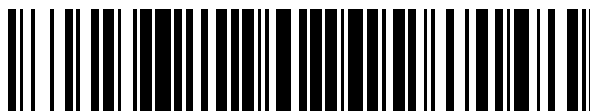


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 530**

21 Número de solicitud: 201130647

51 Int. Cl.:

A23L 1/015 (2006.01)

A23C 19/097 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **04.12.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.05.2012

62 Número de la solicitud inicial: **P 200803451**

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

72 Inventor/es:
ARCOS RODRÍGUEZ, Mario;
RODRÍGUEZ OLIVERA, Elías;
NAHARRO CARRASCO, Germán y
LUENGO RODRÍGUEZ, José María

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA ELIMINAR DOPAMINA DE DIFERENTES FUENTES**

57 Resumen:

Procedimiento para eliminar dopamina 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 o 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 de 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 cantidad de dopamina de alimentos.

ES 2 380 530 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para eliminar dopamina de diferentes fuentes.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION.

5 El campo técnico de la invención pertenece a la Biotecnología. La invención 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.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA

Aminas biogénicas. Aspectos generales

20 Las aminas son compuestos químicos derivados del amoníaco 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).

25 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.).

30 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.

35 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).

40 Afortunadamente, los organismos cuentan con diferentes sistemas naturales de detoxificación (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.

45 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.

Las aminas biogénicas como neurotransmisores

50 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).
 5 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
 10 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
 20 clínica como antidepresivos (6).

Histamina

Esta amina biogénica neurotransmisora se produce por descarboxilación de la histidina debido a la acción de la histidinadecarboxilasa (Figura 2^a). 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
 25 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
 30 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)
 40 (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).

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 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).

Presencia de aminas en alimentos fermentados

15 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).

25 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.

30 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.

35 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).

40 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.

50 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).

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

55 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

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.

5 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.)

10 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

15 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.

20

Amina biogénica	Efectos farmacológicos
<p data-bbox="188 1099 296 1126">Histamina</p> <p data-bbox="188 1397 284 1424">Tiramina</p>	<p data-bbox="612 1099 1050 1126">Liberación de adrenalina y noradrenalina</p> <p data-bbox="612 1149 1193 1205">Estimulación de la musculatura uterina, intestinal y del aparato respiratorio.</p> <p data-bbox="612 1274 1139 1301">Estimulación de neuronas sensoriales y motoras.</p> <p data-bbox="612 1323 1005 1350">Incremento de la presión sanguínea.</p> <p data-bbox="612 1373 954 1400">Control de la secreción gástrica.</p> <p data-bbox="612 1422 906 1449">Vasoconstricción periférica.</p> <p data-bbox="612 1471 1082 1498">Incremento del ritmo cardiaco y respiratorio.</p> <p data-bbox="612 1520 1133 1547">Estimulación de la lacrimación y de la salivación.</p> <p data-bbox="612 1570 916 1597">Liberación de noradrenalina.</p> <p data-bbox="612 1619 708 1646">Migraña.</p>
<p data-bbox="188 1756 446 1783">Putrescina y cadaverina</p> <p data-bbox="188 1906 352 1933">β-feniletilamina</p>	<p data-bbox="612 1709 746 1736">Hipotensión.</p> <p data-bbox="612 1758 740 1785">Bradcardia.</p> <p data-bbox="612 1807 1043 1834">Potenciación del efecto de otras aminas.</p> <p data-bbox="612 1906 916 1933">Liberación de noradrenalina.</p> <p data-bbox="612 1955 1002 1982">Incremento de la presión sanguínea.</p> <p data-bbox="612 2004 708 2031">Migraña.</p>

Amina biogénica	Efectos farmacológicos
Triptamina	Incremento de la presión sanguínea.

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.

5 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).

15 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.

25 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).

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 inhibitoras 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).

40 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 nitritos 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 nitritos 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

5 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.

10 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.

Descarboxilación de aminoácidos

25 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).

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

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).

40 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.

45 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.

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

Enzima	Números de acceso en GenBank y fuentes
Grupo I	
Glicina descarboxilasa (EC 1.4.4.2)	P23378, humana; P15505, pollo; P26969, <i>Pisum sativum</i>
Grupo II	
Glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15)	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)
Histidina descarboxilasa (EC 4.1.1.22)	P28577, <i>Enterobacter aerogenes</i> ; P28578, <i>Klebsiella planticola</i> ; P05034, <i>Morganella morganii</i> ; X70644, <i>Drosophila melanogaster</i> ; P23738, ratón; P16453, rata; P19113, humana. M96070, <i>Petroselinum crispum</i> '
Tirosina descarboxilasa (EC 4.1.1.25)	S19796, <i>Caenorhabditis elegans</i> ; P05031, <i>Drosophila melanogaster</i> ;
Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.28)	P14173, rata; P22781; cerdo de Guinea, P80041, cerdo P27718, bovina; P20711, humana P17770, <i>Catharanthus roseus</i>
Triptófano descarboxilasa (EC 4.1.1.17)	P21169, <i>Escherichia coli</i> ; P24169, <i>Escherichia coli</i> (inducible)
Grupo III	
Ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.18)	P05033, <i>Hafnia alvei</i> ; P26934, <i>Bacillus subtilis</i> ; P23892, <i>Escherichia coli</i>

Enzima	Números de acceso en GenBank y fuentes
Lisina descarboxilasa (EC 4.1.1.19)	P28629, <i>Escherichia coli</i>
Arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.17)	P28629, <i>Escherichia coli</i> (biodegradative)
Grupo IV	P07805, <i>Trypanosoma brucei</i> ; P27116, <i>Leishmania donovani</i> ; P27121,
Ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.19)	<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.
	P21170, <i>Escherichia coli</i> ; P22220, <i>Avena sativa</i>
Arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.20)	

Microorganismos productores de aminas biogénicas

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).

5 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

10 *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

15 *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-

20

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. acidófilus* y *L. arabinose*, todas ellas identificadas como productoras de histamina (26).

5 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 ente otras) en los alimentos fermentados (52).

10 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 Descarboxilasa mayor incluso que la observada en las bacterias acidolácticas (50).

15 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.

20 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:

30 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.

35 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*.

40 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*.

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).

50 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

5 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.

10 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.



15 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).

25 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).

30 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.

35 La mayoría de las enzimas implicadas en la oxidación de las diferentes aminas a sus correspondientes aldehídos, son oxidorreductasas 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).

40 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

45 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).

50 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).

5 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

10 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.

15 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).

20 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_{seq} para la transferencia intramolecular de e⁻ (75). Posteriormente, el aldehído generado tras la desaminación del sustrato es oxidado al correspondiente ácido.

Quinohemoproteínas amino deshidrogenasas.

30 Son enzimas heterotriméricas constituidas por tres subunidades (αβγ) 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.

35 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).

40 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).

45 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):

50 La reacción se inicia mediante el ataque nucleofílico del nitrógeno del grupo amino al C₆ 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 Asp_{33y}) abstrae un protón del C_α de la amina para formar el intermediario carbaniónico ©. Al mismo tiempo se reduce el CTQ tras captar una molécula de H₂O, dando lugar al intermediario d.

5 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 re-oxidación del cofactor y de los grupos hemo.

10 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 ~~la~~ 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).

15 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 α₂β₂, donde el cofactor se encuentra unido a las subunidades β (83).

20 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).

25 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).

35 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.

40 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).

45 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

50 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.

5 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
10 isoenzimas, MAOA y MAOB, esta clasificación se realizó en función de la inhibición específica de la MAOA por el antidepressivo clorgilina 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).

15 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
20 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
25 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.

30 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
35 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

40 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
45 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.

50 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
55 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*.

Catabolismo de tiramina en *P. putida* U

5 *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 procariotas y para eucariotas (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.

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.
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.
9. BOULTON A.A. (1980) Trace amines and mental disorders. *J Neurol Sci.* 7: 261-263.
10. BOROWSKY, B., ADHAM, N., JONES, K. A., RADDATZ, R., ARTYMYSHYN, R., OGOZALEK, K.L., DURKIN, M.M., LAKHLANI, P.P., BONINI, J.A., 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.
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., 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.

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.
- 5 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.
- 10 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.
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.
- 15 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.
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.
- 20 25. ASKAR, A., TREPTOW, H. (1986), Biogenic amine in lebensmittein vorkommen bedeutung und bestimmung. Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart.
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.
- 25 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.
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.
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 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.
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.
- 35 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.
33. SIMPSON, G.M., DE LEON, J. (1989) Tyramine and new monoamine oxidase inhibitor drugs. *Br J Psychiatry Suppl.* 6: 32-37.
- 40 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.
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.
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.
- 45 37. RECSEI, P.A., SNELL, E.E. (1972) Histidine decarboxylaseless mutants of *Lactobacillus* 30a: isolation and growth properties. *J Bacteriol.* 112: 624-626.

38. MITOMA, C., UNDEFRIEND, S. (1960) Bacterial tryptophan decarboxylase. *Biochim Biophys Acta*. 37: 356-357.
39. CHOU DHURY, N., HANSEN, W., ENGESSER, D., HAMMES, W.P., HOLZAPFEL, W.H. (1990). Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase medium. *Letters in Applied Microbiology*. 11: 278-281.
40. KATO, Y., TSUDA, T., ASANO, Y. (2007) Purification and partial characterization of N-hydroxy-l-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.
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.
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.
44. SUZZI, G., GARDINI, F. (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol*. 88: 41-54.
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.
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.
48. LE JEUNE, C., LONVAUD-FUNEL, A., TEN BRINK., HOFSTRA, H. Y VAN DER VOSSEN. 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.
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: 291.
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 reverse-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 871: 75-83.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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: Marcel Dekker.
- 30 71. OUBRIE, A., ROZEBOOM, H.J., KALK, K.H., HUIZINGA, E.G. (2002) Crystal structure of quinoxinoprotein 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 quinoxinoproteins and the O-quinoxin family of cofactors. *J. Nutri.* 130: 719-727.
- 35 73. MATSUSHITA, K., TOYAMA, H., ADACHI, O. (2002) Quinoxinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *App. Microbiol. Biotechnol.* 58: 13-22.
74. DAVIDSON, V.L. (2004) Electron transfer in quinoxinoproteins. *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 quinoxinoprotein-containing phenylethylamine oxidase. *Biochemistry.* 40: 15789-15795.
- 40 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 quinoxinoprotein 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 quinoxinoprotein cofactors in an amine oxidase from the gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochem J.* 288:337-340.
- 45 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., TANI, 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 90. SAURA, J., NADAL, E., VAN DEN BERG, B., VILA, M., BOMBI, J.A., MAHY, N. (1996) Localization of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sci.* 59: 1341-1349.
91. MURA, A., PINTUS, F., FAIS, A., PORCU, S., CORDA, M., SPANÒ, D., MEDDA, R., FLORIS, G. (2008) Tyramine oxidation by copper/TPQ amine oxidase and peroxidase from *Euphorbia characias* latex. *Arch Biochem Biophys.* 475: 18-24.
- 35 92. GROSS, A.J., SIZER, I.W. (1959) The oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. *J Biol Chem.* 234 :1611-1614.
93. VALOTI, M., MORÓN, J.A., BENOCCI, A., SGARAGLI, G., UNZETA, M. (1998) Evidence of a coupled mechanism between monoamine oxidase and peroxidase in the metabolism of tyramine by rat intestinal mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 55: 37-43.
- 40 94. DIAZ, E., FERRÁNDEZ, A., PRIETO, M.A., AND GARCÍA, J.L. (2001) Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. 65: 523-569.
95. Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L. B., and Luengo, J. M. (1990) Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid. *J Biol Chem* 265: 7084-7090.
- 45 96. LUENGO, J.M., GARCÍA, J.L., OLIVERA, E.R. (2001) The phenylacetyl-CoA catabolón: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* 39: 1434-1442.
97. Luengo, J. M., Arias, S., Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Arcos, M., Naharro, G., Olivera, E. R. (2004) From aromatics to bioplastics: the phenylacetyl-CoA catabolon as a model of catabolic convergence. In Gayathri, A. (ed.), *Recent Res. Devel. Biophys. Biochem.*, Vol. 4, pp.: 257-292. Research Signpost, Kerala, India.

98. OLIVERA, E.R., MIÑAMBRES, B., GARCÍA, B., MUNIZ, C., MORENO, M.A., FERRÁNDEZ, A., DÍAZ, E., GARCÍA, J.L. Y LUENGO, J.M. (1998) "Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 6419-6424.
- 5 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.
- 10 100. 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.
- 10 101. 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.
- 15 102. 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 pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* 166: 175-176.
103. QUANDT, J., HYNES, M.F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene.* 127: 15-21.
- 20 104. 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 INVENCION

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-dihidroxifenilacético. 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 imprescindible del procedimiento de degradación, la tiramina oxidasa TynAB, o proteínas homólogas 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:

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);

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

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);

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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende las secuencias mencionadas en a), o secuencias complementarias a las mismas.

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%.

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 homóloga 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:

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);

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

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);

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 hibrida, 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%.

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:

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);

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

5 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);

10 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 hibrida, 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%.

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:

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);

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

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);

25 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 hibrida, 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%.

30 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:

35 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);

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

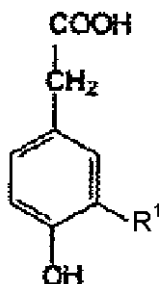
45 c) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia representada por SEQ ID NO:14 (secuencia de aminoácidos de TynF) y/o una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de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

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: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 hibrida, 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.

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%.

5 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
10 SEQ ID NO:2, que corresponde al cluster tyn de *Pseudomonas putida* U.

15 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 el 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 mismos 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
20 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,
25



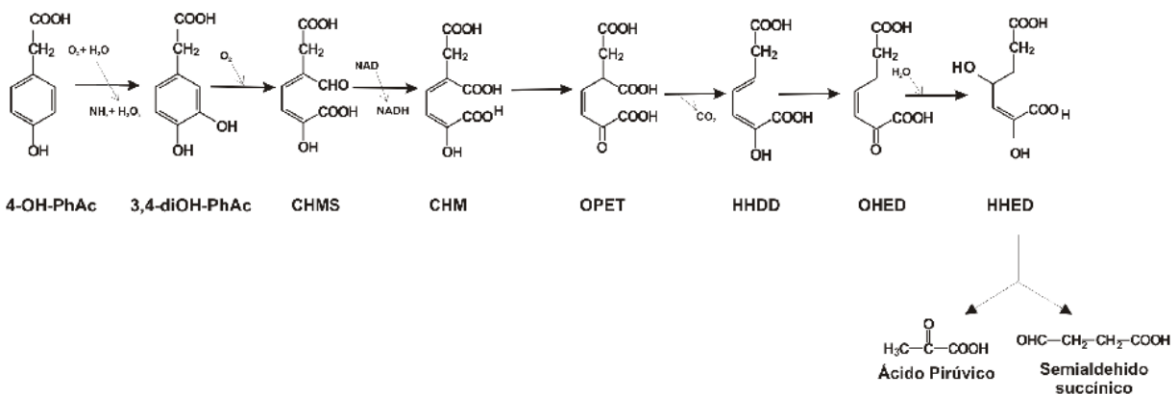
en la que R¹ es H,

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

30

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



35 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 hibrida en condiciones estrictas con al menos una de las secuencias de a);

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 hibrida, 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),

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),

o combinaciones de los mismos.

15 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;

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

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

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

50 - 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);

- 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),

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

5 - 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)

Como en los casos anteriores, se prefiere especialmente que los polipéptidos o complejos proteicos comprendidos en la composición comprenda una secuencia coya 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.

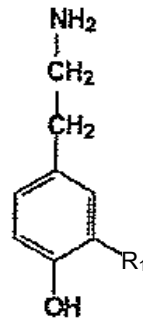
15 Otra realización preferida corresponde al caso en el que dicho plásmido comprende adicionalmente un fragmento de ácido nucleico que comprende las secuencias codificantes presentes en el cluster hpa de *Pseudomonas putida*. Aún se prefiere más el caso en el que el cluster hpa está insertado en el plasmido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

20 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.

35 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.

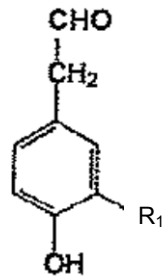
40 Otro aspecto de la invención, de gran importancia, se refiere a procedimientos que emplean las secuencias polipeptídicas descritas anteriormente, para disminuir el contenido de tiramina y/o dopamina en una muestra cualquiera, con preferencia por los alimentos y las bebidas para consumo humano o animal, 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



Fórmula I

donde R₁ 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,



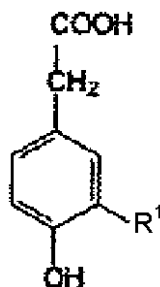
Fórmula II

donde R₁ es H u OH,

10 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.

20 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*).

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



Fórmula III

donde R^1 es H u OH,

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:

- 5 a) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO:7;
- b) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de a);
- 10 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;
- 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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en a), o una secuencia complementaria a la misma.
- 15 o cuya secuencia de aminoácidos es idéntica al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:8

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).

- 30 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 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_1 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:

- 55 a) transformar ácido 3,4-dihidroxifenilacético en semialdehído 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico;
- b) transformar semialdehído 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico en ácido 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico,

- c) transformar ácido 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico 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,
- 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,

5 g) escindir ácido 2,4-hidroxi-hept-2-ene-1,7-dioico en ácido pirúvico y ácido succínico o semialdehído succínico,

donde cualquiera de los ácidos citados puede estar en forma de cualquiera de sus sales.

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:

10 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,

15 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,

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

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

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

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

25 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 polipéptidos 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
30 secuencia que se selecciona del grupo de SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, o combinaciones de las mismas. Más preferido aún es el caso en el que los citados porcentajes de homología son del 100%.

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

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.

40 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.

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
45 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
50 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 industrial alimentaria.

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.

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 R_1 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 en el que las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento son sintetizadas por un microorganismo presente en la muestra o que se añade a la misma, que es un organismo hospedador recombinante de la invención. En una realización particularmente preferida, la bebida es vino y el microorganismo se añade al vino durante la fermentación maloláctica.

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

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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 (*tyn*ABFECGRD) 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 (*hpaR*₁TetRBCIHXFDEG₂G₁AR₂) 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 piruvico y en ácido succinico 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 tandem (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 tirosindescarboxilasa 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 (5mM) 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 decrita 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 cartabolismo 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 proximos 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

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 aldehidos 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

Con objeto de disponer de una contrucción 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 eexcreta 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-dihidroxifenilacéticos generados a traves de la ruta *Tyn* (Fig.12).

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).

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 5 µm tamaño de poro 10 µm) (Phenomenex Laboratorios U.S.A.) con una precolumna Analytical Guard Cartridge System, (KJ0-4282).

La fase móvil empleada contenía KH₂PO₄ (50 mM, pH 4) y acetonitrilo (CH₃CN), 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. 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. 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 proteinogénico 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 para transformar *P. putida* U \square hmg. La cepa recombinante obtenida (*P. putida* U \square 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 homogentisato 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* \square hmg \square hpd pMCtdcA) degradaba la tirosina incluso más eficazmente que aquella otra que carecía sólo del cluster hmg (Fig. 15). Este efecto puede explicarse asumiendo que, al estar bloqueada la ruta degradativa en una etapa anterior a la formación del ácido homogentísico, la pérdida de intermediarios catabólicos excretables es menor y, por consiguiente, un mayor porcentaje de L-tirosina será descarboxilado y degradado a través de las vías Tyn y Hpa.

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

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

Breve descripción de las Figuras

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

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

La Figura 3 muestra la estructura de las aminas "traza" más importantes. La \square 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- \square hidroxilasa.

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

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

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

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

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

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

5 En la Figura 10, el diagrama de curvas de la izquierda representa las curvas de crecimiento medidas como (A_{540nm}) en medio MM + dopamina (5mM) correspondientes a las cepas *P. putida* U CECT 4848 (silvestre) (■), *P. putida* U *tynR*::pK18mob (△) 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 (5Mm). El comportamiento de los distintos mutantes incluidos en los diferentes grupos, fue similar a cada uno de los indicados en la figura.

10 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).

15 En la Figura 12, el diagrama de curvas de la izquierda representa las curvas de crecimiento medidas como (A_{540nm}) medidas en la cepa 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 (5mM) 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.

20 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 (5mM) (○, □) o 4-OH-PhAc (5mM) (●, ■). El crecimiento se midió como A_{540nm} .

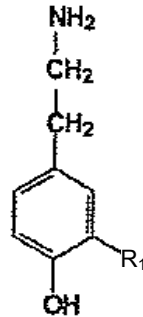
La Figura 14 muestra la representación esquemática de la estrategia seguida para la obtención de las construcciones pK_{tynhpa} HindIII y pK_{tynhpa} XbaI que contienen la información genética necesaria para degradar tiramina, dopamina, 4-OH-PhAc y 3,4-diOH-PhAc.

25 La Figura 15 representa las curvas de crecimiento medidas como (A_{540nm}) 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 (5mM) como única fuente de carbono.

30 La Figura 16 Curvas de crecimiento medidas como (A_{540nm}) 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 (5mM) como única fuente de carbono.

REIVINDICACIONES

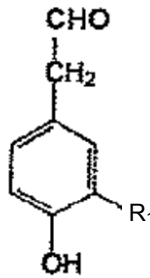
1. Un procedimiento para transformar un compuesto de la Fórmula I



Fórmula I

5 donde R₁ es OH (dopamina),
 contenido en una muestra,
 en ácido pirúvico y ácido succínico, o alguna de sus sales,
 que comprende las siguientes etapas:

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

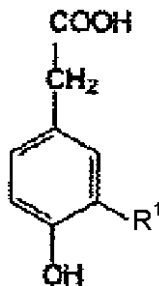


10

Fórmula II

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

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



15

Fórmula III

donde R¹ es OH (ácido 3,4-dihidroxifenilacético), por la acción catalítica de una 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa;

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

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

e) 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,

5 f) 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,

g) 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,

10 h) 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,

i) 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;

15 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.

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:

20 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;

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

25 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;

30 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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende las secuencias mencionadas en i), o secuencias complementarias a las mismas;

35 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
40 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.

45 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.

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

50 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 hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);

- iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO:8;
- 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:8, donde la molécula de ácido nucleico hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma.
- o es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:8.
- 10 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 hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa que cataliza la etapa c) es idéntica en su secuencia de aminoácidos al menos en un 60% a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO:24.
- 15 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa que cataliza la etapa c) tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO:24.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la deshidrogenasa 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:26.
- 20 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la secuencia de la deshidrogenasa que cataliza la etapa d) es idéntica a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO:26.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de la isomerasa 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:28.
- 25 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la secuencia de la isomerasa que cataliza la etapa e) es idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO:28.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la descarboxilasa 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:30.
- 30 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el que la descarboxilasa 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:30.
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:32.
- 35 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:32.
- 40 16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la hidratasa 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:34.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la hidratasa que cataliza la etapa h) es idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO:34.
- 45 18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la aldolasa 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:36.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que la aldolasa que cataliza la etapa i) es idéntica en su secuencia de aminoácidos a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO:36.
- 50 20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

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,

5 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;

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

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

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

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

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

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

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

20 21. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, 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:

25 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;

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

30 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;

35 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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende las secuencias mencionadas en i), o secuencias complementarias a las mismas;

40 b) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa, seleccionada del grupo que consiste en:

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

45 ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);

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

50 iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ

ES 2 380 530 A1

ID NO:8, donde la molécula de ácido nucleico hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma

c) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como hidroxifenilacetaldehído dioxigenasa, 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:23;

ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida 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:24;

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:24, donde la molécula de ácido nucleico hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;

d) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como deshidrogenasa, seleccionada del grupo que consiste en:

i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO:25;

20 ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);

iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;

30 e) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como isomerasa, seleccionada del grupo que consiste en:

i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO:27;

ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);

35 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;

40 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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;

f) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como descarboxilasa, 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:29;

ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida 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:30;

- iv) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:30, donde la molécula de ácido nucleico hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 5 g) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como descarboxilasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO:31;
- 10 ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
- iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO: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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- h) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como hidratasa, 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:33;
- ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida 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:34;
- 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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 30 i) la secuencia codificante de una proteína capaz de actuar como aldolasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO:35;
- 35 ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de i);
- iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia representada por SEQ ID NO:36;
- 40 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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma;
- 45 j) 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 :
- i) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia representada por SEQ ID NO:9, SEQ ID: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;
- 50 ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que hibrida en condiciones estrictas con una secuencia de i);

- 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;
- 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: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 hibrida, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de DNA que comprende la secuencia mencionada en i), o una secuencia complementaria a la misma.
- 10 22. Procedimiento según la reivindicación 21, 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: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.
- 15 23. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, en el que el vector de expresión es un plásmido.
24. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, 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.
- 20 25. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que el vector de expresión está insertado en el genoma del hospedador.
26. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que el vector de expresión permanece como forma replicativa autónoma.
- 25 27. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, 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.
28. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que las secuencias codificantes de las enzimas sintetizadas por el microorganismo están presentes en su genoma de forma natural.
- 30 29. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que el microorganismo es *Pseudomonas putida* U (CECT 4848) y el procedimiento es el de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.
30. Procedimiento según las reivindicaciones 24 y 27, en el que el microorganismo es un microorganismo hospedador recombinante.
- 35 31. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en el que la muestra en la que se quiere disminuir el contenido del compuesto de la Fórmula I en el que R¹ es OH 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.
32. Procedimiento según la reivindicación 31, 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.
- 40 33. Procedimiento según la reivindicación 32, 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.
- 45 34. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33 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.
35. Procedimiento según las reivindicaciones 24 y 34, en el que el microorganismo es un organismo hospedador recombinante.
36. Procedimiento según la reivindicación 35, en el que el microorganismo recombinante es una bacteria capaz de transformar un azúcar en ácido láctico.
- 50 37. Procedimiento según la reivindicación 36, en el que la bacteria pertenece a un género que se selecciona entre *Lactobacillus*; *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*.

38. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 37, en el que el microorganismo actúa como iniciador (starter) de la transformación de la leche en derivado lácteo.
- 5 39. Procedimiento según la reivindicación 31, 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
40. Procedimiento según la reivindicación 39, 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.
- 10 41. Procedimiento según la reivindicación 40, en el que el microorganismo es un organismo hospedador recombinante.
42. Procedimiento según la reivindicación 41, en el que la bebida es vino y el microorganismo se añade al vino durante la fermentación maloláctica.
- 15 43. Procedimiento según la reivindicación 31, 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.
44. Procedimiento según la reivindicación 31, 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.
- 20 45. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 43 ó 44, 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.
46. Procedimiento según la reivindicación 45, en el que el microorganismo actúa como iniciador (starter) de la transformación de la materia prima en el embutido o chucrut.
- 25 47. Uso de *Pseudomonas putida* U para disminuir el contenido de 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.
- 30 48. Uso de un organismo hospedador transformado con un vector de expresión que comprende las secuencias codificantes de las enzimas que catalizan las etapas del procedimiento de la reivindicación 2 y las de los polipéptidos representados por las secuencias SEQ ID NO:10, SEQ ID:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42 y SEQ ID NO:44, para disminuir el contenido de 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.
49. Uso según la reivindicación 48, 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.
- 35 50. Uso según la reivindicación 49, en el que el alimento es un derivado lácteo.
51. Uso según la reivindicación 50, en el que el derivado lácteo es un queso.
52. Uso según la reivindicación 49, en el que alimento es un embutido.
53. Uso según la reivindicación 49, 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.
- 40 54. Una composición que comprende al menos los siguientes polipéptidos o complejos proteicos:
- 45 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;
- b) una 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa cuya secuencia es idéntica, al menos en un 60%, a la secuencia polipeptídica representada por SEQ ID NO:8;

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

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

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

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

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

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

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

15 j) 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.

55. Composición según la reivindicación 54, en la que el porcentaje de identidad de las proteínas citadas en los apartados a) a j) con la correspondiente secuencia representada por SEQ ID NO:4 a SEQ ID NO:44 es del 100%.

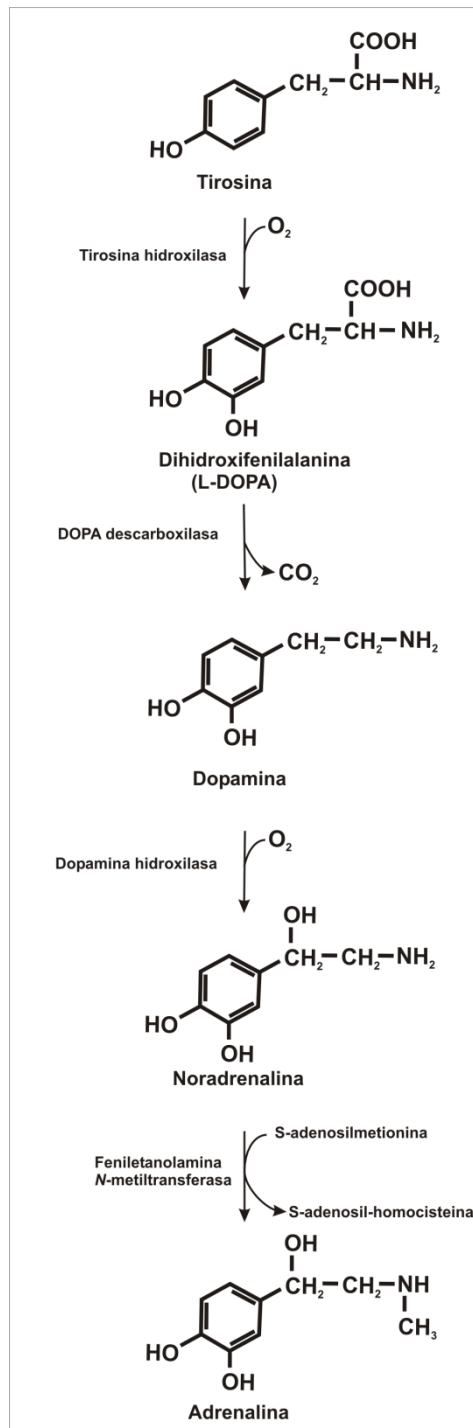


Figura 1

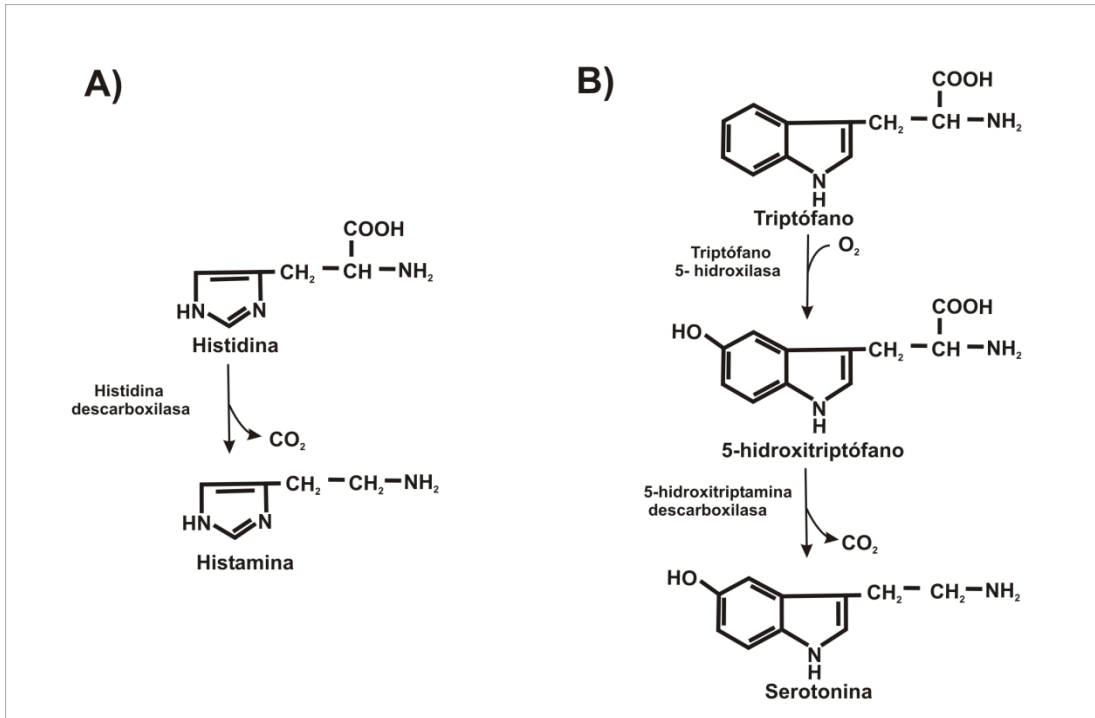


Figura 2

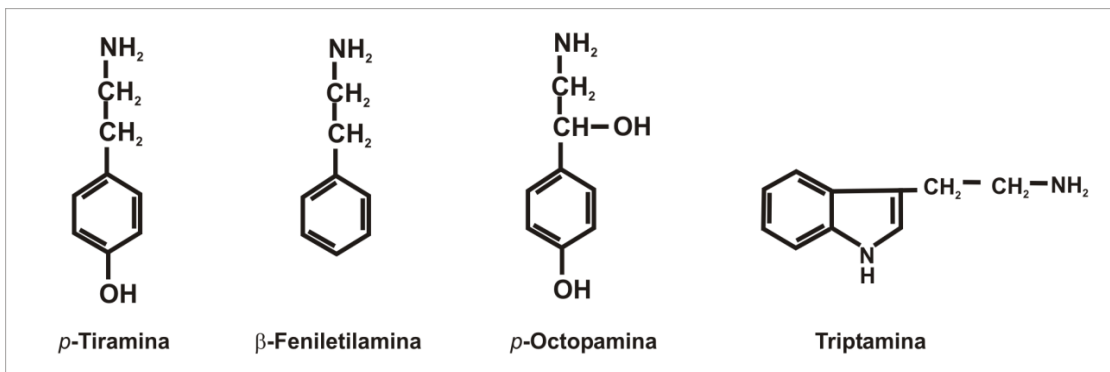
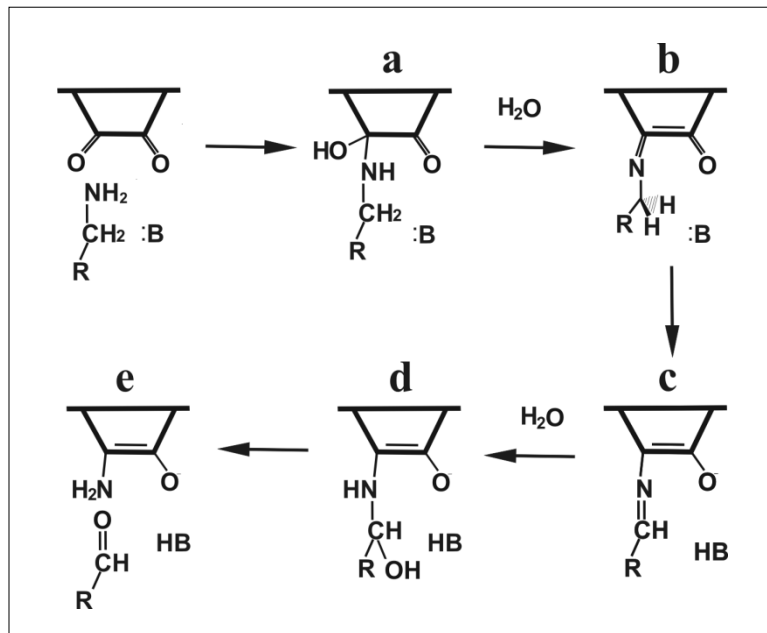


Figura 3

Figura 4

Amina biogénica		Precursor
Aminas alifáticas		
Putrescina	<chem>NCCCCCN</chem>	Ornitina
Cadaverina	<chem>NCCCCCCN</chem>	Lisina
Aminas aromáticas		
Tiramina	<chem>NCCc1ccc(O)cc1</chem>	Tirosina
Feniletilamina	<chem>NCCc1ccccc1</chem>	Fenilalanina
Aminas heterocíclicas		
Histamina	<chem>NCCNc1c[nH]cn1</chem>	Histidina
Triptamina	<chem>NCCNc1c[nH]c2ccccc12</chem>	Triptófano

Figura 5



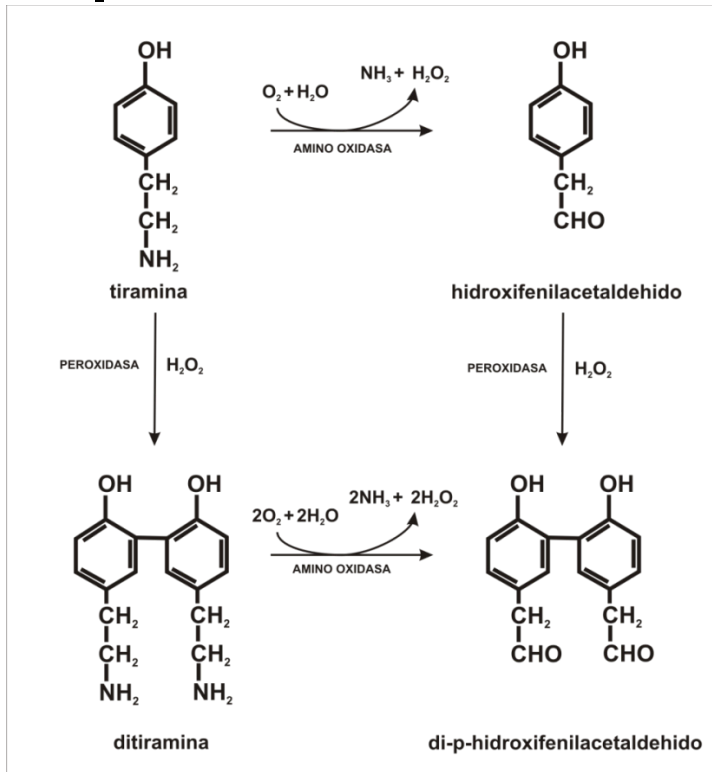


Figura 6

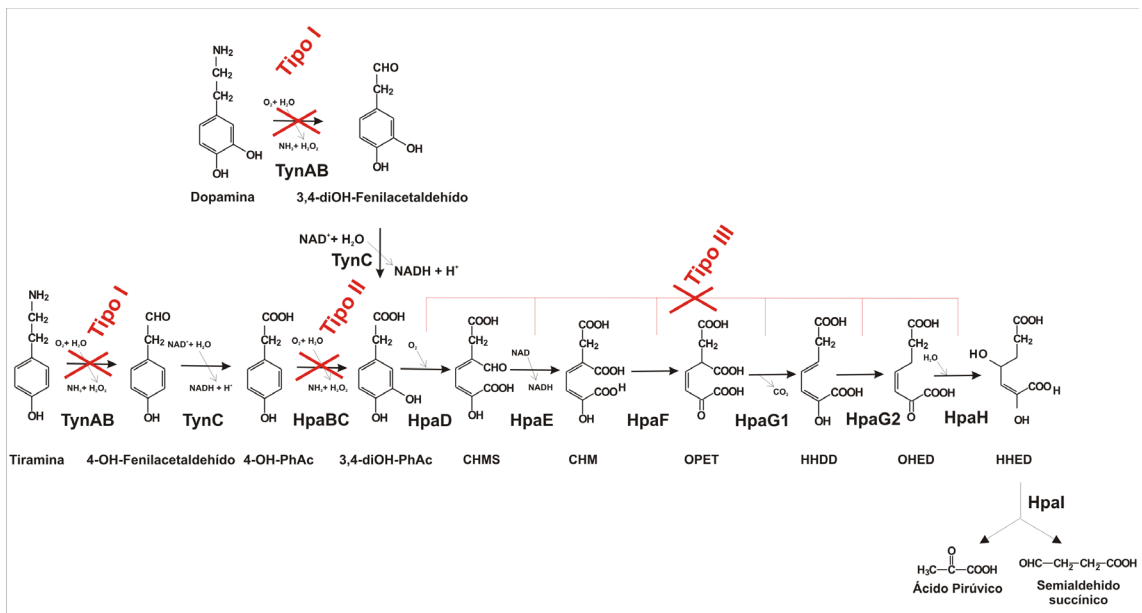


Figura 7

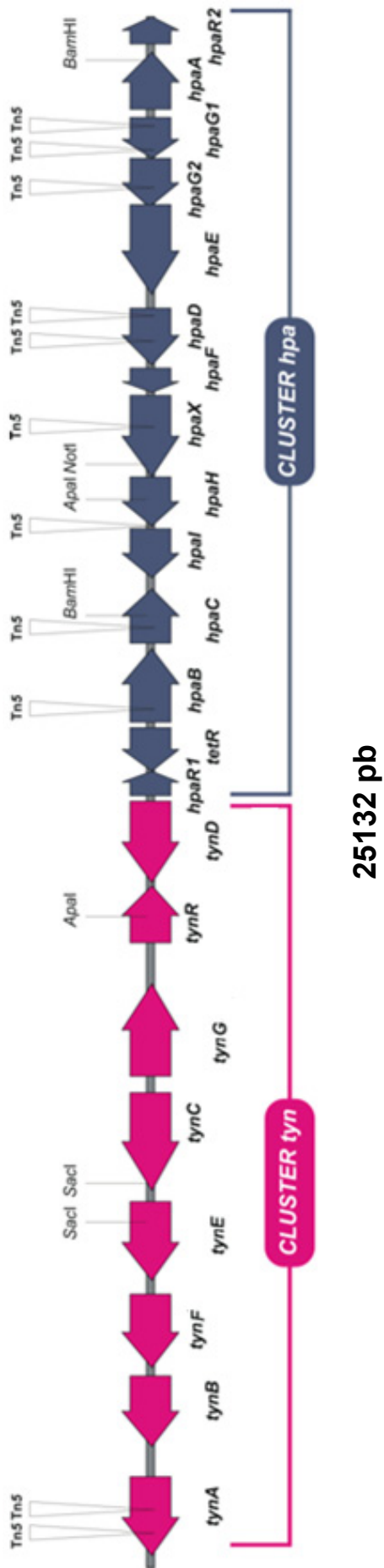


Figura 8

Figura 9

```

1 TCAGGCGAAACGCTCGAAGCGGTACGGTGACGGGTGCGATCAGCGGGGTGGCCTGGGCCACCAGGTCTGCCGCCAG
  AGTCCGCTTTGCGAGCTTCGCCATGCCACTGCCAGCTAGTCGCCCCACGGGACCCGGTGGTCCAGACGGCCGTC
-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 CTGGCCAGCAGCAGGGCAGGTGCCGAAGCCATGCCCGGAAAAGCCGGTGGCCAGGGTCAGGCCCGGAATACTGGC
  GACCGTTCGTCGTCGCCCTCCACGGCTTCGGTACGGCCCTTTTCGGCCACCGGTCCAGTCCGGCCCTTATGACCG
-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 CACCGGGCCGATGACCGGGTTGGAGTCGGGGGTGACGTCAATCGTGCCGGCCAGGGCCTGGCGATACGGGCCTG
  GTGGCCCGGCTACTGGCCCAACCTCAGCCCCACTGCAGTTAGCACGGCCGGTCCGCGACCGCTATGCCCGGAC
-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 TTCGAACACCGGCCAGGCCGCTTTTCAGGTTGCGCATGGCCCTCGTCGTTGAGGGCCGGGTTGGCGTGCGGGTCTTG
  AAGCTTGTGGCCGGTCCGGCGAAAGTCCAACCGGTACCGGAGCAGCAACTCCCGGCCAACCGCACGCCCGAAGC
-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 TACCCGTACACGCTCGAAGGGGGTTACATCCGTTGCCTTCCAGCGCCGGGCCAGGGCCAGGTCCTTGAAGAAGTA
  ATGGCATGTGCGAGCTTCCCCAATGTAGGCAACGGAAGTTCGGGCCCGGTCCCGGTCCAGGAACCTTCTTCAT
-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 CTTGCCAAAGCTGATGCGCAAAAAGTCCCGCTGGGCACGCAGCTGGGGCAGGTAACGCTTGCCAGCAGCAGGTTG
  GAACGGTTTCGACTACGCGTTTTTCAGGGCGACCCGTGCGTCGACCCCGTCCATTGCGAACGGGTGCTGCTCCAC
-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 ATCAGGGTGAGGAAGCGCTCCAGCGCGCCGCGTGGGTGATGATGTAGCCGCCGCTCTGTGCTTGCGGAAGGA
  TAGCTCCCACTCCTTCCGCAAGTCCGCGGGCGGACCCACTACTACATCGGGCGGAGGAACACGCAACGCCTTCCT
-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 AAAATCTGGTGCGCCACGGCGATGTGCGTTGGCCCGTCCATGGGCTCTGTGCGCAGCACGGAACAGGTGACGGG
  TTTTAGACCACGGGGTGGCGCTACAGCCAACGGGCGAGTACCCGAGACACCGGTGCTGCCTTGTCCAGTCCGG
-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 CAAGGTTCGGCAGGTTGATGCCAGGTTGCCGAGGAACTTGCAGCACACAGGCCACCGGCCAGCAACACCTGGTC
  GTTCCAGCCGTCCAACTACGGGTCCAACGGCTCCTTGAACGCGCTGGTGTCCGGTGGCCGGTGGTGTGGACCAG
-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 GCAGCGGATTTACCTTGCTCGGTGACCACCCCGCTGACACGGCCGGCTGCGGTGACCAGCGTGCACACCGCGCA
  CGTCCGCTAAAGTGAACGAGCCACTGGTGGGGCGACTGTGCCGGCCAGCCACTGGTGCACGCGTGGCGCGT
-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 GTTCTCCACTACCACTGCACCTTTGGCGATCGCCCGCCGGGCGATGGCGCTGGCGGCCAGGGTCGGTTCCGGCGG
  CAAGAGGTGATGGTACGTGGAACCGCTAGCGGGGGCCCGCTACCGCGACCCCGGTCCAGCCAAGCCGCGC
-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 GGCGTCGGAGGGGGTGAAGATGCCACCTGCCAATCCGCCCACACCCGGCACCATCCGGGTGATTTCCCGCGT
  CCGCAGCCTCCCCACTTCTACGGTGGACGGGTAGGCGGGCTGGTGGGCCGTGGTAGGCCACTAAAGGGCGCA
-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 GCTCAGCAGGCGCAATCCAGGCCAGCGCTCGACGCTTTTCAGCCAGCCTTCATGCATGCCATCTGCGTGTGTC
  CGAGTGTCCGCGCTTAGGTCCGGTCCGCGAGCTGCGAAAAGTCGGTTCGGAAGTACGTACGGGTAGACGCACAG
-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 GTTACGGCCGATGAACATGATGCCGGCTTGCCGATAGCCAACGTGCTGCAACCCGTGCGGGCATCTCGGCCCA
  CAATGCCGGCTACTTGTACTACGGCCGAACGGCTATCGGTTGCAGCGACGGTGGGCACGCCGTAGAGCCGGGT
-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 CAGCCGATCAGCCGCCAGTGCCAGGGAAATGTCATGGGCGTGGCCGGTGGTCTTGGCGACCCAGCCAGGTTGCG
  GTCGGCTAGTCCGGGTCACGGTCCCCTTACAGTACCCGACCCGCAACCCAGAACCGGTGGGTCCGCGTCCAAACGC
-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 CGACGACTGCTCCCCAGCGATGCGCCCTTCTCCAGCACCACCAGGATGTTGCGTTGCGGAGGCTCAGTGC
  GCTGCTGACGAGGGGTGCTACGCGGGGAAGAGGTGCTGGTGGTGGCCATACAACGCAAGCCGCTCCGAGTCCAG
-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 GGCGGTGAGGCCGATAATGCCGCCACCGATGATCACCACGGTAGTGGCGTGGGGTGGCGGGTGTGGTTTGCAC
  CCGCCACTCCGGCTATTACGGCGGTGGCTACTAGTGGTGCATCACCAGCCCCACCGCCACGACCAACCGTG
-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

1276 AGGGCGATCGTGGGAGACATGGCTTTACTCTTTGTTGTGCGTGCAGGGGGAGTGTTCAGCGCCAGCCAGCAGCC

```

ES 2 380 530 A1

TCCCCGCTAGCACCTCTGTACCAGAAATGAGAAACAACACGCACGTCCCCCTCACAAAGTCGCGGTGGTTCGTCGG
-2 P A I T P S M
← *tynA*

1351 TCACTGGCCAAGGCGGATCAGGGTCACTTTCGCTTGCCCCGCACCGCGGTAGGCGGTGACCTCCAGCTCGACCTT
AGTGACCGGTTCCGCCTAGTCCCAGTGAACGCGAACGGGGCGTGGCGCCATCCGCCACTGGAGGTGCGAGCTGGAA

1426 GTAAACGGTGGAGCCCAGCGGGCGGCGAGGTGACCGTGGTGGCGGGTTCGATGCCGCGGAACTTCTCGCCGATCAC
CATTTGCCACCTCGGGTCGCGCCCGTCCACTGGCACCACCGGCCAGCTACGGGCGCTTGAAGAGCGGCTAGTG

1501 GTCCATGACCCGTGGTACATCGGCAGGGTCTGGATGAACACGCGGAGTTGATGACATCGGCCAGGCTGGCATC
CAGGTACTGGGCACCATGTAGCCGTCCCAGGACCTACTTGTGCGCGCTCAACTACTGTAGCCGGTCCGACCCGTAG

1576 GACTGCGGCCAGCGCGGTTTCGATGTTGGCGAACACCTGGTGGGTCTGTTTCGATGACGTCTCTGGAATGACCTG
CTGACCGCGGTTCGCGCCAAAGCTACAACCGCTTGTGGACACCACAGACAAGCTACTGCAGGAGACCTTACTGGAC

1651 GGTCTGCGGGTTCGCTCCGCGGTGTTGGAGACGTGAATCCAGTTGTCCACCGCCACCAGCGGGAGTAGCTGGC
CCAGACGCCAACGACGGCCGCCACAACCTCTGCACTTAGGTCAACAGGTGGCGGTGGTCCGCCCTCATCGACCC

1726 CATGGCTTCGAACTTGGAGCCGGTTTTCAGTTTTCGATGATCTGTGTCATGGGCTTTGCCTTGTATCCGGTTGCGG
GTACCGAAGCTTGAACCTCGGCCAAAAGTCAAATACTAGACACAGTACCCGAAACGGAAACAATAGGCCAACGCC

1801 GGATCAGCTGAGAACGGGGGTTTCCAGAGGTTGAGCTTACGCGGATGCCTTGCTCGAGCGCCTTGGCGGTACAC
CCTAGTTCGACTCTTGCCCCAAAGGGTCTCCAATCGAAATGCGGCTACGGAACGAGCTCGCGGAACGCCATGTG
-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 CACGGTGGCCAGGCCACGTCTTCGACGGGCATGCGGCCACCGACATCAGGATGATTTTCGTGTCATGCAGGCG
GTGCCACGGGGTCCGGTGCAGAAGCTGCCCGTACGGCGGGTGGCTGTAGTCTACTAAAGCAGCAGTACGTCGCC
-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 GCCCGGTGGTTCGCGCTGATGATCTTGCAGATGCTTCCACCTGCTCGGCGGCCAGCGTGCCTTCGGCAATCAT
CGGGCCACGCAGCGGCTACTAGAACGGCTACAGAAGGTGGACGAGCCGCCGGTTCGCACGGAAGCCGTTAGTA
-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 GTCCATGAAGCGCACACCTACCAGCGGTACGTGGTGTGCGCAGGCTTGGGCGAGCTCTTCGAACACAGGCCCTCGTA
CAGGTACTTCGCGTGTGGATGGTTCGCGCATGCACCAACACCGCTCCGAACCCGTCGAGAAGCTTGGTCCGGAGCAT
-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 GAGCCCGGTGTTGTCACACCTTGCACGCTCGTCTGCTCCATGCCGCGCTCGATACTGCACGGGGCTGGCAT
CTCCGCCACAACAGGTGGTGGAACGCGTGCAGCAGGACAGGTACGGCCGAGCTATGACGTGCCCGGACCGTA
-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 GGCCAGGAACGCGCCAGGCTTGACCCACTCGCGGCGCACACGCGGTTACTGGCTGGGGTTCGCGGACTTCGCCCCGA
CCGGTCTTGCAGCGTCCGAACTGGGTGAGCGCCGCGTGGTTCGCCATGACCGACCCAGCGGCTGAAGCGGGCT
-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 GCTGCACTAGCTGACAGGTTCGGAACCGCGTACCACTTCTTCCAGGTTTCCACACCTGGACATGAGTGATTTG
CGACGTCACTGACTGGTCCAGCCTTGGCGCATGGTGAAGAAGGTCCCAAAGGTGGTGGACCTGTACTACTAAAC
-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 CGGGAAGCTGGTTTTACCCAGGCGACGAAGGCATCCAGGTTCTTCTGGCCACGGCCCTTGACCTTGAGGGTGTG
GCCCTTCGACCAAAAGTGGGTCCGCTGCTTCCGTAGGTCCAAGAAGACCGGTGCCGGGAACTGGAACCTCCACAG
-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 GATCAGCGGGCAGACGGCCATGAACGACGACCGTGGTCTTGGCCATCACCCCGGGCCGCGCCAGGCCGATCAC
CTAGTCCCGCTTGCCTGACTTGGCTGCTGGCACCAGAACGGGTAGTGGGGGCGCGCGGTCGCGCTAGTG
-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 CTTGGCGTCTTTCGCGCCAGGTGGCGGGCGCGACGCCGGGATGGCGCGGTCGCGTAGGCCGACAGCAGGTT
GAACCGCAGGAACGCGGTCACCGCCCGCGGTCGCGGCCCTACCGCGGCCACGCCATCCGGCTGTCGTCCAA
-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 GGCCGACATGTGTGCCAGTGGCGCGCCGGTTCGCGCATCGTTGAGGGTGAACATCAGGATCGAGCGGGGCGAGGCC
CCGGCTGTACACACGGTCAACCGCGCGCCACAGCCGTAGCAACTCCACTTGTAGTCTTAGCTCGCCCCGTCCGG
-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 TTTCTACGGTTGGCGATGTTTCGAGCCGTACCACTTGGCGCCTGCGGTCTGGAAGTTGCCGCGGAGGTACGCCGG
AAAGAGTGCCAACCGCTACAAGCTCGGCATGGTGAACCGCGGACGCCAGACCTTCAACGGCGGCTCCATGCGGCC
-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 CATCGCCATCATGCGCCGGTTCGCGGTTGGGCTTGGGATGTTGGGAATGGCGAGTGTGCGGGGAGGTAATCAT
GTAGCGGTAGTACGCGCCAGCCGCCACCCGAACCCGTACAACCCCTTACCGCTCAGGAGCCCTTCCATTAGTA
-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

2776 CGCGCGCTGCGAGTTCGCTGTTTCGCGCCGGCATGCGGTAGTACCCCTGGTACAGCAGGCCGAACATTTCTTCCAT
GCGCGGCACGCTCAGCGACAAGCCCGGCCGTACGCCATCAGTGGGACCATGTCGTCGGCTTGTAAAGAAGGTA

ES 2 380 530 A1

```

-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 GGTGTCGACACAGGCCGGCATGTCGGTGACGCCGGCACGGATCATGTCCTGCTCGGACAGGTAGATGAAGTCAAT
    CCACAGCTGTGTCCGGCCGTACAGCCACTGCGGCCGTGCCTAGTACAGGACGAGCCTGTCCATCTACTTCAGTTA
-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 TCTGGTATCGAGGGTCATGGCGGGTCTCGCAGGGCTGGCTGCCGTCCGATTTGTTGTTGGTTTCGAGGCAACCAG
    AGACCATAGCTCCCAGTACCGCCCAGAGCGTCCCAGCCAGCGCAGCCTAAACAACAACCAAAGCTCCGTTGGTC
-2  R T D L T M
        ← tynB
3001 TTTTCGCTAACGACTGGTAGGTCGTCTTGTGTCTGCCTGCCAGCCGAGTTGACCGTCAGTGCCAGGGCTTCAATGG
    AAAGCGATTGCTGACCATCCAGCAGAACACAGACGGACGGTCCGGCTCAACTGGCAGTCACGGTCCCAGAGTTACC
-3  H
3076 CCCGCGAGCGAGAAGCTGGCCGGGGTGTGGCGCAGGCTGAGGGCGGTGACAGGCGACACCACCAGGGTGCACAGG
    GGGCGCTCGCTCTTCGACCCGGCCCCACACCGCGTCCGACTCCCAGCCAGTCGTCGGTGTGGTGGTCCCACGTGTC
-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 GCCAGCAGCGCGGCCATGCGGTCGGGCCGTGGTTGAGTACCACTGCGGCCAGCGGGGCGCGCCGGCAGACGCC
    CGGTCGTCGCGCCGGGTACGCCAGCCCGGCACCAACTCATGGTGACGCCGGTCCGCCCGCGCGCCGGTCTGCGG
-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 GACAGCTGGATGGCGCCCAGCAGCGCTGCGGTGGAACCCAGTGCCTTTTCTTGGCAGGCCATCACCAGCGACATC
    CTGTCGACCTACCCGCGGGTTCGTCGCGACGCCACCTTGGGTCACGGAAAAGAACGCTCCGGTAGTGGTTCGCTGTAG
-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 AGCGTCGACTCGGCTATCCCAGGCCGAACAGGGCTATCACCATGCCGCCGGCCACACCTGGCAGCCCCAGGCCG
    TCGCAGCTGAGCCGATAGGGGTCCGGCTTGTCCCAGATAGTGGTACGGCGCCGGTGTGGACCGTCCGGGGTCCGGC
-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 GTCAGTGACCCGAGCAGGCTGATGCAGGCACCGCCGGCCATGCACAGCAGGCCACCCGAGTCAAGGTATTGAGG
    CAGTCACGTTGGCTCGTCCGACTACGTCCGTGGCGCCGGTACGTGTCGTGCGGGTGGGCTCAGTTCCATAACTCC
-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 CCCAGCCGGCTGATCAGGTGGCTGGCCGTATGGCGCCGAGCAGGATCGACACCCCGGTGGCGCCAACAGCAGG
    GGTCCGGCCGACTAGTCCACCGACCCGGCAGTACCGCGGTCGTCTAGCTGTGGGGCCACCGCGGTTTGTGCTCC
-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 CCGAAGCCCTGGGCGCTCAGGCCGTAGTGGCCGTGACACCAGGGTGGCACC GCCGATGTAGGCGAACAGGAAG
    GGCTCCGGACCCGCGAGTCCGGCATCACCCGGACCATGTGGTCCCACCGTGGCGGCTACATCCGTTGTCTTCC
-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 AAGAATACCGCAGCAACCCGAGGGTCCGGCGCAGGAAGCGCGGTCGGCGAGGATGGCCAGGTAGGTGCTGCAG
    TTCTTATGGCGTCTGTTGGCGGTCCAGCCCGCTCCTTCGCCGCGACCCGCTCCTACCGGTCCATCCACGACGTC
-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 GCGTGGCCCAGGCGCAGGGGTTGCGGTTTGTGCGGCCGAGGGTTTCGGGCAGGTTGAGCAGGCTGTTGACCAGC
    CGCACCGGGTCCGGTCCCAAGCGCAAACGACCCCGCTCCCAAGCCCGTCCAGTCTCCGACAACCTGGTCCG
-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 ACCGTCACGCCCATGCCGGCAGTACCAGCATTACTGCACGCCAGCCGAAATGTGCGTCGATCACGCCGCCAGG
    TGGCAGTGGGGTACGGCCGCTCATGGTCTGAATGACGTGCGGTCGGCTTACACGCAGTGTAGTGGCGGGGTC
-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 GCAGGTGCCAGGATCGGTGCGACGCCCTTCGATGGTCATCAGCAGGGCGAACAGTTTGGTCCGGCCACGCCCTGG
    CGTCCACGGTCCAGCCACGCTGCGGAAGCTACCAGTAGTCGTCGCCGCTTGTCAAACCAGCGCCGGTGCGGGACC
-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 CTCACATCACGCACCATGCTCATGATCACCACCAGGGTCAGCGCACTGCCAGGCCCTGGAAAAAGCGCAGCATG
    GAGTGTAGTGCCTGGTACGAGTACTAGTGGTGGTCCCAGTCGCGTGACGGTCCGGGACCTTTTTCGCGTCTGTAC
-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 ATCAGGGTGTGAGGCTGGGGGCTGCGGCTGCGCCAGCGAGCACAGGATGAACAGCAGCAGGCCCGCCAGCAGC
    TAGTCCCAGAGCTCCGACCCCGACCGCCAGCGGGTCCGTCGTCCTACTTGTGTCGTCGTCGCGCCGGTCCGTCG
-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 GGCTTGGCCCGGCCATAAGCGTCGACGATGGGGCCGAAGATCAGCTGGCCGGCGCCCATGGCCAGCAGGAAGAAG
    CCGAACCGCGCCGATATTGCGAGCTGCTACCCCGCTTCTAGTGCACCGCCGCGGGTACCGGTGCTCCTTCTTC
-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
4126 GTCAGTGTGAGCTGTACGCGGGTGAAGCTAGCCTGATAGTGGCTGGCGATTTCCGGCAGGCTCGACAGGTACATG
    CAGTCACAGTGCACATGCGCCACTTCGATCGGACTATCACCAGCCGCTAAAGCCGTCGAGCTGTCATGTAC
-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

```

ES 2 380 530 A1

4201 TCGACGGCGGAAGGGCCGAGGGCGCCGATCAGGCCTAGGCCAGGGCGAAGCTGAAGGGTATGGGAGGGGAGGGA
 AGCTGCCGCTTCCCGGCTCCCGGGCTAGTCCGGATCCGGGTCCCGCTTCGACTTCCCATACCCTCCCTCCCT
 -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 TTGGCTTGATGGTTTTCTCTGGCTGATTTTTTCGCTACCGACCGGTAGGTTTTCGGAATATTTATTCGCCGAGTCG
 AACCGAACGTACCAAAAAGAGACCGACTAAAAAGCGGATGGCTGGCCATCCAACCGTTATAATAAGCGGCTCAGC
 -3 N A Q M
 ← *tynF*

4351 GCCAAGGTCAAACCTTCCGCAAGGCCACTGATTCCTGTGGGGAGCGGGCATGCCCGGAACACCGGCAAAGCCG
 CGGTTCCAGTTTGGGAAGGCGTTCGGTGACTAAGGACACCCCTCGCCCGTACGGGCGCTTGTGGCCGTTTCGGC

4426 GTGCCACCGAGTCGCCTTCTTCGCGGGCATGCCCGCTCCACATTGACCGCAGAGGTTGGTTACCGTGGTTGCGT
 CACGGTGGCTCAGCGGAAGAAGCGCCCGTACGGGCGAGGGTGTAAGTGGCGTCTCCAACC AATGGCACCAACGCA

4501 CAGAACGGCACAGCCACGGTTCAGTGGCTATACACATTGGTACCATTCCCGCCACCTGGTTGCCGCCGTTGCTC
 GTCCTGCCGTGTCGGTGCAGTCGACCGATATGTGTAACCATGGTAAGGGCGGGTGGACCAACGGCGGCAACGAG
 -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 TCGTCTTCCGCGGCTGGTAAAGGCCACACGGGGCTGATTATCAGGTGCTCGTTGACTGCCCATTCACATAC
 AGCAGGAACCGCGCGACCATTTCCGGGTGGTCCGCCGACTAATAGTCCACGAGCAACTGACGGGTAAAGGTATG
 -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 AGGTCCAGTCCCGCGCATCGAGTTGAGGCTTTCGCGGGTGCCTACGGTGTGCAAGTCAAGTACAGCGCCCCG
 TCCAGGTTCGAGGGCGCGTACGCTCCAACCTCGAAAGCGCCACGCATGCCACAGCTTCAGCTTCATGTCGCGGGGC
 -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 ACTGTGAGATTTCCAGCGGTGTCGCCTTACGCCCCACATGGTGGATACCCGTGTTGCTGTTGAAGGGGCCGGC
 TGACACTCTAAAAGGTCCGCACAGCGGAAGTCCGGGTGTAACCATGGGACACGCAACTTCCCGGCCCGC
 -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 TAGTTGGCAGCGACTTACCCCTGGAACACAGGTGCCGTAACCGCTGGACAGGCGCTGAACAGCGGCTCCAGCCT
 ATCAACCGTCGCTGAAGTGGGACCTTGGTCCACGGCATTGGCGACTGTCCGGCGACTTGTCCGCCAGGGTCGGA
 -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 GCCGAGTAGCGGGTGTAGCGGTAGGTAACCTGCGGTGCCACGGCAGGTCCGGCAAGGTGTAGCCGGCCTGCAGG
 CGGTCATCGCCACATCGCCATCCATTGGACGCCACGGGTGCCGTCCAGCCGCTTCCACATCGGCCGGACGTCC
 -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 TACCAGGCTTGTCCGGGCGTCCGGTCTTGTCTGCCAGGCGTATTCGAAGGCGAAACTGGCATTGTGCATGCCA
 ATGTTCCGAACGAGCCCCGCGCAGCAGAAACAGGACGGTCCGCATAAGCTTCCGCTTTGACCGTAACAGCTACGGT
 -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 GCGTTGCCCTTCGCCGCGCACGCTATACACGTCCATGCCTTCCGGGGCTTCTGAAAGTTCGCTGGCCCATTTGGTCC
 CGCAACGGAAAGCGCGCGTGCATATGTGCAGGTACGGAAGCGCCGAAAGACTTTCAGCGACCGGGTAACCCAGC
 -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 GTGACGTCGATGCCGTGAATCCAGGTTCAGCCGAGGGTGCCTAAGGCTTGGGTGTAGTCCAGCGTCCCGCGGCC
 CACTGCAGTACCGCACTTAGGTCCAGTCCGGGCTCCACGGGTTCCGAACCCACATCAGGTTCGACGGCCCGCCG
 -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 AGTTCGGTTTCGGCCTGGGCGCGGTTGTCCGATTTACGCCACAGCAGGCTGCCATGCAGGCCATCGCTGCCCCCC
 TCAAGCCAAAGCCGACCGCGCAACAGCCTAAAGTCCGTTGTCGTCGACGGTACGTCGGGTAGCGACGGGGG
 -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 AGGCGCAGCATTGCGGTGCGGTGCAAGGCGTGGCGGGCGCCAGGTAGTAGGCCCGCCGCGGTCCAGCGCACCG
 TCCGCGTGTAAACGCCACGCCAGCTTCCGCACCGCCCGCGGTCCATCATCCGGGGCGGCGCCAGGTTCGCGTGGC
 -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 TCGGCGACCGCTTGCAGGTTCCGGCCGTCGTCGTTGATCAAAAAACCACTGCCAGGCGAATGGTCTGGCGG
 AGCCGCTGCGGCAACGGGTCCAAGCCCGCAGCAGCAACTAGTTTTTTGGTACGGGTCCGCTTACCAGACCGCC
 -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 CCGGCGAAACGTCCACTCCATCCTTGCAGCAGCCGGAAACAGGTTCGGCCGAGCGCCAGCCGAGGAAGCGTCT
 GGCCGCTTTGACAGGTAGGTAGGAACGGGTTCGTCGCTTGTCCAGCCGCTTCGCGGTTCGGCTCCTTCCGCGA
 -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 TCGATCTTGGTGGTGCCTTCGAGCCATCGGTGTTGCCGGCCGATCGCCATCGCCCCAGGTGGCCGAGCTCACC
 AGCTAGAACCACCGCAAGCCTCGGTAGCCACAACGGCCGCGGTAGCCGTAGCGGGTCCACCGGCTCGAGTGG
 -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 CAGTTCAGGCTGCCGTACAGCGTCCGTTGCCGGCCAGGCCCTGGTACCAGCTGAGGCCATACTTGATAAAGCCT
 GTCAGTCCGACGGCATGTGCGACGGCAACGGCCGGTCCGGGACCAGTGGCGACTCCGGTATGAAGTATTTCCGGA
 -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

ES 2 380 530 A1

5626 TCACGCCAGGTCGAACCCCTGTGGTGCCGTCGTAGTTCCTGCGGCTGTTGAACATGCCCCATACCGCCAGCATG
 AGTGGCGTCCAGCTTGGGGGACACCACGGCAGCATCAAGAACGCCGACAACCTTGTACGGGGTATGGCGGTCTGATC
 -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 TCGGCGTTCAGGTGGCTGTTCATCGTCGGCGTACAGCTCAACGGCCGGCGGGCCCTGGCTGGCCAGCAAGGTTGCC
 AGCCGCAAGTCCACCGACAGTAGCAGCCGCATGTCGAGTTGCCGGCCGGCGCCGACCGACCGGTTCGTTCCAACGG
 -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 AGGGCCAGGCTGGACAGCGTCTGTGGTTTGACCATTTGCACATCCCTCGTTTGTCTCGGCCACCTTCACAGGGG
 TCCCGGTCCGACCTGTTCGAGACACCAAACCTGGTAAACGTGTAGGGAGCAAACAAGAGCCGGTGGAAAGTGTCCCC
 -3 L A L S S L T Q P K V **M**
 ← *tynE*

5851 CCTTTGTTGTTTCGGGGGACCCCTCGGTTCTGGCGAGGGCCATCGCGGTTGGCGGCGATGGCCATATTAGGGCGTG
 GGAAACAACAAGCCCCGTGGGAGCCAAGACCGTCCCCGTAGGCCAACCGCGCTACCGGATAATCCCGCAC

5926 TGGCGTGGGGCGGGTCTTGTTCGTGGCTGCCAAGGCGCTTGCACGCCCTTGGCCACAGGCGGGTTCAGTAGCGGA
 ACGCCACCCCGCCCCAGAACAAGCACCGGTTCCGCGAACGTGCGGAACCGGTGTCCGCGCCAGTTCATCGCCT
 -1 Y R I

6001 TCATCACCGACTTGAGCTCGGTGAAGTTCATCGATGAAGGCCGAGCCGAACCTCGCGGCCAATGCCGGAAGCCTTGA
 AGTAGTGGTGAACTCGAGCCACTTCAGTAGCTACTTCCGGCTCGGCTTGAGCGCCGGTTACGGCCTTCGGAACT
 -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 TGCCCCCAAACGGTACAGCCGGTTCGAGCAGGGTGTGCATGTTGACCCACAGGGTACCGGCTGGATTGCGGGA
 ACGGGGTTTGCCATGTCGGCCCCAGTCTCCACACGTACAACCTGGGTGTCCCATGGCCGGACCTAAACGCCCT
 -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
 AGTACGCGTACCGAACGGTCCAGCAACCAGGTGTCGACCGCGACTCCGGCATCCCGCTCCGCAAGTAGTCCA
 -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 GCAGCAGTTCGTCTTCGTCTCATAAGGCAGGAAGTTCGCCACAGGGCCGAAGGTTTCTGGGTGAGCAGGGTGT
 CGTCGTCAAGCAGAACGACAGTATTCCGTCCTTCCAGCGGTGTCCCGGCTTCCAAAGGACCCACTCGTCCACACA
 -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 CGCAGGCTGACCGGGCAGGATTACCGTGGGTTTCGACGAAACAGCCGGGGCCGTGCCCCAGGGTGGCCCGGTGAA
 GCGTCCGACTGGCCCGCTCCTAATGGCACCCAAGTGTCTTGTGCGCCCCGGCAGCGGGTCCACGGCGGCACTT
 -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 TGATCTGGTGCCTTCGGCGGGCGATGGCGAACAGTTCGGCCAGCTTCTGCTGGTGGCGCTTGTGGCCACGG
 ACTAGACCGACGGAAGCCGCGCCGCTACCGCTTGTCAAGCCGGTTCGAAGACGACCACCGCGAACACCGGTGCC
 -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 GGCCGAACCTGGGTGGCCTCGTCCAGTGGCGAGCCGATTTTTCAGTTGGCCAGGCGCTGGGACAGGGCGTCCAGCA
 CCGCTTGACCCACCGGACAGGTACCGCTCGGCTAAAGTCAACCGGTCGCGGACCCGTGTCGCGCAGGTCTG
 -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 GCGGGTCGATGCGCGAGCGGTGCACATAGAAGCGCTCGCCCGGGCGCAGATTTGCCCGAGTGCAGGAAGCCGG
 CGCCAGCTACGCGCTCGCCACGTGATCTTCGCGAGCGGGCGCCGCTTAAACGGGGTCCACGCTCTCGGCC
 -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 CCTCGATGATGCCGTCACAGCCTTGTTCGGTTGCCACGTCGGGCAGGAAGGCCACCGGCTTCTTGGCCCGCAGTT
 GGAGCTACTACGGCAGGTTCGGAACAGCCAACCGTGCACCCGTCCTTCCGGTGGCGCAAGAAGCGGGTCAA
 -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 CCAAGTTCGACCGGGTTCAGCTTGGCGCCCATGGCAGCCTGGCCTACGGCGATGCCAGTGGGCACGGAGCCGGTGA
 GGTACAGCGTGGCCAGTGAACCGGGTACCGTTCGGACCGGATGCCGCTACGGTACCGGTCACCGGTGCTCGGCCACT
 -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 ACGAGACCTTGTTCGGTACCTGCGTGCATCAGTGCCTTGGCCACCAGGCCACCACCGGTTCAGCAGTTCAGTG
 TGCTCTGGAACAGCCATGGACGACGAGTAGTACGGAACGGGTGGTCCGGTGGTGGCCAGTTCGCAAGTAC
 -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 CACCGCCGGCAGGCGCTGCTTCGGTGGCCAGTTCGGCAATGCGCAGCAGCGTCAGCGGGTGAATTGCTGGGCT
 GTGGCCGGCGTCCGACGAAGCCACCGTCAAGCCGTTACGCGTTCGTCGAGTCCGCCCCACTTAAGCAGCCCGA
 -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

6901 TGAGGATAATGCTGCAGCCGTTGTTCAGGGCCAGGCCAGCTTCCAGATGGCGATCATGCTGGCGAAGTTCACG
 ACTCCTATACGACGTCGCGCAACAGTCCCGGCTCCGGTCAAGGCTTACCCTAGTACGACCGCTTCAAGGTGC
 -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

ES 2 380 530 A1

CGTGCTACGGGTGGTGGTTCGCGTTAGCCGAGCGCGTCCCCTCCGCGACATCGCGAGTGGCCGCTTGCTCCCCT
-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 GCGACGGGGTGATGGTCTGGCCGGTGATCTTGGTCGCCAGCCGGGCTAGTAGCGCAGGAAGTGGCGGGCTGCT
CGCTGCCCCACTACCAGACCGGCCACTAGAACCAGCGGGTCGGCCGCATCATCGCGTCCCTTACCGCGCCGGACGA
-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 GTACTTCGAACGCACGGAAATGCCGATGAGCTTGGCGGATTGCAAGGTTTCCAGCTGCGCCAGTCTTTCGCGGT
CATGAAGCTTGGCTGCCCTTACGGCTACTCGAACGGCCTAACGTTCCAAAGTTCGACGCGGTCAAGAAGGCCA
-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 TGGCTTCCAGCAGTTCGGCCAGCTTGAACAGCACTGCGGCGGGCGGGGGCTGGTGTGCGACCAGCGGTAA
ACCGAAGTTCGTCAGCCGGTTCGAACCTTTCGCTGACGCCGCGCCGCGCCCGCCACACGCTGGTCCGCCATT
-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 AGCCTTGGCGCGAGGAGCTGACGGCATGGTGCACATCGGCCGTTGGCGTTCGGCGATGTGGCGATGGTCTGGC
TCGGAACCGCGCTCCTCGACTGCCGTACCAGCTGTAGCCGGACCAACCGCAGCCGTACACCCGCTACCAGACCG
-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 CGTTGGCCGGGTTGACCACGGCAATGTTTCGACGACGACTGGCTGGCGAGGTGCTGGCCGTTGGATGAACACGCCAT
GCAACCGGCCAACTGGTCCGCTTACAAGCTGCTGCTGACCGACCGCTCCACGACCGGCACCTACTTGTGGCGTA
-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 GCTCGCGGGCCAGGAAGCCGTGACGGCAGGTAGGAGGGTGTGTCGCTCATGCAGACTCCGGGGCAGTTGGCCA
CGAGCGCCCGCTCCTTCGGCACTGCCGTCCATCCTCCACTACAGCGAGTACGCTGTGAGGCCCGTCAACCGGT
-1 E R A L F A T V A P L L T I D S **M**

← *tynC*

7501 AAGTTTGCAGCTTAATAAGCGGGCAGTGCGGTGTGTGCTGCGTGACAGGTGCATGACTGTGGCTGCCAAC
TTCAAACGTCGAATTATTGCCCCGTCACGCCACGAACCGACGCACTGTCCAGTACTGACACCGACGGTTGG

7576 GCACTGGGTAAGCCTTGTGGGAGCGCCCTTGTGTGCGATAGGGCCGACAGCGGGCCCGCGATGTTGGCGGGC
CGTGACCCATTTCGGAACACCCCTCGCCGGAACACAGCGCTATCCCGCGCTCTCGCCGGGGCCGCTACAACCGCCG

7651 AAGCTGAAAATGCTGGGGCCGCTTCGCGCCCTATCGCGACGCAAGGCCGCT CCCACAAAAAAGCGAGCGTAGG
TTGCACTTTTACGACCCCGCGAAGCGGGGATAGCGCTGCGTTCCGGCGA GGGTGTTTTTTTCGCTCGCATCC

7726 CCGGGCTGATGCTGGCAGGCAGCAACAAGCCCGCGGCAGCCATCGGCAAGACGCCATGCCACCGGCAGCGCAC
GGCCCGACTAACGACCGTCCGTGCTGTTGTTGCGGCCGCGCTGCGGTAGCCGTTCTGCGGTACGGTGGCCGTCGCGTG

tynG →

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

7801 AGTAATCACTCGTTCAACGCCACAAAAACAAGCCGGGGCATAACGATGTCACTCAATAACAAGCTCACCGAGCACC
TCATTAGTGAGCAAGTTGCGGTGTTTTGTTCCGGCCCGTATGCTACAGTGAGTTATTGTTTCGAGTGGCTCGTGG

+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 TCAACCGCGGCACTGTGCGTTTCCCACCGCACTGGCCAGCACTGTGCGGCTGATCATGGCCAGCCCGGTGATCC
AGTTGGCGCGGTGACAGCCAAAGGGGTGGCGTGACCGGTCGTGACAGCCGACTAGTACCGGTTCGGCCACTAGG

+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 TCACCGCGACCATGGGCTTGGCATCGGCGGCAGCGCCTTCGCGGTGGCCATGGTTCATCGCCGCACTGATGATGC
AGTGGCGCTGGTACCCGAAACCGTAGCCCGCGTTCGCGGAAGCGGCACCGGTACCACTAGCGGCGTACTACTACG

+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 TGGCGCAGTCCACACCTTTCGCGAGGCTGCGTGCATCCTGCCGACCAAGCGGCTCGGTATACGACTACATCAACT
ACCGCGTCAAGTGGTGGAAACGGCTCCGACGCAGCTAGGACGGCTGGTGGCCGAGCCATATGCTGATGTAGTTGA

+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 GTGCGATGGGCGTTTCTTCGCCATTACCGGCACGCTGTGCGCCCTACCTGATCGTGCATGTGTTTCGCCGTTACCG
CACCGTACCCGCAAGAAGCGGTAATGGCCGTGCGACAGCCGGATGGACTAGCACGTACACAAGCGGCCATGGC

+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 CCGAAACCATCCTGTCGGGGTGATGGCGCTGGTGAACCTTCGAGCACCTCAATACCCTGGCGGAATCCGCCGGCG
GGCTTTGGTAGGACAGCCCCACTACCGGACCACTTGAAGCTCGTGGAGTTATGGACCCGCTTAGGCGGGCCG

+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 GTTCGTGGTGTGCTGGGGTGTGCTTCGTTGGTGGCGTTTTCGCGTGTCAATGCCTTGGCGTCAGCGCCTTCAGCC
CAAGCACCGACGACCCCCACAGAACCCAGCCGCAACGCCACGAGTTACGGAAACCGCAGTTCGCGGAAGTTCGG

+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 GCGCGAAGTGGTCTCACCTTCGGCATGTGGACCACTTGATGGTGTTCGGCGTGGCTTGGCCCTGATCGCCGCAC
CGCGCCTTACCAGGAGTGAAGCCGTACACCTGGTGGAACTACCACAAGCCGACGAACCGGACTAGCGGGCGTG

+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 CCGCAGTGGAACTGGACGCGCCGTTCCGGGTGTGCGTGGTGGGCACCGACTGATGACCATCCTTCGCTGGTCCG
GGCGTACCTTGACCTGCCGGGCAAGCCGCACAGCGACCCCGTGGCTGGACTACTGGTAGGAGAGCGACCCAGC

ES 2 380 530 A1

+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 GCATGGCCATGTTTCATGTTGCTTGGCTGCGAGTTCGTACGCGCTTGCCCGGAACTGCGTTCGGCTCGGCCTGGG
 CGTACCGGTACAAGTACAAGCAACCGACGCTCAAGCAGTGCAGCGAACGGGGGCTTGACGACGAGCGCGGACCC

+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 TGCTGCGCGGGCCATGGGCTGGGCCTGTTTGGCGTGGCCAGCTGCATGTTTCATCTACGAGCGGCGATGAAGC
 ACGACGGCGCCCGTACCGCGACCCGGACAAACCGCACCCGGTTCGACGTACAAGTAGATGCTCGCCGCTACTTCC

+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 GCCAGGTGAAAACGTGGTGGTGGATGCCGCCAGTGGCGTGCACCTGCTGGACACGCCCATGGCCATCCCGCGCT
 CGGTCCACCTTTTGCACCACGACCTACGGCGGTACCGCACGTGGACGACCTGTGCGGGTACCGGTAGGGCGCGA

+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 TCGCCGAGCAGGTGATGGGTGATATTGGCCAGTGTGGTGGGTATCGGCTTCTGTTTCGCGCGCGCGCCACCA
 AGCGGCTCGTCCACTACCCACTATAACCGGGTACACCCGACCCATAGCCGAAGGACAAGCGGCCGCGCCGGTGGT

+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 TCAACACGCTGATGGCCGGTGTGCCACGCATTCTTTACGGCATGGCGGTGGACGGCGCGTTGCCAAGGTGTTCA
 AGTGTGCGACTACCGGCCACACGGTGCCTAAGAAATGCCGTACCGCCACCTGCGCGCAACCGGTTCCACAAGT

+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 CCTACCTGCACCCGCGCTTCAAGACGCGCTGCTGTGCATCCTGGTGGTGGCGTTGATCCCTTGCCTGCATGCCT
 GGATGGACGTGGGCGCGAAGTTCTGCGGGCAGCAGCAGTAGGACCACCACCGCAACTAGGGAACGGACGTACGGA

+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 GGTACCTGGGCGGCAACCCGGACAACATCCTGCACCTGGTGTGGCGCGGTGTGCGCCTGGAGCACCGCCTACC
 CCAATGGACCCGCGCTTGGGCTGTGTAGGACGTGGACCAGACCGGGCGCACAGCGGACCTCGTGGCGGATGG

+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 TGCTGGTGACCCTGTCGGTGGTGTATTTGCGCATCCGCCGCCAGACCTGCCGCGTGCCTACCGCTCGCCGCTGT
 ACGACCCTGGGACAGCCACCCTATAACGCGTAGGCGCGGGTCTGGACGGCGCACGGATGGCGAGCGCGCGACA

+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 TCCCGTTGCCGAGATATTCTCCAGTAGCGGTATCCTCATCGGCATGGCGTTCATCACACCGCGGGCATGAACC
 AGGGCAACGGCGCTATAAAGAGGTTCATCGCCATAGGAGTAGCCGTACCGCAAGTAGTGTGGCGGCCGCTACTTGG

+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 CTGCCGATGCTACGTGCCGTTCCGCATCATGCTTGGCGCCACTGCGGCCTATGCATTGTTCTGGACGCTGTGGG
 GACGGCTACAGATGCACGGCAAGCGGTAGTACGAACCGCGGTGACGCGGATACGTAACAGACCTGCGACACCC

+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 TGCAGAAGTCAACCCGTTCAAGCCGGCGCGGGTTCGAGGATGTGCTCGAGAAAGAGTTTGTGCGGAGCCTGGCC
 ACGTCTTCCAGTTGGGCAAGTTCCGCGCGCCAGCTCCTACACGAGCTCTTTCTCAAACGACGGCTCGGACCGG

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

9376 CGCCCAGGCGCCACGCTGGCATGCCTGGCGCGCAACCTGGGGCAGCAGAACCTGGTGGCGCGCGGGGTGATCCAC
 GCGGGTCCGCGGTGCGACCGTACGGACCGCGGTTGGACCCCGTCTTGGACCACCGCGCGCCCACTAGGTTG

9451 GACCCGCGCCAGGGTTGGCAGGCCACGGTGCACGAACCGCTCGAGGCCACCTGCTGATGCACATCGTACCTGT
 CTGGGCGGGTCCCAACCGTCCCGTGCACCGTGTGCGCAGCTCCGGGTGGACGACTACGTGTAGCAGTGGACA

9526 GAGTTCAGCTGCAGTTGCTGCTCCGCAAGGGGCGAGGTCAGCTGGAGCTGCGCCATACCGGTGCGCTTCCG
 CTC AAGGTGACGTC AACGGACGAGGCGTTCCCCCGCTCCAGTCCGACCTCGACGCGGTATGGCCACGCGAAGCG

9601 CGTGCCGGCTGGCCTGTGTGTACCGCAAGGGCGACCGGGCGCGCTTCCGCCGACTGCGCGACCGGTTGCTGCAG
 GCACGGCCGGACCGGACACACATGGCGTTCCCGTGGCCCGCGCAAGCGGGCTGACGCGCTGGCCAACGACGTC

9676 CAGGCCGACTGGTGGCGCGCTGATGCCGCTGGATTTCAAGCGCTGACCTTGGCCTGGCGCGACGGCCAATGG
 GTCCGGCGTGACCACCGCGGACTACGGCGACCTAAAGTTCGCGGACTGGAACCGGACCGCGCTGCCGGTTACC

9751 TTGCTGACCTGGAGCACATGGGCGGTAGCGAAGTGGTCAACCGCATGCCAGCGTTTCGCGCTACATCCCCTAC
 AACGACTGGGACCTCGTGTACCCGCCATCGCTTACCAGTTGGCGTACGGTTCGCAAGCGGGCATGTAGGGGTAG

9826 AGCCCGCAACAGCGGGCGCACCTGATGGCCAGCCTGGCCAGTTCAACACTTTGCTACCTAACCTTTGACGCAAA
 TCGGGCGTTGTCGCCCCGCTGGACTACCGGTTCGACCGGGTCAAGTTGTGAAACGATGGATTGGAAACTGCGTTT

9901 CTGGCATAACGCTTGTGTATCAAGCGACGAATGATGACAGTTGTGCGCACATAGATAACATGTTAACAATGTGC
 GACCGTATGCGGAACGACATAGTTGCTGCTTACTACTGTCAACACGCGTGTATCTATTGTACAATGTTACACG

tynR →

+3 M H T Q Q S N R Q G L E R W
 9976 GCATAACAACAATCTGCGTTCGAGGGCAGCCATGCATACTCAACAATCCAACCGTTCAGGGGCTGGAACGCTGGA

+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

ES 2 380 530 A1

10051 CCACGGCCATGCAACAGATCTGTGGCCGTTTCGAGACGGAACTTGCCTCCAATCACTCGCTGTTTCATCGGCGAGG
GGTGCCGGTACGTTGTCTAGACACCGGCAAAGCTCTGCCTTGAACGCAGGTTAGTGAGCGACAAGTAGCCGCTCC

+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 TTTCTACCTTTTCCCGTGC CGGCTTGCCGCTGGCCAACTGCGCACCAATGCCGCAACATCCGCCGGCTGGGGC
AAAGATGGAAAAGGGCACGGCCGACGGCGACCGGTTGGACGCGTGGTTACGGCCGTTGTAGGCGGCCGACCCGC

+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 AAAACCCGACCCCTTGACGATGACCAGCATTGTTTCTGCTGAGCCAGCGTGC GGCGCATTCACCCGTGTCCAGG
TTTTGGGCTGGAACTGCTACTGGTCTGTAACAAAGGACAGTCCGTCGCACGCCCGTAAGGTGGCACAGGGTCC

+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 GGGGCATGCAGGTGACCTGGCGCCGGGTGAGCTGCTGCTGATGGATTCCGTCGGGCGTGC GAAATCACCCCA
CCCCGTACGTCAGTCCGACCGCGGCCACTCGACGACACTACCTAAGCCAGCCCGCAGCGCTTTAGTGGGGT

+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 GTGGTTGATCGAACATGTCTCGTGGCCCTGTGCGTGCAGCAGGTACGCAAGTATGTGCAAGGACGGCGCCGA
CACCAACTAGCTTGTACAGAGCGACCGGGACAGCGCACTCGTCCATGCGTTTCATACAGCTTCCGTGCGCCGGT

+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 TGTTTGGCAAGATCTCCTCGAGCAACGCTGCGGGCGCATGCTGCATGTGCTGATGGACCAACTGTGCAAGGACG
ACAAACCGTTCTAGAGGAGCTCGTTGCGGACGCCCGCTACGACGTACACGACTACCTGGTTGACACGTTCTCTGC

+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 GCAATGTAAGCGGTGATGGGGCCAGGGCGACGCGCTGCAGACCGCCTTCATTGCCCTGCTGGAGCCAGGCTTCG
CGTTACATTCGCCACTACCCCGGTTCCCGTGC GCGACGCTGCGGGAAGTAACGGGACGACCTCGGTCCGAAGC

+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 AGGCCATGGCGAAGCGCTGGGCAACCTTGGGGCCTTGAACGGGGCCAACCTGCCGGGGCTACGTGCAGCAGGTGA
TCGCGGTACCGCTTCGCGACCCGTTGGAACCCCGAACTTGCCCGGTTGGACGCCCGATGCACGTGCTCCACT

+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 TCGACGAGTCCCTGTCACAGCCCGGGCTGACCCCGTCCAACTGCGCGGTGCCTGAACATCTCGGTGCGTCAAC
AGCTGCTCAGGGACAGTGTGCGGCCGACTGGGGCAGGTTGGACCGGCCAGCGGACTTGTAGAGCCACGCAGTGG

+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 TGTACCGGTGTTTCGAGGAGGAGGCGATAGTGTGTGCCCTACATTACGCGGGCGCGCCTGAAGCGCAGTGGCG
ACATGGCCGACAAGCTCCTCCTCCCGCTATCACACACGGCGATGTAAGTCGCCCCGCGGACTTCGCGTCAACGC

+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 ATGACCTGCCAACCCGTTCTTCAAGGAGCGAGTGCATTACCTCGATTGCCTACAAGTGGGGGTTTACCGACTCGG
TACTGGACCGGTTGGGCAAGAAGTCTCGCTCAGCTAATGGAGCTAACGGATGTTACCCCCAAATGGCTGAGCC

+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 CGCATTTACGCGCTCGTTC AAGAAACAGTTCGAAACGCTGCCCCAAGGACTACCGGGCGCAGGCGATGGTTT GAG
GCGTAAAGTCGGCGAGCAAGTCTTTGTCAAGCTTGCAGCGGGTTCCTGATGGCCCGCTCCGCTACCAAACCTC

10951 TGTGATGGTGTGCTTGTGCGGGCCTCATCGCCGGCAAGTCACTTGGCGGCGGTTTCAGCGACGGCCGTTGAAGTA
ACACTACCACGACGAACACGCCCGGAGTAGCGGGCGTTTCAGTGAACCGCCCAAGTTCGCTGCCGCAACTTCAT
-2 R R G N F Y

11026 GCCCGACAGCTGGTGCACGGTCTTGCCGGCAGTGAGCAGCAGCGGGCGGAAATGGTCTTGCCGAGGATGCGCGC
CGGCTGTGACACCGTGCAGAAACGGCCGCTACTCGTCTCGCCCGCCTTACAGGAACGGCTCCTACGCGCG
-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 ATGCTTGACCGAGCTGACCAGGTCATAGCGCTTCGATCCCTCCTGCATACCCTCGGCGAGTATCTTGCAAATGAT
TACGAACCTGGCTGACTGGTCCAGTATCGCGAAGCTAGGGAGGACGTATGGGAGCCGCTCATAGAACGTTTACTA
-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 GTGGCTGGGCGTGACGCCAAAGCCGGAGTAGCCCTGCACATAGAAAGCGTTGGGGCGGTTGTGCGAGGGTGCCAT
CACCGACCCGCACTGCGGTTTCGGCTCATCGGGACGTGTATCTTTCGCAACCCCGCAACAGCTCCCACGGATA
-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 CTGCGGAAACAGGTTGGCACTGGTGGCCATCGGGCCGCCAGGCGAGTGCATGCGCACGCTCTTTCAGGTAGGG
GACGCTTTGTCCAACCGTGACCACCGGTAGCCCGGGCGGGTCCGGTCCAGCTACGCGTGCAGAAAGTCCATCCC
-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 GAAAATCTTCAGCATCAGCGCGCGGTTCCACGCCTTCAGGTCACGCGGGAAGTGTGCTGACGAAAGGGCGTGGCGGC
CTTTTAGAAGTCTAGTTCGCGCGCAAGGTGCGGGAAGTCCAGGTCGCCCCCTCACGAGCTGCTTCCCGCACCGCCG
-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 GCCAAACAGCAGGCGGTTCTCGCGGGTGACCCGGTAGTAGTTCGATCACCGGGCGGATGTGCTGTAGGCCCCGCG
CGGTTTGTGCTCCGCCAAGAGCGCCCACTGGGCCATCATCAGCTAGTGGCCCGCTACAGCGACATCCGGGGCGC
-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

ES 2 380 530 A1

```

ATAGCCCGACTACGCGAGCTAGTCGAGTAGGCCGTTACCGAGCCAGTAGTAGACCTCCCGTATCCACAAATATCA
-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 GCGTGCCTGACGCTGCGGGTCCAGCTTGTGTGAGGAAGCTGTCGCACGCCACAGCAGCTTGTGCGCGCTACCGA
CGCACGCACGTCGACGCCGAGGTGCAACAACCTCCTTCGACACGCTGCGGGTGTGTCGTAACGACCGCGCATGGCT
-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 GCCACGGCCGGTGCCTACCGTGTGCGCTCGCCGTAGGTCACTTCCAGGGCCGGGCTGTGTTCGAAGATGCGCGC
CGGTGCGCGCCACGCATGGCACTACGCGAGCGGCATCCAGTGAAGGTCCCGGCCGACACAAGCTTCTACGCGCG
-2 G R G T R V T I R E G Y T V E L A P S H E F I R A
11701 ACCATGGCCCACAGTGCCTGCGCTTCGCCCCAGCAGAGGTTCAAGGAATGCACATGGCCACCGCCCATGTGCAT
TGGTACCGGGTGGTACGGACGCAAGCGGGTGTGTCGTCGAAGTCCCTTACGTGTACCGGTGGCGGGTACACGTA
-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 CAGGGCGCTGCTGTAGGCGTTGCTGCCGATGATCTGGCGCACTTCCGCTGCCACCGAGAAAACGGATCTCGTCGCG
GTCCCGCAGCAGACATCCGCAACGACGGCTACTAGACCGCGTGAAGCGACGGTGGCTCTTTTGCCTAGAGCAGCGC
-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 GGTATTGATCGCCTTGAACGCCTTCTCCCATTTGCGCAGGGTCTGTTCCTGGCGCGGGTTGAAGCCCATGTAGCC
CCATAACTAGCGGAACCTTGGGAAGAGGGTAAACCGCTCCAGACAAGGACCGCCGCAACTTCGGGTACATCGG
-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 ATAGCCGTTGGCAGAAGTCGGCGTCGATGGCGTAGCGGGCGATGCGGTCCTTGATGATGCCGGCGCCAGTTCGCT
TATCGGCACCGTCTTCAGCCGAGCTACCGCATCGCCGCTACGCCAGGAAGTACTACGGCCGCGGGTCAAGCGA
-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 GATTTCGAAAATATCCCTCACGCCCTGATCACCGACGCTGCTGCGGATCTTCTCCAGGTCGTGGCCGATGCCCGC
CTAAAGCTTTTATAGGGAGTGGCGGACTAGTGGCTGCGACGACGCTTAGAAGAGGTCAGCACCGGCTACGGGGC
-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 CATGATCTGCCCGCGTTGCGCCCGCTACCGCCGTAGCCAGATAACGGCCCTCGAGCAGCAGCATATTGGTCAC
GTACTAGACGGCGCGCAACCGGGCGATGGCGGCATCGGGTCTATTGCGGGAGCTCGTGCTGTATAACCAAGT
-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 GCCTTGTTCCGCCAGCTCCAGGGCGGTGTTAATGCGGAGAAAACCGCCACCGATCACACGACATCGGCCCTCGAT
CGGAACAAGGGCGTTCGAGTCCCGCCACAATTACGGCCTCTTTGGCGGTGGCTAGTGGTGTGTAGCCGGAGCTA
-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 GTCGCGTTCAGGGTGGGAAGCTCAGGTTGTACTTCTTGGTTCGCGGAGTAGTAGTGGGGCTCTCGAGGGTGT
CAGCGCAAGGTCCCAACCCCTTCGAGTCCAAACATGAAGAACCAGCGGCTCATCATCCACCCCGAGAGCTCCCACTA
-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 CATGACCGCCGCTGCTGACTGAAATGGGTAGAAATCATCTATTAATGTATTAATGATTGTGCACTGGCATACT
GTACTGCGCGGACGACTGACCTTTACCCATCTTTAGTAAGATAATTACATAATTACTAACACGTGACCGTATGA
-2 M V G G A S Q F H T S I M
                                     ←-tynD
hpaR →
+3 M T T P R P S L T L T L L
12376 CGCCGGTTTGTCTATTTCCAGCCTCCTTGAGCCCGCATGACCACACCGAGACCCTCCCTGACCCTGACCTTGTGTC
GCGGCCAAAACGATAAAGGTCGGAGGAACCTCGGGCGTACTGGTGTGGCTCTGGGAGGGACTGGGACTGGAACGAC
+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 AGGCGCGCAAGCCACCATGGCGTTCCTCCGCCCGCGCTGAATGCCATGACCTGACCGAGCAGCAATGGCGGG
TCCGCGCGCTTCGGTGGTACCACAAGAAGCGGGCCGCGACTTACGGGTACTGGACTGGCTCGTCGTTACCGCC
+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 TAATCCGTATCCTGCGCCAGCAAGCGAGCTGGAAGCCATCAGTTGGCGGAGCTGGCCTGTATCCTCAAACCCA
ATTAGGCATAGGACCGGGTTCGTTCCGCTCGACCTTTTCGGTAGTCAACCGCTCGACCGGACATAGGAGTTTGGGT
+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 GTATGAGCGGGGTGCTCAAGCGCCTGGAGCGTGAAGGCATCGTAGCGCGCGCAAGTCCGCCGAGGACAGCGCC
CATACTCGCCCCACGAGTTCGCGGACCTCGCACTGCCGTAGCATCGCGCCGCTTACGCGGCCTCCTGGTCCGG
+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 GGTGTTTCATCAGCCTGACCGAGGCGCGCCAGCAAGCGTTCCTGGCGATGAGCGAGGAGATGACCCGCAACTACG
CCCACAAGTAGTCCGACTGGCTCCGGCCGGTTCGTCGAAGACCGCTACTCGCTCCTCTACTGGCGGTGATGC
+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 ACAAGATCCTCGCCAGTTTGGCGATGACAAGCTGCAGCAGCTGATGCAGCTGCTGGGTGAAATGAAGAAGATCA
TGTTCTAGGAGCGGGTCAAACCGCTACTGTTTCGACGCTCGTGCAGTACGTCGACGCCACTTTACTTCTTCTAGT
+3 K P ■
12826 AACCTGACCGCCAGGCGTCAGCGGTTGAGTGACAGCGAGTCTCCAGCACTTTCAGCAGTGTGCGCGCGCC

```

ES 2 380 530 A1

TTGGGACTGCGCGGTCCGCAGTCGCCAACTCACTGTCGCTCAGAAGGTCGTGAAAGTCGTCACGACGGCGCGGG
-1 ■ R N L S L S D E L V K L L A A A R R

12901 GCTCATAGGCGTCGGGGCCTGCGTACATCAGCTCTACATACAGGCTGTCGATGATGCCAGGTAGGCATCGGCAT
CGAGTATCCGCAGCCCCGGACGCATGTAGTCGAGATGTATGTCCGACAGCTACTACGGGTCCATCCGTAGCCGTA
-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 ACAGCGCCAGGCGGCTGTGCTGCTCATGCGCCAGCCGTGGCGAGCTTGCAGGGCCACGCTGAACCCCTTCGCGTA
TGTGCGGGTCCCGCAGACGACGAGTACGCGGGTCGGCACCGCTCGAACGTCGCCGTGCGACTTGGGAAGCGCAT
-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 TGCCGTCCAGTACTGTTCAAAGCCCCAAGTGACAATCGGCTTGTATGCCGCGCGGGGGCAGGAACGCCGTGCGCA
ACGCAGGTCCATGACAAGTTTCGGGCTTCACTGTTAGCCGAACTACGGGCGGCCCCCTTCCTTGGCGCAGCGT
-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 ACACGAAGCGCAGTTGGGCGAGTCGCGATAACGTTTCGGCCAGGTGCAGGGCCAGCCAGTCCCGCGCCAGGC
TGTGCTTCCGCGTCAACCCGCTCAGCGCTATTGCAAGCCGGTCCACGTCGCCGTGCGGTACGGGCGGGCGGTCCG
-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 CGTCGCGGGCTTCTGCGCAAAGCCGTGCTCGACAAAGGCCGTTTCTGCAACAAGCGCACGCTGGAACACCTCCA
GCAGCGCCGAAAGACGCGTTTCGGCAGGAGCTGTTCCGGCAAAGGACGTTTCGCGTGCACCTTGTGGAGGT
-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 CGAAACAAGCGCTCCTTGTGGCGAAATGCGCATAACGCGATGCCTTGCAGTATGCCGCCAACTGGGCGATTTCGT
GCTGTTCCGCGAGGAACAACCGCTTACGCGTATGTCGCTACGGAACGCGTACGGGCGGTTGACCCGCTAAAGCA
-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 TCACGGAAGAGGCGTCATAACCGTACTCGGCGAAGTGGCCGACGGCGGCATCGCACACAGCACCCGAGAAGGGG
AGTCGCTTCCGCGAGTATGGCATGAGCCGCTTACCGGCTGCCGCCGTAGCGTGTGCGTGGCGTCTTCCCC
-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 AAAGTCTTTCAACAGCATCACTCCGTCAGGGGCGGGCGGGCCGCGCGTCTTGAGGGTGGGATTGTGGTGAT
TTTCCAGAAAGTTGTCGTAGTGAGGCAGTCCCGCGCCGCCGCGCGCAGAACTCCCACCCTAACACCACTA
-1 L D K L L ■

← **tetR**

13501 CGAAAATGCACGGGTCAATGCTTGTGCGAAGGCAATTTCCGGGCGCCATGGAAAGTGAATGTTCCCTCGTAAC
GCTTTTACGTGCCAGTTACGAACAGCGTTCCGTTAAAGGCCGCGGTACCTTTACGTTACAAGGGGAGCATG
+3 **hpaB** →
■

13576 GTGCATTCCCTCCACCCAATCGCCGCTCACATACTGATCGCGTCTTGAATCCAATAAGAAAGAGACCGCTCATGA
CACGTAAGGAGGTGGGTTAGCGGGAGTGTATGACTAGCGCAGAAGCTTAGGTTATTTCTTCTCGGCGAGTACT

+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 AAAAGCCAAACCCCTGCTGGAAGACCTGAAGTCCGCTCGCCACCATTGCCGCAATGCCATGCGTGCAGAGC
TTTTCGGTTTGGGGACGACCTTCTGGACTTCAGGCAGGACGGCTGGTAACGGCGGTTACGGTACGCACGCTCTCG

+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 AGGACCGCAGTGTCCGGCAGAGAATATCGCCTTGTGAAAAGCATCGGCATGCACCGCGCTTTCTTGCCCAAAC
TCCTGGCGTACACGGCCGCTCTTATAGCGGAACGACTTTTCGTAGCCGTACGTGGCGGAAAGAACGGGTTTG

+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 ACTTCGGCGCATGAAATCACCCGCGGAGTTCGCCAGTGCATCGCCTTGTGGCGGGGCTGCGCCAGCA
TGAAGCCGCGTACCTTTAGTGGGACGGCCTCAAGCGGGTCACGTAGCGGAACGACCGCCCGGACGCGGTCTG

+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 CAGCCTGGCCATGAGCCTGCTGTGCACCCACAGCCACCAGATGGCAATGTTCTCGCCAAAGCTACAACAGGAGG
GTCGGACCCGGTACTCGGACGACAGTGGGTGTCGGTGGTCTACCGTTACAAGAGCGGGTTCGATGTTGTCCTCC

+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

13951 TGTGGGTAGCGACCCGGATGCTACCGCCAGCAGCAGTATCGCGCGTTCGGCCGACTGAAGAGGTTGAGGGTG
ACACCCATCGCTGGGCTACGATGGCGGTCGTCGTATAGCGCGGCAAGCCGGCGTACTTCTCCAACCTCCCAC

+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 GCGTGTGTTTACGGCGGAAATGGGCTGGAGTTCGGGTTGCGACCAGCCGAATGGGCGATTCTCGGTTTCCGCC
CGCACAGCAAGTCGCCGCTTACCCGACCTCAAGGCCAACGCTGGTGGCGCTTACCCGCTAAGAGCCAAAGGGCG

+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 GCAAGAATGCCAAGGCGCTCAGGATTACTGCTTCGCCATCCTGCCTCGCAGTACTATGAAATCCGTGATGACT
CGTCTTTACGGCTTCCGCGAGTCTTAATGACGAAGCGGTAGGACGGAGCGTCACTGATACTTTAGGCACACTACTA

+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 GGTATGCCGTGGGCATGCGCGGACGCGGACGCAAGACCTGATCGTGCGTGTGCTTTCGTCGCCGAGCACCAGCA
CCATACGGCACCCGTACGCGCCGTCGCCGCTGTTCTGGGACTAGCACGCACTACGGAAGCACGGGCTCGTGGCGT

ES 2 380 530 A1

```

+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 TCCAGAAGGCCAAGGACATGATGGAGGGCAAGTCGGCGGGCTTTGGTTTGTACCCCGACAGCAAGATTTTCTTCG
  AGGTCCTCCGGTTCCCTGTACTACCTCCCCTTCAGCCGCCGAAACCAACATGGGGCTGTGCTTCTAAAAGAAGC

+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 CCCCATATCGCCCGTATTTTGCCAGCGGCTTCTCCACGGTCAGCTTGGGCGTTGCCGAGCGCATGCTGGAGGTTG
  GGGGCATAGCGGGCATAAAACGGTCGCCGAAGAGGTGCCAGTCGAACCCGCAACGGCTCGCGTACGACCTCCACA

+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 TCCGCGAGAAAACCCGCAACCCGCTGCGTGCCTACACGGTGTGCGTGGGCGCCGCCACCCCGGCGCTGATGC
  AGGGCTCTTTTGGGCGTTGGCGCACGCACGGATGTGCCACGACGGCACCCGCGGCGTGGGGCCGCGACTACG

+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 GCCTGGCCGAGTCGACCCATCAGGTGGCCGCTGCCCGGGCATTGCTGGAAAAGAGCTGGGACGAGATTGCCGAGC
  CGGACCGGCTCAGCTGGGTAGTCCACCGGCGACGGGCCCGTAACGACCTTTTCTCGACCTGCTCTAACGGCTCG

+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 ACAGTGCCTGTCACGAATACCCGTCGCGTGGCAGCCTGGCGTTCTGGCGTACCAACCAGGGCTACGCCGTGAAGA
  TGTACGGGCGAGTCTTATGGGCAGCGCACCGTGGCAGCCGAAGACCGCATGGTTGGTCCCGATGCGGCACTTCT

+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 TGTGCATCCAGGCCGTCGACCCGCTGATGGAAGCGGCCGGTGGTGGCGCCTGGTTCCGAGAGCAACGAACTGCAGC
  ACACGTAGTCCGGCAGCTGGCGGACTACCTTCGCCGGCCACCACCGCGGACCAAGCTCTCGTTGCTTGACGTGC

+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 GGCTGTTCCGCGATTTCGCACATGACCCGTCGCCATGCCTACACCGATTACGACGTGTGTGCGCAAACTCCTCGGCC
  CCGACAAGCGCTAAGCGTGTACTGGCCACGGGTACGGATGTGGTAATGCTGCACACAGCGTTTAGGAGCCGG

+3 R E L M G L E P D P A M V ■
14776 GCGAGCTGATGGGCCTGGAGCCTGACCCGGCGATGGTCTGAGCCGCCACTTGTTTTCACCCATCCCCTACAAGCA
  CGCTCGACTACCCGGACCTCGGACTGGGCGGCTACCAGACTCGGCGGTGAACAAAAGTGGGTAGGGGATGTTCTGT

+1
  hpaC →
  M S K E T F D S R A
14851 CAACAACAACAGGGCAGGCTGCCAGGCCTGCCCGGGAGTCTTGCATGTCAAAGAAACCTTCGATTCACGTGCC
  GTTGTGTTGTTGTCCCGTCCGACGGTCCGGACGGGCCCTCAGAACGTACAGGTTTCTTTGGAAGCTAAGTGACCGG

+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 TTCCGCCGCGCCCTGGGCAACTTCGCCACCGCGTACCGTGGTACTGCCCGCGCCAGTGGCCGCAAGGTC
  AAGCGGCGCGGGACCCGTTGAAGCGGTGGCCGCACTGGCACCACTGACGGCGGGCGGGGTACCGGCGTTCGAG

+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 GCGGTTACCGCCAACAGCTTCAACTCGGTGTGCTGGACCCGGCGCTGATCCTGTGGAGCATCGACAAGCGCTCC
  CCGCAATGGCGGTTGTGCAAGTTGAGCCACAGCGACCTGGGCGCGACTAGGACACCTCGTAGCTGTTCCGCGAG

+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 ACCAGCCATGAAGTGTTCGAAGAGGCCTCGCACTTTGCCGTGAACATTCGGCTGCGGACCAGATCGACCTGTCC
  TGGTCCGTTACTTCAACAAGCTTCTCCGAGCGTGAACCGCACTTGTAAAGCCGACGCTGGTCTAGCTGGACAGG

+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 AACAACTTTGCCCGCCCGAAGGAAGATCGCTTTGCCGGTATCGACTACGAGACCGGCACTGGCGGCGCGCGGTTG
  TTGTTGAAACGGGCGGGCTTCCTTCTAGCGAAACGGCCATAGCTGATGCTCTGGCCGTGACCGCCGCGCGGCAAC

+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 TTCGCCGATTGCGCGGCGCGCTTTGAGTGTGAAAAGTACCAGCAGCTGGACGGTGGCGATCACTGGATCCTGGTG
  AAGCGGCTAACGCGCCGCGGAACTCACACTTTTCATGGTCTGCGACCTGCCACCGCTAGTGACCTAGGACCAAC

+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 GGCAAGGTAGTGGCCTTTGATGACTTTGGCCGCTCGCCGCTGCTGTATCACCAGGGCGCCTATTCAATGGTGTG
  CCGTTCATACCCGAAACTACTGAAACCGGCGAGCGGCGACGACATAGTGGTCCCGCGGATAAGTTACCACGAC

+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 CCGCATACCCGATGACCAAGGCGCAGAGGGGCGGACCCGAGCAGCCACTTCCAGGGCCGCTGCGACACAAC
  GGCATAGGGGCTACTGGGTTCCGCGTCTCCCGTCCGTTGGCTCGTCCGGTGAAGTCCCGCGGACGCTCGTGTGTG

+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 CTGTACTACCTGATGACCCAGGCGCTGCGTGCCTACCAGGCTGACTACCAGCCACGCCAGCTGTGTACCGGCGCTG
  GACATGATGGACTACTGGGTCCGCGACGCACGGATGGTCCGACTGATGGTCCGGTCCGGTCCGACATGGCCGGAC

+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 CGCACAGCGAGGCGACGATGCTGATGGTGTGGAGAACGATGCGGGCCTGAGCCTGAACGACCTGCAACCGCAAC
  CGTGGTCCGCTCCGTGCGTACGACTACCACGACCTTTGCTACGCCCGGACTCGGACTTGTGGACGTTGCGCTT

```

ES 2 380 530 A1

+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 GTGGCGATGCCGGCGCGGAGATCGGGAAGCGGTTGCCAACCTCAAGCGCAAAGGGCTGATTGCCGATGACGAA
CACCGCTACGGCCGCGCCCTCTAGCTCCTTCGCCAACGGTTGGAGTTCGCGTTTCCCGACTAACGGCTACTGCTT

+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 GGGCGAGTGGCGGTATCGGTGAAGGGCGTGGACGAGACCAGGCGTGTGGACCATTGCCCGGCACAGCAGGAC
CCCCTCACGCCGATAGCCACTTCCCGCACCTGTCTGGCTCCGCAACCTGGTAACGGGCGGTTGTCTGCTCTG

+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 AAGGTGTTGGGGCAGTTCAGTGAACAGCAGCTGGAGACTTCAAGACCGTGCTCAAGGCCCTTATCAACATCTGA
TTCCACAAGCCCGTCAAGTCACTTGTCTGCGACCTCTGAAAGTTCTGGCAGAGTTCGGGAATAGTTGTAGACT

15826 ACACGCTTTGGGATGGCACCGGCTGTTTTGGATGGCACCGGCTGTGCCGGTGTTCGCGGATGAACCCGCTCCCA
TGTGCGAAACCCTACCGTGGCCGA^{CAAAACCTACCGTGGCCGACACGGCCACAAGCGCCTACTTGGGCGAGGGTG}

15901 ^{AGGTCCAGCGCCAGTAGCAACTTCGGCGCGGTACCTGTGGGAGCGGCTTTAGCCCGCAACACCGGCAAAGCCGGT}
^{TCCAGGTCGCGGTATCGTTGAAGCCGCGCCATGGACACCTCGCCGAAATCGGCGCTTGTGGCCGTTTCGGCCA}

15976 GCCATCCAACCAGAAGCCTCAGTAGGCACCACCCCGGCACTGGGACTACCACTGTATCCTTGAACCTCCCCGC
CGGTAGGTGGTCTTCGGAGTCACTCCGTGGTGGGGCCGTGACCCTGATGGTGACATAGGAACCTGAAGGGGGC
-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 CAGTCTCGCGCAGCCCGCGCATCAGCACCGTGGTATCCACACCCACCGCCACAAACGCCGACCCAGCTCGATGTA
GTCGAGCGGTTCGGGCGCTAGTCTGGCACCATAGGTGTGGGTGGCGGTTTTCGGCGTGGGTCGAGCTACAT
-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 GCGTCGCGCAGTTTCTCGTCCGCGTGAGAATGCCGGCGGCTTTGCCCGCTTGCCAATGCGCAGATTGCGTC
CGCAGCGCGGTCAAAGAGCAGGCGGACTCTTACGGCCCGCAAACGGGCGGAACGGTTACGCGTGTAAACGCAG
-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 TTCAATCGCCCGCTGCACCTCCGGGTGCCCGGGTTGCCCGATGCCCATGGCCGCACTCAGGTCTGCAGGCC
AAGTTAGCGCGGACGTGGAGGCCACGGGCCCAACGGCGCTACGGGGTACCGCGGTGAGTCCAGACGTCCGGG
-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 GATGAACACGCCATCCACACCTTCCACTGCAACGATCTCGTCCAGGTGGCCAGGCCTTCTTGTCTCGATCTG
CTACTTGTGCGGTAGGTGTGGAAGGTGACGTTGCTAGAGCAGGTCCAACCGGTCCGGAAGGAACAGAGCTAGAC
-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 CACCAGCAGGCACATTTGCTCATCGGCGTGGTCCAGGTAACCGGGGAGGGTGTTCAGCGCGAAGCCCGCGCCAG
GTGGTCTCGTGTAAACGAGTAGCCGCACCAGTCCATTGGCCCTCCACAAGTTCGCGCTTCGGGCGCGGTC
-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
GCGCGACGGTGGGGCGCTTACGGGAACCCGCCATTACGTACCGGAACCTGGTCAACGGCGCGGACAAGCCGCTCA
-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 TTCCACCATCGGCACCAGCAAGGTTTGTGCGCCGATATCCAGCACCTGCTTGTATCAGCGCGGTATCGCCGATCAC
AAGGTGGTAGCCGTGGTCTTCCAAACACGCGGCTATAGGTCTGGACGAACTAGTTCGCGCCATAGCGGCTAGTG
-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 GGGCGGATCACTGCCTGGCTGGGGTAGGGTGCCACCGCTGCAACTGGGCGAGCATGCCGCGCAGGTCTGTGGG
GCCCGCTAGTGACGGACCGACCCATCCACGGTGGCGGACGTTGACCGCTCGTACGGCGGTCAGCAACCC
-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 CGCGTGTTCGCGCTCGATCAGCAGCCAGTCGAAACCGGCATTGGCCGCCAGCTCGGCGCAGTAGGCATCGGCCAG
GCGCACAAGCGGACGCTAGTCTCGGTGACGTTTGGCCGTAACCGCGGTCGAGCCGCGTCATCCGTAGCCGGTC
-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 GCCGAGCCACAGGCCGATTTGCGGTTACCCTGTGCAGGCGTGCCTTGAAGTGGTTGATGGGCATGTCCATGAG
CGGCTCGGTGTCGGCTAAACGCCAAGTGGCGACAGTCCGCGGCAACTTCAACCACTACCCGTACAGGTTACTC
-2 G L W L G I Q P E G S H L R R K F H N I P M D ^M
← hpaI

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

16876 CGGCGACCGGGCGGGTGAACGAACCCCAAGGATGATCTGGCCGGGCTGCAAGGTGACGTCGTACGGCGCCAGTT
GCCGCTGGCCCGCCACTTGTCTGGGGTTCTACTAGACCGGCCGACGTTCCACTGCAGCATGCCGCGGTCAA
-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 TGTGGCCAGCCAGGCAACGCCTTTGGCCGGGTGGTTGAGCACGGCAGCGCTGACCCCGGATTCTCGATCACGG

ES 2 380 530 A1

ACAACCGGTCGGTCCGTTGCGGAAACCGGCCACCAACTCGTGCCGTCGCGACTGGGGCCTAAGGAGCTAGTGCG
 -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 CATTGCGGTAGAGCACCGCGGCACTTTGCGCAGGTCGATTTGCGTGGGGCGCAGGGCCGCGCCATCACCA
 GTAACGCCATCTCGTGGCGGCCGTGAAACCGCTCCAGCTAAAGCCACCCCGCTGCCGGCGGGGGTAGTGGT
 -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 CGCCGGCATTGGCGGCGTTGTCGGAGATGGTGTGCAACACCTTGGGGTGGCCTGGGTTTGGGGTCCACCTGCT
 GCGGCCGTAACCGCGCAACAGCCTCTACCACAGCTTGTGGAACGCCACCCGACCCAAACGCCAGGTGGACGA
 -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 GGATGCGCGCTCAATGATTTCCAGCGCGGGATCACCCACTCGGTGGCGTCCAGCACATCAAACCGGTGATGT
 CCTACGCGCGCAGTTACTAAAGGTCGCGGCCCTAGTGGGTGAGCCACCGCAGGTGCTGTAGTTTGTGCCACTACA
 -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 TCGGGCCCTTCAGCGGCTTGGCGAGGATGAACGCCAACTCCACTTCAACCCGCGGCACGATGAAGCGCTCGAAG
 AGCCGGGAAGTCGCCGAACGGCTCTACTTGGCGTTGAGGTGAAGTTGGGCGCCGTGCTACTTCCGCGAGTTCC
 -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 GGATGTCGCTGCCCTTCGTCGAACAGCATGTCGTCGAGCAAGGCGCCGTAGTCCGGCTCGGTGATGTTGACGATA
 CCTACAGCGACGGAAGCAGCTTGTGCTACAGCAGCTCGTCCGCGCATCAGCCCGAGCCACTACAAGCTGCTAT
 -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 CCTGCATGGCGCGGAGGTTCAGGCCGATCTTGTGGCCACCAGCTTGGCCCGGCGGCGATCTTTTTTGCACCC
 GGACGTACCGCGCCTCCAGTCCGCTAGAACACCGGGTGGTGAACGCGGGCCCGCTAGAAAAACCGTGGG
 -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 AGGCGCGCTGGATGGCGTAGGCGTCTTCGATGGTATTGCCGGTGTCTCCAGCGAGAAGTGGCGCACTTGCTCGC
 TCCGCGCACTACCGCATCCGCGAAGCTACCACTAACGGCCAACGAGTCCGCTTTGACCGCGTGAACGAGCG
 -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 GGGAGCGTTCGGCCTGGTCGAGGCGGTGCGCGCGTGTGGATGAAAGCGTGTCTAGCATGGGGCGGTCTCTT
 CCTCGCAAGCCGACAGCTCCGCCAGCGCCGACGACCTACTTTCGCAACAGATCGTACCCCGCCAGAGAA
 -1 S R E A Q D L R D A A H Q I F A N D L **M**

 **hpaH**

17626 GATTCAAGGGTTGACGATGGCAGCCTGGGTGCGCAACACCAGCAGGCGCCAGGGCGATGAAGACGGCGAGTAC
 CTAAGTTCCCAACTGCTACCGTCCGACCCACGCGTTGTGGTTCGTCGCGGGTCCCGCTACTTCTGCCGCTCATG
 -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
 CATGTCCTGTTCCGACCGCGACACCCACCACAGCGCGTGGGTGCGCTACTTCATCCGCACTTCTTGTCTCCGCTA
 -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 GCTGCCAGCGAGCTGATCAGGGCAATGCCGCGGCGCTGGGTACGGGCGTTGAGGAACCGCGCGGCGAGTTGCCA
 CGACGGGTGCTCGACTAGTCCCCTTACGGCCGCGGACCCATGCCGCAACTCCTTGGCGCCGCGCTCAACGGT
 -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 GAACATCGGCAGCGCAGCGCTGGCGCCATGCCGCGCAGCACCAGGCGGCCATTACCGGCAGCGCCTGCTCGGG
 CTTGTAGCCGTCGCGTCCGACCGCGGTTACGGCCGCGTGGTCCGCGGTAATGGCCGTCGCGGACGAGCC
 -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 GGCAATGGCCGCAATAGCGATGCCGATGGCAGCCATCAGCAGCGGTACGCACAGGTGCCAGCGCGTTCGCGTTG
 CCGTTACCGGCGTTATCGCTACGGCTACCGTCCGTTAGTTCGTCGCGATGCGTGTCCACGGTCCGCGCAAGCGCAAC
 -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 GCGTTCGCTGGAGCGGCGCAGCCAGCATGAACACGCGCCGCGCACGTACGGCACAGCGCTGAGCAGGCGGAC
 CGCCAGCGACCTCGCCGCGTGGCGTCTACTTGTGCGTCCGCGGTCATGCCGTTGTCGCGACTCGTCCGCGTG
 -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 ACTGGCGTTCGCTGGCCACACCGGCACTGTGAATCAGGCTGGGCATCCAGAACGCAAGGGTATTACCGCCAGCAT
 TGACCGCAGCGACCGGTGTGGCCGTGACACTTAGTCCGACCCGTAGGTCTTGGCTTCCCATAAAGTGGCGGTGTA
 -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 CACCGCGCAATACCGGCCACCAACAGCCACAGCGCACGGCTTGCGAAAATGGCGCCGAACGAGGTTACGGGCTT
 GTGGCGGTTATGTGCCGTTGGTGTGCGGTGTCGCGTCCGAAACGCTTTTACCGCGGTTGCTCCAATGCCCGAA
 -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 GCGTGTCTTCTTCCACCGAATTGCGCGCGCAGCGTGGCTTCTGCTGCTCATCCAGCCAGCTCACCCGCTCGAA
 CGCGACAAGAAGGAGTGGCTTAACGCGCGCTCGCACCGAAAGACGACGAGTAGGTCCGTCGAGTGGGCGAGCTT
 -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 GTGTCGCGCAAAAACGGCCAGTACCACAGGCCAGCAACACCACCGCGCCCTTCGAGCAGGAACATCCACTG
 CACGAGGCCGTTTTGCGGTCATGGTGGTCCGGTGGTGGTGGCGCGGGGAAGCTCGTCTTGTAGGTGAC

ES 2 380 530 A1

-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 CCAGCCACGCAGCCCGCCCGTGTGTCATGAAGGCCAGTATGGCCCCGACACTGGCCCCGGACCCTCCGGC
GGTCGGTGGTTCGGCGGGCACAGCAGTACTCCGGTCATACCGGGGCTGTGACCGGGCGGCTGGTGGAGCCG
-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 CAACGGCACGGCAATGGCGAACAGCGCGGTGACCTGGGCGCGGCCCGCCGGGTACCAGCGGTTGAGGTAAAC
GTTGCGGTCGGTACCGCTTGTGCGCCACTGGACCCGCGCGGGCCCATGGTCGCCAACTCCATTTG
-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 CAGAATGCCCGGAAGAACCCTCGGCCGCGCCAGGGCAAAGCGCAACAGGTAGAACCGCGTGTGCTTTT
GTCTTACGGGCCCTTCTTGGGCGGAGCCGGCGGGTCCCGTTTCGCGTTGTCCATCTTGGCGCAGCAGAAAG
-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 GATCAGCAGCATGTGTCGACAACAGCCCCACACCACCATCAGGCAGGCATCCAGCGGCGTGGGCCAACCGG
CTAGTCGTGTACGACCAGCTGTTGTGCGGGGTGTGGTGTAGTCCGTCGCTAGGTGCGCCGACCCGGTTGCG
-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 GTCGAGCATCAGGTTGCTGGGACGCCGAACAGCGCATAGGCAATGAAGAACAGCCCGGACCCAGGCCATAGAC
CAGTCGTAGTCCAACGACCCCTGCGGCTGTGCGGTATCCGTTACTTCTTGTGGGCGGTTGGTCCGGTATCTG
-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 CGTGTGGGCAAAATGCAGGTCCTGGCTCATCTGCATCTTGGCGAAGCAATGTTGATGCGGTCCAGGTGGGCGAA
GCACAGCCTGTTTACGTCAGGACCGAGTAGACGTAGAACCCTCGGTTACAACCTACGCCAGGTCCACCCGCTT
-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 CAGGTAGCACACCAGCAGCGGCATCAGCCCGCAGGTGACTGCCGATGGGTACTGTGCGCCCGTTCAACGTG
GTCCATCGTGTGGTCGTCGTCGCGTAGTCGGCGGTCCACTGACGGGTACCCATGACAGCCGGGAAGTTGCAC
-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 TGCCTCGCGCGGCGAGGCTGTTCGAGTGTGCTCATGTTTTTGTACTTATTCTGTAATGAGTCGGGGAGGGCGTG
ACGGAGCGCGCGCTCCGAACAAGCTCACACGAGTACAAAAACATGAATAAGACATTACTCAGCCCTCCCGCAC
-2 A E R P S A Q E L T S **M**

← *hpaX*

18976 GTTTGAGCCGGCGGCTAGCGGTTGAACAGTGGGTGCAAGGTGCTGTGCTTGGCGTCGTAGACCTGGGCGGTGCT
CAAACCTCGCCCGCGGATCGCCAACTTGTACCCACGTTCCACGACACGAACCCGAGCATCTGGACCCGCCACGA
-2 **■** R N F L P H L T S H K A D Y V Q A T S

19051 GTGGTCGATCTGCACGGTATGCCGATCGGGCGCTGTTGCAGCAGTGGGTCCAGGCGCGCTTTCACACATGCCAG
CACCAGCTAGACGTTGCCACTACGGCTAGCCCGCACAACGTCGTACCCAGGTCCGCGCGAAAGTTGTGACGGTC
-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 CAAGCTGTGCCCCACTGTTTTGTGCACCTCGGCGCTACGGCCGGTAGCCATGCGCAGGTTGGCGTACAGAAAGCC
GTTGACAGCGGGTGACAAAACACGTGGAGCCGCGATGCGCGCCATCGGTACGCGTCAACCCGATGTCTTTCCG
-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 GTATTCCGCTTTGCGCTCGGCCACCGCGCAATGGGCGCGGGGTAGGCCAGCACGCGTGTACCGCCAGTGGGGAA
CATAAGCGGAAACGGCAGCCGGTGGCGGTTACCCGCGCCCATCCGGTGTGCGCACATGGGCGTACCCCTT
-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 CACGGCTTTGCCTTCGGCATCGCGCTGTTGAGCATGGTGTGCGCCAGGGCGCGGCACAGGCCGGGATGTGCGC
GTGCCGAAACGGAAGCCGTAGCCGACAAAGCTCGTACCAGCCGGTCCCGCGCGGTGTGCGGCCCTACAGCCG
-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 GTCGGTTTTCCAGGTCGGGGTATAGAGCAGAACCAGGTGTGGCATGGGGGCTCCTCGGTGAGGGGCGGCTGGCC
CAGCCAAAGGTCCAGCCCCATATCTCGTCTTGGTCCACACCGTACCCCGGAGGAGCCACTCCCCGCGCAGCCG
-2 D T E L D P T Y L L V L H P **M**

← *hpaF*

19426 ACCCGCCAGGGCGACAGCCGCGAACGGGTGGGTTACAGGGGCTGGTGGGCACACGCGCGCGGGTTGGCGGC
TGGGCGGTCGCGTGGTGGCGCTTGGCCACCAATGTCCGCGACACCCGTTGGTGGCGCGGCCAACCGCCG
-2 **■** L R S T P V V A A P N A A

19501 CTGGGCAGCGGGGATGGCACACCCTGCGGGGTGACCGGGAAGATCGCGTTGATCTGGCCGGTCCGGAAGA
GACCCGTGCCCCCTACCGTGGTGGCAGGACGCCCCACTGGCCCTTCTAGCGCAACTAGACCGGCCACGGCTTCT
-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 GCCGAAGTAGGGCGTGACCACTTCGGCCTTGCCTGCGTAATCGGACAGCCAGCGCACCCAGCAGCATTGCCGT
CGGCTTCATCCCGCACTGGTGAAGCCGGAACGGCAGCATTAGCCTGGTGGGTGCGGTGGTTCGTAACGGCA
-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 GTCGTGCATGAAGCCTTACCGTGGCCTTTGGCGCGTACTCCGGCAGCATCCCGCAGAAGCCTTCCCACTCGCC
CAGCACGTACTTCGGAAGTGGCACCGGAAACCGCCGATGAGGCCGTGCTAGGGCGTCTTGGGAAGGGTGGCGG
-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

ES 2 380 530 A1

19726 GTCCTGCCACATTTGCACCACACGGTGGTTCGAGGTTTCGAGGAACGGGCTCCACACCTTGGTGGCAAAGTCCGG
 CAGGACGGTGTAAACGTGGTGTGCCACCAGCTCCCAAAGCTCCTTGCCCGAGGTGTGGAACCACCGTTTACGGCC
 -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 CGCCTGGCCGTTCGCGCAAGCGGTGCGACAGCGAGCCGCTGGCCAGGAACGCCACGGTGCCGTGCTAGTGGTC
 GCGGACCGGCAAGACGCGTTCGCCACCGTGTGCGTTCGGCGACCGGTCCCTTGCGGTGCCACGGCAGCATACCAG
 -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 TTCTACTGCCTTGGCATGGCCAGCCAGCCAGCGGGCACTGTGCGCCAGGTAGTGGAGGTGCACAGGGCCGAGAC
 AAGATGACGGAACCGGTACCGGGTCCGGTCCGCCGTGACAGCCGGTCCATCACGCTCCACGTGTCCCGGCTCTG
 -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 CGAGACCACTTTGAAGTGTGGTCTGGTTCATGTAGCGCATGGGCACAGGGTCCGTATTCCGGGGCGAGGGT
 GCTCTGGTGAACCTTACGACACAGGACCAAGTACATCGCGTACCCGTGGTCCCACGGCATAAGGCCCGCTCCCA
 -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 GGTGGCGTGGTGGCCATGGTTCGACGTTGAAGCGGTTGCACTCCTCGCCAGCAGCTTGCCAGCTCGGGATT
 CCACCGCACCCCGGTACCAAAGCTGCAACTTCGCCAACGTGAGGAGCCGGTTCGTAACGGGTGAGGCCCTAA
 -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 GCCGGGGAATGCGTAGGGCATGTTGCTGATGAAGTGCAGGAGTTCGTTGCTGGTGTACACGCCCTCGAAATGCGG
 CGGCCCTTACGCATCCCGTACAACGACTACTTACGCGCTCAAGCAACGACCACATGTGCGGGAGCTTTACGCC
 -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 CCCGCACAGCACGTGGTAGTTGGCGTTGACCAGCCAGTGCCTGTGCAACACGACGATGGTGTCCACGCCAGCTC
 GGGCGTGTGCTGCACCATCAACCCCAACTGGTTCGCTCACGCACAGCTTGTGCTGTACCACAGGTGCGGGTCGAG
 -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 ACGGCAACGGCGGCTGATTTCTGATGCCCGTCGATGGCCGCTGGCGAAAGCCTTGGCGGGGCTGGCAGTTC
 TGCCGTTGCCCGCCGACTAAAGCACTACGGGCAGCTACCGCGGAGCCGCTTTCGGAACCGCGCCCGACCGTCAAG
 -2 R C R R S I E H H G D I A A Q R F G Q R P G P L E

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

← *hpaD*

20401 GCTGTTGTGTTTTGGGGCTGACCCGGTCCCTTGTAGGAGCGGCGCTTGTTCGGGGATGGGGCGCACAGCGGCC
 CGACAACAACAAAACCCGACTGGGCCAGGGAACATCCTCGCGCGGAAACAAGGCCCTACCCCGCTGTCCCGGGG

20476 GGGGATATCTGCGCGAGGCTGAAATCCAGGGGCCGCTGCGCGCCCATCGCGGGCACAAGGCCGCTCCTACACC
 CCGCTATAGACGCCGCTCCGACTTTAGGTCCCGGCGACGCGGGGTAGCGCCGCTGTTCCGGCGAGGATGTGG

20551 CGGGCGGTGTAACCCGACAGAGGGTTAGATGCCCCAGCGAGGAATGTGGTGATTACCCATGGAATAACACAGT
 GCCCGCCACATTTGGCGTGTCTCCAATCTACGGGGTTCGCTCCTTACACCACTAATGGGTACCTTTATGTGTGCA
 -1 I G W R P I H H N G M S I C V N

20626 TCTTGATCTCTGCAAAGACCTCGAAGCTGTACTGCCCGCCTCACGCCCGGTACCGGAACCTTTACGCCCGCGA
 AGAAGTAGAGACGTTTCTGGAGCTTCGACATGACGGGCGGGAGTGGGGCCATGGCCTTGGAAGTGGCGGGCT
 -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 ACGGCTGGCGCAGGTGCGGTACGTTCTGGCTGTTGATGAACACCATGCCGGCCTCGATGCCACGGGCCAGGCGAT
 TGCCGACCGGCTCCAGCGCATGCAAGACCACAACCTACTTGTGGTACGGCCGAGCTACGGTGCCTGGTCCGCTA
 -1 P Q R L D R V N Q S N I F V M G A E I G R A L R H

20776 GGGCTTTGCCGATGTCCTGGGTCCAGATGTACGAGGCCAGGCCATACTCGGTGTCGTTGGCCAGTTGCAGCGCCT
 CCCGAAACGGCTACAGGACCCAGGTCTACATGCTCCGGTCCGGTATGAGCCACAGCAACCGGTCAACGTGCGGGA
 -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 CGGCTTCGCTCCTTGAACGGGATCAGGCACACCACCGGGCCAAAGATTTCTTCTGGGCAATGCGCATCTTGTGT
 GCCGAAAGCAGGAACTTGCCTAGTCCGTGTGGTGGCCCGGTTTCTAAAGAAGGACCCGTTACGCGTAGAACAACA
 -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 TCACGTGCGGCAATACGGTGGGCTGGATGAACTGCCCTTGGCCAGGTGCGCAGGCAGGTTGGCCGGGCGCTCCA
 AGTGCAGCGCTTATGCCACCCGACCTACTTACGGGGAAACCGGTCCACGCGTCCGCTCCACCGGCCCGGAGGT
 -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 GGCCCCGCGGACAGGCGTGCACCTTCTTCGATGCCAATGCGGATGTACCCGGTGACCTTGTCTATAGTGTGCT
 CCGGGGCGGCTGGTCCGCACGTGGAAGAAGCTACGGTTACGCCTACATGGGCCACTGGAACAGTATCACGACGA
 -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 GGGTGTATCATGAACCGACCTGGGTTTTCGGGTCCGGTCCGGTCCACTACGATCAGGCGCTTGGCGCGCGCCGCAA
 CCCACTAGTAGCTTGGCTGGACCCAAAAGCCAGCCAGCCAGTGGATGCTAGTCCGGAACCGCGCGCGGGCTT
 -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

ES 2 380 530 A1

21151 ACTCTGCGACAAACTGCGGGTACACGCTTTCCTGGATGAAGATGCGGCTGCCGGCGGTGCAGCGCTCGCCGTTCA
 TGAGACGCTGTTTTGACGCCCATGTGCGAAAGGACCTACTTCTACGCCGACGGCCGCCACGTCGCGAGCGGCAAGT
 -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 GCGAGAAGATGGTGAACAGCGCGGCTCCAGCGCAGCTCAAGGTCTGCGTCTTCGAAGATCAGCACGGGCGACT
 CGCTCTTCTACCACTTGTGCGCGCCGAGGTGCGGTGCGAGTTCAGACGCGAGAAGCTTCTAGTCGTGCCCGCTGA
 -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 TGCCGCCAGTTCATCGAGTACTTTTTAAGGCCTGCGGTCTGCATGATCTTCTTGCCGGTGGCGGTACCGCCGG
 ACGGCGGGTCAAGGTAGCTCATGAAAAATCCGGACGCCAGACGTAAGAAAGACGGCCACCGCCATGGCGGCC
 -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 TGAAGAAATGGCGCGCACATCGGGGTGGCGGACCAGGGCATCGCCGGCGGTAGGCCCGTAACCCCTGGATCACGT
 ACTTCTTTTACCGCGCGTGTAGCCCCACCGCCTGGTCCCGTAGCGGCGCCATCGCGGCATTGGGACCTAGTGCA
 -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 TCAGACCCCGTTGGGGATGCCGGCTTCTACCGCCAGGCGGCCAGTTCGTTGGCGGTGAGGGCGACAGCTCGC
 AGTCGTGGGGCAACCCCTACGGCCGAAGATGGCGGTCCCGCGGTCAAGCAACCGCCAGTCTCCCGTGTGAGCGG
 -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 TCATCTTACGACGCGCGGTGTGCCAGCGCCAGGCACGGCGCAGTCTTCCAGGTAGCCGTCATGAACGGCACGT
 AGTAGAAGTCGTGCGGCCACAACGGGTGCGGGTCCGTGCGCGGTGCGAGGTCCATCGGCAGTACTTGGCGTGCA
 -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 TCCATGGGCTTACCAGGCCGACACACCCACCGGCTGGTACAGGTGTAGTTGAGCATCTGGTCGTGACCGGGT
 AGGTACCCGAATGGTCCGGCGTGTGTGGTGGCCGACCATGTCCACATCAACTCGTAGACCAGGAGCTGGCCCA
 -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 AGGTATGGCCGTCCATGCGCGTGCACACTTCGGCGAAGAAGTCGAAGTTGTGCGAGGCACGCGGGATCAGCACGT
 TCCATACCGGCAGGTACGCGCACGTGTGAAGCCGCTTCTCAGCTTCAACACGCTCCGTGCGCCCTAGTCGTGCA
 -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 TCTTGGTCTGGTGGATCGGCAGGCGGTTGTCGAGGGTTTCCAGCTCGGCGAGTTTCGGCACGTTCTGCTCAATCA
 AGAACAGACCACCTAGCCGTCCGGCCACAGCTCCCAAAGGTGCGAGCCGCTCAAAGCCGTGCAAGACGAGTTAGT
 -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 GCTCACCCAGCTTGGCGATCAGCCGGGCACGTTCCCTGGCCGGGTGTTGGCCCACTTGGGGAAGGCTTCCCTGG
 CGAGTGGGTGCGAACGCGTAGTCGCCCCGTGCAAGGAACCGGCCCCACAACCGGGTGAACCCCTCCGAAGGAACC
 -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 CCGCAGCCACAGCCTGGGCCACTTCCCTCGGCGCCCGCTGGCGACTTCGCAGATGGCGTCCCGGTGGCCGGT
 GCGTCGGTGTGCGACCCCGTGAAGGAGCCGCGCGGCGACCCGCTGAAGCGTCTACCGCAGCGGCCACCGGCCA
 -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 TGTAGTTGACGAAGGTGTCTTTGCTCTCGACCTCAGGCGGTTGATCCAGTGCTTATCATGCTGCTCATGCCTT
 ACATCAACTGCTTCCACAGAAACGAGAGCTGGAGTGCCGCAACTAGGTACGAACTAGTACGACGAGTACGGAA
 -1 Y N V F T D K S E V E R G N I W H K I **M**
 -2 **← hpaE** **█** A K

22051 GTTGTCTTGAAGAAGTCAGCTTCGCTGACGATACGGTTGACCAGGCGACCGACGCTTCCACTTCCACCACCAC
 CAACAAGAATCTTTCAGTCAAGCGACTGCTATGCCAAGTGGTCCGCTGGCTGCGGAAGGTGAAGGTGGTGGT
 -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 TTCGTACCCGGCACACATCGGCCAGGCTTCTGGCGTCCGGTGGCGATCATGTGCCCGGTGCGAGGGTCAT
 AAGCAGTGGGCCGTGGTGTAGCCGTCGGAAGACCGCACGGCCACCGCTAGTACAGCGGCCAACGTCACAGTA
 -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 GAAGCTGGAGAAGTATTCGATGAGGTGCGGGATGTCGAAGATCATGTCCGCGGTGGTGCCTTCTGCTTACGCTC
 CTTGACCTCTTTCATAAGCTACTCCACGCCCTACAGCTTCTAGTACAGGCGCCACCACGGAAGGACGAAGTCGAG
 -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 ACCGTTGATCCAGGTGCGCAGCTTACAGTTGCTGACGCTTGGCACATCGGCCGATCGACGATCCACGGGCGGAC
 TGGCAACTAGGTCCACGCGTCAAGTCCACGACTGCAGACCGTGTAGCCGGCTAGCTGCTAGGTGCCCGGCTG
 -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 CGGGGTGGTGGCATCGCGGTTTTTACCCCGCAGGTTGGGGCGGTAGTAGTTTTCCAGGTAGTCCGGATGGCGTA
 GCCCCACCACCGTAGCGCCAAAAGTGGGCGTCAACCCCGCCATCATCAAAGTCCATCAGCGCTACCGCAT
 -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 GTCGTTGCACACGGTGTAGCCGGCAACGTAGGCCAGGGCGTCTCACGCTTACGCTTCTTCCGCGCTTTGCCGAT
 CAGCAACGTGTGCACATCGGCCGTTGCATCCCGTCCCGCAGGAGTGCGAACTGCAAGAAGCGGCCAAAACGGCTA
 -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 CACCGCCACGAGCTCGCACTCGTAGTGCATGTATTGACGTTGTCCGGCGCCAGGTGACCTGGATGTGGCCGGT

ES 2 380 530 A1

GTGGCGGTGGTTCGAGCGTGTGAGCATCAGTACATAAGCTGCAACAGGCCCGCGGTCCACTGGACCTACACCGGCCA
-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 GTAGGTGCCTGGCGACTTGTATGAAAGCCAACGGTTCGGTGGGCGGCGGAAGGCCAGCTCCCTGGCGTGGTTCGGC
CATCCACGGACCGTGAACACTTTCGGTTCGCAAGCCACCCGCGCGCTTCCGGTTCGAGGGACCGCACCGCCG
-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 GTAGTTCAGGCCAGGGCGAACATGCTGCCGGTGGCGGGTGGCAGCCAGGTGACCTGGTCTGATGGACCAGGCC
CATCAAGTCCGGTCCCGCTTGTACGACGCCACCGCCACCGTCCGCTCCACTGGACCAGGACTACCTGGTCCGC
-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 GCGTTCGCAAGGGCGAGGTGATCGTCTTCGACCGTGCATCGTGGGCCTGGCGTTCGAACTGGATACGGCGGTG
CGGCAGCCGTTCCCGTCCACTAGCAGAAGCTGGCACTGTAGCACCCGGACCGGAGCTTGACCTATGCCCGCAC
-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 TTTACAGTAATTCCTCACTCGGCGACGATGTGGTGGTTCAGCTTGCCAGGCCGTCGATCTCGATGTGACGC
AAAGTGTCCATTAAGGAGTGAGCCGCTGTACACCAACCAGTTCGAACGGTCCCGCAGCTAGAGCTACAGCTGCG
-1 E A V I H N T L K G L G D I E I D V R
-2 K V

← *hpaG2*

22876 GGTACCTGGCTGTACATCGACGCGGCCCTCGGGGGTTCGGGTGATCAGGATGTGCGCGCGTGCAGGGTCATGA
CCAGTGGACCGACATGTAGCTGCGCCGGAGCCCCAAGCCACTAGTCCACAGCGCGCCGACGTCACCGTACT
-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 ACTCGTGTATTTCGCAATCAGCTGCGCCACCGTGCATCGCAGTTGGCGGTGTTGTTGTGCTGGCGCAGTTCGC
TGAGCGACTAAAGCCGTTAGTTCGACGCGGTGGCAGCATCGCTCAACCGCCACAACAACACGACCGCGTCAAGCG
-1 E S I E A I L Q A V T R V C N A T N N H Q R L E G

23026 CGTTCACATACAGGCGCAGGCCAGGGCATCGGGGTGGCCACTTGGCTGGCGGGCACCAGTTCAGGGCCGACCG
GCAAGTGTATGTCCCGTCCGGTCCCGTTCAGCCCCAACCAGTGAACCGACCGCCGTTGGTCAAGTCCCGGTGGC
-1 N V Y L R L G L A D P N A V Q S A P V L E P G V P

23101 GGCAAAAACCATCACGGCACTTGGCCTTACTGACGGCGGTAGTAGCTGGCTTCGGGCAGGCTCACTTCGTTGA
CCGTTTTGGTAGTGCCTGAAACCGGAACGACGTCGCCCATCATCGACCGAAGCCCGTCCGAGTGAAGCAACT
-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 CGATGGTGTAGCCCGCCACATGCTCCAGGCATCGGCCAGCTGACGCGGCTGGCGTCCCTTGCCAATCACCCTC
GCTACCACATCGGGCGGTGTACGAGGTCCCGTAGCCGTCGACTGCGCCGACCGCAGGAACGGTGTAGTGGTGAG
-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 CCAGCGCCGGCCGGGTTGCACGCGCTGCACGCCGCGGGAATACCACCTGGCCTTCATGCTGGTTCGGGTGT
GGTCCGCGCCCGGCCAACGTCGCGGACGTCGCGCCGGCCCTTATGGTGGACCGGAAGTACGACCAACGCCACA
-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 TCGGGTCTTGACGAACAACACCGGCTTACCGGCAGTTGCTTGTACGGTGTCCACGAACCGCGCTTGGTGT
AGCCCCAGAACTGCTTGTGTGGCCGAACGCGGCTCAACGAACATGCCACGAAGGTGCTTGGCGGAACCCACGA
-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 GCTGCAGCAAACCTGGTAGTTCAGCGCAGCCGAACAGGGTGCCTGGCAACGTCAAGCAGGGCATGGCTCA
CGACGTCGTTGGACCATCAAGTCGCGTGCAGCTTGTCCACGGCAGCGTTCAGTTCGTCGCGTACCGAGT
-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 M

hpaG1 ←

23476 TGCTCTTCTCTGGCAGTGCAGGGCGGTGGCCGCTGCGGATTCGTTAATGTGTTAATGTTAATGTTAATATG
ACGAGAAGAGGACCGTCCAGTCCCGCCACCGGCAGGACGCTAAAGCAATTACACAATTACAATATCAATTATAC

23551 TTAACGATGGTCAAGGGGTGGCCAGTGGCGCCTGCCGCAAGGCAAGGCACCATGGGCCATCGTCAACAGGGTCA
AATGCTACCAGTTCACCGGTCACCGCGGACGGCCGTTCCGTTCCGTTGGTACCCGGTAGCAGTTGTCCAGT

hpaA →

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

23626 AGCGATTTGCGAGCAAGCAGCCATGAGCGACCGCATCCGATACCGAACATCAACATTGGCCAGGTTTACGACCA
TCGTAACCGCTCGTTCGTCGGTACTCGTGGCCGATAGGCTATGGCTTGTAGTTGTAACCGGTCCAATGCTGGT

+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
CGCGATGTCGCTGTCGCTCCACGTAATGCTGGCCGACCGGTTGGACCGCCGAAAAGCCCGGTTGTACGGCCA

+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 GCACCGGCATGACCGGTTTTTCCAGGTGCATTACGTAAGTCCGGCACAGTACGGGTGTATCTGGATGACCGACA
+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

ES 2 380 530 A1

23851 GTACATCGAGGCCGGCCGATGTTCTTCCTCACGCCACCCACGGTGGCGCACGCGTTCGTCACCGAAGCTGACAG
CATGTAGCTCCGGCCCGGTACAAGAAGGAGTGGGGTGGGTGCCACCGCGTGCAGCAAGCAGTGGCTTCGACTGTG

+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 CGACGGGCATGTGTGACGGTGCGCCAGCAACTGGTGTGGCAATTGATCGAAGCCGACGCCAGCCTGTGCGGGC
GCTGCCGTACACGACTGCCACGGGTCGTTGACCACACCGTTAACTAGCTTCGGCTGCGGTGCGACGACGGCCG

+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 GGGCATGCAGGTGCAGCCAGCCTGTGTGGCGCTGGGCAACCTGCCGGCCGAATACAAGCCGAGGCGCAGGCCT
CCCGTACGTCCACGTCCGTGCGACACACCGCGACCCGTTGGACGGCCGGCTTATGTTCCGGCTCCGCGTCCGGGA

+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 GCAAGGCTGGCTGGACGCGTTGAGTGACGAGTTTGGCCACGACGCAACCGGGTCCGAGGCGGCGTTCAGTTCGCT
CGTCCGACCGACTGCGCAACTACTGCTCAAACGGTGGCTGCTGGCCACGCGCTCCGCGCAACGTCAGCGA

+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 GACCCGCTGATCATGATCAGCCTGTGCGGCTGTGCCCAACTCGCTGGAATCGACCCGGCGGGCATGAAGA
CTGGGCGGACTAGTACTAGTTCGGACGACGCCACGCGGTTGAGCGACCTTAGCTGGGCGCGCGCTACTTCT

+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 CCTGAAGATCTTCCACCGTTTCAATGCCCTGATCGAAGCGCATTACCTTGAGCATTGGCCGCTGGCCCGTACGC
GGACTTCTAGAAGTGGCAAAGTTACGGGACTAGCTTCGCGTAATGGAACCTCGTAACCGCGACCGGGCGATGCG

+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 GCAGCAGATTGGCGTGACCGAGGACGGCTGAACGATGTGTGCCGGCGCATCGCCGACTTGCCATCCAAGCGCCT
CGTCGTCTAACCGACTGGCTCCGTGCCGACTTGCTACACACGGCCGCTAGCGGCTGAACGGTAGGTTCCGGGA

+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 GGTGCTGGAACGGCTGATGCAGGAGGCCAAGCGTTGCTGTTGTTTTCCGGCAGCACGGCCAACGAAATCTGTTA
CCACGACCTTCCGACTACGTCTCCGGTTCGCAAACGACAACAAAAGGCCGCTGCTGCCGTTGCTTTAGACAAT

+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 CCAGCTCGGCTTCAAGGATCCGGCCTATTTACAGCGCTTCTTCAACCGCTACGCCAAGCTCACACCCGGGAGTA
GGTCGAGCCGAAGTTCCTAGGCCGATAAAGTCGGCGAAGAAGTTGGCGATGCGGTTTCGAGTGTGGGCCCTCAT

+2 R Q R Q A E L Q ■

24526 CCGCCAGCGGCAGGCAGAAATTGCAGTGAATGGCCATGGCGGCTCACCCGGGTGCTGTTGTTGTTTACAGCGGAT
GGCGGTCCGCGTCCGTCTTAACGTCACTTTACCGGTACCGCCGAGTGGGCCACGACAACAACAAATGTCGCTA

24601 GGTGCGAGCCCGCGCGCCGGGCTTGAATGGGTTTTCCGTGGAACAGATTGCACTTTCCATCGTGCATGCCCTTAA
CCAGCGTCCGGCGCGCGCCGAACTTACCCAAAAGGCACCTTGTCTAACGTGAAAGGTAGCACGTACGGGAATT

hpaR →

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

24676 ATTCGTGAATTGAGAAAAAGCCACAGGTTTGACCATGACCAAGACGCAACCTTCGCTCACGCTAAGCCTGTTGCA
TAAGCACTTAACCTTTTTTCGGTGTCCAAACTGGTACTGGTCTTCGCTTGAAGCGAGTGCATTCGGACAACGT

+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 GGCCCGAGAAAGCCGCGATGGCATTTTTACGGCCGCTGTTGAACAGCACGACCTGACCGAGCAGCAATGGCGGGT
CCGGGCTCTTCGGCGCTACCGTAAAAAGTCCGGCGACAACCTGGTCTGCTGGACTGGCTCGCTGCTTACCGCCCA

+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 AATCCGCATCCTCAAGCAGCACGGCGAGCTGGAGAATTATCAGTTGGCGGAACTGGCCTGCATCCTCAAGCCGAG
TTAGGGGTAGGAGTTTCGTGCTGCGCTCGACCTTAAATAGTCAACCGCTTGACCGGACGTAGGAGTTCCGGCTC

+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 CATGACCGGGTACTGGGCGCCTGGAGCGAGACGGGCTGGTGGCGCGGAGAAAGCCGCGCAGGACCAGCGACG
GTACTGGCCCCATGACCCCGGGACCTCGCTCTGCCCGACCACGCGCGCTTTCGGCGCGCTCCTGGTCTGCTGC

+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
CCACAAGCAGTCCGACTGGCTTTCTCCCTCCGACGAAACGGAGCTACTTCTTCCGTACCTCCGGTTGATGGT

+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 GAAGATTCAGGCGCAGTTTGGTGAAGAGAAGCTGCAGCAGCTGATGGGGTTGTTGAATGACCTGAAGCGCATCGC
CTTCTAAGTCCGCGTCAAACCACTTCTCTCGACGTGCTCGACTACCCCAACAACCTACTGGACTTCGCGTAGCG

+2 P ■

25126 GCCATAA
CGGTATT

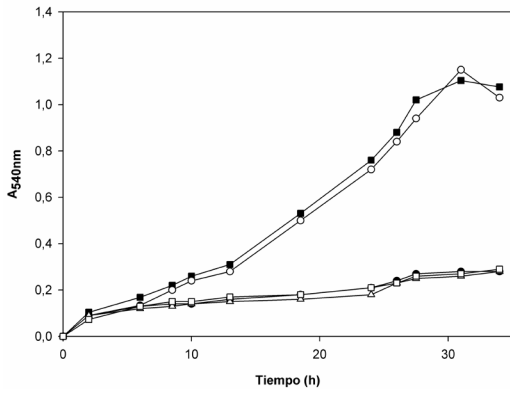


Figura 10

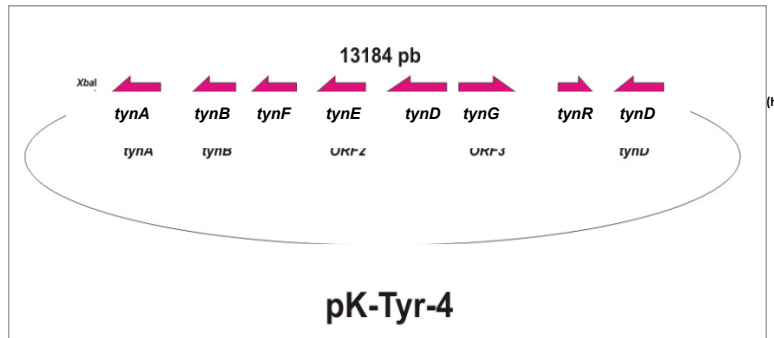
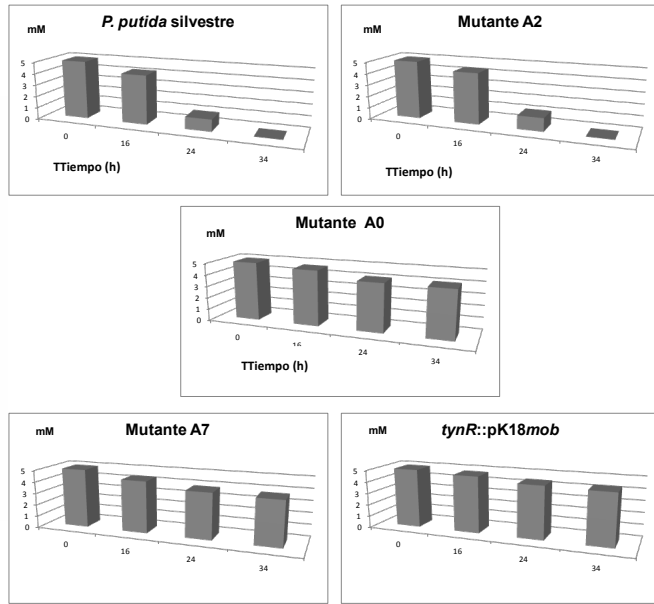


Figura 11

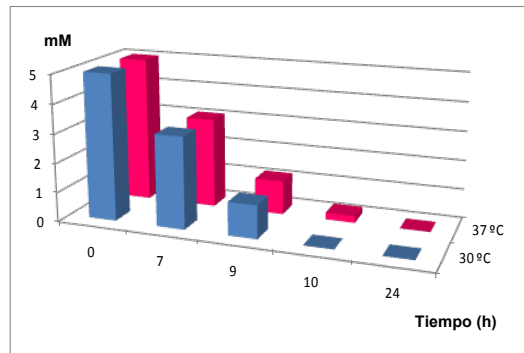
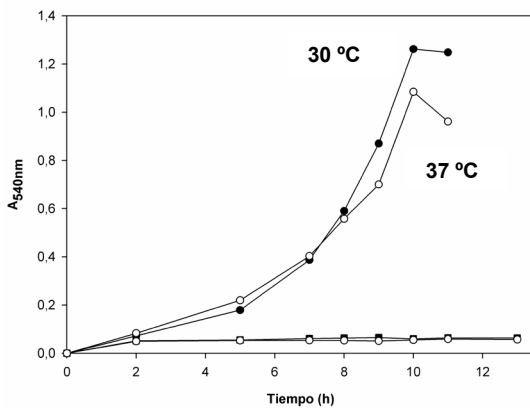


Figura 12

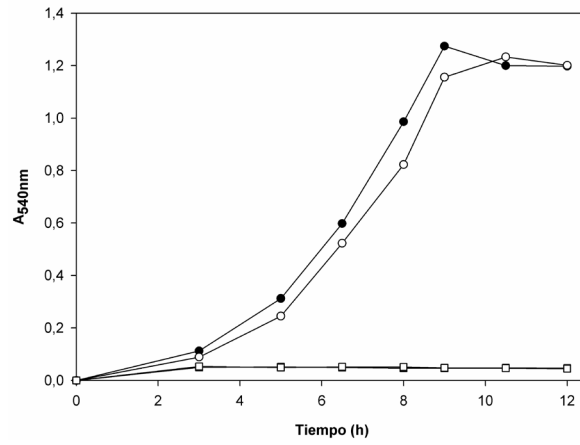


Figura 13

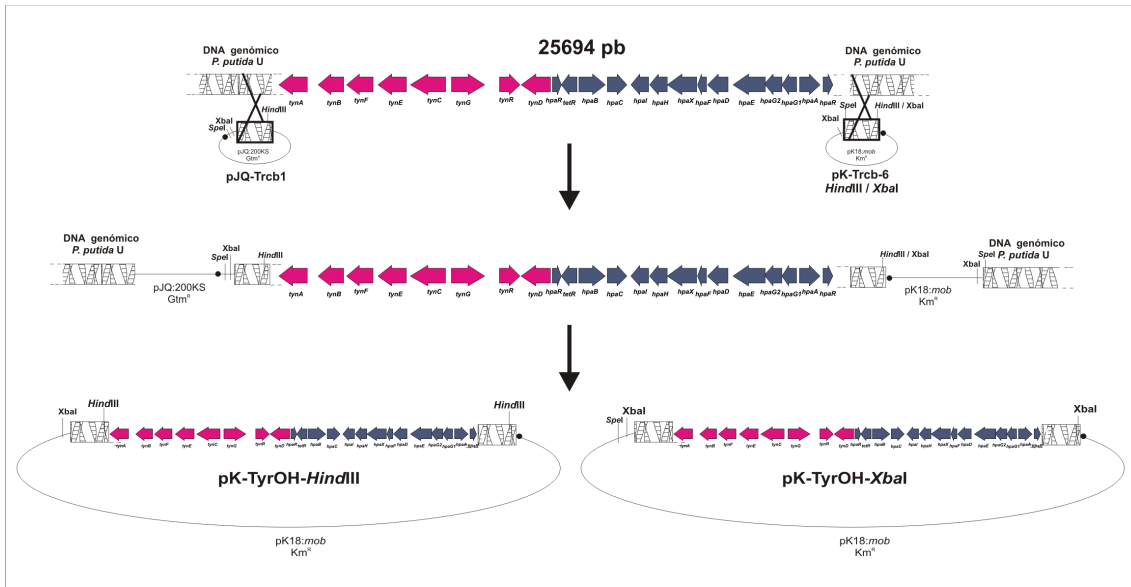


Figura 14

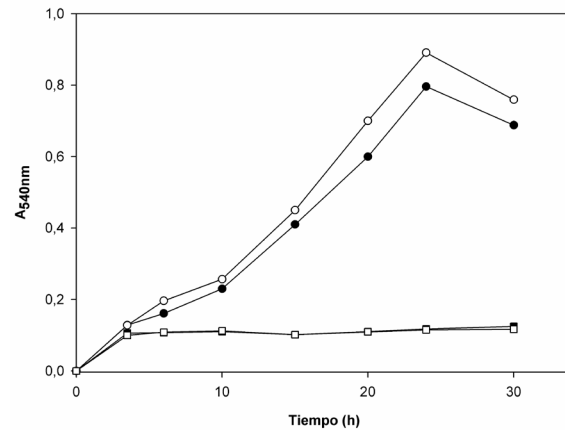


Figura 15

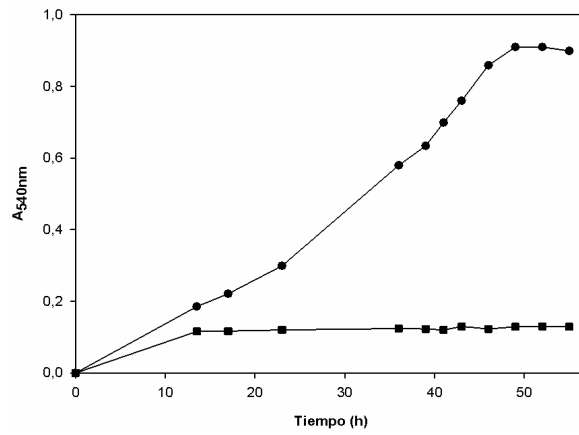


Figura 16

ES 2 380 530 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOGES STARTERS S.A.

<120> PROCEDIMIENTO PARA ELIMINAR DOPAMINA DE DIFERENTES FUENTES

<130> P-101089

<160> 45

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 25132

<212> DNA

<213> Pseudomonas putida U

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(25132)

<223> Secuencia que contiene los cluster tyn y hpa

<400> 1

tcaggcgaaa	cgctcgaagc	ggtacggtga	cgggtcgatc	agcggggtgg	cctggggccac	60
caggtctgcc	gccagctggc	cagcagcagg	cgaggtgccg	aagccatgcc	cggaaaagcc	120
ggtggccagg	gtcaggcccg	gaatactggc	caccggggccg	atgaccgggt	tggagtccgg	180
ggtgacgtca	atcgtgccgg	cccaggcget	ggcgatacgg	gcctgttcga	acaccggcca	240
ggccgctttc	aggttgccga	tggcctcgtc	ggtgagggcc	gggttggcgt	gcgggtcttg	300
taccctgaca	cgctcgaagg	gggttacatc	cgttgccttc	cagcgcgggg	ccaggggccag	360
gtccttgaag	aagtacttgc	caaagctgat	gcgcaaaaag	tcccgcctggg	cacgcagctg	420
gggcaggtaa	cgcttgccca	gcagcaggtg	atcgaggggtg	aggaaggcgt	ccagcgcgcc	480
gcgctgggtg	atgatgtagc	cgccgctcct	gtgcttgccg	aaggaaaaat	ctggtgcgcc	540
cacggcgatg	tcggttggcc	cgcccatggg	ctctgtgcgc	agcacggaac	aggtcagcgg	600
caaggtcggc	aggttgatgc	ccaggttgcc	gaggaacttg	cgcgaccaca	ggccaccggc	660
cagcaacacc	tggtcgcagc	ggatttcacc	ttgctcgggtg	accaccccgc	tgacacggcc	720
ggctgcggtg	accagcgtgc	gcaccgcgca	gttctccact	accactgcac	ctttggcgat	780
cgccgcccgg	gcgatggcgc	tggcggccag	ggtcggttcg	gcgcgggcgt	cggagggggg	840
gaagatgcca	cctgcccgat	ccgcccgaac	accgcggcacc	atccgggtga	tttcccgcgt	900
gctcagcagg	cgcgaatcca	ggcccagcgc	ctcgacgctt	ttcagccagc	cttcatgcat	960
gcccattctgc	gtgtcgttac	ggccgatgaa	catgatgccg	gcttgccgat	agccaacgtc	1020
gctgccaaacc	cgctgcgggca	tctcggccca	cagccgatca	gccgccagtg	ccaggggaat	1080
gtcatggggc	tggcggttgg	tcttgccgac	ccagcccagg	ttgcgcgacg	actgctcccc	1140
agcgatgcgc	cccttctcca	gcaccaccac	cggtatggtg	cgttcggcga	ggctcagtgc	1200
ggcgggtgagg	ccgataatgc	cgccaccgat	gatcaccacg	gtagtgggcgt	cgggggtggcg	1260
ggtgctggtt	tgcacagggg	cgatcgtggg	agacatgggt	ttactctttg	ttgtgcgtgc	1320
agggggagtg	ttcagcgcca	gccagcagcc	tactggcca	aggcggatca	gggtcacttg	1380
cgcttgcccc	gcaccgcggg	aggcgggtgac	ctccagctcg	accttgtaaa	cggtggagcc	1440
cagcggcggg	caggtgaccg	tgggtggcgg	gtcgatgccg	cggaaacttct	cgccgatcac	1500
gtccatgacc	cggtgtacat	cggcagggtc	ctggatgaac	acgcgcgagt	tgatgacatc	1560
ggccaggctg	gcctcgcactg	cgccagcgcg	ggtttcgatg	ttggcgaaca	cctggtgggt	1620
ctgttcgatg	acgtcctctg	gaatgaacctg	ggtctgcggg	ttgcgtccgg	cggtggtgga	1680
gacgtgaatc	cagttgtcca	ccgccaccag	gcgggagtag	ctggccatgg	cttcgaaactt	1740
ggagccgggt	ttcagtttga	tgatctgtgt	catgggcttt	gccttgttat	ccggttgccg	1800
ggatcagctg	agaacggggg	tttcccagag	ggtgagcttt	acgccgatgc	cttgctcgag	1860
cgcttgccgg	tacaccacgg	tgccccaggc	cagctcttcg	acgggcatgc	cgcccaccga	1920
catcaggatg	atctcgtcgt	catgcagggc	gcccgggtgc	tcgccgctga	tgatcttgcc	1980
gatgtcttcc	acctgctcgg	cggccagcgt	gccttcggca	atcatgtcca	tgaagcgcac	2040
acctaccagc	ggtacgtggt	tgtgcgcagg	cttgggcagc	tcttcgaacc	aggcctcgta	2100

ES 2 380 530 A1

gaggccggtg	ttgtccacca	ccttgccgac	gtogtctctg	tccatgcccg	cgctcgatact	2160
gcacggggct	ggcatggcca	ggaacgcgcc	aggcttgacc	cactcgcggc	gcaccagcgg	2220
gtactggctg	gggtcgcgca	cttcgcccga	gctgcagtag	ctgaccaggt	cggaaccgcg	2280
taccacttct	tccagggttt	ccaccacctg	gacatgagtg	atltgcccga	agctggtttt	2340
caccagggcg	acgaaggcat	ccaggttctt	ctggccacgg	cccttgacct	tgagggtgtc	2400
gatcagcggg	cagacggcca	tgaacgcagc	gaccgtggtc	ttgcccatca	cccccgggcc	2460
ggccaggccg	atcaccttgg	cgctccttgc	cgccaggtgg	cgggcgccga	cgcccgggat	2520
ggcgccggtg	cggtaggccg	acagcaggtt	ggccgacatg	tgtgccagtg	gcgcgcccgt	2580
gtcggcatcg	ttgagggtga	acatcaggat	cgagcggggc	aggcctttct	cacggttggc	2640
gatgttcgag	ccgtaccact	tggcgcctgc	ggtctggaag	ttgccgcccga	ggtacgcccg	2700
catcgccatc	atgcgcgggt	cggcgggtgg	cttgggcatg	ttggggaatg	gcgagtgctc	2760
ggggaaggta	atcatcgcgc	cgtgcgagtc	gctgttcggg	ccggccatgc	ggtagtcacc	2820
ctggtacagc	aggccgaaca	tttcttccat	ggtgtcgaca	caggccggca	tgctcggtgac	2880
gccggcacgg	atcatgtcct	gctcggacag	gtagatgaag	tcaattctgg	tatcgagggg	2940
catggcgggt	ctcgcagggc	tggctgcccg	cggatttggt	ggtggtttcg	aggcaaccag	3000
tttcgctaac	gactggttag	tcgtcttgtg	tcctgctgcc	agccgagttg	accgtcagtg	3060
ccagggtctc	aatggcccgc	gagcgagaag	ctggccgggg	tgtggcgagc	gctgagggcg	3120
gtcagcaggc	acaccaccag	ggtgcacagg	gccagcagcg	cggcccctgc	ggtcggggccg	3180
tggttgagta	ccactgcggc	cagcggggcg	gcgcggcgag	acgccgacag	ctggatggcg	3240
cccagcagcg	ctgcgggtga	accagtgccc	tttcttgcg	aggccatcac	cagcgacatc	3300
agcgtcgact	cggctatccc	caggccgaac	agggtatca	ccatgccgcc	ggccacacct	3360
ggcagcccc	ggccggctcag	tgcaccgagc	aggctgatgc	aggcaccgcc	ggccatgcac	3420
agcacgcccc	cccagatcaa	ggtattgagg	cccagccggc	tgatcaggtg	gctggccgctc	3480
atggcgccga	gcaggatcga	caccccgggtg	gcgccaaaca	gcaggccgaa	ggcctggggcg	3540
ctcaggccgt	agtgggcctg	gtacaccagg	gtggcaccgc	cgatgtaggc	gaacagggaag	3600
aagaataccg	cagcaaccgc	cagggctcggg	cgcagggaagc	ggcggtcggc	gaggatggcc	3660
aggtaggtgc	tgcaggcgtg	gcccaggcgc	aggggttcgc	gtttgctggg	cggcagggtt	3720
tcgggcaggt	tcagcaggct	gttgaccagc	accgtcacgc	ccatgccggc	gagtagccagc	3780
attactgcac	gccagccgaa	atgtgcgctg	atcacgccgc	ccagggcagg	tgccaggatc	3840
ggtgcgacgc	cttcgatggt	catcagcagg	gcgaacagtt	tggtcgcggc	cacgccctgg	3900
ctcacatcac	gcaccatgct	catgatcacc	accagggtca	gcgcactgcc	caggccctgg	3960
aaaaagcgca	gcatgatcag	ggtgtcgagg	ctgggggctg	cggtcgcgcc	cagcgagcac	4020
aggatgaaca	gcagcaggcc	ggccagcagc	ggcttgcgcc	ggccataaag	gtcgcagatg	4080
gggcccgaaga	tcagctggcc	ggcgcccctg	gccagcagga	agaaggctcag	tgctcagctgt	4140
acgcgggtga	agctagcctg	atagtggctg	gcgatttccg	gcaggctcga	caggtacatg	4200
tcgacggcgg	aagggccgag	ggcgccgctc	aggcctaggc	ccagggcgaa	gctgaagggg	4260
atgggagggg	agggattggc	ttgcatgggt	ttctctgggt	gatttttctg	ctaccgaccg	4320
gtaggtttgc	gaatattatt	cgccgagctg	gccaaaggta	aacccttccg	caaggccact	4380
gattcctgtg	gggagcgggc	atgcccgcga	acaccggcaa	agccggtgcc	accgagtcgc	4440
cttcttcgcg	ggcatgcccg	ctcccacatt	gaccgcagag	ggtggttacc	gtggttgctg	4500
cagaacggca	cagccacggg	cagctggcta	tacacattgg	taccattccc	gccacactgg	4560
ttgccgcccg	tgctctcgtc	cttgcgcggc	tggtaaaggc	ccaccagcgg	gctgattatc	4620
agggtgctcg	tgactgccc	ttccacatac	aggctccagct	cccgcgcctc	gaggttgagg	4680
ctttcgcggg	tgcgtacggg	gtcgaagctg	aagtacagcg	ccccgactgt	gagattttcc	4740
agcgggtgctg	ccttcacgcc	cacatggtgg	atacccgtgt	tgctggtgaa	ggggccggcg	4800
tagttggcag	cgacttcacc	ctggaaccag	gtgccgtaac	cgctggacag	gccgctgaac	4860
agcgcgtccc	agcctgcccga	gtagcgggtg	tagcggtagg	taacctgcgg	tgcccacggc	4920
aggctcggcg	agggtgtagcc	ggcctgcagg	taccaggctt	gctcggggcc	gtcgggtctt	4980
tcttgccagg	cgtattcgaa	ggcgaaactg	gcattgtcga	tgccagcgtt	gccttcgccc	5040
cgcacgctat	acacgtccat	gccttcgcgc	gctttctgaa	agtcgctggc	ccattggtcg	5100
gtgacgtcga	tgccgtgaat	ccaggtcagc	ccaggggtgc	ccaaggcttg	ggtgtagtcc	5160
agcgtgcccg	cggccagttc	ggtttcggcc	tgggcgctgg	tgctcgattt	cagccacagc	5220
aggctgccat	gcaggccatc	gctgcccccc	aggcgcagca	ttgcgggtgc	gtcgaaggcg	5280
tggcggggcg	ccaggtagta	ggccccgcgg	cggctccagc	caccgtcggc	gacgccgttg	5340
cccaggttcg	ggcctgctgc	gttgatcaaa	aaaccactgc	ccaggcgaat	ggtctggcgg	5400
ccggcggaaa	cgtccactcc	atccttgcgc	agcaccggga	acaggctcgg	cgagcggccag	5460
ccgaggaagg	cgtcttcgat	cttgggtggg	cgttcggagc	catcggtggt	gccggccgca	5520
tcgcccacgc	cccagggtgg	cgagctcacc	cagttcaggc	tgccgtacag	cgtgccgttg	5580
ccggccaggc	cctggtcacc	gctgaggcca	tacttgataa	agccttcacg	ccaggctcga	5640
ccccctgtgg	tgccgtcgtg	gttcttgcgg	ctggtgaaca	tgccccatac	cgccagcatg	5700

ES 2 380 530 A1

tcggcgttca	ggtggctgtc	atcgtcggcg	tacagctcaa	cggccggcgc	ggcctggctg	5760
gccagcaagg	ttgccagggc	caggctggac	agcgtctgtg	gtttgaccat	ttgcacatcc	5820
ctcgtttgtt	ctcggccacc	ttcacagggg	cctttgttgt	tcgggggcac	cctcggttct	5880
ggcgaggggc	catcgcggtt	ggcggcgatg	gcctattagg	gcgtgtgcgg	tggggcgggg	5940
tcttgttcgt	ggctgccaa	gcgcttgcac	gccttggcca	caggcgcggt	cagtagcgga	6000
tcatcaccga	cttgagctcg	gtgaagtcac	cgatgaaggc	cgagccgaac	tcgcgcccaa	6060
tgccggaagc	cttgatgccc	ccaaacggta	cagccgggtc	gagcagggtg	tgcattgtga	6120
cccacagggg	accggcctgg	atcttgcggg	tcattgcgcat	ggccttggcc	aggtcgttgg	6180
tccacaggct	ggcgtgagg	ccgtagggcg	aggcgttcat	cagggtgcagc	agttcgtcct	6240
cgctgctata	aggcaggaag	gtcgcacacag	ggccgaagg	ttcctgggtg	agcaggggtg	6300
cgcaggctga	ccgggcgagg	attaccgtgg	gttcgacgaa	acagccgggg	ccgtcggcca	6360
gggtgcccgc	gtgaatgatc	tggttgcctt	cggcgcgggg	gatggcgaac	agttcggcca	6420
gcttctgctg	gtgctgcttg	ttggccacgg	ggccgaactg	ggtggcctcg	tccagtggcg	6480
agccgatttt	cagttggccc	aggcgtcggg	acagggcgct	cagcagcggg	tcgatgcgcg	6540
agcgggtgcac	atagaagcgc	tcgcccgcgg	cgagattttg	ccccgagtgc	aggaagccgg	6600
cctcgtatgat	gccgtccaca	gccttgtcgg	ttgccacgct	gggcaggaag	gccaccgctg	6660
tcttgccgcc	cagttccagt	gtcgcacggg	tcagcttggc	gccccatggc	gcttggccta	6720
cggcgtatgcc	agtgggcacg	gagccgggtg	acgagacctt	gtcgggtacct	gcgtgctcga	6780
tcagtgcctt	gcccaccagg	ccaccaccgg	tcagcacgctt	cagtgcaccg	gccggcaggc	6840
ctgcttcggt	ggccagttcg	gcaatgcgca	gcagcgtcag	cgggggtgaat	tcgctgggct	6900
tgaggataat	gctgcagccg	gttgtcaggg	ccgaggccag	cttccagatg	gcgatcatgc	6960
tggcgaagtt	ccacggcacg	atgcccacca	ccacgccaat	cggctcgcgc	agggtgaagg	7020
cgctgtagcg	ctcaccggcg	aacgagggca	gcgacggggg	gatggtcttg	ccggtgatct	7080
tggtcgccca	gccggcgtag	tagcgcagga	agtgcgcggc	ctgctgtact	tcgaacgcac	7140
gggaaatgcc	gatgagcttg	ccggattgca	aggtttccag	ctgcgccagt	tcttcgcggt	7200
tggtctccag	caggctcgcc	agcttgaaca	gcactgcggc	gcgggcggcg	gggctggtgt	7260
gcgaccaggc	ggtaaagcct	tggcgcgagg	agctgacggc	atggtcgaca	tcggcctggt	7320
tggcgtcggc	gatgtggggc	atggtctggc	cgttggccgg	gttgaccacg	gcaatgttcg	7380
acgacgactg	gctggcgagg	tgctggccgt	ggatgaacac	gccatgctcg	cgggccaggga	7440
aggccgtgac	ggcaggtagg	agggtgatgt	cgctcatgca	gactccgggg	cagttggcca	7500
aagtttgacg	cttaataagc	ggggcagtg	ggtgcttgtg	cctgcgtgac	aggtgcatga	7560
ctgtggctgc	caaccgcact	gggtaagcct	tgtgggagcg	gccttgtgtc	gcgatagggc	7620
cgcagagcgg	ccccggcgat	gttggcggcg	aaagtgaaaa	tgctggggcc	gcttcgcgcc	7680
cctatcgcga	cgcaaggccg	ctcccacaaa	aaaagcgagc	gtaggccggg	ctgattcgtg	7740
gcaggcagca	acaagcccgg	cggcagccat	cggcaagacg	ccatgccacc	ggcagcgcac	7800
agtaatcact	cgttcaacgc	cacaaaaaca	agccggggca	tacgatgtca	ctcaataaca	7860
agctcaccga	gcacctcaac	cgcggcactg	tcggtttccc	caccgcactg	gccagcactg	7920
tcgggctgat	catggccagc	ccggtgatcc	tcaccgcgac	catgggcttt	ggcatcggcg	7980
gcagcgcctt	cgccgtggcc	atggtcatcg	ccgcactgat	gatgctggcg	cagtccacca	8040
cctttgccga	ggctgcgtcg	atcctgcoga	ccacgggctc	ggtatacgac	tacatcaact	8100
gtggcatggg	ccgtttcttc	gccattaccg	gcacgctgtc	ggcctacctg	atcgtgcatg	8160
tgttcgcggg	taccgcccga	accatcctgt	cgggggtgat	ggcgtcgttg	aacttcgagc	8220
acctcaatac	cctggcggaa	tcgcgcggcg	gttcgtggct	gctgggggtg	tgcttcgttg	8280
tggcgtttgc	ggtgctcaat	gcctttggcg	tcagegcctt	cagccgcgcg	gaagtggctc	8340
tcaccttcgg	catgtggacc	accttgatgg	tgttcggcgt	gcttggcctg	atcggccgac	8400
ccgcagtgga	actggacggc	ccgttcggcg	tgctcgtggt	gggcaccgac	ctgatgacca	8460
tcctctcgct	ggtcggcatg	gccatgttca	tgttcgttgg	ctgcgagttc	gtcacgccgc	8520
ttgccccgga	actgcgtcgc	tcggcctggg	tgctgcccg	ggccatggcg	ctgggcctgt	8580
ttggcgtggc	cagctgcatg	ttcatctacg	gagcggcgat	gaagcggcag	gtggaaaacg	8640
tggtgctgga	tgccgccagt	ggcgtgcacc	tgctggacac	gccccatggc	atcccgcgct	8700
tcgcccagca	ggtgatgggt	gatattggcc	cagtggtggc	gggtatcggc	ttcctgctcg	8760
ccggcggcgc	caccatcaac	acgctgatgg	ccggtgtgcc	acgcattcct	tacggcatgg	8820
cggtgacggg	cgcgttgccc	aagggtgttca	cctaactgca	cccgcgcttc	aagacggcgc	8880
tgctgtgcat	cctggtgggt	gcggtgatcc	cctgcctgca	tgcttgggtg	ctggggcgga	8940
accgggacaa	catcctgcac	ctggtgctgg	ccgcctgtgt	cgctgggagc	accgcctacc	9000
tgctggtgac	cctgtcgggt	gtgatattgc	gcattccggc	cccagacctg	ccgcgtgcct	9060
accgctcgcc	gctgttcccc	ttgcccagca	tattctccag	tagcggtatc	ctcatcggca	9120
tggcgttcat	cacaccggcg	ggcatgaacc	ctgcccagat	ctacgtgcgg	ttcgccatca	9180
tgcttggcgc	cactgcggcc	tatgcattgt	tctggacgct	gtgggtgcag	aaggtaacc	9240
cgttcaagcc	ggcgcgggct	gaggatgtgc	tcgagaaaga	gtttgcctgc	gagcctggcc	9300

ES 2 380 530 A1

acgccgtgga	gcacgtgctg	catgatcaga	aatttgctg	aacgcttgct	ggcgccccga	9360
gcgccctcag	gctatcgccc	aggcgccaag	ctggcatgcc	tggcgcgcaa	cctggggcag	9420
cagaacctgg	tggcggccgg	ggtgatccac	gacccggccc	agggttggca	ggccacgggtg	9480
cacgaacgcg	tcgaggccca	cctgctgatg	cacatcgtea	cctgtgagtt	ccagctgcag	9540
ttgcctgctc	cgcaaggggg	cgaggtcagc	ctggagctgc	gccataccgg	tgcgcttcgc	9600
cgtgccggcc	tggcctgtgt	gtaccgcaag	ggcgaccggg	cgcgcttcgc	ccgactgcgc	9660
gaccggttgc	tgcagcaggc	cgactgggtg	gcggcgctga	tgccgctgga	tttcaagcgc	9720
ctgaccttgg	cctggcgcgga	cggccaatgg	ttgctgacct	tggagcacat	ggcggttagc	9780
gaagtggcca	accgcatgcc	agcgtttcgc	cgctacatcc	ccatcagccc	gcaacagcgg	9840
gcgcacctga	tggccagcct	ggcccagttc	aacactttgc	tacctaacct	ttgacgcaaa	9900
ctggcatacg	ccttgctgta	tcaagcgacg	aatgatgaca	gttgtgcgca	catagataac	9960
atgtaacaa	tgtgcgcata	acaacaaatc	ctgcgtcgag	ggcagccatg	catactcaac	10020
aatccaaccg	tcaggggctg	gaacgctgga	ccacggccat	gcaacagatc	tgtggccggt	10080
tcgagacgga	acttgctgct	aatcactcgc	tgttcacggg	cgaggtttct	accttttccc	10140
gtgccggctt	gcccgtggcc	aacctgcgca	ccaatgccgg	caacatccgc	cggtggtggc	10200
aaaacccgac	ccttgacgat	gaccagcatt	gtttcctggt	cagccagcgt	gcggggcatt	10260
ccaccgtgtc	ccaggggggc	atgcaggtca	gcctggcgcc	gggtgagctg	ctgctgatgg	10320
attcggtcgg	gcgctgcgaa	atcacccccca	gtgggttgat	cgaacatgtc	tcgctggccc	10380
tgtcgcgtga	gcaggtacgc	aagtatgtgc	aaggcagcgg	cccgatgttt	ggcaagatct	10440
cctcgagcaa	cgctgcgggg	cgcatgctgc	atgtgctgat	ggaccaactg	tgcaaggacg	10500
gcaatgtaag	cggtgatggg	gcccagggcg	acgcgctgca	gaccgccttc	attgccctgc	10560
tggagccagg	cttcgagcgc	catggcgaag	cgctgggcaa	ccttggggcc	ttgaacgggg	10620
ccaacctgcg	gggctacgtg	cagcaggtga	tcgacgagtc	cctgtcacag	cccgggctga	10680
ccccgtccaa	cctggccggg	cgctgaaca	tctcgggtgc	tcacctgtac	cggtgttcg	10740
aggaggagg	cgatagtgtg	tgccgctaca	ttcagcgggc	gcgcctgaag	cgcagtgcgg	10800
atgacctggc	caaccctgct	ttcaggagcg	agtcgattac	ctcgattgcc	tacaagtggg	10860
ggtttaccga	ctcggcgcac	ttcagccgct	cgttcaagaa	acagttcgaa	cgctcgccca	10920
aggactaccg	ggcgcaggcg	atggtttgag	tgtgatgggtg	ctgcttgtgc	gggcctcatc	10980
gccggcaagt	cacttggcgg	cggttcagcg	acggccggtg	aagtagcccg	acagctgggtg	11040
cacggtcctg	ccggcagtgga	gcagcagcgg	gcggaaatgg	tccttgccga	ggatgcgcgc	11100
atgcttgacc	gagctgacca	ggtcatagcg	cttcgatccc	tcctgcatac	cctcggcgag	11160
tatcttgcaa	atgatgtggc	tgggcgtgac	gccaaagccg	gagtagccct	gcacatagaa	11220
agcgttgggg	cggttgctga	gggtgcctat	ctgcggaaac	aggttggcac	tggttggcct	11280
cgggccgccc	caggccaggt	cgatgcgcac	gtcttcagg	taggggaaaa	tcttcagcat	11340
cagcgcgcgg	ttccacgcct	tcaggtccag	cgggaaagtc	tcgacgaagg	gcgtggcggc	11400
gccaacacgc	aggcggttct	cgcggtgac	ccggtagtag	tcgatcaccg	ggcggtatgc	11460
gctgtaggcc	ccgcgtatcg	ggctgatgcg	ctcgatcagc	tcacccggca	atggctcggg	11520
catcatctgg	aaggcatagg	tgtttatagt	gcgtgcgtgc	agctgcggct	ccagcttgtt	11580
gaggaagctg	tcgcacgccc	acagcagctt	gctggcgcgt	accgagccac	ggccgggtgcg	11640
taccgtgatg	cgctcgccgt	aggctcacttc	cagggccggg	ctgtgttcga	agatgcgcgc	11700
accatggccc	accagtgcct	gcgcttcgcc	cagcagcagg	ttcagggaat	gcacatggcc	11760
accgcccattg	tgcacagggg	cgctgctgta	ggcgttgctg	ccgatgatct	ggcgcacttc	11820
gctgccaccg	agaaaacgga	tctcgtcgcg	ggtattgatc	gccttgaacg	ccttctccca	11880
tttgcgcagg	gtctgttcct	ggcgggcggg	gaagcccatg	tagccatagc	cggtggcagaa	11940
gtcggcgctg	atggcgtagc	gggcgatgcg	gtccttgatg	atgccggcgc	ccagttcgct	12000
gatttcgaaa	atatccctca	cgccctgatc	accgacgctg	ctgcggatct	tctccaggct	12060
gtggccgatg	cccgccatga	tctgcccggc	ggtgcgcccg	ctaccgcccg	agcccagata	12120
acggccctcg	agcacgacga	tattggtcac	gccttgttcc	gccagctcca	ggcggtggt	12180
aatgccggag	aaaccgccac	cgatcaccac	gacatcggcc	tcgatgtcgc	gttccagggt	12240
tgggaagctc	aggttgtact	tcttggctgc	cgagttagta	gtggggctct	cgagggtgat	12300
catgacgccg	cctgctgact	ggaaatgggt	agaaatcatt	ctattaatgt	attaatgatt	12360
gtgactggc	atactgcctg	gtttgctatt	tcagcctcc	ttgagcccgc	atgaccacac	12420
cgagaccctc	cctgaccctg	accttgctgc	aggcgcgcga	agccaccatg	gcgttcttcc	12480
gcccggcgct	gaatgcccat	gacctgaccg	agcagcaatg	gcgggtaatc	cgatatcctgc	12540
gccagcaagg	cgagctggaa	agccatcagt	tggcggagct	ggcctgtatc	ctcaaaccac	12600
gtatgagcgg	ggtgctcaag	cgccctggagc	gtgacggcat	cgtagcgcgg	cgcaagtgcg	12660
cggaggacca	gcgcccgggtg	ttcatcagcc	tgaccgaggc	cgccagcaa	gcgtttctgg	12720
cgatgagcga	ggagatgacc	cgcaactacg	acaagatcct	cgccagttt	ggcgatgaca	12780
agctgcagca	gctgatgcag	ctgctgggtg	aatgaagaa	gatcaaacc	tgacgcgcca	12840
ggcgtcagcg	ggtgagtgc	agcaggtctt	ccagcacttt	cagcagtgct	gcccgcgcgc	12900

ES 2 380 530 A1

gctcataggc	gtcggggcct	gcgtagatca	gctctacata	caggctgtcg	atgatgccca	12960
ggtaggcatc	ggcatacagc	gccaggcggc	tgtgctgctc	atgcgcccag	ccgtggcgag	13020
cttgcaaggc	cacgctgaac	ccttcgcgta	tgccgtccag	gtactgttca	aagcccgaag	13080
tgacaatcgg	cttgatgccc	gcccggggca	ggaacgccgt	gcgcaacacg	aagcgcagtt	13140
gggcccagtc	gcgataacgt	tcggccaggt	gcagggccag	ccagtgcccc	gccgccaggc	13200
cgctcggggc	ttcctgcgca	aagccgtgct	cgacaaaggc	cgtttcctgc	acaagcgcac	13260
gctggaacac	ctccacgaac	aaggcgtcct	tgttggcgaa	atgcgcatac	agcgatgcct	13320
tgcgcatgcc	cgccaactgg	gcgatttctg	tcagcgaaga	ggcgtcataa	ccgtactcgg	13380
cgaagtggcc	gacggcggca	tcgcacacac	gcaccgcaga	aggggaaagg	tctttcaaca	13440
gcatcactcc	gtcagggggc	cggcggggcg	cgcgctctt	gagggtgggg	ttgtggtgat	13500
cgaaaatgca	cgggtcaatg	cttgtcgcaa	ggcaatttcc	gggcgccatg	gaaagtgcaa	13560
tgttcccctc	gtaacgtgca	ttcctccacc	caatcgccgc	tcacatactg	atcgctctt	13620
cgaatccaat	aagaaagaga	ccgctcatga	aaaagccaaa	ccccctgctg	gaagacctga	13680
agtccgtcct	gcccaccatt	gcccaccaatg	ccatgcgtgc	agagcaggac	cgcagtgctg	13740
cggcagagaa	tatcgccttg	ctgaaaagca	tcggcatgca	ccgcgctttc	ttgcccaaac	13800
acttcggcgg	catggaatc	accctgcggg	agttcgcoca	gtgcatcgcc	ttgtgtggcg	13860
gggcctgcgc	cagcacagcc	tgggccaatg	gcttgctgtg	caccacagc	caccagatgg	13920
caatgttctc	gcccaagcta	caacaggagg	tgtgggtag	cgaccgggat	gctaccgcca	13980
gcagcagtat	cgcgccgttc	ggcgcactg	aagaggttga	gggtggcgtg	tcgttcagcg	14040
gcgaaatggg	ctggagttcc	ggttgcgacc	acgccgaatg	ggcgattctc	ggtttccgcc	14100
gcaagaatgc	cgaaggcgct	caggattact	gcttcgccat	cctgcctcgc	agtgactatg	14160
aaatccgtga	tgactggtat	gccgtgggca	tgcgcgagc	cggcagcaag	accctgatcg	14220
tgcgtgatgc	cttcgtgccc	gagcaccgca	tcagaaggc	caaggacatg	atggagggca	14280
agtcggcggg	ctttggtttg	taccccgaca	gcaagathtt	cttcgccccg	tatcgcccgt	14340
atthtgccag	cggcttctcc	acggtcagct	tgggcgttgc	cgagcgcag	ctggaggtgt	14400
tccgcgagaa	aaccgcgaac	cgctgcgtg	cctacaccgg	tgctgccgtg	ggcgcgccca	14460
ccccggcgct	gatgcgcctg	gccgagtcga	ccatcagggt	ggccgctgcc	cgggcattgc	14520
tggaaaagag	ctgggacgag	attgccgagc	acagtgcocg	tcacgaatac	ccgtcgcgtg	14580
gcacgctggc	gttctggcgt	accaaccagg	gctacgccgt	gaagatgtgc	atccaggccg	14640
tcgaccgcct	gatggaagcg	gcccgtggtg	gcgcctggtt	cgagagcaac	gaactgcagc	14700
ggctgttccg	cgattcgcac	atgaccgggtg	ccatgccta	caccgattac	gacgtgtgtg	14760
cgaaaatcct	cggccgcgag	ctgatgggcc	tggagcctga	cccggcgatg	gtctgagccg	14820
ccacttgtht	tcaccatcc	cctacaagca	caacaacaaa	cagggcaggc	tgccaggcct	14880
gcccgggagt	cttgcatgtc	caaagaaacc	ttcgattcac	gtgccttcog	ccgcaaggct	14940
ggcaacttcg	ccaccggcgt	gaccgtggtg	actgcgcocg	gccccagtgg	ccgcaaggct	15000
ggcgttaccg	ccaacagctt	caactcgggtg	tcgctggacc	cggcgcgtgat	cctgtggagc	15060
atcgacaagc	gctccaccag	ccatgaagtg	ttcgaagagg	cctcgcactt	tgccgtgaac	15120
attctggctg	cggaccagat	cgacctgtcc	aacaactttg	cccgcccgaa	ggaagatcgc	15180
tttgccggta	tcgactacga	gaccggcact	ggcggcgcgc	cgttgttcgc	cgattgcgcg	15240
gcgcgctttg	agtgtgaaaa	gtaccagcag	ctggacgggtg	gcgatcactg	gatcctggtg	15300
ggcaaggtag	tggcctttga	tgactttggc	cgctcgcocg	tgctgtatca	ccagggcgcc	15360
tattcaatgg	tgctgccgca	tacccgcag	acccaaggcg	cagaggggca	ggcaccgagc	15420
agccacttcc	agggccgcct	gcagcacaac	ctgtactacc	tgatgacca	ggcgtcgcgt	15480
gcctaccagg	ctgactacca	gccacgccag	ctgtgtaccg	gcctgcgcac	cagcgaggca	15540
cgcatgctga	tgggtgctgga	gaacgatgcg	ggcctgagcc	tgaacgacct	gcaacgcgaa	15600
gtggcgatgc	cggcgcggga	gatcgaggaa	gcggttgcca	acctcaagcg	caaagggctg	15660
attgccgatg	acgaaggggc	agtgcggcta	tcggtgaagg	gcgtggacga	gaccgaggcg	15720
ttgtggacca	ttgcccggca	acagcaggac	aagggtgttcg	ggcagttcag	tgaacagcag	15780
ctggagactt	tcaagaccgt	gctcaaggcc	cttatcaaca	tctgaacacg	ctttgggatg	15840
gcaccggctg	ttttggatgg	caccggctgt	gcccgtgttc	gcggatgaac	ccgctcccac	15900
aggtccagag	ccagtagcaa	cttcggcgcg	gtacctgtgg	gagcggcttt	agccgcgaac	15960
accggcaaa	ccggtgccat	ccaaccagaa	gcctcagtag	gcaccacccc	cggcaggtgg	16020
gactaccact	gtatccttga	acttccccgc	cagctcgcgc	agcccgcgca	tcagcaccgt	16080
ggtatccaca	cccaccgcca	caaacgcgcg	accagctcgc	atgtagcgtc	gcgccagttt	16140
ctcgtcccg	ctgagaatgc	cggcggcttt	gcccgccttg	ccaatgcgca	cgattgcgtc	16200
ttcaatcgcc	gctcgcacct	cggggtgccc	ggggttgccg	cgatgcccc	tggccgcact	16260
caggtctgca	ggcccgatga	acacgccatc	cacaccttcc	actgcaacga	tctcgtccag	16320
gttggccagg	ccttccttgt	tctcgatctg	caccagcagg	cacatttgct	catcggcgtg	16380
gtccaggtaa	ccggggaggg	tgttccagcg	cgaagcccg	gccagcgcgc	tgcccacccc	16440
gcgaatgcc	ttgggcccgt	aatgcatggc	cttgaccagt	tgccgcgcct	gttcggcagt	16500

ES 2 380 530 A1

ttccaccatc	ggcaccagca	aggtttgtgc	gocgatatcc	agcacctgct	tgatcagcgc	16560
ggtatcgccg	atcaccgggc	ggatcactgc	ctggctgggg	tagggtgcca	ccgcctgcaa	16620
ctgggcgagc	atgcgcgcga	ggtcgtttgg	cgcggtgttc	ccgtcgatca	gcagccagtc	16680
gaaaccggca	ttggccgcca	gctcggcgca	gtaggcacgc	gccaggccga	gccacaggcc	16740
gattttcggt	tcaccgctgt	gcaggcgctg	cttgaagtgg	ttgatgggca	tgtccatgag	16800
caggtcctta	aacgaagcgg	caggcgatgg	agccgagcat	gtcgtagtgc	acgtggaagg	16860
tgtcacctgg	gcgagcggcg	accgggcggg	tgaacgaacc	ccaaggatg	atctggccgg	16920
gctgcaaggt	gacgtcgtac	ggcgccagtt	tggtggccag	ccaggcaacg	cctttggccg	16980
ggtggttgag	cacggcagcg	ctgaccccgg	attcctcgat	cacgccattg	cggtagagca	17040
ccgccggcac	tttgcgcagg	tcgatttccg	tggggcgcac	ggcccccccg	cccatcacca	17100
cgccggcatt	ggcggcggtt	tcggagatgg	tgtcgaacac	cttgccgggtg	gcctgggttt	17160
gcggtgccac	ctgctggatg	cgcgcgtaaa	tgatttccag	cgccgggatc	accactcggg	17220
tggcgtccag	cacatcaaac	acggtgatgt	tcgggccctt	cagcggcctt	ccgaggatga	17280
acgccaactc	cacttcaacc	cgcggcacga	tgaagcgcct	gaaggggatg	tcgctgcctt	17340
cgctgaacag	catgtcgtcg	agcaaggcgc	cgtagtcggg	ctcggatgat	ttcgacgata	17400
cctgcatggc	gcgcgaggtc	aggccgatct	tgtagggccc	cagcttgccg	ccggcggcga	17460
tcttttttgc	caccaggcgc	cgctggatgg	cgtaggcgtc	ttcgatggtg	attgcccgtt	17520
gctccagcga	gaactggcgc	acttgctcgc	gggagcgttc	ggcctggctg	aggcggctcg	17580
cggcgtgctg	gatgaaagcg	ttgtctagca	tgggggcggg	ctcttgattc	aagggttgac	17640
gatggcagcc	tgggtgcgca	acaccagcag	gccgcccagg	gcatgaaga	cgccgagtac	17700
gtacagagca	aggctggcgc	tgtaggggtg	gtcgcgcacc	cagccgatga	agtagggcgt	17760
gaagaacgag	gcatgctgct	ccagcgagct	gatcagggca	atgccggcgg	cctgggtacg	17820
ggcgttgagg	aacgcggcgg	gcagttgcca	gaacatcggc	agcgcagcgc	tggcgcccat	17880
gccggccagc	accaggccgg	ccattaccgg	cagcgcctgc	tcgggggcaa	tggccgcaat	17940
agcgatgccg	atggcagcca	tcagcagcgg	tacgcacagg	tgccagcggc	gttcgcgctg	18000
gcggtcgtcg	gagcggccgc	acgccagcat	gaacacgcag	ccggccacgt	acggcacagc	18060
gctgagcagg	ccgacactgg	cgctcgtggc	cacaccggca	ctgtgaatca	ggctgggcat	18120
ccagaacgca	agggtattca	ccgccagcat	caccgcgcaa	tacacggcca	ccaacagcca	18180
cagcgcacgg	cttgcgaaaa	tggcgccgaa	cgaggttacg	ggcttgcgct	gttcttcctc	18240
accgaattgc	gcgcgcagcg	tggctttctg	ctgctcatcc	agccagctca	cccgcctcgaa	18300
gtgctccggc	aaaacggcca	gtaccaccag	gccagcaaac	accaccggcg	ccccttcgag	18360
caggaacatc	cactgccagc	cacgcagccc	gcccgtgtcg	tgcatgaagg	ccagtatggc	18420
cccggacact	ggcccgcgca	ccactccggc	caacggcacg	gcaatggcga	acagcgcggt	18480
gacctgggcg	cggcgcccgg	ccgggtacca	gcggttaggg	taaaccagaa	tgcccgggaa	18540
gaaccggcc	tcggccgcgc	ccagggcaaa	gcccgaacag	tagaacgcgc	tgctgccttc	18600
gatcagcagc	atgctggctg	acaacagccc	ccacaccacc	atcaggcagg	cgatccagcg	18660
gcgtagggcca	acgcggctga	gcatcagggt	gctggggacg	ccgaacagcg	cataggcaat	18720
gaagaacagc	ccggcaccca	ggccatagac	cggtgctggc	aaatgcaggt	cctggctcat	18780
ctgcatcttg	gcaagcccaa	tgtagatgcg	gtccagggtg	gcaaacaggt	agcacaccag	18840
cagcagcggc	atcagccgcc	agggtgactgc	ccgatgggta	ctgtcggccc	gttcaacgtg	18900
tgctcgcgc	ggcgaggctt	gttcgagtgt	gctcatgttt	ttgtacttat	tctgtaata	18960
gtcggggagg	gctggttttg	agccggcgcg	ctagcgggtg	aacagtgggt	gcaaggtgct	19020
gtgcttggcg	tcgtagacct	gggcggtgct	gtggctgatc	tgcacgggtg	tgccgatcgg	19080
gcgctggttc	agcagtgggt	ccaggcgcgc	tttcaacact	gccagcaagc	tgctcgccac	19140
tgttttgtgc	acctcggcgc	tacggccggg	agccatgcgc	aggttggcgt	acagaaagcc	19200
gtattcgctt	ttgcccgcgg	ccaccgcgca	atggggcgcg	gggtaggcca	gcacgcgtgt	19260
accgccagtg	gggaacacgg	ctttgccttc	ggcatcgcgc	tgctcagaca	tggtgtcggc	19320
cagggcgcg	cacaggccgg	ggatgtcggc	gtcggtttcc	aggctcgggg	tatagagcag	19380
aaccaggtgt	ggcatggggg	cctcctcggg	gaggggcggc	tggccaccgg	ccagggcgac	19440
cagccgcgaa	cgggtggggt	acaggcggct	ggtgggcacc	acggcggccg	ggttggcggc	19500
ctgggcagcg	gggatggcac	caccgtcctg	cgggctgacc	gggaagatcg	cgtagatctg	19560
gccggtgccc	gaagagccga	agttagggct	gaccattcgc	gccttgccgt	cgtaactcga	19620
ccagcccagc	gcaccagca	gcattgccc	gtcgtgcatg	aagccttcac	cgtagccctt	19680
ggcggcgtac	tccggcagca	tcccgcagaa	cgcttcccac	tcgcccctct	gccacatttg	19740
caccacagcg	tggtcgaggg	tttcgaggaa	cgggctccac	accttgggtg	caaagtccgg	19800
cgctggccg	ttctgcgcga	agcgggtgca	cagcgagccg	ctggccagga	acgccacggg	19860
gccgtcgtag	tggtcttcta	ctgccttgcg	catggcccag	cccaggcggg	cactgtcggc	19920
caggtagtgc	gaggtgcaca	gggcccagac	cgagaccact	ttgaagtgct	ggtcctggtt	19980
catgtagcgc	atgggcacca	gggtgcccga	ttccggggcg	agggtgggtg	cgtaggtggc	20040
catggtttcg	acgttgaagc	ggttgcactc	ctcggccagc	agcttgccca	gctcgggatt	20100

ES 2 380 530 A1

gccggggaat	gcgtagggca	tgttgctgat	gaagtgcggc	agttcgttgc	tgggtgtacac	20160
gccctcgaaa	tgcggcccgc	acagcacgtg	gtagttggcg	ttgaccagcc	agtgcgtgtc	20220
gaacacgacg	atgggtgtcca	cgcccagctc	acggcaacgg	cggctgattt	cgtgatgccc	20280
gtcgatggcc	gcctggcgaa	agccttggcg	cgggcctggc	agttcggaca	tgtacatgga	20340
cggtagatgg	gtaatcttgg	cagttagagc	gagtttgccc	atgggggtct	ccgataagac	20400
gctgttgttg	ttttggggct	gaccocggtc	cttgtaggag	cggccttgtt	ccgggatggg	20460
gcgcacagcg	gccccggcga	tatctgcggc	gaggctgaaa	tccagggggc	gctgcgcgcc	20520
ccatcgcggg	cacaaggccg	ctcctacacc	cgggcggtgt	aaaccgcaca	gagggtaga	20580
tgccccagcg	aggaatgtgg	tgattaccca	tggaaataca	cacgttcttg	atctctgcaa	20640
agacctcgaa	gctgtactgc	ccgcocctac	gcccgggtacc	ggaacctttc	acgccgccga	20700
acggctggcg	caggctcgct	acgttctggc	tgttgatgaa	caccatgccg	gcctcgatgc	20760
cacgggccag	gcgatgggct	ttgcogatgt	cctgggtcca	gatgtacgag	gccaggccat	20820
actcgggtgc	gttggccagt	tgcagcgcct	cggcttcgct	cttgaacggg	atcaggcaca	20880
ccaccggggc	aaagatthct	tcctgggcaa	tgcgcactct	gttgttcacg	tcggcgaata	20940
cggtagggctg	gatgaactgc	cccttggcca	ggtgcgcagg	caggttggcc	gggcgctcca	21000
ggccccagtc	gaccaggcgt	gcaccttctt	cgatgccaat	gcggatgtac	ccggtgacct	21060
tgtcatagtg	ctgctgggtg	atcatcgaac	cgacctgggt	tttcgggtcg	gtcgggtcac	21120
ctacgatcag	gcgcttggcg	cgcgcgcgca	actctgcgac	aaactgcggg	tacacgcttt	21180
cctggatgaa	gatgcggctg	ccggcgggtg	agcgcctgcc	gttcagcag	aagatggtga	21240
acagcgcggc	gtccagcgcg	cgctcaaggt	ctgcgtcttc	gaagatcagc	acgggcgact	21300
tgccgccag	ttccatcgag	tactttttaa	ggcctgcggg	ctgcatgac	ttcttgccgg	21360
tggcggtagc	gccggtgaag	gaaatggcgc	gcacatcggg	gtggcggacc	agggcacgc	21420
cggcggtagc	gccgtaaccc	tggatcacgt	tcagcaccct	gttggggatg	ccggcttcta	21480
ccgccaggcg	gccagttctg	ttggcggctc	gaggcgacag	ctcgcctcat	ttcagcacgg	21540
cggtagttgcc	cagcgcacag	cacggcgcag	tcttcagggt	agccgtcatg	aacggcacgt	21600
tccatgggct	taccaggccg	cacacacca	ccggctggta	caggggtgtag	ttgagcatct	21660
ggtcgtcgac	cgggtaggta	tggccgtcca	tgcgcgtgca	cacttcggcg	aagaagtcca	21720
agttgtgcca	ggcacgcggg	atcagcacgt	tcttgggtctg	gtggatcggc	aggccgggtg	21780
cgagggttcc	cagctcggcg	agtttcggca	cgttctgctc	aatcagctca	cccagcttgc	21840
gcatcagccg	ggcacgttcc	ttggccgggg	tgttggccca	cttggggaa	gcttccttgg	21900
ccgcagccac	agcctggggc	acttctctcg	cgcgcgcgct	ggcgacttcc	cagatggcgt	21960
cgccggtagc	cgggtttagt	ttgacgaagg	tgtctttgct	ctcgacctca	cggccgttga	22020
tccagtgcct	gatcatgctg	ctcatgcctt	gttgttcttg	aagaagtccg	cttcgctgac	22080
gatacggttg	accaggcgac	cgacgccttc	cacttcacc	accacttctg	caccggcgac	22140
cacatcggcc	aggccttctg	gcgtgcgggt	ggcgatcatg	tcgcccgggt	gcagggtcat	22200
gaagctggag	aagtattcga	tgagggtcgg	gatgtcgaag	atcatgtccg	cggtaggtgcc	22260
ttctgcttc	agctcacctg	tgatccaggt	gcgcagcttc	aggttgctga	cgtctggcac	22320
atcgcccgca	tcgacgatcc	acgggcgcgac	cggggtgggtg	gcatcgcggg	ttttcacccg	22380
caggtagggg	cggtagtagt	tttcaggta	gtcgcggatg	gcgtagtctg	tgcacacggg	22440
gtagccggca	acgtaggcca	gggocgtctc	acgcttgacg	ttcttcgccc	ctttgccgat	22500
caccgccacc	agctcgcact	cgtagtgcac	gtattcgcag	ttgtccgggc	gccaggtgac	22560
ctggatgtgg	ccgggtgtagg	tgccctggcga	cttgatgaaa	gccaacgggt	cggtagggcg	22620
cgcaaggcc	agctccctgg	cgtggctcgg	gtagttcagg	cccagggcga	acatgctgcc	22680
ggtggcgggt	ggcagccagg	tgacctggtc	ctgatggacc	aggcggccgt	cggcaaggcg	22740
caggtgatcg	tcttcgaccg	tgacatcgtg	ggcctggccc	tcgaactgga	tacgggcgtg	22800
tttcacaggt	aattcctcac	tcggcgacga	tgtggttggg	cagcttggcc	aggccgtcca	22860
tctcgatgtc	gacgcgggtc	cctggctgta	catcgacgcg	gccctcgggg	gttccgggtga	22920
tcaggatgtc	gccggcgtgc	agggatcatga	actcgtctgat	ttcggcaatc	agctgcgcca	22980
ccgtgcgtac	gcagttggcg	gtgttgttgt	gctggcgcag	ttcgcgcttc	acatacaggg	23040
gcaggcccag	ggcatcgggg	ttggccactt	ggctggcggg	caccagttca	gggcccagcc	23100
ggcaaaaacc	atcacggcac	ttggccttga	ctcgaggcgc	gtagtagctg	gcttcgggca	23160
ggctcacttc	gttgacgatg	gtgtagcccg	ccacatgctc	cagggcatcg	gccacgctga	23220
cgccgctggc	gtccttgcca	atcaccactc	ccagcgcggg	gcccgggttgc	acgcgctgca	23280
cgccggccgg	gaataccacc	tggccttcat	gctgggttgcg	ggtgttcggg	gtcttgacga	23340
acaacaccgg	cttgaccggc	agttgcttgt	acgggtgcttc	cacgaacgcc	gcttgggtgct	23400
gctgcagcaa	accctggtag	ttcagcgcga	cgcgcaacag	ggtgcccgctg	gcaacgtcaa	23460
gcagggcgatg	gctcatgctc	ttctcctggc	agtgacgggc	ggtggccgctc	ctgcggattt	23520
cgtaaatgtg	taaatgttat	agttaatatg	ttaacgatgg	tcaaggggtg	gccagtgccg	23580
cctgccggca	aggcaaggca	ccatgggcca	tcgtcaacag	ggtcaagcga	tttgccgagca	23640
agcagccatg	agcgaaccggc	atccgatacc	gaacatcaac	attggccagg	tttacgacca	23700

ES 2 380 530 A1

gcgctacagc	gacagcgagg	tgcattacga	ccggctgggc	aacctggcgg	gctttttcgg	23760
gcgcaacatg	ccggtgcacc	ggcatgaccg	gtttttccag	gtgcattacg	tgaagtcggg	23820
cacagtacgg	gtgtatctgg	atgaccagca	gtacatcgag	gccggggccga	tgttcttcct	23880
cacgccaccc	acggtggcgc	acgcgttcgt	caccgaagct	gacagcgacg	ggcatgtgct	23940
gacgggtgcg	cagcaactgg	tgtggcaatt	gatcgaagcc	gacgccagcc	tgtgtccggc	24000
gggcatgcag	gtgcagccag	cctgtgtggc	gctgggcaac	ctgccggccg	aatacaaggc	24060
cgaggcgcag	cgctgcaag	gctggctgga	cgcggtgagt	gacgagtttg	ccacgcagca	24120
accgggtcgc	gaggcggcgt	tgcagtcgct	gacccgcctg	atcatgatca	gctgtctgcg	24180
gctgtgcccc	aactcgctgg	aatcgacccc	ggcgcggcat	gaagacctga	agatcttcca	24240
ccgtttcaat	gccctgatcg	aagcgcatta	ccttgagcat	tggccgctgg	cccgcctacgc	24300
gcagcagatt	ggcgtgaccg	aggcacggct	gaacgatgtg	tgccggcgca	tcgccgactt	24360
gccatccaag	cgctgtgtgc	tggaaaggct	gatgcaggag	gccaagcggt	tgtgtttggt	24420
ttccggcagc	acggccaacg	aaatctgtta	ccagctcggc	ttcaaggatc	cggcctattt	24480
cagccgcttc	ttcaaccgct	acgccaaagct	cacaccggg	gagtaccgcc	agcggcaggc	24540
agaattgcag	tgaaatggcc	atggcggctc	acccgggtgc	tgttgttggt	tacagcggat	24600
ggtcgcagcc	cgcgcgccgg	gcttgaatgg	gttttcgctg	gaacagattg	cactttccat	24660
cgtgcatgcc	cttaaattcg	tgaattgaga	aaaagccaca	ggtttgacca	tgaccaagac	24720
gcaaccttcg	ctcacgctaa	gcctgttgca	ggcccagaaa	gccgcgatgg	catttttcag	24780
gccgctgttg	aaccagcacg	acctgaccga	gcagcaatgg	cgggtaatcc	gcatcctcaa	24840
gcagcacggc	gagctggaga	attatcagtt	ggcggaactg	gcctgcatcc	tcaagccgag	24900
catgaccggg	gtactggggc	gcctggagcg	agacgggctg	gtgcggcggc	agaaggccgc	24960
gcaggaccag	cgacgggtgt	tcgtcagcct	gaccgaaaga	ggggaggcgt	gctttgcctc	25020
gatgaaggaa	ggcatggagg	ccaactacca	gaagattcag	gcgcagtttg	gtgaagagaa	25080
gctgcagcag	ctgatggggg	tgttgaatga	cctgaagcgc	atcgcgccat	aa	25132

<210> 2
 <211> 12339
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12339)
 <223> Cluster tyn

<400> 2						
tcaggcgaaa	cgctcgaagc	ggtacgggtga	cgggctcgatc	agcgggggtgg	cctggggccac	60
caggtctgcc	gccagctggc	cagcagcagg	cgaggtgccg	aagccatgcc	cggaaaagcc	120
ggtggccagg	gtcaggcccc	gaatactggc	caccggggccg	atgaccgggt	tggagtcggg	180
ggtgacgtca	atcgtgccgg	cccaggcgct	ggcgatacgg	gcctgttcga	acaccggcca	240
ggccgctttc	aggttgcgca	tggcctcgtc	gttgagggcc	gggttggcgt	gcgggtcctt	300
taccctgaca	cgctcgaagg	gggttacatc	cgttgccttc	cagcgcgggg	ccagggccag	360
gtccttgaag	aagtacttgc	caaagctgat	gcgcaaaaag	tcccgcctggg	cacgcagctg	420
gggcaggtaa	cgcttgccca	gcagcaggtg	atcgaggggtg	aggaaggcgt	ccagcgcgcc	480
gcgctgggtg	atgatgtage	cgccgtcctt	gtgcttgccg	aaggaaaaat	ctgggtgcgcc	540
cacggcgatg	tcggttggcc	cgtccatggg	ctctgtgcgc	agcacggaac	aggtcagcgg	600
caaggtcggc	aggttgatgc	ccaggttgcc	gaggaacttg	cgcgaccaca	ggccaccggc	660
cagcaacacc	tggtcgcagc	ggatttcacc	ttgctcgggtg	accaccccgc	tgacacggcc	720
ggctgcgggtg	accagcgtgc	gcaccgcgca	gttctccact	accactgcac	ctttggcgat	780
cgccgccccg	gcgatggcgc	tggcggccag	ggtcggttcg	gcgcgggctg	cggagggggt	840
gaagatgcca	cctgcccatt	ccgcccacc	accgcgacc	atccgggtga	tttcccgcgt	900
gctcagcagg	cgcgaatcca	ggcccagcgc	ctcgaagcctt	ttcagccagc	cttcatgcat	960
gcccattctg	gtgtcgttac	ggccgatgaa	catgatgccg	gcttgccgat	agccaacgtc	1020
gctgccaacc	cgtgcgggca	tctcggccca	cagccgatca	gccgccagtg	ccagggggat	1080
gtcatggggc	tggcggttgg	tcttgcgcac	ccagcccagg	ttgcgcgacg	actgctcccc	1140
agcgatgcgc	cccttctcca	gcaccaccac	cggtatggtg	cgttcggcga	ggctcagtgc	1200
ggcgggtgagg	ccgataatgc	cgccaccgat	gatcaccacg	gtagtggcgt	cggggtggcg	1260
ggtgctgggt	tgcacagggg	cgatcgtggg	agacatggct	ttactctttg	ttgtgcgtgc	1320
agggggagtg	ttcagcgcca	gccagcagcc	tcactggcca	aggcggatca	gggtcacttg	1380

ES 2 380 530 A1

cgcttgcccc	gcaccgcggt	aggcggtgac	ctccagctcg	accttgtaaa	cggtggagcc	1440
cagcggcggg	caggtgaccg	tgggtggcgg	gtcgatgccg	cggaacttct	cgccgatcac	1500
gtccatgacc	cgtggtacat	cggcagggtc	ctggatgaac	acgcgcgagt	tgatgacatc	1560
ggccaggctg	gcatcgactg	cggccagcgc	ggtttcgatg	ttggcgaaca	cctggtgggt	1620
ctgttcgatg	acgtcctctg	gaatgacctg	ggtctgcggg	ttgctgcccg	cggtggttga	1680
gacgtgaatc	cagttgtcca	ccgccaccag	gcgggagtag	ctggccatgg	cttcgaactt	1740
ggagccgggt	ttcagtttga	tgatctgtgt	catgggcttt	gccttgttat	ccggttgccg	1800
ggatcagctg	agaacggggg	ttcccagag	ggtgagcttt	acgccgatgc	cttgctcgag	1860
cgcttgccg	tacaccacgg	tgccccaggc	cacgtcttcg	acgggcatgc	cgcccaccga	1920
catcaggatg	atctcgtcgt	catgcaggcg	gcccgggtgc	tcgcccgtga	tgatcttgcc	1980
gatgtcttcc	acctgctcgg	cggccagcgt	gccttcggca	atcatgtcca	tgaagcgcac	2040
acctaccagc	ggtacgtggt	tgtgcgcagg	cttgggcagc	tcttcgaacc	aggcctcgta	2100
gaggccgggt	ttgtccacca	ccttgccgac	gtcgtcctgc	tccatgccgg	cgctcgatact	2160
gcacggggct	ggcatggcca	ggaacgcgcc	aggcttgacc	cactcgcggc	gcaccagcgg	2220
gtactggctg	gggtcgccga	cttcgcccga	gctgcagtag	ctgaccaggt	cggaaccgcg	2280
taccacttct	tccagggttt	ccaccacctg	gacatgagtg	atctgcccga	agctggtttt	2340
caccacggcg	acgaaggcat	ccaggttctt	ctggccacgg	cccttgacct	tgagggtgct	2400
gatcagcggg	cagacggcca	tgaacgcagc	gaccgtggtc	ttgcccatac	cccccgggcc	2460
ggccaggccg	atcaccttgg	cgtccttgcg	cgccagggtg	cgggcgcccga	cgcccgggat	2520
ggcgccgggt	cggtaggccg	acagcagggt	ggccgacatg	tgtgccagtg	gcgcgccggg	2580
gtcggcatcg	ttgagggtga	acatcaggat	cgagcggggc	aggccttctt	cacggttggc	2640
gatgttcgag	ccgtaccact	tggcgcctgc	ggtctggaag	ttgccgccga	ggtacgccgg	2700
catcgccatc	atgcgcgggt	cggcgggtgg	cttgggcagc	ttggggaatg	gagagtgctc	2760
ggggaaggta	atcatcgcgc	cgtgcgagtc	gctgctcggg	ccggccatgc	ggtagtcacc	2820
ctggtacagc	aggccgaaca	tttcttccat	ggtgtcgaca	caggccggca	tgtcggtgac	2880
gccggcacgg	atcatgtcct	gctcggacag	gtagatgaag	tcaattctgg	tatcgagggg	2940
catggcgggt	ctcgcagggc	tggctgccgt	cggatttgtt	gttggtttct	aggcaaccag	3000
tttcgctaac	gactggtagg	tcgtcttgtg	tctgcctgcc	agccgagttg	accgtcagtg	3060
ccagggtctc	aatggcccgc	gagcgagaag	ctggccgggg	tgtggcgcag	gctgagggcg	3120
gtcagcaggc	acaccaccag	ggtgcacagg	gccagcagcg	cgcccacatg	ggtcggggccg	3180
tggttgagta	ccactgcggc	cagcggggcg	gcgcgggcag	acgccgacag	ctggatggcg	3240
cccagcagcg	ctgcgggtga	acccagtgcc	ttttcttgcg	aggccatcac	cagcgacatc	3300
agcgtcgact	cggtatctcc	caggccgaac	agggtatca	ccatgccgcc	ggccacacct	3360
ggcagcccca	ggccggtcag	tgcaccgagc	aggctatgc	aggcaccgcc	ggccatgcac	3420
agcacgcccc	cccaggtcaa	ggtattgagg	cccagcggc	tgatcaggtg	gctggccgct	3480
atggcgcccga	gcaggatcga	caccccggtg	gcgccaaaca	gcaggccgaa	ggcctggggc	3540
ctcaggccgt	agtgggcctg	gtacaccagg	gtggcaccgc	cgatgtaggc	gaacaggaag	3600
aagaataccg	cagcaaccgc	cagggtcggg	cgcaggaagc	ggcggtcggc	gaggatggcc	3660
aggtaggtgc	tgcaggcgtg	gcccaggcgc	aggggttcgc	gtttgctggg	cggcagggtt	3720
tcgggcaggt	tcagcaggct	gttgaccagc	accgtcacgc	ccatgccggc	gagtagcagc	3780
attactgcac	gccagccgaa	atgtgcgtcg	atcacgccgc	ccagggcagg	tgccaggatc	3840
ggtgcgacgc	cttcgatggt	catcagcagg	gcgaacagtt	tggtcgcggc	cacgccctgg	3900
ctcacatcac	gcaccatgct	catgatcacc	accaggtca	gcgcactgcc	caggccctgg	3960
aaaaagcgca	gcatgatcag	ggtgtcgagg	ctgggggctg	cggctgcgcc	cagcgagcac	4020
aggatgaaca	gcagcaggcc	ggccagcagc	ggcttgccgc	ggccataagc	gtcgacgatg	4080
gggcccgaaga	tcagctggcc	ggcgcccagc	gccagcagga	agaaggtcag	tgctcagctgt	4140
acgcgggtga	agctagcctg	atagtggctg	gcgatttccg	gcaggctcga	caggtacatg	4200
tcgacggcgg	aagggccgag	ggcgccgatc	aggcctaggc	ccagggcgaa	gctgaagggt	4260
atgggagggg	agggattggc	ttgcatggtt	ttctctggct	gatttttctc	ctaccgaccg	4320
gtaggtttgc	gaatattatt	cgccagtgct	gccaaggtca	aaccttccg	caaggccact	4380
gattcctgtg	gggagcgggc	atgcccgcga	acaccggcaa	agccgggtgc	accgagtcgc	4440
cttctctcgg	ggcatgcccg	ctcccacatt	gaccgcagag	gttggttacc	gtggttcgct	4500
cagaacggca	cagccacggg	cagctggcta	tacacattgg	taccattccc	gcccacctgg	4560
ttgcccggct	tgctctcgtc	cttgcgcggc	tggtaaaggc	ccaccagcgg	gctgattatc	4620
agggtgctct	tgactgccc	ttccacatac	aggccagct	cccgcgcac	gaggttgagg	4680
ctttcgcggg	tgcgtacggg	gtcgaagtcg	aagtagcagc	ccccgactgt	gagattttcc	4740
agcgggtgct	ccttcacgcc	cacatgggtg	ataccctgtg	tgctggtgaa	ggggccggcg	4800
tagttggcag	cgacttcacc	ctggaaccag	gtgccgtaac	cgctggacag	gccgctgaac	4860
agcgcgtccc	agcctgccga	gtagcgggtg	tagcggtagg	taacctgcgg	tgcccacggc	4920
aggctcggcga	agggtgtagc	ggcctgcagg	taccaggctt	gctcggggcc	gtcgggtctt	4980

ES 2 380 530 A1

tcctgccagg	cgtattcgaa	ggcgaaactg	gcattgtoga	tgccagcgtt	gccttcgccg	5040
cgcacgctat	acacgtccat	gccttcgcgg	gctttctgaa	agtcgctggc	ccattggtcg	5100
gtgacgtcga	tgccgtgaat	ccaggtcagc	ccgaggggtg	ccaaggcttg	ggtgtagtcc	5160
agcgtgccgg	cggccagttc	ggtttcggcc	tgggcgcggt	tgtcggattt	cagccacagc	5220
aggctgccat	gcaggccatc	gctgcccccc	aggcgcagca	ttgcggtgcg	gtcgaaggcg	5280
tggcggggcg	ccaggtagta	ggccccgcgg	cggctccagc	caccgtcggc	gacgccgttg	5340
cccaggttcg	ggccgtcgtc	gttgatcaaa	aaaccactgc	ccaggcgaat	ggtctggcgg	5400
ccggcggaaa	cgtccactcc	atccttgccc	agcaccggga	acaggctcgg	cgagcggccg	5460
ccgaggaagg	cgtcttcgat	cttgggtggtg	cgcttcggagc	catcgggtgt	gccggccgca	5520
tcgccatcgc	cccagggtgg	cgagctcacc	cagttcaggc	tgccgtacag	cgtgccgttg	5580
ccggccaggc	cctggtcacc	gctgaggcca	tacttgataa	agccttcacg	ccaggtcgaa	5640
ccccctgtgg	tgccgtcgta	gttcttgccg	ctggtgaaca	tgccccatac	cgccagcatg	5700
tcggcgttca	ggtggctgtc	atcgtcggcg	tacagctcaa	cggccggcgc	ggcctggctg	5760
gccagcaagg	ttgccagggc	caggctggac	agcgtctgtg	gtttgaccat	ttgcacatcc	5820
ctcgtttggt	ctcggccacc	ttcacagggg	cctttgttgt	tcgggggcac	cctcgtttct	5880
ggcagggggc	catcgcgggt	ggcggcgatg	gcctattagg	gcgtgtgcgg	tggggcgggg	5940
tcttgttcgt	ggctgccaa	gcgcttgcac	gccttggcca	caggcgcggg	cagtagcggg	6000
tcacaccga	cttgagctcg	gtgaagtcat	cgatgaaggc	cgagccgaac	tcgcgcccaa	6060
tgccggaagc	cttgatgccc	ccaaacggta	cagccgggtc	gagcaggggtg	tgcatggtga	6120
cccacagggt	accggcctgg	atlttgccgg	tcatgcgcac	ggccttgccc	aggtcggttg	6180
tccacaggct	ggcgtgagg	ccgtagggcg	aggcgttcat	cagggtgcagc	agttcgtctt	6240
cgtcgtcata	aggcaggaag	gtcgccacag	ggccgaagg	ttcctgggtg	agcaggggtg	6300
cgcaggctga	ccgggcgagg	attaccgtgg	gttcgacgaa	acagccgggg	ccgtcgccca	6360
gggtgccgcc	gtgaatgatc	tggctgcctt	cggcgcgggc	gatggcgaac	agttcggcca	6420
gcttctgctg	gtgcggcttg	ttggccacgg	ggccgaactg	ggtggcctcg	tcagtgccg	6480
agccgatttt	cagttggccc	aggcgtggg	acagggcgtc	cagcagcggg	tcgatgcgcg	6540
agcgggtgac	atagaagcgc	tcgcccgcgg	cgcagatttg	ccccgagtgc	aggaagccgg	6600
cctcgatgat	gccgtccaca	gccttgctcg	ttgccacgtc	gggcaggaag	gccaccgcgt	6660
tcttgccgcc	cagttccagt	gtcgcacggg	tcagcttggc	gccccatggc	gcctggccta	6720
cggcgatgcc	agtgggcacg	gagccgggtg	acgagacctt	gtcggtaacct	gcgtgctcga	6780
tcagtgcctt	gcccaccagg	ccaccaccgg	tcagcacggt	cagtgaccag	gccggcaggc	6840
ctgcttcggg	ggccagttcg	gcaatgcgca	gcagcgtcag	cgggggtgaat	tcgctgggct	6900
tgaggataat	gctgcagccg	gttgtcaggg	ccgagggcag	cttccagatg	gcgatcatgc	6960
tggcgaagtt	ccaccgcacg	atgcccacca	ccagcccaat	cggctcgcgc	agggtgaagg	7020
cgctgtagcg	ctcaccggcg	aacgagggca	gcgacggggg	gatggctctg	ccgggtgatct	7080
tggctgcccc	gccggcgtag	tagcgcagga	agtgcgcggc	ctgctgtact	tcgaacgcac	7140
gggaaatgcc	gatgagcttg	ccggattgca	aggtttccag	ctgcgccagt	tcttcgcggg	7200
tggcttccag	caggctcggcc	agcttgaaca	gcactgcggc	gcgggcggcg	gggctggtgt	7260
gcgaccaggc	ggtaaagcct	tggcgcgagg	agctgacggc	atggtcgaca	tcggcctggt	7320
tggcgtcggc	gatgtggggc	atggtctggc	cgttggccgg	gttgaccacg	gcaatggtcg	7380
acgacgactg	gctggcgagg	tgctggccgt	ggatgaacac	gccatgctcg	cgggccagga	7440
aggccgtgac	ggcaggtagg	agggtgatgt	cgctcatgca	gactccgggg	cagttggcca	7500
aagtttgacg	cttaataagc	ggggcagtg	ggtgcttgtg	cctgcgtgac	agggtcatga	7560
ctgtggctgc	caaccgcact	gggtaagcct	tgtgggagcg	gccttggtgc	gcgatagggc	7620
cgcagagcgg	ccccggcgat	gttggcggcg	aaagctgaaa	tgctggggcc	gcttcgcgcc	7680
cctatcgcga	cgcaaggccg	ctcccacaaa	aaaagcgagc	gtaggccggg	ctgattgctg	7740
gcaggcagca	acaagcccgg	cggcagccat	cggcaagacg	ccatgccacc	ggcagcgcac	7800
agtaatcact	cgttcaacgc	cacaaaaaca	agccggggca	tacgatgtca	ctcaataaca	7860
agctcaccga	gcacctcaac	cgcggcactg	tcggtttccc	caccgcactg	gccagcactg	7920
tcgggctgat	catggccagc	ccgggtgatcc	tcaccgcgac	catgggcttt	ggcatcggcg	7980
gcagcgcctt	cgccgtggcc	atggtcatcg	ccgcactgat	gatgctggcg	cagttccacca	8040
cccttgccga	ggctgcgtcg	atcctgccc	ccacgggctc	ggatacagac	tacatgaaact	8100
gtggcatggg	ccgtttcttc	gccattaccg	gcaocgtgtc	ggcctacctg	atcgtgcatg	8160
tgttcgccgg	taccgccgaa	accatcctgt	cgggggtgat	ggcgctggtg	aacttcgagc	8220
acctcaatac	cctggcggaa	tccgcggcg	gttcgtggct	gctgggggtg	tgcttcgtgg	8280
tggcgtttgc	ggtgctcaat	gcctttggcg	tcagcgcctt	cagccgcgcg	gaagtgttcc	8340
tcaccttcgg	catgtggacc	accttgatgg	tgttcggcgt	gcttggcctg	atcgcgcgac	8400
ccgcagtggg	actggacggc	ccgttcggcg	tgctcgtggt	gggcaccgac	ctgatgacca	8460
tcctctcgct	ggtcggcatg	gccatgttca	tgttcgttgg	ctgcgagttc	gtcacgcgcg	8520
ttgccccgca	actgcgtcgc	tcggcctggg	tgctgcgcgc	ggccatggcg	ctgggcctgt	8580

ES 2 380 530 A1

ttggcgtggc	cagctgcatg	ttcatctacg	gagcggcgat	gaagcgccag	gtggaaaaacg	8640
tggtgctgga	tgccgccagt	ggcgtgcacc	tgctggacac	gccccatggcc	atccccgcgct	8700
tcgccgagca	ggtgatgggt	gatattggcc	cagtgtggct	gggtatcggc	ttcctgttcg	8760
ccggcgggc	caccatcaac	acgctgatgg	ccggtgtgcc	acgcattctt	tacggcatgg	8820
cggtggacgg	cgcgttgccc	aagggtttca	cctacctgca	cccgcgcttc	aagacgccgc	8880
tgctgtgcat	cctggtgggtg	gcggtgatcc	cttgccctgca	tgccctggtag	ctgggcggca	8940
acccggacaa	catcctgcac	ctggtgctgg	ccgccgtgtg	cgccctggagc	accgcctacc	9000
tgctggtgac	cctgtcgggtg	gtgatattgc	gcateccgccg	cccagacctg	ccgcgtgcct	9060
accgctcgcc	gctgttcccg	ttgccgcaga	tattctccag	tagcgggtatc	ctcatcggca	9120
tggcgttcat	cacaccgccg	ggcatgaacc	ctgccgatgt	ctacgtgccg	ttcgccatca	9180
tgcttgggc	cactgcggcc	tatgcattgt	tctggacgct	gtgggtgcag	aagggtcaacc	9240
cgttcaagcc	ggcgcgggtc	gaggatgtgc	tcgagaaaga	gtttgcctgcc	gagcctggcc	9300
acgccgtgga	gcacgtgctg	catgatcaga	aatttgcgctg	aacgcttgct	ggcgccccga	9360
gcgccttcag	gctatcgccc	aggcgccaacg	ctggcatgcc	tggcgcgcaa	cctggggcag	9420
cagaacctgg	tggcggccgg	ggtgatccac	gaccgggccc	agggttgga	ggccacgggtg	9480
cacgaacgcg	tcgaggccca	cctgctgatg	cacatcgtca	cctgtgagtt	ccagctgcag	9540
ttgcctgctc	tgcaaggggg	cgaggtcagc	ctggagctgc	gccataccgg	tgcgcttcgc	9600
cgtgccggcc	tggcctgtgt	gtaccgcaag	ggcgaccggg	cgcgcttcgc	ccgactgcgc	9660
gaccggttgc	tgcagcaggc	cgcactggtg	gcggcgctga	tgccgctgga	tttcaagcgc	9720
ctgaccttgg	cctggcgcgga	cgccaatgg	ttgctgacct	tggagcacat	gggcggtagc	9780
gaagtggca	accgcatgcc	agcgtttcgc	cgctacatcc	ccatcagccc	gcaacagcgg	9840
gcgcacctga	tggccagcct	ggcccagttc	aacactttgc	tacctaacct	ttgacgcaaa	9900
ctggcatacg	ccttgctgta	tcaagogaag	aatgatgaca	gttgtgcgca	catagataac	9960
atgtaacaa	tgtgcgcata	acaacaaatc	ctgcgtcgag	ggcagccatg	catactcaac	10020
aatccaaccg	tcaggggctg	gaacgctgga	ccacggccat	gcaacagatc	tgtggccggt	10080
tcgagacgga	acttgcgtcc	aatcactcgc	tgttcatcgg	cgaggtttct	accttttccc	10140
gtgccggcct	gcccgtggcc	aacctgcgca	ccaatgccgg	caacatccgc	cggtcggggc	10200
aaaaccggac	ccttgacgat	gaccagcatt	gtttcctggt	cagccagcgt	gcggggcatt	10260
ccaccgtgtc	ccaggggggc	atgcaggtea	gcctggcgcc	gggtgagctg	ctgctgatgg	10320
attcggctcg	gcgctgcgaa	atcaccccca	gtgggttgat	cgaacatgtc	tcgctggccc	10380
tgtcgcgtga	gcaggtacgc	aagtatgtgc	aaggcagcgg	cccgatgttt	ggcaagatct	10440
cctcgagcaa	cgccctgcggg	cgcatgctgc	atgtgctgat	ggaccaactg	tgcaaggacg	10500
gcaatgtaag	cggtgatggg	gcccagggcg	acgcgtgca	gaccgccttc	attgcctcgc	10560
tggagccagg	cttcgagcgc	catggcgaag	cgctgggcaa	ccttggggcg	ttgaaacggg	10620
ccaacctgcg	gggctacgtg	cagcaggtga	tcgacgagtc	cctgtcacag	cccgggctga	10680
ccccgtccaa	cctggcgggt	cgccctgaaca	tctcgggtgcg	tcacctgtac	cggtcgttcg	10740
aggaggagg	cgatagtgtg	tgcgcctaca	ttcagcgggc	gcgcctgaag	cgcagtgcgg	10800
atgacctggc	caaccggttc	ttcaggagcg	agtcgattac	ctcgattgcc	tacaagtggg	10860
ggtttaccga	ctcggcgcat	ttcagccgct	cgttcaagaa	acagttcgaa	cgctcggcca	10920
aggactaccg	ggcgcaggcg	atggtttgag	tgtgatgggtg	ctgcttgtgc	gggcctcatc	10980
gccggcaagt	cacttggcgg	cggttcagcg	acggccggtg	aagtagcccg	acagctgggtg	11040
cacggtcttg	ccggcagtgga	gcagcagcgg	gcggaaatgg	tccttgccga	ggatgcgcgc	11100
atgcttgacc	gagctgacca	ggtcatagcg	cttcgatccc	tcctgcatac	cctcggcgag	11160
tatcttgcaa	atgatgtggc	tgggcgtgac	gccaaagccg	gagtagccct	gcacatagaa	11220
agcgttgggg	cggttgtcga	gggtgcctat	ctgcggaaac	aggttggcac	tggtggccat	11280
cgggccggcc	caggccagggt	cgatgcgcac	gtctttcagg	taggggaaaa	tcttcagcat	11340
cagcgcggcg	ttccacgcct	tcaggctccag	cgggaaagtgc	tcgacgaagg	gcgtggcggc	11400
gccaacacagc	aggcggttct	cgcggtgac	ccggtagtag	tcgatcaccg	ggcggatgtc	11460
gctgtaggcc	ccgcgtatcg	ggctgatgog	ctcgatcagc	tcacccggca	atggctcgggt	11520
catcatctgg	aaggcatagg	tgtttatagt	gcgtgcgtgc	agctgcggct	ccagcttgtt	11580
gaggaagctg	tcgcacgccc	acagcagctt	gctggcgctg	accgagccac	ggccggtgcg	11640
taccgtgatg	cgctcgcgct	aggtaacttc	cagggcgggg	ctgtgttcga	agatgcgcgc	11700
accatggccc	accagtgcct	gcgcttcgcc	cagcagcagg	ttcaggggaat	gcacatggcc	11760
accgcccattg	tgcatcaggg	cgctgctgta	ggcggtgctg	ccgatgatct	ggcgcacttc	11820
gctgccaccg	agaaaaacgga	tctcgtcgcg	ggtattgatc	gccttgaacg	ccttctccca	11880
tttgccgagg	gtctgttccct	ggcgggcggtt	gaagcccatg	tagccatagc	cggtggcagaa	11940
gtcggcgctcg	atggcgtagc	gggcgatgog	gtccttgatg	atgccggcgc	ccagttcgcct	12000
gatttcgaaa	atatecctca	cgccctgatc	accgacgctg	ctgcggatct	tctccaggtc	12060
gtggccgatg	cccgccatga	tctgcccgcg	ggtgcggccg	ctaccgccgt	agcccagata	12120
acggccctcg	agcacgacga	tattggtcac	gccttgttcc	gccagctcca	gggcgggtgtt	12180

ES 2 380 530 A1

```

aatgccggag aaaccgccac cgatcaccac gacatcggcc tcgatgtcgc gttccagggt 12240
tgggaagctc aggttgact tcttggtcgc cgagtagtag gtggggctct cgagggtgat 12300
catgacgccg cctgctgact ggaaatgggt agaaatcat 12339

```

```

<210> 3
<211> 1296
<212> DNA
<213> Pseudomonas putida U

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1296)
<223> Secuencia codificante de TynA

```

```

<400> 3
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

gcc act acc gtg gtg atc atc ggt ggc ggc att atc ggc ctc acc gcc 96
Ala Thr Thr Val Val Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu Thr Ala
20 25 30

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

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

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

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

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

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
115 120 125

cgc ctg ctg agc acg cgg gaa atc acc cgg atg gtg ccg ggt ggt cgg 432
Arg Leu Leu Ser Thr Arg Glu Ile Thr Arg Met Val Pro Gly Gly Arg
130 135 140

gcg gat tgg gca ggt ggc atc ttc acc ccc tcc gac gcc cgc gcc gaa 480
Ala Asp Trp Ala Gly Gly Ile Phe Thr Pro Ser Asp Ala Arg Ala Glu
145 150 155 160

ccg acc ctg gcc gcc agc gcc atc gcc cgg gcg gcg atc gcc aaa ggt 528
Pro Thr Leu Ala Ala Ser Ala Ile Ala Arg Ala Ala Ile Ala Lys Gly
165 170 175

```

ES 2 380 530 A1

gca gta gta gta gag aac tgc gcg gtg cgc acg ctg gtc acc gca gcc	576
Ala Val Val Val Glu Asn Cys Ala Val Arg Thr Leu Val Thr Ala Ala	
180	185
190	
ggc cgt gtc agc ggg gtg gtc acc gag caa ggt gaa atc cgc tgc gac	624
Gly Arg Val Ser Gly Val Val Thr Glu Gln Gly Glu Ile Arg Cys Asp	
195	200
205	
cag gtg ttg ctg gcc ggt ggc ctg tgg tgc cgc aag ttc ctc ggc aac	672
Gln Val Leu Leu Ala Gly Gly Leu Trp Ser Arg Lys Phe Leu Gly Asn	
210	215
220	
ctg ggc atc aac ctg ccg acc ttg ccg ctg acc tgt tcc gtg ctg cgc	720
Leu Gly Ile Asn Leu Pro Thr Leu Pro Leu Thr Cys Ser Val Leu Arg	
225	230
235	240
aca gag ccc atg gac ggg cca acc gac atc gcc gtg ggc gca cca gat	768
Thr Glu Pro Met Asp Gly Pro Thr Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro Asp	
245	250
255	
ttt tcc ttc cgc aag cac aag gac ggc ggc tac atc atc acc cag cgc	816
Phe Ser Phe Arg Lys His Lys Asp Gly Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Arg	
260	265
270	
ggc gcg ctg gac gcc ttc ctc acc ctc gat cac ctg ctg ctg ggc aag	864
Gly Ala Leu Asp Ala Phe Leu Thr Leu Asp His Leu Leu Leu Gly Lys	
275	280
285	
cgt tac ctg ccc cag ctg cgt gcc cag cgg gac ttt ttg cgc atc agc	912
Arg Tyr Leu Pro Gln Leu Arg Ala Gln Arg Asp Phe Leu Arg Ile Ser	
290	295
300	
ttt ggc aag tac ttc ttc aag gac ctg gcc ctg gcc cgg cgc tgg aag	960
Phe Gly Lys Tyr Phe Phe Lys Asp Leu Ala Leu Ala Arg Arg Trp Lys	
305	310
315	320
gca acg gat gta acc ccc ttc gag cgt gta cgg gta caa gac ccg cac	1008
Ala Thr Asp Val Thr Pro Phe Glu Arg Val Arg Val Gln Asp Pro His	
325	330
335	
gcc aac ccg gcc ctc aac gac gag gcc atg cgc aac ctg aaa gcg gcc	1056
Ala Asn Pro Ala Leu Asn Asp Glu Ala Met Arg Asn Leu Lys Ala Ala	
340	345
350	
tgg ccg gtg ttc gaa cag gcc cgt atc gcc agc gcc tgg gcc ggc acg	1104
Trp Pro Val Phe Glu Gln Ala Arg Ile Ala Ser Ala Trp Ala Gly Thr	
355	360
365	
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	
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
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	

ES 2 380 530 A1

```

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 379
<212> PRT
<213> Pseudomonas putida U

<400> 6

Met Thr Leu Asp Thr Arg Ile Asp Phe Ile Tyr Leu Ser Glu Gln Asp
1                      5                      10                      15

Met Ile Arg Ala Gly Val Thr Asp Met Pro Ala Cys Val Asp Thr Met
20                      25                      30

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

Pro Phe Pro Asn Met Pro Lys Pro Thr Ala Asp Arg Arg Met Met Ala
65                      70                      75                      80

Met Pro Ala Tyr Leu Gly Gly Asn Phe Gln Thr Ala Gly Ala Lys Trp
85                      90                      95

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

Leu Met Phe Thr Leu Asn Asp Ala Asp Thr Gly Ala Pro Leu Ala His
115                      120                      125

Met Ser Ala Asn Leu Leu Ser Ala Tyr Arg Thr Gly Ala Ile Pro Gly
130                      135                      140

Val Gly Ala Arg His Leu Ala Arg Lys Asp Ala Lys Val Ile Gly Leu
145                      150                      155                      160

Ala Gly Pro Gly Val Met Gly Lys Thr Thr Val Ala Ala Phe Met Ala

```

ES 2 380 530 A1

```

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

```

```

<210> 7
<211> 1488
<212> DNA
<213> Pseudomonas putida U

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1488)
<223> TynC

```

```

<400> 7
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
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

```


ES 2 380 530 A1

aac gcg gtg gcc ttc ctg ccc gac gtg gca acc gac aag gct gtg gac	864
Asn Ala Val Ala Phe Leu Pro Asp Val Ala Thr Asp Lys Ala Val Asp	
275	280
285	
ggc atc atc gag gcc ggc ttc ctg cac tcg ggg caa atc tgc gcc gcg	912
Gly Ile Ile Glu Ala Gly Phe Leu His Ser Gly Gln Ile Cys Ala Ala	
290	295
300	
ggc gag cgc ttc tat gtg cac cgc tcg cgc atc gac ccg ctg ctg gac	960
Gly Glu Arg Phe Tyr Val His Arg Ser Arg Ile Asp Pro Leu Leu Asp	
305	310
315	320
gcc ctg tcc cag cgc ctg ggc caa ctg aaa atc ggc tcg cca ctg gac	1008
Ala Leu Ser Gln Arg Leu Gly Gln Leu Lys Ile Gly Ser Pro Leu Asp	
325	330
335	
gag gcc acc cag ttc ggc ccc gtg gcc aac aag ccg cac cag cag aag	1056
Glu Ala Thr Gln Phe Gly Pro Val Ala Asn Lys Pro His Gln Gln Lys	
340	345
350	
ctg gcc gaa ctg ttc gcc atc gcc cgc gcc gaa ggc agc cag atc att	1104
Leu Ala Glu Leu Phe Ala Ile Ala Arg Ala Glu Gly Ser Gln Ile Ile	
355	360
365	
cac ggc ggc acc ctg ggc gac ggc ccc ggc tgt ttc gtc gaa ccc acg	1152
His Gly Gly Thr Leu Gly Asp Gly Pro Gly Cys Phe Val Glu Pro Thr	
370	375
380	
gta atc ctc gcc cgg tca gcc tgc gac acc ctg ctc acc cag gaa acc	1200
Val Ile Leu Ala Arg Ser Ala Cys Asp Thr Leu Leu Thr Gln Glu Thr	
385	390
395	400
ttc ggc cct gtg gcg acc ttc ctg cct tat gac gac gaa gac gaa ctg	1248
Phe Gly Pro Val Ala Thr Phe Leu Pro Tyr Asp Asp Glu Asp Glu Leu	
405	410
415	
ctg cac ctg atg aac gcc tcg ccc tac ggc ctc agc gcc agc ctg tgg	1296
Leu His Leu Met Asn Ala Ser Pro Tyr Gly Leu Ser Ala Ser Leu Trp	
420	425
430	
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	
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	
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
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

ES 2 380 530 A1

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida U

<400> 8

```

Met Ser Asp Ile Thr Leu Leu Pro Ala Val Thr Ala Phe Leu Ala Arg
1          5          10          15
Glu His Gly Val Phe Ile His Gly Gln His Leu Ala Ser Gln Ser Ser
20          25          30
Ser Asn Ile Ala Val Val Asn Pro Ala Asn Gly Gln Thr Ile Ala His
35          40          45
Ile Ala Asp Ala Asn Gln Ala Asp Val Asp His Ala Val Ser Ser Ser
50          55          60
Arg Gln Gly Phe Thr Ala Trp Ser His Thr Ser Pro Ala Ala Arg Ala
65          70          75          80
Ala Val Leu Phe Lys Leu Ala Asp Leu Leu Glu Ala Asn Arg Glu Glu
85          90          95
Leu Ala Gln Leu Glu Thr Leu Gln Ser Gly Lys Leu Ile Gly Ile Ser
100         105         110
Arg Ala Phe Glu Val Gln Gln Ala Ala His Phe Leu Arg Tyr Tyr Ala
115         120         125
Gly Trp Ala Thr Lys Ile Thr Gly Gln Thr Ile Thr Pro Ser Leu Pro
130         135         140
Ser Phe Ala Gly Glu Arg Tyr Ser Ala Phe Thr Leu Arg Glu Pro Ile
145         150         155         160
Gly Val Val Val Gly Ile Val Pro Trp Asn Phe Ala Ser Met Ile Ala
165         170         175
Ile Trp Lys Leu Ala Ser Ala Leu Thr Thr Gly Cys Ser Ile Ile Leu
180         185         190
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
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
245         250         255
Ala Met Gly Ala Lys Leu Thr Arg Ala Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys
260         265         270
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

```

ES 2 380 530 A1

```

      290          295          300
Gly Glu Arg Phe Tyr Val His Arg Ser Arg Ile Asp Pro Leu Leu Asp
305          310          315          320

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
          340          345          350

Leu Ala Glu Leu Phe Ala Ile Ala Arg Ala Glu Gly Ser Gln Ile Ile
          355          360          365

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
385          390          395          400

Phe Gly Pro Val Ala Thr Phe Leu Pro Tyr Asp Asp Glu Asp Glu Leu
          405          410          415

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
          435          440          445

Gly Thr Leu Trp Val Asn Met His Thr Leu Leu Asp Pro Ala Val Pro
          450          455          460

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
          485          490          495

```

```

<210> 9
<211> 942
<212> DNA
<213> Pseudomonas putida U

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(942)
<223> TynR

```

```

<400> 9
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

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

cac tcg ctg ttc atc ggc gag gtt tct acc ttt tcc cgt gcc ggc ttg      144

```

ES 2 380 530 A1

His	Ser	Leu	Phe	Ile	Gly	Glu	Val	Ser	Thr	Phe	Ser	Arg	Ala	Gly	Leu	
		35					40					45				
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					
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	
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		
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			
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				
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					
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	
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		
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			
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				
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					
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	
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		
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			
agg	agc	gag	tcg	att	acc	tcg	att	gcc	tac	aag	tgg	ggg	ttt	acc	gac	864

ES 2 380 530 A1

```

Arg Ser Glu Ser Ile Thr Ser Ile Ala Tyr Lys Trp Gly Phe Thr Asp
      275                               280                               285

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

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

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

Pro Leu Ala Asn Leu Arg Thr Asn Ala Gly Asn Ile Arg Arg Leu Gly
      50                               55                               60

Glu Asn Pro Thr Leu Asp Asp Asp Gln His Cys Phe Leu Val Ser Gln
      65                               70                               75                               80

Arg Ala Gly His Ser Thr Val Ser Gln Gly Gly Met Gln Val Ser Leu
      85                               90                               95

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

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
      145                              150                              155                              160

Leu Cys Lys Asp Gly Asn Val Ser Gly Asp Gly Ala Gln Gly Asp Ala
      165                              170                              175

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

Gly Tyr Val Gln Gln Val Ile Asp Glu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Leu
      210                              215                              220

```

ES 2 380 530 A1

Thr Pro Ser Asn Leu Ala Gly Arg Leu Asn Ile Ser Val Arg His Leu
 225 230 235 240
 Tyr Arg Leu Phe Glu Glu Glu Gly Asp Ser Val Cys Arg Tyr Ile Gln
 245 250 255
 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
 275 280 285
 Ser Ala His Phe Ser Arg Ser Phe Lys Lys Gln Phe Glu Arg Ser Pro
 290 295 300
 Lys Asp Tyr Arg Ala Gln Ala Met Val
 305 310

<210> 11
 <211> 1335
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1335)
 <223> TynD

<400> 11
 atg att tct acc cat ttc cag tca gca ggc ggc gtc atg atc acc ctc 48
 Met Ile Ser Thr His Phe Gln Ser Ala Gly Gly Val Met Ile Thr Leu
 1 5 10 15
 gag agc ccc acc tac tac tcg gcg acc aag aag tac aac ctg agc ttc 96
 Glu Ser Pro Thr Tyr Tyr Ser Ala Thr Lys Lys Tyr Asn Leu Ser Phe
 20 25 30
 cca acc ctg gaa cgc gac atc gag gcc gat gtc gtg gtg atc ggt ggc 144
 Pro Thr Leu Glu Arg Asp Ile Glu Ala Asp Val Val Val Ile Gly Gly
 35 40 45
 ggt ttc tcc ggc att aac acc gcc ctg gag ctg gcg gaa caa ggc gtg 192
 Gly Phe Ser Gly Ile Asn Thr Ala Leu Glu Leu Ala Glu Gln Gly Val
 50 55 60
 acc aat atc gtc gtg ctc gag ggc cgt tat ctg ggc tac ggc ggt agc 240
 Thr Asn Ile Val Val Leu Glu Gly Arg Tyr Leu Gly Tyr Gly Gly Ser
 65 70 75 80
 ggg cgc aac ggc ggg cag atc atg gcg ggc atc ggc cac gac ctg gag 288
 Gly Arg Asn Gly Gly Gln Ile Met Ala Gly Ile Gly His Asp Leu Glu
 85 90 95
 aag atc cgc agc agc gtc ggt gat cag ggc gtg agg gat att ttc gaa 336
 Lys Ile Arg Ser Ser Val Gly Asp Gln Gly Val Arg Asp Ile Phe Glu
 100 105 110
 atc agc gaa ctg ggc gcc ggc atc atc aag gac cgc atc gcc cgc tac 384

ES 2 380 530 A1

Ile	Ser	Glu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ile	Ile	Lys	Asp	Arg	Ile	Ala	Arg	Tyr	
		115					120					125				
gcc	atc	gac	gcc	gac	ttc	tgc	cac	ggc	tat	ggc	tac	atg	ggc	ttc	aac	432
Ala	Ile	Asp	Ala	Asp	Phe	Cys	His	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Met	Gly	Phe	Asn	
	130					135					140					
cgc	cgc	cag	gaa	cag	acc	ctg	cgc	aaa	tgg	gag	aag	gcg	ttc	aag	gcg	480
Arg	Arg	Gln	Glu	Gln	Thr	Leu	Arg	Lys	Trp	Glu	Lys	Ala	Phe	Lys	Ala	
145					150					155					160	
atc	aat	acc	cgc	gac	gag	atc	cgt	ttt	ctc	ggg	ggc	agc	gaa	gtg	cgc	528
Ile	Asn	Thr	Arg	Asp	Glu	Ile	Arg	Phe	Leu	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Arg	
				165					170					175		
cag	atc	atc	ggc	agc	aac	gcc	tac	agc	agc	gcc	ctg	atg	cac	atg	ggc	576
Gln	Ile	Ile	Gly	Ser	Asn	Ala	Tyr	Ser	Ser	Ala	Leu	Met	His	Met	Gly	
			180					185						190		
ggg	ggc	cat	gtg	cat	tcc	ctg	aac	ctg	ctg	ctg	ggc	gaa	gcg	cag	gca	624
Gly	Gly	His	Val	His	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Ala	
		195					200					205				
ctg	gtg	ggc	cat	ggg	gcg	cgc	atc	ttc	gaa	cac	agc	ccg	gcc	ctg	gaa	672
Leu	Val	Gly	His	Gly	Ala	Arg	Ile	Phe	Glu	His	Ser	Pro	Ala	Leu	Glu	
	210					215					220					
gtg	acc	tac	ggc	gag	cgc	atc	acg	gta	cgc	acc	ggc	cgt	ggc	tcg	gta	720
Val	Thr	Tyr	Gly	Glu	Arg	Ile	Thr	Val	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Ser	Val	
225					230					235					240	
cgc	gcc	agc	aag	ctg	ctg	tgg	gcg	tgc	gac	agc	ttc	ctc	aac	aag	ctg	768
Arg	Ala	Ser	Lys	Leu	Leu	Trp	Ala	Cys	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn	Lys	Leu	
				245					250					255		
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			
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				
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					
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		
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		
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			
ccg	atg	gcc	acc	agt	gcc	aac	ctg	ttt	ccg	cag	ata	ggc	acc	ctc	gac	1104

ES 2 380 530 A1

Pro	Met	Ala	Thr	Ser	Ala	Asn	Leu	Phe	Pro	Gln	Ile	Gly	Thr	Leu	Asp	
		355					360					365				
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					
acg	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	
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			
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			
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
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U

<400> 12

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

ES 2 380 530 A1

115	120	125
Ala Ile Asp Ala Asp Phe Cys His Gly Tyr Gly Tyr Met Gly Phe Asn 130 135 140		
Arg Arg Gln Glu Gln Thr Leu Arg Lys Trp Glu Lys Ala Phe Lys Ala 145 150 155 160		
Ile Asn Thr Arg Asp Glu Ile Arg Phe Leu Gly Gly Ser Glu Val Arg 165 170 175		
Gln Ile Ile Gly Ser Asn Ala Tyr Ser Ser Ala Leu Met His Met Gly 180 185 190		
Gly Gly His Val His Ser Leu Asn Leu Leu Leu Gly Glu Ala Gln Ala 195 200 205		
Leu Val Gly His Gly Ala Arg Ile Phe Glu His Ser Pro Ala Leu Glu 210 215 220		
Val Thr Tyr Gly Glu Arg Ile Thr Val Arg Thr Gly Arg Gly Ser Val 225 230 235 240		
Arg Ala Ser Lys Leu Leu Trp Ala Cys Asp Ser Phe Leu Asn Lys Leu 245 250 255		
Glu Pro Gln Leu His Ala Arg Thr Ile Asn Thr Tyr Ala Phe Gln Met 260 265 270		
Met Thr Glu Pro Leu Pro Asp Glu Leu Ile Glu Arg Ile Ser Pro Ile 275 280 285		
Arg Gly Ala Tyr Ser Asp Ile Arg Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Arg Val 290 295 300		
Thr Arg Glu Asn Arg Leu Leu Phe Gly Ala Ala Thr Pro Phe Val Glu 305 310 315 320		
His Phe Pro Leu Asp Leu Lys Ala Trp Asn Arg Ala Leu Met Leu Lys 325 330 335		
Ile Phe Pro Tyr Leu Lys Asp Val Arg Ile Asp Leu Ala Trp Gly Gly 340 345 350		
Pro Met Ala Thr Ser Ala Asn Leu Phe Pro Gln Ile Gly Thr Leu Asp		

ES 2 380 530 A1

355	360	365	
Asn Arg Pro Asn Ala Phe Tyr Val Gln Gly Tyr Ser Gly Phe Gly Val			
370	375	380	
Thr Pro Ser His Ile Ile Cys Lys Ile Leu Ala Glu Gly Met Gln Glu			
385	390	395	400
Gly Ser Lys Arg Tyr Asp Leu Val Ser Ser Val Lys His Ala Arg Ile			
	405	410	415
Leu Gly Lys Asp His Phe Arg Pro Leu Leu Leu Thr Ala Gly Lys Thr			
	420	425	430
Val His Gln Leu Ser Gly Tyr Phe Asn Gly Arg Arg			
	435	440	
<210>	13		
<211>	1218		
<212>	DNA		
<213>	Pseudomonas putida U		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1)..(1218)		
<223>	TynF		
<400>	13		
atg caa gcc aat ccc tcc cct ccc ata ccc ttc agc ttc gcc ctg ggc			48
Met Gln Ala Asn Pro Ser Pro Pro Ile Pro Phe Ser Phe Ala Leu Gly			
1	5	10	15
cta ggc ctg atc ggc gcc ctc ggc cct tcc gcc gtc gac atg tac ctg			96
Leu Gly Leu Ile Gly Ala Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Met Tyr Leu			
	20	25	30
tcg agc ctg ccg gaa atc gcc agc cac tat cag gct agc ttc acc cgc			144
Ser Ser Leu Pro Glu Ile Ala Ser His Tyr Gln Ala Ser Phe Thr Arg			
	35	40	45
gta cag ctg aca ctg acc ttc ttc ctg ctg gcc atg ggc gcc ggc cag			192
Val Gln Leu Thr Leu Thr Phe Phe Leu Leu Ala Met Gly Ala Gly Gln			
	50	55	60
ctg atc ttc ggc ccc atc gtc gac gct tat ggc cgg cgc aag ccg ctg			240
Leu Ile Phe Gly Pro Ile Val Asp Ala Tyr Gly Arg Arg Lys Pro Leu			
65	70	75	80
ctg gcc ggc ctg ctg ctg ttc atc ctg tgc tcg ctg ggc gca gcc gca			288
Leu Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Leu Cys Ser Leu Gly Ala Ala Ala			
	85	90	95
gcc ccc agc ctc gac acc ctg atc atg ctg cgc ttt ttc cag ggc ctg			336

ES 2 380 530 A1

Ala	Pro	Ser	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Met	Leu	Arg	Phe	Phe	Gln	Gly	Leu	
			100					105					110			
ggc	agt	gcg	ctg	acc	ctg	gtg	gtg	atc	atg	agc	atg	gtg	cgt	gat	gtg	384
Gly	Ser	Ala	Leu	Thr	Leu	Val	Val	Ile	Met	Ser	Met	Val	Arg	Asp	Val	
		115				120						125				
agc	cag	ggc	gtg	gcc	gcg	acc	aaa	ctg	ttc	gcc	ctg	ctg	atg	acc	atc	432
Ser	Gln	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Lys	Leu	Phe	Ala	Leu	Leu	Met	Thr	Ile	
	130					135				140						
gaa	ggc	gtc	gca	ccg	atc	ctg	gca	cct	gcc	ctg	ggc	ggc	gtg	atc	gac	480
Glu	Gly	Val	Ala	Pro	Ile	Leu	Ala	Pro	Ala	Leu	Gly	Gly	Val	Ile	Asp	
145					150				155						160	
gca	cat	ttc	ggc	tgg	cgt	gca	gta	atg	ctg	gta	ctc	gcc	ggc	atg	ggc	528
Ala	His	Phe	Gly	Trp	Arg	Ala	Val	Met	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Met	Gly	
				165				170						175		
gtg	acg	gtg	ctg	gtc	aac	agc	ctg	ctg	aac	ctg	ccc	gaa	acc	ctg	ccg	576
Val	Thr	Val	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Leu	Asn	Leu	Pro	Glu	Thr	Leu	Pro	
			180				185						190			
ccc	agc	aaa	cgc	gaa	ccc	ctg	cgc	ctg	ggc	cac	gcc	tgc	agc	acc	tac	624
Pro	Ser	Lys	Arg	Glu	Pro	Leu	Arg	Leu	Gly	His	Ala	Cys	Ser	Thr	Tyr	
		195				200					205					
ctg	gcc	atc	ctc	gcc	gac	cgc	cgc	ttc	ctg	cgc	ccg	acc	ctg	gcg	gtt	672
Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Asp	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Pro	Thr	Leu	Ala	Val	
	210				215					220						
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	
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		
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				
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				
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						
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		
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		
caa	gaa	aag	gca	ctg	ggt	tcc	acc	gca	gcg	ctg	ctg	ggc	gcc	atc	cag	1056

ES 2 380 530 A1

Gln	Glu	Lys	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Ile	Gln		
			340					345					350				
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					
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						
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		
tcg	ctc	gcg	ggc	cat	tga												1218
Ser	Leu	Ala	Gly	His													
				405													

<210> 14
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U

<400> 14

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				
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						
Leu	Ile	Phe	Gly	Pro	Ile	Val	Asp	Ala	Tyr	Gly	Arg	Arg	Lys	Pro	Leu		
	65				70					75					80		
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				
Gly	Ser	Ala	Leu	Thr	Leu	Val	Val	Ile	Met	Ser	Met	Val	Arg	Asp	Val		
		115					120						125				
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		
Ala	His	Phe	Gly	Trp	Arg	Ala	Val	Met	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Met	Gly		
				165					170					175			

ES 2 380 530 A1

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
 Leu Ala Ile Leu Ala Asp Arg Arg Phe Leu Arg Pro Thr Leu Ala Val
 210 215 220
 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
 Phe Gly Ala Thr Gly Val Ser Ile Leu Leu Gly Ala Met Thr Ala Ser
 260 265 270
 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
 Gly Leu Gly Leu Pro Gly Val Ala Gly Gly Met Val Ile Ala Leu Phe
 305 310 315 320
 Gly Leu Gly Ile Ala Glu Ser Thr Leu Met Ser Leu Val Met Ala Ser
 325 330 335
 Gln Glu Lys Ala Leu Gly Ser Thr Ala Ala Leu Leu Gly Ala Ile Gln
 340 345 350
 Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ala Ala Val Val Leu Asn
 355 360 365
 His Gly Pro Thr Ala Trp Ala Ala Leu Leu Ala Leu Cys Thr Leu Val
 370 375 380
 Val Cys Leu Leu Thr Ala Leu Ser Leu Arg His Thr Pro Ala Ser Phe
 385 390 395 400
 Ser Leu Ala Gly His
 405

<210> 15
 <211> 1311
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1311)
 <223> TynE

<400> 15
 atg gtc aaa cca cag acg ctg tcc agc ctg gcc ctg gca acc ttg ctg
 Met Val Lys Pro Gln Thr Leu Ser Ser Leu Ala Leu Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15

48

ES 2 380 530 A1

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	
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	
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	
atc aag tat	ggc ctc agc	ggg 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
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	
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	
gac gcc ttc	ctc ggc tgg	cgc tcg gcc	gac ctg ttc	ccg gtg ctg	ggc	384
Asp Ala Phe	Leu Gly Trp	Arg Ser Ala	Asp Leu Phe	Pro Val Leu	Gly	
	115		120		125	
aag gat gga	gtg gac gtt	tcc gcc ggc	cgc cag acc	att cgc ctg	ggc	432
Lys Asp Gly	Val Asp Val	Ser Ala Gly	Arg Gln Thr	Ile Arg Leu	Gly	
	130		135		140	
agt ggt ttt	ttg atc aac	gac gac ggc	ccg aac ctg	ggc aac ggc	gtc	480
Ser Gly Phe	Leu Ile Asn	Asp Asp Gly	Pro Asn Leu	Gly Asn Gly	Val	
	145		150		155	160
gcc gac ggt	gcg ctg gac	cgc ggc ggg	gcc tac tac	ctg gcc gcc	cgc	528
Ala Asp Gly	Ala Leu Asp	Arg Gly Gly	Ala Tyr Tyr	Leu Ala Ala	Arg	
	165		170		175	
cac gcc ttc	gac cgc acc	gca atg ctg	cgc ctg ggg	ggc agc gat	ggc	576
His Ala Phe	Asp Arg Thr	Ala Met Leu	Arg Leu Gly	Gly Ser Asp	Gly	
	180		185		190	
ctg cat ggc	agc ctg ctg	tgg ctg aaa	tcc gac aac	cgc gcc cag	gcc	624
Leu His Gly	Ser Leu Leu	Trp Leu Lys	Ser Asp Asn	Arg Ala Gln	Ala	
	195		200		205	
gaa acc gaa	ctg gcc gcc	ggc acg ctg	gac tac acc	caa gcc ttg	ggc	672
Glu Thr Glu	Leu Ala Ala	Gly Thr Leu	Asp Tyr Thr	Gln Ala Leu	Gly	
	210		215		220	
acc ctc ggg	ctg acc tgg	att cac ggc	atc gac gtc	acc gac caa	tgg	720
Thr Leu Gly	Leu Thr Trp	Ile His Gly	Ile Asp Val	Thr Asp Gln	Trp	
	225		230		235	240
gcc agc gac	ttt cag aaa	gcc cgc gaa	ggc atg gac	gtg tat agc	gtg	768
Ala Ser Asp	Phe Gln Lys	Ala Arg Glu	Gly Met Asp	Val Tyr Ser	Val	
	245		250		255	

ES 2 380 530 A1

cgc ggc gaa ggc aac gct ggc atc gac aat gcc agt ttc gcc ttc gaa	816
Arg Gly Glu Gly Asn Ala Gly Ile Asp Asn Ala Ser Phe Ala Phe Glu	
260	265
270	
tac gcc tgg cag gac aag acc gac ggc ccc gag caa gcc tgg tac ctg	864
Tyr Ala Trp Gln Asp Lys Thr Asp Gly Pro Glu Gln Ala Trp Tyr Leu	
275	280
285	
cag gcc ggc tac acc ttc gcc gac ctg ccg tgg gca ccg cag gtt acc	912
Gln Ala Gly Tyr Thr Phe Ala Asp Leu Pro Trp Ala Pro Gln Val Thr	
290	295
300	
tac cgc tac acc cgc tac tcg gca ggc tgg gac gcg ctg ttc agc ggc	960
Tyr Arg Tyr Thr Arg Tyr Ser Ala Gly Trp Asp Ala Leu Phe Ser Gly	
305	310
315	320
ctg tcc agc ggt tac ggc acc tgg ttc cag ggt gaa gtc gct gcc aac	1008
Leu Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Trp Phe Gln Gly Glu Val Ala Ala Asn	
325	330
335	
tac gcc ggc ccc ttc aac agc aac acg ggt atc cac cat gtg ggc gtg	1056
Tyr Ala Gly Pro Phe Asn Ser Asn Thr Gly Ile His His Val Gly Val	
340	345
350	
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	
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	
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
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	
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	
gct gtg ccg ttc tga	1311
Ala Val Pro Phe	
435	
<210> 16	
<211> 436	
<212> PRT	
<213> Pseudomonas putida U	
<400> 16	
Met Val Lys Pro Gln Thr Leu Ser Ser Leu Ala Leu Ala Thr Leu Leu	
1	5
	10
	15

ES 2 380 530 A1

Ala Ser Gln Ala Ala Pro Ala Val Glu Leu Tyr Ala Asp Asp Asp Ser
 20 25 30
 His Leu Asn Ala Asp Met Leu Ala Val Trp Gly Met Phe Asn Ser Arg
 35 40 45
 Lys Asn Tyr Asp Gly Thr Thr Gly Gly Ser Thr Trp Arg Glu Gly Phe
 50 55 60
 Ile Lys Tyr Gly Leu Ser Gly Asp Gln Gly Leu Ala Gly Asn Gly Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Gly Ser Leu Asn Trp Val Ser Ser Ala Thr Trp Gly Asp Gly
 85 90 95
 Asp Ala Ala Gly Asn Thr Asp Gly Ser Glu Arg Thr Thr Lys Ile Glu
 100 105 110
 Asp Ala Phe Leu Gly Trp Arg Ser Ala Asp Leu Phe Pro Val Leu Gly
 115 120 125
 Lys Asp Gly Val Asp Val Ser Ala Gly Arg Gln Thr Ile Arg Leu Gly
 130 135 140
 Ser Gly Phe Leu Ile Asn Asp Asp Gly Pro Asn Leu Gly Asn Gly Val
 145 150 155 160
 Ala Asp Gly Ala Leu Asp Arg Gly Gly Ala Tyr Tyr Leu Ala Ala Arg
 165 170 175
 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
 Glu Thr Glu Leu Ala Ala Gly Thr Leu Asp Tyr Thr Gln Ala Leu Gly
 210 215 220
 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
 Arg Gly Glu Gly Asn Ala Gly Ile Asp Asn Ala Ser Phe Ala Phe Glu
 260 265 270
 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
 Tyr Arg Tyr Thr Arg Tyr Ser Ala Gly Trp Asp Ala Leu Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Trp Phe Gln Gly Glu Val Ala Ala Asn
 325 330 335

ES 2 380 530 A1

Tyr Ala Gly Pro Phe Asn Ser Asn Thr Gly Ile His His Val Gly Val
 340 345 350
 Lys Ala Thr Pro Leu Glu Asn Leu Thr Val Gly Ala Leu Tyr Phe Asp
 355 360 365
 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
 Pro Leu Val Gly Leu Tyr Gln Pro Arg Lys Asp Glu Ser Asn Gly Gly
 405 410 415
 Asn Gln Val Gly Gly Asn Gly Thr Asn Val Tyr Ser Gln Leu Thr Val
 420 425 430
 Ala Val Pro Phe
 435

<210> 17
 <211> 1497
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1497)
 <223> TynG

<400> 17
 atg tca ctc 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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

ES 2 380 530 A1

Thr Thr Phe Ala Glu Ala Ala Ser Ile Leu Pro Thr Thr Gly Ser Val
 65 70 75 80
 Tyr Asp Tyr Ile Asn Cys Gly Met Gly Arg Phe Phe Ala Ile Thr Gly
 85 90 95
 Thr Leu Ser Ala Tyr Leu Ile Val His Val Phe Ala Gly Thr Ala Glu
 100 105 110
 Thr Ile Leu Ser Gly Val Met Ala Leu Val Asn Phe Glu His Leu Asn
 115 120 125
 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
 Arg Ala Glu Val Val Leu Thr Phe Gly Met Trp Thr Thr Leu Met Val
 165 170 175
 Phe Gly Val Leu Gly Leu Ile Ala Ala Pro Ala Val Glu Leu Asp Gly
 180 185 190
 Pro Phe Gly Val Ser Leu Val Gly Thr Asp Leu Met Thr Ile Leu Ser
 195 200 205
 Leu Val Gly Met Ala Met Phe Met Phe Val Gly Cys Glu Phe Val Thr
 210 215 220
 Pro Leu Ala Pro Glu Leu Arg Arg Ser Ala Trp Val Leu Pro Arg Ala
 225 230 235 240
 Met Ala Leu Gly Leu Phe Gly Val Ala Ser Cys Met Phe Ile Tyr Gly
 245 250 255
 Ala Ala Met Lys Arg Gln Val Glu Asn Val Val Leu Asp Ala Ala Ser
 260 265 270
 Gly Val His Leu Leu Asp Thr Pro Met Ala Ile Pro Arg Phe Ala Glu
 275 280 285
 Gln Val Met Gly Asp Ile Gly Pro Val Trp Leu Gly Ile Gly Phe Leu
 290 295 300
 Phe Ala Gly Ala Ala Thr Ile Asn Thr Leu Met Ala Gly Val Pro Arg
 305 310 315 320
 Ile Leu Tyr Gly Met Ala Val Asp Gly Ala Leu Pro Lys Val Phe Thr
 325 330 335
 Tyr Leu His Pro Arg Phe Lys Thr Pro Leu Leu Cys Ile Leu Val Val
 340 345 350
 Ala Leu Ile Pro Cys Leu His Ala Trp Tyr Leu Gly Gly Asn Pro Asp
 355 360 365
 Asn Ile Leu His Leu Val Leu Ala Ala Val Cys Ala Trp Ser Thr Ala
 370 375 380

ES 2 380 530 A1

Tyr Leu Leu Val Thr Leu Ser Val Val Ile Leu Arg Ile Arg Arg Pro
 385 390 395 400
 Asp Leu Pro Arg Ala Tyr Arg Ser Pro Leu Phe Pro Leu Pro Gln Ile
 405 410 415
 Phe Ser Ser Ser Gly Ile Leu Ile Gly Met Ala Phe Ile Thr Pro Pro
 420 425 430
 Gly Met Asn Pro Ala Asp Val Tyr Val Pro Phe Ala Ile Met Leu Gly
 435 440 445
 Ala Thr Ala Ala Tyr Ala Leu Phe Trp Thr Leu Trp Val Gln Lys Val
 450 455 460
 Asn Pro Phe Lys Pro Ala Arg Val Glu Asp Val Leu Glu Lys Glu Phe
 465 470 475 480
 Ala Ala Glu Pro Gly His Ala Val Glu His Val Leu His Asp Gln Lys
 485 490 495
 Phe Ala

<210> 19
 <211> 1170
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1170)
 <223> HpaB

<400> 19
 atg aaa aag cca aac ccc ctg ctg gaa gac ctg aag tcc gtc ctg ccg 48
 Met Lys Lys Pro Asn Pro Leu Leu Glu Asp Leu Lys Ser Val Leu Pro
 1 5 10 15
 acc att gcc gcc aat gcc atg cgt gca gag cag gac cgc agt gtg ccg 96
 Thr Ile Ala Ala Asn Ala Met Arg Ala Glu Gln Asp Arg Ser Val Pro
 20 25 30
 gca gag aat atc gcc ttg ctg aaa agc atc ggc atg cac cgc gct ttc 144
 Ala Glu Asn Ile Ala Leu Leu Lys Ser Ile Gly Met His Arg Ala Phe
 35 40 45
 ttg ccc aaa cac ttc ggc ggc atg gaa atc acc ctg ccg gag ttc gcc 192
 Leu Pro Lys His Phe Gly Gly Met Glu Ile Thr Leu Pro Glu Phe Ala
 50 55 60
 cag tgc atc gcc ttg ctg gcg ggg gcc tgc gcc agc aca gcc tgg gcc 240
 Gln Cys Ile Ala Leu Leu Ala Gly Ala Cys Ala Ser Thr Ala Trp Ala
 65 70 75 80
 atg agc ctg ctg tgc acc cac agc cac cag atg gca atg ttc tcg ccc 288
 Met Ser Leu Leu Cys Thr His Ser His Gln Met Ala Met Phe Ser Pro
 85 90 95

ES 2 380 530 A1

aag cta caa cag gag gtg tgg ggt agc gac ccg gat gct acc gcc agc	336
Lys Leu Gln Gln Glu Val Trp Gly Ser Asp Pro Asp Ala Thr Ala Ser	
100	105
110	
agc agt atc gcg ccg ttc ggc cgc act gaa gag gtt gag ggt ggc gtg	384
Ser Ser Ile Ala Pro Phe Gly Arg Thr Glu Glu Val Glu Gly Gly Val	
115	120
125	
tcg ttc agc ggc gaa atg ggc tgg agt tcc ggt tgc gac cac gcc gaa	432
Ser Phe Ser Gly Glu Met Gly Trp Ser Ser Gly Cys Asp His Ala Glu	
130	135
140	
tgg gcg att ctc ggt ttc cgc cgc aag aat gcc gaa ggc gct cag gat	480
Trp Ala Ile Leu Gly Phe Arg Arg Lys Asn Ala Glu Gly Ala Gln Asp	
145	150
155	160
tac tgc ttc gcc atc ctg cct cgc agt gac tat gaa atc cgt gat gac	528
Tyr Cys Phe Ala Ile Leu Pro Arg Ser Asp Tyr Glu Ile Arg Asp Asp	
165	170
175	
tgg tat gcc gtg ggc atg cgc ggc agc ggc agc aag acc ctg atc gtg	576
Trp Tyr Ala Val Gly Met Arg Gly Ser Gly Ser Lys Thr Leu Ile Val	
180	185
190	
cgt gat gcc ttc gtg ccc gag cac cgc atc cag aag gcc aag gac atg	624
Arg Asp Ala Phe Val Pro Glu His Arg Ile Gln Lys Ala Lys Asp Met	
195	200
205	
atg gag ggc aag tcg gcg ggc ttt ggt ttg tac ccc gac agc aag att	672
Met Glu Gly Lys Ser Ala Gly Phe Gly Leu Tyr Pro Asp Ser Lys Ile	
210	215
220	
ttc ttc gcc ccg tat cgc ccg tat ttt gcc agc ggc ttc tcc acg gtc	720
Phe Phe Ala Pro Tyr Arg Pro Tyr Phe Ala Ser Gly Phe Ser Thr Val	
225	230
235	240
agc ttg ggc gtt gcc gag cgc atg ctg gag gtg ttc cgc gag aaa acc	768
Ser Leu Gly Val Ala Glu Arg Met Leu Glu Val Phe Arg Glu Lys Thr	
245	250
255	
cgc aac cgc gtg cgt gcc tac acc ggt gct gcc gtg ggc gcc gcc acc	816
Arg Asn Arg Val Arg Ala Tyr Thr Gly Ala Ala Val Gly Ala Ala Thr	
260	265
270	
ccg gcg ctg atg cgc ctg gcc gag tcg acc cat cag gtg gcc gct gcc	864
Pro Ala Leu Met Arg Leu Ala Glu Ser Thr His Gln Val Ala Ala Ala	
275	280
285	
cgg gca ttg ctg gaa aag agc tgg gac gag att gcc gag cac agt gcc	912
Arg Ala Leu Leu Glu Lys Ser Trp Asp Glu Ile Ala Glu His Ser Ala	
290	295
300	
cgt cac gaa tac ccg tcg cgt ggc acg ctg gcg ttc tgg cgt acc aac	960
Arg His Glu Tyr Pro Ser Arg Gly Thr Leu Ala Phe Trp Arg Thr Asn	
305	310
315	320
cag ggc tac gcc gtg aag atg tgc atc cag gcc gtc gac cgc ctg atg	1008
Gln Gly Tyr Ala Val Lys Met Cys Ile Gln Ala Val Asp Arg Leu Met	
325	330
335	

ES 2 380 530 A1

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
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
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
gac ccg gcg atg gtc tga Asp Pro Ala Met Val 385	1170

<210> 20
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U

<400> 20

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 20 25 30	
Ala Glu Asn Ile Ala Leu Leu Lys Ser Ile Gly Met His Arg Ala Phe 35 40 45	
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 65 70 75 80	
Met Ser Leu Leu Cys Thr His Ser His Gln Met Ala Met Phe Ser Pro 85 90 95	
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 115 120 125	
Ser Phe Ser Gly Glu Met Gly Trp Ser Ser Gly Cys Asp His Ala Glu 130 135 140	
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 165 170 175	
Trp Tyr Ala Val Gly Met Arg Gly Ser Gly Ser Lys Thr Leu Ile Val 180 185 190	

ES 2 380 530 A1

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
 210 215 220
 Phe Phe Ala Pro Tyr Arg Pro Tyr Phe Ala Ser Gly Phe Ser Thr Val
 225 230 235 240
 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
 260 265 270
 Pro Ala Leu Met Arg Leu Ala Glu Ser Thr His Gln Val Ala Ala Ala
 275 280 285
 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
 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
 340 345 350
 Leu Phe Arg Asp Ser His Met Thr Gly Ala His Ala Tyr Thr Asp Tyr
 355 360 365
 Asp Val Cys Ala Gln Ile Leu Gly Arg Glu Leu Met Gly Leu Glu Pro
 370 375 380
 Asp Pro Ala Met Val
 385

<210> 21
 <211> 930
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(930)
 <223> hpaC

<400> 21
 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
 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

ES 2 380 530 A1

```

acc gag gcg ttg tgg acc att gcc cgg caa cag cag gac aag gtg ttc      864
Thr Glu Ala Leu Trp Thr Ile Ala Arg Gln Gln Gln Asp Lys Val Phe
      275                               280                               285

ggg cag ttc agt gaa cag cag ctg gag act ttc aag acc gtg ctc aag      912
Gly Gln Phe Ser Glu Gln Gln Leu Glu Thr Phe Lys Thr Val Leu Lys
      290                               295                               300

gcc ctt atc aac atc tga      930
Ala Leu Ile Asn Ile
305

```

```

<210> 22
<211> 309
<212> PRT
<213> Pseudomonas putida U

```

```

<400> 22
Met Ser Lys Glu Thr Phe Asp Ser Arg Ala Phe Arg Arg Ala Leu Gly
1                               5                               10                               15

Asn Phe Ala Thr Gly Val Thr Val Val Thr Ala Ala Gly Pro Ser Gly
      20                               25                               30

Arg Lys Val Gly Val Thr Ala Asn Ser Phe Asn Ser Val Ser Leu Asp
      35                               40                               45

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

Val Phe Glu Glu Ala Ser His Phe Ala Val Asn Ile Leu Ala Ala Asp
65                               70                               75                               80

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

Ala Gly Ile Asp Tyr Glu Thr Gly Thr Gly Gly Ala Pro Leu Phe Ala
      100                              105                              110

Asp Cys Ala Ala Arg Phe Glu Cys Glu Lys Tyr Gln Gln Leu Asp Gly
      115                              120                              125

Gly Asp His Trp Ile Leu Val Gly Lys Val Val Ala Phe Asp Asp Phe
      130                              135                              140

Gly Arg Ser Pro Leu Leu Tyr His Gln Gly Ala Tyr Ser Met Val Leu
      145                              150                              155                              160

Pro His Thr Arg Met Thr Gln Gly Ala Glu Gly Gln Ala Pro Ser Ser
      165                              170                              175

His Phe Gln Gly Arg Leu Gln His Asn Leu Tyr Tyr Leu Met Thr Gln
      180                              185                              190

Ala Leu Arg Ala Tyr Gln Ala Asp Tyr Gln Pro Arg Gln Leu Cys Thr
      195                              200                              205

Gly Leu Arg Thr Ser Glu Ala Arg Met Leu Met Val Leu Glu Asn Asp
      210                              215                              220

```

ES 2 380 530 A1

Ala Gly Leu Ser Leu Asn Asp Leu Gln Arg Glu Val Ala Met Pro Ala
225 230 235 240

Arg Glu Ile Glu Glu Ala Val Ala Asn Leu Lys Arg Lys Gly Leu Ile
245 250 255

Ala Asp Asp Glu Gly Arg Val Arg Leu Ser Val Lys Gly Val Asp Glu
260 265 270

Thr Glu Ala Leu Trp Thr Ile Ala Arg Gln Gln Gln Asp Lys Val Phe
275 280 285

Gly Gln Phe Ser Glu Gln Gln Leu Glu Thr Phe Lys Thr Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ile Asn Ile
305

<210> 23
<211> 924
<212> DNA
<213> Pseudomonas putida U

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(924)
<223> hpaD

<400> 23
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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 530 A1

```

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

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

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
      145                        150                        155                        160

ggc tgg gcc atg cgc aag gca gta gaa gac cac tac gac ggc acc gtg      528
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
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
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
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
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
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 tct tcc ggc      816
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
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
Ala Ile Pro Ala Ala Gln Ala Ala Asn Pro Ala Ala Val Val Pro Thr
      290                        295                        300

agc cgc ctg taa
Ser Arg Leu
305

```

```

<210> 24
<211> 307
<212> PRT
<213> Pseudomonas putida U

<400> 24

```


ES 2 380 530 A1

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
 20 25 30
 Ile Asp Gly His His Glu Ile Ser Arg Arg Cys Arg Glu Leu Gly Val
 35 40 45
 Asp Thr Ile Val Val Phe Asp Thr His Trp Leu Val Asn Ala Asn Tyr
 50 55 60
 His Val Leu Cys Gly Pro His Phe Glu Gly Val Tyr Thr Ser Asn Glu
 65 70 75 80
 Leu Pro His Phe Ile Ser Asn Met Pro Tyr Ala Phe Pro Gly Asn Pro
 85 90 95
 Glu Leu Gly Lys Leu Leu Ala Glu Glu Cys Asn Arg Phe Asn Val Glu
 100 105 110
 Thr Met Ala His His Ala Thr Thr Leu Ala Pro Glu Tyr Gly Thr Leu
 115 120 125
 Val Pro Met Arg Tyr Met Asn Gln Asp Gln His Phe Lys Val Val Ser
 130 135 140
 Val Ser Ala Leu Cys Thr Ser His Tyr Leu Ala Asp Ser Ala Arg Leu
 145 150 155 160
 Gly Trp Ala Met Arg Lys Ala Val Glu Asp His Tyr Asp Gly Thr Val
 165 170 175
 Ala Phe Leu Ala Ser Gly Ser Leu Ser His Arg Phe Ala Gln Asn Gly
 180 185 190
 Gln Ala Pro Asp Phe Ala Thr Lys Val Trp Ser Pro Phe Leu Glu Thr
 195 200 205
 Leu Asp His Arg Val Val Gln Met Trp Gln Asp Gly Glu Trp Glu Ala
 210 215 220
 Phe Cys Gly Met Leu Pro Glu Tyr Ala Ala Lys Gly His Gly Glu Gly
 225 230 235 240
 Phe Met His Asp Thr Ala Met Leu Leu Gly Ala Leu Gly Trp Ser Asp
 245 250 255
 Tyr Asp Gly Lys Ala Glu Val Val Thr Pro Tyr Phe Gly Ser Ser Gly
 260 265 270
 Thr Gly Gln Ile Asn Ala Ile Phe Pro Val Thr Pro Gln Asp Gly Gly
 275 280 285
 Ala Ile Pro Ala Ala Gln Ala Ala Asn Pro Ala Ala Val Val Pro Thr
 290 295 300
 Ser Arg Leu
 305

ES 2 380 530 A1

<210> 25
 <211> 1461
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1461)
 <223> hpaE

<400> 25
 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 380 530 A1

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				
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					
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	
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	
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		
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			
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					
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	
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		
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			
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				
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					
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	
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		
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			

ES 2 380 530 A1

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

Ala Thr Gly Lys Lys Ile Met Gln Thr Ala Gly Leu Lys Lys Tyr Ser
 225 230 235 240

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
 260 265 270

Gly Glu Arg Cys Thr Ala Gly Ser Arg Ile Phe Ile Gln Glu Ser Val
 275 280 285

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
 305 310 315 320

Gln Gln His Tyr Asp Lys Val Thr Gly Tyr Ile Arg Ile Gly Ile Glu
 325 330 335

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
 355 360 365

Asp Val Asn Asn Lys Met Arg Ile Ala Gln Glu Glu Ile Phe Gly Pro
 370 375 380

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
 405 410 415

Ile Gly Lys Ala His Arg Leu Ala Arg Gly Ile Glu Ala Gly Met Val
 420 425 430

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
 450 455 460

Val Phe Ala Glu Ile Lys Asn Val Cys Ile Ser Met Gly Asn His His
 465 470 475 480

Ile Pro Arg Trp Gly Ile
 485

<210> 27
 <211> 405

ES 2 380 530 A1

```

<212> DNA
<213> Pseudomonas putida U

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(405)
<223> hpaF

<400> 27
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

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

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

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

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

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

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

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

cac cca ctg ttc aac cgc tag                                         405
His Pro Leu Phe Asn Arg
          130

```

```

<210> 28
<211> 134
<212> PRT
<213> Pseudomonas putida U

```

```

<400> 28
Met Pro His Leu Val Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Leu Glu Thr Asp Ala
1          5          10          15

Asp Ile Pro Gly Leu Cys Arg Ala Leu Ala Asp Thr Met Leu Glu Gln
          20          25          30

Arg Asp Ala Glu Gly Lys Ala Val Phe Pro Thr Gly Gly Thr Arg Val
          35          40          45

```

ES 2 380 530 A1

Leu Ala Tyr Pro Ala Ala His Cys Ala Val Ala Asp Gly Lys Gly Glu
 50 55 60
 Tyr Gly Phe Leu Tyr Ala Asn Leu Arg Met Ala Thr Gly Arg Ser Ala
 65 70 75 80
 Glu Val His Lys Thr Val Gly Asp Ser Leu Leu Ala Val Leu Lys Ala
 85 90 95
 Arg Leu Asp Pro Leu Leu Gln Gln Arg Pro Ile Gly Ile Thr Val Gln
 100 105 110
 Ile Asp His Ser Thr Ala Gln Val Tyr Asp Ala Lys His Ser Thr Leu
 115 120 125
 His Pro Leu Phe Asn Arg
 130

<210> 29
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(660)
 <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
 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
 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
 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
 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
 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
 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

ES 2 380 530 A1

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

<400> 30

Met Ser His Ala Leu Leu Asp Val Ala Ser Gly Thr Leu Phe Gly Val	
1	5
	10
	15
Ala Leu Asn Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Gln His Gln Ala Ala Phe Val	
	20
	25
	30
Glu Ala Pro Tyr Lys Gln Leu Pro Val Lys Pro Val Leu Phe Val Lys	
	35
	40
	45
Thr Pro Asn Thr Arg Asn Gln His Glu Gly Gln Val Val Phe Pro Ala	
	50
	55
	60
Gly Val Gln Arg Val Gln Pro Gly Pro Ala Leu Gly Val Val Ile Gly	
	65
	70
	75
	80
Lys Asp Ala Ser Arg Val Ser Val Ala Asp Ala Leu Glu His Val Ala	
	85
	90
	95
Gly Tyr Thr Ile Val Asn Glu Val Ser Leu Pro Glu Ala Ser Tyr Tyr	
	100
	105
	110
Arg Pro Ala Val Lys Ala Lys Cys Arg Asp Gly Phe Cys Pro Val Gly	
	115
	120
	125

ES 2 380 530 A1

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

Leu Arg Leu Tyr Val Asn Gly Glu Leu Arg Gln His Asn Asn Thr Ala
 145 150 155 160

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
 180 185 190

Arg Val Asp Val Gln Pro Gly Asp Arg Val Asp Ile Glu Ile Asp Gly
 195 200 205

Leu Gly Lys Leu Thr Asn His Ile Val Ala Glu
 210 215

<210> 31
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(765)
 <223> hpaG2

<400> 31
 gtg aaa cac gcc cgt atc cag ttc gac ggc cag gcc cac gat gtc acg 48
 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 96
 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 144
 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 192
 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 240
 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 288
 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 336
 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 384
 Glu Asp Ala Leu Ala Tyr Val Ala Gly Tyr Thr Val Cys Asn Asp Tyr

ES 2 380 530 A1

115	120	125	
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	
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
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	
ggg 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	
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	
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	
ggg 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
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
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U

<400> 32

Val Lys His Ala Arg Ile Gln Phe Asp Gly Gln Ala His Asp Val Thr																			
1			5				10							15					
Val Glu Asp Asp His Leu Arg Leu Ala Asp Gly Arg Leu Val His Gln																			
20							25							30					
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									
Thr Glu Pro Leu Ala Phe Ile Lys Ser Pro Gly Thr Tyr Thr Gly His																			
65				70					75										80
Ile Gln Val Thr Trp Arg Pro Asp Asn Val Glu Tyr Met His Tyr Glu																			
85							90												95

ES 2 380 530 A1

Cys Glu Leu Val Ala Val Ile Gly Lys Ala Ala Lys Asn Val Lys Arg
 100 105 110
 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
 Lys Asn Arg Asp Ala Thr Thr Pro Val Gly Pro Trp Ile Val Asp Ala
 145 150 155 160
 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
 Pro His Leu Ile Glu Tyr Phe Ser Ser Phe Met Thr Leu Gln Pro Gly
 195 200 205
 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
 Arg Ile Val Ser Glu Ala Asp Phe Phe Lys Asn Asn Lys Ala
 245 250

<210> 33
 <211> 804
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(804)
 <223> hpaH

<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
 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
 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
 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
 acc tcg cgc gcc atg cag gta tcg tcg aac atc acc gag ccc gac tac 240
 Thr Ser Arg Ala Met Gln Val Ser Ser Asn Ile Thr Glu Pro Asp Tyr

ES 2 380 530 A1

65	70	75	80	
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	
ttc gag cgc ttc atc gtg ccg cgg gtt gaa gtg gag ttg gcg ttc atc				336
Phe Glu Arg Phe Ile Val Pro Arg Val Glu Val Glu Leu Ala Phe Ile	100	105	110	
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	
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	
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
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	
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	
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	
aac cac ccg gcc aaa ggc gtt gcc tgg ctg gcc aac aaa ctg gcg ccg				672
Asn His Pro Ala Lys Gly Val Ala Trp Leu Ala Asn Lys Leu Ala Pro	210	215	220	
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
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	
gac atg ctc ggc tcc atc gcc tgc cgc ttc gtt taa				804
Asp Met Leu Gly Ser Ile Ala Cys Arg Phe Val	260	265		

<210> 34
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U

<400> 34
 Met Leu Asp Asn Ala Phe Ile Gln His Ala Ala Asp Arg Leu Asp Gln
 1 5 10 15

ES 2 380 530 A1

Ala Glu Arg Ser Arg Glu Gln Val Arg Gln Phe Ser Leu Glu Gln Pro
 20 25 30

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

Thr Ser Arg Ala Met Gln Val Ser Ser Asn Ile Thr Glu Pro Asp Tyr
 65 70 75 80

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

Leu Gly Lys Pro Leu Lys Gly Pro Asn Ile Thr Val Phe Asp Val Leu
 115 120 125

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

Thr Ile Ser Asp Asn Ala Ala Asn Ala Gly Val Val Met Gly Gly Arg
 165 170 175

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

Asn His Pro Ala Lys Gly Val Ala Trp Leu Ala Asn Lys Leu Ala Pro
 210 215 220

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

Asp Met Leu Gly Ser Ile Ala Cys Arg Phe Val
 260 265

<210> 35
 <211> 804
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(804)
 <223> hpaI

<400> 35

ES 2 380 530 A1

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

Val Val Val Pro Ser Ala Gly Gly Gly Ala Tyr
 260 265

<210> 37
 <211> 906
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(906)
 <223> hpaA

<400> 37
 atg agc gac cgg cat ccg ata ccg aac atc aac att ggc cag gtt tac 48
 Met Ser Asp Arg His Pro Ile Pro Asn Ile Asn Ile Gly Gln Val Tyr
 1 5 10 15
 gac cag cgc tac agc gac agc gag gtg cat tac gac cgg ctg ggc aac 96
 Asp Gln Arg Tyr Ser Asp Ser Glu Val His Tyr Asp Arg Leu Gly Asn
 20 25 30
 ctg gcg ggc ttt ttc ggg cgc aac atg ccg gtg cac cgg cat gac cgg 144
 Leu Ala Gly Phe Phe Gly Arg Asn Met Pro Val His Arg His Asp Arg
 35 40 45
 ttt ttc cag gtg cat tac gtg aag tcg ggc aca gta cgg gtg tat ctg 192
 Phe Phe Gln Val His Tyr Val Lys Ser Gly Thr Val Arg Val Tyr Leu
 50 55 60
 gat gac cag cag tac atc gag gcc ggg ccg atg ttc ttc ctc acg cca 240
 Asp Asp Gln Gln Tyr Ile Glu Ala Gly Pro Met Phe Phe Leu Thr Pro
 65 70 75 80
 ccc acg gtg gcg cac gcg ttc gtc acc gaa gct gac agc gac ggg cat 288
 Pro Thr Val Ala His Ala Phe Val Thr Glu Ala Asp Ser Asp Gly His
 85 90 95
 gtg ctg acg gtg cgc cag caa ctg gtg tgg caa ttg atc gaa gcc gac 336
 Val Leu Thr Val Arg Gln Gln Leu Val Trp Gln Leu Ile Glu Ala Asp
 100 105 110
 gcc agc ctg ctg ccg gcg ggc atg cag gtg cag cca gcc tgt gtg gcg 384
 Ala Ser Leu Leu Pro Ala Gly Met Gln Val Gln Pro Ala Cys Val Ala
 115 120 125
 ctg ggc aac ctg ccg gcc gaa tac aag gcc gag gcg cag cgc ctg caa 432
 Leu Gly Asn Leu Pro Ala Glu Tyr Lys Ala Glu Ala Gln Arg Leu Gln
 130 135 140
 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
 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

ES 2 380 530 A1

	165	170	175	
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	
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	
ctt gag cat tgg ccg ctg gcc cgc tac gcg cag cag att ggc gtg acc				672
Leu Glu His Trp Pro Leu Ala Arg Tyr Ala Gln Gln Ile Gly Val Thr				
	210	215	220	
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
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	
ttg ttt tcc ggc agc acg gcc aac gaa atc tgt tac cag ctc ggc ttc				816
Leu Phe Ser Gly Ser Thr Ala Asn Glu Ile Cys Tyr Gln Leu Gly Phe				
	260	265	270	
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	
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	

<210> 38
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U

<400> 38

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
Leu Ala Gly Phe Phe Gly Arg Asn Met Pro Val His Arg His Asp Arg																			
		35							40										45
Phe Phe Gln Val His Tyr Val Lys Ser Gly Thr Val Arg Val Tyr Leu																			
	50								55										60
Asp Asp Gln Gln Tyr Ile Glu Ala Gly Pro Met Phe Phe Leu Thr Pro																			
	65																		70
Pro Thr Val Ala His Ala Phe Val Thr Glu Ala Asp Ser Asp Gly His																			
																			85
																			90
																			95

ES 2 380 530 A1

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

<210> 39
 <211> 1308
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1308)
 <223> hpaX

<400> 39
 atg agc aca ctc gaa caa gcc tcg ccg cgc gag gca cac gtt gaa cgg 48
 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
 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

ES 2 380 530 A1

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
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
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	ggt	ggc	cca	cgc	cgc	tgg	atc	gcc	288
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
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
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	ggt	tac	ctc	aac	cgc	tgg	tac	432
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
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
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
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	ggt	624
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
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
Ala	Thr	Leu	Arg	Ala	Gln	Phe	Gly	Glu	Glu	Glu	Gln	Arg	Lys	Pro	Val	
225					230						235			240		
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		
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			
atg	ccc	agc	ctg	att	cac	agt	gcc	ggt	gtg	gcc	agc	gac	gcc	agt	gtc	864

ES 2 380 530 A1

Met	Pro	Ser	Leu	Ile	His	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Ser	Asp	Ala	Ser	Val	
		275					280					285				
ggc	ctg	ctc	agc	gct	gtg	ccg	tac	gtg	gcc	ggc	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					
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	
tgc	gta	ccg	ctg	ctg	atg	gct	gcc	atc	ggc	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		
gcc	ccc	gag	cag	gcg	ctg	ccg	gta	atg	gcc	ggc	ctg	gtg	ctg	gcc	ggc	1056
Ala	Pro	Glu	Gln	Ala	Leu	Pro	Val	Met	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	
			340					345					350			
atg	ggc	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				
ttc	ctc	aac	gcc	cgt	acc	cag	gcc	gcc	ggc	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					
ctg	ggc	agc	atc	gcc	tcg	ttc	ttc	acg	ccc	tac	ttc	atc	ggc	tgg	gtg	1200
Leu	Gly	Ser	Ile	Ala	Ser	Phe	Phe	Thr	Pro	Tyr	Phe	Ile	Gly	Trp	Val	
385					390					395					400	
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			
ttc	atc	gcc	ctg	ggc	ggc	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			
gtc	aac	cct	tga													1308
Val	Asn	Pro														
		435														

<210> 40
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U

<400> 40

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		
Leu	Val	Cys	Tyr	Leu	Phe	Ala	His	Leu	Asp	Arg	Ile	Asn	Ile	Gly	Phe
		35					40					45			

ES 2 380 530 A1

Ala Lys Met Gln Met Ser Gln Asp Leu His Leu Ser Asp Thr Val Tyr
 50 55 60

Gly Leu Gly Ala Gly Leu Phe Phe Ile Ala Tyr Ala Leu Phe Gly Val
 65 70 75 80

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

Glu Ser Ser Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Arg Phe Ala Leu Gly Ala Ala
 115 120 125

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

Pro Leu Ala Gly Val Val Gly Gly Pro Val Ser Gly Ala Ile Leu Ala
 165 170 175

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

Leu Pro Glu His Phe Glu Arg Val Ser Trp Leu Asp Glu Gln Gln Lys
 210 215 220

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

Ala Val Tyr Cys Ala Val Met Leu Ala Val Asn Thr Leu Ala Phe Trp
 260 265 270

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

Ala Cys Gly Arg Ser Ser Asp Arg Gln Arg Glu Arg Arg Trp His Leu
 305 310 315 320

Cys Val Pro Leu Leu Met Ala Ala Ile Gly Ile Ala Ile Ala Ala Ile
 325 330 335

Ala Pro Glu Gln Ala Leu Pro Val Met Ala Gly Leu Val Leu Ala Gly
 340 345 350

Met Gly Ala Ser Ala Ala Leu Pro Met Phe Trp Gln Leu Pro Pro Ala
 355 360 365

ES 2 380 530 A1

Phe Leu Asn Ala Arg Thr Gln Ala Ala Gly Ile Ala Leu Ile Ser Ser
 370 375 380
 Leu Gly Ser Ile Ala Ser Phe Phe Thr Pro Tyr Phe Ile Gly Trp Val
 385 390 395 400
 Arg Asp Thr Thr His Ser Ala Ser Leu Ala Leu Tyr Val Leu Ala Val
 405 410 415
 Phe Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu Val Leu Arg Thr Gln Ala Ala Ile
 420 425 430
 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
 Met Thr Thr Pro Arg Pro Ser Leu Thr Leu Thr Leu Leu Gln Ala Arg
 1 5 10 15
 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
 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
 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
 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
 65 70 75 80
 cgc aag tcg ccg gag gac cag cgc cgg gtg ttc atc agc ctg acc gag 288
 Arg Lys Ser Pro Glu Asp Gln Arg Arg Val Phe Ile Ser Leu Thr Glu
 85 90 95
 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
 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
 atg cag ctg ctg ggt gaa atg aag aag atc aaa ccc tga 423

ES 2 380 530 A1

Met Gln Leu Leu Gly Glu Met Lys Lys Ile Lys Pro
 130 135 140

<210> 42
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida U
 <400> 42

Met Thr Thr Pro Arg Pro Ser Leu Thr Leu Thr Leu Leu Gln Ala Arg
 1 5 10 15
 Glu Ala Thr Met Ala Phe Phe Arg Pro Ala Leu Asn Ala His Asp Leu
 20 25 30
 Thr Glu Gln Gln Trp Arg Val Ile Arg Ile Leu Arg Gln Gln Gly Glu
 35 40 45
 Leu Glu Ser His Gln Leu Ala Glu Leu Ala Cys Ile Leu Lys Pro Ser
 50 55 60
 Met Ser Gly Val Leu Lys Arg Leu Glu Arg Asp Gly Ile Val Ala Arg
 65 70 75 80
 Arg Lys Ser Pro Glu Asp Gln Arg Arg Val Phe Ile Ser Leu Thr Glu
 85 90 95
 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
 Met Gln Leu Leu Gly Glu Met Lys Lys Ile Lys Pro
 130 135 140

<210> 43
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(423)
 <223> hpaR2

<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
 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
 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

ES 2 380 530 A1

<210> 45
 <211> 12722
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida U

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12722)
 <223> cluster hpa

<400> 45

atgaccacac	cgagaccctc	cctgaccctg	accttgctgc	aggcgcgcga	agccaccatg	60
gcgttcttcc	gcccggcgct	gaatgcccac	gacctgaccg	agcagcaatg	gcgggtaatc	120
cgtatcctgc	gccagcaagg	cgagctggaa	agccatcagt	tggcggagct	ggcctgtatc	180
ctcaaaccac	gtaggagcgg	ggtgctcaag	cgcttgagc	gtgacggcat	cgtagcgcgg	240
cgcaagtgcg	cggaggacca	gcgcgggtg	ttcatcagcc	tgaccgaggc	cggccagcaa	300
gcgtttctgg	cgatgagcga	ggagatgacc	cgcaactacg	acaagatcct	cgcccagttt	360
ggcgatgaca	agctgcagca	gctgatgcag	ctgctgggtg	aatgaagaa	gatcaaacc	420
tgacgcgcca	ggcgtcagcg	gttgagtgac	agcgagtctt	ccagcacttt	cagcagtgtc	480
gccgcgcgcc	gctcataggc	gtcggggcct	gcgtacatca	gctctacata	caggctgtcg	540
atgatgcca	ggtaggcatc	ggcatacagc	gccaggcggc	tgtgctgctc	atgcgccag	600
ccgtggcgag	cttgcagggc	cacgctgaac	ccttcgcgta	tgccgtccag	gtactgttca	660
aagcccgaag	tgacaatcgg	cttgatgcc	gccgggggca	ggaacgccgt	gcgcaacacg	720
aagcgcagtt	gggcccagtc	gcgataacgt	tccgccaggt	gcagggccag	ccagtgtccc	780
gccgccaggc	cgtcgcgggc	ttcctgcgca	aagcctgtct	cgacaaaggc	cgtttcctgc	840
acaagcgcac	gctggaacac	ctccacgaac	aaggcgtcct	tgttggcgaa	atgcgcatac	900
agcgatgect	tgcgcatgcc	cgccaactgg	gcgatttcgt	tcagcgaaga	ggcgtcataa	960
ccgtactcgg	cgaagtggcc	gacggcggca	tcgcacacac	gcaccgcaga	aggggaaagg	1020
tctttcaaca	gcatcactcc	gtcagggggc	cggcgggccc	cgcgctctt	gagggtggga	1080
ttgtggtgat	cgaaaatgca	cgggtcaatg	cttgtcgcaa	ggcaatttcc	gggcgccatg	1140
gaaagtgcaa	tgttccccct	gtaacgtgca	ttcctccacc	caatcgccgc	tcacatactg	1200
atcgcgtctt	cgaatccaat	aagaaagaga	ccgctcatga	aaaagccaaa	ccccctgtg	1260
gaagacctga	agtcctcct	gccgaccatt	gcgcgcaatg	ccatgcgtgc	agagcaggac	1320
cgcagtgctg	cggcagagaa	tatgccttg	ctgaaaagca	tcggcatgca	ccgcgctttc	1380
ttgccaaac	acttcggcgg	catggaaatc	accctgccgg	agttcgccca	gtgcatcgcc	1440
ttgctggcgg	gggcctgcgc	cagcacagcc	tgggcatga	gcctgctgtg	caccacagc	1500
caccagatgg	caatgttctc	gcccagcta	caacaggagg	tgtgggtag	cgaccggat	1560
gctaccgcca	gcagcagtat	cgcgccgttc	ggccgactg	aagaggttga	gggtggcgtg	1620
tcgttcagcg	gcgaaatggg	ctggagtcc	ggttgcgacc	acgccgaatg	ggcgattctc	1680
ggtttccgcc	gcaagaatgc	cgaaggcgt	caggattact	gcttcgccat	cctgcctcgc	1740
agtgactatg	aaatccgtga	tgactggtat	gccgtgggca	tgcgcgccag	cggcagcaag	1800
accctgatcg	tgctgtgatg	cttcgtgcc	gagcacgcga	tccagaaggc	caaggacatg	1860
atggagggca	agtcggcggg	ctttggttt	taccccgaca	gcaagatttt	cttcgccccg	1920
tatgcgccgt	atthttgccag	cggttctcc	acggtcagct	tgggcgttgc	cgagcgcag	1980
ctggaggtgt	tccgcgagaa	aaccgcgaac	cgctgctgtg	cctacaccgg	tgctgccgtg	2040
ggcgcgcgca	ccccggcgct	gatgcgcctg	gccgagtcga	cccatcaggt	ggccgctgcc	2100
cgggcattgc	tgaaaagag	ctgggacgag	attgccgagc	acagtgcccg	tcacgaatac	2160
ccgtcgcgtg	gcacgctggc	gttctggcgt	accaaccagg	gctacgccgt	gaagatgtgc	2220
atccaggccg	tcgaccgect	gatggaagcg	gccggtgggt	gcgcctggtt	cgagagcaac	2280
gaactgcagc	ggctgttccg	cgattcgcac	atgaccgggtg	cccattgccta	caccgattac	2340
gacgtgtgtg	gcgaaatcct	cggccgcgag	ctgatgggcc	tggagcctga	cccggcgatg	2400
gtctgagccg	ccacttgttt	tcaccatcc	cctacaagca	caacaacaaa	cagggcaggc	2460
tgccaggcct	gcccgggagt	cttgcattgc	caaagaaacc	ttcgattcac	gtgccttccg	2520
ccgcgccctg	ggcaacttcg	ccaccggcgt	gaccgtgggtg	actgccgcgg	gccccagtg	2580
ccgcaaggtc	ggcgttaccg	ccaacagctt	caactcgggtg	tcgctggacc	cggcgcgtgat	2640
cctgtggagc	atcgacaagc	gctccaccag	ccatgaagtg	ttcgaagagg	cctcgcactt	2700
tgccgtgaac	attctggctg	cggaccagat	cgacctgtcc	aacaactttg	cccgcccgaa	2760
ggaagatcgc	tttgccggta	tcgactacga	gaccggcact	ggcggcgcgc	cgttgttccg	2820

ES 2 380 530 A1

cgattgcgcg	gcgcgctttg	agtgtgaaaa	gtaccagcag	ctggacggtg	gcgatcactg	2880
gacacctggtg	ggcaaggtag	tggcctttga	tgactttggc	cgctcgccgc	tgctgtatca	2940
ccagggcgcc	tattcaatgg	tgctgcccga	taccgcgatg	acccaaggcg	cagaggggca	3000
ggcaccgagc	agccacttcc	agggccgcct	gcagcacaac	ctgtactacc	tgatgaccca	3060
ggcgctgctg	gcttaccagg	ctgactacca	gccacgccag	ctgtgtaccg	gcttgcgcac	3120
cagcgaggca	cgcatgctga	tgggtgctgga	gaacgatgcg	ggcctgagcc	tgaacgacct	3180
gcaacgcgaa	gtggcgatgc	cggcgcggga	gatcgaggaa	gcggttgcca	acctcaagcg	3240
caaagggctg	attgccgatg	acgaagggcg	agtgcggcta	tcggtgaagg	gcgtggacga	3300
gaccgaggcg	ttgtggacca	ttgcccgcca	acagcaggac	aagggtgttcg	ggcagttcag	3360
tgaacagcag	ctggagactt	tcaagaccgt	gctcaaggcc	cttatcaaca	tctgaacacg	3420
ctttgggatg	gcaccggctg	ttttggatgg	caccggctgt	gccgggtgtt	gcggatgaac	3480
ccgctcccac	aggtccagcg	ccagtagcaa	cttcggcgcg	gtacctgtgg	gagcggcttt	3540
agccgcgaac	accggcaaa	ccggtgccat	ccaaccagaa	gcctcagtag	gcaccacccc	3600
cggcactggg	gactaccact	gtatccttga	acttccccgc	cagctcgcgc	agcccgcgca	3660
tcagcaccgt	ggtatccaca	cccaccgcca	caaacgccgc	accagctcgc	atgtagcgtc	3720
gcgccagttt	ctcgtccgcg	ctgagaatgc	cggcggcttt	gcccgccttg	ccaatgocga	3780
cgattgctgc	ttcaatcgcc	gcttgcacct	ccgggtgcc	ggggttgccg	cgatgaccca	3840
tggccgcaact	caggtctgca	ggcccgatga	acacgccatc	cacaccttcc	actgcaacga	3900
tctcgtccag	gttggccagg	ccttccttgt	tctcogatctg	caccagcagg	cacatttgct	3960
catcggcgtg	gtccaggtaa	ccggggaggg	tgttccagcg	cgaagcccgc	gccagcgcgc	4020
tgcccacccc	gcgaatgccc	ttgggcgggg	aatgcatggc	cttgaccagt	tgccgcgcct	4080
gttcggcagt	ttccaccatc	ggcaccagca	aggtttgtgc	gccgatatcc	agcacctgct	4140
tgatcagcgc	ggtatcgccg	atcacccggc	ggatcactgc	ctggctgggg	tagggtgcca	4200
ccgcctgcaa	ctgggcgagc	atgccgcgca	ggtcggtggg	cgctgttccg	ccgtcgatca	4260
gcagccagtc	gaaaccggca	ttggccgcca	gctcggcgca	gtaggcacgc	gccaggccga	4320
gccacaggcc	gatttgccgt	tcaccgctgt	gcaggcgtcg	cttgaagtgg	ttgatgggca	4380
tgtccatgag	caggtcctta	aacgaagcgg	caggcgatgg	agccgagcat	gtcgtagtcg	4440
acgtggaagg	tgtcacctgg	gcgagcggcg	accgggcccg	tgaacgaacc	cccaaggatg	4500
atctggcccg	gctgcaagg	gacgtcgtac	ggcgccagtt	tgttggccag	ccaggcaacg	4560
cctttggccg	ggtggttgag	cacggcagcg	ctgaccccgg	attcctcgat	cacgccattg	4620
cggtagagca	ccgcccgcac	tttgccgagg	tcgatttcgg	tggggcgcac	ggcccgcctg	4680
cccatacaca	cgccggcatt	ggcggcgttg	tcggagatgg	tgtcgaacac	cttgcgggtg	4740
gcttgggttt	gcgggtccac	ctgctggatg	cgcgctcaa	tgatttccag	cgccgggatc	4800
accactcgg	tggtcctcag	cacatcaaac	acggtgatgt	tcgggcccct	cagcggcttg	4860
ccgaggatga	acgccaactc	cacttcaacc	cgcggcacga	tgaagcgtc	gaaggggatg	4920
tcgctgcctt	cgtcgaacag	catgtcgtcg	agcaaggcgc	cgtagtcggg	ctcggtgatg	4980
ttcgacgata	cctgcatggc	gcgagaggtc	aggccgatct	tgtagggccc	cagcttgcgc	5040
ccggcggcga	tcttttttgc	cacccaggcg	cgctggatgg	cgtaggcgtc	ttcgatgggtg	5100
attgccgggt	gctccagcga	gaactggcgc	acttgctcgc	gggagcgttc	ggcctggtcg	5160
aggcggctcg	cgccgtgctg	gatgaaagcg	ttgtctagca	tggggcgcg	ctcttgattc	5220
aagggttgac	gatggcagcc	tgggtgcgca	acaccagcag	gccgcccagg	gcgatgaaga	5280
cggcgagtac	gtacagagca	aggctggcgc	tgtaggggtg	gtcgcgcacc	cagccgatga	5340
agtagggcgt	gaagaacgag	gcatgctgct	ccagcagcgt	gatcagggca	atgccggcgc	5400
cctgggtacg	ggcgttgagg	aacgcggcgc	gcagttgcca	gaacatcggc	agcgcagcgc	5460
tggcgcccat	gccggccagc	accaggcccg	ccattaccgg	cagcgcctgc	tcgggggcaa	5520
tggccgcaat	agcgatgccc	atggcagcca	tcagcagcgg	tacgcacagg	tgccagcggc	5580
gttcgcgctg	gcggctcgtg	gagcggcccgc	acgccagcat	gaacacgcag	ccggcccacgt	5640
acggcacagc	gctgagcagg	ccgacactgg	cgctcgtggc	cacaccggca	ctgtgaaatca	5700
ggctgggcat	ccagaacgca	agggtattca	ccgccagcat	caccgcgcaa	tacacggcca	5760
ccaacagcca	cagcgcacgg	cttgcgaaaa	tggcgccgaa	cgaggttacg	ggcttgcgct	5820
gttcttctc	accgaattgc	gcgcgcagcg	tggtcttctg	ctgctcatcc	agccagctca	5880
cccgttcgaa	gtgctccggc	aaaacggcca	gtaccaccag	gcccagcaac	accaccggcg	5940
ccccttcgag	caggaacatc	cactgcccagc	caocagcccc	gcccgtgtcg	tgcatgaagg	6000
ccagtatggc	cccggacact	ggcccgcgca	ccactcccgg	caacggcacg	gcaatggcga	6060
acagcgcggt	gacctgggcg	cggcgcccgg	ccgggtacca	gcgggtgagg	taaaccagaa	6120
tgcccgggaa	gaaccgggcc	tcggccgcgc	ccagggcaaa	gcgcaacagg	tagaacgcgc	6180
tgctgctttc	gatcagcagc	atgctggctg	acaacagccc	ccacaccacc	atcaggcagg	6240
cgatccagcg	gcgtgggcca	acgcggctga	gcatcagggt	gctggggacg	ccgaacagcg	6300
cataggcaat	gaagaacagc	ccggcaccca	ggccatagac	cgtgtcggac	aaatgcaggt	6360
cctggctcat	ctgcatcttg	gcgaagccaa	tgttgatgcg	gtccagggtg	gcgaacaggt	6420

ES 2 380 530 A1

agcacaccag	cagcagcggc	atcagccgcc	aggtgactgc	ccgatgggta	ctgtcggccc	6480
gttcaacgtg	tgcctcgcgc	ggcgaggcct	gttcgagtgt	gctcatgttt	ttgtacttat	6540
tctgtaatga	gtcggggagg	gcgtgggttt	agccggcgcg	ctagcggttg	aacagtgggt	6600
gcaaggtgct	gtgcttggcg	tcgtagacct	gggcggtgct	gtggtcgatc	tgcacggtga	6660
tgccgatcgg	gcgctgttgc	agcagtgggt	ccaggcgcgc	tttcaacact	gccagcaagc	6720
tgtcgcccac	tgttttgtgc	acctcggcgc	tacggccggt	agccatgcgc	aggttggcgt	6780
acagaaagcc	gtattcgcct	ttgccgtcgg	ccaccgcgca	atgggcggcg	gggtaggcca	6840
gcacgcgtgt	accgccagtg	gggaacacgg	ctttgccttc	ggcatcgcgc	tgttcgagca	6900
tgggtgcggc	cagggcgcgg	cacaggccgg	ggatgtcggc	gtcggtttcc	aggtcggggg	6960
tatagagcag	aaccagggtg	ggcatggggg	cctcctcggg	gaggggcggc	tggccacccg	7020
ccagggcgac	cagccgcgaa	cgggtgggtt	acaggcggct	ggtgggcacc	acggcggccc	7080
ggttggcggc	ctgggcagcg	gggatggcac	caccgtcctg	cggggtgacc	gggaagatcg	7140
cgttgatctg	gccggtgccc	gaagagccga	agttagggcg	gaccacttcg	gccttgccgt	7200
cgtaatcgga	ccagcccagc	gcacccagca	gcattgccgt	gtcgtgcatg	aagccttcac	7260
cgtggccttt	ggcggcgtac	tccggcagca	tcccgcagaa	cgcttcccac	tcgccgtcct	7320
gccaatttg	caccacacgg	tggtcgaggg	tttcgaggaa	cgggctccac	accttggtgg	7380
caaagtccgg	cgccctggccg	ttctgcgcga	agcggtgcca	cagcgagccg	ctggccagga	7440
acgccacggt	gcccgtcgtag	tggtcttcta	ctgccttgcg	catggcccag	cccaggcggg	7500
cactgtcggc	caggtagtgc	gaggtgcaca	gggcccagac	cgagaccact	ttgaagtgct	7560
ggtcctgggt	catgtagcgc	atgggcacca	gggtgccgta	ttccggggcg	agggtggtgg	7620
cgtgggtggc	catggtttcg	acgttgaagc	ggttgcactc	ctcggccagc	agcttgccca	7680
gctcgggatt	gccggggaat	gcgtagggca	tgttgctgat	gaagtgcggc	agttcgttgc	7740
tggtgtacac	gccctcgaaa	tcgggcccgc	acagcacgtg	gtagttagcg	ttgaccagcc	7800
agtgcgtgtc	gaacacgacg	atggtgtcca	cgcccagctc	acggcaacgg	cggctgattt	7860
cgtgatgccc	gtcgatggcc	gcctggcgaa	agccttggcg	cgggcctggc	agttcggaca	7920
tgtacatgga	cggtagatgg	gtaatcttgg	cagtgagagc	gagtttgccc	atgggggtct	7980
ccgataagac	gctgtttgtt	ttttggggct	gaccgggtcc	cttgtaggag	cggccttggt	8040
ccgggatggg	gcgcacagcg	gccccggcga	tatctgcggc	gaggctgaaa	tccagggggc	8100
gctgcgcgcc	ccatcgcggg	cacaaggccg	ctcctacacc	cgggcgggtg	aaaccgcaca	8160
gagggttaga	tgccccagcg	aggaatgtgg	tgattaccca	tggaaataca	cacgttcttg	8220
atctctgcaa	agacctcgaa	gctgtactgc	ccgccctcac	gcccggtagc	ggaacctttc	8280
acgccgccga	acggctggcg	caggtcgcgt	acgttctggc	tgttgatgaa	caccatgccg	8340
gcctcgatgc	cacggggccag	gcgatgggct	ttgcccagct	cctgggtcca	gatgtacgag	8400
gccaggccat	actcgggtgc	gttggccagt	tcgagccctc	cggcttcgtc	cttggaccgg	8460
atcaggcaca	ccaccgggcc	aaagatttct	tccctgggcaa	tgccgatcct	gttggtcacg	8520
tcggcgaata	cgggtgggctg	gatgaactgc	cccttggcca	ggtgcgcagg	caggttggcc	8580
gggcgctcca	ggccccggc	gaccaggcgt	gcaccttctt	cgatgccaat	gcggatgtac	8640
ccggtgacct	tgtcatagt	ctgctgggtg	atcatcgaa	cgacctgggt	tttcgggtcg	8700
gtcgggtcac	ctacgatcag	gcgcttggcg	cgccgcgcaa	actctgcgac	aaactgcggg	8760
tacacgcttt	cctggatgaa	gatgcggctg	ccggcgggtg	agcgcctcgc	gttcagcgag	8820
aagatggtga	acagcgcggc	gtccagcgca	cgctcaaggt	ctgcgtcttc	gaagatcagc	8880
acgggcgact	tgccgcccag	ttccatcgag	tactttttaa	ggcctgcggg	ctgcgatgatc	8940
ttcttgccgg	tgccgggtacc	gccgggtgaag	gaaatggcgc	gcacatcggg	gtggcggacc	9000
agggcatcgc	cggcggtagc	gccgtaacct	tggtatcact	tcagcaccct	gttgggggatg	9060
ccggcttcta	ccgccaggcg	gcccagttcg	ttggcgggtca	gagggcgacag	ctcgcctcatc	9120
ttcagcacgg	cgggtgttgc	cagcgcagg	cacggcgcag	tcttccaggt	agccgtcatg	9180
aacggcacgt	tccatgggct	taccaggccg	cacacaccca	ccggctggta	caggggtgtag	9240
ttgagcatct	ggtcgtcgac	cgggtaggta	tgcccgctca	tgccgctgca	cacttcggcg	9300
aagaagtcca	agttgtgcga	ggcacgcggg	atcagcacgt	tcttgggtctg	gtggatcggc	9360
aggccgggtg	cgagggtttc	cagctcggcg	agtttcggca	cgttctgctc	aatcagctca	9420
cccagcttgc	gcacagcccg	ggcacgttcc	ttggccgggg	tgttggccca	cttgggggaa	9480
gcttccttgg	ccgcagccac	agcctgggce	acttccctcg	cgccgcccgt	ggcgacttcg	9540
cagatggcgt	cgccgggtgg	cgggtttag	ttgacgaagg	tgtctttgct	ctcgacctca	9600
cggccggtga	tccagtgcct	gatcatgctg	ctcatgcctt	gttgttcttg	aagaagttag	9660
cttcgctgac	gatacgggtg	accaggcgac	cgacgccttc	cacttccacc	accacttcgt	9720
caccggcac	cacatcggcc	aggccttctg	gcgtgccggg	ggcgatcatg	tcgcccgggt	9780
gcagggatcat	gaagctggag	aagtattcga	tgaggtgcgg	gatgtcgaag	atcatgtccg	9840
cgggtggtg	ttcctgcttc	agctcaccgt	tgatccaggt	gcgcagcttc	aggttgctga	9900
cgtctggcac	atcggccgca	tcgacgatcc	acgggcccag	cggggtgggtg	gcacgcgggt	9960
ttttcaccgg	caggttgggg	cggtagtagt	tttccaggta	gtcgcgggatg	gcgtagtctg	10020

ES 2 380 530 A1

tgcacacggt gttagccgga acgtaggcca gggcgtcctc acgcttgacg ttcttcgccc 10080
 ctttgccgat caccgccacc agctcgcaact cgtagtgcac gtattcgacg ttgtccgggc 10140
 gccaggtgac ctggatgtgg ccggtgtagg tgccctggcga cttgatgaaa gccaacgggt 10200
 cgggtggcgg cgccaaggcc agctccctgg cgtggtcggc gtagttcagg cccagggcga 10260
 acatgctgcc ggtggcgggt ggcagccagg tgacctggtc ctgatggacc aggcgccgt 10320
 cggcaaggcg caggtgatcg tcttcgaccg tgacatcgct ggccctggccg tcgaactgga 10380
 tacgggcgtg tttcacagggt aattcctcac tcggcgacga tgtggttggc cagcttgccc 10440
 aggccgtcga tctcgatgtc gacgcgggca cctggctgta catcgacgcg gccctcgggg 10500
 gttccgggtg tccagatgtc gccggcgtgc agggatcatga actcgcctgat ttcggcaatc 10560
 agctgcgcca ccgtgcgtac gcagttggcg gtgttggttg gctggcgagc ttcggccgtc 10620
 acatacaggc gcaggccag ggcacggggg ttggccactt ggctggcggg caccagttca 10680
 gggccgaccg ggcaaaaacc atcacggcac ttggccttga ctgcagggcg gtagtagctg 10740
 gcttcgggca ggctcacttc gttgacgatg gtgtagcccg ccacatgctc cagggcatcg 10800
 gccacgctga cgcggctggc gtccttgcca atcaccactc ccagcgccgg gccgggttgc 10860
 acgcgctgca cgccggccgg gaataaccacc tggccttcat gctggttgcg ggtgttcggg 10920
 gctttgacga acaacaccgg cttgaccggc agttgctgtt acggtgcttc cacgaaccgc 10980
 gcttgggtgct gctgcagcaa accctggtag ttcagcgcga cgccgaacag ggtgccgctg 11040
 gcaacgtcaa gcagggcatg gctcatgctc ttctcctggc agtgcagggc ggtggccgtc 11100
 ctgcggtatt cgtaaatgtg ttaatggtat agttaatatg ttaacgatgg tcaaggggtg 11160
 gccagtggcg cctgcgggca aggcaaggca ccatgggcca tcgtcaacag ggtcaagcga 11220
 tttgagagca agcagccatg agcgaaccgg atccgatacc gaacatcaac attggccagg 11280
 tttacgacca gcgctacagc gacagcgagg tgcattacga ccggctgggc aacctggcgg 11340
 gctttttcgg gcgcaacatg ccggtgcacc ggcattgacc gtttttccag gtgcattacg 11400
 tgaagtcggg cacagtacgg gtgtatctgg atgaccagca gtacatcgag gccgggccga 11460
 tgttcttctc cacgccacc acggtggcgc acgcgttcgt caccgaagct gacagcgacg 11520
 ggcatgtgct gacggtgcgc cagcaactgg tgtggcaatt gatcgaagcc gacgccagcc 11580
 tgctgccggc gggcatgcag gtgcagccag cctgtgtggc gctgggcaac ctgccggccg 11640
 aatacaaggc cgaggcgcag cgcctgcaag gctggctgga cgcgttgagt gacgagtttg 11700
 ccacgcagca accgggtcgc gaggcggcgt tgcagtcgt gaccgcctg atcatgatca 11760
 gctgctgctg gctgtgcccc aactcgtcgg aatcgacccc ggcgcgcat gaagacctga 11820
 agatcttcca ccgtttcaat gccctgatcg aagcgcatta ccttgagcat tggccgctgg 11880
 cccgctacgc gcagcagatt ggcgtgaccg aggcacggct gaacgatgtg tgccggcgca 11940
 tcgccgactt gccatccaag cgcctggcgc tggacggct gatgcaggag gccaaagcgt 12000
 tgctgttgtt ttccggcagc acggccaacg aaatctgtta ccagctcggc ttcaaggatc 12060
 cggcctatth cagccgcttc ttcaaccgct acgccaagct cacaccggg gagtaccgcc 12120
 agcggcaggc agaattgcag tgaatggcc atggcggctc acccggtgc tgttgttgtt 12180
 tacagcggat ggtcgcagcc cgcgcgccg gcttgaatgg gttttccgtg gaacagattg 12240
 cactttccat cgtgcatgcc cttaaattcg tgaattgaga aaaagccaca ggtttgacca 12300
 tgaccaagac gcaaccttcg ctcaagctaa gcctgttgca ggcccagaaa gccgcgatgg 12360
 cttttttcag gccgctgttg aaccagcacg acctgaccga gcagcaatgg cgggtaatcc 12420
 gcatcctcaa gcagcacggc gagctggaga attatcagtt ggcggaactg gcctgcattc 12480
 tcaagccgag catgaccggg gtactggggc gcctggagcg agacgggctg gtgcccggc 12540
 agaaggccgc gcaggaccag cgacgggtgt tcgtcagcct gaccgaaaga ggggagggcgt 12600
 gctttgcctc gatgaaggaa ggcattggagg ccaactacca gaagattcag gcgcagtttg 12660
 gtgaagagaa gctgcagcag ctgatggggg tgttgaatga cctgaagcgc atcgcgccat 12720
 aa 12722



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130647

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	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 132674 A2 (BOVRIL LIMITED) 13.02.1985, resumen.	1-55
A	ES 483919 A1 (UNDERBERGER, E.) 01.09.1980, Reivindicaciones.	1-55
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.º. 1-2, páginas 1 - 10; tabla 1.	1-55

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.º:

Fecha de realización del informe
26.04.2012

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, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.04.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-55	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-55	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 dopamina 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 483919 A1 (UNDERBERGER, 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°. 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 1-55. 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.