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 GGCCAGGAACGCGCCAGGCTTGACCCACTCGCGGCGCACCAGCGGGTACTGGCTGGGGTTCGCGACTTCGCCCGA
 CCGGTCTTGCAGCGGTCCGAACCTGGGTGAGCGCGCGTGGTCCGCCATGACCGACCCAGCGGTGAAAGCGGGCT
 -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
 CGACGTATCGACTGGTCCAGCCTTGGCGCATGGTGAAGAAGGTCCCAAAGGTGGTGGACCTTACTACTAAAC
 -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
 GCCCTTCGACCAAAAAGTGGGTCCGCTGCTTCCGTAGGTCCAAGAAGACCGGTGCCGGGAACCTGGAACCTCCAGAG
 -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 GATCAGCGGGCAGACGGCCATGAACGCGAGCGACCGTGGTCTTGGCCATCACCCCGGGCCGGCCAGGCCGATCAC
 CTAGTCGCCCCGTCTGCCGCTACTTGGTTCGCTGGCACCAGAACGGGTAGTGGGGGCCCGCGGTCCGGCTAGTG
 -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 CTTGGCGTCTTGGCGCCAGGTGGCGGGCGCCAGCGCCGGATGGCGCCGGTTCGCGTAGGCCGACAGCAGGTT
 GAACCGAGGAACGCGCGGTCCACCGCCGCGGTGCGGGCCCTACCAGCGCCACGCCATCCGGCTGTCGTCCAA
 -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 GGCCGACATGTGTGCCAGTGGCGCGCGGTGTCGGCATCGTTGAGGGTGAACATCAGGATCGAGCGGGGCAGGCC
 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 TTTCTCACGGTTGGCGATGTTTCGAGCCGTACCCTTGGCGCCTGCGGCTTGAAGTTGCCCGGAGGTACGCCGG
 AAAGAGTGCCAACCGCTACAAGCTCGGCATGGTGAACCGCGGACGCCAGACCTTCAACGGCGCTCCATGCGGCC
 -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
 GTAGCGGTAGTACGCGGCCAGCCGCCACCCGAACCGTACAACCCCTTACCCTCACGAGCCCTTCCATTAGTA
 -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 CGCGCCGTGCGAGTCGCTGTTCCGGCCGGCCATGCGGTTAGTCACCCTGGTACAGCAGGCCGAACATTTCTTCCAT
 GCGCGGCACGCTCAGCGACAAGCCCGGCGGTACGCCATCAGTGGGACCATGTCGTCCGGCTTTAAAGAAGGTA
 -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 GGTGTGACACAGGCCGGCATGTCGGTGACGCCGGCACGGATCATGTCTGCTCGGACAGGTAGATGAAGTCAAT
 CCACAGCTGTGTCGGCCGTACAGCCACTGCGGCCGTGCCTAGTACAGGACGAGCCTGTCATCTACTTCAGTTA
 -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
 AAAGCGATTGCTGACCATCCAGCAGAACAGACGGACGGTCGGCTCAACTGGCAGTCACGGTCCCAGAGTTACC
 -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
 CTGTCGACTACCGCGGGTCCGTCGCGACGCCACCTTGGGTACGGAAGAAGCTCCGGTAGTGGTCCGTTGAG
 -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 GTCAGTGCACCGAGCAGGCTGATGCAGGCACCGCGGCCATGCACAGCAGCGCCACCCGAGTCAAGGTATTGAGG
 CAGTCACGTGGCTCGTCCGACTACGTCCGTGGCGCCGGTACGTGTGTCGCGGGTGGGCTCAGTTCCATAACTCC
 -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 CCCAGCCGGCTGATCAGGTGGCTGGCCGTATGGCGCCAGCAGGATCGACACCCCGGTGGCGCCAAACAGCAGG
 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 CCGAAGGCCTGGGCGCTCAGGCCGTAGTGGCCGTGACACCAGGGTGGCACCGCCGATGTAGGCGAACAGGAAG
 GGCTTCCGGACCCGCGAGTCCGGCATACCCGGACCATGTGGTCCACCGTGGCGGCTACATCCGCTTGTCTTCC
 -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
 TTCTTATGGCGTCTTGGCGGTCCAGCCCGCTCTTCCGCCAGCCGCTCTACCGGTCCATCCACGACGTC
 -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 GCGTGGCCAGCGCAGGGTTCGCGTTTGTGGCGCGAGGGTTTCGGGCAGGTTACGAGGCTGTTGACCAGC
 CGCACCGGTTCCGCGTCCCAAGCGCAAACGACCCCGCTCCCAAGCCCGTCCAAGTCTCCGACAACCTGGTCCG
 -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
 TGGCAGTGCGGGTACGGCCGCTCATGGTTCGTAATGACGTGCGGTGCGGCTTACACGCAGCTAGTGGCGGGTCC
 -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
 GAGTGTAGTGCCTGACGACTACTAGTGGTGGTCCAGTCCGCTGACGGTCCGGGACCTTTTTCGCGTCTGAC
 -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 ATCAGGGTGTGAGGCTGGGGCTGCGGCTGCCGCCAGCAGCACAGGATGAACAGCAGCAGGCCGGCCAGCAGC
 TAGTCCACAGCTCCGACCCCGACCGCGGGTCCGTCGTTGCTTACTTGTGCTGTCGCGCCGGTCCGTCG
 -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

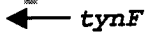
4051 GGCTTGGCGCGGCCATAAGCGTCGACGATGGGGCCGAAGATCAGCTGGCCGGCGCCATGGCCAGCAGGAAGAAG
 CCGAACCGCGCCGGTATTCGACGCTGCTACCCCGGTTCTAGTCGACCGGCCCGGGTACCGTCTGCTCTTCTTC
 -3 P K R R G Y A D V I P G F I L Q G A G M A L L F F

ES 2 364 110 A1

4126 GTCAGTGTCAAGCTGTACGCGGGTGAAGCTAGCCTGATAGTGGCTGGCGATTTCGGCAGGCTCGACAGGTACATG
 CAGTCACAGTGCACATGCGCCACTTCGATCGGACTATCACCAGCCGCTAAAGGCCGTCGAGCTGTCCATGTAC
 -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 TCGACGGCGGAAGGGCCGAGGGCGCCGATCAGGCCTAGGCCAGGGCGAAGCTGAAGGGTATGGGAGGGAGGGA
 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  *tynF*
 GCCAAGGTCAAACCTTCCGCAAGGCCACTGATTCCTGTGGGAGCGGGCATGCCCGCAACCGGCAAGGCC
 CGGTTCCAGTTTGGGAAGCGCTCCGGTGACTAAGGACACCCCTCGCCCGTACGGGCGCTTGTGGCCGTTCCGGC

4426 GTGCCACCGAGTCGCCTTCTTCGCGGGCATGCCCGCTCCACATTGACCGCAGAGGTTGGTTACCGTGGTTGCGT
CACGGTGGCTCAGCGGAAGAAGCGCCCGTACGGGCGAGGGTGTAACTGGCGTCTCCAACCAATGGCACCAACGCA

4501 CAGAACGGCACAGCCACGGTACAGTGGCTATACACATTTGGTACCATTCCCGCCACCTGGTTGCCGCCGTTGCTC
 GTCTTGGCGTGTGGTGCAGTGCAGCAGTATGTGTAACCATGGTAAGGGCGGGTGGACCAACGGCGGCAACGAG
 -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 TCGTCTTTCGCGGCTGGTAAAGGCCACCAGCGGGTATTATCAGGTGCTCGTTGACTGCCATTCCACATAC
 AGCAGGAACGCGCCGACCATTTCCGGGTGGTCCCGGACTAATAGTCCACGAGCAACTGACGGGTAAGGTGTATG
 -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 ACTGTGAGATTTTCCAGCGGTGTGCCTTACAGCCACATGGTGGATACCCGTTGCTGTTGAAGGGCGCGG
 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 GCGGAGTAGCGGTGTAGCGGTAGGTAACCTGCGGTGCCACCGCAGGTGCGGCAAGGTGTAGCCGGCCTCGAGG
 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 TACCAGGCTTGTCCGGCGCGTGGTCTTGTCTGCCAGCGTATTGGAAGCGAAACTGGCATTGTGATGCCA
 ATGGTCCGAACGAGCCCCGCGAGCAGAACAGGACGGTCCGCATAAGCTTCCGCTTTGACCGTAACAGCTACGGT
 -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 GCGTTGCCCTTCCCGCGCACGCTATACAGTCCATGCTTCCGCGGCTTCTGAAAGTGCCTGGCCCATTTGGTGC
 CGCAACGGAAAGCGGCGCGTGCATATGTGCAGGTACGGAAGCGCCGAAAGACTTTCAGCGACGGGTAACGAGC
 -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 GTGACGTCGATGCCGTGAATCCAGGTGAGCCGAGGGTGGCCAAGGCTTGGGTGTAGTCCAGCGTCCCGCGGCC
 CACTGCAGTACGGCACTTAGGTCCAGTCCGGTCCACCGGTTCCGAACCCACATCAGGTGCGACGGCCCGCCG
 -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 AGTTCCGGTTTCCGCTGGGCGCGGTTGTCGGATTTAGCCACAGCAGGCTGCCATGCAGGCCATCGCTGCCCC
 TCAAGCCAAAGCCGACCCGCGCAACAGCCTAAAGTCCGTTGCTCCGACGGTACGTCGGTAGCGACGGGGG
 -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 AGGCGCAGCATTGCGGTGCGGTGGAAGCGTGGCGGGCGGCCAGGTAGTAGGCCCGCGGGTCCAGCGACCG
 TCCGCGTCTAACGCCACGCCAGCTTCCGACCCCGCCGGTCCATCATCCGGGGCGGCGCCAGGTGCGGTGGC
 -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
 AGCCGCTGCGGCAACGGGTCGAAGCCCGGACGACCAACTAGTTTTTGGTACGGGTCGCTTACCAGACCGCC
 -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 CCGGCGAAACGTCCACTCCATCCTTCCCAGCACCGGAAACAGGTGCGCCGAGCGCCAGCCGAGGAAGGCGTCT
 GGCCGCTTTGAGGTGAGGTAGGAACGGTTCGTCGCCCTTGTCCAGCCGCTCGCGGTGCGCTCCTCCGCGA
 -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 TCACGCCAGGTGCAACCCCTGTGGTGCCGTCGTAGTCTTGGCGGCTGTTGAACATGCCCCATACCGCCAGCATG
AGTGGCGTCCAGCTTGGGGACACCACGGCAGCATCAAGAACGCCGACAACCTGTACGGGGTATGGCGGTTCGTAC
-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 TCGGCGTTCAGGTGGTGTTCATCGTCGGCGTACAGCTCAACGGCCGGCGGGCTGGCTGGCCAGCAAGGTTGCC
AGCCGCAAGTCCACCGACAGTAGCAGCCGATGTGCGAGTTGCCGGCCGGCGGACCAGCCGGTTCGTTCACCGG
-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 CCTTTGTGTTTCGGGGGACCCCTCGGTTCTGGCGAGGGGCCATCGCGGTTGGCGGCGATGGCCATTAGGGCGTG
GGAAACAACAAGCCCCGTGGGAGCCAAGACCCTCCCGGTAGCGCCAACCGCGCTACCGGATAATCCCGCAC

5926 TCGGTTGGGGGGGGTCTTGTTCGTGGCTGCCAAGGCGCTTGACAGCCTTGGCCACAGGCGGGTTCAGTAGCGGA
ACGCCACCCCGCCCCAGAACAAGCACCAGCGTTCCGGCAACGTGCGGAACCGGTTGTCGCGCCAGTTCATCGCCT
-1 Y R I

6001 TCATCACCGACTTGAGCTCGGTGAAGTCATCGATGAAGGCCGAGCCGAACCTCGCGGCAATGCCGGAAGCCTTGA
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 TGCCCCAAACGGTACAGCCGGTTCGAGCAGGGTGTGCATGTTGACCCACAGGGTACCGGCTGGATTGCGGGGA
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 GCAGCAGTTCGTCTTCGTGCTATAAGGCAGGAAGTTCGCCACAGGGCCGAAGGTTTCTGGGTGAGCAGGGTGT
CGTCGTCAAAGCAGAAGCAGCAGTATCCGTCCTTCCAGCGGTGTCCCGGCTTCCAAAGGACCCACTCGTCCACCA
-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
CGCCAGCTACCGCTCGCCACGTGATCTTCGCGAGCGGGCGCCGCTTAAACGGGGTTCACGTCCTTCGGCC
-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 CCTCGATGATGCCGTCCACAGCCTTGTGCGTTGCCACGTGGGCGAGGAAGGCCACCGGTTCTTGCAGCCAGTT
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 CCAGTGTGCGCAGGGTTCAGCTTGGCGCCCATGGCAGCCTGGCCTACGGCGATGCCAGTGGGACAGGACCGGTTGA
GGTACAGCGTGGCCAGTTCGAACCGGGTACCCTCGGACCGGATGCCGTACGGTACCCGTCGCTCGGGCCACT
-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
TGCTCTGGAACAGCCATGGACGCACGAGCTAGTCAGGAAACGGGTTGGTCCGGTGGTGGCCAGTTCGTCAAGTAC
-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
GTGGCCGGCGTCCGGACGAAGCCACCGGTAAGCCGTTACGCGTGTGCGAGTCCGCCACTTAAAGCGACCCGA
-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 GCGACGGGTGATGGTCTGGCCGGTATCTTGGTCGCCCAGCCGGCTAGTAGCGCAGGAAGTGGCGGCGCTGCT
CGTGCCCCACTACCAGACCGGCCACTAGAACAGCGGGTGGCCGCATCATCGCGTCCCTTACGCGCCGGACGA
-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 CGTTGGCCGGGTGACCACGGCAATGTTTCGACGACGACTGGCTGGCGAGGTGCTGGCCGTGGATGAACACGCCAT
GCAACCGGCCAACTGGTGGCGTTACAAGCTGCTGCTGACCGACCGCTCCACGACCGGCACCTACTTGTGGCGTA
-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 AAGTTTGCAGCTTAATAAGCGGGGCGAGTGGGTGCTTGTGCTGCGTGACAGGTGCATGACTGTGGCTGCCAAC
TTCAAACGTGCAATTATTCGCCCGTACGCCACGAACACGGACGCACTGTCCACGTACTGACACCACCGGTTGG
← *tynG*

7576 GCACTGGGTAAGCCTTGTGGGAGCGGCCTTGTGTCGCGATAGGGCCGAGAGCGGCCCGGGCGATGTTGGCGGGC
CGTGACCCATTTCGGAACACCCTCGCCGGAACACAGCGCTATCCCGCGCTCTCGCCGGGGCCGCTACAACCGCCG

7651 AAGCTGAAATGCTGGGGCCGCTTTCGCCCCCTATCGCGACGCAAGGCCGCTCCCACAAAAAAGCGAGCGTAGG
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 TCACCGGACCATGGGCTTTGGCATCGGCCGCGAGCGCCTTCGCGGTGGCCATGGTCATCGCCGCACTGATGATGC
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 GTGGCATGGGCGGTTTCTTCGCCATTACCGGCACGCTGTCGGCCTACCTGATCGTGCATGTGTTCCGCGGTACCG
CACCGTACCCGGCAAAGAAGCGGTAATGGCCGTGCGACAGCCGGATGGACTAGCACGTACACAAGCGGCCATGGC

+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 CCGAAACCATCTGTGGGGGTGATGGCGCTGGTGAACCTCGAGCACCTCAATACCCTGGCGGAATCCGCGGGCG
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
CAAGCACCGACACCCACACGAAGCACCCGCAACCGCCAGGTTACGGAAACCGCAGTCCGCGGAAGTCCG

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
CGCGCCTTACCAGGAGTGAAGCCGTACACCTGGTGAAGTACCACAAGCCGCACGAACCCGACTAGCGGCGTG

+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 GCATGGCCATGTTTCATGTTCTGGTGGCTGCGAGTTCGCTCACGCCGCTGCCCCGAAGTGCCTCGCTCGGCCTGGG
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 TGCTGCCCGGGCCATGGCGCTGGGCGTGTGGCGTGGCCAGCTGCATGTTTCATCTACGGAGCGGCATGAAGC
ACGACGGCGCCCGGTACCGCGACCCGGACAACCCGACCCGCTCGACGTACAAGTAGATGCCTCGCCGCTACTTCCG

+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 GCCAGGTGGAAAACGTGGTGTGGATGCCGCCAGTGGCGTGCACCTGCTGGACACGCCCATGGCCATCCCGCGGT
CGGTCCACCTTTTGACCACGACCTACGGCGGTACCGCACGCTGGACGACCTGTGCGGGTACCGGTAGGGCGCGA

+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
AGCGGCTCGTCCACTACCCACTATAACCGGGTCACACCGACCCATAGCCGAAGGACAAGCGGCGCGCCGGTGGT

+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 TCAACACGCTGATGGCCGGTGTGCCACGATTCCTTTACGGCATGGCGGTGGACGGCGCGTTCGCCAAGTGTTC
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 CCTACCTGCACCCGCGCTTCAAGACGCGCTGCTGTGCATCCTGGTGGTGGCGTGTATCCCTTGCTGCATGCCT
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 GGTACCTGGGCGGCAACCCGGACAACATCCTGCACCTGGTGTGGCCCGGTGTGCGCTGGAGACCCGCTTACC
CCATGGACCCGCGTGGGCGTGTGTAGGACCTGGACACGACCGGGCGCACACGCGGACCTCGTGGCGGATGG

+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
AGGGCAACGGCGTCTATAAGAGGTATCGCCATAGGAGTAGCGTACCGCAAGTAGTGTGGCGGCGGCTACTTGG

+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 TGCAGAAGTCAACCCGTTCAAGCCGGCGCGGGTFCGAGGATGTGCTCGAAGAGAGTTTCTGCGGAGCCTGGCC
ACGTCTTCCAGTTGGGCAAGTTCGGCCGCGCCAGCTCTACACGAGCTCTTCTCAACGACGGCTCGGACCGG

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

9376 CGCCAGGCGCCACGCTGGCATGCCTGGCGCGCAACCTGGGGCAGCAGAACCTGGTGGCGGCGGGGTGATCCAC
GCGGGTCCGCGGTGCGACCGTACGGACCGCGGTTGGACCCCGTCTTGGACACCCGCGGCCCACTAGGTG

9451 GACCCGCGCCAGGGTTGGCAGGCCACGGTGCACGAACGCGTFCGAGGCCACCTGCTGATGCACATCGTACCTGT
CTGGGCGGGTCCCAACCGTCCGGTGCCACGTGCTTGGCAGCTCCGGTGGACGACTACGTGTAGCAGTGGACA

9526 GAGTTCAGCTGCAGTTGCTGCTCCGCAAGGGGGCAGGTCAGCCTGGAGCTGCGCCATACCGGTGCGCTTCCG
CTCAAGGTGCAGTCAACGGACGAGGCGTTCCCCGCTCCAGTCCGACCTCGACGCGGTATGGCCACCGGAAGCG

9601 CGTGCCGCGCTGGCCTGTGTGTACCGAAGGGCGACCGGGCGCGTTCGCCCCACTGCGCGACCGGTTGCTGCAG
GCACGGCCCGGACCGGACACACATGGCGTTCCCGTGGCCCGCGGAAGCGGGTGCACGCGTGGCCAACGACGTC

9676 CAGCCGCACTGGTGGCGCGCTGATGCCGCTGGATTTCAAGCGCCTGACCTTGGCCTGGCGCGACGGCCAATGG
GTCCGGCGTGACACCCCGCGACTACGGCGCACTAAAGTTCGGGACTGGAACCGGACCGCTGCCGTTACC

9751 TTGCTGACCTGGAGCACATGGCGGTAGCGAAGTGGTCAACCGCATGCCAGCGTTTCGCCGCTACATCCCCATC
AACGACTGGGACCTCGTGTACCCGCCATCGCTTACCAGTTGGCGTACGGTGCAGAACCGGGATGTAGGGGTAG

ES 2 364 110 A1

9826 AGCCCGCAACAGCGGGCGCACCTGATGGCCAGCCTGGCCAGTTCAACACTTTGCTACCTAACCTTTGACGCAA
TCGGCGTTGTGCGCCCGTGGACTACCGGTGCGACCGGGTCAAGTTGTGAAACGATGGATTGGAACCTGCGTTT

9901 CTGGCATAACGCTTGTGTATCAAGCGACGAATGATGACAGTTGTGCGCACATAGATAACATGTTAACAATGTGC
GACCGTATGCGGAACGACATAGTTCGCTGCTTACTACTGTCAACACCGGTGTATCTATTGTACAATTGTTACACG

+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 CCACGGCCATGCAACAGATCTGTGGCCGTTTCGAGACGGAACCTGCGTCCAATCACTCGCTGTTTCATCGGCGAGG
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 TTTCTACCTTTTCCCGTGGCCGCTTGGCCGCTGGCCAACTGGCCACCAATGCCGGCAACATCCGCCGCTGGGGC
AAAGATGGAAGGGCACGGCCGAACGGCGACCGGTTGGACGCGTGGTTACGGCCGTTGTAGGCGGCCGACCCCG

+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
TTTTGGGCTGGGAACCTGCTACTGGTCGTAACAAGGACCACTGGTTCGCACGCCCGTAAGGTGGCACAGGGTCC

+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 GGGGCATGCAGGTGACCTGGCCGCGGGTGGAGCTGCTGCTGATGGATTCGGTGGGGCGCTGCGAAATCACCCCGA
CCCCGTACGTCCAGTCCGACCGCGGCCACTGCAGCAGGACTACCTAAGCCAGCCCCGCGACGCTTTAGTGGGGGT

+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 GTGGGTTGATCGAACATGTCTCGCTGGCCCTGTGCGGTGAGCAGGTACGCAAGTATGTGCAAGCAGCGGCCCGA
CACCAACTAGCTTGTACAGAGCGACCGGGACAGCGCACTCGTCCATGCGTTCATACAGCTTCCGTCGCGGGGT

+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 TGTTTGGCAAGATCTCCTCGAGCAACGCTGCGGGCCATGTGATGTGCTGATGGACCACTGTGCAAGGAGC
ACAAACCGTTCAGAGGAGCTCGTTGCGGACCGCCGCTACGACGTACACGACTACCTGGTTGACACGTTCTCTGC

+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
TCGCGGTACCGCTTCGCGACCCGTTGGAACCCGGAACCTGCCCCGTTGGACGCCCCGATGCACGTCGTCCACT

+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 TCGACGAGTCCCTGTACAGCCCGGCTGACCCCGTCCAACCTGGCCGGTCCCTGAACATTCGGTGGGTCCAC
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
ACATGGCCGACAAGTCTCCTCCTCCCGCTATCACACCGGCGATGTAAGTCGCCCCGCGGACTTCGCGTCACGCC

+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 ATGACCTGGCCAACCCGTTCTTCAAGAGCGAGTTCGATTACCTCGATTGCCTACAAGTGGGGGTTTACCGACTCGG
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 CGCATTTAGCCGCTCGTTCAAGAAACAGTTCGAACGCTCGCCCAAGGACTACCGGGCGCAGGCGATGGTTTGG
GCGTAAAGTCGGCGAGCAAGTCTTTGTCAAGCTTGCAGCGGGTTCTGATGGCCCGCTCCGCTACCAAACCT

10951 TGTGATGGTGTGCTGTTGTGCGGGCCTCATCGCCGCAAGTCACTTGGCGGCGGTTTCAGCGACGGCCGTTGAAGTA
ACACTACCACGACGAACACGCCCGAGTAGCGCCGTTCAAGTGAACCGCCGCAAGTCCGCTGCCGCAACTTCAT

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

11026 GCCCGACAGCTGGTGACCGTCTTGGCCGAGTGAGCAGCAGCGGGCGAAATGGTCTTGGCCGAGGATGCGCGC
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

GAGCGCTTTGTCCAACCGTGACCACCGGTAGCCCGGGGGTCCGGTCCAGCTACCGGTGCAGAAAGTCCATCCC
-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
CTTTTAGAAGTCGTAGTCGCGGCCAAGGTGCGGAAGTCCAGGTCGCCCTTCACGAGCTGCTTCCCGCACCCGCGC
-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 GCCAAACAGCAGCGGGTTCGCGGGTGACCCGGTAGTAGTCGATCACCGGGCGGATGTCGCTGTAGGCCCCGCG
CGGTTTGTGTCGCGCAAGAGCGCCACTGGGCCATCATCAGCTAGTGGCCCGCCTACAGCGACATCCGGGGCGC
-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 TATCGGGCTGATGCGCTCGATCAGCTCATCCGGCAATGGCTCGGTCATCATCTGGAAGGCATAGGTGTTTATAGT
ATAGCCCGACTACCGGAGCTAGTCGAGTAGGCGGTTACCGAGCCAGTAGTAGACCTCCGATCCACAAATATCA
-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 GCGTGCCTGTCAGCTGCGGCTCCAGCTTGTGAGGAAGCTGTGCGACGCCACAGCAGCTTGTGGGCGGTACCGA
CGCACGCACGTGCGCCGAGGTGCAACAACCTCCTTGCACAGCGTGGGGTGTGTCGCAACCGCGCATGGCT
-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 GCCACGGCCGGTGCCTACCGTGATGCGCTCGCCGTAGGTCACTTCCAGGGCCGGGCTGTGTTCCGAAGATGCGCGC
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 ACCATGGCCACCAGTGCCTGCGCTTCGCCACGAGCAGGTTTCAGGAATGCACATGGCCACCAGGCTGTCAT
TGGTACCGGGTGGTACGCGACCGAAGCGGGTGTGTCGTCCTTCCAAAGTCCCTTACGTGACCGGTGGCGGGTACACGTA
-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 CAGGGCGCTGCTGTAGGCGTGTGCTGCCGATGATCTGGCGCACTTCGCTGCCACCGAGAAACGGATCTCGTCCGG
GTCCCGCAGCACATCCGCAACGACGCTACTAGACCGCTGAAGCGACGGTGGCTCTTTTGCCTAGAGCAGCGC
-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
CCATAACTAGCGGAACCTGCGGAAGAGGGTAAACCGCTCCAGACAAGGACCAGCGCAACTTCCGGGTACATCGG
-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 ATAGCCGTGGCAGAAGTCGGCGTCGATGGCGTAGCGGGCGATGCGGTCCTTGTGATGATGCCGGCGCCAGTTCGCT
TATCGGCACCGTCTTACGCGCAGCTACCGCATCGCCGCTACGCCAGGAACACTACGCGCGCGGGTCAAGCGA
-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 GATTTTCGAAAATATCCCTCACGCCCTGATCACCGACGCTGCTGCGGATCTTCTCCAGGTCGTGGCCGATGCCCGC
CTAAAGCTTTTATAGGGAGTGGGGACTAGTGCTGCGACGCGCTAGAAGAGGTCAGCACCGGCTACGGGGC
-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 CATGATCTGCCCGCGTTGCGCCCGCTACCGCCGTAGCCAGATAACGGCCCTCGAGCACGACGATATTGGTCAC
GTACTAGACGGCGGCCAACCGGGCGATGGCGCATCGGGTCTATTGCCGGGAGCTCGTGTCTATAACCAAGT
-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 GCCTTGTTCGCGCAGCTCCAGGGCGGTTAATGCGCGAGAAACCGCCACCGATCACCACGACATCGGCCCTCGAT
CGGAACAAGCGGTCGAGGTCGCCCAACAATTACGGCTCTTTGGCGGTGGCTAGTGGTGTCTAGCCCGAGCTA
-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 GTCGCTTCAGGGTGGGAAGCTCAGGTTGTACTTCTTGGTCGCCAGTAGTAGGTTGGGGCTCTCGAGGGTGTGAT
CAGCGCAAGGTCACACCCCTTCGAGTCCAACATGAAGAACCAGCGGCTCATCATCCACCCCGAGACTCCCACTA
-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 CATGACGCCCGCTGCTGACTGGAAATGGGTAGAAATCATTCTATTAATGATTAATGATTGTGCACTGGCACT
GTACTGCGGCGGACGACTGACCTTTACCCATCTTTAGTAAGATAATTACATAATTAATAACACGTGACCCGTATGA
-2 M V G G A S Q F H T S I 

← *tynD*
hpaR →

+3  T T P R P S L T L T L L

12376 CGCCGGTTTCTATTTCCAGCCTCCTTGAGCCCGCATGACCACACCGAGACCCTCCCTGACCTGACCTTGCTGC
CGGCCAAACGATAAAGGTCGGAGGAACTCGGGCTACTGGTGTGGCTCTGGGAGGACTGGGACTGGAACGACG

+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 AGGCGCGCAAGCCACCATGGCGTTCTTCCGCCCGGGCGTGAATGCCATGACCTGACCAGCAGCAATGGCGGG
TCCGCGCGCTTCGGTGGTACCAGCAAGAAGCGGGCCCGACTTACGGGTACTGGACTGGCTCGTGTGTTACCGCC

+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 TAATCCGTATCTGCGCCAGCAAGCGGAGCTGGAAGCCATCAGTTGGCGGAGCTGGCCTGTATCTCAAACCCA
ATTAGGCATAGGACCGGTCGTTCCGCTCGACCTTTCGTAGTCAACCGCCTCGACCGGACATAGGAGTTTGGGT

+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 GTATGAGCGGGTGTCTCAAGCGCTGGAGCGTGACGGCATCGTAGCGCGGCCAAGTCCCGGAGGACGAGCGCC

ES 2 364 110 A1

CATACTCGCCCCACGAGTTTCGGGACCTCGCACTGCCGTAGCATCGCGCCGCGTTTCAGCGGCCTCCTGGTCGCGG

+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
 CGAGTATCCGACGCCCCGACGCATGTAGTCGAGATGTATGTCGACAGCTACTACGGGTCCATCCGTAGCCGTA
 -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 ACAGCGCCAGGCGGCTGTGCTGCTCATGGCCAGCCGTGGCGAGCTTGCAGGGCCACGCTGAACCTTTCGCGTA
 TGTGCGGTCGCGCGACACGACGAGTACGCGGGTCGGCACCGCTCGAACGTCGCGGTGCGACTTGGGAAGCGCAT
 -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
 ACGGCAGTCCATGACAAGTTTCGGGCTTCACTGTAGCCGAACACGGGCGGCCCCGTCCTTGGCGCACGCGT
 -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 ACACGAAGCGCAGTTGGGCCGAGTCGCGATAACGTTTCGGCCAGGTGCAGGGCCAGCCAGTCCCCCGCCAGGC
 TGTGCTTCCGCTCAACCCGGCTCAGCGCTATTGCAAGCCGGTCCACGTCGCGGTCCGTCACGGGGCGCGGTCGCG
 -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
 GCAGCGCCGAAGGACGCGTTTCGCGCACGAGCTGTTCCGGCAAAGGACGTTGTCGCGTGCACCTTGTGGAGGT
 -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
 AGTCGCTTTCGCGAGTATTGGCATGAGCCGCTTACCGGCTGCCGCGTAGCGTGTGCGTGGCGTCTTCCCC
 -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
 TTTCCAGAAAGTTGTCGTAGTGAGGCAGTCCCCGCGCCGCGCGCGCAGAACTCCACCCCTAACACCACTA
 -1 L D K L L ■

← tetR

13501 CGAAAATGCACGGGTCAATGCTTGTGCGCAAGGCAATTTCCGGGCGCCATGGAAAAGTCAATGTTCCCTCGTAAC
 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 AAAAGCCAAACCCCTGCTGGAAGACCTGAAGTCCGCTTCCGACCATGCGCCCAATGCCATGCGTGCAGAGC
 TTTTCGGTTTGGGGACGACCTTCTGGACTTCAGGACGACGCGCTGGTAACGGCGGTTACGGTACGCACGCTCG

+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 AGGACCGCAGTGTGCCGGCAGAGAATATCGCCTTGTGAAAAGCATCGGCATGCACCGCGCTTCTTGCCTAAAC
 TCCTGGCGTCACACGGCCGTCTCTTATAGCGGAACGACTTTCGTAGCCGTACGTGGCGCGAAAAGAACGGGTTG

+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 ACTTCGGCGGCATGGAAATCACCCCTGCCGAGTTCGCCCAGTGCATCGCCTTGTGGCGGGGCGCTGCGCCAGCA
 TGAAGCCCGCGTACCTTTAGTGGGACGGCTCAAGCGGTCACGTAGCGGAACGACCCGCCCCGACCGCGGTCGT

+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
 GTCGGACCCGGTACTCGGACGACAGTGGGTGTCGGTGGTCTACCGTTACAAGAGCGGGTTGATGTTGTCTCC

+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 TGTGGGGTAGCGACCCGGATGCTACCGCCAGCAGCATATCGCGCCGTTGCGCCGCACTGAAGAGGTTGAGGGTG
 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
 AGGTCTTCCGGTTCCTGTACTACCTCCCGTTCAGCCGCCGAAACCAACATGGGGCTGTCGTTCTAAAAGAAGC

+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 CCCCCTATCGCCCGTATTTTGGCAGCGGCTTCTCCACGGTCAGCTTGGGCGTTGCCGAGCGCATGCTGGAGGTTG
 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 TCCGCGAGAAAACCCGCAACCCGCTGCCTGACACCGGTGCTGCCGTTGGGCGCCGCCACCCCGGCGTGCATGC
 AGGCGCTCTTTTGGGCGTTGGGCGACGCACGGATGTGGCCACGACGGCACCCCGGCGGTGGGGCCGCGACTACG

+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
 CGGACCCGCTCAGCTGGGTAGTCCACCCGCGACGGCCCGTAACGACCTTTTCTCGACCTGCTCTAACGGCTCG

+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 ACAGTGCCTCGTACGAATACCCGTCGCGTGGCAGCTGGCGTTCTGGCGTACCAACCAGGGCTACGCCCGTGAAGA
 TGTACGGGCGAGTGTATGGGAGCGCACCGTGGCAGCCGCAAGACCGCATGGTTGGTCCCGATCGGGCACTTCT

+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
 ACACGTAGGTCGGCAGCTGGCGGACTACCTTCGCCGGCCACCACCGCGGACCAAGCTCTCGTTGCTTGACGTCC

+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 GGCTGTTCGCGGATTTCGCACATGACCCGTGCCATGCCTACACCGATTACGACGTGTGTGCGCAAAATCCTCGGCC
 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 CAACAACAACAGGGCAGGCTGCCAGGCTGCCCGGGAGTCTTGCATGTCCAAAGAAACCTTCGATTACGTGCC
 GTTGTGTTTGTCCCGTCCGACGGTCCGGACGGCCCTCAGAACGTACAGGTTCTTTTGAAGCTAAGTGACCGG

+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 TTCCGCCGCGCCCTGGGCAACTTCGCCACCGCGTGACCGTGGTGACTGCCCGCGCCCGAGTGGCCGCAAGGTC
 AAGGCGGCGGGACCCGTTGAAGCGTGGCCGCACTGGCACCACTGACGGCGCGCGGGGTACCGGCGTTCAG

+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
 CGCAATGGCGGTTGTGCAAGTTGAGCCACAGCGACCTGGGCGCGACTAGGACACCTCGTAGCTGTTCCGGAG

+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 ACCAGCCATGAAGTGTTCGAAGAGGCTCGCACTTTGCCGTGAACATCTGGCTGCGGACAGATCGACCTGTCC
 TGGTTCGTACTTCAAGCTTCTCCGAGCGTGAACGGCACTTGTAAGACCGACGCTGGTCTAGCTGGACAGG

+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 AACAACTTTGCCCGCCGAAGGAAGATCGCTTTGCCGGTATCGACTACGAGACCGGCACTGGCGGCGCGCGGTTG
 TTGTTGAAACGGGCGGGCTTCTTCTAGCGAAACGGCCATAGCTGATGCTCTGGCCGTGACCCGCGCGGCAAC

+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
 AAGCGGCTAACCGCGCGCGGAAACTCACACTTTTCATGGTCTGACCTGCCACCGCTAGTGACCTAGGACCA

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
CCGTTCATACCCGGAACTACTGAAACCGGCGAGCGGCGACGACATAGTGGTCCCGCGGATAAGTTACCACGAC

+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
GGCGTATGGGCGTACTGGGTTCCGCGTCTCCCGTCCGTGGCTCGTCCGGTGAAGGTCCCGGCGGACGTCTGTGTTG

+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
GACATGATGGACTACTGGGTCCGCGACGCACGGATGGTCCGACTGATGGTCCGGTCCGGTCCGACACATGGCCGGAC

+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
CGGTGGTGCCTCCGTGCGTACGACTACCACGACCTTGTGTACGCCCGGACTCGGACTTGTGTGACGTTGCGCTT

+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 GTGTCGATCCCGCGCGGAGATCGAGGAAGCGGTGCGAACCTCAAGCGCAAAGGGCTGATTGCCGATGACGAA
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 GGGCAGTGCGGCTATCGGTGAAGGGCGTGGACGAGACCAGGCGTGTGGACCATGCCCGGCAACAGCAGGAC
CCCCTACGCCGATAGCCACTTCCCGCACCTGTCTGGTCCGCAACACCTGGTAACGGGCGGTGTGCTGCTG

+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
TTCCACAAGCCCGTCAAGTCACTTGTGTCGACCTCTGAAAGTTCGGCACGAGTCCGGGAATAGTTGTAGACT

15826 ACACGCTTTGGGATGGCACC GGCTTTTGGATGGCACC GGCTGTGCCGGTGTTCGGGATGAACCCGCTCCAC
TGTGCGAAACCCTACCGTGGCCGA CAAAACCTACCGTGGCCGACACGGCCACAAGCGCCTACTTGGGCGAGGGTG

15901 AAGTCCAGCGCCAGTAGCAACTTCGGCGCGGTACCTGTGGGAGCGGCTTTAGCCGCGAACACCCGGCAAAGCCGGT
TCCAGGTCGCGGTTCATCGTTGAAGCCGCGCCATGGACACCTCGCGGAAATCGGCGCTTGTGCGCGTTTCGGCCA

15976 GCCATCCAACCCAGAAGCCTCAGTAGGCACCACCCCGGCACTGGGGACTACCCTGTATCCTTGAACCTCCCCGC
CGGTAGGTTGGTCTTCGGAGTCATCCGTGGTGGGGCCGCGACCCCTGATGGTGACATAGGAACCTGAAGGGGCG
-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 CAGCTCGCGCAGCCCGCGCATCAGCACCGTGGTATCCACACCACCGCCACAACGCCGACCCAGCTCGATGTA
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 CGCTCGCGCCAGTTCCTCGTCCGCGCTGAGAATGCCGGCGGCTTTGCCCGCCTTGCCAATGGCAGGATTGCGTC
CGCAGCGCGGTCAAAGAGCAGGCGGACTCTTACGCGCCGCGAAACGGGCGGAACGGTTACGCGTGTAAACGAG
-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 TTCAATCGCCGCTGCACCTCCGGGTGCCCGGGTTCGCGCATGCCCATGGCCGCACTCAGGTCTGCAGGCC
AAGTTAGCGCGGACGTGGAGGCCACCGGCCAACCGGCGTACGGGTTACCGCGGTGAGTCCAGACGTCGGG
-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
GTGGTCCGTTAAACGAGTAGCCGACCCAGTCCATTGGCCCTCCCAAGGTCCGCGCTTCGGGCGCGGTG
-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 CGCGCTGCCACCCCGCAATGCCCTTGGGCGGGTAATGCATGGCCTTGACCAGTTGCCGCGCCTGTTCCGGCAGT
GCGGACCGGTGGGCGCTTACGGGAACCCGCCCCATTACGTACCGGAACCTGGTCAACGCGCGGACAGCCGTC
-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
AAGTGGTAGCCGTTGCTTCCAAACACGGGCTATAGTGTGGAGCAACTAGTCCGCGCATATCGGCGCTAGTG
-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 CGGGCGGATCACTGCCTGGGTGGGTTAGGGTGCACCCGCTGCAACTGGGCGAGCATGCCGCGCAGGTGCTGGG
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 CGCGTGTTCGGCTCGATCAGCAGCCAGTCGAAACCGGCATTTGGCCGCGCAGCTCGGCGCAGTAGGCATCGGCCAG

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 GGGCGACCGGGCGGGTGAACGAACCCCAAGGATGATCTGGCCGGGCTGCAAGGTGACGTCGTACGGCGCCAGTT
GCCGCTGGCCCGCCACTTGGCTTGGGGTTCCTACTAGACCGCCGACGTTCCACTGCAGCATGCCGCGGTCAA
-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
ACAACCGGTCGGTCCGTTGCGGAAACCGGCCACCAACTCGTGCCGTCGCGACTGGGGCTAAGGAGCTAGTGCG
-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
GTAACGCCATCTCGTGGCGGCGGTGAAACGCGTCCAGCTAAAGCCACCCCGCTGCCGGGCGGGCGGTTAGTGGT
-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 CGCCGGCATTGGCGGCGTGTGCGGAGATGGTGTGGAACACCTTGGGGTGGCCTGGGTTTGGCGGTCCACTGCT
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
CCTACGCGCGCAGTTACTAAAGTTCGGCGCCCTAGTGGGTGAGCCACCGCAGGTCGTGTAGTTTGTGCCACTACA
-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
TCGCGCGACCTACCGCATCCGCAAGCTACCCACTAACGGCCACGAGGTCGCTCTTGACCGCGTGAACGAGCG
-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 GGGAGCGTTCGGCCTGGTCGAGGCGGTGCGCGGCGTGTGGATGAAAGCGTGTCTAGCATGGGGCGGTCTCTT
CCCTCGCAAGCCGACAGCTCCGCCAGCCGCGCAGCCTACTTTCGCAACAGATCGTACCCCGCCAGAGAA
-1 S R E A Q D L R D A A H Q I F A N D L  **← hpaH**

17626 GATTCAAGGGTTGACGATGGCAGCCTGGGTGCGCAACACCAGCAGGCCGCGCCAGGGCGATGAAGACGGCGAGTAC
CTAAGTTCCTCAACTGCTACCGTCCGACCCACGCGTGTGGTTCGTCGCGGGTCCCGCTACTTCTGCCGCTCATG
-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
CATGTCTCGTTCCGACCCGACACCCACAGCGGTCGGTTCGCTACTTTCATCCCGCACTTCTTGTCTCCGCTA
-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
CTTGTAGCGTTCGCTGCGGACCGGGTACGGCCGCTGTTGGTTCGGCCGCGTAAATGGCCGTCGCGGACGAGCCC
-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
CCGTTACCGCGTTATCGTACGGCTACCGTCCGTTAGTCGTCGCCATGCGTGTCCACGGTCCGCCAAGCGCAAC

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 ACTGGCGTCGCTGGCCACACCGCACTGTGAATCAGGCTGGGCATCCAGAACGCAAGGGTATTCACCGCCAGCAT
TGACCGCAGCGACCGGTGTGGCCGTGACACTTAGTCCGACCCGTAGGTCTTGCCTCCATAAGTGGCGGTCTGA
-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
GTGGCGCGTATGTGCCGGTGGTGTGCGGTGTCGCGTCCGCAACGCTTTTACCGCGGCTTGCTCCAATGCCCGAA
-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
CAGGAGCCGTTTGGCCGGTTCATGGTGGTCCGGTTCGTTGTTGGTGGCCGCGGGGAAAGCTCGTCCCTGTAGGTGAC
-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
GTTGCCGTGCCGTTACCGCTTGTGCGGCCACTGGACCCGCGCCGCGGGCGGCCCATGGTCGCCAACTCCATTTG
-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 CAGAATGCCCGGGAAGAACCAGCGCTCGGCCGCGCCAGGGCAAAGCGCAACAGGTAGAACGCGCTGCTGCTTTC
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
CTAGTCTGTCAGCACGCTGTTGTGCGGGGTGTGGTGGTAGTCCGTCGCTAGGTCCGCGCACCCGCTGCGC
-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
GTCCATCGTGTGGTGTGTCGCGTAGTCCGGTCCACTGACGGGTACCCATGACAGCCGGGCAAGTTGCAC
-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
ACGGAGCGCGCCGCTCCGAACAAGCTCACACGAGTACAAAACATGAATAAGACATTACTCAGCCCTCCCGCAC
-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 GTGGTCGATCTGCACGGTGTGCGGATCGGGCGCTGTTGCAGCAGTGGGTCCAGGCGCGCTTCAACACTGCCAG
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
GTTTCGACAGCGGGTGACAAAACAGTGGAGCCCGATGCCGGCATCGGTACGCGTCCAAACCGATGTTCTTCGG
-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 GTATTGCGCTTTGCCGTGCGCCACCCGCAATGGGCGGCGGGTAGGCCAGCAGCGGTGTACCGCCAGTGGGGAA
CATAAGCGGAAACGGCAGCCGGTGGCGCGTTACCCCGCCCATCCGGTCTGCGCACATGGCGGTACCCCTT
-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 CACGGCTTTGCCTTCGGCATCGCGCTGTTTCGAGCATGGTGTGCGCCAGGGCGCGGCACAGGCCGGGGATGTGCGG

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
 CAGCCAAAGTCCAGCCCCATATCTCGTCTTGGTCCACACCGTACCCCCGGAGGAGCCACTCCCCCGCCGACCGG
 -2 D T E L D P T Y L L V L H P ■
 19426 ACCCGCCAGGGCGACCAGCCGCGAACGGGTGGGTACAGGCGGCTGGTGGGCACCACGGCGCGGGTGGCGGGC
 TGGGGGCTCCCGCTGGTCCGGCGCTTGCCACCCCAATGTCCGCCGACCACCCGTGGTGGCGCCGCCCCAACCGCCG
 -2 ■ L R S T P V V A A P N A A ← *hpaF*
 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 GCCGAAGTAGGGCGTGACCACTTCGGCCTTGCCGTCGTAATCGGACCAGCCAGCGCACCAGCAGCATTGCCGT
 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 GTCGTGCATGAAGCCTTACCGTGGCCTTTGGCGGCGTACTCCGGCAGCATCCCGCAGAACGCTTCCCACTCGCC
 CAGCAGTACTTCGGAAGTGGCACCAGGAAACCGCCGATGAGGCCGCTGTTGCGAAGGTTGAGCGG
 -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
 CAGGACGGGTGTAACGTTGGTGTGCCACCAGCTCCCAAAGCTCCTTGCCCGAGGTGTGGAACCACCGTTTCAGGCC
 -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
 CGGACCGGCAAGACGCGCTTCGCCACGCTGTCGCTCGGCGACCGGTCTTGGCGTCCACGGCAGCATCACCG
 -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 TTCTACTGCCTTGCGCATGGCCCAGCCAGCGGGGCACTGTCCGGCAGGTAGTGGCAGGTGCACAGGGCCGAGAC
 AAGATGACGGAACGCGTACCAGGTCGGGTCGGCCGTCGACAGCCGTTCCATCACGCTCCACGTGTCCCGGCTCTG
 -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
 GCTCTGGTGAACCTCAGCACCAGGACCAAGTACATCGCGTACCCGTTGGTCCCACGGCATAAGGCCCGCTCCCA
 -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
 CCACCGCACCACCGGTACCAAGCTGCAACTTCGCCAAGTGGAGGAGCCGGTTCGTAACGGGTCGAGCCCTAA
 -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 GCCGGGAATGCGTAGGGCATGTTGCTGATGAAGTGGCGGAGTTGCTTGTGGTGTACACGCCCTCGAAATGCGG
 CGGCCCTTACGCATCCCGTACAACGACTACTTCACGCCGTCAGCAACGACCATGTGCGGGAGCTTTACGCC
 -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
 GGGCGTGTGTCGACCATCAACCGCACTGGTGGTCCAGCACAGCTTGTGCTGCTACACAGGTGCGGGTCGAG
 -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
 TGCCGTTGCCCGGACTAAAGCACTACGGGCAGCTACGGCGGACCGCTTTCCGGAACCGCGCCCGGACCGTCAAG
 -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
 CCTGTACATGTACCTGCCATGTACCCATTAGAACCCTACTCTCGCTCAAACGGGTACCCCCAGAGGCTATTCTG
 -2 S M Y M S P V H T I K A T L A L K G ■
 20401 GCTGTGTTGTTTTGGGGCTGACCCGGTCCCTTGTAGGAGCGGCTTGTCCGGGATGGGGCGCACAGCGGCCCC
 CGACAACAACAAACCCGACTGGGCCAGGGAACATCCTCGCGCGGAACAAGGCCCTACCCCGCTGTGCGCGGGG
 ← *hpaD*
 20476 GCGGATATCTGCGGCGAGGCTGAAATCCAGGGGCGGCTGCGCGCCCATCGCGGGCACAAGGCCGCTCTACACC
CCGCTATAGACGCCGCTCCGACTTTAGGTCCCGGCGACGCGGGGTAGCGCCGCTGTTCCGCGGAGGATGTGG
 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
TGCCGACCGCGTCCAGCGCATGCAAGACCGACAACACTACTTGTGGTACGGCCGGAGCTACGGTGCCCGGTCCGCTA
-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 GGGCTTTGCCGATGCCTGGGTCCAGATGTACGAGGCCAGGCCATACTCGGTGTCGTTGGCCAGTTGCAGCGCCT
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
AGTGCAGCCGCTTATGCCACCCGACCTACTTGCAGGGGAACCGGTCACGCGTCCGTCACCGGCGCGGAGT
-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 GGGTGCATCGAACCGACCTGGGTTTTCGGGTCCGGTCCGGTCCACTACGATCAGGCGCTTGGCGCGCGCCGCAA
CCCACTAGTAGCTTGGTGGACCCAAAAGCCAGCCAGCCAGTGGATGCTAGTCCGCGAACCGCGCGCGGCTT
-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
TGAGACGCTGTTGACGCCCATGTGCGAAAGGACCTACTTCTACGCCGACGGCCGCCAGTCCGAGCGGCAAGT
-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 GCGAGAAGATGGTGAACAGCGCGCGTCCAGCGCACGCTCAAGGCTGCGTCTTGAAGATCAGCACGGGCGACT
CGCTCTTCTACCACTTGTGCGCGCGCAGGTGCGGTGCGAGTTCAGACGCGAGAAGCTTCTAGTGTGCGCGCTGA
-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 TGCCGCCAGTTCATCGAGTACTTTTTAAGGCTGCGGTGTCATGATCTTCTTCCGGTGGCGGTACCGCCGG
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 TGAAGGAAATGGCGCGCACATCGGGTGGCGGACCAGGGCATCGCCGGCGGTAGCGCCGTAACCTGGATCACGT
ACTTCTTTTACCGCGGTGTAGCCCCACCGCTGGTCCCGTAGCGCGCCCATCGCGCATTGGGACCTAGTGCA
-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
AGTAGAAGTCTGCGCCACACGGGTGCGGTCCGTCGCGGTGCGAGGTCAGAGGTCCATCGGCAGTACTTGCCTGCA
-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 TCCATGGGCTTACCAGGCCGCACACCCACCGGCTGGTACAGGCTGTAGTTGAGCATCTGGTCTGACCGGGT
AGGTACCCGAATGGTCCGGCTGTGTGGGTGGCCGACCATGTCCACATCAACTCGTAGACCAGCAGCTGGCCCA
-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
TCCATACCGGCAGGTACGCGCACGTGTGAAGCCGCTTCTTCCAGCTTCAACACGCTCCGTCGCCCTAGTCTGCA
-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
AGAACCAGACCACCTAGCCGTCGGCCACAGCTCCCAAAGGTCGAGCCGCTCAAAGCCGTCGAAGACAGCTAGT
-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 GCTCACCCAGCTTGGCATCAGCCGGGACGTTTCTTGGCCGGGTTGTTGGCCACTTGGGGAAGGCTTCTCTGG
CGAGTGGGTGCAACCGGTAGTCCGGCCCGTCAAGGAACCGGCCCAACCGGTTGAACCCCTTCCGAAGGAACC
-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
GGCTCGGTGTCGGACCCGTTGAAGGAGCCGCGCGGCGGCGGCTGAAGCGTCTACCGCAGCGGCCACCGCCCA
-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
 CAACAAGAACTTCTTCAGTCGAAGCGACTGCTATGCCAACTGGTCCGCTGGCTGCGGAAGGTGAAGGTGGTGGT
 -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 ACCGTTGATCCAGGTGCGCAGCTTCAAGTTGCTGACGCTTGGCACATCGGCCGCATCGACGATCCACGGGGCGAC
 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 CGGGGTGGTGGCATCGCGTTTTTACCCGCGAGTTGGGGCGGTAGTAGTTTTCCAGGTAGTCCGGGATGGCGTA
 GCCCCACCACCGTAGCGCCAAAAGTGGGCGTCCAACCCCGCCATCATAAAAGTCCATCAGCGCTACCGCAT
 -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
 CAGCAACGTGTGCCACATCGGCCGTGCATCCGGTCCCGCAGGAGTGCAGAACTGCAAGAAGCGGCAACGGCTA
 -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
 GTGGCGGTGGTTCGAGCGTGCATCACGTACATAAGCTGCAACAGGCCCGCGGTCCACTGGACCTACACCGCCA
 -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 GTAGGTGCCTGGCGACTTGTATGAAAGCCAACGGTTCGGTGGGGCGCGGAAGGCCAGCTCCCTGGCGTGGTCCGC
 CATCCACGGACCGTGAACACTTTTCGGTTGCCAAGCCACCCCGCGCTTCCGGTTCGAGGACCGCACAGCGG
 -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
 CATCAAGTCCGGTCCCGTGTGACGACGCCACCGCCACCGTCCGGTCCACTGGACAGGACTACCTGGTCCGC
 -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 GCGCTCGGCAAGGCGCAGGTGATCGTCTTCGACCGTGACATCGTGGGCCTGGCCGTCGAAGTGGATACGGGCGTG
 CGGACGCCGTTCCCGCTCCACTAGCAGAAGCTGGCACTGTAGCACCCGGACCGGACGTTGACCTATGCCCGCAC
 -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
 AAAGTGTCCATTAAGGAGTGAGCCGCTGTACACCAACCAGTCAACGGGTCCGGCAGCTAGAGCTACAGTCCG
 -1 E A V I H N T L K G L G D I E I D V R
 -2 K

← **hpaG2**

22876 GGTCACTGGCTGTACATCGACGCGGCCCTCGGGGTTCCGGTGTGATCAGGATGTCCGGCGGTGCAGGGTCATGA
 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 CGTTCACATACAGGCGCAGGCCAGGGCATCGGGGTTGGCCACTTGGCTGGCGGGCACCAGTTCAGGGCCGACCG
 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
 CCGTTTTTGGTAGTGCCGTGAACCGGAAGTACGCTCCCGCCATCATCGACCGAAGCCCGTCCGAGTGAAGCACT
 -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
 GGTCCGCGCCCGCCCAACGTCGCGCAGTGGCGCCGGCCCTTATGGTGGACCGGAAGTACGACCAACGCCACA
 -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
 AGCCCCAGAACTGCTTGTGTGGCCGAACCTGGCGTCAACGAACATGCCACGAAGGTGCTTGGCGGCAACACGA

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
AATTGCTACCAGTTCACCGCGGTACCGCGGACGGCCGTTCCGTTCCGTGGTACCCGGTAGCAGTTGTCCAGT

hpaA →

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

23626 AGCGATTTGCGAGCAAGCAGCCATGAGCGACCGGCATCCGATACCGAACATCAACATTTGGCCAGGTTTACGACCA
TCGCTAAACGCTCGTTCGTGCGTACTCGTGGCCGTAGGCTATGGCTTGTAGTTGTAACCGGTCCAATGCTCGT

+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 GTACATCGAGGCCGGCCGATGTTCTTCTCACGCCACCCACGGTGGCGCACCGGTTTCGTCACCGAAGCTGACAG
CATGTAGCTCCGGCCCGGTACAAGAAGGAGTGCGGTGGGTGCCACCGCGTGCAGCAAGCAGTGGCTTCGACTGTC

+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
CCCGTACGTCCACGTGCGGTGCGACACACCGCGACCCGTTGGACGGCCGGCTTATGTTCCGGCTCCGCGTCCGCGA

+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 GCAAGGCTGGCTGGACGCGTTGAGTGACGAGTTTGCACGCAAGCAACCGGTCGCGAGGCGGCGTTGACGTCGCT
CGTTCCGACCGACTGCCAATCACTGCTCAAACGGTGCCTGCTTGGCCAGCGCTCCGCCGCAACGTCAGCGA

+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 GACCCGCTGATCATGATCAGCCTGCTGCGGCTGTGCCCCAACTCGCTGGAATCGACCCCGGCGGCGATGAAGA
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 CCTGAAGATCTTCCACCGTTTCAATGCCCTGATCGAAGCGCATTACCTTGAGCATTTGGCCGCTGGCCCGTACGC
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
CGTCGCTAACCGCACTGGCTCCGTGCCGACTTGCTACACACGGCCGCTAGCGGCTGAACGGTAGGTTCCGCGA

+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 GGTGCTGGAACGGCTGATGCAGGAGGCCAAGCGTTTGTGCTGTTGTTTTCCGGCAGCACGGCCAACGAAATCTGTTA
CCACGACCTTGGCGACTACGTCTCCGGTTCGCAAACGACAACAAAAGCCGCTGCTGCCGGTTGCTTTAGACAAT

+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 CCAGCTCGGCTTCAAGGATCCGGCCTATTTAGCCGCTTCTTCAACCGCTACGCCAAGCTCACACCCGGGGAGTA
GGTCGAGCCGAAGTTCCTAGGCCGATAAAGTCGGCAAGAAGTTGGCGATGCGGTTTCGAGTGTGGGCCCTCAT

+2 R Q R Q A E L Q **hpaR** →

24526 CCGCCAGCGGCAGGCAAGTTCAGTGAATGGCCATGGCGGCTCACCCGGGTGCTGTTGTTGTTTACAGCGGAT
GGCGGTCGCCGTCCTTAACTCACTTTACCGGTACCGCCGAGTGGGCCACGACAACAACAATGTCCGCTA

24601 GGTGCGACCCCGCGCCGGCTTGAATGGTTTTCCGTTGGAACAGATTGCACTTTCCATCGTGCATGCCCTTAA
CCAGCGTCGGGCGCGGCCGCAACTTACCCAAAAGCCACTTGTCTAACGTGAAAGGTAGCAGTACGGGAATT

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

24676 ATTCGTGAATTGAGAAAAGCCACAGGTTTACCATGACCAAGACGCAACCTTCGCTCAGCTAAGCCTGTTGCA
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
GTACTGGCCCCATGACCCCGGGACCTCGCTCTGCCGACCACGCCCGCTTTCGGCGCGTCTGGTCGCTGC

+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
CCACAAGCAGTCGGACTGGCTTCTCCCTCCGACGAAACGGAGCTACTTCTCCGTACCTCCGGTTGATGGT

+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

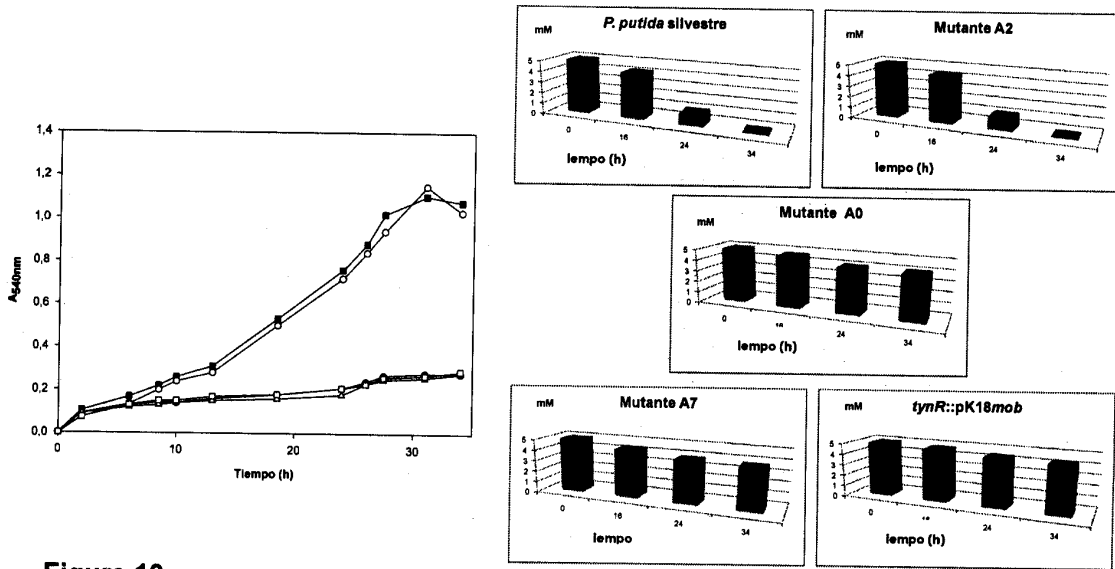


Figura 10

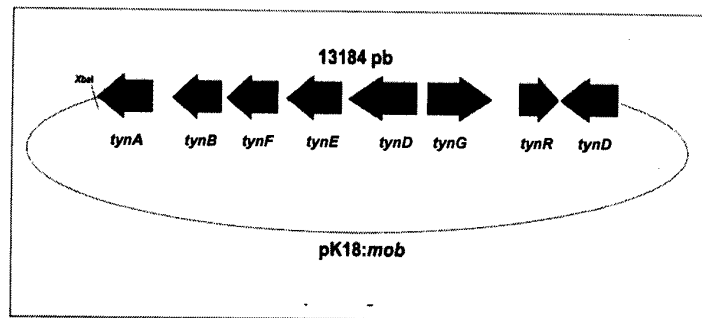


Figura 11

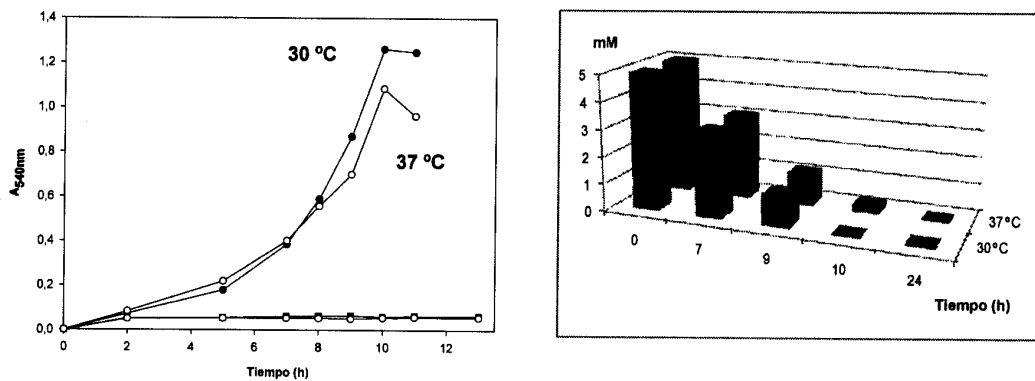


Figura 12

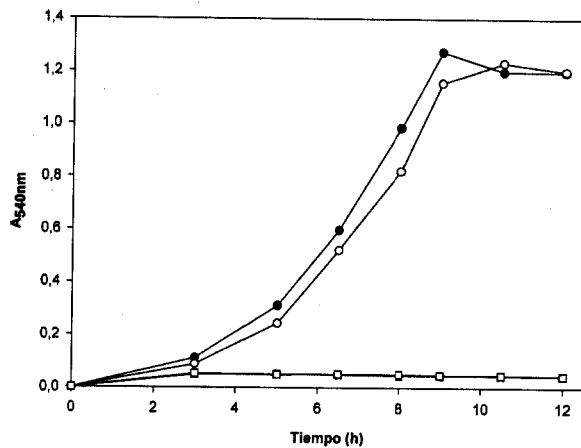


Figura 13

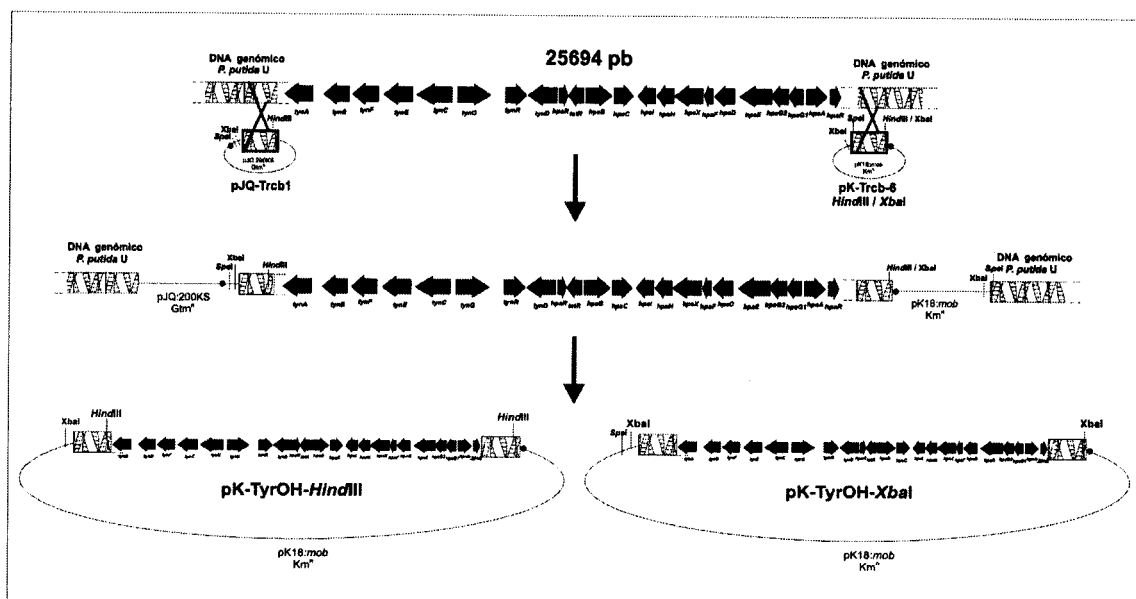


Figura 14

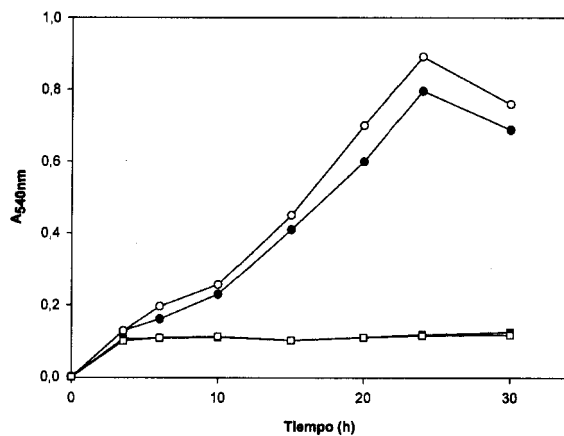


Figura 15

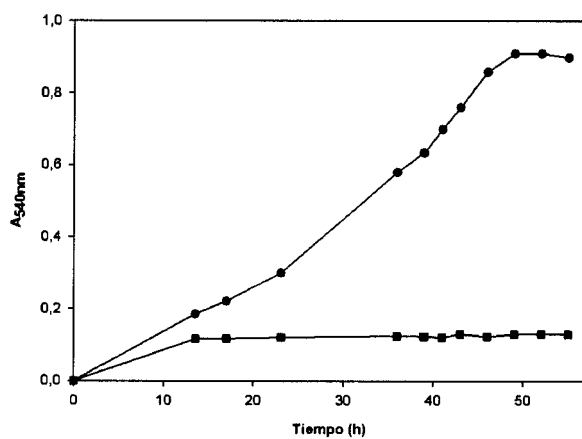


Figura 16

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  cgctcgaagc  ggtaoaggta  cgggtcgcac  agcgggggtg  cctgggccac      60
   caggtctgcc  gccagctggc  cagcagcagg  cgaggtgccc  aagccatgcc  cggaaaagcc     120
   ggtggccagg  gtcaggcccg  gaatactggc  caccgggccc  atgaccgggt  tggagtccgg     180
   ggtgacgtca  atcgtgcccg  cccaggcgct  ggcgatacgg  gcctgttcga  acaccggcca     240
   ggccgctttc  aggttgccga  tggcctcgtc  gttgagggcc  gggttggcgt  gcgggtcttg     300
35   tacccgtaca  cgctcgaagg  gggttacatc  cgttgccctc  cagcgcgggg  ccagggccag     360
   gtccttgaag  aagtacttgc  caaagctgat  gcgcaaaaag  tcccgtctgg  cacgcagctg     420
   gggcaggtaa  cgcttgccca  gcagcaggtg  atcgaggggt  aggaaggcgt  ccagcgcgcc     480
   gcgctgggtg  atgatgtagc  cgccgtcctt  gtgcttgccg  aaggaaaaat  ctggtgccc     540
40   cacggcgatg  tcggttgccc  cgctccatgg  ctctgtgccc  agcacggaac  aggtcagcgg     600
   caaggtcggc  aggttgatgc  ccaggttgcc  gaggaacttg  cgcgaccaca  ggccaccggc     660
   cagcaacacc  tggctcgcagc  ggatttcacc  ttgctcgggt  accaccccgc  tgacacggcc     720
   ggctgcgggt  accagcgtgc  gcaccgcgca  gttctccaat  accactgcac  ctttgccgat     780
   cgccgcccgg  gcgatggcgc  tggcggccag  ggtcgggttg  gcgcggggcg  cggagggggg     840
45   gaagatgcc  cctgcccatt  ccgcccagcc  acccggcacc  atccgggtga  tttcccgcgt     900
   gctcagcagg  cgcgaatcca  ggcccagcgc  ctcgacgctt  ttcagccagc  cttcatgcat     960
   gcccatctgc  gtgtcgttac  ggccgatgaa  catgatgccc  gcttgccgat  agccaacgtc    1020
   gctgccaacc  cgtgcgggca  tctcggccca  cagccgatca  gcgcgagtg  ccaggggaat    1080
50
   gtcatgggcg  tggcgggttg  tcttgccgac  ccagcccagg  ttgocgcgac  actgctcccc    1140
   agcgatgccc  cccttctcca  gcaccaccac  cggtatggtg  cgttoggcga  ggctcagtgc    1200
55   ggcggtgagg  ccgataatgc  cgccaccgat  gatcaccacg  gtagtggcgt  cgggggtggc    1260
   ggtgctggtt  tgcacagggg  cgatcgtggg  agacatggct  ttactctttg  ttgtgctgct    1320
   agggggagtg  ttcagcgcca  gccagcagcc  tcaactggca  aggcggatca  gggtcacttg    1380
   cgcttgcccc  gcaccgcggt  aggcgggtgac  ctccagctcg  accttgtaaa  cggtgagacc    1440
   cagcggcggg  caggtgaccg  tggtgccggg  gtcgatgccc  cggaaactct  cggcgatcac    1500
60   gtccatgacc  cgtggtacat  cggcagggtc  ctggatgaac  acgcgcgagt  tgatgacatc    1560
   ggccaggctg  gcctcgactg  cggccagcgc  ggtttcgatg  ttggcgaaca  cctgggtggg    1620
   ctgttcgatg  acgtcctctg  gaatgacctg  ggtctgcccg  ttgcgtcccg  cgggtgttgg    1680
   gacgtgaatc  cagttgtcca  ccgccaccag  gcgggagtag  ctggccatgg  cttcgaactt    1740
   ggagccggtt  ttcagtttga  tgatctgtgt  catgggcttt  gccttgttat  ccgggtgccc    1800
65   ggatcagctg  agaacggggg  tttcccagag  gttgagcttt  acgcccgatg  cttgctcgag    1860
   cgccttgccg  tacaccacgg  tgccccaggc  cacgtcttcg  acgggcatgc  cgcccaccga    1920
```

ES 2 364 110 A1

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | catcaggatg | atctcgtcgt | catgcaggcg | gcccgggtgcg | tgcgccgtga | tgatcttgcc | 1980 |
| | gatgtcttcc | acctgctcgg | cggccagcgt | gccttcggca | atcatgtcca | tgaagcgcac | 2040 |
| 5 | acctaccagc | ggtacgtggt | tgtgcgcagg | cttgggcagc | tcttcgaacc | aggcctcgta | 2100 |
| | gagggccggtg | ttgtccacca | ccttgccgac | gtcgtcctgc | tccatgccgg | cgtcgatact | 2160 |
| | gcacggggct | ggcatggcca | ggaacgcgcc | aggcttgacc | cactcgcggc | 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 | gcgcgccggg | 2580 |
| 15 | gtcggcatcg | ttgagggtga | acatcaggat | cgagcggggc | aggcctttct | cacggttggc | 2640 |
| | 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 | cgtgattgtt | gttggtttcg | aggcaaccag | 3000 |
| | tttcgctaac | gactggtagg | tcgtcttgtg | tctgcctgcc | agccgagttg | accgtcagtg | 3060 |
| | ccagggtctc | aatggcccgc | gagcgcgaga | ctggccgggg | tgtggcgag | gctgagggtg | 3120 |
| 25 | gtcagcaggc | 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 | caccccgggtg | gcgccaaca | gcaggccgaa | ggcctggggc | 3540 |
| | ctcaggccgt | agtgggcctg | gtacaccagg | gtggcaccgc | cgatgtaggc | gaacaggaag | 3600 |
| | agaataaccg | cagcaaccgc | cagggtcggg | cgcaggaagc | ggcggtcggc | gaggatggcc | 3660 |
| 35 | aggtagggtg | tgcaggcgtg | gcccaggcgc | aggggttcgc | gtttgctggg | cggcagggtt | 3720 |
| | tcgggcaggt | 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 | ggtgtcagagg | ctgggggctg | cggtcgcgcc | cagcgagcac | 4020 |
| | aggatgaaca | gcagcaggcc | ggccagcagc | ggcttgcgcc | ggccataagc | gtcgcagatg | 4080 |
| | gggccgaaga | 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 | atgccgcgca | acaccggcaa | agccgggtgcc | accgagtcgc | 4440 |
| | cttcttcgcg | ggcatgcccg | ctcccacatt | gaccgcagag | gttggttacc | gtggttgcgt | 4500 |
| 50 | cagaacggca | cagccacggg | cagctggcta | tacacattgg | taccattccc | gcccacctgg | 4560 |
| | ttgccgccgt | tgtctctcgtc | cttgcgcggc | tggtaaaggc | ccaccagcgg | gctgattatc | 4620 |
| | aggtgctcgt | tgactgcccc | ttccacatac | aggtccagct | cccgcgcac | gaggttgagg | 4680 |
| | cttctgcggg | tgcgtacggg | gtcgaagtcg | aagtacagcg | cccgcactgt | gagattttcc | 4740 |
| 55 | agcgggtgctg | ccttcacgcc | cacatggtgg | ataccctgtg | tgtgttgaa | ggggccggcg | 4800 |
| | tagttggcag | cgacttcacc | ctggaaccag | gtgccgtaac | cgctggacag | gcccgtgaac | 4860 |
| | agcgcgtccc | agcctgccga | gtagcgggtg | tagcggtagg | taacctgcgg | tgccaccggc | 4920 |
| | aggtcggcga | aggtgtagcc | ggcctgcagg | taccaggctt | gctcggggcc | gtcgggtctt | 4980 |
| | tcctgccagg | cgtattcgaa | ggcgaaactg | gcattgtcga | tgcacagcgt | gccttcgcgg | 5040 |
| 60 | cgacgcctat | acacgtccat | gccttcgcgg | gctttctgaa | agtcgctggc | ccattggctg | 5100 |
| | gtgacgtcga | tgccgtgaat | ccaggtcagc | ccgaggggtg | ccaaggcttg | ggtgtagtcc | 5160 |
| | agcgtgcggc | cggccagttc | ggtttcggcc | tgggcgcggg | tgtcggatct | cagccacagc | 5220 |
| | aggctgccc | gcaggccatc | gctgcccccc | aggtccagca | ttgcgggtgcg | gtcgaaggcg | 5280 |
| | tggcggggcg | ccaggtagta | ggcccccccg | ggctccagcg | caccgtcggc | gacgcgggtg | 5340 |
| 65 | ccagggttcg | ggcgtcgtc | gttgatcaaa | aaaccactgc | ccaggcgaat | ggtctggcgg | 5400 |
| | ccggcgggaaa | cgtccactcc | atccttgccc | agcaccggga | acaggtcggc | cgagcggccag | 5460 |

ES 2 364 110 A1

5 ccgaggaagg cgtcttcgat cttggtggtg cgttcggagc catcgggtgtt gccggccgca 5520
 tcgccatcgc cccaggtggc cgagctcacc cagttcaggc tgccgtacag cgtgccgttg 5580
 ccggccaggc cctggtcacc gctgaggcca tacttgataa agccttcacg ccaggtcгаа 5640
 10 ccccctgtgg 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
 15 tcttgttcgt ggctgccaag gcgcttgcac gccttgcca caggcgcggg cagtagcgga 6000
 tcatcaccga cttgagctcg gtgaagtcat cgatgaaggc cgagccgaac tcgcgccaa 6060
 tgccggaagc cttgatgcc ccaaaccggt cagccgggtc gagcagggtg tgcatgttga 6120
 cccacagggt accggcctgg atttgcggga tcatgcgat ggccctggcc aggtcgttgg 6180
 20 tccacaggct ggcgctgagg ccgtaggggc aggcgttcat cagggtcagc agttcgtctt 6240
 cgtcgtcata aggcaggaag gtcgccacag ggccgaagggt ttccctgggtg agcagggtgt 6300
 cgcaggctga ccggggcagg attaccgtgg gttcgacgaa acagccgggg ccgtcgccca 6360
 gggtgccgcc gtgaatgatc tggctgcctt cggcgcgggc gatggcgaac agttcggcca 6420
 gcttctgctg gtgcggctt tggccaccgg ggcggaactg ggtggcctcg tccagtggcg 6480
 25 agccgatttt cagttggccc aggcgctggg acagggcgtc cagcagcggg tcgatgcgcg 6540
 agcggtgcac atagaagcgc tcgcccgcgg cgcagatttg ccccgagtgc aggaagccgg 6600
 cctcgatgat gccgtccaca gccttgctgg ttgccaactg gggcaggaag gccaccgcgt 6660
 tcttgccgcc cagttccagt gtgcacggg tcagcttggc gcccatggca gcctggccta 6720
 30 cggcgatgcc agtgggcacg gagccgggtg acgagacct gtcggtaact gcgtgctcga 6780
 tcagtgcctt gccaccagg ccaccaccgg tcagcacgtt cagtgcaccg gccggcaggc 6840
 ctgcttcggt ggccagttcg gcaatgcgca gcagcgtcag cgggggtaac tcgctgggct 6900
 tgaggataat gctgcagccg gttgtcagg gcagggccag ctccagatg gcgatcatgc 6960
 35 tggcgaagt tccacggcac atgcccacca ccaocgcaat cggctcgcgc aggtgaaag 7020
 cgctgtagcg ctaccggcg aacgagggca ggcacggggg gatggtctgg ccggtgatct 7080
 tggtcgccc gccggcgtag tagcgcagga agtgcgcggc ctgctgtact tcgaacgcac 7140
 gggaaatgcc gatgagcttg ccgattgca aggtttccag ctgcgccagt tcttcgcggt 7200
 40 tggcttccag caggtcggcc agcttgaaca gcaactgcgg gcggggcggc gggctggtgt 7260
 gcgaccaggc ggtaaagcct tggcgcgagg agctgacggc atggctgaca tcggcctggt 7320
 tggcgtcggc gatgtggggc atggtctggc cgttggccgg gttgaccacg gcaatgctc 7380
 acgacgactg gctggcgagg tgcctggcgt ggatgaacac gccatgctcg cgggccagga 7440
 aggcctgac ggcaggtagg aggggtgatg ogctcatgca gactccgggg cagttggcca 7500
 45 aagtttgca ctttaataagc ggggcagtg ggtgcttgtg cctgcgtgac aggtgcatga 7560
 ctgtggctgc caaccgcaat gggtaagcct tgtgggagcg gccttgtgtc gcgatagggc 7620
 cgcagagcgg ccccgcgat gttggcggcg aagetgaaa tgctggggcc gcttcgcgcc 7680
 cctatcgca cgaaggccg ctcccacaaa aaaagcgagc gtaggcgggg ctgattgctg 7740
 50 gcaggcagca acaagcccgg cggcagccat cggcaagaag ccatgccacc ggcagcgcac 7800
 agtaataact cgttcaacgc cacaaaaaca agccggggca tacgatgtca ctcaataaca 7860
 agctcaccga gcacctcaac cgcggcactg tcggtttccc caccgcaact gccagcactg 7920
 tcgggctgat catggccagc ccgggtgatcc tcaccgcgac catgggcttt ggcatcggcg 7980
 gcagcgcctt cgcctgtggc atggtcatcg ccgcaactgat gatgctggcg cagtcacca 8040
 55 cctttgcccga ggcgtgcgtg atcctgcccga ccacgggctc ggtatacgcac tacatcaact 8100
 gtggcatggg ccgcttcttc gccattaccg gcaogctgtc ggcctacctg atcgtgcatg 8160
 tgttcgcccg taccgcccga accatcctgt cgggggtgat ggcgctgggt aacttcgagc 8220
 acctcaatac cctggcggaa tccgcggcg gttcgtggct gctgggggtg tgcttcgtgg 8280
 60 tggcgtttgc ggtgctcaat gcctttggcg tcagcgcctt cagccgcgcg gaagtggtec 8340
 tcaccttcgg catgtggacc accttgatgg tgttcggcgt gcttggcctg atcgcgcac 8400
 ccgcagtgga actggacggc ccgttcggcg tgcctgctgt gggcaccgac ctgatgacca 8460
 tcctctcgct ggtcggcatg gccatgttca tgttcgttgg ctgcgagttc gtcacgccgc 8520
 ttgccccga actgcgtcgc tcggcctggg tgcctgcgcg ggccatggcg ctgggcctgt 8580
 65 ttggcgtggc cagctgcatg tcatctacg gagcggcgat gaagcggccag gtggaaaacg 8640
 tgggtgctgga tgccgccagt ggcgtgcacc tgctggacac gcccatggcc atcccgcgct 8700
 tcgcccagca ggtgatgggt gatattggcc cagtggtggct gggtatcggc ttctgttctg 8760
 ccggcgcggc caccatcaac acgotgatgg ccggtgtgcc acgcaattct tacggcatgg 8820
 cgggtggacgg cgcgttgccc aagggtgtca cctacctgca cccgcgcttc aagacggccg 8880
 tgctgtgcat cctgggtggtg gcgttgatcc cttgcctgca tgccctggtac ctgggcggca 8940
 acccggacaa catcctgcac ctggtgctgg ccgccgtgtg gcctggagc accgcctacc 9000

ES 2 364 110 A1

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | tgctggtgac | cctgtcgggtg | gtgatattgc | gcateccgccc | cccagacctg | ccgcgtgcct | 9060 |
| | accgctcggc | 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 | cacatcgta | 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 | tgtggccggtt | 10080 |
| | tcgagacgga | acttgcgctc | aatcactcgc | tgttcacg | cgaggtttct | accttttccc | 10140 |
| | gtgccggcctt | gocgctggcc | aacctgcgca | ccaatgccgg | caacatccgc | cggtggggcg | 10200 |
| 25 | aaaaccggac | ccttgacgat | gaccagcatt | gtttcctggt | cagccagcgt | gcggggcatt | 10260 |
| | ccaccgtgtc | ccaggggggc | atgcaggtea | gcctggcgcc | gggtgagctg | ctgctgatgg | 10320 |
| | attcggctcg | gcgctgcgaa | atcaccoccca | gtgggttgat | cgaacatgtc | 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 | caaccggttc | ttcaggagcg | agtcgattac | ctcgattgcc | tacaagtggg | 10860 |
| | ggtttaaccga | ctcggcgcac | ttcagccgct | cgttcaagaa | acagttcgaa | cgctcgccca | 10920 |
| | aggactaccg | ggcgcaggcg | atggtttgag | tgtgatggtg | ctgcttgtgc | gggcctcatc | 10980 |
| | gccggcaagt | cacttggcgg | cggttcagcg | acggcogttg | aagtagcccg | acagctgggtg | 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 | tcaggteccag | cggaagtgc | tcgacgaagg | gcgtggcggc | 11400 |
| | gccaaacagc | aggcggttct | cgcggtgac | ccggtagtag | tcgatcaccg | ggcggatgtc | 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 | aggteacttc | 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 | gtctgttctt | ggcggcggtt | gaagcccatg | tagccatagc | cgtggcagaa | 11940 |
| | gtcggcgtcg | atggcgtagc | gggcgatgcg | gtccttgatg | atgccggcgc | ccagttcgct | 12000 |
| | gatttcgaaa | atatccctca | cgccctgate | accgacgctg | ctgcggatct | tctccaggte | 12060 |
| | gtggccgatg | cccgccatga | tctgcccgc | ggttgcgccc | ctaccgcccgt | agcccagata | 12120 |
| 60 | acggccctcg | agcacgacga | tattggteac | gccttgttcc | gccagctcca | ggcgggtggt | 12180 |
| | aatgccggag | aaaccgccac | cgatcaccac | gacatcggcc | tcgatgtcgc | gttccagggt | 12240 |
| | tgggaagctc | aggttgtact | tcttggtegc | cgagtagtag | gtggggctct | cgagggtgat | 12300 |
| | catgacgccg | cctgctgact | ggaaatgggt | agaaatcatt | ctattaatgt | attaatgatt | 12360 |
| | gtgcactggc | 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 | cgcaagtcgc | 12660 |
| | cggaggacca | gcgccgggtg | 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 |
| | cttgccagggc | cacgctgaac | ccttcgcgta | tgcgctccag | gtactgttca | aagcccgaag | 13080 |
| | tgacaatcgg | cttgatgccc | gccgggggca | ggaacgccgt | gcgcaacacg | aagcgcagtt | 13140 |
| | gggcgagatc | gcgataacgt | tccggccaggt | gcagggccag | ccagtgcccc | gccgccaggc | 13200 |
| | cgtcgcgggc | ttcctgcgca | aagcctgctc | cgacaaaggc | cgtttctctc | acaagcgcac | 13260 |
| 15 | gctggaacac | ctccacgaac | aaggcgtcct | tgttgccgaa | atgcgcatac | agcgatgcct | 13320 |
| | tgcgcatgcc | cgccaactgg | gcgatttctg | tcagcgaaga | ggcgtcataa | ccgtactcgg | 13380 |
| | cgaagtggcc | gacggcggca | tcgcacacac | gcaccgcaga | aggggaaagg | tctttcaaca | 13440 |
| | gcatcactcc | gtcagggggc | cgccggggcc | cgccgctctt | gaggggtgga | ttgtggtgat | 13500 |
| 20 | cgaaaatgca | cgggtcaatg | cttgtcgcaa | ggcaatttcc | gggcgccatg | gaaagtgcaa | 13560 |
| | tgttcccctc | gtaacgtgca | ttcctccacc | caatcgccgc | tcacatactg | atcgctctct | 13620 |
| | cgaatccaat | aagaaagaga | ccgctcatga | aaaagccaaa | ccccctgctg | gaagacctga | 13680 |
| | agtcgctcct | gcccaccatt | gcccaccaatg | ccatgcgtgc | agagcaggac | cgcagtgtgc | 13740 |
| | cggcagagaa | tatcgccttg | ctgaaaagca | tccgcatgca | ccgcgctttc | ttgcccaaac | 13800 |
| 25 | acttcggcgg | catggaaatc | accctgccgg | agttcgccca | gtgcatcgcc | ttgctggcgg | 13860 |
| | gggcctgcgc | cagcacagcc | tgggccaatg | gcctgctgtg | caccacagc | caccagatgg | 13920 |
| | caatgttctc | gcccgaagct | caacaggagg | tgtggggtag | cgaccgggat | gctaccgcca | 13980 |
| | gcagcagtat | cgcgcgcttc | ggccgcactg | aagaggttga | gggtggcgtg | tcgttcagcg | 14040 |
| 30 | gcgaaatggg | ctggagtctc | ggttcgcacc | acgcogaatg | ggcgattctc | ggtttccgcc | 14100 |
| | gcaagaatgc | cgaaggcgct | caggattact | gcttcgccat | cctgcctcgc | agtgtactatg | 14160 |
| | aaatccgtga | tgactggtat | gccgtgggca | tgcgcggcag | cggcagcaag | accctgatcg | 14220 |
| | tgcgtgatgc | cttcgtgccc | gagcacgcga | tccagaaggc | caaggacatg | atggagggca | 14280 |
| | agtcggcggg | ctttggtttg | taccocgaca | gcaagatttt | cttcgccccg | tatcgcccgt | 14340 |
| 35 | atthttgccag | cggcttctcc | acggtcagct | tgggcgttgc | cgagcgcgatg | ctggaggtgt | 14400 |
| | tccgcgagaa | aaccgcgaac | cgcgtgcgtg | cctacacccg | tgtgcctg | ggcgcgccca | 14460 |
| | ccccggcgtc | gatgcgcctg | gccgagtoga | cccatcaggt | ggccgctgcc | cgggcattgc | 14520 |
| | tggaaaagag | ctgggacgag | attgccgagc | acagtgcccg | tcacgaatac | ccgtcgcgtg | 14580 |
| 40 | gcacgctggc | gttctggcgt | accaaccagg | gctacgccgt | gaagatgtgc | atccaggccg | 14640 |
| | tcgaccgcct | gatggaagcg | gccggtggtg | gocctggtt | cgagagcaac | gaactgcagc | 14700 |
| | ggctgttccg | cgattcgcac | atgaccgggtg | cccatgccta | caccgattac | gacgtgtgtg | 14760 |
| | cgcaaatcct | cggccgcgag | ctgatgggcc | tggagcctga | cccggcgatg | gtctgagccg | 14820 |
| | ccacttgtht | 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 | cgccgctgat | cctgtggagc | 15060 |
| | atcgacaagc | gctccaccag | ccatgaagtg | ttogaagagg | cctcgcactt | tgccgtgaac | 15120 |
| 50 | tttgcgggta | cggaccagat | cgacctgtcc | aacaactttg | cccgccgaa | ggaagatcgc | 15180 |
| | tttgcgggta | tcgactacga | gaccggcact | ggcggcgcgc | cgttgttcgc | cgattgcgcg | 15240 |
| | gocgcctttg | agtgtgaaaa | gtaccagcag | ctggacggtg | gcgatcactg | gatcctggtg | 15300 |
| | ggcaaggtag | tggcctttga | tgactttggc | cgctcgcgcg | tgctgtatca | ccagggcgcc | 15360 |
| | tattcaatgg | tgtgcgcgca | taccgcgatg | acccaaggcg | cagaggggca | ggcaccgagc | 15420 |
| 55 | agccacttcc | agggccgcct | gcagcacaac | ctgtaactacc | tgatgaccca | ggcgtgcgtg | 15480 |
| | gcctaccagg | ctgactacca | gccacgccag | ctgtgtaocg | gootgocgac | 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 | agccocgcga | tcagcaccgt | 16080 |

ES 2 364 110 A1

ggtatccaca cccaccgcca caaacgccgc acccagctcg atgtagcgtc gcgccagttt 16140
 ctcgctccgcg ctgagaatgc cggcggcttt gcccgcttg ccaatgcgca cgattgcgtc 16200
 ttcaatcgcc gcctgcacct ccgggtgcc ggggttgccg cgatgcccc tggccgact 16260
 5 caggtctgca ggcccgatga acacgccatc cacaccttc actgcaacga tctcgctccag 16320
 gttggccagg ccttccctgt tctcgatctg caccagcagg cacatttgct catcggcgtg 16380
 gtccaggtaa ccggggaggg tgttccagcg cgaagcccgc gccagcgcgc tgcccacccc 16440
 gcgaatgccc ttgggagggt aatgcatggc cttgaccagt tgccgcgcct gttcggcagt 16500
 10 ttccaccatc ggcaccagca aggtttgtgc gccgatatcc agcacctgct tgatcagcgc 16560
 ggtatcgccg atcaccgggc ggatcactgc ctggctgggg tagggtgcca ccgcctgcaa 16620
 ctgggcgagc atgcccgcga ggtcgttggg cgcgtgttcg ccgtcgatca gcagccagtc 16680
 gaaaccggca ttgcccgcca gctcggcgca gtaggcatcg gccaggcca gccacaggcc 16740
 caggtcctta aacgaagcgg caggcgatgg agccgagcat gtcgtagtcg acgtggaagg 16800
 15 tgtcacctgg gcgagcggcg accggcggg tgaaccgaacc ccaaggatg atctggccgg 16920
 gctgcaagggt gacgtcgtae ggcgccagtt tgttggccag ccaggcaacg ccttggccg 16980
 ggtggttgag cacggcagcg ctgaccccgg attcctcgat cacgccattg cggtagagca 17040
 20 ccgcccggcac tttgcgcagg tcgatttcgg tggggcgcac ggcccggccg cccatcacca 17100
 cgccggcatt ggcggcgctt tccgagatgg tgtcgaacac cttgcccggg gcctgggttt 17160
 gcgggtccac ctgctggatg cgcgcgtcaa tgatttcag cgcgggatc acccactcgg 17220
 tggcgtccag cacatcaaac acggtgatgt tggggccctt cagcggcttg ccgaggatga 17280
 acgccaactc cacttcaacc cgcggcacga tgaagcgtc gaaggggatg tgcgtgcctt 17340
 25 cgtcgaacag catgtcgtcg agcaaggcgc cgtagtcggg ctcggtgatg ttcgacgata 17400
 cctgcatggc gcgcgaggtc aggccgatct tgtggcccac cagcttgcgc ccggcggcga 17460
 tcttttttgc caccaggcg cgtcggatgg cgtaggcgtc ttcgatggtg attgccggtt 17520
 gctccagcga gaactggcgc acttgctcgc gggagcgttc ggccctggtcg aggcggtcgg 17580
 30 cggcgtgctg gatgaaagcg ttgtctagca tggggcggg ctcttgattc aagggtgac 17640
 gatggcagcc tgggtgcgca acaccagcag gccgcccagg gcgatgaaga cggcgagtac 17700
 gtacagagca aggctggcgc tgtgggtggt gtcgcgcacc cagccgatga agtagggcgt 17760
 gaagaacgag gcgatgctgc ccagcagct gatcagggca atgcccggcg cctgggtacg 17820
 35 ggcgttgagg aacgcggcg gcagttgcca gaacatcggc agcgcagcgc tggcggccat 17880
 gccggccagc accaggccgg ccattaccgg cagcgcctgc tcgggggcaa tggccgcaat 17940
 agcgtgccc atggcagcca tcagcagcg taagcagcag tgccagcggc gttcgcgttg 18000
 gcggtcgtg gagcggccc acgccagcat gaacacgag ccggccacgt accgcacagc 18060
 gctgagcagg ccgacactgg cgtcgtggtc cacaccggca ctgtgaatca ggtgggcat 18120
 40 ccagaacgca agggattca ccgccagcat caccgcgcaa tacacggcca ccaacagcca 18180
 cagcgcacgg cttgcaaaa tggcgcgcaa cgaggttacg ggcttgcgtt gttcttctc 18240
 accgaattgc gcgcgagcg tggctttctg ctgctcatcc agccagctca cccgctcga 18300
 gtgctccggc aaaacggcca gtaccaccag gccagcaac accaccggcg ccccttcgag 18360
 45 caggaacatc cactgccagc cacgcagccc gccctgtctg tgcataagg ccagtatggc 18420
 cccggacact ggcccggcga ccaactccggc caacggcag gcaatggcga acagcgcgt 18480
 gacctggcg cggcggccc ccgggtacca gcggttgagg taaaccagaa tgcccgggaa 18540
 gaaccggcc tcggccgcgc ccagggcaaa gcgcaacagg tagaacgcgc tgcgtctttc 18600
 50 gatcagcagc atgctggtcg acaacagccc ccacaccacc atcaggcagg cgatccagcg 18660
 gcgtgggcca acgcggtcga gcatcaggtt gctggggagc ccgaacagcg cataggcaat 18720
 gaagaacagc ccggcaccca ggccatagac cgtgtcggac aaatgcaggt cctggctcat 18780
 ctgcatcttg gcgaagccaa tgttgatgag gtccaggtg gcgaacaggt agcacaccag 18840
 cagcagcggc atcagcccgc aggtgactgc ccgatgggta ctgtcggccc gttcaacgtg 18900
 55 tgcctcgcgc ggcgaggctt gttcagatgt gctcatgttt ttgtacttat tctgtaatga 18960
 gtcggggagg gcgtggtttg agccggcgcg ctagcggttg aacagtgggt gcaaggtgct 19020
 gtgcttggcg tcgtagacct gggcgggtgct gtggtcgate tgcacgggtga tgccgatcgg 19080
 gcgctgttgc agcaagtgggt ccaggcgcgc tttcaact ggcagcaagc tgtcggccc 19140
 60 tgttttgtgc acctcggcgc tacggccggt agccatgcgc aggttggcgt acagaagcc 19200
 gtattgcctt ttgcccgcgc ccaccgcgca atggggcgcg gggtaggcca gcacgcgtg 19260
 accgccagtg gggaaacagg ctttgcttc ggcatcgcgc tgttcgagca tgggtgcggc 19320
 cagggcggcg cacaggccgg ggatgtcggc gtcggtttcc aggtcggggg tatagagcag 19380
 aaccaggtgt ggcattgggg cctcctcggg gagggcgggc tggccaccgg ccaggcgagc 19440
 65 cagccgcgaa cgggtgggtt acaggcggct ggtgggcacc accggcggcg ggttggcggc 19500
 ctgggcagcg gggatggcac caccgtcctg cggggtgacc ggaagatcg cgttgatctg 19560
 gccgggtgccg gaagagccga agtagggcgt gaccacttcg gccttgcctg cgtaatcgga 19620

ES 2 364 110 A1

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|-------|
| | ccagcccagc | gcacccagca | gcattgccc | gtcgtgcatg | aagccttcac | cgtggccttt | 19680 |
| | ggcggcgtac | tccggcagca | tcccgcagaa | cgcttcccac | tgcgccctct | gccacatttg | 19740 |
| | caccacacgg | tggctgaggg | tttcgaggaa | cgggctccac | accttggtgg | caaagtccgg | 19800 |
| 5 | cgcttgccg | ttctgcccga | agcggtgcca | cagcgagccg | ctggccagga | acgccacggt | 19860 |
| | gccgtcgtag | tggctcttct | ctgccttgcc | catggcccag | cccaggccgg | cactgtcggc | 19920 |
| | caggtagtgc | gaggtgcaca | gggcccagac | cgagaccact | ttgaagtgtc | ggtcctgggt | 19980 |
| | catgtagcgc | atgggcacca | gggtgccgta | ttccggggcg | agggtggtgg | cgtggggggc | 20040 |
| 10 | catggtttcg | acgttgaagc | ggttgcactc | ctcggccagc | agcttgccca | gctcgggatt | 20100 |
| | gccggggaat | gcgtagggca | tgttgctgat | gaagtgcggc | agttcgttgc | tgggtgtacac | 20160 |
| | gccctcgaaa | tgcggcccgc | acagcaoctg | gtagttggcg | ttgaccagcc | agtgcgtgtc | 20220 |
| | gaacacgacg | atggtgtcca | cgcccagctc | acggcaacgg | cggtctgatt | cgtgatgccc | 20280 |
| | gtcgtatggc | gcctggcgaa | agccttggcg | cgggcctggc | agttcggaca | tgtacatgga | 20340 |
| 15 | cggtacatgg | gtaatcttgg | cagtgcagagc | gagtttgccc | atgggggtct | ccgataagac | 20400 |
| | gctgtttgtg | ttttggggct | gacccggctc | cttgtaggag | cgcccttggt | ccgggatggg | 20460 |
| | gcgcacagcg | gccccggcga | tatctgcccg | gaggtgaaa | tccaggggcc | gctgcgcgcc | 20520 |
| | ccatcgcggg | cacaaggccg | ctctacacc | cgggcggtgt | aaaccgcaca | gagggttaga | 20580 |
| 20 | tgccccagcg | aggaatgtgg | tgattaccca | tggaaataca | cacgttcttg | atctctgcaa | 20640 |
| | agacctcgaa | gctgtactgc | ccgccctcac | gcccggtagc | ggaacctttc | acgccgccga | 20700 |
| | acggctggcg | caggtcgcgt | acgttctggc | tgttgatgaa | cacatgcccg | gcctcgtatc | 20760 |
| | cacgggccag | gcgatgggct | ttgcgatgtg | cctgggtcca | gatgtacgag | gccaggccat | 20820 |
| | actcgggtgc | gttggccagt | tgcagcgcct | cggcttcgtc | cttgaacggg | atcaggcaca | 20880 |
| 25 | ccaccggggc | aaagatttct | tccctgggca | tgcgcactct | gttggtcacg | tccggcaata | 20940 |
| | cggtgggctg | gatgaactgc | cccttggcca | ggtgcgcagg | caggttggcc | gggcgctcca | 21000 |
| | ggccccgggc | gaccaggcgt | gcaocttctt | cgatgccaat | gcggtatgac | ccggtgacct | 21060 |
| | tgtcatagtg | ctgctgggtg | atcatogaac | cgacctgggt | tttcgggtcg | gtcgggtcac | 21120 |
| 30 | ctacgatcag | gcgcttggcg | cgcgccgcaa | actctgcgac | aaactgcggg | tacacgcttt | 21180 |
| | cctggatgaa | gatgcggctg | ccggcgggtg | agcgtctccc | gttcagcagc | aagatgggtg | 21240 |
| | acagcgcggc | gtccagcgca | cgctcaaggt | ctcgcctctc | gaagatcagc | acggggcact | 21300 |
| | tgcgccccag | ttccatcgag | tactttttaa | ggcctgcggg | ctgcatgac | ttcttgcggg | 21360 |
| | tggcggtagc | gccggtgaag | gaaatggcgc | gcacatcggg | gtggcggacc | agggcatcgc | 21420 |
| 35 | cgccggtagc | gccgtaacct | tggatcacgt | tcagcacccc | gttgggggat | ccggtctcta | 21480 |
| | ccgccaggcg | gcccagttcg | ttggcgggca | gaggcgacag | ctcgcctcat | ttcagcacgg | 21540 |
| | cggtgttgcc | cagcgcaggc | caaggcgcag | tcttccaggt | agccgtcatg | aacggcacgt | 21600 |
| | tccatgggct | taccaggccg | cacacaccca | ccggtgggta | caggtgtgag | ttgagcatct | 21660 |
| 40 | ggtcgtcgac | cggttaggta | tggcgcgtca | tgcgcgtgca | cacttcggcg | aagaagtcca | 21720 |
| | agttgtgcga | ggcacgcggg | atcagcacgt | tcttgggtct | gtggatcggc | aggccggtgt | 21780 |
| | cgagggtttc | cagctcggcg | agtttcggca | cgcttctgct | aatcagctca | cccagcttgc | 21840 |
| | gcatcagccg | ggcacgttcc | ttggccgggg | tgttgggcca | cttgggggag | gcttccttgg | 21900 |
| | ccgcagccac | agcctggggc | acttcctcgg | cgccgcggct | ggcgacttcg | cagatggcgt | 21960 |
| 45 | cgccgggtgg | cgggttgtag | ttgacgaagg | tgtctttgct | ctcgacctca | cggccgttga | 22020 |
| | tccagtgctt | gatcatgctg | ctcatgcctt | gttgttcttg | aagaagtccg | cttcgctgac | 22080 |
| | gatacggttg | accaggcgac | cgacgccttc | cacttccacc | accacttcgt | caccggccac | 22140 |
| | cacatcggcc | aggccttctg | gcgtgcccgt | ggcgatcatg | tgcgccggtt | gcagggctcat | 22200 |
| 50 | gaagctggag | aagtattcga | tgaggtgcgg | gatgtcgaag | atcatgtccg | cggtggtgcc | 22260 |
| | ttctgcttcc | agctcaccgt | tgatccaggt | gocagccttc | aggttgctga | cgtctggcac | 22320 |
| | atcggccgca | tcgacgatcc | acgggcccag | cgggggtggt | gcacgcgggt | ttttcaccgg | 22380 |
| | caggttgggg | cggtagttag | tttccaggta | gtcgcgggat | gcgtagtctg | tgacacgggt | 22440 |
| | gtagccggca | acgtaggcca | gggcgtctcc | acgcttgacg | ttcttcggcc | ctttgccgat | 22500 |
| 55 | caccgccacc | agctcgcact | cgtagtgcat | gtattcgacg | ttgtccgggg | gccaggtgac | 22560 |
| | ctggatgtgg | ccggtgtagg | tgcctggcga | cttgatgaaa | gccaacgggt | cggtgggccc | 22620 |
| | cgcaaggccc | agctccctgg | cggtgtcggc | gtagttcagg | cccagggcga | acatgctgcc | 22680 |
| | ggtggcgggt | ggcagccagg | tgacctggtc | ctgatggacc | aggcggccgt | cggcaaggcg | 22740 |
| 60 | caggtgatcg | tcttcgaccg | tgacatcgtg | ggcctggccg | togaactgga | tacgggctgt | 22800 |
| | tttcacaggt | aattcctcac | tcggcgacga | tgtggttggg | cagcttgccc | aggcctcga | 22860 |
| | tctcgtatgc | gacgcgggtc | cctggctgta | catcgacgcg | 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 gttgacgatg gtgtagcccc ccacatgctc cagggcatcg gccacgctga 23220
cgcggtggc gtccttgcca atcaccactc ccagcgccgg gccgggttgc acgcgctgca 23280
cgccggccgg gaataaccacc tggccttcat gctggttgcg ggtgttcggg gtcttgacga 23340
acaacaccgg cttgaccggc agttgcttgt acggtgcttc cacgaacgcc gcttgggtgct 23400
5 gctgcagcaa accctggtag ttcagcgcga cgccgaacag ggtgccgctg gcaacgtcaa 23460
gcagggcatg gtcctatgctc ttctcctggc agtgcagggc ggtggccgctc ctgcggtattt 23520
cgttaatgtg 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 gccggggccga tgttcttctc 23880
cacgccaccc acggtggcgc acgcgttcgt caccgaagct gacagcgacg ggcatgtgct 23940
15 gacggtgcmc cagcaactgg tgtggcaatt gatcgaagcc gacgccagcc tgctgccggc 24000
gggcatgcag gtgcagccag cctgtgtggc gctgggcaac ctgccggccg aatacaaggc 24060
cgaggcgcag cgcctgcaag gctggctgga cgcgttgagt gacgagtttg ccacgcagca 24120
accgggtcgc gaggcggcgt tgcagtgcgt gaccgcgctg atcatgatca gcctgctgcg 24180
20 gctgtgcccc aactcgtgg aatcgacccc ggccggcat gaagacctga agatcttcca 24240
ccgtttcaat gccctgatcg aagcgcatta ccttgagcat tggccgctgg ccgctacgc 24300
gcagcagatt ggcgtgaccg aggcacggct gaacgatgtg tgccggcgca tcgccgactt 24360
gccatccaag cgcctggtgc tggaaacggct gatgcaggag gccaaagcgtt tgctgttggt 24420
25 ttccggcagc acggccaacg aaatctgtta ccagctcggc ttcaaggatc cggcctatct 24480
cagccgcttc ttcaaccgct acgccaagct cacaccggg gagtaccgcc agcggcaggc 24540
agaattgcag tgaatggcc atggcggctc acccgggtgc tgttgttggt tacagcggat 24600
ggtgcagacc cgcgcgccgg gcttgaatgg gttttccgtg gaacagattg cactttccat 24660
cgtgcatgcc cttaaattcg tgaattgaga aaaagccaca ggtttgacca tgaccaagac 24720
30 gcaaccttcg ctacgcgtaa gcctgttga ggcccagaaa gccgcgatgg cttttttcag 24780
gccgctggtg aaccagcacg acctgaccga gcagcaatgg cgggtaatcc gcatcctcaa 24840
gcagcacggc gagctggaga attatcagtt ggcggaactg gcctgcatcc tcaagccgag 24900
catgaccggg gtactggggc gcctggagcg agacgggctg gtgcggcggc agaaggccgc 24960
35 gcaggaccag cgacgggtgt tcgtcagcct gaccgaaaga ggggaggcgt gctttgcctc 25020
qatqaaqaa qgcatggagg ccaactacca gaagattcag gcgcagtttg gtgaagagaa 25080
gctgcagcag ctgatgggtg tgttgaatga cctgaagcgc atcgcgcat 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 cgggtcgatc agcgggggtgg cctgggcccac 60
caggtctgcc gccagctggc cagcagcagg cgaggtgccg aagccatgcc cggaaaagcc 120
ggtggccagg gtcaggcccg gaatactggc caccgggccc atgaccgggt tggagtcggg 180
ggtgacgtca atcgtgccgg cccaggcgcg ggcgatacgg gcctgttcga acaccggcca 240
ggcgcctttc aggttgogca tggcctcgtc gttgagggcc gggttggcgt gcgggtcttq 300
60 taccctgaca cgctcgaagg gggttacatc cgttgcttc cagcgcgggg ccagggccag 360
gtccttgaag aagtaacttc caaagctgat gcgcaaaaag tcccgcgtgg cagcagctg 420
gggcaggtaa cgcttgccca gcagcaggtg atcgagggtg aggaaggcgt ccagcgcgcc 480
gcgctgggtg atgatgtagc cgcogtccct gtgcttgccg aaggaaaaat ctggtgcgcc 540
cacggcgatg tcggttggcc cgtccatggg ctctgtgcgc agcacggaac aggtcagcgg 600
caaggtcggc aggttgatgc ccaggttgcc gaggaacttg cgcgaccaca ggccaccggc 660
65 cagcaacacc tggctgcagc ggatttcacc ttgctcgggtg accaccccgc tgacacggcc 720
ggctgcggtg accagcgtgc gcaccgcgca gttctccact accactgcac ctttggcqtat 780

```

ES 2 364 110 A1

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| | cgccgccccg | gcgatggcgc | tggcggccag | ggtcggttcg | gcgcgggcgt | cggagggggt | 840 |
| | gaagatgccca | cctgoccaa | ccgcccagacc | accgggcacc | atccgggtga | ttccccgcgt | 900 |
| | gctcagcagg | cgcgaaatcca | ggcccagcgc | ctcgacgctt | ttcagccagc | cttcatgcat | 960 |
| 5 | gcccattctgc | gtgtcgttac | ggccgatgaa | catgatgccg | gcttgccgat | agccaacgtc | 1020 |
| | gctgccaacc | cgtgcgggca | tctcggccca | ccagccgatca | gccgccagt | ccaggggaat | 1080 |
| | gtcatgggcg | tggcggttgg | tcttgccac | ccagcccag | ttgcccagc | actgctcccc | 1140 |
| | agcgatgcgc | cccttctcca | gcaccaccac | cggatggtg | cgttcggcga | ggctcagtgc | 1200 |
| | ggcggtgagg | ccgataatgc | cgccaccgat | gatcaccacg | gtagtggcgt | cggggtggcg | 1260 |
| 10 | ggtgctggtt | tgcacagggg | cgatcgtggg | agacatggct | ttactctttg | ttgtgcgtgc | 1320 |
| | agggggagt | ttcagcgcca | gccagcagcc | tactggcca | aggcggatca | gggtcacttg | 1380 |
| | cgcttgcccc | gcaccgcggt | aggcggtgac | ctccagctcg | accttgtaaa | cggtggagcc | 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 | ttgcgtccgg | cggtgttggg | 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 | cgtagatact | 2160 |
| | gcacggggct | ggcatggcca | ggaacgcgcc | aggcttgacc | cactcgcggc | gcaccagcgg | 2220 |
| | gtactggctg | gggtcggcga | cttcgcccga | gctgcagtag | ctgaccaggt | cggaaccgcg | 2280 |
| | taccacttct | tccagggttt | ccaccacctg | gacatgagtg | atctgcggga | agtggtttt | 2340 |
| 30 | caccagggcg | acgaaggcat | ccaggttctt | ctggccacgg | cccttgacct | tgagggtgtc | 2400 |
| | gatcagcggg | cagacggcca | tgaacgcagc | gaccgtggtc | ttgcccata | cccccgggcc | 2460 |
| | ggccaggccg | atcaccttgg | cgctcttgcg | cgccaggtgg | cgggcgcgca | cgccccggat | 2520 |
| | ggcgcgggtg | cggtaggccg | acagcaggtt | ggccgacatg | tgtgccagt | gcgcgcgggt | 2580 |
| 35 | gtcggcatcg | ttgaggggtg | acatcaggat | cgagcggggc | aggcctttct | cacggttggc | 2640 |
| | gatgttcgag | ccgtaccact | tggcgcctgc | ggtctggaag | ttgccgcgca | ggtacgcggg | 2700 |
| | catcgccatc | atgcgccggt | cgccgggtgg | cttgggcatg | ttggggaatg | gcgagtgctc | 2760 |
| | ggggaaggta | atcatcgcgc | cgtgcgagtc | gctgttcggg | ccggccatgc | ggtagtcacc | 2820 |
| | ctggtacagc | aggccgaaca | tttcttccat | ggtgtcgaca | caggccggca | tgtcggtgac | 2880 |
| 40 | 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 | gcccaggcgc | aggggttcgc | gtttgctggg | cggcagggtt | 3720 |
| | tcgggcaggt | tcagcaggct | gttgaccagc | accgtcacgc | ccatgccggc | gagtaccagc | 3780 |
| | attactgcac | gccagccgaa | atgtgcgtcg | atcacgcgc | ccagggcagg | tgccaggatc | 3840 |
| | ggtgcgacgc | cttcgatggt | catcagcagg | gcgaacagtt | tggtcgcggc | cacgccttgg | 3900 |
| 60 | ctcacatcac | gcaccatgct | catgatcacc | accagggtea | gcgcaactgc | caggccctgg | 3960 |
| | aaaaagcgc | gcatgatcag | ggtgtcgagg | ctgggggctg | cggtgcgcc | cagcgagcac | 4020 |
| | aggatgaaca | gcagcaggcc | ggccagcagc | ggcttgcgcc | ggccataagc | gtcagcagtg | 4080 |
| | gggcccgaaga | tcagctggcc | ggcggccatg | gccagcagga | agaaggtcag | tgtcagctgt | 4140 |
| | acgcgggtga | agctagcctg | atagtggtg | 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 | gccaaggtca | 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 | gcccactgaac | 4860 |
| | agcgcgtccc | agcctgccga | gtagcgggtg | tagcggtagg | taacctgcgg | tgcccacggc | 4920 |
| | aggtcggcga | aggtgtagcc | ggcctgcagg | taccaggctt | gctcggggcc | gtcgggtctg | 4980 |
| | tcctgcccag | cgtattcgaa | ggcgaaactg | gcattgtcga | tgccagcgtt | gccttcgcgg | 5040 |
| 15 | cgcacgctat | acacgtccat | gccttcgcgg | gctttctgaa | agtcgctggc | ccattggctg | 5100 |
| | gtgacgtcga | tgccgtgaat | ccaggctcagc | ccgaggggtgc | ccaaggcttg | ggtgtagtcc | 5160 |
| | agcgtgccgg | cggccagttc | ggtttcggcc | tgggcgcggg | tgctcggattt | cagccacagc | 5220 |
| | aggtcggcat | gcaggccatc | gctgcccccc | agggcgcagca | ttgcgggtgcg | gtcgaaggcg | 5280 |
| 20 | tggcggggcg | ccaggtagta | ggccccgccg | cggtccagcg | caccgtcggc | gacgccggtg | 5340 |
| | cccaggttcg | ggcgtcgtc | gttgatcaaa | aaaccactgc | ccaggcgaat | ggtctggcgg | 5400 |
| | ccggcggaaa | cgtccactcc | atccttgccc | agcaccggga | acaggctcggc | cgagcggcag | 5460 |
| | ccgaggaagg | cgtcttcgat | cttgggtggtg | cgttcggagc | catcgggtgtt | gcccggccgca | 5520 |
| | tcgccatcgc | cccagggtggc | cgagctcacc | cagttcaggc | tgccgtacag | cgtgccggtt | 5580 |
| 25 | ccggccaggc | cctggtcacc | gctgaggcca | tacttgataa | agccttcacg | ccaggctgaa | 5640 |
| | ccccctgtgg | tgccgtcgtg | gttcttcgcg | ctggtgaaca | tgccccatac | cgccagcatg | 5700 |
| | tcggcgttca | ggtggctgtc | atcgtcggcg | tacagctcaa | cgccggcgcg | ggcctggctg | 5760 |
| | gccagcaagg | ttgccagggc | caggctggac | agcgtctgtg | gtttgaccat | ttgcacatcc | 5820 |
| 30 | ctcgtttgtt | ctcggccacc | ttcacagggg | cctttgttgg | tcgggggcac | cctcggttct | 5880 |
| | ggcgaggggc | catcgcgggt | ggcggcgatg | gcctattagg | gcgtgtgcgg | tggggcgggg | 5940 |
| | tcttgttcgt | ggctgccaag | gcgcttgcac | gccttgcca | caggcgcggg | cagtagcgga | 6000 |
| | tcacaccoga | cttgagctcg | gtgaagtcat | cgatgaaggc | cgagccgaac | tcgcgccaa | 6060 |
| | tgccggaagc | cttgatgccc | ccaaacggta | cagccgggtc | gagcaggggtg | tgcatgttga | 6120 |
| 35 | cccacagggg | accggcctgg | atctgcggga | tcagtcgcat | ggccttgccc | aggtcgttgg | 6180 |
| | tccacagggc | ggcgtgagg | ccgtagggcg | aggcgttcat | cagggtcagc | agttcgtctt | 6240 |
| | cgctgtcata | aggcaggaag | gtcgccacag | ggccgaagg | ttcctgggtg | agcaggggtg | 6300 |
| | cgcaggctga | ccgggcgagg | attaccgtgg | gttcgacgaa | acagccgggg | ccgtcgccca | 6360 |
| 40 | gggtgcccgc | gtgaatgate | ttggtgcctt | cggcgcgggc | gatggcgaac | agttcggcca | 6420 |
| | gcttctgctg | gtgcggcctg | ttggccacgg | ggccgaactg | ggtggcctcg | tcagtgggcg | 6480 |
| | agccgatttt | cagttggccc | agggcgtggg | acagggcgtc | cagcagcggg | tcgatgcgcg | 6540 |
| | agcgggtgac | atagaagcgc | tcgcccgcgg | cgcagatttg | ccccgagtgc | aggaagccgg | 6600 |
| 45 | cctcogatgat | gccgtccaca | gccttgcgg | tgccacgtc | gggcaggaag | gccaccgcgt | 6660 |
| | tcttgcccgc | cagttccagt | gtcgcaacgg | tcagcttggc | gcccattggca | 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 | cggtctgcgc | aggggtgaagg | 7020 |
| | cgctgtagcg | ctcaccggcg | aacgagggca | gcgacggggg | gatggtctgg | ccggtgatct | 7080 |
| | tggtcgcccc | gcccggcgtg | tagcgcagga | agtgcgcggc | ctgctgtact | tcgaacgcac | 7140 |
| 55 | gggaaatgcc | gatgagcttg | ccggattgca | agtttccag | ctgcgccagt | tcttcgcggg | 7200 |
| | tggcttccag | caggctcggcc | agcttgaaca | gcaactgcggc | gcgggcggcg | gggctggtgt | 7260 |
| | gcgaccaggc | ggtaaagcct | tggcgcgagg | agctgacggc | atggtcgaca | tcggcctggt | 7320 |
| | tggcgtcggc | gatgtggggc | atggtctggc | cgttggccgg | gttgaccacg | gcaatgttcg | 7380 |
| | acgacgactg | gctggcgagg | tgctggccgt | ggatgaacac | gccatgctcg | cgggcccagga | 7440 |
| 60 | aggccgtgac | ggcaggtagg | agggtgatgt | 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 | gtagggccggg | ctgattgctg | 7740 |
| | gcaggcagca | acaagcccgg | cggcagccat | cggcaagacg | ccatgccacc | ggcagcgcac | 7800 |
| | agtaatcact | cgttcaacgc | cacaaaaaca | agccggggca | tacgatgtca | ctcaataaca | 7860 |

ES 2 364 110 A1

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | agctcaccga | gcacctcaac | cgcggaactg | tgggtttccc | caccgcaactg | gccagcaactg | 7920 |
| | tcgggctgat | catggccagc | ccgggtgatcc | tcaccgcgac | catgggcttt | ggcatcggcg | 7980 |
| | gcagcgcctt | cgccgtggcc | atgggtcatcg | ccgcaactgat | gatgctggcg | cagtcocacca | 8040 |
| 5 | cctttgccga | ggctgctcg | atcctgcca | ccacgggctc | ggtatacgac | tacatcaact | 8100 |
| | gtggcatggg | ccgtttcttc | gccattaccg | gcacgctgtc | ggcctacctg | atcgtgcatg | 8160 |
| | tgttcgccgg | taccgcccga | accatcctgt | cggggggat | ggcgtggtg | aacttcgagc | 8220 |
| | acctcaatac | cctggcggaa | tccgcccggc | gttcgtgget | gctgggggtg | tgcttcgtgg | 8280 |
| | tggcgtttgc | ggtgctcaat | gcctttggcg | tcagcgcctt | cagccgcgcg | gaagtgggtcc | 8340 |
| 10 | tcaccttcgg | catgtggacc | accttgatgg | tgctcggcgt | gcttggcctg | atcgcgcgac | 8400 |
| | ccgcagtgga | actggacggc | ccgttcggcg | tgctcgtggt | gggcaccgac | ctgatgacca | 8460 |
| | tcctctcgct | ggtcggcatg | gccatgttca | tgctcgttgg | ctgcgagttc | gtcacgccgc | 8520 |
| | ttgccccga | actgcgtcgc | tcggcctggg | tgctgcccgc | ggccatggcg | ctgggcctgt | 8580 |
| 15 | ttggcgtggc | cagctgcatg | ttcatctacg | gagcggcgat | gaagcggccag | gtggaaaacg | 8640 |
| | tggtgctgga | tgccgccagt | ggcgtgcacc | tgctggacac | gcccattggc | 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 | cctggtggtg | gcgttgatcc | cttgccctgca | tgccctggtac | ctgggcccga | 8940 |
| | accgggacaa | catcctgcac | ctggtgctgg | ccgcccgtgtg | cgccctggagc | accgcctacc | 9000 |
| | tgctggtgac | cctgtcgggtg | gtgatattgc | gcacccgccc | cccagacctg | ccgcgtgcct | 9060 |
| | accgctcgcc | gctgttcccg | ttgcccgaga | tattctccag | tagcgggtatc | ctcactggca | 9120 |
| 25 | tggcgttcat | cacaccggcg | ggcatgaacc | ctgcccagtg | 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 | gctatcggcc | aggcgcaccg | ctggcatgcc | tgccgcgcaa | cctggggcag | 9420 |
| 30 | cagaacctgg | tggcggccgg | ggtgatccac | gaccgcggcc | agggttggca | ggccacgggtg | 9480 |
| | cacgaacgcg | tcgaggccca | cctgctgatg | cacatcgtca | cctgtgagtt | ccagctgcag | 9540 |
| | ttgcctgctc | cgcaaggggg | cgaggtcagc | ctggagctgc | gccataccgg | tgcccttcgc | 9600 |
| | cgctgcccgg | tggcctgtgt | gtaccgcaag | ggcgaccggg | cgcccttcgc | ccgactgcgc | 9660 |
| 35 | gaccggttgc | tgccagcagg | cgcaactggt | ggcgcgctga | tgccgctgga | tttcaagcgc | 9720 |
| | ctgaccttgg | cctggcgcga | cgcccaatgg | ttgctgacct | tgagcacat | gggcccgtagc | 9780 |
| | gaagtgggtca | accgcatgcc | agcgtttcgc | cgctacatcc | ccatcagccc | gcaacagcgg | 9840 |
| | gcccacctga | tggccagcct | ggcccagttc | aacactttgc | tacctaacct | ttgacgcaaa | 9900 |
| 40 | ctggcatacg | ccttgctgta | tcaagcgacg | aatgatgaca | gttggtgcga | catagataac | 9960 |
| | atgttaacaa | tgtgcgcata | acaacaaatc | ctgctgcgag | ggcagccatg | catactcaac | 10020 |
| | aatccaaccg | tcaggggctg | gaacgctgga | ccacggccat | gcaacagatc | tgtggccggt | 10080 |
| | tcgagacgga | acttgctgct | aatcaactgc | tgctcatcgg | cgaggtttct | accttttccc | 10140 |
| | gtgcccggct | gcccgtggcc | aacctgcgca | ccaatgcggg | caacatccgc | cggtggggcg | 10200 |
| 45 | aaaaccggac | ccttgacgat | gaccagcatt | gtttcctggt | cagccagcgt | gcccggcatt | 10260 |
| | ccaccgtgtc | ccaggggggc | atgcaggtca | gcccgtggcc | gggtgagctg | ctgctgatgg | 10320 |
| | attcggctcg | gcgctgcgaa | atcaccccga | gtgggttgat | cgaacatgtc | tcgctggccc | 10380 |
| | tgtcgcgtga | gcaggtacgc | aagtatgtgc | aaggcagcgg | cccgatgttt | ggcaagatct | 10440 |
| 50 | cctcgagcaa | cgccctgcgg | cgcatgctgc | atgtgctgat | ggaccaactg | tgcaaggacg | 10500 |
| | gcaatgtaag | cggtgatggg | gcccagggcg | acgcgctgca | gaccgccttc | attgccctgc | 10560 |
| | tggagccagg | cctcgagcgc | catggcgaag | cgctgggcaa | ccttggggcc | ttgaacgggg | 10620 |
| | ccaacctgcy | gggctacgtg | cagcaggtga | tcgacgagtc | cctgtcacag | cccgggctga | 10680 |
| | ccccgtccaa | cctggccggg | cgccgaaca | tctcgggtcg | tcacctgtac | cgctgttcg | 10740 |
| 55 | aggaggaggg | cgatagtgtg | tgccgctaca | ttcagcgggc | gcccctgaag | cgcagtgccg | 10800 |
| | atgacctggc | caaccgcttc | ttcaggagcg | agtcgattac | ctcgattgcc | tacaagtggg | 10860 |
| | ggtttaccga | ctcggcgcac | ttcagccgct | cgttcaagaa | acagttcgaa | cgctcgccca | 10920 |
| | aggactaccg | ggcgcagggc | atggtttgag | tgtgatgggtg | ctgcttgtgc | gggcctcatc | 10980 |
| 60 | gcccggcaagt | cacttgccgg | cggttcagcg | acggccgctt | aagttagccc | acagctgggtg | 11040 |
| | cacggtcttg | ccggcagtg | gcagcagcgg | gcccgaatgg | tccttgccga | ggatgcgcgc | 11100 |
| | atgcttgacc | gagctgacca | ggtcatagcg | cctcgatccc | tcctgcatac | cctcggcgag | 11160 |
| | tatcttgcaa | atgatgtggc | tgggctgac | gcccgaagcc | gagtagccct | gcacatagaa | 11220 |
| | agcgttgggg | cggttgtcga | gggtgcctat | ctgcccgaac | aggttggcac | tggtggccat | 11280 |
| 65 | cgggccgccc | caggccaggt | cgatgcgcac | gtctttcagg | taggggaaaa | tcttcagcat | 11340 |
| | cagcgcgcgg | ttccacgcct | tcaggtccag | cggggaagtgc | 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 gcgtgctgct 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
gtcggcgtcg atggcgtagc gggcgatgcg gtccttgatg atgccggcgc ccagttcgcct 12000
gatttcgaaa atatccctca cgccctgatc accgacgctg ctgcggatct tctccaggtc 12060
gtggccgatg cccgccatga tctgcccgcc gttgcgcccg ctaccgccgt 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 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 gtg Ser Thr Arg Glu Ile Thr Arg Met Val | ctg agc acg cgg gaa atc acc cgg atg gtg Ser Thr Arg Glu Ile Thr Arg Met Val | ctg agc acg cgg gaa atc acc cgg atg gtg Ser Thr Arg Glu Ile Thr Arg Met Val | ccg ggt ggt cgg Pro Gly Gly Arg | 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 | gac gcc cgc gcc gaa 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 672 |
| 35 | Leu Gly Ile 225 | gac atc aac ctg ccg acc ttg ccg ctg acc tgt tcc gtg ctg cgc Gly Ile Asn Leu Pro Thr Leu Pro Leu Thr Cys Ser Val Leu Arg | gac atc aac ctg ccg acc ttg ccg ctg acc tgt tcc gtg ctg cgc Gly Ile Asn Leu Pro Thr Leu Pro Leu Thr Cys Ser Val Leu Arg | gac atc aac ctg ccg acc ttg ccg ctg acc tgt tcc gtg ctg cgc Gly Ile Asn Leu Pro Thr Leu Pro Leu Thr Cys Ser Val Leu Arg | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 912 |
| 60 | Phe Gly Lys 305 | gag 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 | gag 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 | gag 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 960 |
| 65 | Ala Thr Asp 325 | gat gta acc ccc ttc gag cgt gta cgg gta caa gac ccg cac Thr Asp 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 Asp 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 Asp Val Thr Pro Phe Glu Arg Val Arg Val Gln Asp Pro His | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 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 | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 1056 |
| 75 | tgg ccg gtg 345 | tcc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc ggc acg ccg gtg ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc ggc acg | tcc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc ggc acg ccg gtg ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc ggc acg | tcc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc ggc acg ccg gtg ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc ggc acg | gac gcc cgc gcc gaa Ala Arg Ala Glu | 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 | |
| 10 | Tyr | Gly | Ser | Asn | Ile | Ala | Asn | Arg | Glu | Lys | Gly | Leu | Pro | Arg | Ser | Ile |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| 15 | Leu | Met | Phe | Thr | Leu | Asn | Asp | Ala | Asp | Thr | Gly | Ala | Pro | Leu | Ala | His |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| 20 | Met | Ser | Ala | Asn | Leu | Leu | Ser | Ala | Tyr | Arg | Thr | Gly | Ala | Ile | Pro | Gly |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| 25 | Val | Gly | Ala | Arg | His | Leu | Ala | Arg | Lys | Asp | Ala | Lys | Val | Ile | Gly | Leu |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| 30 | Ala | Gly | Pro | Gly | Val | Met | Gly | Lys | Thr | Thr | Val | Ala | Ala | Phe | Met | Ala |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| 35 | Val | Cys | Pro | Leu | Ile | Asp | Thr | Leu | Lys | Val | Lys | Gly | Arg | Gly | Gln | Lys |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| 40 | Asn | Leu | Asp | Ala | Phe | Val | Ala | Trp | Val | Lys | Thr | Ser | Phe | Pro | Gln | Ile |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| 45 | Thr | His | Val | Gln | Val | Val | Glu | Thr | Leu | Glu | Glu | Val | Val | Arg | Gly | Ser |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | | 220 | | | |
| 50 | Asp | Leu | Val | Ser | Tyr | Cys | Ser | Ser | Gly | Glu | Val | Gly | Asp | Pro | Ser | Gln |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| 55 | Tyr | Pro | Leu | Val | Arg | Arg | Glu | Trp | Val | Lys | Pro | Gly | Ala | Phe | Leu | Ala |
| | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| 60 | Met | Pro | Ala | Pro | Cys | Ser | Ile | Asp | Ala | Gly | Met | Glu | Gln | Asp | Asp | Val |
| | | | 260 | | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| 65 | Arg | Lys | Val | Val | Asp | Asn | Thr | Gly | Leu | Tyr | Glu | Ala | Trp | Phe | Glu | Glu |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| 70 | Leu | Pro | Lys | Pro | Ala | His | Asn | His | Val | Pro | Leu | Val | Gly | Val | Arg | Phe |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| 75 | Met | Asp | Met | Ile | Ala | Glu | Gly | Thr | Leu | Ala | Ala | Glu | Gln | Val | Glu | Asp |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| 80 | Ile | Gly | Lys | Ile | Ile | Ser | Gly | Asp | Ala | Pro | Gly | Arg | Leu | His | Asp | Asp |
| | | | | 325 | | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| 85 | Glu | Ile | Ile | Leu | Met | Ser | Val | Gly | Gly | Met | Pro | Val | Glu | Asp | Val | Ala |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| 90 | Trp | Gly | Thr | Val | Val | Tyr | Arg | Lys | Ala | Leu | Glu | Gln | Gly | Ile | Gly | Val |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| 95 | 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 gcc aag ctc atc gcc 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 gcc 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 | | 385 | | | | 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 | | | | | 495 | | |

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

ctg cag acc gcc ttc att gcc ctg ctg gag cca ggc ttc gag cgc cat 576
 Leu Gln Thr Ala Phe Ile Ala Leu Leu Glu Pro Gly Phe Glu Arg His
 180 185 190
 5
 ggc gaa gcg ctg ggc aac ctt ggg gcc ttg aac ggg gcc aac ctg cgg 624
 Gly Glu Ala Leu Gly Asn Leu Gly Ala Leu Asn Gly Ala Asn Leu Arg
 195 200 205
 10
 ggc tac gtg cag cag gtg atc gac gag tcc ctg tca cag ccc ggg ctg 672
 Gly Tyr Val Gln Gln Val Ile Asp Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Leu
 210 215 220
 15
 acc ccg tcc aac ctg gcc ggt cgc ctg aac atc tcg gtg cgt cac ctg 720
 Thr Pro Ser Asn Leu Ala Gly Arg Leu Asn Ile Ser Val Arg His Leu
 225 230 235 240
 20
 tac cgg ctg ttc gag gag gag ggc gat agt gtg tgc cgc tac att cag 768
 Tyr Arg Leu Phe Glu Glu Glu Gly Asp Ser Val Cys Arg Tyr Ile Gln
 245 250 255
 25
 cgg gcg cgc ctg aag cgc agt gcg gat gac ctg gcc aac ccg ttc ttc 816
 Arg Ala Arg Leu Lys Arg Ser Ala Asp Asp Leu Ala Asn Pro Phe Phe
 260 265 270
 30
 agg agc gag tcg att acc tcg att gcc tac aag tgg ggg ttt acc gac 864
 Arg Ser Glu Ser Ile Thr Ser Ile Ala Tyr Lys Trp Gly Phe Thr Asp
 275 280 285
 35
 tcg gcg cat ttc agc cgc tcg ttc aag aaa cag ttc gaa cgc tcg ccc 912
 Ser Ala His Phe Ser Arg Ser Phe Lys Lys Gln Phe Glu Arg Ser Pro
 290 295 300
 40
 aag gac tac cgg gcg cag gcg atg gtt tga 942
 Lys Asp Tyr Arg Ala Gln Ala Met Val
 305 310

<210> 10

<211> 313

<212> PRT

<213> *Pseudomonas putida* U

<400> 10

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

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

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

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 |
| 65 | 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
10    355                               360                               365
      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
20    405

```

<210> 15

<211> 1311

<212> DNA

25 <213> *Pseudomonas putida* U

<220>

<221> CDS

30 <222> (1)..(1311)

<223> TynE

35 <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 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

| | | |
|----|--|------|
| 5 | gac gcc ttc ctc ggc tgg cgc tcg gcc gac ctg ttc ccg gtg ctg ggc Asp Ala Phe Leu Gly Trp Arg Ser Ala Asp Leu Phe Pro Val Leu Gly | 384 |
| | 115 120 125 | |
| 10 | aag gat gga gtg gac gtt tcc gcc ggc cgc cag acc att cgc ctg ggc Lys Asp Gly Val Asp Val Ser Ala Gly Arg Gln Thr Ile Arg Leu Gly | 432 |
| | 130 135 140 | |
| 15 | agt ggt ttt ttg atc aac gac gac ggc ccg aac ctg ggc aac ggc gtc Ser Gly Phe Leu Ile Asn Asp Asp Gly Pro Asn Leu Gly Asn Gly Val | 480 |
| | 145 150 155 160 | |
| 20 | gcc gac ggt gcg ctg gac cgc ggc ggg gcc tac tac ctg gcc gcc cgc Ala Asp Gly Ala Leu Asp Arg Gly Gly Ala Tyr Tyr Leu Ala Ala Arg | 528 |
| | 165 170 175 | |
| 25 | cac gcc ttc gac cgc acc gca atg ctg cgc ctg ggg ggc agc gat ggc His Ala Phe Asp Arg Thr Ala Met Leu Arg Leu Gly Gly Ser Asp Gly | 576 |
| | 180 185 190 | |
| 30 | ctg cat ggc agc ctg ctg tgg ctg aaa tcc gac aac cgc gcc cag gcc Leu His Gly Ser Leu Leu Trp Leu Lys Ser Asp Asn Arg Ala Gln Ala | 624 |
| | 195 200 205 | |
| 35 | gaa acc gaa ctg gcc gcc ggc acg ctg gac tac acc caa gcc ttg ggc Glu Thr Glu Leu Ala Ala Gly Thr Leu Asp Tyr Thr Gln Ala Leu Gly | 672 |
| | 210 215 220 | |
| 40 | acc ctc ggg ctg acc tgg att cac ggc atc gac gtc acc gac caa tgg Thr Leu Gly Leu Thr Trp Ile His Gly Ile Asp Val Thr Asp Gln Trp | 720 |
| | 225 230 235 240 | |
| 45 | gcc agc gac ttt cag aaa gcc cgc gaa ggc atg gac gtg tat agc gtg Ala Ser Asp Phe Gln Lys Ala Arg Glu Gly Met Asp Val Tyr Ser Val | 768 |
| | 245 250 255 | |
| 50 | cgc ggc gaa ggc aac gct ggc atc gac aat gcc agt ttc gcc ttc gaa Arg Gly Glu Gly Asn Ala Gly Ile Asp Asn Ala Ser Phe Ala Phe Glu | 816 |
| | 260 265 270 | |
| 55 | tac gcc tgg cag gac aag acc gac ggc ccc gag caa gcc tgg tac ctg Tyr Ala Trp Gln Asp Lys Thr Asp Gly Pro Glu Gln Ala Trp Tyr Leu | 864 |
| | 275 280 285 | |
| 60 | cag gcc ggc tac acc ttc gcc gac ctg ccg tgg gca ccg cag gtt acc Gln Ala Gly Tyr Thr Phe Ala Asp Leu Pro Trp Ala Pro Gln Val Thr | 912 |
| | 290 295 300 | |
| 65 | tac cgc tac acc cgc tac tcg gca ggc tgg gac gcg ctg ttc agc ggc Tyr Arg Tyr Thr Arg Tyr Ser Ala Gly Trp Asp Ala Leu Phe Ser Gly | 960 |
| | 305 310 315 320 | |
| 70 | ctg tcc agc ggt tac ggc acc tgg ttc cag ggt gaa gtc gct gcc aac Leu Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Trp Phe Gln Gly Glu Val Ala Ala Asn | 1008 |
| | 325 330 335 | |
| 75 | tac gcc ggc ccc ttc aac agc aac acg ggt atc cac cat gtg ggc gtg Tyr Ala Gly Pro Phe Asn Ser Asn Thr Gly Ile His His Val Gly Val | 1056 |
| | 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

```

<210> 16

<211> 436

<212> PRT

<213> *Pseudomonas putida* U

<400> 16

```

35  Met Val Lys Pro Gln Thr Leu Ser Ser Leu Ala Leu Ala Thr Leu Leu
    1          5          10          15

40  Ala Ser Gln Ala Ala Pro Ala Val Glu Leu Tyr Ala Asp Asp Asp Ser
    20          25          30

45  His Leu Asn Ala Asp Met Leu Ala Val Trp Gly Met Phe Asn Ser Arg
    35          40          45

50  Lys Asn Tyr Asp Gly Thr Thr Gly Gly Ser Thr Trp Arg Glu Gly Phe
    50          55          60

55  Ile Lys Tyr Gly Leu Ser Gly Asp Gln Gly Leu Ala Gly Asn Gly Thr
    65          70          75          80

60  Leu Tyr Gly Ser Leu Asn Trp Val Ser Ser Ala Thr Trp Gly Asp Gly
    85          90          95

65  Asp Ala Ala Gly Asn Thr Asp Gly Ser Glu Arg Thr Thr Lys Ile Glu
    100         105         110

70  Asp Ala Phe Leu Gly Trp Arg Ser Ala Asp Leu Phe Pro Val Leu Gly
    115         120         125

75  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

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | ccg | ttc | ggc | gtg | tcg | ctg | gtg | ggc | acc | gac | ctg | atg | acc | atc | ctc | tcg | 624 |
| | Pro | Phe | Gly | Val | Ser | Leu | Val | Gly | Thr | Asp | Leu | Met | Thr | Ile | Leu | Ser | |
| 5 | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| | ctg | gtc | ggc | atg | gcc | atg | ttc | atg | ttc | ggt | ggc | tgc | gag | ttc | gtc | acg | 672 |
| | Leu | Val | Gly | Met | Ala | Met | Phe | Met | Phe | Val | Gly | Cys | Glu | Phe | Val | Thr | |
| 10 | | 210 | | | | | 215 | | | | 220 | | | | | | |
| | ccg | ctt | gcc | ccc | gaa | ctg | cgt | cgc | tcg | gcc | tgg | gtg | ctg | ccg | cgg | gcc | 720 |
| | Pro | Leu | Ala | Pro | Glu | Leu | Arg | Arg | Ser | Ala | Trp | Val | Leu | Pro | Arg | Ala | |
| 15 | | | | | 230 | | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| | atg | gcg | ctg | ggc | ctg | ttt | ggc | gtg | gcc | agc | tgc | atg | ttc | atc | tac | gga | 768 |
| | Met | Ala | Leu | Gly | Leu | Phe | Gly | Val | Ala | Ser | Cys | Met | Phe | Ile | Tyr | Gly | |
| 20 | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| | gcg | gcg | atg | aag | cgc | cag | gtg | gaa | aac | gtg | gtg | ctg | gat | gcc | gcc | agt | 816 |
| | Ala | Ala | Met | Lys | Arg | Gln | Val | Glu | Asn | Val | Val | Leu | Asp | Ala | Ala | Ser | |
| 25 | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| | ggc | gtg | cac | ctg | ctg | gac | acg | ccc | atg | gcc | atc | ccg | cgc | ttc | gcc | gag | 864 |
| | Gly | Val | His | Leu | Leu | Asp | Thr | Pro | Met | Ala | Ile | Pro | Arg | Phe | Ala | Glu | |
| 30 | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| | cag | gtg | atg | ggt | gat | att | ggc | cca | gtg | tgg | ctg | ggt | atc | ggc | ttc | ctg | 912 |
| | Gln | Val | Met | Gly | Asp | Ile | Gly | Pro | Val | Trp | Leu | Gly | Ile | Gly | Phe | Leu | |
| 35 | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| | ttc | gcc | ggc | gcg | gcc | acc | atc | aac | acg | ctg | atg | gcc | ggt | gtg | cca | cgc | 960 |
| | Phe | Ala | Gly | Ala | Ala | Thr | Ile | Asn | Thr | Leu | Met | Ala | Gly | Val | Pro | Arg | |
| 40 | | 305 | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| | att | ctt | tac | ggc | atg | gcg | gtg | gac | ggc | gcg | ttg | ccc | aag | gtg | ttc | acc | 1008 |
| | Ile | Leu | Tyr | Gly | Met | Ala | Val | Asp | Gly | Ala | Leu | Pro | Lys | Val | Phe | Thr | |
| 45 | | | | 325 | | | | | | | 330 | | | | 335 | | |
| | tac | ctg | cac | ccg | cgc | ttc | aag | acg | ccg | ctg | ctg | tgc | atc | ctg | gtg | gtg | 1056 |
| | Tyr | Leu | His | Pro | Arg | Phe | Lys | Thr | Pro | Leu | Leu | Cys | Ile | Leu | Val | Val | |
| 50 | | | | 340 | | | | | | 345 | | | | 350 | | | |
| | gcg | ttg | atc | cct | tgc | ctg | cat | gcc | tgg | tac | ctg | ggc | ggc | aac | ccg | gac | 1104 |
| | Ala | Leu | Ile | Pro | Cys | Leu | His | Ala | Trp | Tyr | Leu | Gly | Gly | Asn | Pro | Asp | |
| 55 | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| | aac | atc | ctg | cac | ctg | gtg | ctg | gcc | gcc | gtg | tgc | gcc | tgg | agc | acc | gcc | 1152 |
| | Asn | Ile | Leu | His | Leu | Val | Leu | Ala | Ala | Val | Cys | Ala | Trp | Ser | Thr | Ala | |
| 60 | | | | 370 | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| | tac | ctg | ctg | gtg | acc | ctg | tcg | gtg | gtg | ata | ttg | cgc | atc | cgc | cgc | cca | 1200 |
| | Tyr | Leu | Leu | Val | Thr | Leu | Ser | Val | Val | Ile | Leu | Arg | Ile | Arg | Arg | Pro | |
| 65 | | | | 385 | | | 390 | | | | 395 | | | | | 400 | |
| | gac | ctg | ccg | cgt | gcc | tac | cgc | tcg | ccg | ctg | ttc | ccg | ttg | ccg | cag | ata | 1248 |
| | Asp | Leu | Pro | Arg | Ala | Tyr | Arg | Ser | Pro | Leu | Phe | Pro | Leu | Pro | Gln | Ile | |
| 70 | | | | 405 | | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| | ttc | tcc | agt | agc | ggt | atc | ctc | atc | ggc | atg | gcg | ttc | atc | aca | ccg | ccg | 1296 |
| | Phe | Ser | Ser | Ser | Gly | Ile | Leu | Ile | Gly | Met | Ala | Phe | Ile | Thr | Pro | Pro | |
| 75 | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |

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 ggc 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
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
50
Phe Ala Val Ala Met Val Ile Ala Ala Leu Met Met Leu Ala Gln Ser
      50      55      60
45
Thr Thr Phe Ala Glu Ala Ala Ser Ile Leu Pro Thr Thr Gly Ser Val
65      70      75      80
50
Tyr Asp Tyr Ile Asn Cys Gly Met Gly Arg Phe Phe Ala Ile Thr Gly
      85      90      95
55
Thr Leu Ser Ala Tyr Leu Ile Val His Val Phe Ala Gly Thr Ala Glu
      100      105      110
60
Thr Ile Leu Ser Gly Val Met Ala Leu Val Asn Phe Glu His Leu Asn
      115      120      125
65
Thr Leu Ala Glu Ser Ala Gly Gly Ser Trp Leu Leu Gly Val Cys Phe
      130      135      140
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 | |
| | | | | | | 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 | |
| | | | | | | 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 | |
| | | | | | | 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
    20                      355                      360                      365
    Asp Val Cys Ala Gln Ile Leu Gly Arg Glu Leu Met Gly Leu Glu Pro
    25                      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 | | |
| 15 | Arg | Lys | Val | Gly | Val | Thr | Ala | Asn | Ser | Phe | Asn | Ser | Val | Ser | Leu | Asp |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| 20 | Pro | Ala | Leu | Ile | Leu | Trp | Ser | Ile | Asp | Lys | Arg | Ser | Thr | Ser | His | Glu |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| 25 | Val | Phe | Glu | Glu | Ala | Ser | His | Phe | Ala | Val | Asn | Ile | Leu | Ala | Ala | Asp |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| 30 | Gln | Ile | Asp | Leu | Ser | Asn | Asn | Phe | Ala | Arg | Pro | Lys | Glu | Asp | Arg | Phe |
| | | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| 35 | Ala | Gly | Ile | Asp | Tyr | Glu | Thr | Gly | Thr | Gly | Gly | Ala | Pro | Leu | Phe | Ala |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| 40 | Asp | Cys | Ala | Ala | Arg | Phe | Glu | Cys | Glu | Lys | Tyr | Gln | Gln | Leu | Asp | Gly |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| 45 | Gly | Asp | His | Trp | Ile | Leu | Val | Gly | Lys | Val | Val | Ala | Phe | Asp | Asp | Phe |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| 50 | Gly | Arg | Ser | Pro | Leu | Leu | Tyr | His | Gln | Gly | Ala | Tyr | Ser | Met | Val | Leu |
| | 145 | | | | 150 | | | | | | 155 | | | | | 160 |
| 55 | Pro | His | Thr | Arg | Met | Thr | Gln | Gly | Ala | Glu | Gly | Gln | Ala | Pro | Ser | Ser |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| 60 | His | Phe | Gln | Gly | Arg | Leu | Gln | His | Asn | Leu | Tyr | Tyr | Leu | Met | Thr | Gln |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| 65 | Ala | Leu | Arg | Ala | Tyr | Gln | Ala | Asp | Tyr | Gln | Pro | Arg | Gln | Leu | Cys | Thr |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| 70 | Gly | Leu | Arg | Thr | Ser | Glu | Ala | Arg | Met | Leu | Met | Val | Leu | Glu | Asn | Asp |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| 75 | Ala | Gly | Leu | Ser | Leu | Asn | Asp | Leu | Gln | Arg | Glu | Val | Ala | Met | Pro | Ala |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| 80 | Arg | Glu | Ile | Glu | Glu | Ala | Val | Ala | Asn | Leu | Lys | Arg | Lys | Gly | Leu | Ile |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| 85 | Ala | Asp | Asp | Glu | Gly | Arg | Val | Arg | Leu | Ser | Val | Lys | Gly | Val | Asp | Glu |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| 90 | Thr | Glu | Ala | Leu | Trp | Thr | Ile | Ala | Arg | Gln | Gln | Gln | Asp | Lys | Val | Phe |
| | | | 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 140 | Lys | Val | Val | Ser |
| 20 | Val 145 | 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 180 | Ala | Ser | Gly | Ser | Leu | Ser 185 | His | Arg | Phe | Ala | Gln 190 | Asn | Gly |
| 30 | Gln | Ala | Pro 195 | Asp | Phe | Ala | Thr | Lys 200 | Val | Trp | Ser | Pro | Phe 205 | Leu | Glu | Thr |
| 35 | Leu 210 | Asp | His | Arg | Val | Val | Gln 215 | Met | Trp | Gln | Asp | Gly 220 | Glu | Trp | Glu | Ala |
| | Phe 225 | 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 255 | Asp |
| 45 | Tyr | Asp | Gly | Lys 260 | Ala | Glu | Val | Val | Thr 265 | Pro | Tyr | Phe | Gly | Ser 270 | Ser | Gly |
| | Thr | Gly | Gln 275 | Ile | Asn | Ala | Ile | Phe 280 | Pro | Val | Thr | Pro | Gln 285 | Asp | Gly | Gly |
| 50 | Ala 290 | Ile | Pro | Ala | Ala | Gln | Ala 295 | Ala | Asn | Pro | Ala | Ala 300 | 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 | gcg 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

| | | |
|----|---|------|
| | gcc acc ggc aag aag atc atg cag acc gca ggc ctt aaa aag tac tcg | 720 |
| | Ala Thr Gly Lys Lys Ile Met Gln Thr Ala Gly Leu Lys Lys Tyr Ser | |
| | 225 230 235 240 | |
| 5 | atg gaa ctg ggc ggc aag tcg ccc gtg ctg atc ttc gaa gac gca gac | 768 |
| | Met Glu Leu Gly Gly Lys Ser Pro Val Leu Ile Phe Glu Asp Ala Asp | |
| | 245 250 255 | |
| 10 | ctt gag cgt gcg ctg gac gcc gcg ctg ttc acc atc ttc tcg ctg aac | 816 |
| | Leu Glu Arg Ala Leu Asp Ala Ala Leu Phe Thr Ile Phe Ser Leu Asn | |
| | 260 265 270 | |
| 15 | ggc gag cgc tgc acc gcc ggc agc cgc atc ttc atc cag gaa agc gtg | 864 |
| | Gly Glu Arg Cys Thr Ala Gly Ser Arg Ile Phe Ile Gln Glu Ser Val | |
| | 275 280 285 | |
| 20 | tac ccg cag ttt gtc gca gag ttt gcg gcg cgc gcc aag cgc ctg atc | 912 |
| | Tyr Pro Gln Phe Val Ala Glu Phe Ala Ala Arg Ala Lys Arg Leu Ile | |
| | 290 295 300 | |
| 25 | gta ggt gac ccg acc gac ccg aaa acc cag gtc ggt tcg atg atc acc | 960 |
| | Val Gly Asp Pro Thr Asp Pro Lys Thr Gln Val Gly Ser Met Ile Thr | |
| | 305 310 315 320 | |
| 30 | cag cag cac tat gac aag gtc acc ggg tac atc cgc att ggc atc gaa | 1008 |
| | Gln Gln His Tyr Asp Lys Val Thr Gly Tyr Ile Arg Ile Gly Ile Glu | |
| | 325 330 335 | |
| 35 | gaa ggt gca cgc ctg gtc gcc ggg ggc ctg gag cgc ccg gcc aac ctg | 1056 |
| | Glu Gly Ala Arg Leu Val Ala Gly Gly Leu Glu Arg Pro Ala Asn Leu | |
| | 340 345 350 | |
| 40 | cct gcg cac ctg gcc aag ggg cag ttc atc cag ccc acc gta ttc gcc | 1104 |
| | Pro Ala His Leu Ala Lys Gly Gln Phe Ile Gln Pro Thr Val Phe Ala | |
| | 355 360 365 | |
| 45 | gac gtg aac aac aag atg cgc att gcc cag gaa gaa atc ttt ggc ccg | 1152 |
| | Asp Val Asn Asn Lys Met Arg Ile Ala Gln Glu Glu Ile Phe Gly Pro | |
| | 370 375 380 | |
| 50 | gtg gtg tgc ctg atc ccg ttc aag gac gaa gcc gag gcg ctg caa ctg | 1200 |
| | Val Val Cys Leu Ile Pro Phe Lys Asp Glu Ala Glu Ala Leu Gln Leu | |
| | 385 390 395 400 | |
| 55 | gcc aac gac acc gag tat ggc ctg gcc tcg tac atc tgg acc cag gac | 1248 |
| | Ala Asn Asp Thr Glu Tyr Gly Leu Ala Ser Tyr Ile Trp Thr Gln Asp | |
| | 405 410 415 | |
| 60 | atc ggc aaa gcc cat cgc ctg gcc cgt ggc atc gag gcc ggc atg gtg | 1296 |
| | Ile Gly Lys Ala His Arg Leu Ala Arg Gly Ile Glu Ala Gly Met Val | |
| | 420 425 430 | |
| 65 | ttc atc aac agc cag aac gta cgc gac ctg cgc cag ccg ttc ggc ggc | 1344 |
| | Phe Ile Asn Ser Gln Asn Val Arg Asp Leu Arg Gln Pro Phe Gly Gly | |
| | 435 440 445 | |
| 70 | gtg aaa ggt tcc ggt acc ggg cgt gag ggc ggg cag tac agc ttc gag | 1392 |
| | Val Lys Gly Ser Gly Thr Gly Arg Glu Gly Gly Gln Tyr Ser Phe Glu | |
| | 450 455 460 | |

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 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

```

cct gaa ctg gtg ccc gcc agc caa gtg gcc aac ccc gat gcc ctg ggc      432
Pro Glu Leu Val Pro Ala Ser Gln Val Ala Asn Pro Asp Ala Leu Gly
   130                               135                               140

5   ctg cgc ctg tat gtg aac ggc gaa ctg cgc cag cac aac aac acc gcc      480
Leu Arg Leu Tyr Val Asn Gly Glu Leu Arg Gln His Asn Asn Thr Ala
   145                               150                               155                               160

10  aac tgc gta cgc acg gtg gcg cag ctg att gcc gaa atc agc gag ttc      528
Asn Cys Val Arg Thr Val Ala Gln Leu Ile Ala Glu Ile Ser Glu Phe
                               165                               170                               175

15  atg acc ctg cac gcc ggc gac atc ctg atc acc gga acc ccc gag ggc      576
Met Thr Leu His Ala Gly Asp Ile Leu Ile Thr Gly Thr Pro Glu Gly
                               180                               185                               190

20  cgc gtc gat gta cag cca ggt gac cgc gtc gac atc gag atc gac ggc      624
Arg Val Asp Val Gln Pro Gly Asp Arg Val Asp Ile Glu Ile Asp Gly
                               195                               200                               205

25  ctg ggc aag ctg acc aac cac atc gtc gcc gag tga      660
Leu Gly Lys Leu Thr Asn His Ile Val Ala Glu
   210                               215

<210> 30
30  <211> 219
    <212> PRT
    <213> Pseudomonas putida U

35  <400> 30

Met Ser His Ala Leu Leu Asp Val Ala Ser Gly Thr Leu Phe Gly Val
   1           5           10           15

40  Ala Leu Asn Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Gln His Gln Ala Ala Phe Val
           20           25           30

45  Glu Ala Pro Tyr Lys Gln Leu Pro Val Lys Pro Val Leu Phe Val Lys
           35           40           45

50  Thr Pro Asn Thr Arg Asn Gln His Glu Gly Gln Val Val Phe Pro Ala
           50           55           60

55  Gly Val Gln Arg Val Gln Pro Gly Pro Ala Leu Gly Val Val Ile Gly
           65           70           75           80

60  Lys Asp Ala Ser Arg Val Ser Val Ala Asp Ala Leu Glu His Val Ala
           85           90           95

65  Gly Tyr Thr Ile Val Asn Glu Val Ser Leu Pro Glu Ala Ser Tyr Tyr
           100          105          110

70  Arg Pro Ala Val Lys Ala Lys Cys Arg Asp Gly Phe Cys Pro Val Gly
           115          120          125

75  Pro Glu Leu Val Pro Ala Ser Gln Val Ala Asn Pro Asp Ala Leu Gly
           130          135          140

```

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

Gly Leu Asn Tyr Ala Asp His Ala Arg Glu Leu Ala Phe Ala Pro Pro
50                      55                      60

60
Thr Glu Pro Leu Ala Phe Ile Lys Ser Pro Gly Thr Tyr Thr Gly His
65                      70                      75                      80

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

ES 2 364 110 A1

```

    tac atc gag ctg ggt gcg gcg ttt gtg gcg gtg ggt gtg gat acc acg      720
    Tyr Ile Glu Leu Gly Ala Ala Phe Val Ala Val Gly Val Asp Thr Thr
    225                230                235                240

5   gtg ctg atg cgc ggg ctg cgc gag ctg gcg ggg aag ttc aag gat aca      768
    Val Leu Met Arg Gly Leu Arg Glu Leu Ala Gly Lys Phe Lys Asp Thr
                245                250                255

10  gtg gta gtc ccc agt gcc ggg ggt ggt gcc tac tga                        804
    Val Val Val Pro Ser Ala Gly Gly Gly Ala Tyr
                260                265

<210> 36
<211> 267
15  <212> PRT
    <213> Pseudomonas putida U

20  <400> 36

    Met Asp Met Pro Ile Asn His Phe Lys Arg Arg Leu His Ser Gly Glu
    1                5                10                15

25  Pro Gln Ile Gly Leu Trp Leu Gly Leu Ala Asp Ala Tyr Cys Ala Glu
                20                25                30

    Leu Ala Ala Asn Ala Gly Phe Asp Trp Leu Leu Ile Asp Gly Glu His
    30                35                40                45

    Ala Pro Asn Asp Leu Arg Gly Met Leu Ala Gln Leu Gln Ala Val Ala
    50                55                60

35  Pro Tyr Pro Ser Gln Ala Val Ile Arg Pro Val Ile Gly Asp Thr Ala
    65                70                75                80

    Leu Ile Lys Gln Val Leu Asp Ile Gly Ala Gln Thr Leu Leu Val Pro
    40                85                90                95

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

45  Tyr Pro Pro Lys Gly Ile Arg Gly Val Gly Ser Ala Leu Ala Arg Ala
    115                120                125

    Ser Arg Trp Asn Thr Leu Pro Gly Tyr Leu Asp His Ala Asp Glu Gln
    50                130                135                140

    Met Cys Leu Leu Val Gln Ile Glu Asn Lys Glu Gly Leu Ala Asn Leu
    145                150                155                160

55  Asp Glu Ile Val Ala Val Glu Gly Val Asp Gly Val Phe Ile Gly Pro
                165                170                175

    Ala Asp Leu Ser Ala Ala Met Gly His Arg Gly Asn Pro Gly His Pro
    60                180                185                190

    Glu Val Gln Ala Ala Ile Glu Asp Ala Ile Val Arg Ile Gly Lys Ala
    195                200                205

65  Gly Lys Ala Ala Gly Ile Leu Ser Ala Asp Glu Lys Leu Ala Arg Arg

```

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

| | | |
|----|---|------|
| | acc tcg ttc ggc gcc att ttc gca agc cgt gcg ctg tgg ctg ttg gtg | 768 |
| | Thr Ser Phe Gly Ala Ile Phe Ala Ser Arg Ala Leu Trp Leu Leu Val | |
| | 245 250 255 | |
| 5 | gcc gtg tat tgc gcg gtg atg ctg gcg gtg aat acc ctt gcg ttc tgg | 816 |
| | Ala Val Tyr Cys Ala Val Met Leu Ala Val Asn Thr Leu Ala Phe Trp | |
| | 260 265 270 | |
| 10 | atg ccc agc ctg att cac agt gcc ggt gtg gcc agc gac gcc agt gtc | 864 |
| | Met Pro Ser Leu Ile His Ser Ala Gly Val Ala Ser Asp Ala Ser Val | |
| | 275 280 285 | |
| 15 | ggc ctg ctc agc gct gtg ccg tac gtg gcc gcc tgc gtg ttc atg ctg | 912 |
| | Gly Leu Leu Ser Ala Val Pro Tyr Val Ala Gly Cys Val Phe Met Leu | |
| | 290 295 300 | |
| 20 | gcg tgc ggc cgc tcc agc gac cgc caa cgc gaa cgc cgc tgg cac ctg | 960 |
| | Ala Cys Gly Arg Ser Ser Asp Arg Gln Arg Glu Arg Arg Trp His Leu | |
| | 305 310 315 320 | |
| 25 | tgc gta ccg ctg ctg atg gct gcc atc gcc atc gct att gcg gcc att | 1008 |
| | Cys Val Pro Leu Leu Met Ala Ala Ile Gly Ile Ala Ile Ala Ala Ile | |
| | 325 330 335 | |
| 30 | gcc ccc gag cag gcg ctg ccg gta atg gcc gcc ctg gtg ctg gcc gcc | 1056 |
| | Ala Pro Glu Gln Ala Leu Pro Val Met Ala Gly Leu Val Leu Ala Gly | |
| | 340 345 350 | |
| 35 | atg gcc gcc agc gct gcg ctg ccg atg ttc tgg caa ctg ccg ccg gcg | 1104 |
| | Met Gly Ala Ser Ala Ala Leu Pro Met Phe Trp Gln Leu Pro Pro Ala | |
| | 355 360 365 | |
| 40 | ttc ctc aac gcc cgt acc cag gcc gcc gcc att gcc ctg atc agc tcg | 1152 |
| | Phe Leu Asn Ala Arg Thr Gln Ala Ala Gly Ile Ala Leu Ile Ser Ser | |
| | 370 375 380 | |
| 45 | ctg gcc agc atc gcc tcg ttc ttc acg ccc tac ttc atc gcc tgg gtg | 1200 |
| | Leu Gly Ser Ile Ala Ser Phe Phe Thr Pro Tyr Phe Ile Gly Trp Val | |
| | 385 390 395 400 | |
| 50 | cgc gac acc acc cac agc gcc agc ctt gct ctg tac gta ctc gcc gtc | 1248 |
| | Arg Asp Thr Thr His Ser Ala Ser Leu Ala Leu Tyr Val Leu Ala Val | |
| | 405 410 415 | |
| 55 | ttc atc gcc ctg gcc gcc ctg ctg gtg ttg cgc acc cag gct gcc atc | 1296 |
| | Phe Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu Val Leu Arg Thr Gln Ala Ala Ile | |
| | 420 425 430 | |
| 60 | gtc aac cct tga | 1308 |
| | Val Asn Pro | |
| | 435 | |
| 60 | <210> 40 | |
| | <211> 435 | |
| | <212> PRT | |
| 65 | <213> <i>Pseudomonas putida</i> U | |

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

50  Arg Lys Ser Pro Glu Asp Gln Arg Arg Val Phe Ile Ser Leu Thr Glu
      85                               90                               95

55  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

60  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

| | | | | | | | |
|----|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| 30 | 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 | ggtgagtgac | agcaggtctt | ccagcacttt | cagcagtgtc | 480 |
| 40 | gcccgcgcgc | gctcataggc | gtcggggcct | gcgtacatca | gctctacata | caggctgtcg | 540 |
| | atgatgcccc | ggtaggcctc | 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 | atgcgcatac | 900 |
| | agcgatgcct | tgcgcatgcc | cgccaactgg | gcgatttctg | tcagcgaaga | ggcgtcataa | 960 |
| | ccgtactcgg | cgaagtggcc | gacggcggca | tcgcacacac | gcaccgcaga | aggggaaagg | 1020 |
| 50 | tctttcaaca | gcatcactcc | gtcaggggog | cggcgggocg | cgccgctctt | gaggggtggga | 1080 |
| | ttgtggtgat | cgaaaatgca | cgggtcaatg | cttctgcgaa | ggcaatttcc | gggcgccatg | 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 |
| 60 | caccagatgg | caatgttttc | gcccagctca | caacaggagg | tgtggggtag | cgacccggat | 1560 |
| | gctaccgcc | gcagcagtat | cgccgcgttc | ggccgcactg | aagaggttga | gggtggcgtg | 1620 |
| | tcgttcagcg | gcgaaatggg | ctggagttcc | ggttgccgac | acgcgcaatg | ggcgattctc | 1680 |
| | ggtttccgcc | gcaagaatgc | cgaaggcgtc | caggattact | gcttcgccat | 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

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| | tatcgcccgt | atdddggcag | cggtctctcc | acggtcagct | tgggcggtgc | cgagcgcgatg | 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 | cggcctgatg | 2640 |
| 15 | cctgtggagc | atcgacaagc | gctccaccag | ccatgaagtg | ttcgaagagg | cctcgcactt | 2700 |
| | tgccgtgaac | attctggctg | cggaccagat | 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 | tgggtgctgga | 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 | ttttggatgg | caccggctgt | gcccgtgttc | gcggatgaac | 3480 |
| | ccgctcccac | aggtccagcg | ccagtagcaa | cttcggcgcg | gtacctgtgg | gagcggcttt | 3540 |
| | agcccggaac | accggcaaa | 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 | gggggttgcg | cgatgcccc | 3840 |
| | tggccgcact | caggtctgca | ggcccgatga | acacgccatc | cacaccttcc | actgcaacga | 3900 |
| | tctcgtccag | gttggccagg | ccttccttgt | tctcgatctg | caccagcagg | cacatttgct | 3960 |
| 40 | catcggcgtg | gtccaggtaa | ccggggaggg | tgttccagcg | cgaagcccgc | gccagcgcgc | 4020 |
| | tgccaccccc | gcgaatgccc | ttggggcggt | aatgcatggc | cttgaccagt | tgcgcgcct | 4080 |
| | gttcggcagt | ttccaccatc | ggcaccagca | aggtttgtgc | gccgatatcc | agcacctgct | 4140 |
| | tgatcagcgc | ggtatcgccg | atcaccgggc | ggatcactgc | ctggctgggg | tagggtgcca | 4200 |
| | ccgctgcaa | ctgggcgagc | atgccgcgca | ggtcgttggg | cgctgttccg | 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 | tgttggccag | ccaggcaacg | 4560 |
| | cctttggccg | ggtggttgag | cacggcagcg | ctgaccccgg | attcctcgat | cacgccattg | 4620 |
| | cggtagagca | ccgcccggc | tttgccgagg | tcgatttcgg | tggggcgcac | ggcccggccg | 4680 |
| | cccatcacca | cgccggcatt | ggcggcggtg | tcggagatgg | tgtcgaacac | cttgcgggtg | 4740 |
| | gcctgggttt | gcgggtccac | ctgctggatg | cgcgctcaa | tgatttccag | cgccgggatc | 4800 |
| 55 | accactcgg | tggcgtccag | cacatcaaac | acggtgatgt | tcgggccctt | cagcggcttg | 4860 |
| | ccgaggatga | acgccaactc | cacttcaacc | cgcggcacga | tgaagcgctc | 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 | tggggcggt | ctcttgattc | 5220 |
| | aagggttgac | gatggcagcc | tgggtgcgca | acaccagcag | gccgccaggg | gcgatgaaga | 5280 |
| | cggcgagtac | 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 | cagcgccctgc | 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 | aggtgactgc | 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 | gcgctggtgc | agcagtgggt | ccaggcgcgc | tttcaacact | gccagcaagc | 6720 |
| 25 | tgtcgcceac | tgttttgctc | 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 | gagggcgggc | 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 | gcccgtcgtg | tggctcttct | ctgccttgcg | catggcccag | cccagggggg | 7500 |
| 40 | cactgtcggc | caggtagtgc | gaggtgcaca | gggcccagac | cgagaccact | ttgaagtgct | 7560 |
| | ggtcctgggt | catgtagcgc | atgggcacca | gggtgcccga | ttccggggcg | agggtgggtg | 7620 |
| | cgtggtgggc | catggtttcg | acgttgaagc | ggttgcactc | ctcggccagc | agcttgccca | 7680 |
| | gctcgggatt | gcccggggaat | 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 | ccatcgcggg | 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 | cggtgggctg | 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
 ccggtctcta ccgccaggcg gccagttcg ttggcgggca gaggcgacag ctogctcadc 9120
 tcagcacggy cgggtgtgce cagcgccagg cacggcgag tcttccagggt agcgcgtcag 9180
 aacggcacgt tccatgggct taccaggccg cacacacca ccggctggta cagggtgtag 9240
 ttgagcatct ggtcgtcgac cgggtaggta tggccgtcca tgcgcgtgca cacttcggcg 9300
 aagaagtcga agttgtgca ggcacgggg 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
 cggccggtga tccagtgtt gatcatgctg ctcatgcctt gttgttcttg aagaagtcag 9660
 cttcgctgac gatacgggtg accaggcgac cgacgccttc cacttccacc accacttcgt 9720
 15 caccocggcac cacatcggcc aggccttctg gcgtgccggg ggcgatcatg tcgcccgggt 9780
 gcagggtcat gaagctggag aagtattcga tgagggtcgg gatgtcgaag atcatgtcog 9840
 cgggtggtgcc ttctgtctc agctcaccgt tgatccagggt gcgcagcttc aggttgctga 9900
 cgtctggcac atcggccgca tcgacgatcc acgggcccgc cggggtggtg gcatcgcggg 9960
 20 ttttcacccg caggttgggg cggtagtagt ttccaggta gtcgaggatg gcgtagctgt 10020
 tgcaacgggt gtaccggca acgtaggcca gggcgtctc acgcttgacg ttcttcgccc 10080
 ctttgccgat caccgccacc agctcgcact cgtagtcat gtattcgacg ttgtccgggc 10140
 gccagggtgc 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 tgtggttggg cagcttgccc 10440
 aggcgctga tctcgatgtc gacgcggtca cctggctgta catcgacggg gccctcgggg 10500
 gttccggtga tcaggatgtc gccggcgtgc aggtcatga actcgtgat ttccgcaatc 10560
 30 agctgcgcca ccgtgcgtac gcagttggcg gtgttgttgt gctggcgag ttccgcccgc 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 gccgggttg 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 ggtggccgctc 11100
 ctgocgattt cgttaatgtg ttaatgttat agttaatatg ttaacgatgg tcaaggggtg 11160
 gccagtgccg cctgccggca aggcaaggca ccatgggcca tcgtcaacag ggtcaagcga 11220
 tttgcgagca agcagccatg agcagccggc atccgatacc gaacatcaac attggccagg 11280
 tttacgacca gcgcacacag gacagcgag tgcatcaga ccggctgggc aacctggcgg 11340
 45 gctttttcgg gcgcaacatg ccggtgcacc ggcattgacc gtttttccag gtgcattacg 11400
 tgaagtcggg cacagtacgg gtgtatctgg atgacagca gtacatcgag gccggccgag 11460
 tgttcttctt caocccacc acggtgccgc acgcgttcgt caccgaagct gacagcgagc 11520
 ggcattgtgt gacggtgcgc cagcaactgg tgtggcaatt gatcgaagcc gacgccagcc 11580
 50 tgctgccggc gggcatgcag gtgcagccag cctgtgtggc gctgggcaac ctgccggccg 11640
 aatacaaggc cgaggcgcag cgcctgcaag gctggctgga cgcgttgagt gacgagttg 11700
 ccacgcagca accgggtcgc gaggcggcgt tgcagtcgt gaccocctg atcatgatca 11760
 gcctgctgcg gctgtgccc aactcgtgg aatcgacccc ggcgcggcat gaagacctga 11820
 agatcttcca ccgtttcaat gccctgatcg aagcgcatta ccttgagcat tggccgctgg 11880
 55 cccgctacgc gcagcagatt ggcgtgacc aggcacggct gaacgatgtg tgccggcgca 11940
 tcgcccactt gccatccaag cgcctgggtc tggaaaggct gatgcaggag gccaaagcgtt 12000
 tgctgttgtt ttccggcagc acggccaacg aaatctgtta ccagctcggc ttcaaggatc 12060
 cggcctatth cagccgcttc ttcaaccgct acgccaagct cacaccggg gactaccgcc 12120
 agcggcagge agaattgcag tgaatggcc atggcggctc acccgggtgc tgttgttgtt 12180
 60 tacagcggat ggtcgcagcc cgcgcgcgg gcttgaatgg gttttccgtg gaacagattg 12240
 cactttccat cgtgcatgcc cttaaatctg tgaattgaga aaaagccaca ggtttgacca 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 gcctggagcg agacgggctg gtgcggcggc 12540

ES 2 364 110 A1

5 agaaggccgc gcaggaccag cgacgggtgt tcgtcagcct gaccgaaaga ggggaggcgt 12600
gctttgcctc gatgaaggaa ggcattggagg ccaactacca gaagattcag gcgcagtttg 12660
gtgaagagaa gctgcagcag ctgatggggg 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.