

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 032**

51 Int. Cl.:

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2015 PCT/KR2015/002548**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15142020**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2015 E 15765883 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3119875**

54 Título: **Microorganismos que producen L-aminoácidos y proceso para producir L-aminoácidos usando los mismos**

30 Prioridad:

21.03.2014 KR 20140033697

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.07.2019

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
Dongho-ro 330, Ssangnim-dong, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, JI SUN;
SEO, CHANG IL;
CHEONG, KI YONG;
KOH, EUN SUNG;
KWON, DO HYUN y
LEE, KWANG HO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 720 032 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microorganismos que producen L-aminoácidos y proceso para producir L-aminoácidos usando los mismos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante que produce un L-aminoácido y un método para producir un L-aminoácido usando el microorganismo recombinante.

10 Técnica antecedente

Se han usado diversos procesos de fermentación usando microorganismos para producción en masa de metabolitos útiles, por ejemplo, aminoácidos, y asimismo, se han desarrollado una diversidad de técnicas incluyendo desarrollo de cepas, establecimiento de condiciones de fermentación, o similares, para la fermentación exitosa usando los microorganismos. En particular, para el desarrollo de una cepa hospedadora para producción en masa de metabolitos útiles, se han realizado muchos intentos de inducir sobreexpresión o expresión baja de un gen específico.

Sin embargo, en la producción fermentativa usando bacterias, la producción de metabolitos útiles puede reducirse debido a la contaminación de fagos. La contaminación de fagos está provocada principalmente debido a receptores de fagos, que son proteínas, polisacáridos lipídicos, o similares, que son capaces de unir fagos a una superficie bacteriana. En el caso de *Escherichia coli* (*E. coli*), *E. coli* es atacada por una diversidad de fagos y, en consecuencia, el estudio de receptores para cada uno de los fagos ha sido relativamente exitoso. Sin embargo, el estudio de la relación entre los receptores de fagos y la producción de L-aminoácidos no se ha llevado a cabo aún lo suficiente.

A este respecto, los inventores de la presente invención seleccionan genes que son receptores de fagos bien conocidos y, después, inactivan cada uno de los genes, para reducir el riesgo de la reducción de la producción de L-aminoácidos, considerándose el riesgo una vulnerabilidad de *E. coli*. A continuación, se confirma la influencia en la producción de L-aminoácidos, y dicha selección e inactivación de los genes se aplica a cepas productoras de L-aminoácidos, completando de esta forma la presente invención.

30

Divulgación de la invención

Problema técnico

35 La presente invención proporciona un microorganismo recombinante que tiene capacidad de producción de L-aminoácidos y un receptor de fago inactivado.

La presente invención proporciona un método de producción de un L-aminoácido usando el microorganismo.

40 Solución al problema

En un aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante que produce L-aminoácido en el que al menos una de NfrA y NfrB están inactivadas.

45 El término "NrfA" como se utiliza en el presente documento se refiere a una proteína que forma un receptor para bacteriófago N4 y puede ser una proteína de membrana de bacterias. Por ejemplo, NrfA puede ser una subunidad de una proteína de membrana externa. La NfrA puede incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40. La NfrA puede incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más o 95 % o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40. Una secuencia de un gen que codifica la NfrA puede incluir una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40. La secuencia del gen que codifica la NfrA puede incluir, por ejemplo, una secuencia de un gen *nfrA* (NCBI Gene ID: 12930896). Por ejemplo, la secuencia del gen que codifica la NfrA puede incluir una secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 39, o una secuencia polinucleotídica que tiene aproximadamente 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más o 95 % o más identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 39.

55

El término "NrfB" como se utiliza en el presente documento se refiere a una proteína que forma un receptor para bacteriófago N4 y puede ser una proteína de membrana de bacterias. Por ejemplo, NrfB puede ser una subunidad de una proteína de membrana interna. La NfrB puede incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. La NfrB puede incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más o 95 % o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. Una secuencia de un gen que codifica la NfrB puede incluir una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. La secuencia del gen que codifica la NfrB puede incluir, por ejemplo, una secuencia de un gen *nfrB* (NCBI Gene ID: 12933943). Por ejemplo, la secuencia del gen que codifica la proteína NfrB puede incluir una secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 41, o una secuencia polinucleotídica que tiene aproximadamente 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más o 95 % o más

65

identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 41.

Además, en el microorganismo recombinante que produce un L-aminoácido, puede inactivarse adicionalmente al menos uno de Tsx y FhuA.

5 El término "Tsx" como se utiliza en el presente documento se refiere a una proteína formadora de un canal de nucleósidos, es decir, un canal específico para un nucleósido, y puede ser un componente que forma un receptor para fago T6 y colicina K. La Tsx puede incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o una
10 secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más o 95 % o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45. Una secuencia de un gen que codifica la Tsx puede incluir una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45. La secuencia del gen que codifica la Tsx puede incluir, por ejemplo, una secuencia de un gen *tsx* (NCBI Gene ID: 12934188). Por ejemplo, la secuencia del gen que codifica la Tsx puede incluir una secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 44, o una secuencia polinucleotídica que tiene aproximadamente 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más
15 o 95 % o más identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 44.

La expresión "FhuA" como se utiliza en el presente documento se refiere a una proteína multifuncional en una membrana externa de bacterias que transporta (Fe^{3+}) ferricromo o antibióticos, tal como albomicina y rifamicina, y puede ser un receptor para fagos T1, T5 y phi80. La FhuA puede incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos
20 de la SEQ ID NO: 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más o 95 % o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47. Una secuencia de un gen que codifica la FhuA puede incluir una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47. La secuencia del gen que codifica la proteína FhuA puede incluir, por ejemplo, una secuencia de un gen *fhuA* (NCBI Gene ID: 12930751). Por ejemplo, la secuencia del gen que codifica la FhuA puede incluir una
25 secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 47, o una secuencia polinucleotídica que tiene aproximadamente 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más o 95 % o más identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 47.

El término "identidad" como se utiliza en el presente documento se refiere a igualdad entre dos secuencias de aminoácidos, que puede determinarse mediante un método que es bien conocido en la técnica, por ejemplo, el algoritmo BLAST 2.0 que define parámetros, tales como una puntuación, una identidad y una similitud entre dos secuencias de aminoácidos.

La expresión "microorganismo recombinante" como se utiliza en el presente documento se refiere a un microorganismo que está modificado genéticamente. El microorganismo recombinante puede ser un microorganismo que está modificado por ingeniería genética y, por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede introducirse en un microorganismo según métodos de ingeniería genética, o puede transformarse una secuencia o localización de un gen endógeno en un microorganismo.

40 La expresión "L-aminoácido" como se utiliza en el presente documento se refiere a una unidad estructural básica de una proteína que constituye el cuerpo de un organismo y que tiene tanto un grupo amino como un grupo ácido carboxílico que se unen con el mismo átomo de carbono. Por ejemplo, el L-aminoácido puede seleccionarse del grupo que consiste en L-leucina, L-fenilalanina, L-lisina, L-treonina, L-valina, L-isoleucina, L-triptófano y L-metionina. Por ejemplo, el L-aminoácido puede ser L-triptófano o L-treonina.

45 La expresión "una enzima o una proteína se inactiva" o "inactivación de una enzima o una proteína" como se utiliza en el presente documento se refiere a un caso donde la proteína anteriormente descrita no se expresa en absoluto en un microorganismo, un caso donde la proteína anteriormente descrita se expresa, pero no tiene ninguna actividad, o un caso donde la proteína anteriormente descrita se expresa, pero la actividad de la misma es débil en comparación con la actividad intrínseca. La expresión "actividad intrínseca" como se utiliza en el presente documento se refiere a la actividad de un microorganismo en un estado natural, es decir actividad que existe originalmente en un microorganismo, o actividad de una proteína que no se ha modificado genéticamente.

50 La inactivación de la proteína NfrA, la proteína NfrB, la proteína Tsx y la proteína FhuA puede estar provocada por mutación, supresión o alteración de genes que codifican cada uno la proteína NfrA, la proteína NfrB, la proteína Tsx y la proteína FhuA. La expresión "mutación, supresión o alteración de los genes" como se utiliza en el presente documento se refiere a un caso donde una parte o todos los genes o factores reguladores en regiones promotoras o terminadoras de los genes se mutan, sustituyen, suprimen o insertan con al menos una base, de modo que los genes no se expresan o los genes se expresan en una cantidad pequeña, o los genes se expresan sin mostrar actividad
60 enzimática o con actividad enzimática reducida. La mutación, supresión o alteración de los genes puede conseguirse por manipulación genética, tal como recombinación homóloga, mutagénesis o evolución molecular. Cuando una célula incluye una pluralidad de los mismos genes o al menos dos genes homólogos, uno o más genes pueden suprimirse o alterarse en la célula. Para inactivar los genes proporcionados en una realización de la presente invención, pueden llevarse a cabo métodos de fabricación de un mutante usando una Red recombinasa lambda.

65 El microorganismo recombinante retira o reduce la actividad de cada una de las proteínas proporcionadas en el

presente documento o las proteínas en combinación. En consecuencia, el microorganismo recombinante puede tener capacidad de producción potenciada del L-aminoácido en comparación con el caso donde la actividad de las proteínas no está inactivada y, por tanto, el microorganismo recombinante puede usarse de forma apropiada para el fin de producir el L-aminoácido.

5 El microorganismo recombinante, puede ser un microorganismo del género *Escherichia*, el microorganismo del género *Escherichia* puede ser *Escherichia coli* (*E. coli*), por ejemplo, KCCM11501P. La KCCM11501P es una cepa KCCM10910P Δ *nfrAB* preparada usando una cepa productora de treonina (KCCM10910P) como una cepa original y realizar supresión de los genes tanto *nfrA* como *nfrB*. En este caso, se ha descubierto que la capacidad de consumo de azúcar en la *E. coli* KCCM11501P es mayor que en la cepa original (KCCM10910P). La KCCM11501P se denominó 'E. coli CA03-8253P' y, después, se depositó en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (en lo sucesivo en el presente documento, denominado 'KCCM') el 13 de diciembre de 2013 según el tratado de Budapest.

15 Según otro aspecto de la presente invención, se desvela un método para producir el L-aminoácido, incluyendo el método: cultivar el microorganismo recombinante que produce el L-aminoácido; y recoger el L-aminoácido del producto de cultivo.

El microorganismo recombinante que produce el L-aminoácido se define igual que se ha descrito anteriormente.

20 El L-aminoácido puede seleccionarse del grupo que consiste en L-leucina, L-fenilalanina, L-lisina, L-treonina, L-valina, L-isoleucina, L-triptófano y L-metionina. Por ejemplo, el L-aminoácido puede ser L-treonina o L-triptófano. El cultivo del microorganismo recombinante puede conseguirse de acuerdo con un medio de cultivo apropiado y condiciones de cultivo que se conocen bien en la técnica. Además, un experto habitual en la materia puede ajustar de forma apropiada un medio de cultivo y condiciones de cultivo según el microorganismo seleccionado. El método de cultivo puede incluir un cultivo discontinuo, un cultivo continuo, un cultivo semicontinuo, o una combinación de los mismos.

El medio de cultivo puede incluir una diversidad de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno e ingredientes oligoelementos.

30 Las fuentes de carbono pueden incluir, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; grasas, tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcohol, tal como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, o una combinación de los mismos. El cultivo del microorganismo recombinante puede realizarse usando glucosa como una fuente de carbono. Las fuentes de nitrógeno pueden incluir, por ejemplo, fuentes de nitrógeno orgánicas, tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, agua de macerado de maíz (AMM) y harina de soja; y fuentes de nitrógeno inorgánicas, tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio; o una combinación de los mismos. El medio de cultivo puede incluir, como una fuente de fósforo, dihidrógeno fosfato de potasio o hidrógeno fosfato de potasio. Además, el medio de cultivo puede incluir sales que contienen sodio correspondientes a la fuente de fósforo y sales metálicas, tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, el medio de cultivo puede incluir aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. El medio o los ingredientes individuales del medio pueden añadirse al medio de cultivo de una manera discontinua o continua.

45 Además, pueden añadirse compuestos, tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico al medio de cultivo durante el cultivo del microorganismo recombinantes de una manera apropiada, para ajustar el pH del medio de cultivo. Además, pueden usarse agentes antiespumantes, tales como éster poliglicólico de ácidos grasos, durante el cultivo del microorganismo recombinante, para suprimir la producción de burbujas de aire. Para mantener las condiciones aeróbicas del medio de cultivo, puede inyectarse oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) en el medio de cultivo. En este caso, una temperatura del medio de cultivo puede estar habitualmente en un intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C. Un periodo del cultivo del microorganismo recombinante puede durar hasta que se obtenga una cantidad deseada del L-aminoácido y, por ejemplo, el cultivo del microorganismo recombinante puede durar de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 160 horas.

55 La expresión "producto de cultivo" como se utiliza en el presente documento se refiere a un caldo de cultivo que contiene el microorganismo recombinante, un sobrenadante de cultivo del que se retira una célula microbiana o una solución diluida del producto de cultivo. El medio de cultivo puede incluir además un ingrediente para aumentar la productividad del L-aminoácido. Por ejemplo, la composición puede incluir además fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno o ingredientes oligoelementos.

60 La recogida del L-aminoácido del producto de cultivo puede realizarse mediante métodos de cultivo apropiados conocidos en la técnica, tales como un cultivo discontinuo, un cultivo continuo o un cultivo semicontinuo, para recoger o recuperar el L-aminoácido producido en el producto de cultivo.

65 **Efectos ventajosos de la invención**

Según un aspecto, puede usarse un microorganismo con actividad eliminada o reducida de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en NfrA y NfrB para producir un L-aminoácido. El microorganismo puede tener adicionalmente al menos uno de Tsx y FhuA inactivado.

- 5 Según otro aspecto, puede usarse un método para producir un L-aminoácido para producir un L-aminoácido de una manera eficaz.

Modo de la invención

- 10 En lo sucesivo en el presente documento, a presente invención se describirá en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son únicamente para fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

15 **Ejemplo 1. Preparación de cepa productora de treonina que tiene receptor de fago inactivado usando KCCM10910P**

Para preparar una cepa productora de treonina que tiene un receptor de fago inactivado, se usó una cepa KCCM10910P (patente coreana n.º 10-0966324) como una cepa original. Después, se preparó un casete para inactivar un gen para cada receptor de fago y, después, se usó para permitir la transformación genética.

20

1-1. Preparación de cepa productora de treonina que tiene gen *nfrA* inactivado

Para preparar una cepa productora de treonina que tiene un gen *nfrA* inactivado, se preparó un casete para inactivar un gen *nfrA*. El casete usó un método de inactivación en una etapa, que es una técnica de construcción de un mutante usando Red recombinasa lambda desarrollada por Datsenko KA *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) 97:6640-6645). Para confirmar la inserción del casete en el gen, se usó un gen resistente a cloranfenicol de pUCprmfloxC como un marcador (publicación abierta a inspección pública de patente coreana n.º: 2009-007554).

25

Se obtuvo un fragmento de ADN de 1,1 kb que incluía una parte de una secuencia del gen *nfrA* (SEQ ID NO: 39) y una parte de una secuencia de bases del gen resistente a cloranfenicol de un pUCprmfloxC usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 2 y 3. En este caso, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo en el presente documento, denominada "PCR") usando un kit de premezcla de PCR (es decir, un producto de la compañía BIONEER, en lo sucesivo en el presente documento, se usó el mismo producto) en las siguientes condiciones: 27 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto. El producto de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % y, después, se eluyó. A continuación, se realizó de nuevo PCR usando el producto eluido como un molde y un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 1 y 4 en las mismas condiciones descritas anteriormente, dando como resultado un fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb. El fragmento de ADN se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, se eluyó y, después, se usó finalmente para preparar el casete para inactivar el gen *nfrA*.

30

35

40

Para preparar una cepa productora de treonina que tiene el gen *nfrA* inactivado, se preparó una cepa productora de treonina (KCCM10910P), que se transformó con un plásmido pKD46 según el método desarrollado por Datsenko KA *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) 97:6640-6645), como una cepa competente. Después, se introdujo ADN del casete preparado para inactivar el gen *nfrA* en la cepa para permitir la transformación.

45

La cepa obtenida se seleccionó en una placa de LB que tenía resistencia a cloranfenicol. Es decir, se usó un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 5 y 6, que tiene una secuencia de ADN que queda fuera de dos extremos de una secuencia homóloga de *nfrA* del casete para inactivación genómica, para seleccionar de este modo colonias donde el tamaño del producto de PCR resultante se redujo de 2,8 kb a 1,5 kb.

50

La cepa recombinante primaria que tenía resistencia a cloranfenicol se retiró del plásmido pKD46 y, después, se le introdujo un plásmido pJW168 para retirar el gen marcador de cloranfenicol de las células microbianas (Gene, (2000) 247,255-264). Después, se realizó PCR usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 5 y 6 para obtener un producto de ADN de 0,4 kb, lo que indica que la cepa finalmente obtenida tenía un tamaño de ADN reducido. En consecuencia, se preparó la cepa productora de L-treonina que tiene el gen *nfrA* inactivado (KCCM10910PΔ*nfrA*).

55

1-2. Preparación de cepa productora de treonina que tiene gen *nfrB* inactivado

Para preparar una cepa productora de treonina que tiene un gen *nfrB* inactivado (SEQ ID NO: 41), un casete para inactivar un gen *nfrB* se preparó de la misma manera que en la preparación del casete para inactivar el gen *nfrA* del Ejemplo 1-1. Se obtuvo un fragmento de ADN de 1,1 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 8 y 9 y, después, se preparó un fragmento de ADN de 1,2 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 7 y 10.

60

Se llevó a cabo un método para preparar una cepa productora de treonina que tiene el gen *nfrB* inactivado por el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1, en donde un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 11 y 12 se usó para confirmar el tamaño del producto de PCR resultante. En consecuencia, se preparó finalmente la cepa productora de

65

L-treonina que tiene el gen *nfrB* inactivado (KCCM10910PΔ*nfrB*).

1-3. Preparación de cepa productora de treonina que tiene gen *nfrAB* inactivado

5 Para preparar una cepa productora de treonina que tiene un gen *nfrAB* inactivado (SEQ ID NO: 43), un casete para inactivar un gen *nfrAB* se preparó de la misma manera que en la preparación del casete para inactivar el gen *nfrA* del Ejemplo 1-1. Se obtuvo un fragmento de ADN de 1,1 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 2 y 9 y, después, se preparó un fragmento de ADN de 1,2 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1 y 10.

10 Se llevó a cabo un método para preparar una cepa productora de treonina que tiene el gen *nfrAB* inactivado por el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1, en donde un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 5 y 12 se usó para confirmar el tamaño del producto de PCR resultante. En consecuencia, se preparó finalmente la cepa productora de L-treonina que tiene el gen *nfrAB* inactivado (KCCM10910PΔ*nfrAB*).

1-4. Preparación de cepa productora de treonina que tiene gen *tsx* inactivado

20 Para preparar una cepa productora de treonina que tiene un gen *tsx* inactivado (SEQ ID NO: 44), un casete para inactivar un gen *tsx* se preparó de la misma manera que en la preparación del casete para inactivar el gen *nfrA* del Ejemplo 1-1. Se obtuvo un fragmento de ADN de 1,1 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 13 y 14 y, después, se preparó un fragmento de ADN de 1,2 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 15 y 16.

25 Se llevó a cabo un método para preparar la cepa productora de treonina que tiene el gen *tsx* inactivado por el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1, en donde un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 17 y 18 se usó para confirmar el tamaño del producto de PCR resultante. En consecuencia, se preparó finalmente la cepa productora de L-treonina que tiene gen *tsx* inactivado (KCCM10910PΔ*tsx*).

1-5. Preparación de cepa productora de treonina que tiene gen *fhuA* inactivado

30 Para preparar una cepa productora de treonina que tiene un gen *fhuA* inactivado (SEQ ID NO: 46), un casete para inactivar un gen *fhuA* se preparó según el método de inactivación de una etapa descrita anteriormente. Para obtener un fragmento de ADN con una secuencia de bases que tiene homología con una secuencia del gen *fhuA*, se usaron un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 19 y 20 y un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 21 y 22, dando como resultado la producción de productos de PCR. Además, para obtener un fragmento de ADN con una secuencia de bases que tiene resistencia a cloranfenicol, se usó un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 23 y 24, dando como resultado la producción de un producto de PCR. En consecuencia, estos tres productos de PCR resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, después, se eluyeron. Se realizó PCR usando estos tres productos de PCR eluidos como moldes y un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 19 y 22 para preparar un casete para inactivar el gen *fhuA*.

40 Para preparar una cepa productora de treonina que tiene el gen *fhuA* inactivado, el casete para inactivar el gen *fhuA* se preparó por el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1, en donde un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 25 y 26 se usó para confirmar el tamaño de los productos de PCR resultantes. En consecuencia, se preparó finalmente la cepa productora de L-treonina que tiene el gen *fhuA* inactivado (KCCM10910PΔ*fhuA*).

1-6. Preparación de cepa productora de treonina que tiene gen *lamB* inactivado

50 Para preparar una cepa productora de treonina que tiene un gen *lamB* inactivado (SEQ ID NO: 48), un casete para inactivar un gen *lamB* se preparó según el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1. Se obtuvo un fragmento de ADN de 1,1 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 27 y 28 y, después, se preparó un fragmento de ADN de 1,2 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 29 y 30.

55 Se llevó a cabo un método para preparar la cepa productora de treonina que tiene el gen *lamB* inactivado por el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1, en donde un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 31 y 32 se usó para confirmar el tamaño del producto de PCR resultante. En consecuencia, se preparó finalmente la cepa productora de L-treonina que tiene gen *lamB* inactivado (KCCM10910PΔ*lamB*).

1-7. Preparación de cepa productora de treonina que tiene gen *btuB* inactivado

60 Para preparar una cepa productora de treonina que tiene un gen *btuB* inactivado (SEQ ID NO: 50), un casete para inactivar un gen *btuB* se preparó según el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1. Se obtuvo un fragmento de ADN de 1,1 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 33 y 34 y, después, se preparó un fragmento de ADN de 1,2 kb usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 35 y 36.

65 Se llevó a cabo un método para preparar la cepa productora de treonina que tiene el gen *btuB* inactivado por el mismo método descrito en el Ejemplo 1-1, en donde un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 37 y 38 se usó para

confirmar el tamaño del producto de PCR resultante. En consecuencia, se preparó finalmente la cepa productora de L-treonina que tiene el gen *btuB* inactivado (KCCM10910P*btuB*).

Ejemplo 2. Comparación de la productividad de L-treonina entre microorganismos recombinantes

5 Los microorganismos recombinantes preparados según el Ejemplo 1 se cultivaron en un medio de titulación de treonina que contiene composiciones mostradas en la Tabla 1 posterior, en un matraz de Erlenmeyer. Después, se confirmó si los microorganismos recombinantes tenían capacidad de producción de L-treonina.

10 Tabla 1

[Tabla 1]

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	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-metionina	0,15 g
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	30 g
pH	6,8

15 Se inoculó 1 asa de platino de cada uno de los 7 tipos de las cepas de *E. coli* del Ejemplo 1 y la cepa KCCM10910P que se cultivaron durante una noche en el medio sólido de LB en un incubador a 33 °C en 25 ml de un medio de titulación que contenía composiciones mostradas en la Tabla 1 anterior y, después, se cultivó en un incubador a 33 °C y a 200 rpm durante 48 horas.

20 Tabla 2

[Tabla 2]

Cepa	Consumo de azúcar (g/l)	
	30 h	48 h
KCCM 10910P (cepa original)	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

25 Como se muestra en la Tabla 2 anterior, se ha confirmado que las velocidades de consumo de azúcar de las cepas que tenían cada una los genes *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* y *fhuA* inactivados fueron mayores que la velocidad de consumo de azúcar de la cepa original (KCCM10910P). También se confirmó que la tasa de producción de las cepas no se redujo durante un periodo de 48 horas. Al mismo tiempo, se confirmó que las velocidades de consumo de azúcar de las cepas que tenían cada una los genes *lamB* y *btuB* inactivados fueron similares a la velocidad de consumo de azúcar de la cepa original, o ligeramente más lentas que la velocidad de consumo de azúcar de la cepa original. También se confirmó que las concentraciones de L-treonina mostradas en las cepas del cultivo después de 48 horas fueron todas similares. Las cepas que tenían cada una los genes *nfrA*, *nfrB*, y *nfrAB* inactivados dieron como resultado los mismos resultados de cultivo. Es decir, el caso donde se suprimió uno de los dos genes y el caso donde se suprimieron ambos genes generaron los mismos resultados.

Ejemplo 3. Preparación de cepas con combinación de mutaciones eficaz y comparación en la capacidad de producción de L-treonina de las mismas

3-1. Preparación de cepas que tienen genes *nfrAB* y *fhuA* inactivados simultáneamente, genes *nfrAB* y *tsx* inactivados simultáneamente y genes *nfrAB*, *tsx* y *fhuA* inactivados simultáneamente

Para confirmar si el caso donde la inactivación combinada de los genes *nfrAB*, *fhuA*, y *tsx* que tienen capacidad de consumo de azúcar aumentada tiene capacidad de consumo de azúcar adicional en las cepas productoras de L-treonina, se prepararon una cepa KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*fhuA*, una cepa KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx* y una cepa KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx*Δ*fhuA*. Con el fin de preparar estas cepas, se prepararon cepas que tenían cada una los genes *fhuA* y *tsx* inactivados de acuerdo con la cepa KCCM10910PΔ*nfrAB* del Ejemplo 1-3 de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1 (dando como resultado las cepas KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*fhuA* y KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx*). Además, se preparó una cepa que tenía el gen *fhuA* inactivado de acuerdo con la cepa KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx*, preparando de este modo finalmente una cepa KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx*Δ*jhuA*.

Como se muestra en la Tabla 2, se determinó que las cepas que tenían los genes *nfrA*, *nfrB* y *nfrAB* inactivados tenían los mismos efectos entre sí. A este respecto, en la preparación de cepas con combinaciones de mutaciones eficaces, las cepas que tenían los genes *tsx* y *fhuA* inactivados se prepararon usando la cepa que tenía el gen *nfrAB* inactivado. Sin embargo, se determinó que los efectos de las cepas que tenían los genes *tsx* y *fhuA* inactivados eran iguales que los efectos de la cepa que tenía solamente el gen *nfrA* inactivado, solamente el gen *nfrB* inactivado o los genes *nfrA* y *nfrB* inactivados simultáneamente.

3-2. Comparación en la capacidad de producción de L-treonina de cepas con combinaciones de mutaciones eficaces

Para comparar la capacidad de producción de L-treonina de las cepas con combinación de mutaciones eficaces preparadas anteriormente, se usó un medio que contenía composiciones mostradas en la Tabla 1 anterior para cultivar cepas de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

25

Cepa	Consumo de azúcar (g/l)	
	30 h	48 h
KCCM10910P (cepa original)	22	34,5
KCCM10910PΔ <i>nfrAB</i>	26	34,4
KCCM 109 10PΔ <i>nfrAB</i> Δ <i>fhuA</i>	28	34,5
KCCM 10910PΔ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i>	28	34,4
KCCM 10910PΔ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i> Δ <i>fhuA</i>	29	34,5

Como resultado de un ensayo de potencia en la cepa KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*fhuA*, la cepa KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx* y la cepa KCCM10910PΔ*nfrAB*Δ*tsx*Δ*fhuA*, cada una preparada de acuerdo con la inactivación combinada de los genes *nfrAB*, *fhuA* y *tsx* que tienen capacidad de consumo de azúcar aumentada, se confirmó que la cepa en la que el gen *fhuA* o el gen *tsx* se inactivó adicionalmente además de la mutación por el gen *nfrAB* solamente aumentó la capacidad de consumo de azúcar. En consecuencia, la cepa KCCM10910PΔ*nfrAB* transformada que mostraba capacidad de consumo de azúcar aumentada se denominó '*E. coli* CA03-8253P' y, después, se depositó en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (KCCM) el 13 de diciembre de 2013 (N.º de registro: KCCM 11501P).

Ejemplo 4. Preparación de cepa que tiene receptor de fago inactivado usando KCCM-10132 y comparación en la capacidad de producción de treonina de la misma

4-1. Preparación de cepa que tiene receptor de fago inactivado usando KCCM-10132

40

Se prepararon 10 tipos de cepas que tenían cada una un receptor de fago inactivado usando una cepa KCCM-10132 (véase Tabla 4 posterior) de la misma manera que se ha descrito en los Ejemplos 1 y 3, de acuerdo con los 7 tipos de los casetes de inactivación del Ejemplo 1. La cepa KCCM-10132 se desveló en la patente coreana n.º: 10-0270510 como una cepa que tenía capacidad de producción de treonina procedente de *E. coli*.

45

4-2. Preparación de cepa que tiene receptor de fago inactivado usando KCCM-10132 y comparación en la capacidad de producción de treonina de la misma

Los 10 tipos de las cepas que tenían cada una el receptor de fago inactivado que se prepararon usando la cepa KCCM-10132 Del ejemplo 4-1 y la cepa original (KCCM-10132) se cultivaron en un medio que contenía las composiciones mostradas en la Tabla 1 por el mismo método que se describe en el Ejemplo 2. Después, las cepas cultivadas se evaluaron comparando la capacidad de producción de treonina de las mismas.

55

Tabla 4

[Tabla 4]

Cepa	Consumo de azúcar (g/l)	
	30 h	48 h
KCCM-10132 (cepa original)	32	20,2
KCCM-10132Δ <i>nfrA</i>	35	20,2
KCCM-10132Δ <i>nfrB</i>	35	20,1
KCCM-10132Δ <i>nfrAB</i>	36	20,2
KCCM-10132Δ <i>tsx</i>	35	20,2
KCCM-10132Δ <i>fhuA</i>	36	20,1
KCCM-10132Δ <i>lamB</i>	31	20,2
KCCM-10132Δ <i>btuB</i>	30	20,1
KCCM-10132Δ <i>nfrAB</i> Δ <i>fhuA</i>	38	20,2
KCCM-10132Δ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i>	38	20,1
KCCM-10132Δ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i> Δ <i>fhuA</i>	39	20,2

Como se muestra en la Tabla 4 anterior, se ha confirmado que las velocidades de consumo de azúcar de las cepas que tenían cada una los genes *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* y *fhuA* inactivados fueron mayores que la velocidad de consumo de azúcar de la cepa original (KCCM-10132). También se confirmó que la tasa de producción de las cepas no se redujo en un periodo de 48 horas. Al mismo tiempo, se confirmó que las velocidades de consumo de azúcar de las cepas que tenían cada una los genes *lamB* y *btuB* inactivados fueron similares a la velocidad de consumo de azúcar de la cepa original, o ligeramente más lentas que la velocidad de consumo de azúcar de la cepa original. También se confirmó que las concentraciones de L-treonina mostradas en las cepas del cultivo después de 48 horas fueron todas similares. También se confirmó que las cepas que tenían cada una los genes *nfrAB*, *fhuA*, *nfrAB* y *tsx* y los genes *nfrAB*, *tsx* y *fhuA* simultáneamente inactivados tenían velocidades de consumo de azúcar mejoradas en comparación con la velocidad de consumo de azúcar de la cepa que tiene solamente en gen *nfrAB* inactivado.

Ejemplo 5. Preparación de cepa que tiene receptor de fago inactivado usando KCCM11166P y comparación en la capacidad de producción de treonina de la misma

5-1. Preparación de cepa que tiene receptor de fago inactivado mediante el uso de KCCM11166P

Se prepararon 7 tipos de cepas productoras de triptófano que tenían cada una un receptor de fago inactivado usando un KCCM11166P (patente coreana n.º: 10-1261147) de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 1, de acuerdo con los 7 tipos de los casetes de inactivación del Ejemplo 1.

5-2. Preparación de cepa que tiene receptor de fago inactivado usando KCCM11166P y comparación en la capacidad de producción de treonina de la misma

Para evaluar la capacidad de producción de los 7 tipos de las cepas productoras de triptófano que tenían cada una el receptor de fago inactivado preparado usando la cepa KCCM11166P del Ejemplo 5-1, se usó un medio que contenía composiciones mostradas en la Tabla 5 a continuación. Es decir, las células microbianas se inocularon mediante un asa de platino y, después, se cultivaron durante una noche en el medio LB sólido. A continuación, se inoculó 1 asa de platino de cada una de las células microbianas en 25 ml de medio de titulación que contenía las composiciones mostradas en la Tabla 5 a continuación y, después, se cultivó en un incubador a 37 °C y a 200 rpm durante 48 horas. Los resultados obtenidos de la misma se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 5

[Tabla 5]

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	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
Citrato de sodio	5 g
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	40 g
Fenilalanina	0,15 g

Composición	Concentración (por litro)
Tirosina	0,1 g
pH	6,8

Tabla 6

[Tabla 6]

Cepa	Consumo de azúcar (g/l)		DO		L-triptófano (g/l)
	33 h	48 h	33 h	48 h	
KCCM11166P	56,8	56,8	14,0	14,0	7,2
KCCM11166PΔ <i>nfrA</i>	59,5	59,5	13,5	13,5	7,2
KCCM11166PΔ <i>nfrB</i>	59,5	59,5	13,5	13,5	7,2
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i>	59,5	59,5	13,5	13,5	7,2
KCCM11166PΔ <i>tsx</i>	60,2	60,2	14,3	14,3	7,1
KCCM11166PΔ <i>fhuA</i>	59,5	59,5	13,7	13,7	7,1
KCCM11166PΔ <i>lamB</i>	57,0	57,0	14,0	14,0	7,2
KCCM11166PΔ <i>btuB</i>	56,2	56,2	13,0	13,0	7,1

5 Como se muestra en la Tabla 6 anterior, en el caso de la supresión de cada uno de los genes *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* y *fhuA*, se ha confirmado que las cantidades de triptófano producidas en las cepas que tenían cada una los genes *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* y *fhuA* inactivados fueron similares mientras que las velocidades de consumo de azúcar de las cepas que tenían cada una los genes *nfrA*, *nfrB*, *nfrAB*, *tsx* y *fhuA* inactivados fueron ligeramente mayores que otras. Al mismo tiempo, en el caso de la supresión de cada uno de los genes *lamB* y *btuB*, se confirmó que las cantidades de triptófano producidas por las cepas que tenían cada una los genes *lamB* y *btuB* inactivados o las velocidades de consumo de azúcar de las cepas que tenían cada una la inactivación de genes *lamB* y *btuB* no cambiaron.

15 **Ejemplo 6. Preparación de cepas con combinación de mutaciones eficaz y comparación en la capacidad de producción de L-triptófano de las mismas**

20 **6-1. Preparación de cepas productoras de L-triptófano que tienen genes *nfrAB* y *fhuA* inactivados simultáneamente, genes *nfrAB* y *tsx* inactivados simultáneamente y genes *nfrAB*, *tsx* y *fhuA* inactivados simultáneamente**

25 Para confirmar si el caso donde la inactivación combinada de los genes *nfrAB*, *fhuA* y *tsx* que tienen capacidad de consumo de azúcar aumentada tiene capacidad de consumo de azúcar adicional en las cepas productoras de triptófano, se prepararon una cepa KCCM11166PΔ*nfrAB*Δ*fhuA*, una cepa KCCM11166PΔ*nfrAB*Δ*tsx* y una cepa KCCM11166PΔ*nfrAB*Δ*tsx*Δ*fhuA*.

30 **6-2. Comparación en la capacidad de producción de L-triptófano de cepas con combinación de mutaciones eficaz**

Para comparar la capacidad de producción de L-triptófano de los tres tipos de las cepas preparadas según el Ejemplo 6-1, se usó un medio que contenía composiciones mostradas en la Tabla 5 anterior para cultivar las cepas de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

[Tabla 7]

Cepa	Consumo de azúcar (g/l)		DO		L-triptófano (g/l)
	33 h	48 h	33 h	48 h	
KCCM11166P	56,8	56,8	14,0	14,0	7,2
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i>	59,5	59,5	13,5	13,5	7,2
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i>	61,0	61,0	14,0	14,0	7,2
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i> Δ <i>fhuA</i>	60,5	60,5	13,8	13,8	7,1
KCCM11166PΔ <i>nfrAB</i> Δ <i>tsx</i> Δ <i>fhuA</i>	62,0	62,0	14,0	14,0	7,2

Como resultado de un ensayo de potencia en las cepas productoras de triptófano con combinaciones de mutaciones eficaces, se confirmó que las cepas en las que el gen *fhuA* y/o el gen *tsx* se inactivó adicionalmente además de la mutación por el gen *nfrAB* solamente aumentó la capacidad de consumo de azúcar.

[Número de registro]

- 5 Institución depositaria: Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (internacional)
 Número de registro: KCCM11501P
 Fecha de depósito: 13 de diciembre de 2013

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
 INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA
 FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTE

FORMULARIO INTERNACIONAL

Para. CJ CheilJedang Corporation
 CJ CHEILJEDANG CENTER.
 330. DONGHO-RO.
 JUNG-GU, SEÚL 100-400,
 REPÚBLICA DE COREA

RECIBO EN EL CASO DE UN ORIGINAL expedido
 conforme a la Norma 7.1 de la AUTORIDAD
 DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la
 parte inferior de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE: <i>Escherichia coli</i> CA03-8253P	Número de registro proporcionado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: KCCM11501P
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I anterior estuvo acompañado de:	
<input type="checkbox"/> una descripción científica <input type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Márquese con una cruz donde corresponda)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anterior, que lo recibió el 13 de diciembre de 2013. (fecha del depósito original) ¹	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) la potestad para representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de oficial(es) autorizado(s):
Dirección: Yurim B/D 45. Hongjennale-2 ga-gil Seodaemun-gu SEÚL 120-861 República de Corea	Fecha: 13 de diciembre de 2013.

¹ Cuando rija la Norma 6.4(d), dicha fecha es la fecha en la que se adquirió el estado de autoridad depositaria internacional: cuando un depósito realizado fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito bajo el Tratado de Budapest, dicha fecha es la fecha en la que el microorganismo fue recibido por la autoridad depositaria internacional.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Microorganismos que producen L-aminoácidos y proceso de producción

5 <130> PX048447

<150> KR 2014/033697
<151> 21/03/2014

10 <160> 51

<170> KopatentIn 2.0

15 <210> 1
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador para inactivar nfrA

<400> 1
atgaaggaga ataaccttaa tcgcgatcgc ggatggtctg gtttactgct gacgtcttta 60

ttgagtacca 70

25 <210> 2
<211> 71
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador para inactivar nfrA

<400> 2
gacgtcttta ttgagtacca gcgcactcgc agacaatcgc ggcaccagcg taggtgacac 60

tatagaacgc g 71

35 <210> 3
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador para inactivar nfrA

<400> 3
aaccgttcgg gtgccattcg tcgctgtatt tgccgccatt aaagaatgag tagtggatct 60

45 gatgggtacc 70

<210> 4
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador para inactivar nfrA

55 <400> 4

	gcggatatat tgcgccgcat cgaggtacag gttttgggca aaccagcctg aaccgttcgg	60
	gtgccattcg	70
5	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador para inactivar nfrA	
	<400> 5 cgcgtcctga caattcaacg 20	
15	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador para inactivar nfrA	
	<400> 6 cgtgtcctg aacgtgagcg 20	
25	<210> 7 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador para inactivar nfrB	
	<400> 7	
	gtggactggc ttcttgatgt ttttgctacc tggctctacg gcttaaaagt aatcgcgata	60
35	acgttagcgg	70
40	<210> 8 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador para inactivar nfrB	
45	<400> 8	
	aatcgcgata acgttagcgg tcatcatggt catcagcggg ctggacgatt taggtgacac	60
	tatagaacgc	70
50	<210> 9 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador para inactivar nfrB	
	<400> 9	

	aacctgcttt gagtaatagt gattgcatcg aaacttgtaa ttcgcggtga tagtggatct	60
	gatgggtacc	70
5	<210> 10 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador para inactivar nfrB <400> 10	
	ttattctcct tcattttcgg actccagttg cgcaacctgt tctgtgttta aacctgcttt	60
	gagtaatagt	70
15	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador para inactivar nfrB	
25	<400> 11 caatagtcac acctattaat 20	
30	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador para inactivar nfrB <400> 12 ccccagctct tctgcgctgg 20	
40	<210> 13 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador para inactivar tsx <400> 13	
	ggcgctctct tcgtctttta ctgtcaacgc agctgaaaac gacaaaccgc tagtggatct	60
	gatgggtacc	70
50	<210> 14 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador para inactivar tsx <400> 14	

	cgttgaagtt gccgttgccg aagttcagtt ctgcatogtc gttccactga taggtgacac	60
	tatagaacgc	70
5	<210> 15 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador para inactivar tsx <400> 15	
	aacagtggca tacatatgaa aaaaacatta ctggcagccg gtgcggtact ggcgctctct	60
	tcgtctttta	70
15	<210> 16 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador para inactivar tsx <400> 16	
	tcagaagttg taacctacta ccaggttaacc accccagccg gtagagcgaa cgttgaagtt	60
25	gccgttgccg	70
30	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador para inactivar tsx <400> 17 tttataata ggctcctctg 20	
40	<210> 18 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador para inactivar tsx <400> 18 gccggacaaa gcgtttac 18	
50	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador para inactivar fhuA <400> 19 atggcgcgtt ccaaaactgc t 21	

<210> 20
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador para inactivar fhuA
 <400> 20
 10 cgcggtctat aggtcacct cgtgtagcta agcgcttctt 40
 <210> 21
 <211> 40
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para inactivar fhuA
 20 <400> 21
 ggtaccatc agatccacta ctcggtgtg ggctgactac 40
 <210> 22
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para inactivar fhuA
 30 <400> 22
 ttagaaacgg aaggtgagg t 21
 <210> 23
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para inactivar fhuA
 40 <400> 23
 gccgccagct gaagctttac c 21
 <210> 24
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para inactivar fhuA
 50 <400> 24
 tagtgatct gatgggtacc 20
 <210> 25
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cebador para inactivar fhuA
 <400> 25
 65 ctcaggaac gctcagattg c 21

	<210> 26		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> cebador para inactivar fhuA		
	<400> 26		
10	cggaatgatt cgtgtattcc t	21	
	<210> 27		
	<211> 70		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para inactivar lamB		
20	<400> 27		
	acgaccgaag ctgccgccgt tgaaatcagc aggaacggct ttgccgaagt tagtggatct		60
	gatgggtacc		70
	<210> 28		
25	<211> 71		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> cebador para inactivar lamB		
	<400> 28		
	gtaatgtctg ctcaggcaat ggctgttgat ttccacggct atgcacgttc taggtgacac		60
	tatagaacgc g		71
35	<210> 29		
	<211> 71		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> cebador para inactivar lamB		
	<400> 29		
45	ttaccaccag atttccatct gggcaccgaa ggtccactcg tcgctgtcgc cacgaccgaa		60
	gctgccgccg t		71
	<210> 30		
	<211> 71		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador para inactivar lamB		
55	<400> 30		

atgatgatta ctctgcgcaa acttcctctg gcggttgccg tgcgagcggg cgtaatgtct 60
gctcaggcaa t 71
 5 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador para inactivar lamB
 <400> 31
 cctacattg acagccgtg 20
 15 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cebador para inactivar lamB
 <400> 32
 cacacaaagc ctgtcacagg 20
 25 <210> 33
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador para inactivar btuB
 <400> 33
gtggttcaga aggtgtagct gccagacaag gtgtattccc gtccctgcagt tagtggatct 60
 35 **gatgggtacc** 70
 40 <210> 34
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para inactivar btuB
 45 <400> 34
gcccggatac tctcgtcggt actgctaacc gttttgaaca gccgcgcagc taggtgacac 60
tatagaacgc 70
 50 <210> 35
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador para inactivar btuB
 <400> 35

gactccggcg tccgtgggtt gtcggtctat aaacaccagc acggtgggac gtggttcaga 60
 aggtgtagct 70

5 <210> 36
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador para inactivar btuB
 <400> 36

gctgacggcg tgttccgtca cggcattttc cgcttgggca caggatacca gcccgatac 60
 tctcgtcgtt 70

15 <210> 37
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador para inactivar btuB

25 <400> 37
 atctggttct catcatcg 18

30 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador para inactivar btuB

40 <400> 38
 gcataaatgt aatggagatc 20

45 <210> 39
 <211> 2973
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* c. K-12 subc. W3110

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(2973)
 <223> nfrA

<400> 39

atgaaggaga ataaccttaa tccggtcattc ggatggtctg gtttactgct gacgtcttta 60
 ttgagtacca gcgcactcgc agacaatatc ggcaccagcg cagaagagct ggggctgagc 120
 gattatcgcc attttgttat ttatccccgt ctcgataaag cgctgaaggc acagaaaaat 180
 aacgacgaag caaccgccat ccgcgaattt gaatatatac accagcaggt gcccgataat 240

50

attccgctga	ctttatacct	tgcggaagcc	tatcgccatt	ttggtcatga	tgaccggggc	300
cggctgttgc	ttgaggatca	actgaaacgt	caccocaggag	atgcccgact	tgagcgcagt	360
ctggcggcta	ttccggttga	agtgaaaagc	gttacgacag	ttgaagaact	gcttgcccag	420
caaaaagcgt	gcgatgctgc	gccgaccctg	cgttgtcgca	gtgaagtcgg	gcagaatgcc	480
ctgctggctg	cacagttacc	tgtcgccaga	gcgcaactga	acgatgacg	gtttgctgca	540
tgcgccgaag	gaaaaacgct	gcgaaccgat	ctgctgcaac	gggcaatcta	cctgaaacaa	600
tggtcccagg	cagatacgtc	atacaatgaa	gcacgccagc	agaacacatt	aagcgcggca	660
gaacgccgtc	agtggtttga	cgctgcttct	gccgggcagc	tgagcagatc	gatcctggca	720
ctgcaatcac	aggggatctt	caccgatcct	cagtcataata	ttacttacgc	gaccgcgctg	780
gcttatcgtg	gcgaaaaagc	acgcctccag	cattatctca	ttgaaaataa	gccactatct	840
accacggacg	cacaagagaa	aagttggctc	tatctgttat	ctaaatacag	cgtaacccc	900
gttcaggcgt	tggcgaatta	tacggtagac	tttgccgaca	accgccagta	tgttgttggc	960
gcgacgctac	cggtgctggt	aaaagaaggt	cagtacgacg	cagcgcacaa	actgctcgcc	1020
accctccccg	ccaatgaaat	gcttgaggag	cgttatgctg	tcagcgtggc	gaccgcgtaac	1080
aaggctgaag	ctctgcgtct	ggcacgattg	ctgtatcagc	aagaaccggc	aatcttacc	1140
cgcttgatc	aactaacctg	gcaactgatg	cagaacgagc	agtcacgcga	agctgccgat	1200
ttattgctgc	aacgctatcc	ttccagggc	gatgcgcgtg	tcagccagac	tttaatggcg	1260
cgactggcgt	ctctgctgga	aagtcacctc	tacctggcaa	cgccggcgaa	ggtggcgatt	1320
ttatcgaac	ccttaccgct	ggcggagcaa	cgctcagtggc	aaagtcagtt	gccgggtatt	1380
gcagataatt	gcccggcaat	agttcgcttg	ctgggcgata	tgtcgccctc	ctacgatgcc	1440
gccgcctgga	accgtctggc	aaagtgttat	cgggacacgc	taccgggtgt	ggcgttgtat	1500
gcatggcttc	aggccgaaca	acgacaaccg	agcgcctggc	aacatcgtgc	ggtagcctat	1560
caggcgtatc	aggttgagga	ctacgccacc	gcactggcgg	cctggcagaa	aatcagtctt	1620
cacgacatga	gcaatgagga	tctgcttgct	gctgccaata	ccgccaggc	ggcaggaaat	1680
ggtgcggctc	gcgatcgctg	gctacaacag	gcagaaaaac	gtggactggg	aagcaatgcc	1740
ctctactggt	ggctgcatgc	gcaacgttac	attcctggtc	agccggaact	cgcaactgaac	1800
gatctcacgc	gctcaatcaa	tattgcccct	tctgccaacg	cttacgttgc	gcgggcgaca	1860
atttatcgcc	aacgtcataa	tgtcccggcc	gcggtgagtg	atttgcgcgc	cgcgctggaa	1920
ctggaaccga	ataatagcaa	caccocaggca	gcgcttgggt	acgccttgtg	ggatagcggg	1980
gatatcgac	agtcgcggga	aatgctcgaa	ccggcgcata	aagggcttcc	ggacgatccg	2040
gcactgatcc	gacaactggc	ctacgtgaac	cagcgtctgg	atgacatgcc	tgcgacgcag	2100
cactacgccc	ggctggtgat	tgatgacatt	gataatcagg	cgctgataac	cccactgacc	2160

ccagaacaaa atcaacaacg cttcaatttc cgccgtttgc atgaggaggt cggtcgccgc 2220
 tggacgttca gtttcgattc ttccatcggc ttgcgttccg gcgcaatgag taccgctaac 2280
 aataatgtcg gcgggcgcgc gccagggaaa agctatcgta gctacggaca actggaagcc 2340
 gagtaccgca tcggacgcaa tatgctgctg gaaggcgacc tgctctcagt ttatagccgc 2400
 gtctttgccg ataccggaga aaacgggggtg atgatgccgg tgaaaaatcc gatgtccggc 2460
 accggtctgc gctggaagcc gctgcgcgat cagatctttt tcatcgccgt cgaacagcag 2520
 ttgccgctga acggccaaaa tggcgcaccc gataccatgc tgcgcgccag cgcctcattc 2580
 tttaatggcg gcaaatacag cgacgaatgg caccogaacg gttcaggctg gtttgcccaa 2640
 aacctgtacc tcgatgcggc gcaatatatc cgccaggata ttcaggcgtg gacggcagat 2700
 tatcgcgtca gctggcatca gaaggtagct aacggacaga ctattgagcc ttacgctcac 2760
 gttcaggaca acggctatcg tgataaaggc actcagggcg cgcagcttgg cggagtcggg 2820
 gtcgcgtgga atatctggac cggcgagacg cactacgacg cctggccgca caaagtcaat 2880
 ctcggcgtcg agtatcaaca tacctttaag gcgattaatc aacgtaacgg agagcgcaac 2940
 aacgcgtttc tcaccattgg agtgcaactgg taa 2973

<210> 40
 <211> 990
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*. c. K-12 subc.W3110
 <400> 40

5

Met	Lys	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Arg	Val	Ile	Gly	Trp	Ser	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	
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			
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
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
			100					105					110		
Gly	Asp	Ala	Arg	Leu	Glu	Arg	Ser	Leu	Ala	Ala	Ile	Pro	Val	Glu	Val
		115					120					125			
Lys	Ser	Val	Thr	Thr	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Gln	Gln	Lys	Ala	Cys
		130				135					140				

10

Asp Ala Ala Pro Thr Leu Arg Cys Arg Ser Glu Val Gly Gln Asn Ala
 145 150 155 160
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 370 375 380
 Leu Thr Trp Gln Leu Met Gln Asn Glu Gln Ser Arg Glu Ala Ala Asp
 385 390 395 400
 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
 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
 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

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

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

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

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

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

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
 675 680 685

Val Asn Gln Arg Leu Asp Asp Met Pro Ala Thr Gln His Tyr Ala Arg
 690 695 700

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

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

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

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

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

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

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

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
 945 950 955 960

Leu Gly Val Glu Tyr Gln His Thr Phe Lys Ala Ile Asn Gln Arg Asn
 965 970 975

Gly Glu Arg Asn Asn Ala Phe Leu Thr Ile Gly Val His Trp
 980 985 990

<210> 41
 <211> 2238
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* c. K-12 subc. W3110

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(2238)
 <223> nfrB

<400> 41

gtggactggc ttcttgatgt ttttgctacc tggctctacg gcttaaaagt aatcgcgata 60
 acgttagcgg tcatcatggt catcagcggg ctggacgatt tttttattga tgtcgtctac 120
 tgggtacgcc gcattaaacg caagttgagt gtttatcgcc gctaccgcg aatgagttac 180
 cgcgaactgt ataaaccaga tgaaaaaccg ttagcgcatta tggttccggc gtggaatgaa 240
 acgggcgtca tcggcaatat ggccgagctg gcggcgacca cgctcgacta cgaaaactat 300
 catatctttg ttggcaccta cccaacgac cccgatactc agcgtgatgt tgacgaagtg 360
 tgcgctcgct tcccgaatgt gcataaggta gtctgcgcgc gtcttgcccc caccagcaaa 420
 gccgactgtc tgaacaacgt gctggacgcc atcacccaat ttgagcgtag cgccaatttc 480
 gcttttgctg gttttattct gcatgacgcc gaagatgtga tttcaccgat ggaattgcgt 540

ctgttcaact atctggtoga gcgtaaagat ctgattcaga tcccgggtga tccggttogaa 600
 cgcgaatgga cgcacttcac cagcatgact tacattgatg agttttcaga gctgcatggc 660
 aaagatgttc cggtgcgatga agccctcgcc ggacaagtgc ccagcgcagg cgctcggcacc 720
 tgtttcagcc gccgcgcoct gaccgcactg ttagctgacg gtgacggtat tgctttogac 780
 gtgcagagtc ttactgaaga ttacgacatt ggcttccgcc tgaaagaaaa aggtatgacg 840
 gaaatTTTTG tccgTTTTCC ggtggtggac gaagccaaag aacgcgagca gcgtaaattt 900
 ttacagcacg cgcggacatc aaacatgatc tgcgtgcgcg aatatttccc cgataccttt 960
 tcgactgcgg ttcgacaaaa atcccgtgg atcatcggca ttgttttcca aggctttaa 1020
 acccataaat ggacctcag cctgacgctg aactactttc tctggcgcga ccgcaaaggg 1080
 gcaatcagta actttgtcag cttcctcgcg atgctggtga tgatccagct tttgctggtg 1140
 ctggcgtatg aaagtttgtg gcccgatgcc tggcatttcc tttctatttt cagcggcagc 1200
 gcatggtaa tgaccctgct gtggctaaac tttggtttga tggtaaccg catcgtgcag 1260
 cgggtgattt tcgttactgg ctactacggc ctgacgcagg ggctgcttc cgtcctgcoct 1320
 cttttctggg gcaacctgat taacttcatt gccaaactggc gcgcgctaaa acaggtactt 1380
 caacacggcg atccacgtcg cgtggcgtgg gataaaaca cgcatgactt cccagcgtg 1440
 actggcgata cccgctcgtt gcgcccgtta ggtcaaattc tgctggaaaa tcaggtcctc 1500
 actgaagaac aactcgatac agcactgcoct aatcgcgtcg aaggctctac cctgggcoct 1560
 tcaatgctga tgcaggggct gattagcggc gagcagctgg cacagggcgt ggcagagcaa 1620
 aacggcgtgg cgtgggaatc catcgtgcc tggcagatcc cttcctcgtc gattgcojaa 1680
 atgccggcct ccgtggcgtc gcattatgco gtactgcoct tgcgtctgga aaatgacgag 1740
 ttaattgctg gcagtgaaga tggattgac ccggtttcgc tggcggccct gacgcgtaaa 1800
 gtcggacgca aagtgcgtta cgtcattgtt ctgcggggac aaattgtcac agggttacgt 1860
 cactggtatg cacgccgacg cggtcacgat ccgcgggcaa tggttgataa tgcggttcag 1920
 catcagtggc tcacggaaca gcaggccggc gaaatctggc ggcaatatgt gccgcatcag 1980
 ttcctgctcg ccgaaatact gaccacgctc ggtcatatta atcgttcagc aattaacgtg 2040
 ttgttattgc gccatgaacg cagttctctg ccgctcggca agtttttggc caccgaaggc 2100
 gttatcagcc aggaaacggt ggatcgcgtc ctgacaattc aacgcgaatt acaagttctg 2160
 atgcaatcac tattactcaa agcagggtta aacacagaac aggttgcoct actggagctc 2220
 gaaaatgaag gagaataa 2238

<210> 42
 <211> 745
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli* c. K-12 subc. W3110
 <400> 42

5

Met Asp Trp Leu Leu Asp Val Phe Ala Thr Trp Leu Tyr Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 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
 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
 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
 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
 130 135 140
 Asn Asn Val Leu Asp Ala Ile Thr Gln Phe Glu Arg Ser Ala Asn Phe
 145 150 155 160
 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
 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
 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
 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
 275 280 285
 Val Asp Glu Ala Lys Glu Arg Glu Gln Arg Lys Phe Leu Gln His Ala
 290 295 300
 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

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

Leu Ala Met Leu Val Met Ile Gln 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
 385 390 395 400

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

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

Pro Arg Arg Val Ala Trp Asp Lys Thr Thr His Asp Phe Pro Ser Val
 465 470 475 480

Thr Gly Asp Thr Arg Ser Leu Arg Pro Leu Gly Gln Ile Leu Leu Glu
 485 490 495

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

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
 545 550 555 560

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

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

Arg Arg Arg Gly His Asp Pro Arg Ala Met Leu Tyr Asn Ala Val Gln
 625 630 635 640

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
 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
 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 Leu Lys Ala Gly Leu Asn Thr Glu Gln Val Ala
 725 730 735
 Gln Leu Glu Ser Glu Asn Glu Gly Glu
 740 745

5 <210> 43
 <211> 6088
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* c. K-12 subc. W3110

10 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(6088)
 <223> nfrAB

<400> 43

gtggactggc ttcttgatgt ttttgctacc tggctctacg gcttaaaagt aatcgcgata 60
 acgttagcgg tcatcatggt catcagcggg ctggacgatt tttttattga tgtcgtctac 120
 tgggtacgcc gcattaaacg caagttgagt gtttatcgcc gctacccgcg aatgagttac 180
 cgcgaactgt ataaaccaga tgaaaaaccg ttagcggatta tggttccggc gtggaatgaa 240
 acgggcgta tgggcaatat ggccgagctg gcggcgacca cgctcgacta cgaaaactat 300
 catatctttg ttggcaccta cccaacgac cccgatactc agcgtgatgt tgacgaagtg 360
 tgcgctcgct tcccgaatgt gcataaggta gtctgcgcgc gtcctggccc caccagcaaa 420
 gccgactgtc tgaacaacgt gctggacgcc atcacccaat ttgagcgtag cgccaatttc 480
 gcttttgctg gttttattct gcatgacgcc gaagatgtga tttcaccgat ggaattgcgt 540
 ctgttcaact atctggtoga gcgtaaagat ctgattcaga tcccgggtga tccggtcgaa 600
 cgcgaatgga cgcacttcac cagcatgact tacattgatg agttttcaga gctgcatggc 660
 aaagatgttc cgggtcgtga agccctcgcc ggacaagtgc ccagcgcagg cgtcggcacc 720
 tgtttcagcc gccgcgccgt gaccgcactg ttagctgacg gtgacggtat tgctttcgac 780
 gtgcagagtc ttactgaaga ttacgacatt ggcttccgcc tgaaagaaaa aggtatgacg 840
 gaaatTTTTG tccgTTTTCC ggtggtggac gaagccaaag aacgcgagca gcgtaaattt 900
 15 ttacagcacg cgcggacatc aaacatgatc tgcgTgcgcg aatatttccc cgataccttt 960

tcgactgcg	ttogacaaaa	atcccgcctgg	atcatcggca	ttgttttcca	aggctttaa	1020
accataaat	ggacctocag	cctgacgctg	aactactttc	tctggcgcg	ccgcaaagg	1080
gcaatcagta	actttgtcag	cttcctcgcg	atgctgggta	tgatccagct	tttgcgttg	1140
ctggcgatg	aaagtttgtg	gcccgatgcc	tggcatttcc	tttctatfff	cagcggcagc	1200
gcatgggtaa	tgaccctgct	gtggctaaac	tttggtttga	tggttaaccg	catcgtgcag	1260
cggtgattt	tcgttactgg	ctactacggc	ctgacgcagg	ggctgctttc	cgtcctgcgt	1320
cttttctggg	gcaacctgat	taacttcatg	gccaaactggc	gcgcgctaaa	acaggtactt	1380
caacacggcg	atccacgtcg	cgtggcggtg	gataaaaca	cgcatgactt	ccccagcgtg	1440
actggcgata	cccgcctcgtt	gcgcccgtta	ggtcaaattc	tgctggaaaa	tcaggtcatc	1500
actgaagaac	aactcgatac	agcactgcgt	aatcgcgtcg	aaggtctacg	cctggggcgt	1560
tcaatgctga	tgacggggct	gattagcgcc	gagcagctgg	cacaggcgct	ggcagagcaa	1620
aacggcgtgg	cgtgggaatc	catcgatgcc	tggcagatcc	cttcctcgcct	gattgccgaa	1680
atgccggcct	ccgtggcgct	gcattatgcg	gtactgcgcg	tgctctgga	aaatgacgag	1740
ttaattgtcg	gcagtgaaga	tggattgac	ccggtttcgc	tgccggccct	gacgcgtaaa	1800
gtcggacgca	aagtgcgtta	cgctattggt	ctgcggggac	aaattgtcac	agggttacgt	1860
cactggatg	caagccgacg	cggtcacgat	ccgcgggcaa	tggtgtataa	tgccggttcag	1920
catcagtgcc	tcacggaaca	gcaggccggt	gaaatctggc	ggcaatatgt	gccgcatcag	1980
ttcctgttcg	ccgaaatact	gaccacgctc	ggtcatatta	atcgttcagc	aattaacgtg	2040
ttgttattgc	gccatgaacg	cagttctctg	ccgctcggca	agtttttggg	caccgaaggc	2100
gttatcagcc	aggaaacggt	ggatcgcgtc	ctgacaattc	aacgcgaatt	acaagtttcg	2160
atgcaatcac	tattactcaa	agcagggtta	aacacagaac	aggttgcgca	actggagtcc	2220
gaaaatgaag	gagaataacc	ttaatcgcgt	catcggatgg	tctggtttac	tgctgacgtc	2280
tttattgagt	accagcgcac	tcgcagacaa	tatcggcacc	agcgcagaag	agctggggct	2340
gagcgattat	cgccattttg	ttatttatcc	ccgtctcgat	aaagcgtga	aggcacagaa	2400
aaataacgac	gaagcaaccg	ccatccgcg	atgtgaatat	atacaccagc	agggtccgga	2460
taatattccg	ctgactttat	accttgcgga	agcctatcgc	cattttgggc	atgatgaccg	2520
ggcgcggtcg	ttgcttgagg	atcaactgaa	acgtcaccca	ggagatgccc	gacttgagcg	2580
cagtctggcg	gctattccgg	ttgaagtgaa	aagcgttacg	acagttgaag	aactgcttgc	2640
ccagcaaaaa	gcgtgcgatg	ctgcgccgac	cctgcgttgt	cgcagtgaag	tcgggcagaa	2700
tgccctgcgg	ctggcacagt	tacctgtcgc	cagagcgcaa	ctgaacgatg	cgacgtttgc	2760
tgcatcggcg	gaaggaaaaa	cgctgcgaac	cgatctgctg	caacgggcaa	tctacctgaa	2820
acaatggtcc	caggcagata	cgctatacaa	tgaagcacgc	cagcagaaca	cattaagcgc	2880

ggcagaacgc	cgtcagtggt	ttgacgtgct	tcttgccggg	cagctggacg	atcggatcct	2940
ggcactgcaa	tcacagggga	tcttcaccga	tcctcagtca	tatattactt	acgcgaccgc	3000
gctggcttat	cgtggcgaaa	aagcacgcct	ccagcattat	ctcattgaaa	ataagccact	3060
atttaccacg	gacgcacaag	agaaaagttg	gctctatctg	ttatctaaat	acagcgctaa	3120
ccccgttcag	gcgttggcga	attatacggg	acagtttgcc	gacaaccgcc	agtatgttgt	3180
tggcgcgacg	ctaccgggtgc	tgttaaaaga	aggtcagtac	gacgcagcgc	aaaaactgct	3240
cgccaccctc	cccgccaatg	aaatgcttga	ggagcgttat	gctgtcagcg	tggcgaccgc	3300
taacaaggct	gaagctctgc	gtctggcacg	attgctgtat	cagcaagaac	cggcaaatct	3360
taccgcctg	gatcaactaa	cctggcaact	gatgcagaac	gagcagtcac	gcgaagctgc	3420
cgatttattg	ctgcaacgct	atcctttcca	gggcgatgcg	cgtgtcagcc	agactttaat	3480
ggcgcgactg	gcgtctctgc	tggaaagtca	tccttacctg	gcaacgccgg	cgaagggtggc	3540
gattttatcg	aaacccttac	cgctggcgga	gcaacgtcag	tggcaaagtc	agttgccggg	3600
tattgcagat	aattgcccg	caatagttcg	cttgctgggc	gatatgtcgc	cttcctacga	3660
tgcgcgcgcc	tggaaaccgtc	tggcaaagtg	ttatcgggac	acgctaccgc	gtgtggcggt	3720
gtatgcatgg	cttcaggccg	aacaacgaca	accgagcgcc	tggcaacatc	gtgcggtagc	3780
ctatcaggcg	tatcagggtg	aggactacgc	caccgcactg	gcggcctggc	agaaaatcag	3840
tcttcacgac	atgagcaatg	aggatctgct	tgctgctgcc	aataaccgcc	aggcggcagg	3900
aaatggtgcg	gctcgcgatc	gctggctaca	acaggcagaa	aaacgtggac	tgggaagcaa	3960
tgcctctac	tgggtggctgc	atgcgcaacg	ttacattcct	ggtcagccgg	aactcgcact	4020
gaacgatctc	acgcgctcaa	tcaatattgc	gccttctgcc	aacgcttacg	ttgcgcgggc	4080
gacaatttat	cgccaacgtc	ataatgtccc	ggcgcgggtg	agtgatttgc	gcgcgcgct	4140
ggaactggaa	ccgaataata	gcaacaccca	ggcagcgctt	ggttacgcct	tgtgggatag	4200
cggtgatatc	gcacagtcgc	gggaaatgct	cgaaccggcg	cataaagggc	ttccggacga	4260
tccggcactg	atccgacaac	tggcctacgt	gaaccagcgt	ctggatgaca	tgctgcgac	4320
gcagcactac	gcccggctgg	tgattgatga	cattgataat	caggcgtga	taaccctact	4380
gacccagaa	caaatcaac	aacgcttcaa	tttccgccgt	ttgcatgagg	aggcggctcg	4440
ccgctggacg	ttcagtttgc	attcttccat	cggttgcgt	tccggcgcaa	tgagtaccgc	4500
taacaataat	gtcggcggcg	cagcgcacgg	gaaaagctat	cgtagctacg	gacaactgga	4560
agccgagtac	cgcatcggac	gcaatatgct	gctggaaggc	gacctgctct	cagtttatag	4620
ccgcgtcttt	gccgataccg	gagaaaacgg	ggtgatgatg	ccggtgaaaa	atccgatgtc	4680
cggcaccggg	ctgcgctgga	agccgctgcg	cgatcagatc	tttttcatcg	ccgtcgaaca	4740

```

gcagttgccg ctgaacggcc aaaatggcgc atccgatacc atgctgcgcg ccagcgcctc      4800
attctttaat ggcggcaaat acagcgacga atggcaccgc aacggttcag gctggtttgc      4860
ccaaaacctg tacctcgatg cggcgcaata tatccgccag gatattcagg cgtggacggc      4920
agattatcgc gtcagctggc atcagaaggt agctaacgga cagactattg agccttacgc      4980
tcacgttcag gacaacggct atcgtgataa aggcactcag ggcgcgcagc ttggcggagt      5040
cgggggtccgc tggaatatct ggaccggcga gacgcactac gacgcctggc cgcacaaagt      5100
cagtctcggc gtcgagtatc aacatacctt taaggcgatt aatcaacgta acggagagcg      5160
caacaacgcy tttctcacca ttggagtgca ctggtaaatg cgtaagttca tttctgtatt      5220
gctgacactg cttttgggtca gccctttttc ctttgcgatg aaaggatta tctggcaacc      5280
acaaaaccga gatagtcagg ttaccgatac ccagtggcag gggctgatga gtcagttacg      5340
tttgcaaggc ttcgataccc ttgttttgca atggaccgcg tacggcgatg catttaccca      5400
gccagaacag cgcacgttat tgtttaagcg ggccgcagct gcgcaacagg ctggtctgaa      5460
gcttattgtc gggctgaacg ccgatccgga attttttatg caccagaaac agtcgtccgc      5520
agcgctggaa agctatotta atcgctgct ggctgccgat ctccagcaag ccagattatg      5580
gagcgcgcgc cctggcataa cgcgggatgg ctggtacatc agcgcggaaa ttgacgacct      5640
gaactggcgc agcgaagccg cccgtcagcc tttgctaaca tggttaaaca acgcgcagcg      5700
gctgattagc gatgtttcag caaaaccggt ttatatcagt agttttttcg ccggaacat      5760
gtcgcccgat ggctatcgcc aactgctgga acacgttaa gcaaccggcg ttaatgtctg      5820
ggtacaggat ggcagcggcg tggataaact gaccgctgaa cagcgtgaac gttatttaca      5880
ggccagcgcg gattgccaaa gtcccgcgcc tgccagcggc gttgtttatg aactttttgt      5940
cgccggcaaa ggcaaaacct ttacagcgaa accgaaaccg gacgcagaaa ttgcctcgct      6000
gttagcgaaa cgttcctctt gcggtaaaga cactctctat ttctctctgc gctatttgcc      6060
cgtcgcgcac ggcattctcg agtattaa                                     6088

```

5 <210> 44
 <211> 885
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* c. K-12 subc. W3110

10 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(885)
 <223> tsx
 <400> 44

```

atgaaaaaaaa cttactggc agccgggtgcg gtactggcgc tctcttcgtc ttttactgtc      60
aacgcagctg aaaacgacaa accgcagtat ctttccgact ggtggcacca gagcggttaac      120

gttgtcggaa gctatcacac ccgtttcgga ccgcagatcc gcaacgatac ctaccttgag      180
tacgaagcat tcgctaaaaa agactgggtc gacttctatg gttatgcgga tgcgccggtta      240
ttcttcggcg gtaactccga tgctaaaggt atctggaacc acggttctcc gctgtttatg      300
gaaatcgaac cacgtttctc catcgacaag ctgaccaata ctgaccttag cttcgggtccg      360
ttcaaagagt ggtacttcgc gaacaactac atttacgaca tgggtcgtaa taaagatggt      420
cgccagagca cctggtacat gggctctgggt accgatatcg aactggcct gccgatgagc      480
ctgtccatga acgtctatgc gaaataccag tggcagaact atggcgcagc gaacgaaaac      540
gagtgggacg gttaccgttt caaaattaaa tactttgtgc cgattaccga tctgtggggc      600
ggtcagctga gctacatcgg cttcaccaac ttcgactggg gttccgattt aggggatgac      660
agcggtaacg caatcaacgg tattaagacc cgtactaata actctatcgc ttccagccat      720
attctggctc tgaactacga tcaactggcac tactctgtcg tagctcgta ctggcacgac      780
ggtggtcagt ggaacgacga tgcagaactg aacttcggca acggcaactt caacgttcgc      840
tctaccggct ggggtgggta cctggtagta gggtacaact tctga      885

```

<210> 45

<211> 294

<212> PRT

<213> *Escherichia coli* c. K-12 subc. W3110

<400> 45

5

Met Lys Lys Thr Leu Leu Ala Ala Gly Ala Val Leu Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 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
 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
 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
 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
 130 135 140
 Trp Tyr Met Gly Leu Gly Thr Asp Ile Asp Thr Gly Leu Pro Met Ser
 145 150 155 160
 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
 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
 210 215 220
 Ile Asn Gly Ile Lys Thr Arg Thr Asn Asn Ser Ile Ala Ser Ser His
 225 230 235 240
 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
 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
 290

<210> 46
 <211> 2244
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* c. K-12 subc. W3110

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(2244)
 <223> fhuA

5

<400> 46

atggcgcggtt ccaaaactgc tcagccaaaa cactcactgc gtaaaatcgc agttgtagta	60
gccacagcgg ttagcggcat gtctgtttat gcacaggcag cggttgaacc gaaagaagac	120
actatcaccg ttaccgctgc acctgcgccg caagaaagcg catggggggcc tgctgcaact	180
attgcgggcg gacagtctgc taccggcact aaaaccgata cgccgattca aaaagtgcc	240
cagtctatth ctggtgtgac cgccgaagag atggcgctgc atcagccgaa gtcggtaaaa	300
gaagcgctta gctacacgcc ggggtgtctct gttggtacgc gtggcgcatc caacacctat	360
gaccacctga tcattcggcg ctttgccgca gaaggccaaa gccagaataa ctatctgaat	420
ggcctgaagt tgcagggcaa cttctataac gatgcgggtca ttgaccgta tatgctggaa	480
cgcgctgaaa ttatgcgtgg cccggtttcc gtgctttacg gtaaaagcag tcctggcggc	540
ctggtgaata tggtcagcaa gcgtccgacc accgaaccgc tgaaagaagt tcagtttaaa	600
gccggtactg acagcctggt ccagactggt tttgacttta gcgattcgtt ggatgatgac	660
ggtgtttact cttatcgcct gaccggtctt gcgcgttctg ccaatgccca gcagaaaggg	720

```

tcagaagagc agcgttatgc tattgcaccg gcgttcacct ggcgtccgga tgataaaacc      780
aattttacct tcctttctta cttccagaac gagccggaaa ccggttatta cggttggtg      840
ccgaaagagg gaaccgttga gccgctgccg aacggtaagc gtctgccgac agactttaat      900
gaaggggcca agaacaacac ctattctcgt aatgagaaga tggtcggcta cagcttcgat      960
cacgaattta acgacacctt tactgtgcgt cagaacctgc gctttgctga aaacaaaacc     1020
tcgcaaaaca gcgtttatgg ttacggcgtc tgctccgatc cggcgaatgc ttacagcaaa     1080
cagtgtgcgg cattagcgcc agcggataaa ggccattatc tggcacgtaa atacgtcgtt     1140
gatgatgaga agctgcaaaa cttctccggt gataccagct tgcagagcaa gtttgccact     1200
ggcgatatcg accacaccct gctgaccggt gtcgacttta tgcgtatgcg taatgacatc     1260
aacgcctggt ttggttacga cgactctgtg cactgctca atctgtacaa tccggtgaat     1320
accgatttcg acttcaatgc caaagatccg gcaaactccg gcccttaccg cattctgaat     1380
aaacagaaac aaacgggctt ttatgttcag gatcaggcgc agtgggataa agtgctggtc     1440
accctaggcg gtcgttatga ctgggcagat caagaatctc ttaaccgcgt tgccgggacg     1500
accgataaac gtgatgacaa acagtttacc tggcgtggtg gtgttaacta cctgtttgat     1560
aatggtgtaa caccttactt cagctatagc gaatcgtttg aaccttcttc gcaagttggg     1620
aaggatggta atattttcgc accgtctaaa ggtaagcagt atgaagtcgg cgtgaaatat     1680
gtaccggaag atcgtccgat tgtagttact ggtgccgtgt ataatctcac taaaaccaac     1740
aacctgatgg cggaccctga gggttccttc ttctcggttg aaggaggcga gatccgcgca     1800
cgtggcgtag aaatcgaagc gaaagcggcg ctgtcggcga gtgttaacgt agtcggttct     1860
tatacttaca ccgatgcgga atacaccacc gatactacct ataaaggcaa tacgcctgca     1920
caggtgcaa aacacatggc ttcgttgtgg gctgactaca ctttctttga cggtcgcgct     1980
tcaggtctga cgctgggcac cggtggtcgt tatactggct ccagttatgg tgatccggct     2040
aactccttta aagtgggaag ttatacggtc gtggatgcgt tagtacgta tgatctggcg     2100
cgagtcggca tggctggctc caacgtggcg ctgcatgta acaacctggt cgatcgtgaa     2160
tacgtcgcca gctgctttaa cacttatggc tgcttctggg gcgcagaacg tcaggtcggt     2220
gcaaccgcaa ccttccggtt ctaa                                             2244

```

```

<210> 47
<211> 747
<212> PRT
<213> Escherichia coli c. K-12 subc. W3110

```

```
<400> 47
```

```

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

```

5

10

Ala Val Val Val Ala Thr Ala Val Ser Gly Met Ser Val Tyr Ala Gln
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Glu Phe Asn Asp Thr Phe Thr Val Arg Gln Asn Leu Arg Phe Ala
 325 330 335

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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 580 585 590
 Val Glu Gly Gly Glu Ile Arg Ala Arg Gly Val Glu Ile Glu Ala Lys
 595 600 605
 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
 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
 Gly Ser Ser Tyr Gly Asp Pro Ala Asn Ser Phe Lys Val Gly Ser Tyr
 675 680 685

ES 2 720 032 T3

Thr Val Val Asp Ala Leu Val Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Val Gly Met
690 695 700

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

Arg Gln Val Val Ala Thr Ala Thr Phe Arg Phe
740 745

- <210> 48
- <211> 1341
- 5 <212> ADN
- <213> *Escherichia coli* c. K-12 subc. W3110

- <220>
- <221> gen
- 10 <222> (1)..(1341)
- <223> lamB

- <400> 48

```

atgatgatta ctctgcgcaa acttcctctg gcggttgccg tcgcagcggg cgtaatgtct      60
gctcaggcaa tggctggtga tttccacggc tatgcacggt ccggtattgg ttggacaggt      120
agcggcgggtg aacaacagtg tttccagact accggtgctc aaagtaaata ccgctctggc      180
aacgaatgtg aaacttatgc tgaattaaaa ttgggtcagg aagtgtggaa agagggcgat      240
aagagcttct atttcgacac taacgtggcc tattccgctc cacaacagaa tgactgggaa      300
gctaccgatc cggccttccg tgaagcaaac gtgcagggta aaaacctgat cgaatggctg      360
ccaggctcca ccatctgggc aggtaagcgc ttctaccaac gtcacgacgt tcatatgatc      420
gacttctact actgggatat ttctggctct ggtgccggtc tggaaaacat cgatgttggc      480
ttcggtaaac tctctctggc agcaaccgc tcctctgaag ctggtggttc ttcctctttc      540
gccagcaaca atatttatga ctataccaac gaaaccgcga acgacgtttt cgatgtgcgt      600
ttagcgcaga tggaaatcaa cccgggcggc acattagaac tgggtgtcga ctacggtcgt      660
gccaacttgc gtgataacta tcgtctggtt gatggcgcac cgaaagacgg ctggttattc      720
actgctgaac atactcagag tgtcctgaag ggctttaaca agtttgttgt tcagtacgct      780
actgactcga tgacctcgca gggtaaaggg ctgtcgcagg gttctggcgt tgcatttgat      840
aacgaaaaat ttgcctacaa tatcaacaac aacggtcaca tgctgcgtat cctcgaccac      900
gggtgcgatct ccatgggoga caactgggac atgatgtacg tgggtatgta ccaggatata      960
aactgggata acgacaacgg caccaagtgg tggaccgtcg gtattcgccc gatgtacaag     1020
tggacgcaa tcatgagcac cgtgatggaa atcggctacg acaacgtcga atcccagcgc     1080
accggcgaca agaacaatca gtacaaaatt accctcgcac aacaatggca ggctggcgac     1140
agcatctggt cacgcccggc tattcgtgtc ttcgcaacct acgccaagtg ggatgagaaa     1200
tggggttacg actacaccgg taacgctgat aacaacgcga acttcggcaa agccgttcct     1260
gctgatttca acggcggcag cttcggctcgt ggcgacagcg acgagtggac cttcgggtgc     1320
cagatggaaa tctggtggtg a                                     1341

```

<210> 49

<211> 446

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*. c. K-12 subc.W3110

<400> 49

5

ES 2 720 032 T3

Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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
165 170 175

Ser Ser Ser Phe Ala Ser Asn Asn Ile Tyr Asp Tyr Thr Asn Glu Thr
180 185 190

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

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
245 250 255

Val Gln Tyr Ala Thr Asp Ser Met Thr Ser Gln Gly Lys Gly Leu Ser
 260 265 270

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

Met Gly Asp Asn Trp Asp Met Met Tyr Val Gly Met Tyr Gln Asp Ile
 305 310 315 320

Asn Trp Asp Asn Asp Asn Gly Thr Lys Trp Trp Thr Val Gly Ile Arg
 325 330 335

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

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

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

<210> 50
 <211> 1845
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*. c. K-12 subc. W3110

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

<400> 50

atgattaaaa aagcttcgct gctgacggcg tgttccgtca cggcattttc cgcttgggca 60

caggatacca gcccgatac tctcgctggt actgctaacc gttttgaaca gccgcgcagc 120

actgtgcttg caccaaccac cgttgtgacc cgtcaggata tcgaccgctg gcagtcgacc 180

tcgggtcaatg atgtgctgcg ccgtcttccg ggcgtcgata tcacccaaaa cggcggttca 240

ggtcagctct catctatfff tattcgcggt acaaatgcca gtcattgtgt ggtgttaatt 300

gatggcgtag gcctgaatct ggcgggggtg agtggttctg ccgaccttag ccagttccct 360

```

attgcgcttg tccagcgtgt tgaatatatc cgtgggccgc gctccgctgt ttatggttcc      420
gatgcaatag gcggggtggt gaatatcatc acgacgcgcg atgaaccccg aacggaaatt      480
tcagcagggg ggggaagcaa tagttatcag aactatgatg tctctacgca gcaacaactg      540
ggggataaga cacgggtaac gctggtgggc gattatgccc atactcatgg ttatgatggt      600
gttgcctatg gtaataccgg aacgcaagcg cagacagata acgatggttt tttaagtaaa      660
acgctttatg gcgcgctgga gcataacttt actgatgcct ggagcggctt tgtgcgcggc      720
tatggctatg ataaccgtac caattatgac gcgtattatt ctcccggttc accgttgctc      780
gatacccgta aactctatag ccaaagttgg gacgccgggc tgcgctataa cggcgaactg      840
attaaatcac aactcattac cagctatagc catagcaaag attacaacta cgatccccat      900
tatggtcggt atgattcgtc ggcgacgctc gatgagatga agcaatacac cgtccagtgg      960
gcaaacaatg tcatcgttgg tcacggtagt attggtgctg gtgtcgactg gcagaaacag     1020
actacgacgc cgggtacagg ttatggtgag gatggatatg atcaacgtaa taccggcatc     1080
tatctgaccg ggctgcaaca agtcggcgat tttacctttg aaggcgcagc acgcagtgac     1140
gataactcac agtttggtcg tcatggaacc tggcaaacca gcgccggttg ggaattcatc     1200
gaaggttatc gtttcattgc ttctacggg acatcttata aggcaccaaa tctggggcaa     1260
ctgtatggct tctacggaaa tccgaatctg gacccggaga aaagcaaaca gtgggaaggc     1320
gcgtttgaag gcttaaccgc tgggggtgaa tggcgtatth ccggatatcg taacgatgtc     1380
agtgacttga tcgattatga tgatcacacc ctgaaatatt acaacgaagg gaaagcgcgg     1440
attaagggcg tcgagggcgc cgccaattht gataccggac cactgacgca tactgtgagt     1500
tatgattatg tcgatgcgcg caatgcgatt accgacacgc cgttggttac ccgtgctaaa     1560
cagcaggtga aataccagct cgactggcag ttgtatgact tcgactgggg tattacttat     1620
cagtatttag gcactcgcta tgataaggat tactcatctt atccttatca aaccgttaaa     1680
atgggcgggt tgagcttggt ggatcttgcg gttgcgtatc cggtcacctc tcacctgaca     1740
gttcgtggta aaatagccaa cctgttcgac aaagattatg agacagtcta tggctaccaa     1800
actgcaggac ggggaatacac cttgtctggc agctacacct tctga                        1845

```

<210> 51
 <211> 614
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*. c. K-12 subc. W3110

5

<400> 51

Asn Arg Phe Glu Gln Pro Arg Ser Thr Val Leu Ala Pro Thr Thr Val
 35 40 45
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 225 230 235 240
 Tyr Gly Tyr Asp Asn Arg Thr Asn Tyr Asp Ala Tyr Tyr Ser Pro Gly
 245 250 255
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 500 505 510
 Thr Pro Leu Leu Arg Arg Ala Lys Gln Gln Val Lys Tyr Gln Leu Asp
 515 520 525
 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
 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
 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
 610

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo recombinante del género *Escherichia* que produce L-aminoácido en el que al menos una de NfrA y NfrB está inactivada.
2. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en donde la NfrA comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y la NfrB comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42.
- 10 3. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en donde se inactiva adicionalmente al menos uno de Tsx y FhuA.
4. El microorganismo recombinante de la reivindicación 3, en donde la Tsx comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y la FhuA comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47.
- 15 5. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en donde el L-aminoácido es L-treonina o L-triptófano.
6. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en donde el microorganismo recombinante es *Escherichia coli*.
- 20 7. Un método para producir un L-aminoácido, comprendiendo el método:
cultivar el microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y recoger un L-aminoácido del cultivo.
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en donde el L-aminoácido es L-treonina o L-triptófano.