

ÖZET**L-AMİNO ASİTLER ÜRETEN MİKROORGANİZMALAR VE L-AMİNO ASİTLERİ
BUNLARLA ÜRETMEYE YÖNELİK PROSES**

5 Mevcut buluş, bir L-amino asit üreten bir rekombinant mikroorganizma ile ve bir L-amino asidi rekombinant mikroorganizma kullanarak üretmeye yönelik bir metot ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. NfrA ve NfrB proteininden en az birinin etkisizleştirildiği, L-amino asit üreten, *Escherichia* cinsi bir rekombinant mikroorganizma.
2. 1. İstemde tanımlanan rekombinant mikroorganizma olup, burada NfrA, SEQ ID NO: 40'ın bir amino asit dizisini içerir ve NfrB ise, SEQ ID NO: 42'nin bir amino asit dizisini içerir.
3. 1. İstemde tanımlanan rekombinant mikroorganizma olup, burada ayrıca Tsx ve FhuA'dan en az biri de etkisizleştirilmektedir.
4. 3. İstemde tanımlanan rekombinant mikroorganizma olup, burada Tsx, SEQ ID NO: 45'in bir amino asit dizisini içerir ve FhuA ise, SEQ ID NO: 47'nin bir amino asit dizisini içerir.
5. 1. İstemde tanımlanan rekombinant mikroorganizma olup, burada L-amino asit; L-treonin veya L-triptofan olmaktadır.
6. 1. İstemde tanımlanan rekombinant mikroorganizma olup, burada rekombinant mikroorganizma, *Escherichia coli* olmaktadır.
7. Bir L-amino asit üretmeye yönelik bir metot olup bu metot:
- 15 1 ila 6. İstemlerin herhangi birinde tanımlanan rekombinant mikroorganizmanın kültürlenmesini; ve
bir L-amino asidin kültürden toplanmasını içerir.
8. 7. İstemde tanımlanan metot olup, burada L-amino asit; L-treonin veya L-triptofan olmaktadır.

TARİFNAME

L-AMİNO ASİTLER ÜRETEN MİKROORGANİZMALAR VE L-AMİNO ASİTLERİ BUNLARLA ÜRETMEYE YÖNELİK PROSES

Teknik Alan

- 5 Mevcut buluş, bir L-amino asit üreten bir rekombinant mikroorganizma ile ve bir L-amino asidi rekombinant mikroorganizma kullanarak üretmeye yönelik bir metot ile ilgilidir.

Önceki Teknik

- Faydalı metabolitlerin, örneğin amino asitlerin seri üretimi için mikroorganizmalar kullanılan çeşitli fermentasyon prosesleri kullanılmış ve ayrıca mikroorganizmalar kullanılarak başarılı
10 fermentasyon için suş geliştirme, fermentasyon şartlarının oluşturulması veya benzeri çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Özellikle de, faydalı metabolitlerin seri üretimi için bir konakçı suşun geliştirilmesi amacıyla, spesifik bir genin gereğinden fazla ekspresyonunu veya gereğinden az ekspresyonunu indüklemek üzere pek çok girişimde bulunulmuştur.

- Ancak bakteriler kullanın fermentatif üretiminde, faydalı metabolitlerin üretimi, fajların
15 kirlenmesi sebebiyle azaltılabilmektedir. Fajların kirlenmesi, esas olarak fajları bir bakteri yüzeyine bağlayabilen proteinler, lipid polisakkaridler, ya da benzerleri olan faj reseptörlerinden kaynaklanır. *Escherichia coli* (*E. coli*) durumunda, *E. coli*, çeşitli fajlar tarafından saldırıya uğrar ve dolayısıyla, fajların her birine yönelik reseptörlerin araştırılması, görelilik olarak başarılı olmuştur. Ancak, faj reseptörleri ve L-amino asitlerin üretimi arasındaki ilişkinin incelemesi,
20 henüz yeterince gerçekleştirilememiştir.

- Bu bakımdan mevcut buluş sahipleri, iyi bilinen faj reseptörleri olan genleri seçmekte ve akabinde, *E. coli* zafiyeti olarak görülen bir risk olarak, L-amino asit üretiminin azaltılma riskini amacıyla genlerin her birini etkisizleştirmektedir. Daha sonra, L-amino asit üretimi üzerindeki etki doğrulanmakta ve genlerin bu şekilde seçilmesi ve etkisizleştirilmesi, L-amino asit üreten
25 suşlara uygulanarak, mevcut buluşun tamamlanması sağlanmaktadır.

Buluşun Açıklaması

Teknik Problem

- Mevcut buluş, L-amino asit üretme becerisine sahip bir rekombinant mikroorganizma ve etkisizleştirilmiş bir faj reseptörü sağlamaktadır.
- 30 Mevcut buluş, bahsedilen mikroorganizma kullanılarak L-amino asit üretmeye yönelik bir metot sağlamaktadır.

Problemin Çözümü

Bir yönüne göre mevcut buluş, NfrA ve NfrB proteininden en az birinin etkisizleştirildiği bir L-amino asidi üreten bir rekombinant mikroorganizma sağlamaktadır.

Burada kullanıldığı haliyle "NrfA" terimi, bakteriyofaj N4 için bir reseptör oluşturan bir proteini ifade eder ve bakterilerin bir membran proteini olabilir. Örneğin NrfA, bir dış membran proteininin bir alt ünitesi olabilir. NfrA, örneğin SEQ ID NO: 40'ın bir amino asit dizisini ihtiva edebilir. NfrA, örneğin SEQ ID NO: 40'ın bir amino asit dizisini, ya da SEQ ID NO: 40'ın amino asit dizisi ile yaklaşık % 80 veya daha fazla, % 85 veya daha fazla, % 90 veya daha fazla, ya da % 95 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisi ihtiva edebilir. NfrA proteinini kodlayan bir gen dizisi, SEQ ID NO: 40'ın amino asit dizisini kodlayan bir polinükleotit dizisi içerebilir. NfrA proteinini kodlayan genin dizisi, örnek olarak bir *nfrA* geninin (NCBI Gen Kimliği: 12930896) bir dizisini ihtiva edebilir. Örneğin NfrA proteinini kodlayan genin dizisi, SEQ ID NO: 39'un bir polinükleotit dizisini, ya da SEQ ID NO: 39'un polinükleotit dizisi ile yaklaşık % 80 veya daha fazla, % 85 veya daha fazla, % 90 veya daha fazla, ya da % 95 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip bir polinükleotit dizisi içerebilir.

Burada kullanıldığı haliyle "NrfB" terimi, bakteriyofaj N4 için bir reseptör oluşturan bir proteini ifade eder ve bakterilerin bir membran proteini olabilir. Örneğin NfrB, bir iç membran proteininin bir alt ünitesi olabilir. NfrB, örneğin SEQ ID NO: 42'nin bir amino asit dizisini ihtiva edebilir. NfrB, örneğin SEQ ID NO: 42'nin bir amino asit dizisini, ya da SEQ ID NO: 42'nin amino asit dizisi ile yaklaşık % 80 veya daha fazla, % 85 veya daha fazla, % 90 veya daha fazla, ya da % 95 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisi içerebilir. NfrB proteinini kodlayan bir gen dizisi, SEQ ID NO: 42'nin amino asit dizisini kodlayan bir polinükleotit dizisi ihtiva edebilir. NfrB proteinini kodlayan genin dizisi, örnek olarak bir *nfrB* geninin (NCBI Gen Kimliği: 12933943) bir dizisini içerebilir. Örneğin NfrB proteinini kodlayan genin dizisi, SEQ ID NO: 41'in bir polinükleotit dizisini, ya da SEQ ID NO: 41'in polinükleotit dizisi ile yaklaşık % 80 veya daha fazla, % 85 veya daha fazla, % 90 veya daha fazla, ya da % 95 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip bir polinükleotit dizisi ihtiva edebilir.

Dahası bir L-amino asidi üreten rekombinant mikroorganizmada, Tsx ve FhuA proteininden en az biri de etkisizleştirilebilir.

Burada kullanıldığı haliyle "Tsx" terimi, bir nükleosit kanalı, yani bir nükleosit için spesifik olan bir kanalı oluşturan bir proteini ifade eder ve faj T6 ve kolisin K için bir reseptör oluşturan bir bileşen olabilir. Tsx, örneğin SEQ ID NO: 45'in bir amino asit dizisini, ya da SEQ ID NO: 45'in amino asit dizisi ile yaklaşık % 80 veya daha fazla, % 85 veya daha fazla, % 90 veya daha fazla, ya da % 95 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisi ihtiva edebilir. Tsx proteinini kodlayan bir gen dizisi, SEQ ID NO: 45'in amino asit dizisini kodlayan bir polinükleotit

dizisi içerebilir. Tsx proteinini kodlayan genin dizisi, örnek olarak bir *tsx* geninin (NCBI Gen Kimliği: 12934188) bir dizisini ihtiva edebilir. Örneğin Tsx proteinini kodlayan genin dizisi, SEQ ID NO: 44'ün bir polinükleotit dizisini, ya da SEQ ID NO: 44'ün polinükleotit dizisi ile yaklaşık % 80 veya daha fazla, % 85 veya daha fazla, % 90 veya daha fazla, ya da % 95 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip bir polinükleotit dizisi içerebilir.

Burada kullanıldığı haliyle "FhuA" terimi, bakterilerin, örneğin albomisin ve rifamisin gibi antibiyotikleri veya (Fe^{3+})ferrikrom taşıyan bir dış zarında bulunan çok fonksiyonlu bir proteini ifade eder ve fajlar T1, T5 ve phi80 için bir reseptör olabilir. FhuA, örneğin SEQ ID NO: 47'nin bir amino asit dizisini, ya da SEQ ID NO: 47'nin amino asit dizisi ile yaklaşık % 80 veya daha fazla, % 85 veya daha fazla, % 90 veya daha fazla, ya da % 95 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip bir amino asit dizisi ihtiva edebilir. FhuA proteinini kodlayan bir gen dizisi, SEQ ID NO: 47'nin amino asit dizisini kodlayan bir polinükleotit dizisi ihtiva edebilir. FhuA proteinini kodlayan genin dizisi, örnek olarak bir *fhuA* geninin (NCBI Gen Kimliği: 12930751) bir dizisini içerebilir. Örneğin FhuA proteinini kodlayan genin dizisi, SEQ ID NO: 47'nin bir polinükleotit dizisini, ya da SEQ ID NO: 47'nin polinükleotit dizisi ile yaklaşık % 80 veya daha fazla, % 85 veya daha fazla, % 90 veya daha fazla, ya da % 95 veya daha fazla dizi özdeşliğine sahip bir polinükleotit dizisi ihtiva edebilir.

Burada kullanıldığı haliyle "özdeşlik" terimi, iki amino asit dizisi arasındaki aynılığı ifade eder ve ilgili teknikte iyi bilinen bir metot ile, mesela iki amino asit dizisi arasındaki bir skor, bir özdeşlik veya benzerlik gibi parametreleri tanımlayan BLAST 2.0 algoritması ile belirlenebilir.

Burada kullanıldığı haliyle "rekombinant mikroorganizma" terimi, genetiği değiştirilmiş bir mikroorganizmayı ifade eder. Rekombinant mikroorganizma, genetiği dizayn edilmiş bir mikroorganizma olabilir ve örneğin bir eksojen nükleik asit, genetik mühendisliği yöntemlerine göre bir mikroorganizmaya sokulabilir, ya da bir mikroorganizma içerisinde bulunan bir endojen genin bir dizisi veya lokasyonu transforme edilebilir.

Burada kullanıldığı haliyle "L-amino asit" terimi, bir organizmanın gövdesini oluşturan ve aynı karbon grubuna bağlı olarak, hem bir amino grubuna hem de bir karboksilik asit grubuna sahip olan bir proteinin temel yapısal ünitesini ifade eder. Örneğin L-amino asit; L-lözin, L-fenilalanin, L-lizin, L-treonin, L-valin, L-izolözin, L-triptofan ve L-metioninden oluşan gruptan seçilebilir. Örneğin L-amino asit; L-triptofan veya L-treonin olabilir.

Burada kullanıldığı haliyle "bir enzim veya bir proteinin etkisizleştirilmesi" veya bir enzim veya bir proteinin inaktive edilmesi" ifadesi, yukarıda tarif edilen proteinin bir mikroorganizmada hiç ifade edilmediği bir duruma, yukarıda tarif edilen proteinin ifade edildiği, ancak herhangi bir aktivite göstermediği bir duruma, ya da yukarıda tarif edilen proteinin ifade edildiği, ancak aktivitesinin, intrinsik aktivite ile karşılaştırıldığında zayıf olduğu bir duruma işaret eder. Burada

kullanıldığı haliyle "intrinsik aktivite" terimi, doğal durumda bulunan bir mikroorganizmanın aktivitesine, yani bir mikroorganizmada orijinal olarak bulunan aktiviteye, ya da genetiği değiştirilmemiş olan bir proteinin aktivitesine işaret eder.

5 NfrA proteininin, NfrB proteininin, Tsx proteininin ve FhuA proteininin etkisizleştirilmesine, her biri NfrA proteinini, NfrB proteinini, Tsx proteinini ve FhuA proteinini kodlayan genlerin mutasyonu, silinmesi veya bozulması sebep olabilir. Burada kullanıldığı haliyle "genlerin mutasyonu, silinmesi, ya da bozulması" terimi, genlerin bir kısmının veya tamamının veya genlerin promotör veya terminatör bölgeleri üzerindeki regülatör faktörlerin mutasyon geçirmiş, substitüe edilmiş, silinmiş veya içerisine en az bir baz sokulmuş olduğu ve böylece genlerin 10 ifade olmadığı veya genlerin küçük bir miktarda ifade olduğu, ya da genlerin enzimatik aktivite göstermeden veya azalmış enzimatik aktivite göstererek ifade olduğu bir durumu ifade eder. Genlerin mutasyonu, silinmesi veya bozulması, örneğin homolog rekombinasyon, mutagenез veya moleküler evrim gibi genetik manipölasyon yoluyla başarılabılır. Bir hücre, aynı genlerden çok sayıda veya en az iki homolog gen içerdiğinde, bir ya da daha fazla gen hücreden silinebilir 15 veya bozulabilir. Mevcut buluşun bir yapılanmasında sağlanan genleri etkisizleştirmek amacıyla, bir lambda Red rekombinaz kullanan bir mutant üretme metodu gerçekleştirilebilir.

Rekombinant mikroorganizma, burada sağlanan proteinlerin her birinin veya proteinler kombinasyonunun aktivitesini ortadan kaldırır veya azaltır. Buna göre rekombinant mikroorganizma, proteinlerin aktivitesinin etkisizleşmemiş olduğu durum ile karşılaştırıldığında 20 L-amino asit bakımından artmış üretkenlik gösterebilir ve dolayısıyla rekombinant mikroorganizma, L-amino asit üretme amacıyla uygun şekilde kullanılabilir.

Rekombinant mikroorganizma, *Escherichia* cinsinin bir mikroorganizması olabilir ve *Escherichia* cinsinin mikroorganizması ise, örneğin KCCM11501P gibi *Escherichia coli* (*E. coli*) olabilir. KCCM11501P, bir ana suş olarak treonin üreten bir suş (KCCM10910P) kullanılarak 25 ve hem nfrA hem de nfrB genleri eksilti olarak hazırlanan bir KCCM10910PΔnfrAB suşudur. Burada, *E. coli* KCCM11501P'deki şeker tüketim kapasitesinin, ana suştakinden (KCCM10910P) daha yüksek olduğu bulunmuştur. KCCM11501P, '*E. coli* CA03-8253P' olarak adlandırılmış ve daha sonra, Budapeşte Antlaşması uyarınca 13 Aralık 2013 tarihinde Kore Mikroorganizmalar Kültür Merkezinde (buradan itibaren "KCCM" olarak anılacaktır) tevdi 30 edilmiştir.

Mevcut buluşun bir başka yönüne göre, L- amino asit üretmeye yönelik bir metot açıklanmakta olup bu metot, L-amino asidi üreten rekombinant mikroorganizmanın kültürlenmesini; ve L-amino asidin kültür ürününden toplanması içermektedir.

L-amino asidi üreten rekombinant mikroorganizma, yukarıda tarif edilen ile aynıdır.

35 L-amino asit; L-lözin, L-fenilalanin, L-lizin, L-treonin, L-valin, L-izolözin, L-triptofan ve L-

metioninden oluşan gruptan seçilebilir. Örneğin L-amino asit; L-treonin veya L-triptofan olabilir. Rekombinant mikroorganizmanın kültürlenmesi, ilgili teknikte layıkıyla bilinen uygun bir kültür ortamı ve kültür şartları ile başarılabilir. Dahası, ilgili teknikte uzman kişi bir kültür ortamını ve kültür şartlarını seçilen mikroorganizmaya uygun olarak uygun şekilde ayarlayabilir. Kültür metodu, bir kesikli kültür, bir sürekli kültür, bir yarı sürekli kültür, ya da bunların bir kombinasyonunu ihtiva edebilir.

Kültür ortamı; çeşitli karbon kaynakları, azot kaynakları ve eser element bileşenleri içerebilir.

Karbon kaynaklarının arasında, mesela karbonhidratlar, mesela glukoz, sakaroz, laktoz, fruktoz, maltoz, nişasta ve selüloz; yağlar, mesela soya yağı, ayçiçeği yağı, Hint yağı ve Hindistan cevizi yağı; yağ asitleri, mesela palmitik asit, stearik asit ve linoleik asit; alkol, örneğin gliserol ve etanol; ve organik asitler, mesela asetik asit, ya da bunların bir kombinasyonu bulunabilir. Rekombinant mikroorganizmanın kültürlenmesi, bir karbon kaynağı olarak glukoz kullanılarak gerçekleştirilebilir. Azot kaynaklarının arasında, örneğin organik azot kaynakları, mesela pepton, maya özütü, et suyu, malt özütü, mısır maserasyon sıvısı (CSL, *corn steep liquor*) ve soya unu; ve inorganik azot kaynakları, mesela üre, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum fosfat, amonyum karbonat ve amonyum nitrat; ya da bunların bir kombinasyonu bulunabilir. Kültür ortamı, bir fosfor kaynağı olarak potasyum dihidrojen fosfat veya potasyum hidrojen fosfat ihtiva edebilir. Dahası kültür ortamı, fosfor kaynağına karşılık gelen, sodyum içerikli tuzlar ve metal tuzları, mesela magnezyum sülfat veya demir sülfat içerebilir. Dahası kültür ortamı; amino asitler, vitaminler ve uygun öncüller ihtiva edebilir. Ortam veya ortamın münferit bileşenleri, kültür ortamına fasıla veya kontinü şekilde eklenebilir.

Dahası, örneğin amonyum hidroksit, potasyum hidroksit, amonyak, fosforik asit ve sülfürik asit gibi bileşikler, kültür ortamındaki pH seviyesini ayarlayacak şekilde, rekombinant mikroorganizmanın kültürlenmesi esnasında kültür ortamına uygun şekilde katılabilir. Dahası yağ asidi poliglikol ester gibi köpüklenme önleyici maddeler, rekombinant mikroorganizmanın kültürlenmesi esnasında kullanılabilir ve böylece hava kabarcıklarının üretimi baskılanır. Kültür ortamının aerobik şartlarını muhafaza etmek amacıyla oksijen veya oksijen içeren gaz (örneğin hava), kültür ortamına enjekte edilebilir. Burada kültür ortamının sıcaklığı tipik olarak yaklaşık 20°C ila yaklaşık 45°C aralığında bulunabilir. Rekombinant mikroorganizmanın kültürlendiği bir periyot, L-amino asidin arzu edilen bir miktarı elde edilene kadar devam edebilir ve örneğin rekombinant mikroorganizmanın kültürlenmesi yaklaşık 10 saat ila yaklaşık 160 saat sürebilir.

Burada kullanıldığı haliyle "kültür ürünü" terimi, rekombinant mikroorganizmayı, bir mikrobiyal hücrenin uzaklaştırılmış olduğu bir kültür süpernatantını, ya da kültür ürününün seyreltilmiş bir çözeltisini içeren bir besi kültürünü ifade eder. Kültür ortamı ayrıca L-amino asidin verimliliğini artırmak üzere bir bileşen de içerebilir. Örneğin bu bileşim, ayrıca karbon kaynakları, azot

kaynakları, ya da eser element bileşenleri ihtiva edebilir.

L-amino asidin kültür ürününden toplanması, örneğin bir kesikli kültür, bir sürekli kültür, ya da bir yarı sürekli kültür gibi ilgili teknikte bilinen uygun kültür yöntemleri ile gerçekleştirilebilir ve böylece kültür ürününde üretilen L-amino asidin toplanması veya izole edilmesi sağlanır.

5 **Buluşun Avantajlı Etkileri**

Bir yönüne göre, NfrA ve NfrB proteininden oluşan gruptan seçilen en az bir proteinin aktivitesinin ortadan kaldırılmış veya azaltılmış olduğu bir mikroorganizma, bir L-amino asidi üretmek üzere kullanılabilir. Mikroorganizmada ayrıca Tsx ve FhuA proteininden en az birisi etkisizleştirilmiş olabilmektedir.

- 10 Bir başka yönüne göre, bir L-amino asidi verimli şekilde üretmek üzere bir L-amino asidi üretme metodu kullanılabilir.

Buluşa Yönelik Usul

Buradan itibaren mevcut buluş, aşağıdaki örneklere başvurularda daha detaylı şekilde tarif edilecektir. Bu örnekler, sadece açıklama amaçlıdır ve mevcut buluşun kapsamını sınırlandırmayı amaçlamamaktadır.

15

Örnek 1. Etkisizleştirilmiş faj reseptörüne sahip, treonin üreten suşun KCCM10910P kullanılarak hazırlanması

Etkisizleştirilmiş faj reseptörüne sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanması amacıyla bir KCCM10910P suşu (Kore Patenti No: 10-0966324) bir ana suş olarak kullanıldı. Daha sonra, her bir faj reseptörü için bir geni etkisizleştirilmeye yönelik bir kaset hazırlandı ve daha sonra genetik dönüşüme izin vermek için kullanıldı.

20

1-1. Etkisizleştirilmiş *nfrA* genine sahip, treonin üreten suşun hazırlanması

Etkisizleştirilmiş bir *nfrA* genine sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanması amacıyla, bir *nfrA* genini etkisizleştirmeye yönelik bir kaset hazırlandı. Söz konusu kaset için, Datsenko KA ve ark. tarafından geliştirilen lambda Red rekombinaz ile bir mutant oluşturma tekniği olarak, tek adımlık bir etkisizleştirme metodu kullanıldı (Proc Natl Acad Sci ABD., (2000) 97: 6640-6645). Kasetin gen içerisine sokulduğunu doğrulamak üzere, bir belirteç olarak kloramfenikol-dirençli bir pUCprmflox genini kullanıldı (henüz karara bağlanmamış Kore Patent Yayını No: 2009-007554).

25

30

nfrA geninin bir dizisinin bir kısmını (SEQ ID NO: 39) ve bir pUCprmfloxC'nin kloramfenikol-dirençli genine ait bir baz dizisinin bir kısmını içeren 1.1 kb boyutunda DNA fragmanı, SEQ ID NO: 2 ve 3'ün bir primer seti kullanılarak elde edildi. Burada, bir PCR premiks kiti (yani BIONEER firmasının bir ürünü, buradan itibaren aynı ürün kullanılmıştır) kullanılarak bir

polimeraz zincir reaksiyonu (buradan itibaren "PCR" olarak anılacaktır), aşağıdaki şartlar altında gerçekleştirildi: 95°C sıcaklıkta 30 saniye denatürasyon, 56 °C sıcaklıkta 30 saniye geri sarılma (*annealing*) ve 72°C sıcaklıkta 1 dakika uzatma (x 27 döngü). PCR ürünü, % 0.8 agaroz jel üzerinde elektroforezden geçirildi ve daha sonra elüe edildi. Daha sonra PCR, bir şablon olarak, elüe edilen ürün ve SEQ ID NO: 1 ve 4'ün bir primer seti kullanılarak yukarıda tarif edilenle aynı şartlar altında yeniden gerçekleştirildi ve bu şekilde yaklaşık 1.2 kb boyutunda bir DNA fragmanı ile elde edildi. DNA fragmanı, % 0.8 agaroz jel üzerinde elektroforezden geçirildi, elüe edildi ve daha sonra, *nrfA* genini etkisizleştirmek üzere kaseti hazırlamak için kullanıldı.

10 Etkisizleştirilmiş *nrfA* genine sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanması amacıyla, Dssenko KA ve ark. tarafından geliştirilen yöntem uygun olarak, bir pKD46 plazmidi ile transforme edilen, treonin üreten bir suş (KCCM10910P) (Proc Natl Acad Sci ABD., (2000) 97: 6640-6645), bir kompetan suş olarak hazırlandı. Daha sonra, dönüşüme izin vermek üzere, *nrfA* genini etkisizleştirmek için hazırlanan kasetin DNA'sı sokuldu.

15 Elde edilen suş, kloramfenikol direnci sergileyen bir LB plakası üzerinde seçildi. Yani, genomik inaktivasyon için kasetin bir *nrfA* homolog dizisinin iki ucunun dışında yer alan bir DNA dizisine sahip olan, SEQ ID NO: 5 ve 6'nın bir primer seti kullanılarak, meydana gelen PCR ürün boyutunun 2.8 kb'den 1.5 kb'ye indirildi koloniler seçildi.

Kloramfenikol direncine sahip primer rekombinant suş, pKD46 plazmidinden çıkarıldı ve daha sonra, kloramfenikol belirteç genini mikrobiyal hücrelerden uzaklaştırmak üzere bir pJW168 plazmidi ile sokuldu (Gene, (2000) 247,255-264). Daha sonra, 0.4 kb boyutunda DNA ürünü elde etmek üzere, SEQ ID NO: 5 ve 6'nın bir primer seti kullanılan PCR gerçekleştirildi, ki bu durum ise, elde edilen suşun, azalmış bir DNA boyutuna sahip olduğunu gösterdi. Böylece, etkisizleştirilmiş *nrfA* genine sahip, L-treonin üreten suş (KCCM10910PΔ*nrfA*) hazırlandı.

25 **1-2. Etkisizleştirilmiş *nrfB* genine sahip, treonin üreten suşun hazırlanması**

Etkisizleştirilmiş bir *nrfB* genine (SEQ ID NO: 41) sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanması amacıyla, bir *nrfB* genini etkisizleştirmeye yönelik bir kaset, Örnek 1 kapsamında *nrfA* genini etkisizleştirmeye yönelik kasetin hazırlanması ile aynı şekilde hazırlandı. 1.1 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 8 ve 9'un bir primer seti kullanılarak elde edildi ve daha sonra 1.2 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 7 ve 10'un bir primer seti kullanılarak hazırlandı.

Etkisizleştirilmiş *nrfB* genine sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanmasına yönelik bir metot, Örnek 1-1 kapsamında tarif edilen metodun aynı ile gerçekleştirildi ve burada, meydana gelen PCR ürün boyutunu teyit etmek üzere, SEQ ID NO: 11 ve 12'nin bir primer seti kullanıldı. Böylece, etkisizleştirilmiş *nrfB* genine sahip, L-treonin üreten suş (KCCM10910PΔ*nrfB*) hazırlandı.

1-3. Etkisizleştirilmiş *nfrAB* genine sahip, treonin üreten suşun hazırlanması

Etkisizleştirilmiş bir *nfrAB* genine (SEQ ID NO: 43) sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanması amacıyla, bir *nfrAB* genini etkisizleştirmeye yönelik bir kaset, Örnek 1 kapsamında *nfrA* genini etkisizleştirmeye yönelik kasetin hazırlanması ile aynı şekilde hazırlandı. 1.1 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 2 ve 9'un bir primer seti kullanılarak elde edildi ve daha sonra 1.2 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 1 ve 10'un bir primer seti kullanılarak hazırlandı.

Etkisizleştirilmiş *nfrAB* genine sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanmasına yönelik bir metot, Örnek 1-1 kapsamında tarif edilen metodun aynı ile gerçekleştirildi ve burada, meydana gelen PCR ürün boyutunu teyit etmek üzere, SEQ ID NO: 5 ve 12'nin bir primer seti kullanıldı. Böylece, etkisizleştirilmiş *nfrAB* genine sahip, L-treonin üreten suş (KCCM10910PΔ*nfrAB*) hazırlandı.

1-4. Etkisizleştirilmiş *tsx* genine sahip, treonin üreten suşun hazırlanması

Etkisizleştirilmiş bir *tsx* genine (SEQ ID NO: 44) sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanması amacıyla, bir *tsx* genini etkisizleştirmeye yönelik bir kaset, Örnek 1 kapsamında *nfrA* genini etkisizleştirmeye yönelik kasetin hazırlanması ile aynı şekilde hazırlandı. 1.1 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 13 ve 14'ün bir primer seti kullanılarak elde edildi ve daha sonra 1.2 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 15 ve 16'nın bir primer seti kullanılarak hazırlandı.

Etkisizleştirilmiş *tsx* genine sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanmasına yönelik bir metot, Örnek 1-1 kapsamında tarif edilen metodun aynı ile gerçekleştirildi ve burada, meydana gelen PCR ürün boyutunu teyit etmek üzere, SEQ ID NO: 17 ve 18'in bir primer seti kullanıldı. Böylece nihayetinde, etkisizleştirilmiş *tsx* genine sahip, L-treonin üreten suş (KCCM10910PΔ*tsx*) hazırlandı.

1-5. Etkisizleştirilmiş *fhuA* genine sahip, treonin üreten suşun hazırlanması

Etkisizleştirilmiş bir *fhuA* genine (SEQ ID NO: 46) sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanması amacıyla, bir *fhuA* genini etkisizleştirmeye yönelik bir kaset, yukarıda tarif edilen tek adımlı etkisizleştirme metoduna uygun olarak hazırlandı. *fhuA* geninin bir dizisi ile homoloji sergileyen bir baz dizisine sahip bir DNA fragmanı elde etmek amacıyla, SEQ ID NO: 19 ve 20'nin bir primer seti ve SEQ ID NO: 21 ve 22'nin bir primer seti kullanıldı ve bu şekilde PCR ürünleri üretildi. Dahası, kloramfenikol direnci sergileyen bir baz dizisine sahip bir DNA fragmanı elde etmek amacıyla, SEQ ID NO: 23 ve 24'ün bir primer seti kullanılmış ve bu şekilde bir PCR ürünü üretildi. Buna göre, meydana gelen bu üç PCR ürünü, % 0.8 agaroz jel üzerinde elektroforezden geçirildi ve daha sonra elüe edildi. *fhuA* genini etkisizleştirmeye yönelik bir kaset hazırlamak üzere, şablon olarak, elüe olan bu üç PCR ürünü ve SEQ ID NO: 19 ve 22'nin bir primer seti kullanılarak PCR gerçekleştirildi.

Etkisizleştirilmiş *fhuA* genine sahip, treonin üreten bir suş hazırlamak amacıyla, *fhuA* genini etkisizleştirmeye yönelik kaset, Örnek 1-1 kapsamında tarif edilen metodun aynı ile hazırlandı ve burada, meydana gelen PCR ürünlerinin boyutunu teyit etmek üzere, SEQ ID NO: 25 ve 26'nın bir primer seti kullanıldı. Böylece nihayetinde, etkisizleştirilmiş *fhuA* genine sahip, L-treonin üreten suş (KCCM10910PΔ*fhuA*) hazırlandı.

1-6. Etkisizleştirilmiş *lamB* genine sahip, treonin üreten suşun hazırlanması

Etkisizleştirilmiş bir *lamB* genine (SEQ ID NO: 48) sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanması amacıyla, bir *lamB* genini etkisizleştirmeye yönelik bir kaset, Örnek 1-1 kapsamında tarif edilen metodun aynı ile hazırlandı. 1.1 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 27 ve 28'ün bir primer seti kullanılarak elde edildi ve daha sonra 1.2 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 29 ve 30'nın bir primer seti kullanılarak hazırlandı.

Etkisizleştirilmiş *lamB* genine sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanmasına yönelik bir metot, Örnek 1-1 kapsamında tarif edilen metodun aynı ile gerçekleştirildi ve burada, meydana gelen PCR ürün boyutunu teyit etmek üzere, SEQ ID NO: 31 ve 32'nin bir primer seti kullanıldı. Böylece nihayetinde, etkisizleştirilmiş *lamB* genine sahip, L-treonin üreten suş (KCCM10910PΔ*lamB*) hazırlandı.

1-7. Etkisizleştirilmiş *btuB* genine sahip, treonin üreten suşun hazırlanması

Etkisizleştirilmiş bir *btuB* genine (SEQ ID NO: 50) sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanması amacıyla, bir *btuB* genini etkisizleştirmeye yönelik bir kaset, Örnek 1-1 kapsamında tarif edilen metodun aynı ile hazırlandı. 1.1 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 33 ve 34'ün bir primer seti kullanılarak elde edildi ve daha sonra 1.2 kb DNA fragmanı, SEQ ID NO: 35 ve 36'nın bir primer seti kullanılarak hazırlandı.

Etkisizleştirilmiş *btuB* genine sahip, treonin üreten bir suşun hazırlanmasına yönelik bir metot, Örnek 1-1 kapsamında tarif edilen metodun aynı ile gerçekleştirildi ve burada, meydana gelen PCR ürün boyutunu teyit etmek üzere, SEQ ID NO: 37 ve 38'in bir primer seti kullanıldı. Böylece nihayetinde, etkisizleştirilmiş *btuB* genine sahip, L-treonin üreten suş (KCCM10910PΔ*btuB*) hazırlandı.

Örnek 2. Rekombinant mikroorganizmalar arasında L-treonin verimliliğinin karşılaştırılması

Örnek 1'e uygun olarak hazırlanan rekombinant mikroorganizmalar, bir Erlenmeyer şişesi içerisinde, aşağıdaki Tablo 1 içerisinde gösterilen bileşimleri içeren bir treonin titre ortamında yetiştirildi. Daha sonra, rekombinant mikroorganizmaların L-treonin üretme becerisine sahip olup olmadığı doğrulandı.

Tablo 1

Bileşim	Konsantrasyon (/ litre)
Glukoz	70 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	27,5 g
MgSO ₄ .H ₂ O	1 g
FeSO ₄ .H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	5 mg
DL-metionin	0,15 g
Maya özütü	2 g
Kalsiyum karbonat	30 g
pH	6.8

Örnek 1 kapsamındaki *E. coli* suşlarının 7 tipinden her birinin 1 platin ilmeği ve 33°C sıcaklıkta bir inkübatör içerisinde LB katı ortamında gece boyu kültürlen KCCM10910P suşu, yukarıdaki Tablo 1 içerisinde gösterilen bileşimleri içeren 25 ml'lik bir titre ortamına aşılandı ve daha sonra bir inkübatörde 33°C'de ve 200 rpm hızın da 48 saat kültürlendi.

Tablo 2

Suş	Şeker tüketimi (g/L)	L-treonin (g/L)
	30 saat	48 saat
KCCM 10910P (ana suş)	22	34.5
KCCM 10910PΔ <i>nfrA</i>	26	34.5
KCCM 10910PΔ <i>nfrB</i>	26	34.4
KCCM 10910PΔ <i>nfrAB</i>	26	34.4
KCCM 10910PΔ <i>tsx</i>	25	34.4
KCCM 10910PΔ <i>fhuA</i>	24	34.5
KCCM 10910PΔ <i>lamB</i>	20	34.5
KCCM 10910PΔ <i>btuB</i>	21	34.5

Yukarıdaki Tablo 2 içerisinde gösterildiği üzere, her biri etkisizleştirilmiş *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* ve *fhuA* genlerine sahip suşların şeker tüketim oranlarının, ana suşun (KCCM10910P) şeker tüketim oranından daha yüksek olduğu teyit edildi. Suşların üretim oranının 48 saatlik bir süre esnasında azalmadığı da teyit edildi. Bu arada, her biri etkisizleştirilmiş *lamB* ve *btuB* genlerine sahip suşların şeker tüketim oranlarının, ana suşun şeker tüketim oranına benzer olduğu, ya

da ana suşun şeker tüketim oranından biraz daha düşük olduğu doğrulandı. 48 saat geçtikten sonra, kültürün suşlarında görülen L-treonin konsantrasyonlarının tamamının benzer olduğu da doğrulandı. Her biri etkisizleştirilmiş *nfrA*, *nfrB* ve *nfrAB* genlerine sahip suşlar, aynı kültürleme sonuçlarını verdi. Yani, iki genden birinin silindiği durum ve her iki genin silindiği durum, aynı sonuçları verdi.

Örnek 3. Etkin mutasyon kombinasyonuna sahip suşların hazırlanması ve bunların L-treonin üretme kapasitelerinin karşılaştırılması

3-1. Hem etkisizleştirilmiş *nfrAB* hem de etkisizleştirilmiş *fhuA* genlerine sahip suşların, hem etkisizleştirilmiş *nfrAB* hem de etkisizleştirilmiş *tsx* genlerine sahip suşların ve hem etkisizleştirilmiş *nfrAB*, etkisizleştirilmiş *tsx*, hem de etkisizleştirilmiş *fhuA* genlerine sahip suşların hazırlanması

Artmış şeker tüketim kapasitesi sergilediği üzere, *nfrAB*, *fhuA* ve *tsx* genlerinin birlikte etkisizleştirildiği durumun, L-treonin üreten suşlarda başka şeker tüketim kapasitesi gösterip göstermediğini doğrulamak amacıyla, bir KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*fhuA* suşu, bir KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx* suşu ve bir KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx*Δ*fhuA* suşu hazırlandı. Bu suşların hazırlanması amacıyla, her biri etkisizleştirilmiş *fhuA* ve *tsx* genlerine sahip suşlar, Örnek 1 içerisinde tarif edilenle aynı şekilde, Örnek 1-3'ün KCCM10910PΔ*nfrAB* suşu ile uygun şekilde hazırlandı (bu şekilde KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*fhuA* ve KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx* suşları elde edildi). Dahası, etkisizleştirilmiş *fhuA* genine sahip bir suş, KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx* suşuna uygun olarak hazırlandı ve böylece son olarak bir KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx*Δ*fhuA* suşu hazırlandı.

Tablo 2 içerisinde gösterildiği üzere etkisizleştirilmiş *nfrA*, *nfrB* ve *nfrAB* genlerine sahip suşların, birbirleri ile aynı etkilere sahip olduğu belirlendi. Bu bakımdan etkin mutasyon kombinasyonlarına sahip suşların hazırlanmasında, etkisizleştirilmiş *tsx* ve *fhuA* genlerine sahip suşlar, etkisizleştirilmiş *nfrAB* genine sahip suş kullanılarak hazırlandı. Ancak, etkisizleştirilmiş *tsx* ve *fhuA* genlerine sahip suşların etkilerinin, sadece etkisizleştirilmiş *nfrA* genine, sadece etkisizleştirilmiş *nfrB* genine, ya da eş zamanlı olarak etkisizleştirilmiş *nfrA* ve *nfrB* genlerine sahip suşun etkileri ile aynı olduğu belirlendi.

3-2. Etkin mutasyon kombinasyonlarına sahip suşların L-treonin üretme kapasitesinin karşılaştırılması

Yukarıda hazırlanan etkin mutasyon kombinasyonlarına sahip suşların L-treonin üretme kapasitesini karşılaştırmak amacıyla, yukarıda Tablo 1 içerisinde gösterilen bileşimleri içeren bir ortam, suşları yukarıda tarif edilenle aynı şekilde kültürlemek üzere kullanıldı. Sonuçlar aşağıdaki Tablo 3 içerisinde gösterilir.

Suş	Şeker tüketimi (g/L)	L-treonin (g/L)
	30 saat	48 saat
KCCM10910P (ana suş)	22	34.5
KCCM10910P Δ <i>nfrAB</i>	26	34.4
KCCM10910P Δ <i>nfrAB</i> Δ <i>fhuA</i>	28	34.5
KCCM10910P Δ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i>	28	34.4
KCCM10910P Δ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i> Δ <i>fhuA</i>	29	34.5

Her biri, *nfrAB*, *fhuA* ve *tsx* genlerinin birlikte etkisizleştirilerek hazırlandığı, artmış şeker tüketim kapasitesine sahip KCCM10910P Δ *nfrAB* Δ *fhuA* suşu, KCCM10910P Δ *nfrAB* Δ *tsx* suşu ve KCCM10910P Δ *nfrAB* Δ *tsx* Δ *fhuA* suşu üzerindeki etkinlik testinin bir sonucu olarak, sadece *nfrAB* geni ile mutasyona ilave olarak ayrıca *fhuA* geni veya *tsx* geninin de etkisizleştirilmiş olduğu suşun, şeker tüketim kapasitesini artırdığı doğrulandı. Buna göre, artmış şeker tüketim kapasitesi gösteren dönüşmüş KCCM10910P Δ *nfrAB* suşu, *E. coli* CA03-8253P 'olarak adlandırıldı ve daha sonra, 13 Aralık 2013 tarihinde Kore Mikroorganizmalar Kültür Merkezine (KCCM) tevdi edildi (Erişim No: KCCM 11501P).

10 Örnek 4. Etkisizleştirilmiş faj reseptörüne sahip suşun, KCCM-10132 kullanılarak hazırlanması ve treonin üretme kapasitesi bakımından karşılaştırılması

4-1. Etkisizleştirilmiş faj reseptörüne sahip suşun, KCCM-10132 kullanılarak hazırlanması

Her biri etkisizleştirilmiş bir faj reseptörüne sahip 10 tip suş, Örnek 1'deki etkisizleştirme kasetlerinin 7 tipine uygun olarak, Örnek 1 ve 3 içerisinde tarif edilenle aynı şekilde bir KCCM-10132 suşu (bkz. aşağıdaki Tablo 4) kullanılarak hazırlandı. KCCM-10132 suşu, Kore Patenti No: 10-0270510 içerisinde *E. coli*den türetilen, treonin üretme becerisine sahip bir suş olarak açıklanır.

4-2. Etkisizleştirilmiş faj reseptörüne sahip suşun, KCCM-10132 kullanılarak hazırlanması ve treonin üretme kapasitesi bakımından karşılaştırılması

Her biri, Örnek 4-1'in KCCM-10132 suşu kullanılarak hazırlanan, etkisizleşmiş faj reseptörüne sahip 10 tip suş ve ana suş (KCCM-10132), Tablo 1 içerisinde gösterilen bileşimleri içeren bir ortamda, Örnek 2 içerisinde tarif edilen aynı metot ile kültürlendi. Daha sonra kültürlenen suşlar, bunların treonin üretme kapasiteleri karşılaştırılarak değerlendirildi.

Tablo 4

Suş	Şeker tüketimi (g/L)	L-treonin (g/L)
	30 saat	48 saat
KCCM-10132 (ana suş)	32	20.2
KCCM-10132 $\Delta nfrA$	35	20.2
KCCM-10132 $\Delta nfrB$	35	20.1
KCCM-10132 $\Delta nfrAB$	36	20.2
KCCM-10132 Δtsx	35	20.2
KCCM-10132 $\Delta fhuA$	36	20.1
KCCM-10132 $\Delta lamB$	31	20.2
KCCM-10132 $\Delta btuB$	30	20.1
KCCM-10132 $\Delta nfrAB\Delta fhuA$	38	20.2
KCCM-10132 $\Delta nfrAB\Delta tsx$	38	20.1
KCCM-10132 $\Delta nfrAB\Delta tsx\Delta fhuA$	39	20.2

Yukarıdaki Tablo 4 içerisinde gösterildiği üzere, her biri etkisizleştirilmiş *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* ve *fhuA* genlerine sahip suşların şeker tüketim oranlarının, ana suşun (KCCM-10132) şeker tüketim oranından daha yüksek olduğu teyit edildi. Suşların üretim oranının 48 saatlik bir süre esnasında azalmadığı da teyit edildi. Bu arada, her biri etkisizleştirilmiş *lamB* ve *btuB* genlerine sahip suşların şeker tüketim oranlarının, ana suşun şeker tüketim oranına benzer olduğu, ya da ana suşun şeker tüketim oranından biraz daha düşük olduğu doğrulandı. 48 saat geçtikten sonra, kültürün suşlarında görülen L-treonin konsantrasyonlarının tamamının benzer olduğu da doğrulandı. Aynı anda etkisizleştirilmiş *nfrAB*, *fhuA*, *nfrAB* ve *tsx* genlerine ve aynı anda etkisizleştirilmiş *nfrAB*, *tsx* ve *fhuA* genlerine sahip suşların, sadece etkisizleştirilmiş *nfrAB* genine sahip suşun şeker tüketim oranı ile karşılaştırıldığında, iyileşmiş şeker tüketim oranlarına sahip olduğu da teyit edildi.

Örnek 5. Etkisizleştirilmiş faj reseptörüne sahip suşun, KCCM11166P kullanılarak hazırlanması ve treonin üretme kapasitesi bakımından karşılaştırılması

5.1. Etkisizleştirilmiş faj reseptörüne sahip suşun, KCCM11166P kullanılarak hazırlanması

Her biri etkisizleştirilmiş bir faj reseptörüne sahip, triptofan üreten 7 tip suş, Örnek 1'deki etkisizleştirme kasetlerinin 7 tipine uygun olarak, Örnek 1 içerisinde tarif edilenle aynı şekilde bir KCCM11166P suşu (Kore Patenti No: 10-1261147) kullanılarak hazırlandı.

5-2. Etkisizleştirilmiş faj reseptörüne sahip suşun, KCCM11166P kullanılarak hazırlanması ve treonin üretme kapasitesi bakımından karşılaştırılması

Her biri, Örnek 5-1'in KCCM11166P suşu kullanılarak hazırlanan, etkisizleştirilmiş faj reseptörüne sahip, triptofan üreten 7 tip suşun üretkenliğini değerlendirmek amacıyla, aşağıdaki Tablo 5'te gösterilen bileşimleri içeren bir ortam kullanıldı. Yani mikrobiyal hücreler, bir platin ilmek ile aşılandı ve daha sonra, LB katı ortamında gece boyu kültürlendi. Daha sonra, mikrobiyal hücrelerden her birinin 1 platin ilmeği, aşağıdaki Tablo 5 içerisinde gösterilen bileşimleri ihtiva eden 25 ml titre ortamı içine aşılandı ve daha sonra, bir inkübatörde 37°C'de ve 200 rpm'de 48 saat kültürlendi. Buradan elde edilen sonuçlar, aşağıdaki Tablo 6 içerisinde gösterilir.

Tablo 5

Bileşim	Konsantrasyon (/ litre)
Glukoz	60 g
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
MgSO ₄ .H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
Sodyum sitrat	5g
Maya özütü	2 g
Kalsiyum karbonat	40 g
Fenilalanin	0.15 g
Tirosin	0.1 g
pH	6.8

Tablo 6

Suş	Şeker tüketimi (g/L)	OD	L-triptofan (g/L)
	33 saat	48 saat	
KCCM11166P	56.8	14.0	7.2
KCCM11166PΔ <i>nfrA</i>	59.5	13.5	7.2
KCCM11166PΔ <i>nfrB</i>	59.5	13.5	7.2
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i>	59.5	13.5	7.2
KCCM11166PΔ <i>tsx</i>	60.2	14.3	7.1
KCCM11166PΔ <i>fhuA</i>	59.5	13.7	7.1
KCCM11166PΔ <i>lamB</i>	57.0	14.0	7.2

Suş	şeker tüketimi (g/L)	OD	L-triptofan (g/L)
	33 saat		48 saat
KCCM11166PΔ <i>btuB</i>	56.2	13.0	7.1

Yukarıdaki Tablo 6 içerisinde gösterildiğı üzere, *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* ve *fhuA* genlerinden her birinin silinmesi durumunda, her biri etkisizleştirilmiş *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* ve *fhuA* genlerine sahip suşlarda üretilen triptofan miktarları benzer olur iken, her biri etkisizleştirilmiş *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* ve *fhuA* genlerine sahip suşların şeker tüketim oranının, diğerklerine göre biraz daha yüksek olduğı doğrulandı. Diğerk taraftan, *lamB* ve *btuB* genlerinden her birinin silinmesi durumunda, her biri etkisizleştirilmiş *lamB* ve *btuB* genlerine sahip suşlar tarafından üretilen triptofan miktarlarının veya her biri etkisizleştirilmiş *lamB* ve *btuB* genlerine sahip suşların şeker tüketim oranlarının değışmediğı de doğrulandı.

10 Örnek 6. Etkin mutasyon kombinasyonuna sahip suşların hazırlanması ve bunların L-treonin üretme kapasitelerinin karşılaştırılması

15 6-1. Hem etkisizleştirilmiş *nfrAB* hem de etkisizleştirilmiş *fhuA* genlerine sahip suşların, hem etkisizleştirilmiş *nfrAB* hem de etkisizleştirilmiş *tsx* genlerine sahip suşların ve hem etkisizleştirilmiş *nfrAB*, etkisizleştirilmiş *tsx*, hem de etkisizleştirilmiş *fhuA* genlerine sahip suşların hazırlanması

Artmış şeker tüketim kapasitesi sergilediğı üzere, *nfrAB*, *fhuA* ve *tsx* genlerinin birlikte etkisizleştirildiğı durumun, triptofan üreten suşlarda ayrıca şeker tüketim kapasitesi gösterip göstermediğini doğrulamak amacıyla, bir KCCM11166PΔ*nfrAB*Δ*fhuA* suşu, bir KCCM11166PΔ*nfrAB*Δ*tsx* suşu ve bir KCCM11166PΔ*nfrAB*Δ*tsx*Δ*fhuA* suşu hazırlandı.

20 6-2. Etkin mutasyon kombinasyonuna sahip suşların L-triptofan üretme kapasitesinin karşılaştırılması

Örnek 6-1'e göre hazırlanan üç tip suşun L-triptofan üretme kapasitesini karşılaştırmak amacıyla, yukarıda Tablo 5 içerisinde gösterilen bileşimleri içeren bir ortam, suşları Örnek 5 içerisinde tarif edilenle aynı şekilde kültürlemek için kullanıldı. Sonuçlar aşağıdaki Tablo 7

25 içerisinde gösterilir.

Tablo 7

Suş	şeker tüketimi (g/L)	OD	L-triptofan (g/L)
	33 saat		48 saat
KCCM11166P terimi	56.8	14.0	7.2

Suş	şeker tüketimi (g/L)	OD	L-triptofan (g/L)
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i>	59.5	13.5	7.2
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i>	61.0	14.0	7.2
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i> Δ <i>fhuA</i>	60.5	13.8	7.1
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i> Δ <i>fhuA</i>	62.0	14.0	7.2

Etkin mutasyon kombinasyonlarına sahip, triptofan üreten suşlar üzerindeki bir etkinlik testinin bir sonucu olarak, *fhuA* geninin ve/veya *tsx* geninin, sadece *nfrAB* geni ile mutasyona ilave olarak ayrıca etkisizleştirilmiş olduğu suşların şeker tüketim kapasitesini artırdığı doğrulandı.

5 Erişim numarası

Tevdi edilen kurum: Kore Mikroorganizmalar Kùltür Merkezi (uluslararası)

Erişim numarası: KCCM11501P

Tevdi tarihi: 13 Aralık 2013

PATENT İŞLEMLERİ AMACIYLA MİKROORGANİZMALARIN
SAKLANMASININ ULUSLARARASI TANINMASINA DAİR
BUDAPEŞTE ANLAŞMASI
ULUSLARARASI FORM

Kime:

CJ CheilJedang Corporation CJ
CJJEIJEDANG CENTER, 330,
DONGHO-RO, JUNG-GU,
SEOUL 100-400, KORE
CUMHURİYETİ

Madde 7 gereği düzenlenmiş belge aslının bu
sayfanın altında belirtilen ULUSLARARASI TEVDİ
MAKAMI tarafından alındısı

I. MİKROORGANİZMANIN KİMLİĞİ	
TEVDİ EDEN tarafından verilen kimlik referansı : <i>Escherichia coli</i> CA03-8253P	ULUSLARARASI TEVDİ MAKAMI tarafından verilen erişim numarası: KCCM11501P
II. BİLİMSEL TANIM VE/VEYA ÖNERİLEN TAKSONOMİK ADLANDIRMA	
Yukarıda I. altında tanımlanan mikroorganizmanın eşliğinde aşağıdakiler de sunulmuştur: ☐ bir bilimsel tanım ☐ önerilen bir taksonomik adlandırma (Geçerli olması halinde çarpı alınır)	
III. ALINDI VE KABUL	
Uluslararası Tevdi Makamı, kendi tarafından alınan, yukarıda I. altında tanımlanan mikroorganizmayı kabul etmektedir. 13 Aralık 2013. (ilk tevdi tarihi) ¹	
IV. ULUSLARARASI TEVDİ MAKAMI	
Adı : Kore Mikroorganizmalar Kültür Merkezi Adres : Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Kore Cumhuriyeti	Uluslararası Tevdi Makamını temsil etme yetkisi olan şahsın / şahsının veya yetkili memurun / memurların imzası / imzaları : Tarih : 13 Aralık 2013.

¹ Madde 6.4(d) geçerli olduğunda bu tarih, uluslararası tevdi makamının durumunun iktisap ettiği tarihtir; uluslararası tevdi makamının durumunun iktisabından sonra Budapeşte Anlaşması dışında yapılan bir tevдинin Budapeşte Anlaşması gereği bir tevdiye dönüşmesi durumunda bu tarih, mikroorganizmanın uluslararası tevdi makamı tarafından alındığı tarihe tekbül eder.

Form BP/4

Tek sayfa

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> L-Amino Asitler Üreten Mikroorganizmalar ve Üretim Prosesi

<130> PX048447

<150> KR 2014/033697

<151> 2014-03-21

<160> 51

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 5
 <220>
 <223> nfrA inaktivitesi için primer
 <400> 1
 10 atgaaggaga ataaccttaa tcgcgtcatc ggatggctcg gtttactgct gacgtcttta 60
 ttgagtacca 70
 <210> 2
 15 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 20 <223> nfrA inaktivitesi için primer
 <400> 2
 gacgtcttta ttgagtacca gcgcactcgc agacaatatc ggcaccagcg taggtgacac 60
 25 tatagaacgc g 71
 <210> 3
 <211> 70
 <212> DNA
 30 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> nfrA inaktivitesi için primer
 35 <400> 3
 aaccgttcgg gtgccattcg tcgctgtatt tgccgccatt aaagaatgag tagtggatct 60
 gatgggtacc 70
 40 <210> 4
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 45 <220>
 <223> nfrA inaktivitesi için primer
 <400> 4
 50 **gcggatatat tgcgccgcac cgaggtacag gttttgggca aaccagcctg aaccgttcgg 60**
gtgccattcg 70
 55 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> nfrA inaktivitesi için primer

<400> 5

5 cgcgctcctga caattcaacg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> nfrA inaktivitesi için primer

<400> 6

15 cgttgtcctg aacgtgagcg 20

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

20 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> nfrB inaktivitesi için primer

<400> 7

25

30 **gtggactggc ttcttgatgt ttttgctacc tggtctctacg gcttaaaagt aatcgcgata 60****acgttagcgg 70**

<210> 8

<211> 70

<212> DNA

35 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> nfrB inaktivitesi için primer

<400> 8

40

45 **aatcgcgata acgttagcgg tcatcatgtt catcagcggg ctggacgatt taggtgacac 60****tatagaacgc 70**

<210> 9

<211> 70

<212> DNA

50 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> nfrB inaktivitesi için primer

<400> 9

55

aacctgcttt gagtaatagt gattgcacg aaacttgtaa ttcgcgttga tagtggatct 60

gatgggtacc 70

5

<210> 10
<211> 70
<212> DNA
<213> Yapay Dizi

10

<220>
<223> nfrB inaktivitesi için primer

15

<400> 10

ttattctctc tcattttcgg actccagttg cgcaacctgt tctgtgttta aaacctgcttt 60

gagtaatagt 70

20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Yapay Dizi

25

<220>
<223> nfrB inaktivitesi için primer

30

<400> 11
caatagtcac acctattaat 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Yapay Dizi

35

<220>
<223> nfrB inaktivitesi için primer

40

<400> 12
ccccagctct tctgcgtgg 20

<210> 13
<211> 70
<212> DNA
<213> Yapay Dizi

45

<220>
<223> tsx inaktivitesi için primer

50

<400> 13

ggcgctctct tcgtctttta ctgtcaacgc agctgaaaac gacaaaccgc tagtggatct 60

55

gatgggtacc 70

<210> 14

	<211> 70		
	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		
5	<220>		
	<223> tsx inaktivitesi için primer		
	<400> 14		
10	cggtgaagtt gccgttgccg aagttcagtt ctgcacgtc gtccactga taggtgacac	60	
	tatagaacgc	70	
15	<210> 15		
	<211> 70		
	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		
20	<220>		
	<223> tsx inaktivitesi için primer		
	<400> 15		
25	aacagtggca tacatatgaa aaaaacatta ctggcagccg gtgcggtact ggcgctctct	60	
	tcgtctttta	70	
30	<210> 16		
	<211> 70		
	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		
35	<220>		
	<223> tsx inaktivitesi için primer		
	<400> 16		
40	tcagaagttg taacctacta ccaggttaacc accccagccg gtagagcgaa cggtgaagtt	60	
	gccgttgccg	70	
45	<210> 17		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		
50	<220>		
	<223> tsx inaktivitesi için primer		
	<400> 17		
	ttttataata ggctcctctg	20	
55	<210> 18		
	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		

<220>
 <223> tsx inaktivitesi için primer

 <400> 18
 gccggacaaa gcgtttac 18

 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi

 <220>
 <223> fhuA inaktivitesi için primer

 <400> 19
 atggcgcgtt ccaaaactgc t 21

 <210> 20
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi

 <220>
 <223> fhuA inaktivitesi için primer

 <400> 20
 cgcgttctat agtgtcacct cgtgtagcta agcgcctctt 40

 <210> 21
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi

 <220>
 <223> fhuA inaktivitesi için primer

 <400> 21
 ggtacccatc agatccacta ctgcgtgtg ggctgactac 40

 <210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi

 <220>
 <223> fhuA inaktivitesi için primer

 <400> 22
 ttagaaacgg aaggttgcgg t 21

 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi

 <220>
 <223> fhuA inaktivitesi için primer

	<400> 23		
	gccgccagct gaagctttac c	21	
5	<210> 24		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		
10	<220>		
	<223> fhuA inaktivitesi için primer		
	<400> 24		
	tagtggatct gatgggtacc	20	
15	<210> 25		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		
20	<220>		
	<223> fhuA inaktivitesi için primer		
25	<400> 25		
	cttcaggaac gctcagattg c	21	
	<210> 26		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> Yapay Dizi		
30	<220>		
	<223> fhuA inaktivitesi için primer		
35	<400> 26		
	cggaatgatt cgtgtattcc t	21	
	<210> 27		
	<211> 70		
	<212> DNA		
40	<213> Yapay Dizi		
	<220>		
	<223> lamB inaktivitesi için primer		
45	<400> 27		
	acgaccgaag ctgccgccgt tgaaatcagc aggaacggct ttgccgaagt tagtggatct	60	
50	gatgggtacc	70	
	<210> 28		
	<211> 71		
	<212> DNA		
55	<213> Yapay Dizi		
	<220>		
	<223> lamB inaktivitesi için primer		

<400> 28

5 gtaatgtctg ctccaggcaat ggctgttgat ttccacggct atgcacgttc taggtgacac 60
tatagaacgc g 71

<210> 29

<211> 71

10 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> lamB inaktivitesi için primer

<400> 29

20 ttaccaccag atttccatct gggcaccgaa ggtccactcg tcgctgtcgc caccaccgaa 60
gctgccgcgc t 71

<210> 30

<211> 71

25 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

30 <223> lamB inaktivitesi için primer

<400> 30

35 atgatgatta ctctgcgcaa acctccctctg gcgggttgccg tcgcagcggg cgtaatgtct 60
gctcaggcaa t 71

<210> 31

<211> 20

40 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

45 <223> lamB inaktivitesi için primer

<400> 31

cctacatttg acagccgttg 20

<210> 32

<211> 20

50 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

55 <223> lamB inaktivitesi için primer

<400> 32

cacacaaagc ctgtcacagg 20

5	<210> 33 <211> 70 <212> DNA <213> Yapay Dizi	
	<220> <223> btuB inaktivitesi için primer	
10	<400> 33	
	gtgggttcaga aggtgtagct gccagacaag gtgtattccc gtcctgcagt tagtggatct	60
	gatgggtacc	70
15	<210> 34 <211> 70 <212> DNA <213> Yapay Dizi	
20	<220> <223> btuB inaktivitesi için primer	
25	<400> 34	
	gcccggtac tctcgtcgtt actgctaacc gttttgaaca gccgcgcagc taggtgacac	60
	tatagaacgc	70
30	<210> 35 <211> 70 <212> DNA <213> Yapay Dizi	
35	<220> <223> btuB inaktivitesi için primer	
40	<400> 35	
	gactccggcg tcggtgggtt gtcggtctat aaacaccagc acggtgggac gtgggttcaga	60
	aggtgtagct	70
45	<210> 36 <211> 70 <212> DNA <213> Yapay Dizi	
50	<220> <223> btuB inaktivitesi için primer	
55	<400> 36	

gctgacggcg tgttcggtca cggcattttc cgcttgggca caggatacca gcccgatac 60
tctcgtcgtt 70

5
 <210> 37
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
10
 <220>
 <223> btuB inaktivitesi için primer
15
 <400> 37
 atctggttct catcatcg 18
20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
25
 <220>
 <223> btuB inaktivitesi için primer
30
 <400> 38
 gcataaatgt aatggagatc 20
35
 <210> 39
 <211> 2973
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli str.K-12 substr.W3110
40
 <220>
 <221> gene
 <222> (1)..(2973)
 <223> nfrA
45
 <400> 39
50
 atgaaggaga ataaccttaa tcgcgtcatc ggatggctctg gtttactgct gacgtcttta 60
 ttgagtacca gcgcactcgc agacaatatc ggcaccagcg cagaagagct ggggctgagc 120
 gattatcgcc attttgttat ttatccccgt ctcgataaag cgctgaaggc acagaaaaat 180
55
 aacgacgaag caaccgccat ccgcgaattt gaatatatac accagcaggt gccggataat 240

	attccgctga ctttatacct tgcggaagcc tatcgccatt ttggtcatga tgaccgggcg	300
	cggctgttgc ttgaggatca actgaaacgt caccagagg atgcccgaact tgagcgcagt	360
5	ctggcggcta ttccggttga agtgaaaagc gttacgacag ttgaagaact gcttgcccag	420
	caaaaagcgt gcgatgctgc gccgaccctg cgttgctgca gtgaagtcgg gcagaatgcc	480
	ctgcggctgg cacagttacc tgtcgccaga gcgcaactga acgatgcgac gtttgctgca	540
10	tcgccggaag gaaaaacgct gcgaaccgat ctgctgcaac gggcaatcta cctgaaacaa	600
	tggtcccagg cagatacgt atacaatgaa gcacgccagc agaacacatt aagcgcggca	660
	gaacgccgtc agtggtttga cgtgcttctt gccgggcagc tggacgatcg gatcctggca	720
15	ctgcaatcac aggggatctt caccgatcct cagtcataata ttacttacgc gaccgcgctg	780
	gcttatcgtg gcgaaaaagc acgcctccag cattatctca ttgaaaataa gccactattt	840
	accacggacg cacaagagaa aagttggctc tatctgttat ctaaatacag cgctaacccc	900
20	gttcaggcgt tgqcgaaatta tacggtacag tttgccgaca accgccagta tgttggtggc	960
	gcgacgctac cgtgctgtt aaaagaaggt cagtacgacg cagcgcaaaa actgctcgc	1020
25	accctccccg ccaatgaaat gcttgaggag cgttatgctg tcagcgtggc gaccgtaac	1080
	aaggctgaag ctctgcgtct ggcacgattg ctgtatcagc aagaaccggc aaatcttacc	1140
	cgctggatc aactaacctg gcaactgatg cagaacgagc agtcacgcga agctgccgat	1200
30	ttattgctgc aacgctatcc ttccagggc gatgcgcgtg tcagccagac tttaatggcg	1260
	cgactggcgt ctctgctgga aagtcatect tacctggcaa cgcggcgcaa ggtggcgatt	1320
	ttatcgaaac ccttaccgct ggcggagcaa cgtcagtggc aaagtcagtt gccgggtatt	1380
35	gcagataatt gcccggaat agttcgcttg ctgggcgata tgtcgcttc ctacgatgcc	1440
	gccgcctgga accgtctggc aaagtgttat cgggacacgc tacccggtgt ggcgttgtat	1500
	gcatggcttc aggcgaaca acgacaaccg agcgcctggc aacatcgtgc ggtagcctat	1560
40	caggcgtatc aggttgagga ctacgccacc gcactggcgg cctggcagaa aatcagctct	1620
	cacgacatga gcaatgagga tctgcttgct gctgccata ccgccaggc ggcaggaaat	1680
	ggtgcggctc gcgatcgctg gctacaacag gcagaaaaac gtggactggg aagcaatgcc	1740
45	ctctactggg ggctgcatgc gcaacgttac attcctggc agccggaact cgcactgaac	1800
	gatctcacgc gctcaatcaa tattgcgct tctgccaacg cttacgttgc gcgggcgaca	1860
50	atttatcgcc aacgtcataa tgtccgggc gcggtgagtg atttgcgcg cgcgctggaa	1920
	ctggaaccga ataatagcaa caccaggca gcgcttggtt acgccttggt ggatagcgg	1980
	gatatcgac agtcgcggga aatgctcgaa ccggcgcata aagggttcc ggacgatccg	2040
55	gcactgatcc gacaactggc ctacgtgaac cagcgtctgg atgacatgcc tgcgacgcag	2100
	cactacgcc ggctggtgat tgatgacatt gataatcagg cgctgataac cccactgacc	2160

ccagaacaaa atcaacaacg ctccaatttc cgccgtttgc atgaggaggt cggtcgccgc 2220
 tggacgttca gtttcgattc ttccatcggc ttgcgttccg gcgcaatgag taccgctaac 2280
 5 aataatgtcg gcggcgcgagc gccagggaaa agctatcgta gctacggaca actggaagcc 2340
 gagtaccgca tcggacgcaa tatgtgtctg gaaggcgacc tgcctcagc ttatagccgc 2400
 gtctttgccg ataccggaga aaacggggtg atgatgccgg tgaaaaatcc gatgtccggc 2460
 10 accggtctgc gctggaagcc gctgcgcgat cagatctttt tcatcgccgt cgaacagcag 2520
 ttgccgtga acggccaaaa tggcgcatcc gataccatgc tgcgcgccag cgcctcattc 2580
 15 tttaatggcg gcaaatacag cgacgaatgg caccggaacg gttcaggctg gtttgcccaa 2640
 aacctgtacc tcgatgcggc gcaatatatc cgccaggata ttcaggcgtg gacggcagat 2700
 tatcgctca gctggcatca gaaggtagct aacggacaga ctattgagcc ttacgctcac 2760
 20 gttcaggaca acggctatcg tgataaaggc actcagggcg cgcagcttg cggagtcggg 2820
 gtccgctgga atatctggac cggcgagacg cactacgacg cctggccgca caaagtcagt 2880
 ctcggcgtcg agtatcaaca tacctttaag gcgattaatc aacgtaacgg agagcgcaac 2940
 25 aacgcgttcc tcaccattgg agtgcactgg taa 2973

<210> 40

<211> 990

30 <212> PRT

<213> Escherichia coli str. K-12 substr.W3110

<400> 40

35

40

45

50

55

	Met	Lys	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Arg	Val	Ile	Gly	Trp	Ser	Gly	Leu	Leu
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Thr	Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Asn	Ile	Gly	Thr
				20					25					30		
	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	Tyr	Arg	His	Phe	Val	Ile	Tyr
			35					40					45			
10	Pro	Arg	Leu	Asp	Lys	Ala	Leu	Lys	Ala	Gln	Lys	Asn	Asn	Asp	Glu	Ala
			50				55						60			
	Thr	Ala	Ile	Arg	Glu	Phe	Glu	Tyr	Ile	His	Gln	Gln	Val	Pro	Asp	Asn
	65					70					75					80
15	Ile	Pro	Leu	Thr	Leu	Tyr	Leu	Ala	Glu	Ala	Tyr	Arg	His	Phe	Gly	His
					85					90					95	
	Asp	Asp	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gln	Leu	Lys	Arg	His	Pro
20				100					105					110		
	Gly	Asp	Ala	Arg	Leu	Glu	Arg	Ser	Leu	Ala	Ala	Ile	Pro	Val	Glu	Val
			115					120					125			
25	Lys	Ser	Val	Thr	Thr	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Gln	Gln	Lys	Ala	Cys
		130					135					140				

30

35

40

45

50

55

	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Leu	Arg	Cys	Arg	Ser	Glu	Val	Gly	Gln	Asn	Ala	
	145					150					155					160	
5	Leu	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Pro	Val	Ala	Arg	Ala	Gln	Leu	Asn	Asp	Ala	
					165					170					175		
	Thr	Phe	Ala	Ala	Ser	Pro	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu	Arg	Thr	Asp	Leu	Leu	
				180					185					190			
10	Gln	Arg	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Gln	Trp	Ser	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu	Tyr	
			195					200					205				
	Asn	Glu	Ala	Arg	Gln	Gln	Asn	Thr	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	Arg	Arg	Gln	
	210						215					220					
15	Trp	Phe	Asp	Val	Leu	Leu	Ala	Gly	Gln	Leu	Asp	Asp	Arg	Ile	Leu	Ala	
	225				230						235					240	
	Leu	Gln	Ser	Gln	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Pro	Gln	Ser	Tyr	Ile	Thr	Tyr	
					245				250						255		
20	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Tyr	Arg	Gly	Glu	Lys	Ala	Arg	Leu	Gln	His	Tyr	
				260					265					270			
	Leu	Ile	Glu	Asn	Lys	Pro	Leu	Phe	Thr	Thr	Asp	Ala	Gln	Glu	Lys	Ser	
			275					280					285				
25	Trp	Leu	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Tyr	Ser	Ala	Asn	Pro	Val	Gln	Ala	Leu	
	290						295					300					
	Ala	Asn	Tyr	Thr	Val	Gln	Phe	Ala	Asp	Asn	Arg	Gln	Tyr	Val	Val	Gly	
30	305					310					315					320	
	Ala	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Gln	Tyr	Asp	Ala	Ala	Gln	
					325					330					335		
	Lys	Leu	Leu	Ala	Thr	Leu	Pro	Ala	Asn	Glu	Met	Leu	Glu	Glu	Arg	Tyr	
35				340					345					350			
	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Arg	Asn	Lys	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	
			355					360					365				
	Arg	Leu	Leu	Tyr	Gln	Gln	Glu	Pro	Ala	Asn	Leu	Thr	Arg	Leu	Asp	Gln	
40	370						375						380				
	Leu	Thr	Trp	Gln	Leu	Met	Gln	Asn	Glu	Gln	Ser	Arg	Glu	Ala	Ala	Asp	
	385				390						395					400	
45	Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Tyr	Pro	Phe	Gln	Gly	Asp	Ala	Arg	Val	Ser	Gln	
				405						410					415		
	Thr	Leu	Met	Ala	Arg	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Ser	His	Pro	Tyr	Leu	
				420					425					430			
50	Ala	Thr	Pro	Ala	Lys	Val	Ala	Ile	Leu	Ser	Lys	Pro	Leu	Pro	Leu	Ala	
			435					440					445				
	Glu	Gln	Arg	Gln	Trp	Gln	Ser	Gln	Leu	Pro	Gly	Ile	Ala	Asp	Asn	Cys	
	450						455					460					
55	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	Asp	Met	Ser	Pro	Ser	Tyr	Asp	Ala	
	465					470					475					480	

	Ala	Ala	Trp	Asn	Arg	Leu	Ala	Lys	Cys	Tyr	Arg	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	
				485						490					495		
5	Val	Ala	Leu	Tyr	Ala	Trp	Leu	Gln	Ala	Glu	Gln	Arg	Gln	Pro	Ser	Ala	
				500					505					510			
	Trp	Gln	His	Arg	Ala	Val	Ala	Tyr	Gln	Ala	Tyr	Gln	Val	Glu	Asp	Tyr	
			515					520					525				
10	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Ala	Trp	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	His	Asp	Met	Ser	
		530					535						540				
	Asn	Glu	Asp	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Asn	Thr	Ala	Gln	Ala	Ala	Gly	Asn	
	545					550					555					560	
15	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Arg	Trp	Leu	Gln	Gln	Ala	Glu	Lys	Arg	Gly	Leu	
				565						570					575		
	Gly	Ser	Asn	Ala	Leu	Tyr	Trp	Trp	Leu	His	Ala	Gln	Arg	Tyr	Ile	Pro	
			580						585					590			
20	Gly	Gln	Pro	Glu	Leu	Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Thr	Arg	Ser	Ile	Asn	Ile	
			595					600					605				
	Ala	Pro	Ser	Ala	Asn	Ala	Tyr	Val	Ala	Arg	Ala	Thr	Ile	Tyr	Arg	Gln	
		610					615					620					
25	Arg	His	Asn	Val	Pro	Ala	Ala	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Ala	Ala	Leu	Glu	
	625					630					635					640	
	Leu	Glu	Pro	Asn	Asn	Ser	Asn	Thr	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Tyr	Ala	Leu	
				645						650					655		
30	Trp	Asp	Ser	Gly	Asp	Ile	Ala	Gln	Ser	Arg	Glu	Met	Leu	Glu	Pro	Ala	
				660					665					670			
	His	Lys	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Pro	Ala	Leu	Ile	Arg	Gln	Leu	Ala	Tyr	
35			675					680					685				
	Val	Asn	Gln	Arg	Leu	Asp	Asp	Met	Pro	Ala	Thr	Gln	His	Tyr	Ala	Arg	
		690				695						700					
40	Leu	Val	Ile	Asp	Asp	Ile	Asp	Asn	Gln	Ala	Leu	Ile	Thr	Pro	Leu	Thr	
	705					710					715					720	
	Pro	Glu	Gln	Asn	Gln	Gln	Arg	Phe	Asn	Phe	Arg	Arg	Leu	His	Glu	Glu	
				725						730					735		
45	Val	Gly	Arg	Arg	Trp	Thr	Phe	Ser	Phe	Asp	Ser	Ser	Ile	Gly	Leu	Arg	
			740						745					750			
	Ser	Gly	Ala	Met	Ser	Thr	Ala	Asn	Asn	Asn	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	
			755					760					765				
50	Gly	Lys	Ser	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Gly	Gln	Leu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg	Ile	
		770					775					780					
	Gly	Arg	Asn	Met	Leu	Leu	Glu	Gly	Asp	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Ser	Arg	
	785					790					795					800	
55	Val	Phe	Ala	Asp	Thr	Gly	Glu	Asn	Gly	Val	Met	Met	Pro	Val	Lys	Asn	
				805						810					815		

	Pro Met Ser Gly Thr Gly Leu Arg Trp Lys Pro Leu Arg Asp Gln Ile	
	820	825 830
5	Phe Phe Ile Ala Val Glu Gln Gln Leu Pro Leu Asn Gly Gln Asn Gly	
	835	840 845
	Ala Ser Asp Thr Met Leu Arg Ala Ser Ala Ser Phe Phe Asn Gly Gly	
	850	855 860
10	Lys Tyr Ser Asp Glu Trp His Pro Asn Gly Ser Gly Trp Phe Ala Gln	
	865	870 875 880
	Asn Leu Tyr Leu Asp Ala Ala Gln Tyr Ile Arg Gln Asp Ile Gln Ala	
	885	890 895
15	Trp Thr Ala Asp Tyr Arg Val Ser Trp His Gln Lys Val Ala Asn Gly	
	900	905 910
	Gln Thr Ile Glu Pro Tyr Ala His Val Gln Asp Asn Gly Tyr Arg Asp	
	915	920 925
20	Lys Gly Thr Gln Gly Ala Gln Leu Gly Gly Val Gly Val Arg Trp Asn	
	930	935 940
	Ile Trp Thr Gly Glu Thr His Tyr Asp Ala Trp Pro His Lys Val Ser	
25	945	950 955 960
	Leu Gly Val Glu Tyr Gln His Thr Phe Lys Ala Ile Asn Gln Arg Asn	
	965	970 975
30	Gly Glu Arg Asn Asn Ala Phe Leu Thr Ile Gly Val His Trp	
	980	985 990

<210> 41

<211> 2238

<212> DNA

35 <213> Escherichia coli str.K-12 substr.W3110

<220>

<221> gene

<222> (1)..(2238)

40 <223> nfrB

<400> 41

45

50

55

	gtggactggc ttcttgatgt ttttgctacc tggctctacg gcttaaaagt aatcgcgata	60
	acgttagcgg tcatcatgtt catcagcggg ctggacgatt tttttattga tgcgtctac	120
5	tgggtacgcc gcattaaacg caagttgagt gtttatcgcc gctacccgcg aatgagttac	180
	cgcgaactgt ataaaccaga tgaaaaaccg ttagcgatta tggttccggc gtggaatgaa	240
10	acgggcgtca tcggcaatat ggccgagctg gcggcgacca cgctcgacta cgaaaaactat	300
	catatctttg ttggcaccta ccccaacgac cccgatactc agcgtgatgt tgacgaagtg	360
	tgcgctcgct tcccgaatgt gcataaggta gtctgcgcgc gtectggccc caccagcaaa	420
15	gccgactgtc tgaacaacgt gctggacgcc atcacccaat ttgagcgtag cgccaatttc	480
	gcttttgctg gttttattct gcatgacgcc gaagatgtga tttcacccat ggaattgcgt	540
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		

	ctgttcaact atctggtcga gcgtaaagat ctgattcaga tcccgggtgta tccgttcgaa	600
	cgcgaatgga cgcacttcac cagcatgact tacattgatg agttttcaga gctgcatggc	660
5	aaagatgttc cgggtgcgtga agccctcgcc ggacaagtgc ccagcgcagg cgtcggcacc	720
	tgtttcagcc gccgcgccgt gaccgcactg ttagctgacg gtgacggtat tgctttcgac	780
10	gtgcagagtc ttactgaaga ttacgacatt ggcttcgcc tgaaagaaaa aggtatgacg	840
	gaaatttttg tccgttttcc ggtggtggac gaagccaaag aacgcgagca gcgtaaattt	900
	ttacagcacg cgcggacatc aaacatgacg tgcgtgcgcg aatatttccc cgataccttt	960
15	tcgactgcgg ttcgacaaaa atcccgtcg atcatcgcca ttgttttcca aggctttaaa	1020
	accataaat ggacctccag cctgacgctg aactactttc tctggcgcga ccgcaaaggg	1080
	gcaatcagta actttgtcag ctctctcgcg atgctggtga tgatccagct tttgctgttg	1140
20	ctggcgtatg aaagtctgtg gcccgatgcc tggcatttcc tttctatttt cagcggcagc	1200
	gcatggttaa tgacctgct gtggctaaac tttggtttga tggtaaccg catcgtgcag	1260
25	cgggtgattt tcgttactgg ctactacggc ctgacgcagg ggctgctttc cgtcctgcgt	1320
	ctttctgagg gcaacctgat taacttcatg gccaaactggc gcgcgctaaa acaggtactt	1380
	caacacggcg atccacgtcg cgtggcgtgg gataaaacaa cgcctgactt cccagcgtg	1440
30	actggcgata cccgctcggt gcgcccgtta ggtcaaattc tgctggaaaa tcaggtcatc	1500
	actgaagaac aactcgatac agcactgcgt aatcgcgtcg aaggtctacg cctgggcggt	1560
	tcaatgctga tgcaggggct gattagcgcc gagcagctgg cacaggcgct ggcagagcaa	1620
35	aacggcgtgg cgtgggaatc catcgatgcc tggcagatcc ctctctcgct gattgccgaa	1680
	atgccggcct cctgggcgct gcattatgcg gtactgccgc tgcgtctgga aaatgacgag	1740
40	ttaattgtcg gcagtgaaga tggatttgac ccggtttcgc tggcggccct gacgcgtaaa	1800
	gtcggacgca aagtgcgtta cgtcattggt ctgcggggac aaattgtcac agggttacgt	1860
	cactggatat cacgccgacg cggtcacgat ccgcgggcaa tgttgtacaa tgcggttcag	1920
45	catcagtggc tcacggaaca gcaggccggt gaaatctggc ggcaatatgt gccgcatcag	1980
	ttcctgttcg ccgaaatact gaccacgctc ggtcatatta atcgttcagc aattaacgtg	2040
	ttgttattgc gccatgaacg cagttctctg ccgctcggca agtttttggt caccgaaggc	2100
50	gttatcagcc aggaaacgtt ggatcgcgtc ctgacaattc aacgcgaatt acaagtttcg	2160
	atgcaatcac tattactcaa agcaggttta aacacagaac aggttgcgca actggagtcc	2220
55	gaaaatqaq qagaataa	2238

<210> 42

<211> 745

<212> PRT

<213> Escherichia coli str.K-12 substr.W3110

<400> 42

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

	Met	Asp	Trp	Leu	Leu	Asp	Val	Phe	Ala	Thr	Trp	Leu	Tyr	Gly	Leu	Lys	
	1				5					10					15		
5	Val	Ile	Ala	Ile	Thr	Leu	Ala	Val	Ile	Met	Phe	Ile	Ser	Gly	Leu	Asp	
				20					25					30			
	Asp	Phe	Phe	Ile	Asp	Val	Val	Tyr	Trp	Val	Arg	Arg	Ile	Lys	Arg	Lys	
			35					40					45				
10	Leu	Ser	Val	Tyr	Arg	Arg	Tyr	Pro	Arg	Met	Ser	Tyr	Arg	Glu	Leu	Tyr	
		50					55					60					
	Lys	Pro	Asp	Glu	Lys	Pro	Leu	Ala	Ile	Met	Val	Pro	Ala	Trp	Asn	Glu	
	65					70					75					80	
15	Thr	Gly	Val	Ile	Gly	Asn	Met	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Thr	Thr	Leu	Asp	
					85					90					95		
	Tyr	Glu	Asn	Tyr	His	Ile	Phe	Val	Gly	Thr	Tyr	Pro	Asn	Asp	Pro	Asp	
				100					105					110			
20	Thr	Gln	Arg	Asp	Val	Asp	Glu	Val	Cys	Ala	Arg	Phe	Pro	Asn	Val	His	
			115					120					125				
	Lys	Val	Val	Cys	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Ser	Lys	Ala	Asp	Cys	Leu	
25		130					135					140					
	Asn	Asn	Val	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Gln	Phe	Glu	Arg	Ser	Ala	Asn	Phe	
	145					150					155					160	
30	Ala	Phe	Ala	Gly	Phe	Ile	Leu	His	Asp	Ala	Glu	Asp	Val	Ile	Ser	Pro	
				165					170					175			
	Met	Glu	Leu	Arg	Leu	Phe	Asn	Tyr	Leu	Val	Glu	Arg	Lys	Asp	Leu	Ile	
				180					185					190			
35	Gln	Ile	Pro	Val	Tyr	Pro	Phe	Glu	Arg	Glu	Trp	Thr	His	Phe	Thr	Ser	
			195					200					205				
	Met	Thr	Tyr	Ile	Asp	Glu	Phe	Ser	Glu	Leu	His	Gly	Lys	Asp	Val	Pro	
		210					215					220					
40	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Ala	Gly	Gln	Val	Pro	Ser	Ala	Gly	Val	Gly	Thr	
		225				230					235				240		
	Cys	Phe	Ser	Arg	Arg	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Asp	Gly	
45				245						250				255			
	Ile	Ala	Phe	Asp	Val	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Asp	Tyr	Asp	Ile	Gly	Phe	
				260					265					270			
	Arg	Leu	Lys	Glu	Lys	Gly	Met	Thr	Glu	Ile	Phe	Val	Arg	Phe	Pro	Val	
50			275					280					285				
	Val	Asp	Glu	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Gln	Arg	Lys	Phe	Leu	Gln	His	Ala	
		290					295					300					
55	Arg	Thr	Ser	Asn	Met	Ile	Cys	Val	Arg	Glu	Tyr	Phe	Pro	Asp	Thr	Phe	
	305					310					315					320	

	Ser Thr Ala Val Arg Gln Lys Ser Arg Trp Ile Ile Gly Ile Val Phe	325	330	335
5	Gln Gly Phe Lys Thr His Lys Trp Thr Ser Ser Leu Thr Leu Asn Tyr	340	345	350
	Phe Leu Trp Arg Asp Arg Lys Gly Ala Ile Ser Asn Phe Val Ser Phe	355	360	365
10	Leu Ala Met Leu Val Met Ile Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ala Tyr Glu	370	375	380
	Ser Leu Trp Pro Asp Ala Trp His Phe Leu Ser Ile Phe Ser Gly Ser	385	390	395
15	Ala Trp Leu Met Thr Leu Leu Trp Leu Asn Phe Gly Leu Met Val Asn	405	410	415
	Arg Ile Val Gln Arg Val Ile Phe Val Thr Gly Tyr Tyr Gly Leu Thr	420	425	430
20	Gln Gly Leu Leu Ser Val Leu Arg Leu Phe Trp Gly Asn Leu Ile Asn	435	440	445
	Phe Met Ala Asn Trp Arg Ala Leu Lys Gln Val Leu Gln His Gly Asp	450	455	460
25	Pro Arg Arg Val Ala Trp Asp Lys Thr Thr His Asp Phe Pro Ser Val	465	470	475
	Thr Gly Asp Thr Arg Ser Leu Arg Pro Leu Gly Gln Ile Leu Leu Glu	485	490	495
30	Asn Gln Val Ile Thr Glu Glu Gln Leu Asp Thr Ala Leu Arg Asn Arg	500	505	510
	Val Glu Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Met Leu Met Gln Gly Leu Ile	515	520	525
35	Ser Ala Glu Gln Leu Ala Gln Ala Leu Ala Glu Gln Asn Gly Val Ala	530	535	540
	Trp Glu Ser Ile Asp Ala Trp Gln Ile Pro Ser Ser Leu Ile Ala Glu	545	550	555
40	Met Pro Ala Ser Val Ala Leu His Tyr Ala Val Leu Pro Leu Arg Leu	565	570	575
	Glu Asn Asp Glu Leu Ile Val Gly Ser Glu Asp Gly Ile Asp Pro Val	580	585	590
45	Ser Leu Ala Ala Leu Thr Arg Lys Val Gly Arg Lys Val Arg Tyr Val	595	600	605
	Ile Val Leu Arg Gly Gln Ile Val Thr Gly Leu Arg His Trp Tyr Ala	610	615	620
50	Arg Arg Arg Gly His Asp Pro Arg Ala Met Leu Tyr Asn Ala Val Gln	625	630	635
	His Gln Trp Leu Thr Glu Gln Gln Ala Gly Glu Ile Trp Arg Gln Tyr	645	650	655

	Val	Pro	His	Gln	Phe	Leu	Phe	Ala	Glu	Ile	Leu	Thr	Thr	Leu	Gly	His
				660					665					670		
5	Ile	Asn	Arg	Ser	Ala	Ile	Asn	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	His	Glu	Arg	Ser
			675					680					685			
	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Val	Thr	Glu	Gly	Val	Ile	Ser	Gln
		690				695						700				
10	Glu	Thr	Leu	Asp	Arg	Val	Leu	Thr	Ile	Gln	Arg	Glu	Leu	Gln	Val	Ser
	705				710						715					720
	Met	Gln	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly	Leu	Asn	Thr	Glu	Gln	Val	Ala	
				725					730					735		
15	Gln	Leu	Glu	Ser	Glu	Asn	Glu	Gly	Glu							
				740				745								

<210> 43

<211> 6088

20 <212> DNA

<213> Escherichia coli str.K-12 substr.W3110

<220>

<221> gene

25 <222> (1)..(6088)

<223> nfrAB

<400> 43

30

35

40

45

50

55

	gtggactggc ttcttgatgt ttttgctacc tggctctacg gcttaaaagt aatcgcgata	60
	acgttagcgg tcatcatgtt catcagcggg ctggacgatt tttttattga tgtcgtctac	120
5	tgggtacgcc gcattaaacg caagttgagt gtttatcgcc gctacccgcg aatgagttac	180
	cgcgaactgt ataaaccaga tgaaaaaccg ttagcgatta tggttccggc gtggaatgaa	240
10	acgggcgtca tcggcaatat ggccgagctg gcggcgacca cgctcgacta cgaaaaactat	300
	catatctttg ttggcaccta cccaacgac cccgatactc agcgtgatgt tgacgaagtg	360
	tgcgctcgct tcccgaatgt gcataaggta gtctgcgcgc gtccctggccc caccagcaaa	420
15	gccgactgtc tgaacaacgt gctggacgcc atcacccaat ttgagcgtag cgccaatttc	480
	gcttttgctg gttttattct gcatgacgcc gaagatgtga tttcacccgat ggaattgcgt	540
	ctgttcaact atctggtcga gcgtaaagat ctgattcaga tcccgggtga tccgttcgaa	600
20	cgcgaatgga cgcacttcac cagcatgact tacattgatg agttttcaga gctgcatggc	660
	aaagatgttc cgggtgcgtga agccctcgcc ggacaagtgc ccagcgcagg cgtcggcacc	720
25	tgtttcagcc gccgcgccgt gaccgcactg ttagctgacg gtgacggtat tgctttcgac	780
	gtgcagagtc ttactgaaga ttacgacatt ggcttcgcc tgaaaagaaa aggtatgacg	840
	gaaatttttg tccgttttcc ggtggtggac gaagccaaag aacgcgagca gcgtaaattt	900
30	ttacagcacg cgcggacatc aaacatgac tgcgtgcgcg aatatttccc cgataccttt	960
35		
40		
45		
50		
55		

	tgcactgcgg	ttcgacaaaa	atcccgcctgg	atcatcgcca	ttgttttcca	aggctttaaa	1020
	accataaat	ggacctccag	cccgacgctg	aactactttc	tctggcgcca	ccgcaaaggg	1080
5	gcaatcagta	actttgtcag	cttcctcgcg	atgctgggtga	tgatccagct	tttgctgttg	1140
	ctggcgatg	aaagtttgtg	gcccgatgcc	tggcatttcc	tttctatttt	cagcggcagc	1200
	gcatgggtta	tgacctgct	gtggctaaac	tttggtttga	tggttaaccg	catcgtgcag	1260
10	cgggtgattt	tcgttactgg	ctaactacggc	ctgacgcagg	ggctgctttc	cgtcctgcgt	1320
	cttttctggg	gcaacctgat	taacttcacg	gccaaactggc	gcgcgctaaa	acaggtactt	1380
	caacacggcg	atccacgctg	cgtggcgctg	gataaaaaca	cgcacgactt	ccccagcgtg	1440
15	actggcgata	cccgcctgct	gcgcccgtta	ggtcaaattc	tgctggaaaa	tcaggtcatc	1500
	actgaagaac	aactcgatac	agcaactgcgt	aatcgcgctg	aaqgtctacg	cctgggcggt	1560
20	tcaatgctga	tgacggggct	gattagcgcc	gagcagctgg	cacagggcgt	ggcagagcaa	1620
	aacggcgctg	cgtgggaatc	catcgatgcc	tggcagatcc	cttcctcgct	gattgccgaa	1680
	atgccggcct	ccgtggcgct	gcattatgcg	gtactgccgc	tgcgctctga	aaatgacgag	1740
25	ttaattgtcg	gcagtgaaga	tggattgac	ccggtttcgc	tggcgccct	gacgcgtaaa	1800
	gtcggacgca	aagtgcgtta	cgtcattggt	ctgcggggac	aaattgtcac	agggttacgt	1860
	cactggtatg	cacgccgacg	cggtcacgat	ccgcgggcaa	tgttgtacaa	tgcggttcag	1920
30	catcagtggc	tcacggaaca	gcaggccggg	gaaatctggc	ggcaatatgt	gccgcacag	1980
	ttcctgttcg	ccgaaatact	gaccacgctc	ggtcataatta	atcgttcagc	aattaacgtg	2040
	ttgttattgc	gccatgaacg	cagttctctg	ccgctcggca	agtttttggg	caccgaaggc	2100
35	gttatcagcc	aggaaacggt	ggatcgcgct	ctgacaattc	aacgcgaatt	acaagtttcg	2160
	atgcaatcac	tattactcaa	agcaggttta	aacacagaac	aggttgcgca	actggagtc	2220
	gaaaatgaag	gagaataacc	ttaatcgct	catcggatgg	tctggtttac	tgctgacgtc	2280
40	tttattgagt	accagcgcac	tcgcagacaa	tatcggcacc	agcgcagaag	agctggggct	2340
	gagcgattat	cgccattttg	ttatttatcc	ccgtctcgat	aaagcgctga	aggcacagaa	2400
	aaataacgac	gaagcaaccg	ccatccgcga	atttgaatat	atacaccagc	aggtgccgga	2460
45	taatattccg	ctgactttat	accttgcgga	agcctatcgc	cattttgggc	atgatgaccg	2520
	ggcgcggtg	ttgcttgagg	atcaactgaa	acgtcaccca	ggagatgccc	gacttgagcg	2580
50	cagtctggcg	gctattccgg	ttgaagtga	aagcgttacg	acagttgaag	aactgcttgc	2640
	ccagcaaaaa	gcgtgcgatg	ctgcgccgac	cctgcgttgt	cgcagtgaag	tcgggcagaa	2700
	tgccctgcgg	ctggcacagt	tacctgtcgc	cagagcgcaa	ctgaacgatg	cgacgtttgc	2760
55	tgcatcgccg	gaaggaaaaa	cgtgcgaac	cgatctgctg	caacgggcaa	tctacctgaa	2820
	acaatgggtc	caggcagata	cgctatacaa	tgaagcacgc	cagcagaaca	cattaagcgc	2880

	ggcagaacgc cgtcagtggc ttgacgtgct tcttgccggg cagctggacg atcggatcct	2940
	ggcactgcaa tcacagggga tcttcaccga tcttcagtca tataattactt acgcgaccgc	3000
5	gctggcttat cgtggcgaaa aagcacgcct ccagcattat ctcatlgaaa ataagccact	3060
	atttaccacg gacgcacaag agaaaagttg gctctatctg ttatctaaat acagcgctaa	3120
	ccccgttcag gcgttggcga attatacggc acagtttgcc gacaaccgcc agtatgttgt	3180
10	tggcgcgacg ctaccgggtgc tgttaaaaga aggtcagtac gacgcagcgc aaaaactgct	3240
	cgccaccctc ccgcgcaatg aaatgcttga ggagcggtat gctgtcagcg tggcgaccgc	3300
15	taacaaggct gaagctctgc gtctggcacg attgctgtat cagcaagaac cggcaaactc	3360
	taccgccttg gatcaactaa cctggcaact gatgcagaac gagcagtcac gcgaagctgc	3420
	cgatattattg ctgcaacgct atcctttcca gggcgatgag cgtgtcagcc agactttaat	3480
20	ggcgcgactg gcgtctctgc tggaaagtca tctttacctg gcaacgcggg cgaaggtggc	3540
	gattttatcg aaacccttac cgctggcgga gcaacgtcag tggcaaaagc agttgcccgg	3600
	tattgcagat aattgcccgg caatagttcg cttgctgggc gatatgtcgc cttcctacga	3660
25	tgccgcggcc tggaaaccgtc tggcaaaagt ttatcgggac acgctaccgc gtgtggcgtt	3720
	gtatgcatgg cttcaggccg aacaacgaca accgagcgcc tggcaacatc gtgcggtagc	3780
	ctatcaggcg tatcagggtg aggactacgc caccgcactg gcggcctggc agaaaatcag	3840
30	tcttcacgac atgagcaatg aggatctgct tgctgctgcc aataccgccc aggcggcagg	3900
	aaatgggtgcg gctcgcgac gctggctaca acaggcagaa aaacgtggac tgggaagcaa	3960
35	tgccctctac tgggtggctgc atgcgcaacg ttacattcct ggtcagccgg aactcgcact	4020
	gaacgatctc acgcgctcaa tcaatattgc gccttctgcc aacgcttacg ttgcgcgggc	4080
	gacaatttat cgccaacgtc ataatgtccc ggccgcgggtg agtgatttgc gcgcgcgct	4140
40	ggaactggaa ccgaataata gcaacaccca ggcagcgctt gggttacgcct tgtgggatag	4200
	cggtgatata gcacagtcgc gggaaatgct cgaaccggcg cataaagggc ttccggacga	4260
	tccggcactg atccgacaac tggcctacgt gaaccagcgt ctggatgaca tgccctgcgac	4320
45	gcagcactac gcccggtggt tgattgatga cattgataat caggcgctga taacccact	4380
	gacccagaa caaaatcaac aacgcttcaa tttccgccgt ttgcatgagg aggtcggtcg	4440
50	ccgctggacg ttcagtttcg attcttccat cggcttgctt tccggcgcaa tgagtaccgc	4500
	taacaataat gtcggcggcg cagcgccagg gaaaagctat cgtagctacg gacaactgga	4560
	agccgagtac cgcacggac gcaatatgct gctggaaggc gacctgctct cagtttatag	4620
55	ccgcgtcttt gccgataccg gagaaaacgg ggtgatgatg ccggtgaaaa atccgatgtc	4680
	cggcaccggt ctgcgctgga agccgctgcg cgatcagatc tttttcatcg ccgtcgaaca	4740

	gcagttgccg ctgaacggcc aaaatggcgc atccgatacc atgctgcgcg ccagcgccctc	4800
	attctttaat ggcggaacat acagcgacga atggcaccgc aacggttcag gctgggtttgc	4860
5	ccaaaacctg tacctcgatg cggcgcaata tatccgccag gatattcagg cgtggacggc	4920
	agattatcgc gtcagctggc atcagaaggt agctaacgga cagactattg agccttacgc	4980
10	tcacgttcag gacaacggct atcgtgataa aggcaactcag ggcgcgcagc ttggcggagt	5040
	cggggtccgc tggaatatct ggaccggcga gacgcactac gacgcctggc cgcacaaaagt	5100
	cagtctcggc gtcgagtatc aacatacctt taaggcgatt aatcaacgta acggagagcg	5160
15	caacaacgcg tttctcacca ttggagtgca ctggtaaatg cgtaagttca ttttcgtatt	5220
	gctgacactg cttttggtca gccctttttc ctttgcgatg aaagggtatta tctggcaacc	5280
	acaaaaccga gatagtcagg ttaccgatac ccagtggcag ggcctgatga gtcagttacg	5340
20	tttgcaaggc ttcgataccc ttgttttgcg atggaccgct tacggcgatg catttaccca	5400
	gccagaacag cgcacgttat tgtttaagcg ggcgcgagct gcgcaacagg ctggtctgaa	5460
	gcttattgtc ggcctgaacg ccgatccgga attttttatg caccagaaac agtcgtccgc	5520
25	agcgctggaa agctatctta atcgccctgt ggcgcgcgat ctccagcaag ccagattatg	5580
	gagcgccgcg cctggcataa cgcgcgatgg ctggtacatc agcgcggaag ttgacgacct	5640
30	gaactggcgc agcgaagccg cccgtcagcc tttgctaaca tggttaaaca acgcgcagcg	5700
	gctgattagc gatgtttcag caaaaccggt ttatatcagt agtttttttcg ccggaaacat	5760
	gtcgcccgat ggctatcgcc aactgctgga acacgttaaa gcaaccggcg ttaatgtctg	5820
35	ggtacaggat ggcagcggcg tggataaaact gaccgctgaa cagcgtgaac gttattttaca	5880
	ggccagcgcc gattgccaaa gtcccgcgcc tgcacgcggc gttgtttatg aactttttgt	5940
	cgcgcgcaaa ggcaaaacct ttacagcgaa accgaaaccg gacgcagaaa ttgcctcgct	6000
40	gttagcgaaa cgttctctct gcggtaaaga cactctctat ttctctctgc gctattttgcc	6060
	cgtcgcgcac ggcattctct agtattaa	6088
45	<210> 44 <211> 885 <212> DNA <213> Escherichia coli str.K-12 substr.W3110	
50	<220> <221> gene <222> (1)..(885) <223> tsx	
55	<400> 44	

atgaaaaaaaa cattactggc agccgggtgcg gtactggcgc tctcttcgtc ttttactgtc 60
 aacgcagctg aaaacgacaa accgcagtat ctttccgact ggtggcacca gagcggttaac 120
 5 gttgtcggaa gctatcacac ccgtttcggg ccgcagatcc gcaacgatac ctaccttgag 180
 tacgaagcat tcgctaaaaa agactgggtc gacttctatg gttatgcgga tgcgccggta 240
 10 ttcttcggcg gtaactccga tgctaaaggt atctggaacc acggttctcc gctgtttatg 300
 gaaatcgaac cacgtttctc catcgacaag ctgaccaata ctgaccttag cttcgggtccg 360
 ttcaaagagt ggtacttcgc gaacaactac atttacgaca tgggtcgtaa taaagatggt 420
 15 cgccagagca cctggtacat ggggtctgggt accgatatcg acactggcct gccgatgagc 480
 ctgtccatga acgtctatgc gaaataccag tggcagaact atggcgcagc gaacgaaaac 540
 20 gagtgggacg gttaccgttt caaaattaaa tactttgtgc cgattaccga tctgtggggc 600
 ggtcagctga gctacatcgg cttcaccaac ttcgactggg gttccgattt aggggatgac 660
 agcggtaacg caatcaacgg tattaagacc cgtactaata actctatcgc ttccagccat 720
 25 attctggctc tgaactacga tcactggcac tactctgtcg tagctcgta ctggcacgac 780
 ggtggtcagt ggaacgacga tgacagaactg aacttcggca acggcaactt caacgttcgc 840
 tctaccggct ggggtggtta cctggtagta ggttacaact tctga 885
 30

<210> 45

<211> 294

<212> PRT

<213> Escherichia coli str.K-12 substr.W3110

35

<400> 45

40

45

50

55

	Met	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	
	1				5					10					15		
5	Ser	Phe	Thr	Val	Asn	Ala	Ala	Glu	Asn	Asp	Lys	Pro	Gln	Tyr	Leu	Ser	
				20					25					30			
	Asp	Trp	Trp	His	Gln	Ser	Val	Asn	Val	Val	Gly	Ser	Tyr	His	Thr	Arg	
				35				40					45				
10	Phe	Gly	Pro	Gln	Ile	Arg	Asn	Asp	Thr	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Glu	Ala	Phe	
		50					55					60					
	Ala	Lys	Lys	Asp	Trp	Phe	Asp	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ala	Pro	Val	
		65				70					75					80	
15	Phe	Phe	Gly	Gly	Asn	Ser	Asp	Ala	Lys	Gly	Ile	Trp	Asn	His	Gly	Ser	
					85					90					95		
	Pro	Leu	Phe	Met	Glu	Ile	Glu	Pro	Arg	Phe	Ser	Ile	Asp	Lys	Leu	Thr	
20				100					105					110			
	Asn	Thr	Asp	Leu	Ser	Phe	Gly	Pro	Phe	Lys	Glu	Trp	Tyr	Phe	Ala	Asn	
				115				120					125				
	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Met	Gly	Arg	Asn	Lys	Asp	Gly	Arg	Gln	Ser	Thr	
25		130					135					140					
	Trp	Tyr	Met	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ile	Asp	Thr	Gly	Leu	Pro	Met	Ser	
	145					150				155						160	
30	Leu	Ser	Met	Asn	Val	Tyr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Trp	Gln	Asn	Tyr	Gly	Ala	
					165					170					175		
	Ala	Asn	Glu	Asn	Glu	Trp	Asp	Gly	Tyr	Arg	Phe	Lys	Ile	Lys	Tyr	Phe	
35				180					185					190			
	Val	Pro	Ile	Thr	Asp	Leu	Trp	Gly	Gly	Gln	Leu	Ser	Tyr	Ile	Gly	Phe	
			195					200					205				
	Thr	Asn	Phe	Asp	Trp	Gly	Ser	Asp	Leu	Gly	Asp	Asp	Ser	Gly	Asn	Ala	
40		210					215					220					
	Ile	Asn	Gly	Ile	Lys	Thr	Arg	Thr	Asn	Asn	Ser	Ile	Ala	Ser	Ser	His	
	225				230						235					240	
45	Ile	Leu	Ala	Leu	Asn	Tyr	Asp	His	Trp	His	Tyr	Ser	Val	Val	Ala	Arg	
				245					250						255		
	Tyr	Trp	His	Asp	Gly	Gly	Gln	Trp	Asn	Asp	Asp	Ala	Glu	Leu	Asn	Phe	
				260					265					270			
50	Gly	Asn	Gly	Asn	Phe	Asn	Val	Arg	Ser	Thr	Gly	Trp	Gly	Gly	Tyr	Leu	
		275						280					285				
	Val	Val	Gly	Tyr	Asn	Phe											
55		290															

<210> 46

<211> 2244

<212> DNA

<213> Escherichia coli str.K-12 substr.W3110

<220>

<221> gene

5 <222> (1)..(2244)

<223> fhuA

<400> 46

10	atggcgcggtt ccaaaactgc tcagccaaaa cactcactgc gtaaaatcgc agttgtagta	60
	gccacagcgg ttagcggcat gtctgtttat gcacaggcag cggttgaacc gaaagaagac	120
	actatcaccg ttaccgctgc acctgcgcgc caagaaagcg catggggggc tgctgcaact	180
15	attgcgggcg gacagtctgc taccggcact aaaaccgata cgccgattca aaaagtgcc	240
	cagtctatct ctgtttgtgac cgccgaagag atggcgctgc atcagccgaa gtcggtaaaa	300
20	gaagcgctta gctacacgcc ggggtgtctct gttggtacgc gtggcgcatc caacacctat	360
	gaccacctga tcattcgcg gtttgcgga gaaggccaaa gccagaataa ctatctgaat	420
	ggcctgaagt tgcagggcaa cttctataac gatgcggtca ttgaccgta tatgctggaa	480
25	cgcgctgaaa ttatgcgtgg cccggtttcc gtgctttacg gtaaaagcag tcctggcggc	540
	ctgttgaata tggtcagcaa gcgtccgacc accgaaccgc tgaaagaagt tcagtttaaa	600
	gccggtactg acagcctgtt ccagactggt tttgacttta gcgattcgtt ggatgatgac	660
30	ggtgtttact cttatcgcc gaccggtctt gcgcgttctg ccaatgccca gcagaaaggg	720

35

40

45

50

55

	tcagaagagc agcgttatgc tattgcaccg gcgttcacct ggcgtccgga tgataaaacc	780
	aattttacct tcttttctta ctccagAAC gagccggaaa ccggttatta cggctgggtg	840
5	ccgaaagagg gaaccgttga gccgtgccc aacggtaagc gtctgccgac agactttaat	900
	gaaggggCGA agaacaacac ctattctcgt aatgagaaga tggtcggcta cagcttcgat	960
10	cacgaattta acgacacct tactgtgCGT cagaacctgc gctttgctga aaacaaaacc	1020
	tcgcaaaaca gcgtttatgg ttacggcgtc tgctccgac cggcgaatgc ttacagcaaa	1080
	cagtgtgCGG cattagcgcc agcggataaa ggccattatc tggcacgtaa atacgtcgtt	1140
15	gatgatgaga agctgcaaaa ctctccggtt gatacccgat tgcagagcaa gtttgccact	1200
	ggcgatatcg accacacct gctgaccggt gtcgacttta tgcgtatgcg taatgacatc	1260
	aacgcctggt ttggttacga cgaactctgt ccactgctca atctgtacaa tccggtgaat	1320
20	accgatttcg acttcaatgc caaagatccg gcaaactccg gcccttaccg cattctgaat	1380
	aaacagaaac aaacgggCGT ttatgttcag gatcaggcgc agtgggataa agtgcctggtc	1440
	accctaggcg gtcgttatga ctgggcagat caagaatctc ttaaccgcgt tgccgggacg	1500
25	accgataaac gtgatgacaa acagtttacc tggcgtggtg gtgttaacta cctgtttgat	1560
	aatggtgtaa caccttactt cagctatagc gaatcgtttg aacctcttc gcaagttggg	1620
30	aaggatggta atattttcgc accgtctaaa ggtaagcagt atgaagtcgg cgtgaaatat	1680
	gtaccggaag atcgtccgat tgtagttact ggtgccgtgt ataatctcac taaaaccaac	1740
	aacctgatgg cggacctga gggttccttc ttctcggttg aaggtagcga gatccgcgca	1800
35	cgtggcgtag aaatcgagc gaaagcggcg ctgtcggcga gtgttaacgt agtcggttct	1860
	tatacttaca ccgatgcgga atacaccacc gatactacct ataaaggcaa tacgcctgca	1920
	caggtgccaa aacacatggc ttcggttggtg gctgactaca ccttctttga cggtcCGCTT	1980
40	tcaggtctga cgtcgggcac cggtagctgt tatactggct ccagttatgg tgatccggct	2040
	aactccttta aagtgggaag ttatacggtc gtggatgcgt tagtacgtta tgatctggcg	2100
45	cgagtcggca tggctggctc caacgtggcg ctgcatgta acaacctgtt cgatcgtgaa	2160
	tacgtcgcca gctgctttaa cacttatggc tgcttctggg gcgcagaacg tcaggtcgtt	2220
	gcaaccgcaa ccttcCGTTT ctaa	2244
50	<210> 47	
	<211> 747	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli str.K-12substr.W3110	
55	<400> 47	

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

	Ala Val Val Val	Ala Thr Ala Val	Ser Gly Met Ser Val Tyr Ala Gln	20	25	30
5	Ala Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Thr Ala Ala Pro	35	40	45		
	Ala Pro Gln Glu Ser Ala Trp Gly Pro Ala Ala Thr Ile Ala Ala Arg	50	55	60		
10	Gln Ser Ala Thr Gly Thr Lys Thr Asp Thr Pro Ile Gln Lys Val Pro	65	70	75	80	
	Gln Ser Ile Ser Val Val Thr Ala Glu Glu Met Ala Leu His Gln Pro	85	90	95		
15	Lys Ser Val Lys Glu Ala Leu Ser Tyr Thr Pro Gly Val Ser Val Gly	100	105	110		
	Thr Arg Gly Ala Ser Asn Thr Tyr Asp His Leu Ile Ile Arg Gly Phe	115	120	125		
20	Ala Ala Glu Gly Gln Ser Gln Asn Asn Tyr Leu Asn Gly Leu Lys Leu	130	135	140		
	Gln Gly Asn Phe Tyr Asn Asp Ala Val Ile Asp Pro Tyr Met Leu Glu	145	150	155	160	
25	Arg Ala Glu Ile Met Arg Gly Pro Val Ser Val Leu Tyr Gly Lys Ser	165	170	175		
	Ser Pro Gly Gly Leu Leu Asn Met Val Ser Lys Arg Pro Thr Thr Glu	180	185	190		
30	Pro Leu Lys Glu Val Gln Phe Lys Ala Gly Thr Asp Ser Leu Phe Gln	195	200	205		
	Thr Gly Phe Asp Phe Ser Asp Ser Leu Asp Asp Asp Gly Val Tyr Ser	210	215	220		
35	Tyr Arg Leu Thr Gly Leu Ala Arg Ser Ala Asn Ala Gln Gln Lys Gly	225	230	235	240	
	Ser Glu Glu Gln Arg Tyr Ala Ile Ala Pro Ala Phe Thr Trp Arg Pro	245	250	255		
40	Asp Asp Lys Thr Asn Phe Thr Phe Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Glu Pro	260	265	270		
	Glu Thr Gly Tyr Tyr Gly Trp Leu Pro Lys Glu Gly Thr Val Glu Pro	275	280	285		
45	Leu Pro Asn Gly Lys Arg Leu Pro Thr Asp Phe Asn Glu Gly Ala Lys	290	295	300		
	Asn Asn Thr Tyr Ser Arg Asn Glu Lys Met Val Gly Tyr Ser Phe Asp	305	310	315	320	
50	His Glu Phe Asn Asp Thr Phe Thr Val Arg Gln Asn Leu Arg Phe Ala	325	330	335		
55	Glu Asn Lys Thr Ser Gln Asn Ser Val Tyr Gly Tyr Gly Val Cys Ser	340	345	350		

	Asp	Pro	Ala	Asn	Ala	Tyr	Ser	Lys	Gln	Cys	Ala	Ala	Leu	Ala	Pro	Ala	
			355					360					365				
5	Asp	Lys	Gly	His	Tyr	Leu	Ala	Arg	Lys	Tyr	Val	Val	Asp	Asp	Glu	Lys	
		370					375					380					
	Leu	Gln	Asn	Phe	Ser	Val	Asp	Thr	Gln	Leu	Gln	Ser	Lys	Phe	Ala	Thr	
	385					390					395					400	
10	Gly	Asp	Ile	Asp	His	Thr	Leu	Leu	Thr	Gly	Val	Asp	Phe	Met	Arg	Met	
					405					410					415		
	Arg	Asn	Asp	Ile	Asn	Ala	Trp	Phe	Gly	Tyr	Asp	Asp	Ser	Val	Pro	Leu	
				420					425					430			
15	Leu	Asn	Leu	Tyr	Asn	Pro	Val	Asn	Thr	Asp	Phe	Asp	Phe	Asn	Ala	Lys	
			435					440					445				
	Asp	Pro	Ala	Asn	Ser	Gly	Pro	Tyr	Arg	Ile	Leu	Asn	Lys	Gln	Lys	Gln	
	450						455						460				
20	Thr	Gly	Val	Tyr	Val	Gln	Asp	Gln	Ala	Gln	Trp	Asp	Lys	Val	Leu	Val	
	465					470					475					480	
	Thr	Leu	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Trp	Ala	Asp	Gln	Glu	Ser	Leu	Asn	Arg	
					485					490					495		
25	Val	Ala	Gly	Thr	Thr	Asp	Lys	Arg	Asp	Asp	Lys	Gln	Phe	Thr	Trp	Arg	
				500					505					510			
	Gly	Gly	Val	Asn	Tyr	Leu	Phe	Asp	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Tyr	Phe	Ser	
			515					520					525				
30	Tyr	Ser	Glu	Ser	Phe	Glu	Pro	Ser	Ser	Gln	Val	Gly	Lys	Asp	Gly	Asn	
	530						535					540					
	Ile	Phe	Ala	Pro	Ser	Lys	Gly	Lys	Gln	Tyr	Glu	Val	Gly	Val	Lys	Tyr	
35	545					550					555					560	
	Val	Pro	Glu	Asp	Arg	Pro	Ile	Val	Val	Thr	Gly	Ala	Val	Tyr	Asn	Leu	
				565						570					575		
	Thr	Lys	Thr	Asn	Asn	Leu	Met	Ala	Asp	Pro	Glu	Gly	Ser	Phe	Phe	Ser	
40				580					585					590			
	Val	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Arg	Ala	Arg	Gly	Val	Glu	Ile	Glu	Ala	Lys	
			595					600					605				
45	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Asn	Val	Val	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Thr	
	610						615					620					
	Asp	Ala	Glu	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Thr	Tyr	Lys	Gly	Asn	Thr	Pro	Ala	
	625					630					635				640		
50	Gln	Val	Pro	Lys	His	Met	Ala	Ser	Leu	Trp	Ala	Asp	Tyr	Thr	Phe	Phe	
					645					650					655		
	Asp	Gly	Pro	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Arg	Tyr	Thr	
			660					665						670			
55	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gly	Asp	Pro	Ala	Asn	Ser	Phe	Lys	Val	Gly	Ser	Tyr	
			675					680					685				

	Thr	Val	Val	Asp	Ala	Leu	Val	Arg	Tyr	Asp	Leu	Ala	Arg	Val	Gly	Met
	690						695					700				
5	Ala	Gly	Ser	Asn	Val	Ala	Leu	His	Val	Asn	Asn	Leu	Phe	Asp	Arg	Glu
	705					710				715						720
	Tyr	Val	Ala	Ser	Cys	Phe	Asn	Thr	Tyr	Gly	Cys	Phe	Trp	Gly	Ala	Glu
					725					730					735	
10	Arg	Gln	Val	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Phe	Arg	Phe					
					740				745							

<210> 48

<211> 1341

15 <212> DNA

<213> Escherichia coli str.K-12 substr.W3110

<220>

<221> gene

20 <222> (1)..(1341)

<223> lamB

<400> 48

25

30

35

40

45

50

55

	atgatgatta ctctgcgcaa acttccctctg gcggttgccg tgcagcggg cgtaatgtct	60
	gctcaggcaa tggctgttga ttccacggc tatgcacgtt ccggtattgg ttggacaggt	120
5	agcggcgggtg aacaacagtg ttccagact accggtgctc aaagtaaata ccgtcttggc	180
	aacgaatgtg aaacttatgc tgaattaaaa ttgggtcagg aagtgtggaa agagggcgat	240
	aagagcttct atttcgacac taacgtggcc tattccgtcg cacaacagaa tgactgggaa	300
10	gctaccgatc cggccttcg tgaagcaaac gtgcagggtg aaaacctgat cgaatggctg	360
	ccaggctcca ccattctggc aggttaagcg ttctaccaac gtcattgacgt tcatatgatc	420
15	gacttctact actgggatat ttctggctct ggtgccggtc tggaaaacat cgatgttggc	480
	ttcggtaaac tctctctggc agcaaccgc tctctgaag ctggtggttc ttctctttc	540
	gccagcaaca atatttatga ctataccaac gaaaccgca acgacgtttt cgatgtgcgt	600
20	ttagcgcaga tggaaatcaa cccgggcggc acattagaac tgggtgtcga ctacggtcgt	660
	gccaaacttg gtgataacta tcgtctggtt gatggcgcat cgaagacgg ctggttattc	720
	actgctgaac atactcagag tgcctgaag ggctttaaca agtttgttgt tcagtacgct	780
25	actgactcga tgacctcgca gggtaaaagg ctgtcgcagg gttctggcgt tgcatttgat	840
	aacgaaaaat ttgcctacaa tatcaacaac aacggtcaca tgcctgcgtat cctcgaccac	900
30	ggtgcgatct ccattggcga caactgggac atgatgtacg tgggtatgta ccaggatatc	960
	aactgggata acgacaacgg caccaagtgg tggaccgtcg gtattcgccc gatgtacaag	1020
	tggacgcaa tcatgagcac cgtgatggaa atcggtacg acaacgtcga atcccagcgc	1080
35	accggcgaca agaacaatca gtacaaaatt accctcgcac aacaatggca ggctggcgac	1140
	agcatctggt caccgccggc tattcgtgtc ttcgcaacct acgccaagtg ggatgagaaa	1200
40	tggggttacg actacaccgg taacgtgat aacaacgcga acttcggcaa agccgttctt	1260
	gctgatttca acggcggcag cttcggtcgt ggcgacagcg acgagtggac cttcggtgcc	1320
	cagatggaaa tctggtggtg a	1341
45	<210> 49 <211> 446 <212> PRT <213> Escherichia coli str. K-12 substr.W3110	
50	<400> 49	
55		

	Met	Met	Ile	Thr	Leu	Arg	Lys	Leu	Pro	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Ala	Ala	
	1				5				10						15		
5	Gly	Val	Met	Ser	Ala	Gln	Ala	Met	Ala	Val	Asp	Phe	His	Gly	Tyr	Ala	
				20					25					30			
	Arg	Ser	Gly	Ile	Gly	Trp	Thr	Gly	Ser	Gly	Gly	Glu	Gln	Gln	Cys	Phe	
			35					40					45				
10	Gln	Thr	Thr	Gly	Ala	Gln	Ser	Lys	Tyr	Arg	Leu	Gly	Asn	Glu	Cys	Glu	
		50					55					60					
	Thr	Tyr	Ala	Glu	Leu	Lys	Leu	Gly	Gln	Glu	Val	Trp	Lys	Glu	Gly	Asp	
	65					70				75						80	
15	Lys	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Thr	Asn	Val	Ala	Tyr	Ser	Val	Ala	Gln	Gln	
					85					90					95		
	Asn	Asp	Trp	Glu	Ala	Thr	Asp	Pro	Ala	Phe	Arg	Glu	Ala	Asn	Val	Gln	
				100					105					110			
20	Gly	Lys	Asn	Leu	Ile	Glu	Trp	Leu	Pro	Gly	Ser	Thr	Ile	Trp	Ala	Gly	
			115					120					125				
	Lys	Arg	Phe	Tyr	Gln	Arg	His	Asp	Val	His	Met	Ile	Asp	Phe	Tyr	Tyr	
		130					135					140					
25	Trp	Asp	Ile	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Leu	Glu	Asn	Ile	Asp	Val	Gly	
	145					150					155					160	
	Phe	Gly	Lys	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala	Thr	Arg	Ser	Ser	Glu	Ala	Gly	Gly	
30					165					170					175		
	Ser	Ser	Ser	Phe	Ala	Ser	Asn	Asn	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Asn	Glu	Thr	
				180					185					190			
35	Ala	Asn	Asp	Val	Phe	Asp	Val	Arg	Leu	Ala	Gln	Met	Glu	Ile	Asn	Pro	
			195					200					205				
	Gly	Gly	Thr	Leu	Glu	Leu	Gly	Val	Asp	Tyr	Gly	Arg	Ala	Asn	Leu	Arg	
		210					215					220					
40	Asp	Asn	Tyr	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Ala	Ser	Lys	Asp	Gly	Trp	Leu	Phe	
	225				230						235					240	
	Thr	Ala	Glu	His	Thr	Gln	Ser	Val	Leu	Lys	Gly	Phe	Asn	Lys	Phe	Val	
45					245					250					255		

50

55

Val Gln Tyr Ala Thr Asp Ser Met Thr Ser Gln Gly Lys Gly Leu Ser
 260 265 270
 5 Gln Gly Ser Gly Val Ala Phe Asp Asn Glu Lys Phe Ala Tyr Asn Ile
 275 280 285
 Asn Asn Asn Gly His Met Leu Arg Ile Leu Asp His Gly Ala Ile Ser
 290 295 300
 10 Met Gly Asp Asn Trp Asp Met Met Tyr Val Gly Met Tyr Gln Asp Ile
 305 310 315
 Asn Trp Asp Asn Asp Asn Gly Thr Lys Trp Trp Thr Val Gly Ile Arg
 325 330 335
 15 Pro Met Tyr Lys Trp Thr Pro Ile Met Ser Thr Val Met Glu Ile Gly
 340 345 350
 Tyr Asp Asn Val Glu Ser Gln Arg Thr Gly Asp Lys Asn Asn Gln Tyr
 355 360 365
 20 Lys Ile Thr Leu Ala Gln Gln Trp Gln Ala Gly Asp Ser Ile Trp Ser
 370 375 380
 Arg Pro Ala Ile Arg Val Phe Ala Thr Tyr Ala Lys Trp Asp Glu Lys
 385 390 395 400
 25 Trp Gly Tyr Asp Tyr Thr Gly Asn Ala Asp Asn Asn Ala Asn Phe Gly
 405 410 415
 Lys Ala Val Pro Ala Asp Phe Asn Gly Gly Ser Phe Gly Arg Gly Asp
 420 425 430
 Ser Asp Glu Trp Thr Phe Gly Ala Gln Met Glu Ile Trp Trp
 435 440 445

35 <210> 50
 <211> 1845
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli str. K-12 substr. W3110

40 <220>
 <221> gene
 <222> (1)..(1845)
 <223> btuB

45 <400> 50

atgattaaaa aagcttcgct gctgacggcg tgttccgtca cggcattttc cgcttgggca 60
 50 caggatacca gcccgatac tctcgctggt actgctaacc gttttgaaca gccgcgcagc 120
 actgtgcttg caccaaccac cgttgtgacc cgtcaggata tcgaccgctg gcagtcgacc 180
 tcgggtcaatg atgtgctgcg ccgtcttccg ggcgtcgata tcacccaaaa cggcgggttca 240
 55 ggtcagctct catctatttt ttttcgcggt acaaatgccg gtcattgtgtt ggtgttaatt 300
 gatggcgtag gcctgaatct ggcgggggtg agtggttctg ccgaccttag ccagttccct 360

attgcgcttg tccagcgtgt tgaatatatc cgtggggccgc gctccgctgt ttatgggtcc 420
 gatgcaatag gcggggtggt gaatatcatc acgacgcgcg atgaacccgg aacggaaatt 480
 5 tcagcaggggt ggggaagcaa tagttatcag aactatgatg tctctacgca gcaacaactg 540
 ggggataaga cacgggtaac gctgttgggc gattatgcc atactcatgg ttatgatgtt 600
 gttgcctatg gtaataccgg aacgcaagcg cagacagata acgatggttt ttttaagtaaa 660
 10 acgctttatg gcgcgctgga gcataacttt actgatgcct ggagcggctt tgtgcgcggc 720
 tatggctatg ataaccgtac caattatgac gcgtattatt ctcccggttc accgttgctc 780
 gatacccgta aactctatag ccaaagttgg gacgcccggc tgcgctataa cggcgaactg 840
 15 attaaatcac aactcattac cagctatagc catagcaaag attacaacta cgatcccat 900
 tatggtcgtt atgattcgtc ggcgacgctc gatgagatga agcaatacac cgtccagtgg 960
 20 gcaacaatg tcatcgttgg tcacggtagt attggtgcgg gtgtcgaactg gcagaaacag 1020
 actacgacgc cgggtacagg ttatgttgag gatggatatg atcaacgtaa taccggcatc 1080
 tatctgaccg ggctgcaaca agtcggcgat ttacctttg aaggcgcagc acgcagtgc 1140
 25 gataactcac agtttggtcg tcatggaacc tggcaaacca gcgccggttg ggaattcatc 1200
 gaaggttacc gcttcattgc ttctacggg acatcttata aggcacccaaa tctggggcaa 1260
 ctgtatggct tctacggaaa tccgaatctg gacccggaga aaagcaaaca gtgggaaggc 1320
 30 gcgtttgaag gcttaaccgc tggggtgaac tggcgtatit ccggatatcg taacgatgtc 1380
 agtgacttga tcgattatga tgatcacacc ctgaaatatt acaacgaagg gaaagcgcgcg 1440
 35 attaaagggcg tcgagggcgac cgccaatttt gataccggac cactgacgca tactgtgagt 1500
 tatgattatg tcgatgcgcg caatgcgatt accgacacgc cgttggttacg ccgtgctaaa 1560
 cagcaggtga aataccagct cgactggcag ttgtatgact tcgactgggg tattacttat 1620
 40 cagtatttag gcactcgcta tgataaggat tactcatctt atccttatca aaccgttaaa 1680
 atgggcgggtg tgagcttgtg ggatcttgcg gttgcgtatc cggtcacctc tcacctgaca 1740
 45 gttcgtggta aaatagccaa cctgttcgac aaagattatg agacagtcta tggctaccaa 1800
 actgcaggac ggggaatacac ctgtgtctggc agctacacct tctga 1845

<210> 51

<211> 614

<212> PRT

<213> Escherichia coli str. K-12 substr. W3110

<400> 51

Met Ile Lys Lys Ala Ser Leu Leu Thr Ala Cys Ser Val Thr Ala Phe
1 5 10 15

5 Ser Ala Trp Ala Gln Asp Thr Ser Pro Asp Thr Leu Val Val Thr Ala
20 25 30

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

	Asn	Arg	Phe	Glu	Gln	Pro	Arg	Ser	Thr	Val	Leu	Ala	Pro	Thr	Thr	Val	
			35					40					45				
5	Val	Thr	Arg	Gln	Asp	Ile	Asp	Arg	Trp	Gln	Ser	Thr	Ser	Val	Asn	Asp	
			50				55					60					
	Val	Leu	Arg	Arg	Leu	Pro	Gly	Val	Asp	Ile	Thr	Gln	Asn	Gly	Gly	Ser	
		65				70					75					80	
10	Gly	Gln	Leu	Ser	Ser	Ile	Phe	Ile	Arg	Gly	Thr	Asn	Ala	Ser	His	Val	
					85					90					95		
	Leu	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	Asn	Leu	Ala	Gly	Val	Ser	Gly	
				100					105					110			
15	Ser	Ala	Asp	Leu	Ser	Gln	Phe	Pro	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Arg	Val	Glu	
			115					120					125				
	Tyr	Ile	Arg	Gly	Pro	Arg	Ser	Ala	Val	Tyr	Gly	Ser	Asp	Ala	Ile	Gly	
		130					135					140					
20	Gly	Val	Val	Asn	Ile	Ile	Thr	Thr	Arg	Asp	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Ile	
		145				150					155					160	
	Ser	Ala	Gly	Trp	Gly	Ser	Asn	Ser	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Asp	Val	Ser	Thr	
				165						170					175		
25	Gln	Gln	Gln	Leu	Gly	Asp	Lys	Thr	Arg	Val	Thr	Leu	Leu	Gly	Asp	Tyr	
				180					185					190			
	Ala	His	Thr	His	Gly	Tyr	Asp	Val	Val	Ala	Tyr	Gly	Asn	Thr	Gly	Thr	
			195					200					205				
30	Gln	Ala	Gln	Thr	Asp	Asn	Asp	Gly	Phe	Leu	Ser	Lys	Thr	Leu	Tyr	Gly	
		210					215					220					
	Ala	Leu	Glu	His	Asn	Phe	Thr	Asp	Ala	Trp	Ser	Gly	Phe	Val	Arg	Gly	
35		225				230					235					240	
	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Asn	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Gly	
				245						250					255		
40	Ser	Pro	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Lys	Leu	Tyr	Ser	Gln	Ser	Trp	Asp	Ala	
			260						265					270			
	Gly	Leu	Arg	Tyr	Asn	Gly	Glu	Leu	Ile	Lys	Ser	Gln	Leu	Ile	Thr	Ser	
			275					280					285				
45	Tyr	Ser	His	Ser	Lys	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Pro	His	Tyr	Gly	Arg	Tyr	
		290					295					300					
	Asp	Ser	Ser	Ala	Thr	Leu	Asp	Glu	Met	Lys	Gln	Tyr	Thr	Val	Gln	Trp	
		305				310					315					320	
50	Ala	Asn	Asn	Val	Ile	Val	Gly	His	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Gly	Val	Asp	
				325						330					335		
	Trp	Gln	Lys	Gln	Thr	Thr	Thr	Pro	Gly	Thr	Gly	Tyr	Val	Glu	Asp	Gly	
				340					345					350			
55	Tyr	Asp	Gln	Arg	Asn	Thr	Gly	Ile	Tyr	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Gln	Val	
			355					360					365				

	Gly	Asp	Phe	Thr	Phe	Glu	Gly	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Asp	Asn	Ser	Gln	
	370						375					380					
5	Phe	Gly	Arg	His	Gly	Thr	Trp	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Trp	Glu	Phe	Ile	
	385					390					395					400	
	Glu	Gly	Tyr	Arg	Phe	Ile	Ala	Ser	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Lys	Ala	Pro	
					405					410					415		
10	Asn	Leu	Gly	Gln	Leu	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Gly	Asn	Pro	Asn	Leu	Asp	Pro	
				420					425					430			
	Glu	Lys	Ser	Lys	Gln	Trp	Glu	Gly	Ala	Phe	Glu	Gly	Leu	Thr	Ala	Gly	
			435					440					445				
15	Val	Asn	Trp	Arg	Ile	Ser	Gly	Tyr	Arg	Asn	Asp	Val	Ser	Asp	Leu	Ile	
	450						455					460					
	Asp	Tyr	Asp	Asp	His	Thr	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Gly	Lys	Ala	Arg	
	465					470					475					480	
20	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Ala	Thr	Ala	Asn	Phe	Asp	Thr	Gly	Pro	Leu	Thr	
				485						490					495		
	His	Thr	Val	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Val	Asp	Ala	Arg	Asn	Ala	Ile	Thr	Asp	
25				500					505					510			
	Thr	Pro	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Lys	Gln	Gln	Val	Lys	Tyr	Gln	Leu	Asp	
			515					520					525				
30	Trp	Gln	Leu	Tyr	Asp	Phe	Asp	Trp	Gly	Ile	Thr	Tyr	Gln	Tyr	Leu	Gly	
	530						535						540				
	Thr	Arg	Tyr	Asp	Lys	Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Gln	Thr	Val	Lys	
	545					550					555					560	
35	Met	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Trp	Asp	Leu	Ala	Val	Ala	Tyr	Pro	Val	Thr	
				565						570					575		
	Ser	His	Leu	Thr	Val	Arg	Gly	Lys	Ile	Ala	Asn	Leu	Phe	Asp	Lys	Asp	
			580					585					590				
40	Tyr	Glu	Thr	Val	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Thr	Ala	Gly	Arg	Glu	Tyr	Thr	Leu	
			595					600					605				
	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Phe											
45	610																

45

50

55