



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027278

(51)<sup>7</sup> C12N 15/52

(13) B

(21) 1-2013-00475

(22) 12/07/2011

(86) PCT/EP2011/061891 12/07/2011

(87) WO2012/007481 19/01/2012

(30) 10169304.2 12/07/2010 EP

(45) 25/02/2021 395

(43) 27/05/2013 302A

(73) Inbiose N.V. (BE)

Technologiepark 82, Bus 41, 9052 Zwijnaarde, Belgium

(72) MAERTENS, Jo (BE); BEAUPREZ, Joeri (BE); DE MEY, Marjan (BE).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) VI KHUẨN HOẶC NẤM MEN ĐƯỢC CẢI BIẾN VỀ MẶT CHUYỂN HÓA CHO VIỆC TẠO RA FUCOSYLLACTOZA VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA FUCOSYLLACTOZA

(57) Sáng chế đề cập đến sinh vật được cải biến gen, cụ thể là vi sinh vật như vi khuẩn và nấm men, cho việc tạo sản phẩm sinh học giá trị gia tăng như chuyên biệt sacarit, sacarit đã được hoạt hóa, nucleosit, glycosit, glycolipit hoặc glycoprotein. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ được cải biến về mặt chuyển hóa sao cho chúng có thể tạo ra các sản phẩm riêng có giá trị đã nêu với số lượng lớn và ở tỷ lệ cao bằng cách khắc phục các vấn đề kỹ thuật kinh điển xuất hiện trong các quá trình sản xuất có xúc tác sinh hoặc hoặc lên men. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra fucosyllactoza.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến sinh vật được cải biến gen, đặc biệt là vi sinh vật như vi khuẩn và nấm men, cho việc tạo sản phẩm sinh học giá trị gia tăng như sacarit, glycolipit và glycoprotein. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ được cải biến về mặt chuyển hóa sao cho chúng có thể tạo ra các sản phẩm riêng có giá trị đã nêu với số lượng lớn và ở tỷ lệ cao bằng cách khắc phục các vấn đề kỹ thuật kinh điển xuất hiện trong các quá trình sản xuất có xúc tác sinh học hoặc lên men.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Giá cả ngày càng tăng của các nguồn dầu mỏ làm tăng nhận thức về tiềm năng của các quá trình sản xuất sinh học. Điều này làm tăng các nỗ lực nghiên cứu của các công ty và các trung tâm nghiên cứu theo hướng phát triển các công nghệ thân thiện với môi trường và khả thi về kinh tế cho việc tạo một số lượng ngày càng tăng các sản phẩm sinh học, ví dụ, nhiên liệu sinh học, hóa chất sinh học và polyme sinh học. Các sản phẩm này dễ phân hủy và được tạo ra với yêu cầu năng lượng và dòng thải tối thiểu. Mặc dù bối cảnh thuận lợi cho quá trình sản xuất dựa trên công nghệ sinh học, nhưng sự phát triển các phương án thay thế cho các con đường tổng hợp hóa mà được trang bị tốt thường rất cần đầu tư về thời gian và rất tốn kém. Kết quả là, có nhu cầu rõ ràng đối với sự phát triển nhanh hơn và rẻ hơn các chủng sản xuất mới.

Ngày nay, oligosacarit thường được tổng hợp qua các quá trình chuyển hóa sinh học. Các enzym được phân tách và tinh sạch (được gọi là chuyển hóa sinh học *in vitro*) và toàn bộ các chất xúc tác sinh học trong tế bào thường được sử dụng. Về bản chất, chúng chuyển hóa một hoặc nhiều tiền chất thành sản phẩm sinh học mong muốn.

Tuy nhiên, việc áp dụng các chuyển hóa sinh học *in vitro* thường bị cản trở bởi vì sự tổng hợp sản phẩm này có thể cần đến nhiều bước enzym hoặc bởi vì cần đến các đồng nhân tố khác (NADH, NADPH, UTP,...), mà rất đắt.

Nhược điểm khác của tổng hợp *in vitro* là trong thực tế sự biểu hiện và sự tinh sạch nhiều enzym rất khó và quy trình tinh sạch chúng có thể dẫn đến làm giảm hoạt tính của enzym. Ngoài ra, mỗi enzym trong quy trình chuyển hóa sinh học nhiều enzym như vậy có các thông số quy trình tối ưu riêng của nó, dẫn đến các quy trình tối ưu hóa rất phức tạp. Trong quy trình như vậy, cân bằng phản ứng cũng đóng một vai trò rất quan trọng. Ví dụ, khi dùng phosphorylaza, tỷ lệ cơ chất/ sản phẩm được điều chỉnh mà giới hạn hiệu suất sản phẩm sẽ ở trong tầm tay. Điều này tạo ra các sơ đồ xử lý sản phẩm phức tạp để tách sản phẩm từ cơ chất (33, 35).

Cải biến về mặt chuyển hóa là phương pháp khác để tối ưu hóa việc tạo các sản phẩm sinh học giá trị gia tăng như hydratecacbon chuyên biệt. Thông thường, toàn bộ tế bào được cải biến về mặt chuyển hóa để tạo ra sản phẩm sinh học giá trị gia tăng bắt đầu từ tiền chất được cung cấp. Liên quan đến vấn đề này, các tế bào này được cải biến sao cho tất cả các con đường chuyển hóa liên quan đến sự thoái biến tiền chất bị bất hoạt (3, 45, 70, 77, 100). Bằng cách làm như vậy, tiền chất được chuyển hóa hiệu quả và trực tiếp thành sản phẩm mong muốn.

Nhược điểm chính của phương pháp nêu trên là thực tế sự tổng hợp sinh khối và sự tổng hợp sinh học được dự tính đòi hỏi các chất chuyển hóa ban đầu khác nhau. Ví dụ, *E. coli* được cải biến về mặt chuyển hóa cho sự tạo ra hiệu quả 2-deoxy-scylo-inosozơ từ glucoza. Chiến lược này làm cho *E.coli* được cải biến về mặt chuyển hóa không thích hợp để sinh trưởng trên glucoza, cần sự bổ sung các cơ chất khác, ví dụ, glyxerol để cho phép đối với sự tổng hợp sinh khối (45).

Nhược điểm thứ hai của các hệ thống tạo tế bào nguyên vẹn đó là có nhu cầu đối với hai pha, pha sinh trưởng, trong đó sinh khối được tạo ra (hoặc tổng hợp sinh khối), sau đó là pha sản xuất sản phẩm được dự tính. Điều này có nghĩa là pha sinh trưởng và pha sản xuất được tách biệt về thời gian (các pha liên tục). Điều này dẫn đến tỷ lệ tạo tổng thể sản phẩm mong muốn rất thấp. Ngoài ra, quy trình loại này thật khó để tối ưu hóa. Quả thực, các quy trình lên men đã được phát triển tận dụng các tế bào được cải biến về mặt chuyển hóa mà biểu hiện quá mức các gen của con đường sản xuất. Lượng lớn cơ chất này được chuyển hóa thành sinh khối, dẫn đến chỉ dòng nhỏ cơ chất hướng đến sản phẩm (13).

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là khắc phục các nhược điểm nêu trên bởi vì nó đề xuất sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa mà có khả năng tạo ra các sản phẩm mong muốn có sản lượng cao và hiệu suất cao được đảm bảo (Fig. 1). Điều này được thực hiện bằng cách tách rõ rệt sự chuyển hóa của sinh vật thành hai phần: 1) cái được gọi là ‘phần sản xuất hoặc ‘con đường sản xuất’, và 2) phần ‘sinh khối và bổ sung đồng nhân tố’ hoặc ‘sinh khối và/ hoặc con đường sản xuất enzym xúc tác sinh học’. Hai phần này được tạo ra bằng cách tách đường thành: a) sacarit đã được hoạt hóa, và b) sacarit không được hoạt hóa. Mỗi sacarit a) hoặc b) này là hoặc có thể là tiền chất thứ nhất của con đường sản xuất a) hoặc sinh khối và/ hoặc con đường sản xuất enzym xúc tác sinh học b), cho phép một cơ chế hút/đẩy trong tế bào.

Quả thực, tổng hợp sinh khối, mà là mục tiêu chính của tế bào, chuyển hóa sacarit đã được hoạt hóa hoặc sacarit thành sinh khối và dịch chuyển cân bằng của phản ứng tách đường thành sacarit đã được hoạt hóa và sacarit. Trong con đường này, xu thế duy trì sự sống của tế bào hoạt động dưới dạng cơ chế hút đối với con đường sản xuất. Tác dụng hút này được tạo ra bằng tổng hợp sinh khối bởi vì nó đảm bảo sự tích lũy phân tử cơ chất đầu tiên của con đường sản xuất, mà, theo cách hiểu thông thường và lần lượt, cũng thúc đẩy con đường sản xuất. Chiến lược này giải quyết vấn đề về tốc độ tạo xảy ra trong các chiến lược sản xuất gồm hai pha như được mô tả trong tình trạng kỹ thuật. Ngoài ra, bằng cách dị hóa một phần của gốc đường, tế bào luôn được cung cấp các đồng nhân tố cần thiết và nhu cầu năng lượng cần thiết cho sự tạo ra sản phẩm sinh học chuyên biệt. Do đó, chiến lược hiện nay cũng giải quyết vấn đề về sự bổ sung đồng nhân tố mà là cần thiết trong sự tạo ra chất xúc tác sinh học như được mô tả trong tình trạng kỹ thuật. Ngoài ra, các enzym cần thiết trong con đường sản xuất luôn được tổng hợp có hiệu quả và dễ dàng được duy trì qua chiến lược cải biến của sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng 2-fucosyltransferaza có nguồn gốc từ *Dictyostellium discoideum* để tạo ra 2-fucosyllactosa bởi sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa theo sáng chế.



### Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1: (a) Phản ứng cân bằng bình thường, xảy ra trong các kỹ thuật sản xuất hiện nay (b) nguyên tắc hút/đẩy: cân bằng được dịch chuyển theo hướng sacarit và sacarit đã được hoạt hóa. Mục tiêu chính của tế bào là sinh trưởng, do đó nó hút ở sacarit (xem ví dụ), để tạo ra sinh khối ("sinh khối và/ hoặc con đường sản xuất enzym xúc tác sinh học") và bổ sung các đồng nhân tố cần thiết cho con đường sản xuất bên cạnh việc duy trì sự sống. Do tác dụng hút này, sacarit đã được hoạt hóa sẽ tích lũy trong tế bào và thúc đẩy con đường sản xuất.

Fig. 2: Tốc độ lớn của thể biến nạp *E. coli* trên môi trường tối thiểu mang plasmit mã hóa sucroza phosphorylaza. (các chữ viết tắt được nêu trong Bảng 2).

Fig. 3: Dòng cacbon được dự kiến trong chủng đại. Mũi tên nhỏ: chỉ ra các phản ứng trong quá trình chuyển hóa, mũi tên đậm: Chỉ ra các phản ứng tăng cường hoặc mới được đưa vào, đường chéo: chỉ ra sự bất hoạt gen (knock-out) hoặc làm cho gen giảm chức năng.

Fig.4: Dòng cacbon được dự kiến trong chủng gốc 1. Vốn  $\alpha$ glucoza-1-phosphat ( $\alpha$ G1P) trong chủng gốc 1 tăng do các phản ứng chính mà chuyển hóa  $\alpha$ G1P thành các thành phần của tế bào bị bất hoạt. Mũi tên nhỏ: Chỉ ra các phản ứng trong quá trình chuyển hóa, mũi tên đậm: Chỉ ra các phản ứng được tăng cường hoặc mới được đưa vào, đường chéo: chỉ ra sự bất hoạt gen hoặc làm cho gen giảm chức năng.

Fig. 5: Vốn  $\alpha$ glucoza-1-phosphat trong *E. coli* MG1655 (WT) đại sinh trưởng trên glucoza, *E. coli* MG1655 P22-BaSP sinh trưởng trên sucroza, và trong chủng nút MG1655  $\Delta$ glgC  $\Delta$ pgm  $\Delta$ lacZ P22-BaSP sinh trưởng trên sucroza: thử nghiệm trong bình lắc và thử nghiệm mẻ dung tích 1,5 L.

Fig. 6: Sự chuyển hóa của sucroza, axetat và nồng độ sinh khối trong quá trình nuôi cấy  $\Delta$ pgm $\Delta$ lacZ $\Delta$ glgC (3KO) P22-BaSP trên môi trường LB được đậm.

Fig. 7: Sự chuyển hóa của nồng độ  $\alpha$ Glucosa-1-phosphat, fructoza, glucoza, và pyruvat trong quá trình nuôi cấy  $\Delta$ pgm $\Delta$ lacZ $\Delta$ glgC (3KO) P22-BaSP trên môi trường LB được đậm.

Fig. 8: Giảm đồ của nguồn xenlobioza  $\Delta$ pgm $\Delta$ lacZ $\Delta$ glgC (3KO) P22-BaSP-CuCP.

Fig. 9: Sự tạo xenlobioza và hiệu suất của  $\Delta pgm \Delta lacZ \Delta glgC \Delta agp$  (4KO) P22-BaSP-CuCP. Phosphat cao chỉ ra nồng độ phosphat 0,2M, phosphat thấp chỉ ra nồng độ của phosphat 13mM.

Fig. 10: Bắt đầu từ chủng gốc 5, các dẫn xuất của đường được fucosyl hóa như fucosyllactoza và cụ thể hơn 1,2-fucosyllactoza có thể được tạo ra. Chủng này được cải biến để ép tế bào tạo ra frucoza-6-phosphat là chất trung gian trong tổng hợp GDP-fucoza. Glucoza hoặc glucoza-1-phosphat (nếu enzym khởi đầu là sucraza hoặc sucroza phosphorylaza) tiếp đó được cung cấp cho sự chuyển hóa cacbon trung tâm qua con đường pentoza phosphat. Fig 10 thể hiện con đường dẫn đến sản phẩm và sinh khối và các bất hoạt gen cần thiết để đạt được điều này, con đường bên trái chỉ ra lộ trình tối ưu với sucroza phosphorylaza và con đường bên phải chỉ ra lộ trình tối ưu với invertaza được kết hợp với glucokinaza.

Fig.11: Trình tự của một phần hệ gen của nhiễm sắc thể kiểu đại ở vị trí của gen *pgm*. Trình tự gen *pgm* được bôi đậm/in nghiêng.

Fig. 12: Trình tự của một phần hệ gen của chủng đột biến trong đó chỉ sẹo giữ ở vị trí của gen *pgm*. Trình tự sẹo này được bôi đậm/in nghiêng.

Fig. 13: Trình tự của một phần hệ gen của chủng đột biến *pgm* trong đó gen *pgm* được thay bằng một phần của trình tự protein GFP. Trình tự mới được đưa vào này được bôi đậm/in nghiêng.

Fig. 14: Trình tự của một phần hệ gen của chủng đột biến *pgm* trong đó gen *pgm* được thay bằng catxet kanamycin. Trình tự mới được đưa vào này được bôi đậm/in nghiêng.

Fig. 15: Lượng glucoza mà được giải phóng sau khi thủy phân polysacarit đối với các chủng đại được biến nạp bằng sucroza phosphorylaza khác loại có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis* và chủng đột biến  $\Delta pgm \Delta agp \Delta glgC \Delta lacZ \Delta glk \Delta ptsG$  với sucroza phosphorylaza khác loại có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis* và gen nội sinh *tts* có nguồn gốc từ *Streptococcus pneumoniae*.

Fig. 16: Kojibioza, maltoza và sự tiến triển mật độ quang học đúng lúc của chủng tạo kojibioza với kiểu gen  $\Delta lacZ \Delta glgC \Delta agp \Delta ptsG \Delta malPQ \Delta ycjU$  pCXp22MPp22KP.

Fig. 17: Sơ đồ sinh trưởng và sự tích lũy F6P của chủng đột biến  $\Delta pgi \Delta pfkA \Delta pfkB$  trong môi trường cơ sở sucroza.

Fig. 18: Cây phát sinh chủng loại của fucosyltransferaza từ các họ glycosyltransferaza khác nhau, cây này đã thiết kế bởi MCoffee (58).

Fig. 19: Thứ tự của *Dictyostelium discoideum* và *Helicobacter pylori* fucosyltransferaza, các axit amin được đánh dấu là các motif được tìm thấy trong các 2-fucosyltransferaza của GT họ 11. Bôi đậm chỉ ra motif 1, gạch chân, motif 2, và nghiêng, motif 3 (67).

Fig. 20: Các kết quả LC-MS của thử nghiệm fucosyltransferaza có màu đỏ của phenol. Biểu đồ sắc ký bên trên là màu trắng không có GDP-fucoza, thấp hơn là mẫu của thử nghiệm fucosyltransferaza của *D. discoideum*. Đỉnh 13,5 phút của 2FL xuất hiện trong biểu đồ sắc ký này.

Fig. 21: Phân tích LC MSMS 2-fucosyllactoza của một phần của enzym fucosyltransferaza. Biểu đồ sắc ký bên trên thể hiện tiêu chuẩn 100mg/l của 2-fucosyllactoza, biểu đồ sắc ký bên dưới thể hiện đỉnh 2-fucosyllactoza của thử nghiệm enzym này. Trong thử nghiệm này chỉ khối 2-fucosyllactoza được quét bằng quang phổ kế.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa, cụ thể là vi sinh vật, mà có khả năng tạo ra sản phẩm sinh học giá trị gia tăng có sản lượng cao và năng suất cao được đảm bảo. Sinh vật theo sáng chế được cải biến về mặt chuyển hóa sao cho hai lộ trình khác biệt được cải biến tạo ra sản phẩm và dẫn đến sự sinh trưởng/tạo sinh khối. Điều này đạt được bằng các làm giảm hoặc loại bỏ hoạt động của các phản ứng xúc tác bởi enzym chuyển hóa các chất chuyển hóa từ 'phần sinh khối và/ hoặc phần enzym xúc tác sinh học và/ hoặc phần bổ sung đồng nhân tố' thành các chất chuyển hóa từ phần 'con đường sản xuất' và ngược lại, ví dụ bằng cách làm giảm hoặc loại bỏ/bất hoạt ít nhất một, một số hoặc tất cả các gen mã hóa các enzym tiến hành các phản ứng chuyển hóa các chất trung gian của con đường sản xuất thành tiền chất sinh khối, và/ hoặc giảm hoặc loại bỏ/bất hoạt ít nhất một, một số hoặc tất cả các gen mã hóa các enzym tiến hành các phản ứng mà làm thoái biến các chất trung gian. Ngoài ra, các thay đổi về mặt chuyển hóa/ thay đổi di truyền này không làm giảm sự sinh trưởng của tế bào được cải biến. Ví dụ: hydratcacbon hydrolaza kết hợp với hydratcacbon kinaza, hydratcacbon syntaza, và, hydratcacbon phosphorylaza có thể được đưa vào tế bào.

Các enzym này chuyển hóa các cơ chất chứa sacarit, oligosacarit, polysacarit hoặc hỗn hợp của chúng trong gốc đường và gốc đường hoạt hóa (ví dụ gốc sacarit được phosphoryl hóa, UDP, CMP, GDP, ADP, TDP hoặc dTDP... gốc đường được hoạt hóa). Sự cải biến về mặt chuyển hóa bổ sung của tế bào bao gồm sự phong bế con đường bắt đầu từ gốc đường được hoạt hóa theo hướng các thành phần của sinh khối. Theo cách này, gốc đường không được hoạt hóa được dùng làm ‘nhiên liệu’ (hoặc nguồn năng lượng) và đơn vị cấu trúc cho sự tổng hợp sinh khối, của nhiều enzym xúc tác sinh học mà sẽ tiến hành sự chuyển hóa gốc đường được hoạt hóa thành sản phẩm mong muốn (= ví dụ hydratacacbon chuyên biệt) và đồng nhân tố cần thiết (NADH, ATP, UTP ...). Ngược lại, gốc đường được hoạt hóa cũng có thể được dùng làm ‘nhiên liệu’, trong khi gốc đường được hoạt hóa bằng hydratacacbon kinaza và ‘được đẩy’ vào lộ trình tạo sản phẩm chuyên biệt mong muốn.

Bằng cách dùng sinh vật được cải biến theo sáng chế, sự tạo sản phẩm qua sự chuyển hóa đường được hoạt hóa có thể được gắn với sự sinh trưởng trong đó được cấp liệu bằng gốc đường khác (hoặc ngược lại). Theo cách này, xu hướng tự nhiên của tế bào đối với sự nhân lên được dùng làm tài sản để thúc đẩy sự sản xuất của sản phẩm sinh học mong muốn. Điều này có nghĩa là mặt hạn chế trước đây để tạo sinh khối trước sự sản xuất thực tế của sản phẩm sinh học có thể bắt đầu hiện tại mang lại lợi ích. Phương pháp luận này dẫn đến tỷ lệ sản xuất cao, mà không gặp phải khó khăn vốn có với các hệ nhiều enzym và hệ lên men hai pha. Ngoài ra, sinh vật theo sáng chế có thể dùng (các) cơ chất giống nhau như nêu trên đối với cả sự sinh trưởng hoặc tạo sinh khối và sự tạo sản phẩm mong muốn ở tỷ lệ cao, do đó nguyên tắc tổng thể nằm sau chiến lược của cải biến về mặt chuyển hóa này là nguyên tắc hút/đẩy cũng được giải thích ở trên. Sự chuyển hóa ở cacbon trung tâm mà dẫn đến sinh khối và đồng nhân tố hút ở một phần của gốc đường để sinh trưởng trong khi phần khác tích lũy trong tế bào, thúc đẩy con đường sản xuất.

Phương pháp sau cùng có thể không chỉ được dùng để tạo ra các hydratacacbon chuyên biệt mong muốn hoặc hydratacacbon được hoạt hóa mà còn có thể được áp dụng cho sự tổng hợp rất nhiều hợp chất được glycosyl hóa, ví dụ, sacarit, nucleosit, glycosylphosphat, glycoprotein và glycolipit.

Nhiều enzym khởi đầu có thể được đưa vào tế bào để tách sự chuyển hóa thành hai phần, kết hợp với sự bất hoạt gen. Các ví dụ không giới hạn về các enzym mà có thể

được dùng để tách đường thành sacarit hoạt hóa và sacarit là sucroza phosphorylaza, sucroza syntaza, sucraza (invertaza) được kết hợp với glucokinaza và/ hoặc fructokinaza, trehalaza được kết hợp với glucokinaza, maltaza được kết hợp với glucokinaza, sucroza-6-phosphat hydrolaza được kết hợp với fructokinaza, maltoza phosphorylaza, maltoza syntaza, amylaza được kết hợp với phosphorylaza hoặc syntaza hoặc hydrolaza, lactoza syntaza, lactoza phosphorylaza, lactaza (hoặc beta-galactosidaza) được kết hợp với galactokinaza và/ hoặc glucokinaza.

Sáng chế đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa cho việc tạo ít nhất sản phẩm chuyên biệt được chọn từ nhóm bao gồm sacarit, sacarit đã được hoạt hóa, nucleosit, glycosit, glycolipit và a glycoprotein, đặc trưng ở chỗ:

- a) sinh vật đã nêu được biến đổi gen với việc đưa vào ít nhất: i) gen mã hóa hydratcacbon hydrolaza kết hợp với gen mã hóa hydratcacbon kinaza, ii) gen mã hóa hydratcacbon syntaza, hoặc, iii) gen mã hóa hydratcacbon phosphorylaza, sao cho sinh vật đã nêu có khả năng tách disacarit, oligosacarit, polysacarit hoặc hỗn hợp của chúng thành sacarit đã được hoạt hóa và sacarit, và
- b) sinh vật đã nêu còn được biến đổi gen sao cho ít nhất một gen khác so với gen bất kỳ trong số các gen đã được đưa vào của bước a) của sinh vật đã nêu được làm giảm chức năng hoặc không có chức năng và trong đó gen khác đã nêu mã hóa enzym chuyển hóa sacarit đã được hoạt hóa đã nêu thành sinh khối và/ hoặc enzym xúc tác sinh học.

Thuật ngữ ‘sacarit’ đề cập đến monosacarit như, không giới hạn ở, aldoza, ketoza, pentoza, metylpentoza, hexoza, polyol có hoặc không có nhóm carbonyl, carboxyl, amino hoặc trong đó nhóm hydroxyl được thay bằng, không giới hạn ở hydro, amino, thiol, phosphat và/ hoặc nhóm tương tự hoặc dẫn xuất của các nhóm này. Thuật ngữ ‘sacarit’ cũng đề cập đến di-, oligo-, và polysacarit mà được tạo ra từ một hoặc nhiều monosacarit như được mô tả ở trên, liên kết với nhau bằng liên kết glycosit.

Thuật ngữ ‘nucleosit’ đề cập đến mỗi monosacarit mà được thể bằng nucleotit ví dụ, không giới hạn ở, UDP, GDP, ADP, TDP, CMP, hoặc dTDP.

Thuật ngữ ‘glycosit’ đề cập đến sacarit mà tạo ra liên kết glycosit với các hợp chất hóa học khác, như, không giới hạn ở sterol, phenol, axit béo, phosphatidylinositol, vitamin C, cartenoit và artimisinin.

Thuật ngữ ‘glycolipit’ đề cập đến sacarit mà tạo ra liên kết glycosit với axit béo hoặc lipit.

Thuật ngữ ‘glycoprotein’ đề cập đến sacarit mà tạo ra liên kết glycosit với protein.

Thuật ngữ ‘glycosylphosphat’ đề cập đến được sacarit phosphoryl hóa.

Sáng chế còn đề cập đến sinh vật như nêu trên trong đó sinh vật đã nêu còn được biến đổi gen với việc đưa vào ít nhất một gen khác mà chuyển hóa sacarit đã được hoạt hóa đã nêu thành sản phẩm chuyên biệt, hoặc, trong đó ít nhất một gen nội sinh khác của sinh vật đã nêu chuyển hóa sacarit đã được hoạt hóa đã nêu thành sản phẩm chuyên biệt được biểu hiện quá mức.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến sinh vật như nêu trên trong đó sinh vật đã nêu có khả năng sinh trưởng trên disacarit, oligosacarit, polysacarit hoặc hỗn hợp của chúng như là nguồn cacbon chủ yếu. Thuật ngữ ‘chủ yếu’ có nghĩa là nguồn cacbon quan trọng nhất để tạo sinh khối, tức là 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99% của tất cả cacbon mong muốn được có nguồn gốc từ nguồn cacbon nêu trên. Theo một phương án của sáng chế, nguồn cacbon đã nêu là nguồn cacbon duy nhất cho sinh vật đã nêu, tức là 100% của tất cả cacbon mong muốn được có nguồn gốc từ nguồn cacbon nêu trên.

Thuật ngữ ‘cải biến về mặt chuyển hóa’ được dùng để chỉ thực tiễn của việc tối ưu hóa các quá trình di truyền và quá trình điều hòa bên trong sinh vật đã nêu để làm tăng sự sản xuất ra chất hoặc sản phẩm mong muốn nhất định của sinh vật. Sản phẩm này theo đó được gọi là “sản phẩm chuyên biệt” và cụ thể là đề cập đến sacarit mong muốn (được hoạt hóa hoặc không được hoạt hóa), nucleosit, glycosit, glycolipit hoặc glycoprotein. Một số ví dụ không giới hạn về các sản phẩm này là các dẫn xuất của đường như 1,2-fucosyllactoza, 1,3-fucosyllactoza, 1,4-fucosyllactoza, 1,6-fucosyllactoza, galactinol, stachyoza, globotrioza, galactoza(beta1-4) rhamnoza, sophoroza, xenlobioza, UDP-glucoza, sophorolipit, *myo*-inositol, L-arabinoza, *scyllo*-inosoza, glycosylphosphatidylinositol, lacto-N-bioza, lacto-N-tetraoza, lactosamin, galactosyloligosacarit được fucosyl hóa, L-fucoza, N-Ac glucosamin, axit sialic, sialyllactoza, chitosan và kitin.

Thuật ngữ ‘cải biến’ đề cập đến kỹ thuật đã được biết rõ bất kỳ mà có thể được dùng để biến đổi gen sinh vật như ví dụ được mô tả trong (9, 17, 19, 21, 22, 42).

Các thuật ngữ ‘sinh vật có khả năng sinh trưởng trên disacarit, oligosacarit, polysacarit hoặc hỗn hợp của chúng như là nguồn cacbon chủ yếu’ có nghĩa là sinh vật theo sáng chế có thể dùng cùng disacarit, oligosacarit, polysacarit hoặc hỗn hợp của chúng để sinh trưởng (hoặc tạo sinh khối) và tạo sản phẩm mong muốn, và, rằng chúng có thể dùng sacarit sau cùng như là nguồn cacbon duy nhất để nhân lên và/ hoặc có hoạt tính về mặt chuyển hóa. Tóm lại, sinh vật theo sáng chế có khả năng nhân lên và chuyển hóa trong hoặc trên môi trường chứa sacarit đã nêu như là nguồn cacbon duy nhất.

Thuật ngữ ‘tách (hoặc chuyển hóa) thành sacarit đã được hoạt hóa và sacarit’ có nghĩa là sacarit sau cùng mà được dùng làm nguồn cacbon sẽ được tách (hoặc chuyển hóa) bởi sinh vật theo sáng chế thành gốc đường hoạt hóa – một số ví dụ không giới hạn về các gốc đường được hoạt hóa là các gốc đường mang nhóm phosphat, UDP, GDP, ADP, TDP hoặc dTDP - và gốc đường không được hoạt hóa mà không mang hoặc không gắn với các nhóm sau cùng.

Các thuật ngữ ‘enzym xúc tác sinh học’ được dùng để chỉ tất cả các enzym cần cho việc tạo hydratecacbon chuyên biệt.

Thuật ngữ ‘sinh khối’ được dùng để chỉ tất cả thành phần tế bào (tức là protein, ADN, ARN, phosphatidylserin, phosphatidyletanolamin, cardiolipin, phosphatidylglyxerol, putrescin, spermidin, peptidoglycan, glycogen và/ hoặc lipopolysacarit (63) mà có thể được tổng hợp trong chủng sản sinh hydratecacbon chuyên biệt được cải biến từ gốc đường mà không được dùng trong lộ trình tạo ra hydratecacbon chuyên biệt (và các sản phẩm giá trị gia tăng khác).

Các thuật ngữ ‘gen mà được dùng làm giảm chức năng hoặc làm mất chức năng’ được dùng để chỉ các kỹ thuật đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (như việc dùng siRNA, RNAi, miRNA, asRNA, đột biến gen, loại bỏ, đột biến gen nhảy, ...) mà được dùng để biến đổi gen theo cách mà chúng có khả năng kém đi (tức là “kém đi” so với gen kiểu đại về mặt chức năng) hoặc hoàn toàn không có chức năng (như các gen bị bất hoạt) để tạo ra thành phẩm có chức năng (2, 4, 5, 7, 8, 14, 19, 37, 40, 47, 73, 79, 80, 85, 93, 98).

Do đó, thuật ngữ ‘gen bị bất hoạt (knock out)’ được dùng để chỉ gen mà bị làm cho không có chức năng.

Thuật ngữ ‘polysacarit’ được dùng để chỉ sacarit chứa nhiều hơn hoặc bằng 6 dưới đơn vị monosacarit.

Sáng chế còn đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên trong đó sự biến đổi gen của bước a) là tùy ý, hoặc, được thay bằng sự biểu hiện quá mức ít nhất: i) gen nội sinh mã hóa hydratcacbon hydrolaza kết hợp với gen nội sinh hoặc khác loại mã hóa hydratcacbon kinaza, ii) gen nội sinh mã hóa hydratcacbon syntaza, hoặc, iii) gen nội sinh mã hóa hydratcacbon phosphorylaza, và trong đó sinh vật đã nêu có khả năng tách disacarit, oligosacarit, polysacarit hoặc hỗn hợp của chúng thành sacarit đã được hoạt hóa và sacarit.

Hydratcacbon hydrolaza được ưu tiên theo sáng chế là lactaza, invertaza, sucroza, trehalaza, sucroza-6-phosphat hydrolaza, maltaza hoặc amylaza. Hydratcacbon kinaza được ưu tiên theo sáng chế là galactokinaza, fructokinaza, glucokinaza hoặc manokinaza.

Sáng chế còn đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên trong đó sacarit đã được hoạt hóa đã nêu ở bước b) được thay bằng sacarit đã nêu. Do đó, ‘gốc đường được hoạt hóa’ trong phương án này được dùng làm ‘nhiên liệu’, trong khi ‘gốc đường’ này được hoạt hóa bằng kinaza và được đẩy vào lộ trình tạo của sản phẩm chuyên biệt mong đợi.

Sáng chế cũng đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên trong đó gen đã nêu ở bước a) tách disacarit, oligosacarit, hoặc polysacarit thành hai sacarit đã được hoạt hóa giống nhau hoặc khác nhau hoặc thành hai sacarit giống nhau hoặc khác nhau.

Thuật ngữ ‘sinh vật’ như nêu trên được dùng để chỉ vi sinh vật được chọn từ danh sách bao gồm vi khuẩn, nấm men hoặc tế bào nấm, hoặc, được dùng để chỉ tế bào thực vật hoặc tế bào động vật. Tốt hơn, các vi khuẩn này thuộc loài *Escherichia coli*. Tốt hơn, nếu nấm men thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên, trong đó sacarit đã được hoạt hóa đã nêu được chọn từ nhóm bao gồm alpha glucoza-1-phosphat, alpha galactoza-1-phosphat, beta glucoza-1-phosphat, beta galactoza-1-phosphat, fructoza-6-phosphat, glucoza-6-phosphat, UDP-glucoza và



UDP-galactoza và trong đó sacarit đã nêu được chọn từ nhóm bao gồm fructoza, glucoza và /hoặc galactoza.

Sáng chế, như nêu trên, còn đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên, trong đó hydratcacbon hydrolaza đã nêu là lactaza, invertaza, sucraza, maltaza, trehalaza, sucroza-6-phosphat hydrolaza và/ hoặc amylaza, và, trong đó hydratcacbon kinaza đã nêu là galactokinaza, fructokinaza, glucokinaza và/ hoặc manokinaza.

Thậm chí cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên trong đó:

- gen đã nêu ở bước a) mã hóa sucroza phosphorylaza, và/ hoặc
- các gen sau đây ở bước b) được làm cho không có chức năng: gen mã hóa beta-galactosidaza, và/ hoặc, gen mã hóa phosphoglucomutaza, và/ hoặc, gen mã hóa glucoza-1-phosphat adenyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa phosphataza (như không giới hạn ở glucoza-1-phosphataza) và/ hoặc, gen mã hóa glucoza-1-phosphat uridyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-glucoza-4-epimeraza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-glucoza:galactoza-1-phosphat uridyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-galactopyranoza mutaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-galactoza:(glucosyl)lipopolysacarit-1,6-galactosyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-galactosyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-glucosyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-glucuronat transferaza, và/ hoặc, gen mã hóa chất mang UDP-glucoza lipit transferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-đường hydrolaza, và/ hoặc, gen mã hóa invertaza, và/ hoặc, gen mã hóa maltaza, và/ hoặc, và/ hoặc gen mã hóa trehalaza, và/ hoặc, gen mã hóa phosphotransferaza vận chuyển đường, và/ hoặc, gen mã hóa hexokinaza.

Ví dụ về sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa sinh vật là sinh vật trong đó:

- gen đã nêu ở bước a) là gen mã hóa sucroza phosphorylaza có thể (nhưng không phải là duy nhất) có nguồn gốc từ vi khuẩn axit lactic như *Bifidobacterium adolescentis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, và/ hoặc *Streptococcus mutans*, và/ hoặc

- các gen đã nêu ở bước b) là: gen *lacZ*, gen *pgm*, gen *ycjU*, gen *glgC*, gen *agp*, gen *ptsG*, gen *glk*, gen *glf*, gen *waaB*, gen *ushA*, gen *wcaA*, gen *wcaC*, gen *wcaE*, gen *wcaI*, gen *wcaL*, gen *wcaJ*, gen *galU*, gen *galF*, gen *galE*, gen *malP*, gen *malQ*, và/ hoặc, gen *galT* (20, 25, 27, 28, 32, 46, 48, 49, 52, 54, 62, 82, 86, 87, 96, 97).

Ví dụ khác về sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên là sinh vật trong đó:

- gen đã nêu ở bước a) mã hóa sucroza phosphorylaza có thể (nhưng không phải là duy nhất) có nguồn gốc từ vi khuẩn axit lactic như *Bifidobacterium adolescentis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, và/ hoặc *Streptococcus mutans*, và/ hoặc

- các gen đã nêu ở bước b) là: gen PGM1, gen PGM2, gen GLG1, gen GLG2, gen INM1, gen INM2, gen GLK1, gen HXK1, gen HXK2, gen GAL10, gen GAL7, gen YHL012W, gen UGP1, gen GSY1, gen GSY2, gen DIE2, gen ALG8, gen ATG26, gen SUC2, gen MAL32, gen MAL12, gen YJL216C, và/ hoặc, gen YGR287C, và/ hoặc, FEN1, và/ hoặc, FKS1, và/ hoặc, GSC2, và/ hoặc, TPS1 (10, 12, 15, 16, 18, 24, 30, 31, 36, 41, 51, 56, 57, 59, 61, 66, 76, 81, 84, 89-91, 99).

Các sinh vật được cải biến này có thể, ví dụ không giới hạn ở, được dùng để tạo ra xenlobioza, kojibioza, threhaloza, L-arabinoza, *myo*-inositol, rafinoza, stachyoza, L-rhamnoza hoặc L-riboza dưới dạng sản phẩm chuyên biệt.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên trong đó sucroza phosphorylaza đã nêu của bước a) được thay bằng sucroza syntaza, maltoza phosphorylaza hoặc maltoza syntaza, hoặc, trong đó sucroza phosphorylaza đã nêu của bước a) được thay bằng lactoza phosphorylaza hoặc lactoza syntaza.

Các sinh vật này có thể, ví dụ nhưng không giới hạn ở, được dùng để tạo ra sophoroza, UPD-glucoza, glycolipit, flavon 3-O- $\beta$ -D-glucosit (sucroza syntaza ở bước a), galactoza( $\beta$ 1-4)rhamnoza (lactoza phosphorylaza ở bước a), hoặc, UDP-galactoza, galactinol, stachyoza hoặc globotrioza, psychosin (lactoza syntaza ở bước a) dưới dạng các sản phẩm chuyên biệt.

Sáng chế còn đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên trong đó sacarit đã được hoạt hóa đã nêu ở bước b) được thay bằng sacarit đã nêu và trong đó:

- gen đã nêu ở a) mã hóa sucroza phosphorylaza, và/ hoặc
- các gen sau đây ở bước b) được làm cho không có chức năng: gen mã hóa beta-galactosidaza, và/ hoặc, gen mã hóa glucoza-6-phosphat isomeraza, và/ hoặc, gen mã hóa glucoza-1-phosphat adenylyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa phosphataza (ví dụ, glucoza-1-phosphataza), và/ hoặc, gen mã hóa phosphofructokinaza A, và/ hoặc, gen mã hóa phosphofructokinaza B, và/ hoặc, gen mã hóa phosphogluconat dehydrataza, và/ hoặc, gen mã hóa 2-keto-3-deoxygluconat-6-phosphat aldolaza, và/ hoặc, gen mã hóa glucoza-1-phosphat uridyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-glucoza-4-epimeraza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-glucoza:galactoza-1-phosphat uridyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-galactopyranoza mutaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-galactoza: (glucosyl)lipopolysacarit-1,6-galactosyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-galactosyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-glycosyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-glucuronat transferaza, và/ hoặc, gen mã hóa chất mang UDP-glucoza lipid transferaza, và/ hoặc, gen mã hóa GDP-manoza hydrolaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-đường hydrolaza, và/ hoặc, gen mã hóa manozaza-6-phosphat isomeraza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-N-axetylglucosamin enoylpyruvoyl transferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-N axetylglucosamin axetyltransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa UDP-N-axetylglucosamin-2-epimeraza, và/ hoặc, gen mã hóa undecaprenyl-phosphat-alfa-N-axetylglucosaminyl transferaza, và/ hoặc, glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza, và/ hoặc, gen mã hóa L-glutamin:D-fructoza-6-phosphat aminotransferaza, và/ hoặc, gen mã hóa manozaza-6-phosphat isomeraza, và/ hoặc gen mã hóa sorbitol-6-phosphat dehydrogenaza, và/ hoặc, gen mã hóa manitol-1-phosphat 5-dehydrogenaza, và/ hoặc gen mã hóa aluloza-6-phosphat 3-epimeraza, và/ hoặc, gen mã hóa invertaza, và/ hoặc, gen mã hóa maltaza, và/ hoặc, và/ hoặc gen mã hóa trehalaza, và/ hoặc, gen mã hóa phosphotransferaza vận chuyển đường, và/ hoặc, gen mã hóa hexokinaza.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên trong đó:

- gen đã nêu ở bước a) là sucroza phosphorylaza có nguồn gốc từ vi khuẩn axit lactic như *Bifidobacterium adolescentis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, hoặc *Streptococcus mutans*, và/ hoặc

- các gen đã nêu ở bước b) là: gen lacZ, gen pgi, gen glgC, gen agp, gen pfkA, gen pfkB, gen waaB, gen ushA, gen eda, gen edd, gen wcaA, gen wcaC, gen wcaE, gen wcaI, gen wcaL, gen wcaJ, gen wcaB, gen wcaF, gen wcaK, gen wcaD, gen galU, gen galF, gen galE, gen gmm, gen galT, gen manA, gen murA, gen lpxA, gen rffE, và/ hoặc, gen rfe, gen glmS, gen srlD, gen mtlD, gen alsE và/ hoặc, zwf (6, 20, 25, 28, 29, 32, 43, 44, 46, 49, 52-55, 62, 65, 75, 78, 82, 86, 87, 96, 97, 101).

Sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa theo sáng chế là sinh vật trong đó:

- gen đã nêu ở bước a) là gen mã hóa sucroza phosphorylaza có nguồn gốc từ vi khuẩn axit lactic như *Bifidobacterium adolescentis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, hoặc *Streptococcus mutans*, và/ hoặc

- các gen đã nêu ở bước b) là: gen PGI1, gen PFK1, gen PFK2, gen PFK26, gen PFK26, gen PFK27, gen GND1, gen GND2, gen PMI40, gen ZWF1, gen GFA1, gen GLG1, gen GLG2, gen INM1, gen INM2, gen GLK1, gen HXK1, gen HXK2, gen GAL10, gen GAL7, gen YHL012W, gen UGP1, gen GSY1, gen GSY2, gen DIE2, gen ALG8, gen ATG26, gen SUC2, gen MAL32, gen MAL12, gen YJL216C, và/ hoặc, gen YGR287C, và/ hoặc, FEN1, và/ hoặc, FKS1, và/ hoặc, GSC2, và/ hoặc, TPS1 (12, 15, 16, 24, 26, 30, 31, 34, 36, 38, 39, 41, 51, 56, 57, 59-61, 64, 66, 74, 76, 83, 84, 89, 90, 95, 99).

Sinh vật được cải biến này có thể, ví dụ, được dùng để tạo ra các dẫn xuất đường được fucosyl hóa như fucosyllactoza, và cụ thể hơn  $\alpha$ -1,2-fucosyllactoza,  $\alpha$ -1,3-fucosyllactoza,  $\alpha$ -1,4-fucosyllactoza,  $\alpha$ -1,6-fucosyllactoza dưới dạng các sản phẩm chuyên biệt với dẫn xuất fucosyltransferaza cụ thể từ ví dụ không giới hạn ở *Helicobacter pylori*, *Bacteroides sp.*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus* và, *Dictyostelium discoideum*. Ngoài ra, sinh vật được cải biến đã nêu có thể được dùng để tạo ra kitosan bằng kitin syntaza và kitin deacetylaza hoặc để tạo ra myo-inositol bằng cách cho inositol-1-phosphat syntaza kết hợp với inositol monophosphataza.

Các ví dụ cụ thể về các gen mà chuyển hóa sacarit đã được hoạt hóa đã nêu thành sản phẩm chuyên biệt là các gen mã hóa epimeraza, transferaza, reductaza,

(pyro)phosphorylaza, (de)carboxylaza, dehydrataza, permeaza, syntaza và/ hoặc isomeraza. Do đó, sáng chế đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên trong đó các gen mà chuyển hóa sacarit đã được hoạt hóa đã nêu thành sản phẩm chuyên biệt mã hóa epimeraza, transferaza, reductaza, dehydrogenaza, oxidaza, pyrophosphorylaza, (de)carboxylaza, dehydrataza, permeaza, syntaza và/ hoặc isomeraza. Thậm chí cụ thể hơn sáng chế đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa trong đó epimeraza đã nêu là UDP-galactoza-4-epimeraza hoặc UDP-N-acetylglucosamin epimeraza, và/ hoặc, trong đó transferaza đã nêu là glycosyltransferaza, sialyltransferaza hoặc sulfotransferaza.

Sáng chế còn đề cập đến sinh vật được cải biến về mặt chuyển hóa như nêu trên trong đó sản phẩm chuyên biệt đã nêu là monosacarit, disacarit, trisacarit, tetrasacarit, pentasacarit, oligosacarit, polysacarit, nucleosit, O-glycosit, S-glycosit, N-glycosit, C-glycosit, glycoprotein, glycolipit hoặc hydratcacbon được hoạt hóa như không giới hạn ở myo-inositol, L-arabinoza, Scyllo-inozoa, glycosylphosphatidylinositol, lacto-N-bioza, lacto-N-tetraza, lactosamin, galactosyloligosacarit được fucosyl hóa (GOS), L-Fucoza, N-Ac glucosamin, axit sialic, sialyllactoza, chitosan, chitin, 1,2-fucosyllactoza, 1,3-fucosyllactoza, 1,4-fucosyllactoza, 1,6-fucosyllactoza, galactinol, stachyoza, globotrioza, galactoza(beta1-4) rhamnoza, sophoroza, xenlobioza, UDP-glucoza và sophorolipit.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo sản phẩm chuyên biệt như được mô tả ở trên bao gồm bước:

- i) cải biến về mặt chuyển hóa vi sinh vật như được mô tả ở trên, và
- ii) nuôi cấy vi sinh vật được cải biến gen đã nêu, và
- iii) chiết và tinh chế sản phẩm chuyên biệt đã nêu.

Rõ ràng là phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để nuôi cấy vi sinh vật, và chiết và tinh chế các sản phẩm chuyên biệt từ việc nuôi cấy đã nêu có thể được dùng trong sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến việc dùng 2-fucosyltransferaza có nguồn gốc từ *Dictyostelium discoideum* và có có trình tự axit amin được xác định bằng SEQ ID NO 1, hoặc, mảnh của chúng có hoạt tính 2-fucosyltransferaza, hoặc, biến thể của chúng

có độ tương đồng về trình tự ít nhất 75% và có hoạt tính 2-fucosyltransferaza để tạo ra 2-fucosyllactoza ( $\alpha$ 1,2-fucosyllactoza). Mảnh cụ thể có hoạt tính 2-fucosyltransferaza như nêu trên được xác định bằng SEQ ID NO 4.

Việc dùng axit nucleic mã hóa 2-fucosyltransferaza như nêu trên, và cụ thể là trong đó axit nucleic đã nêu được xác định bằng SEQ ID NO 2 hoặc SEQ ID NO 3 (mà cả hai mã hóa SEQ ID NO 1), để tạo ra fucosyllactoza là một phần của sáng chế. Các axit nucleic mã hóa SEQ ID NO 4 được xác định bằng SEQ ID NO 5 và SEQ ID NO 6 và cũng là một phần của sáng chế.

Thuật ngữ ‘mảnh’ được dùng để chỉ protein (hoặc peptit hoặc polypeptit) chứa ít axit amin hơn so với trình tự axit amin như được mô tả bằng SEQ ID NO 1 và vẫn giữ lại hoạt tính 2-fucosyltransferaza đã nêu. Mảnh này có thể -ví dụ- là protein bị mất nhỏ hơn hoặc bằng 10% tổng số axit amin ở đầu tận cùng C- và/ hoặc N hoặc có thể tương ứng với SEQ ID NO 4. Thuật ngữ “biến thể” được dùng để chỉ protein có độ tương đồng về trình tự ít nhất 75%, tốt hơn là có độ tương đồng về trình tự ít nhất 76-85%, tốt hơn nữa là có độ tương đồng về trình tự ít nhất 86-90% hoặc tốt nhất là có độ tương đồng về trình tự ít nhất 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 hoặc 99% so với SEQ ID NO 1 hoặc so với mảnh của chúng, và, mà mã hóa protein vẫn giữ lại hoạt tính 2-fucosyltransferaza đã nêu.

Do đó, thể tương đồng, hoặc các gen trong các chi và loài khác (không phải là *Dictyostellium discoideum* mà từ đó thu được SEQ ID NO 1) có độ đồng nhất ít nhất 75% ở mức axit amin, và có chức năng đã nêu là một phần của sáng chế. Phần trăm độ tương đồng về trình tự axit amin được xác định bằng các sắp xếp hai trình tự này và xác định số lượng vị trí axit amin giống nhau được tách ra trong đoạn ngắn hơn của các trình tự này x100. ‘Biến thể’ này cũng có thể khác so với protein như được mô tả bằng SEQ ID NO 1 chỉ trong các sự thay thế và/ hoặc sự cải biến bảo toàn, sao cho khả năng của protein để không mất đi hoạt tính 2-fucosyltransferaza. "Sự thay thế bảo toàn" là sự thay thế trong đó axit amin được thay thế cho một axit amin khác mà có đặc tính tương tự, sao cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hóa protein mong muốn bản chất của protein hầu như không thay đổi. Nói chung, các nhóm axit amin sau đây biểu hiện các thay đổi bảo toàn: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; và (5) phe, tyr, trp, his.

Các biến thể cũng có thể là (hoặc theo cách khác) protein như được mô tả ở đây được cải biến, ví dụ, bằng sự mất hoặc thêm axit amin mà có ảnh hưởng rất nhỏ đến hoạt tính 2-fucosyltransferaza như được xác định ở trên, cấu trúc thứ cấp và bản chất chữa bệnh bằng nước của enzym này.

Các trình tự cụ thể sau đây, như nêu trên, là một phần của sáng chế:

SEQ ID NO 1: trình tự axit amin hoàn chỉnh của 2-fucosyltransferaza của *Dictyostellium discoideum*:

MNDSPIISVVLPLFIKDNDKSLNYQGINNLIISIDSIIEQTFKEWELILVDDGSNN  
EILEQLLSKRYSTDNRIFINKENKGIVKSLNDAILNHCSPTSKYIARMDSDDIS  
HPTRLQSQLKYLQSNETIDILGCPKMFNNKLEILNNNNNNNNNNNNNNNNVKELIN  
IINNEESFKFIQHPDKDILMWSMFFNCCIVHPSVIFKRSIFTIEHCYEENNQFPFIE  
DYLFWLKSLIMKGLNISNIQSSTPLLRLKHNNSSISFKNIEKQKDSTANASCYY  
LNILFKRFNIDSEIIQNSSLSMKEIIQFFQLSPSSLSKINNISIELFEFAFKYLELIEK  
SCTKQQPNYSNSIKDAANEKMGELVSLCLSNYPNNQKSSLLWEKWLSRNPTS  
QLLSLLSNLNVKSSTTIINNINNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNSI  
LNFISGINSNKINTPKSNNKFKENGIRIICFSKDRAFQLKEYLRTFFKYLNDD  
NGNDKFEIIVDVLFTYSNEKFKNSYQLVIESFPQVNFIEENFTDQLINLVQKTN  
KLEYVMFSVDDILYYNEFNLKEYCLSLNSEPLALGFYMKLNKNITYCHTCNQ  
DITIPLNSNTISRTENNFKYLKWNRRNDNDCKKDWNPWDLCSSTIYRCNDIDSII  
NGIVKYYGIRNGINHPNRFENGNRPIIQKQIYQNKPYCLCLSDHYSPPMSVVTI  
NRVQDVYDNPIYDQTLSDDDLQQLYSNKSLNDEKYKENSLSLNFKSVHIGEL  
FIS

SEQ ID NO 2: trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon mã hóa SEQ ID NO1 để biểu hiện trong *E. Coli*:

ATGAACGATAGCCCGATTATTAGCGTTGTTCTGCCGTTTCTGATCAAAGAT  
AACGATGATAAAAGCCTGAACTACCAGGGCATTAAACAACCTGATTATTAG  
CATCGATAGCATCATCGAGCAGACCTTTAAAGAATGGGAACTGATTCTGGT  
TGATGATGGCAGCAATAACGAAATTCTGGAACAGCTGCTGAGCAAACGTT  
ATAGCACCGATAACCGCATCAAATTTATTATTAATAAAGAAAATAAAGGC  
ATTGTGAAAAGCCTGAATGATGCCATTCTGAATCATTGTAGCCCGACCAGC  
AAATATATTGCACGTATGGATAGCGACGATATTAGCCATCCGACCCGTCTG

CAGAGCCAGCTGAAATATCTGCAGAGCAATGAAACCATTGATATTCTGGG  
TTGCCCCGATCAAAATGTTTAATAATAATAAACTGATTGAAATTCTGAATAA  
TAATAACAATAACAACAATATTAATAATAATGTGAAAGAACTGATTAATA  
TTATTAATAATGAAGAAAGCTTTAAATTTATTTCAGCATCCGGATAAAGATA  
TTCTGATGTGGTCCATGTTCTTCAATTGCTGTATTGTTTCATCCGAGCGTGAT  
TTTTAAACGCAGCATTTTTTACCATCGAGCACTGCTATGAAGAGAATAATCA  
GTTTCCGTTCATCGAGGATTACCTGTTTTGGCTGAAATCCCTGATTATGAAA  
GGCCTGAACATTAGCAATATCCAGAGCAGCACACCGCTGCTGTATCTGCGT  
AAACATAATAACAGCATTAGCTTTAAAAATATTGAAAAACAGAAAGATAG  
CACCGCCAATGCCAGCTGTTATTATCTGAACATTCTGTTCAAACGCTTTAA  
CATCGACAGCGAAATTATTCAGAATAGCAGCCTGAGCATGAAAGAAATCA  
TCCAGTTTTTTTCAGCTGAGCCCGAGCAGCCTGTCCAAAATTAATAACATTA  
GCATCGAACTGTTTGAATTTGCCTTTAAATATCTGGAACTGATCGAGAAAA  
GCTGTACCAAACAGCAGCCGAATTATAGCAACAGCATTAAAGATGCAGCC  
AACGAAAAAATGGGTGAACTGGTTAGCCTGTGTCTGAGCAATTATCCGAA  
TAATCAGAAAAGCAGTCTGCTGTGGGAAAAATGGCTGAGCCGTAATCCGA  
CCAGCCAGCTGCTGAGTCTGCTGAGCAATCTGAATGTTAAAAGCAGCACC  
ACCATTATTAATAACAATATTAACAACAACAATAATAACAACAATAA  
TAACAATAACAATAACAATAATAACAACAACAATAATAATAACA  
ACAACAGCATTCTGAATTTTATTAGCGGCATTAATAGCAATAAAATTAATA  
CCCCGAAAAGCAACAATAACAAATTTAAAGAGAATGGCATTTCGCATTATT  
TGCTTCAGCAAAGATCGTGCATTCCAGCTGAAAGAATATCTGCGCACCTTC  
TTCAAATATCTGAAAAATGATGATAATGGCAATGATAAATTTGAAATTATT  
GTGGATGTGCTGTTTACCTATAGCAATGAAAAATTCAAAAATAGCTATCAG  
CTGGTGATCGAAAGCTTTCCGCAGGTAACTTTATTAAAGAAGAAAACCTT  
ACCGATCAGCTGATTAACCTGGTGCAGAAAACCAACAACTGGAATATGT  
GATGTTTCAGCGTGGATGATATCCTGTATTACAACGAGTTCAATCTGAAAGA  
GTATTGCCTGAGCCTGAATAGCGAACCGCTGGCACTGGGTTTTTATATGAA  
ACTGAATAAAAATATTACCTATTGCCATACCTGCAACCAGGATATTACCAT  
TCCGCTGAATAGCAATACCATTAGCCGCACCGAAAATAACTTTAAATACCT  
GAAATGGAATCGCAACGATAATGATTGCAAAAAAGACTGGAACCTATCCGT  
GGGATCTGTGTAGCACCATTATCGTTGCAACGACATTGACAGCATCATTA



ATGGTATTGTGAAATATTATGGTATTCGCAACGGCATTAAATCATCCGAATC  
 GCTTTGAATTTAATGGCAACCGTCCGATTATTCAGAAACAAATCTACCAGA  
 ACAAACCGTATTGTCTGTGCCTGAGCGATCATTATTCACCGATGAGCGTTG  
 TTACCATTAATCGTGTTTCAGGATGTGTATGATAACCCGATTTATGATCAGA  
 CCCTGAGCCTGGATGATCTGGATCAACTGCTGTATAGCAATAAATCCCTGA  
 ACGATGAAAAATATAAAGAAAACAGCCTGAGTCTGAACTTCAAAAGCGTT  
 CATATTGGCGAACTGTTTCATCAGCTAA

SEQ ID NO 3: trình tự nucleotit nguyên mẫu mã hóa SEQ ID NO1: 2-fucosyltransferaza của *Dictyostelium discoideum*:

ATGAATGATTCACCAATAATAAGTGTAGTTTTACCTTTTTTAATAAAGGAC  
 AATGACGATAAATCATTAATAATTACCAAGGAATAAATAATTTAATAATATCA  
 ATAGATAGCATTATTGAACAACTTTTAAAGAATGGGAATTAATTTTAGTT  
 GATGATGGATCAAATAATGAAATTTTGGAGCAATTACTTTCAAAAAGATAT  
 AGTACAGATAATAGAATTAAATTCATAATAATAAAGAGAATAAAGGTAT  
 TGTTAAAAGTTTAAATGATGCAATTTTAAATCATTGTTTCACCAACTTCAAA  
 ATATATTGCTCGTATGGATTCAGATGATATTTCTCATCCAACAAGATTACA  
 ATCTCAACTTAAATATCTTCAATCAAATGAAACAATTGATATATTAGGTTG  
 TCCAATTAAAATGTTTAATAATAATAAATTAATTGAAATTTTAAATAATAA  
 TAATAATAATAATAATATTAATAATAATGTGAAAGAGTTAATTAATATAAT  
 TAATAATGAAGAATCTTTTAAATTTATTCAACATCCTGATAAAGATATTTT  
 AATGTGGTCAATGTTTTTCAATTGTTGTATTGTTACCCTTCTGTAATATTT  
 AAAAGATCGATATTCACTATTGAACATTGTTATGAAGAAAACAACCAATTT  
 CCATTCATTGAAGATTACTTATTTTGGTTAAAATCCTTAATAATGAAAGGTT  
 TAAATATTTCAAATATCCAATCATCAACACCATTACTATATTTAAGAAAAC  
 ATAATAACTCTATATCTTTTAAAAATATTGAAAAACAAAAAGATTCCACTG  
 CTAATGCATCTTGTTATTATCTAAATATACTTTTTTAAAAGATTTAATATTGA  
 TTCTGAAATTATTCAAAATTCTTCACTCTCAATGAAAGAAATTATTCAGTTC  
 TTTCAACTTTCACCATCATCTTTATCAAAAATCAATAATATTTCAATTGAAT  
 TATTTGAATTTGCATTTAAATATCTAGAATTAATTGAAAAATCATGTACAA  
 AACAACAACCAAACCTATTCAAACAGTATAAAAGATGCAGCAAATGAAAAA  
 ATGGGTGAATTAGTATCTTTATGTTTATCAAATTATCCAAATAATCAAAAA  
 TCATCATTACTTTGGGAAAAATGGTTATCAAGAAATCCAACCTCACAATTA

CTATCACTTTTATCAAATTTAAATGTAAAATCTTCAACTACTATAATTAATA  
 ATAATATTAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA  
 ATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATTCAATTTTAA  
 ATTTTATATCTGGCATTAAAGTAATAAAAATAAATACTCCAAAATCTAATA  
 ATAATAAATTTAAAGAAAATGGAATTAGAATAATTTGTTTCTCAAAAGATA  
 GAGCATTTC AATTAAAAGAATATCTTAGAACATTTTTTAAATATTTAAAAA  
 ATGATGATAATGGAAATGATAAATTTGAAATTATTGTTGATGTATTATTTA  
 CATATTCAAATGAGAAATTCAAAAACCTCTTATCAATTAGTTATTGAAAGTT  
 TTCCACAAGTTAATTTTATTAAAGAAGAGAATTTCACTGATCAATTAATTA  
 ATTTAGTTCAAAAAACAAATAAACTTGAATATGTCATGTTTTTCAGTTGATG  
 ATATTCTTTATTATAATGAATTCAATCTCAAAGAATATTGTTTATCTTTGAA  
 TAGTGAGCCATTGGCATTAGGTTTCTATATGAAGTTAAATAAAAATATTAC  
 CTATTGTCATACTTGTAATCAAGATATAACAATACCATTAAATTCAAATAC  
 TATTAGTAGAACAGAGAATAATTTTAAATATTTAAAATGGAATAGAAATG  
 ATAATGATTGTAAAAAGGATTGGAATTATCCATGGGATTTATGTTCAACCA  
 TTTATAGATGTAATGATATTGATTCAATCATTAAATGGTATAGTTAAATATTA  
 TGGAATTAGAAATGGTATTAATCATCCAAATAGATTCGAATTCAATGGTAA  
 TAGACCAATCATTCAAAGCAAATCTATCAAATAAACCTACTGTTTATG  
 TTTATCAGATCACTATTCTCCAATGTCTGTTGTA ACTATTAATAGAGTTCAA  
 GATGTCTATGATAATCCAATTTATGACCAAACCCTATCTTTAGATGATTTA  
 GATCAATTACTTTATTCAAACAAATCATTAAATGATGAAAAATATAAAGAA  
 AATAGTTTATCTTTAAATTTTAAAAGTGTTTCATATTGGTGAAC TTTTATTT  
 CTAA

SEQ ID NO 4: trình tự axit amin của mảnh của SEQ ID NO 1 có hoạt tính fucosyltransferaza:

MSILNFISGINSNKINTPKSNNKFKENGIRIICFSKDRAFQLKEYLRTFFKYLKN  
 DDNGNDKFEIIVDVLFTYSNEKFKNSYQLVIESFPQVNFIKEENFTDQLINLVQK  
 TNKLEYVMFSVDDILYYNEFNLKEYCLSLNSEPLALGFYMKLNKNITYCHTCN  
 QDITIPLNSNTISR TENNFKYLK WNRNDNDCKKDWNYPWDL CSTIYRCNDIDS  
 IINGIVKYYGIRNGINHPNRFEFNGNRPIIQKQIYQNKPYCLCLSDHYS PMSVVTI  
 NRVQDVYDNPIYDQTL SLDDLDQLLYSNKSLNDEKYKENSLSLNFKSVHIGEL  
 FIS

SEQ ID NO 5: trình tự axit nucleic được tối ưu hóa codon mã hóa SEQ ID NO 4 có ATG được bổ sung:

ATGAGCATTCTGAATTTTATTAGCGGCATTAATAGCAATAAAATTAATACC  
CCGAAAAGCAACAATAACAAATTTAAAGAGAATGGCATTTCGCATTATTTG  
CTTCAGCAAAGATCGTGCATTCCAGCTGAAAGAATATCTGCGCACCTTCTT  
CAAATATCTGAAAAATGATGATAATGGCAATGATAAATTTGAAATTATTGT  
GGATGTGCTGTTTACCTATAGCAATGAAAAATTCAAAAATAGCTATCAGCT  
GGTGATCGAAAGCTTTCCGCAGGTAACTTTATTAAAGAAGAAAACCTTTAC  
CGATCAGCTGATTAACCTGGTGCAGAAAACCAACAACTGGAATATGTGA  
TGTTTCAGCGTGGATGATATCCTGTATTACAACGAGTTCAATCTGAAAGAGT  
ATTGCCTGAGCCTGAATAGCGAACCGCTGGCACTGGGTTTTTATATGAAAC  
TGAATAAAAATATTACCTATTGCCATACCTGCAACCAGGATATTACCATTC  
CGCTGAATAGCAATACCATTAGCCGCACCGAAAATAAATTTAAATACCTGA  
AATGGAATCGCAACGATAATGATTGCAAAAAAGACTGGAACCTATCCGTGG  
GATCTGTGTAGCACCATTTATCGTTGCAACGACATTGACAGCATCATTAAT  
GGTATTGTGAAATATTATGGTATTCGCAACGGCATTAAATCATCCGAATCGC  
TTTGAATTTAATGGCAACCGTCCGATTATTCAGAAACAAATCTACCAGAAC  
AAACCGTATTGTCTGTGCCTGAGCGATCATTATTCACCGATGAGCGTTGTT  
ACCATTAATCGTGTTCAGGATGTGTATGATAACCCGATTTATGATCAGACC  
CTGAGCCTGGATGATCTGGATCAACTGCTGTATAGCAATAAATCCCTGAAC  
GATGAAAAATATAAAGAAAACAGCCTGAGTCTGAACTTCAAAAGCGTTCA  
TATTGGCGAACTGTTCATCAGCTAA

SEQ ID NO 6: trình tự axit nucleic nguyên mẫu mã hóa SEQ ID NO4:

TCAATTTTAAATTTTATATCTGGCATTAAATAGTAATAAAATAAATACTCCA  
AAATCTAATAATAATAAATTTAAAGAAAATGGAATTAGAATAATTTGTTTC  
TCAAAAGATAGAGCATTTCAATTAAAAGAATATCTTAGAACATTTTTTAAA  
TATTTAAAAAATGATGATAATGGAAATGATAAATTTGAAATTATTGTTGAT  
GTATTATTTACATATTCAAATGAGAAATTCAAAAACCTCTTATCAATTAGTT  
ATTGAAAGTTTTCCACAAGTTAATTTTATTAAAGAAGAGAATTTCACTGAT  
CAATTAATTAATTTAGTTCAAAAAACAAATAAACTTGAATATGTCATGTTT  
TCAGTTGATGATATTCTTTATTATAATGAATTCAATCTCAAAGAATATTGTT  
TATCTTTGAATAGTGAGCCATTGGCATTAGGTTTCTATATGAAGTTAAATA

AAAATATTACCTATTGTCATACTTGTAATCAAGATATAACAATACCATTAA  
 ATTCAAATACTATTAGTAGAACAGAGAATAATTTTAAATATTTAAAATGGA  
 ATAGAAATGATAATGATTGTAAAAAGGATTGGAATTATCCATGGGATTTAT  
 GTTCAACCATTTATAGATGTAATGATATTGATTCAATCATTAATGGTATAG  
 TTAAATATTATGGAATTAGAAATGGTATTAATCATCCAAATAGATTCTGAAT  
 TCAATGGTAATAGACCAATCATTCAAAGCAAATCTATCAAATAAACCCCT  
 ACTGTTTATGTTTATCAGATCACTATTCTCCAATGTCTGTTGTAACCTATTAA  
 TAGAGTTCAAGATGTCTATGATAATCCAATTTATGACCAAACCCTATCTTT  
 AGATGATTTAGATCAATTACTTTATTCAAACAAATCATTAATGATGAAAA  
 ATATAAAGAAAATAGTTTATCTTTAAATTTTAAAAGTGTTTCATATTGGTGA  
 ACTTTTTATTCTTAA

Do đó, sáng chế được minh họa bằng các ví dụ điều chế cụ thể.

SEQ ID NO 6: Trình tự axit nucleic nguyên mẫu mã hóa SEQ ID NO 4:

TCAATTTTAAATTTTATATCTGGCATTAAAGTAATAAAATAAATACTCCA  
 AAATCTAATAATAATAAATTTAAAGAAAATGGAATTAGAATAATTTGTTTC  
 TCAAAGATAGAGCATTTCAATTAAGAATATCTTAGAACATTTTTTAA  
 TATTTAAAAAATGATGATAATGGAAATGATAAATTTGAAATTATTGTTGAT  
 GTATTATTTACATATTCAAATGAGAAATTCAAAAACCTCTTATCAATTAGTT  
 ATTGAAAGTTTTCCACAAGTTAATTTTATTAAAGAAGAGAATTTCACTGAT  
 CAATTAATTAATTTAGTTCAAAAAACAAATAAACTTGAATATGTCATGTTT  
 TCAGTTGATGATATTCTTTATTATAATGAATTCAATCTCAAAGAATATTGTT  
 TATCTTTGAATAGTGAGCCATTGGCATTAGGTTTCTATATGAAGTTAAATA  
 AAAATATTACCTATTGTCATACTTGTAATCAAGATATAACAATACCATTAA  
 ATTCAAATACTATTAGTAGAACAGAGAATAATTTTAAATATTTAAAATGGA  
 ATAGAAATGATAATGATTGTAAAAAGGATTGGAATTATCCATGGGATTTAT  
 GTTCAACCATTTATAGATGTAATGATATTGATTCAATCATTAATGGTATAG  
 TTAAATATTATGGAATTAGAAATGGTATTAATCATCCAAATAGATTCTGAAT  
 TCAATGGTAATAGACCAATCATTCAAAGCAAATCTATCAAATAAACCCCT  
 ACTGTTTATGTTTATCAGATCACTATTCTCCAATGTCTGTTGTAACCTATTAA  
 TAGAGTTCAAGATGTCTATGATAATCCAATTTATGACCAAACCCTATCTTT  
 AGATGATTTAGATCAATTACTTTATTCAAACAAATCATTAATGATGAAAA

ATATAAAGAAAATAGTTTATCTTTAAATTTTAAAAGTGTTTCATATTGGTGA  
ACTTTTTATTCTTAA

Theo đó, sáng chế được minh họa bằng các ví dụ điều chế cụ thể.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví dụ 1: Vật liệu và phương pháp**

##### **Môi trường**

Môi trường dịch Luria (LB) bao gồm trypton pepton 1% (Difco, Erembodegem, Bỉ), dịch chiết nấm men 0,5% (Difco) và natri clorua 0,5% (VWR, Leuven, Bỉ). Môi trường cho các thử nghiệm bình lắc chứa 2,00g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5,00g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,993g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7,315g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 8,372g/l MOPS, 0,5g/l  $\text{NaCl}$ , 0,5g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 14,26g/l sucroza hoặc nguồn cacbon khác khi được cụ thể hóa trong các ví dụ, dung dịch vitamin 1ml/l, dung dịch molybdat 100 $\mu\text{l}$ /l, và dung dịch selen 1ml/l. Môi trường này được cố định ở độ pH 7 bằng KOH 1M.

Dung dịch vitamin bao gồm 3,6g/l  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 5g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,3g/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,38g/l  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,5g/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,94g/l  $\text{ZnCl}_2$ , 0,0311g/l  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 0,4g/l  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  và 1,01g/l thiamin  $\cdot \text{HCl}$ . Dung dịch molybdat chứa 0,967g/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Dung dịch selen chứa 42g/l  $\text{SeO}_2$ .

Môi trường tối thiểu để lên men chứa 6,75g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,25g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.15g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (môi trường phosphat thấp) hoặc 2,93g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và 7,31g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (môi trường phosphat cao), 0,5g/l  $\text{NaCl}$ , 0,5g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 14,26g/l sucroza, dung dịch vitamin 1ml/l, dung dịch molybdat 100 $\mu\text{l}$ /l, và dung dịch selen 1ml/l với cùng điều kiện như được mô tả ở trên.

Môi trường phức hợp được tiệt trùng bằng nồi hấp (121°C, 21') và môi trường tối thiểu bằng cách lọc (0,22  $\mu\text{m}$  Sartorius). Nếu cần, môi trường này được làm cho có tính chọn lọc bằng cách bổ sung kháng sinh (ampixilin, cloramphenicol, kanamycin).

##### **Điều kiện nuôi cấy**

Từ khuẩn lạc đơn lẻ trên đĩa LB, trong 5ml môi trường LB, giống nuôi cấy sơ bộ được ủ trong 8 giờ ở 37°C trên máy lắc tròn ở tốc độ 200 vòng/phút. Từ môi trường nuôi cấy này, 2ml được chuyển vào 100ml môi trường tối thiểu trong bình lắc dung tích 500ml và được ủ trong 16 giờ ở 37°C trên máy lắc tròn ở tốc độ 200 vòng/phút. 4%

chất để chủng được dùng trong bình nuôi cấy 2 l Biostat B Plus có dung tích làm việc 1,5 l (Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Đức). Các điều kiện nuôi cấy là: 37°C, khuấy ở tốc độ 800 vòng/phút, và tốc độ dòng khí là 1,5 l/phút. Các điều kiện hiếu khí được duy trì bằng cách sục khí. Độ pH được duy trì ở 7 bằng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M và KOH 4M. Khí thải được làm lạnh xuống 4°C bằng máy làm mát khí thải (Frigomix 1000, Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Đức). Dung dịch 10% của chất chống tạo bọt silicon (BDH 331512K, VWR Int Ltd., Poole, England) được bổ sung vào khi sự tạo bọt xuất hiện trong quá trình lên men (xấp xỉ 10μl). Khí thải được đo bằng máy phân tích khí thải EL3020 (ABB Automation GmbH, 60488 Frankfurt am Main, Đức). Tất cả dữ liệu được lôga bằng hệ thống Sartorius MFCS/win v3,0 (Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Đức).

Tất cả các chủng được nuôi cấy ít nhất hai lần và độ lệch chuẩn về năng suất và tỷ lệ xác định dựa vào ít nhất 10 điểm dữ liệu trong các thử nghiệm lặp lại.

#### Nạp mẫu

Thiết bị phản ứng sinh học chứa bên trong nó ống thu hoạch (BD Spinal Needle, 1,2x152 mm (BDMedical Systems, Franklin Lakes, NJ - USA) kết nối với cổng phản ứng, nối bên ngoài với ống Masterflex-14 (Cole-Parmer, Antwerpen, Bỉ) tiếp đó là cổng thu hoạch với vách ngăn để nạp mẫu. Mặt kia của cổng thu hoạch này được nối phía sau với bình phản ứng bằng ống Masterflex-16. Hệ thống này được gọi là cuộn nạp mẫu nhanh. Trong nạp mẫu, dịch phản ứng được bơm khắp trong cuộn nạp mẫu. Người ta ước lượng rằng, ở tốc độ chảy 150ml/phút, dịch phản ứng này cần 0,04 giây để tiếp cận cổng thu hoạch và 3,2 giây để vào lại bình phản ứng. Ở mức độ pO<sub>2</sub> 50%, có khoảng 3mg/l oxy trong chất lỏng này ở 37°C. Mức pO<sub>2</sub> này không bao giờ nên nhỏ hơn 20% để tránh điều kiện vi hiếu khí. Do đó, 1,8mg/l oxy có thể được tiêu thụ trong khi đi qua cuộn thu hoạch. Cho rằng tốc độ hấp thu oxy là 0,4g oxy/g sinh khối/giờ (tốc độ hấp thu oxy cực đại được nhận thấy ở  $\mu_{max}$ ), điều này tạo ra 5g/l sinh khối, tỷ lệ hấp thu oxy 2g/l/ giờ hoặc 0,56 mg/l/ giây, mà được nhân 3,2 giây (thời gian có mặt trong cuộn này) thu được sự tiêu thụ 1,8mg/l oxy.

Để kết thúc sự chuyển hóa của tế bào trong quá trình nạp mẫu, dịch phản ứng được hút qua cổng thu hoạch trong ống tiêm được nạp 62g hạt thép không gỉ được làm lạnh sơ bộ ở -20°C, để làm lạnh 5ml dịch ngay lập tức xuống đến 4°C. Nạp mẫu sau đó ngay

lập tức là ly tâm lạnh (15000g, 5 phút, 4°C). Trong các thử nghiệm theo mẻ, các mẫu đối với OD<sub>600nm</sub>, CDW, và sự chuyển hóa ngoại bào được thực hiện mỗi giờ bằng cách dùng cuộn nạp mẫu nhanh và phương pháp nạp mẫu hạt thép không gỉ lạnh. Khi sự sinh trưởng theo luật số mũ đạt được, tần suất nạp mẫu tăng đến 20 đến 30 phút một lần.

#### Nạp mẫu dịch

Dùng nạp mẫu nhanh, mà được cặp đôi với máy lên men, các mẫu của 1ml dịch được rút khỏi máy lên men trong 0,5 giây. Các mẫu được rút trực tiếp vào trong các ống chứa 5ml dung dịch làm kết thúc đã được làm lạnh sơ bộ ở -40°C mà đã được trộn ngay lập tức sau khi nạp mẫu bằng cách xoáy. Các cỡ mẫu chiết được định lượng trọng lượng bằng cách cân các ống này trước và sau khi nạp mẫu.

#### Nạp mẫu dịch lọc

Các mẫu của dịch nuôi cấy ngoại bào thu được bằng cách lọc ống tiêm (kích thước hạt 0,45µm, celuloza axetat) ở nhiệt độ trong phòng không có hạt—Sự lọc trực tiếp của mẫu dịch sau khi loại bỏ tế bào, dịch lọc hoặc dịch nổi thu được được trộn ngay lập tức với 5ml dung dịch làm mát để xử lý các mẫu này theo cùng cách như các mẫu dịch. Cũng trong trường hợp này, lượng mẫu chính xác thu được được định lượng trọng lượng.

#### Quy trình làm mát

Dung dịch làm mát được dùng là metanol chứa nước 60% (thể tích/thể tích). Sau khi kết thúc các mẫu dịch trong dung dịch làm mát, mà đã được làm lạnh sơ bộ đến -40°C, hỗn hợp mẫu /dung dịch làm mát được ly tâm trong 5 phút ở 8000g trong ly tâm lạnh (-20°C) bằng cách dùng rôto mà đã được làm lạnh sơ bộ ở -40°C. Sau khi lắng gạn, dịch nổi (QS) được bảo quản ở -40°C cho đến khi chiết. Tiếp đó, các hạt tế bào được tạo lại huyền phù trong 5ml của dung dịch làm mát ở -40°C và được ly tâm lại. Cũng vậy, dịch nổi thứ cấp này (WS) được bảo quản ở -40°C cho đến khi chiết. Để xác định các chất chuyển hóa trong toàn bộ dịch cũng như trong dịch lọc nuôi cấy, quy trình làm mát tương tự được áp dụng; tuy nhiên, toàn bộ hỗn hợp dịch được làm mát (B) hoặc các dịch lọc nuôi cấy được làm mát (F) không được ly tâm, nhưng sau khi xoáy triệt để, 500µl các hỗn hợp này được rút ra cho sự chiết chất chuyển hóa.

### Quy trình chiết chất chuyển hóa

Sự chiết các chất chuyển hóa từ các hạt tế bào cũng như từ các mẫu 500- $\mu$ l từ toàn bộ dịch được làm mát được thực hiện bằng phương pháp etanol nóng [34]. Các chất chuyển hóa được chiết trong etanol đang sôi 75% (3 phút, 90°C). Sau khi làm mát, các dịch chiết thu được được làm bay hơi đến khô trong RapidVap (Labconco Corporation, Kansas, Missouri, USA) trong 110 phút trong chân không. Sau khi tạo huyền phù lại mỗi phần cặn trong 500 $\mu$ L H<sub>2</sub>O, mảnh vụn tế bào được bất hoạt bằng cách ly tâm trong 5 phút ở 5000g. Sau khi gạn các dịch nổi được bảo quản ở -80 °C cho đến khi phân tích thêm.

### Các phương pháp phân tích

Mật độ tế bào của môi trường nuôi cấy được kiểm soát thường xuyên bằng cách đo mật độ quang học ở 600nm (quang phổ kế Uvikom 922, BRS, Brussel, Bỉ). Trọng lượng khô của tế bào thu được bằng cách ly tâm (15 phút, 5000g, rôto GSA, Sorvall RC-5B, Goffin Meyvis, Kapellen, Bỉ) 20g dịch phản ứng trong falcon được làm khô sơ bộ và được làm cho nặng thêm. Tiếp đó các hạt này được rửa một lần bằng 20ml dung dịch sinh lý (9g/l NaCl) và làm khô ở 70°C đến trọng lượng ổn định. Để có thể chuyển hóa các phép đo OD<sub>600nm</sub> thành nồng độ sinh khối, đường tương quan của OD<sub>600nm</sub> so với nồng độ sinh khối được tạo ra. Các nồng độ của glucoza và các axit hữu cơ được xác định trên hệ thống Varian Prostar HPLC system (Varian, Sint-Katelijne-Waver, Bỉ), sử dụng cột Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Eke, Bỉ) gia nhiệt ở 65°C, được trang bị tiền cột 1cm, sử dụng 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6ml/phút) làm pha di động. Máy dò sóng đôi UV-VIS (210nm và 265nm) (Varian Prostar 325) và máy dò chỉ số khúc xạ vi sai (Merck LaChrom L-7490, Merck, Leuven, Bỉ) được dùng để dò đỉnh. Bằng cách tách các sự hấp thụ của các đỉnh trong dịch 265 và 210nm, các đỉnh này có thể được xác định. Sự tách này tạo ra giá trị ổn định, điển hình đối với hợp chất xác định (công thức Beer-Lambert).

### Các phép đo hydratecacbon

Glucoza, fructoza, sucroza và glucoza-1-phosphat được xác định bằng HPLC bằng cột Hypercarb (100x4,6mm; cỡ hạt 5 $\mu$ m) và được phát hiện bằng máy dò ELSD hoặc khối phổ kế (Antonio et al., 2007; Nielsen et al., 2006). LOQ của sucroza và G1P lần lượt là 30 và 20mg/l. Tất cả các mẫu được pha loãng trong khoảng tuyến tính của máy dò,



mà nằm trong khoảng từ LOQ đến xấp xỉ 100mg/l chất chuyển hóa. Khi nhiều đường được phosphoryl hóa và nucleotit có mặt trong dịch, sự thích nghi của phương pháp của Bucholz và cộng sự được áp dụng (11). Trong trường hợp này gradien của nước milliQ (A) và 20mM amoni axetat (B) được dùng để tách các chất phân tích. Gradien này bắt đầu ở A 100% với dòng 1ml/ phút và được chuyển thành B 100% ở 1ml/ phút trong 10 phút. Thành phần eluens của B 100% tiếp đó được giữ trong 4 phút ở 1ml/ phút và tiếp đó được chuyển thành A 100% ở 1ml/ phút trong 1 phút, mà sau đó dòng này được tăng thành 1,2ml/ phút và được giữ trong 3 phút để làm giảm thời gian cân bằng của cột. Sau ba phút này, dòng này lại được làm giảm trong 2 phút thành 1ml/phút. Tất cả các chất phân tích được dò bằng đầu dò ELSD hoặc khối phổ kế.

Để phân tích mono-, di-, và oligo-sacarit cột Prevail Hydratcacbon ES (5 $\mu$ ; 250 x 4,6 mm) được dùng với gradien axeton 100% (A), axetonitril 100% (B) và nước 100% (C). Gradient này được bắt đầu ở A 20%, B 60% và C 20%. Điều này được thay đổi trong 15 phút thành A 15%, B 45% và C 40% và tiếp đó lại thay đổi lại thành A 20%, B 60% và C 20% trong 1 phút. Tiếp đó, cột này được làm cân bằng ở các điều kiện ban đầu của nó trong 6 phút. Tất cả các chất phân tích được xác định bằng ELSD hoặc khối phổ kế.

#### Đo trọng lượng khô của tế bào

Từ mẫu dịch, 4  $\times$  10g tế bào được chuyển vào ống ly tâm, các tế bào này được quay tròn (5000g, 4°C, 5 phút), và các tế bào này được rửa hai lần bằng dung dịch NaCl 0,9%. Các ống ly tâm chứa các hạt tế bào được làm khô trong buồng sấy ở 70°C trong 48 giờ cho đến trọng lượng ổn định. Trọng lượng khô của tế bào thu được theo phân tích trọng lượng; các ống này được làm mát trong lò sấy trước khi cân.

#### Đo polysacarit sophoroza

Để xác định lượng polysacarit sophoroza mà được tạo ra bằng chủng đột biến trong đó gen *tts* khác loại (50) được biểu hiện, 100ml môi trường nuôi cấy của chủng đột biến này và của chủng đại này ở xấp xỉ OD 6 được ly tâm (5500 vòng/phút, 4°C, 5 phút, Heraeus Biofuge stratos). Tiếp đó, 80ml dịch nổi được kết tủa với 2 thể tích của etanol lạnh (100% ở -20°C) được giữ qua đêm ở 6°C. Chất kết tủa được tách khỏi dịch nổi bằng cách ly tâm (5500 vòng/phút, 4°C, 5 phút, Hereaus Biofuge stratos) và được tái tạo huyền phù trong 25ml nước cất (88). Tiếp đó, thủy phân 2ml dung dịch polysacarit

này trong các ống pyrex boriumsiliicat (26 x 100mm) ở 105°C bằng 2,25M HCl (nồng độ cuối cùng) trong 4h. Để trung hòa dung dịch này cho việc đo glucoza, các lượng đẳng mol của NaOH được thêm vào dung dịch này sau khi ủ và làm mát. Lượng glucoza trong dung dịch này được xác định bằng máy phân tích hóa sinh YSI (YSI (UK) Ltd.).

Các chủng và plasmit được dùng cho sự mô tả đặc tính  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferaza của *Dictyostellium discoideum*

Codon tối ưu hóa  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferaza có nguồn gốc từ *Dictyostellium discoideum* được biểu hiện khác loại trong *E. coli* mà có kiểu gen  $\Delta lacZ \Delta glgC \Delta manA \Delta CA$  trên plasmit mà được tạo ra như được Aerts và cộng sự mô tả (1). CA chỉ ra tất cả các gen trong cụm gen mà mã hóa con đường sinh tổng hợp axit colanic đã được Stevenson và cộng sự mô tả (86).

#### Phương pháp tách enzym

Các chủng này sinh trưởng trong LB (10g/l trypton, dịch chiết nấm men 5g/l và 10g/l NaCl) trong môi trường nuôi cấy qua đêm (100ml trong bình lắc dung tích 500ml) ở 37°C và 200 vòng/phút. Các tế bào này thu được bằng cách ly tâm (15 phút ở 7500 vòng/phút và 4°C). Hạt này được tạo lại huyền phù trong 5ml đệm PBS và siêu nghiền 3 lần trong 4 phút trên nước lạnh (chu kỳ 50%, cường độ 3). Mảnh vụn tế bào được ly tâm 15 phút nữa ở 7500 vòng/phút và 4°C. Dịch nổi được dùng làm dịch chiết tế bào thô.

#### Xác định protein

Hàm lượng protein của dịch chiết enzym được xác định bằng kit thử nghiệm protein Pierce BC (Thermo) như được cụ thể hóa trong sổ tay sản phẩm.

Sự tạo cấu trúc plasmit để biểu hiện gen khác loại và gen tương đồng

Plasmit mà được tạo cấu trúc như được Aerts và cộng sự mô tả (1).

#### Các phương pháp di truyền học

Các plasmit được duy trì trong *E. coli* DH5 $\alpha$  chủ (F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*).

Các plasmit. pKD46 (plasmit trợ giúp Red, kháng ampicillin), pKD3 (chứa gen (*cat*) kháng chloramphenicol bọc sườn FRT), pKD4 (chứa gen (*kan*) kháng kanamycin bọc sườn FRT), và các plasmit pCP20 (biểu hiện hoạt tính FLP recombinaza) thu được từ Prof. Dr. J-P Hernalsteens (Vrije Universiteit Brussel, Bỉ). Plasmit pBluescript (Fermentas, St. Leon-Rot, Đức) được dùng tạo cấu trúc các dẫn xuất của pKD3 và pKD4 có thư viện yếu tố khởi đầu phiên mã gen (promoter), hoặc có các alen mang đột biến điểm.

Các đột biến. Các đột biến lần lượt có trong kỹ thuật đột phá gen (bất hoạt gen-knock-out, KO), sự thay thế yếu tố khởi đầu phiên mã gen nội sinh bằng yếu tố khởi đầu phiên mã gen nhân tạo (hoạt hóa gen-knock-in, KI). Chúng được đưa vào bằng cách sử dụng khái niệm Datsenko và Wanner (19).

Thể biến nạp mang plasmit trợ giúp Red sinh trưởng trong môi trường LB 10ml có ampicillin (100mg/l) và L-arabinoza (10mM) ở 30°C đến OD<sub>600nm</sub> 0,6. Các tế bào này được tạo ra có hiệu lực điện bằng cách rửa chúng bằng 50ml nước đá lạnh, lần thứ nhất, và bằng 1ml nước đá lạnh, lần thứ hai. Tiếp đó, các tế bào này được tạo lại huyền phù trong 50µl nước đá lạnh. Tiến hành xung điện bằng 50µl tế bào và 10–100ng của sản phẩm ADN sợi kép thẳng bằng cách sử dụng gen Pulser<sup>TM</sup> (BioRad) (600Ω, 25µFD, và 250 vôn).

Sau khi xung điện, bổ sung tế bào vào 1ml môi trường LB được ủ 1h ở 37°C, và cuối cùng cấy trải lên trên môi trường thạch LB chứa 25mg/l chloramphenicol hoặc 50mg/l kanamycin để chọn thể biến nạp kháng kháng sinh. Các thể đột biến được chọn được kiểm lại bằng PCR có các mồi xuôi dòng và ngược dòng của vùng cải biến và sinh trưởng trong môi trường thạch LB ở 42°C để mất plasmit trợ giúp. Các thể đột biến này được kiểm tra về tính nhạy đối với ampicillin.

Sự loại trừ gen kháng kháng sinh

Các thể đột biến được chọn (kháng chloramphenicol hoặc kanamycin) được biến nạp bằng plasmit pCP20, là plasmit kháng ampicillin và chloramphenicol mà thể hiện sự sao chép nhạy đối với nhiệt độ và sự cảm ứng nhiệt của sự tổng hợp FLP. Thể biến nạp kháng ampicillin được chọn ở 30°C, sau đó một ít khuẩn lạc được tinh chế trong LB ở 42°C và tiếp đó được thử nghiệm đối với sự mất tất cả tính kháng kháng sinh và

plasmid trợ giúp FLP. Các sự bất hoạt gen và hoạt hóa gen được kiểm tra bằng môi đối chứng và được xác định trình tự.

Các môi được dùng để tạo cấu trúc các thể đột biến bất hoạt gen và đột biến hoạt hóa gen được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1: Các môi được dùng để tạo cấu trúc sự bất hoạt gen

| Gen       | Fw-P1-H1                                                                               | Rv-P2-H2                                                                                 |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| lacZ      | CATAATGGATTTCCTTACGCG<br>AAATACGGGCAGACATGGCC<br>TGCCCGGTTATTAggttaggctgga<br>gctgcttc | GTATGTTGTGTGGAATTGTGA<br>GCGGATAACAATTTACACA<br>GGAAACAGCTcatatgaatcctcctt<br>ag         |
| glgC      | agaccgccggtttaagcagcgggaacatctct<br>gaacatacatgtaaacctgcagtgtaggctgg<br>agctgcttc      | gtctggcagggacctgcacacggattgtgtgtg<br>ttccagagatgataaaaaaggagttagtccatat<br>gaatcctccttag |
| agp       | CATATTTCTGTCACACTCTTT<br>AGTGATTGATAACAAAAGAG<br>GTGCCAGGAgtgtaggctggagctgctt<br>c     | TAAAAACGTTTAACCAGCGA<br>CTCCCCCGCTTCTCGCGGGGG<br>AGTTTTCTGcatatgaatcctccttag             |
| pgi       | GGCGCTACAATCTTCCAAAG<br>TCACAATTCTCAAAATCAGA<br>AGAGTATTGCgtgtaggctggagctgc<br>ttc     | GGTTGCCGGATGCGGCGTGA<br>ACGCCTTATCCGGCCTACATA<br>TCGACGATGcatatgaatcctccttag             |
| pfkA      | GACTTCCGGCAACAGATTTC<br>ATTTTGCATTCCAAAGTTCAG<br>AGGTAGTCgtgtaggctggagctgcttc          | GCTTCTGTCATCGGTTTCAGG<br>GTAAAGGAATCTGCCTTTTTC<br>CGAAATCcatatgaatcctccttag              |
| pfkB      | CACTTTCCGCTGATTCGGTGC<br>CAGACTGAAATCAGCCTATA<br>GGAGGAAATGgtgtaggctggagctg<br>cttc    | GTTGCCGACAGGTTGGTGAT<br>GATTCCCCCAATGCTGGGGG<br>AATGTTTTTTCcatatgaatcctcctta<br>g        |
| pgm thông | TGAGAAGGTTTTCGGAACATA                                                                  | CATACGTAAAAAAGGGCGAT                                                                     |

|          |                                                                                         |                                                                                          |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| qua D&W  | TCTAAAACGTTGCAGACAAA<br>GGACAAAGCAgtgtaggctggagctg<br>cttc                              | CTTGCGACCGCCCTTTTTTTTA<br>TTAAATGTGTcatatgaatatectcctta<br>g                             |
| pgm::kan | TGAGAAGGTTTGCGGAACTA<br>TCTAAAACGTTGCAGACAAA<br>GGACAAAGCAACGAAAGGCT<br>CAGTCGAAAG      | CATACGTAAAAAAGGGCGAT<br>CTTGCGACCGCCCTTTTTTTTA<br>TTAAATGTGTAGAACTCCAG<br>CATGAGATCC     |
| pgm::GFP | TGAGAAGGTTTGCGGAACTA<br>TCTAAAACGTTGCAGACAAA<br>GGACAAAGCAgtgtaggctggagctg<br>cttc      | CATACGTAAAAAAGGGCGAT<br>CTTGCGACCGCCCTTTTTTTTA<br>TTAAATGTGTTCATCCGTCAGG<br>ATGGCCTTC    |
| ptsG     | gccacgcgtgagaacgtaaaaaagcacccat<br>actcaggagcactctcaattgtgtaggctggag<br>ctgcttc         | Cacctgtaaaaaaggcagccatctggctgcctt<br>agtcctcccaacgtcttacggacatatgaatate<br>ctccttag      |
| glk      | CGAGAAGGCCCGGATTGTCA<br>TGGACGATGAGATACACCGG<br>AATATCATGGgtgtaggctggagctgc<br>ttc      | CCAGGTATTTACAGTGTGAG<br>AAAGAATTATTTTGACTTTAG<br>CGGAGCAGTTGAAGAcatatgaat<br>atectccttag |
| malPQ    | ATATCCAGCCAGTCTTCCGGC<br>TGTAGTCCTAACAGAGCACT<br>GTTACTGTCagcattacacgtcttgagc<br>g      | GCTTTAAGTGGTTGAGATCA<br>CATTTCTTGCTCATCCCCGC<br>AACTCCTCCcatatgaatatectccttag            |
| MP KI    | ATATCCAGCCAGTCTTCCGGC<br>TGTAGTCCTAACAGAGCACT<br>GTTACTGTC<br>GTAAAACGACGGCCAGTG        | CAACGGCCATTTTTTGCACCTT<br>AGATACAGATTTTCTGCGCTG<br>TATTGCATTGCCGGGATCCG<br>ATGCATATGG    |
| ycjU     | TTTTATTTTGCCCTTCAATGG<br>GACCGCTACCAAACATCAGG<br>AGGATGAATGAAACagcattacac<br>gtcttgagcg | TTCCGTTGAAGGCAACAGTA<br>ATTGCGCCCCGGTTAAGCCC<br>GCGCCGATCCcatatgaatatectcctta<br>g       |

|                                   |                                                                                    |                                                                                  |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| CA thông qua D&W                  | GTAGCATTGTTTCCTAAGTATG<br>ACTCCATTTTTCCAGGAATGG<br>TCGCAAATCgtgtaggctggagctgcttc   | TTCACGCCGCATCCGGCAAG<br>CAAACCAGCTCATAAGCCGG<br>GAGAACAACCcatatgaatcctccttag     |
| CA thông qua sacB                 | TTCACGCCGCATCCGGCAAG<br>CAAACCAGCTCATAAGCCGG<br>GAGAACAACCccgcttacagacaagctgtg     | GTAGCATTGTTTCCTAAGTATG<br>ACTCCATTTTTCCAGGAATGG<br>TCGCAAATCagccatgacccgggaattac |
| wcaJ thông qua sacB               | ATCGCCGACCACTTCGCGCC<br>GCTGATGGTTTTTTCACGTAA<br>GCTCATATCccgcttacagacaagctgtg     | GGATCTTCCCTTACCCCACTG<br>CGGGTAAGGGGCTAATAACA<br>GGAACAACGagccatgacccgggaattac   |
| wcaJ thông qua sacB và fusion PCR | GGGGGCCCCCGGGGGTATGA<br>GCTTACGTGAAAAAACCATC<br>AG                                 | GGGCCCCGGGCCCCGGGCGTTG<br>TTCCTGTTATTAGCCCCTTAC<br>CC                            |
| wcaJ thông qua D&W                | ATCGCCGACCACTTCGCGCC<br>GCTGATGGTTTTTTCACGTAA<br>GCTCATATCgtgtaggctggagctgcttc     | GGATCTTCCCTTACCCCACTG<br>CGGGTAAGGGGCTAATAACA<br>GGAACAACGcatatgaatcctccttag     |
| wcaJ thông qua D&W_2              | TTTTGATATCGAACCAGACG<br>CTCCATTCGCGGATGTACTCA<br>AGGTCGAACgtgtaggctggagctgcttc     | TCTATGGTGCAACGCTTTTCA<br>GATATCACCATCATGTTTGCC<br>GGACTATGcatatgaatcctccttag     |
| galET-H1-P22-RBS                  | TAGCCAAATGCGTTGGCAAA<br>CAGAGATTGTGTTTTTCTTT<br>CAGACTCATCTTTGTTTCCTC<br>CGAATTTCG | CGGTTTCGACGCATGCAGGCA<br>TGAAACCGCGTCTTTTTTTCAG<br>ATAAAAAGCcatatgaatcctccttag   |
| Tương                             | ACCAATCAAATTCACGCGGC                                                               | GTCGGTAGTGCTGACCTTGCC                                                            |

|                       |                                                            |                                                            |
|-----------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| đồng mở<br>rộng galET | CAGGCGCCTGAATGGTGTGA<br>GTGGCAGGGTAGCCAAATGC<br>GTTGGCAAAC | GGAGGCGGCCTTAGCACCCCT<br>CTCCGGCCAACGGTTCGACG<br>CATGCAGGC |
|-----------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|

Ví dụ 2. Cải biến và sử dụng chủng gốc 1 (nguồn cacbon: sucroza; được chuyển hóa thành glucoza-1-phosphat và fructoza bằng sucroza phosphorylaza) – Sàng lọc sucroza phosphorylaza khác

Nhu cầu quan trọng đối với sự thành công của ‘chủng gốc 1’ là sự tồn tại của sucroza phosphorylaza có hiệu lực. Tuy nhiên, mặc dù *E. coli* có sucroza phosphorylaza được giả định (SP), nó không sinh trưởng trên môi trường tối thiểu có sucroza là nguồn cacbon duy nhất. Do đó, 6 sucroza phosphorylaza từ các nguồn vi sinh vật khác nhau được sàng lọc (Bảng 2).

Để đạt được điều này, 6 thể biến nạp của *E. coli* đại được tạo cấu trúc mỗi thể mang plasmit [pCX-yếu tố khởi đầu phiên mã gen-SP] mã hóa một sucroza phosphorylaza (SP) được nêu trong bảng 2. Sự biểu hiện của các chủng này được đánh giá trong các bình lắc, bằng cách sử dụng sucroza là nguồn cacbon duy nhất. Chủng đại (WT) được kết hợp trong mô hình thử nghiệm làm đối chứng ( $\mu_{WT} = 0$ ).

Bảng 2: Sucroza phosphorylaza được sàng lọc

| Nguồn sucroza phosphorylaza            | Viết tắt |
|----------------------------------------|----------|
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i>    | BA       |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>       | LA       |
| <i>Streptococcus mutans</i>            | SM       |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B742  | LM B742  |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B1149 | LM B1149 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B1355 | LM B1355 |

Trong thử nghiệm sàng lọc này, tốc độ lớn của các thể biến nạp khác nhau được giám sát và gắn với sự biểu hiện sucroza phosphorylaza. Theo lập luận này chủng lớn nhanh nhất không tạo ra sucroza phosphorylaza biểu hiện tốt nhất.

Tốc độ lớn của các thể biến nạp khác nhau được mô tả trong Fig. 2, nguyên lý được áp dụng đối với sự tạo hydratcacbon chuyên biệt được mô tả trong Fig. 1: (a) Phản ứng cân bằng thông thường, mà xảy ra trong các kỹ thuật sản xuất hiện nay (b) nguyên lý hút/đẩy: cân bằng được dịch chuyển theo hướng sacarit và sacarit đã được hoạt hóa. Mục tiêu chủ yếu của tế bào sinh trưởng, do đó nó hút, trong fig. này ở sacarit này để tạo ra sinh khối. Do tác dụng hút này, sacarit đã được hoạt hóa sẽ tích lũy trong tế bào và thúc đẩy con đường sản xuất.

Ví dụ 3. Xác định đặc tính của sucroza phosphorylaza của *Bifidobacterium adolescentis*

Các yếu tố khởi đầu phiên mã gen cơ định nhân tạo khác nhau được chèn để đánh giá ảnh hưởng của độ mạnh của yếu tố khởi đầu phiên mã gen đến tốc độ lớn. Để đạt được điều này, yếu tố khởi đầu phiên mã gen yếu, khỏe trung bình và khỏe mạnh từ thư viện yếu tố khởi đầu phiên mã gen sẵn có ở The Centre of Expertise - Industrial Biotechnology và Biocatalysis (Ghent University) được đưa vào. Yếu tố khởi đầu phiên mã gen khỏe trung bình, mà thu được tốc độ lớn cao nhất cuối cùng được giữ lại.

Hằng số ái lực và tốc độ lớn cực đại của chủng *E. coli* mang plasmit mã hóa sucroza phosphorylaza của *Bifidobacterium adolescentis* được xác định. Để đạt được điều này, các thử nghiệm thể ổn định hóa tính và theo mẻ được tiến hành. Ảnh hưởng của nồng độ phosphat đối với các thông số này cũng được kiểm tra (Bảng 3).

Các đặc tính động lực học của chủng được cải biến được nêu trong bảng 3. Rõ ràng là các đặc tính động lực học của chủng được cải biến thích hợp về các ứng dụng trong ngành nuôi cấy.

Bảng 3: Các đặc tính về sự sinh trưởng của *E. coli* mang sucroza phosphorylaza của *Bifidobacterium adolescentis*.  $\text{PO}_4^{3-}$  cao = 64mM;  $\text{PO}_4^{3-}$  thấp = 8,5mM.

|                                        | $\text{PO}_4^{3-}$ cao | $\text{PO}_4^{3-}$ |
|----------------------------------------|------------------------|--------------------|
| $\mu_{\text{cực đại}} (\text{h}^{-1})$ | 0,5                    | 0,46               |
| $K_S (\text{mg/L})$                    | <10                    | +/- 10             |



#### Ví dụ 4. Chiến lược cải biến cho việc cung cấp $\alpha$ glucoza-1-phosphat tăng

Để xác nhận việc hợp lý của chiến lược cải biến, quan trọng là phải chứng minh sự gia tăng của vốn  $\alpha$ glucoza-1-phosphat trong chủng đột biến (Fig. 3), so với vốn  $\alpha$ glucoza-1-phosphat trong chủng đại (Fig. 4). Trong ‘Chủng gốc 1’ sự chuyển hóa vi sinh được tách thành hai phần tách rời bởi vì các phản ứng chính có khả năng chuyển hóa  $\alpha$  glucoza-1-phosphat để tạo sinh khối bị bất hoạt. Một phần của sự chuyển hóa này chuyển hóa gốc fructoza thành sinh khối và nhiều enzym xúc tác sinh học (chuyển hóa trung tâm kinh điển). Phần còn lại chuyển hóa gốc  $\alpha$ glucoza-1-phosphat của sucroza.

Nồng độ  $\alpha$  glucoza-1-phosphat được xác định đối với cả hai chủng đại và một số chủng được cải biến. Để đạt được điều này, các thử nghiệm theo mẻ được tiến hành, bằng cách sử dụng sucroza làm nguồn cacbon duy nhất.

Vốn  $\alpha$  glucoza-1-phosphat: so sánh chủng đại và chủng nút

Để đánh giá tiềm năng của chiến lược cải biến về mặt chuyển hóa dự tính, vốn  $\alpha$ glucoza-1-phosphat được xác định trong:

- *E. coli* MG1655 đại sinh trưởng trên glucoza,
- *E. coli* MG1655 *p22BaSP* sinh trưởng trên sucroza,
- *E. coli* MG1655  $\Delta$ *glgC*  $\Delta$ *pgm*  $\Delta$ *lacZ* *p22BaSP* sinh trưởng trên sucroza

Kích cỡ của vốn này có tầm quan trọng rất lớn bởi vì các con đường được cải biến về mặt chuyển hóa các hydratcacbon chuyên biệt khác nhau được tạo ra đều sử dụng  $\alpha$ glucoza-1-phosphat làm tiền chất chủ yếu. Do đó, vốn  $\alpha$ glucoza-1-phosphat càng lớn, càng có nhiều tiền chất mà là sẵn có cho việc tạo ra các hydratcacbon chuyên biệt khác nhau.

Các kết quả trong bình lắc được mô tả trong Fig.5. Nồng độ glucoza-1-phosphat nội bào lần lượt là  $4,03 \cdot 10^{-3}$  mmol/gcDW, 0,26 mmol/gcDW, và 1,27 mmol/gcDW. Do đó đạt được sự tăng >20000% trong vốn G1P. Vốn tăng này cho phép sự tạo ra hiệu quả nhiều hydratcacbon chuyên biệt.

Trong chủng *E. coli* MG1655 đại glucoza-1-phosphat là tiền chất của các thành phần liên quan đến thành tế bào, glycogen v.v. Dòng cacbon bị giới hạn, điển hình là có nguồn gốc từ  $\alpha$ glucoza-6-phosphat đủ để cung cấp cho tế bào đủ  $\alpha$ glucoza-1-phosphat

để tạo ra các phần sinh khối nhỏ này. Do đó, vốn  $\alpha$ glucoza-1-phosphat có kích cỡ bị giới hạn ( $4,03 \cdot 10^{-3}$  mmol/gcDW).

Điều này ngược với chiến lược được đề xuất để sử dụng sucroza làm nguồn cacbon. So với chủng *E. coli* MG1655 đại vốn glucoza-1-phosphat tăng đã được thể hiện trong các chủng đột biến mà chứa sucroza phosphorylaza có hiệu lực mà tách hiệu quả đường sucroza rẽ thành fructoza và  $\alpha$ glucoza-1-phosphat.

Các kết quả thu được trong bình phản ứng theo mẻ dung tích 1,5L được mô tả trong Fig.6. Nồng độ  $\alpha$ glucoza-1-phosphat nội bào lần lượt là  $4,03 \cdot 10^{-3}$  mmol/gcDW, 0,65mmol/gcDW, và 0,89 mmol/gcDW.

Tạo  $\alpha$ glucoza-1-phosphat bằng  $\Delta pgm\Delta lacZ\Delta glgC$  (3KO) P22-BaSP trên môi trường LB được đệm ở quy mô bình phản ứng

Khả năng của  $\Delta pgm\Delta lacZ\Delta glgC$  P22-BaSP để tạo ra  $\alpha$ glucoza-1-phosphat đã được xác nhận. Để đạt được điều này, tiến hành nuôi cấy bằng môi trường LB được đệm với khoảng sucroza 15g/l. Ở khoảng 15h thêm dung dịch sucroza đậm đặc chứa phosphat. Trong Fig.7 và Fig.6 nồng độ các sản phẩm (phụ) quan trọng nhất được mô tả. Tốc độ lớn cực đại trong pha theo mẻ là khoảng 0,552 h<sup>-1</sup>.

Trong pha theo mẻ trên mỗi mol sucroza chuyển hóa 0,74 mol glucoza-1-phosphat được tạo ra. Lý tưởng là, 1 mol  $\alpha$ glucoza-1-phosphat có thể được tạo ra. Tuy nhiên, 3KO được nghiên cứu vẫn chứa gen mà sản phẩm của nó có khả năng chuyển hóa  $\alpha$ glucoza-1-phosphat, ví dụ, *agp*.

Từ thời điểm tất cả sucroza được tiêu thụ, nồng độ glucoza-1-phosphat giảm và nồng độ glucoza tăng mà là do hoạt tính của Agp.

Tiếp đó ở khoảng 15h thêm sucroza bổ sung, mà được chuyển hóa lại thành glucoza-1-phosphat và mà tích lũy trong môi trường. Fructoza cũng tích lũy trong môi trường, để chỉ ra rằng tế bào đã giới hạn tiềm lực để chuyển hóa tiếp hợp chất này (0,64 mol fructoza/mol sucroza).

Trong thử nghiệm tiếp theo, sucroza và phosphat được bổ sung theo các khoảng thời gian đều đặn trong quá trình lên men. Nồng độ  $\alpha$ glucoza-1-phosphat cực đại thu được khoảng 57g/l.

### Ví dụ 5. Sự bất hoạt gen mã hóa phosphoglucomutaza

Để tách sự chuyển hóa theo ví dụ 1-4 gen mã hóa phosphoglucomutaza phải được bất hoạt. Qua phương pháp kinh điển được Datsenko và Wanner mô tả (19) sự bất hoạt gen tạo ra đoạn nhiễm sắc thể xấp xỉ 84 cặp bazơ. Các chủng trong đó gen bị bất hoạt theo cách dường như để sinh trưởng trên môi trường phức hợp nhưng, thật ngạc nhiên, không sinh trưởng trên môi trường tối thiểu như được mô tả trong phần vật liệu và phương pháp. Tuy nhiên, chủng này sinh trưởng trên môi trường tối thiểu khi catxet kanamycin được bỏ lại sau. Nhìn bề ngoài sự loại bỏ trình tự gốc ở vùng nhiễm sắc thể này dường như là để ngăn cản sự sinh trưởng trên môi trường tối thiểu nhưng sự thay thế trình tự cụ thể này (gen *pgm*), mã hóa phosphoglucomutaza, bằng trình tự có cùng độ dài mà không. Việc này đã được xác nhận bằng cách thay thế gen *pgm* bằng một phần của gen GFP mà chính xác là có cùng kích thước như gen *pgm*. Điều này cũng tạo ra chủng đột biến mà có khả năng sinh trưởng trên môi trường tối thiểu. Trình tự của các chủng này ở vị trí *pgm* trên nhiễm sắc thể được thể hiện trong Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13 và Fig. 14.

### Ví dụ 6. Tạo xenlobioza ở *E. coli*

Các chủng tạo xenlobioza đã được tạo cấu trúc bắt đầu từ ‘Chủng gốc 1’ (Fig.8). Để đạt được điều này plasmit chứa cả hai sucroza phosphorylaza (*Bifidobacterium adolescentis*) và xenlobioza phosphorylaza (*Cellulomonas uda*) được chèn vào kiểu đại ở *E. coli* MG1655  $\Delta$  *ΔglgC Δpgm ΔlacZ* (3KO), và *E. coli* MG1655  $\Delta$  *agp ΔglgC Δpgm ΔlacZ* (4KO) (Bảng 4). Các gen bổ sung cần được bất hoạt là *glk* và *ptsG*, bởi vì cả hai gen này chuyển hóa glucoza thành glucoza-6-phosphat.

Bảng 4: Chủng tạo xenlobioza

| Bất hoạt gen | Phản ứng                                          |
|--------------|---------------------------------------------------|
| <i>lacZ</i>  | Glu + Gal $\leftrightarrow$ Lactoza               |
| <i>pgm</i>   | G1P $\leftrightarrow$ G6P                         |
| <i>glgC</i>  | G1P + ATP + H $\leftrightarrow$ ADP-glucoza + PPi |
| <i>agp</i>   | G1P + H <sub>2</sub> O $\rightarrow$ Glu + Pi     |

|                          |                                         |
|--------------------------|-----------------------------------------|
| <i>ycjM</i>              | Suc $\rightarrow$ G1P + Fruc            |
| <i>ptsG</i>              | Glu + PEP $\rightarrow$ G6P + Pyr       |
| <i>glk</i>               | Glu + ATP $\rightarrow$ G6P + ADP       |
| Hoạt hóa gen             | Phản ứng                                |
| Sucroza phosphorylaza    | Sucroza + Pi $\rightarrow$ G1P + Fruc   |
| Xenlobioza phosphorylaza | G1P + Glu $\rightarrow$ Xenlobioza + Pi |

So sánh chủng đại và chủng nút

Để đánh giá tiềm lực của chiến lược cải biến về mặt chuyển hóa được dự tính để tạo ra các hydratcacbon chuyên biệt, việc tạo xenlobioza được theo dõi ở nhiều chủng được cải biến khác nhau:

- *E. coli* MG1655 (WT) P22-BaSP P22-CuCP
- *E. coli* MG1655  $\Delta glgC$   $\Delta pgm$   $\Delta lacZ$  (3KO) P22- BaSP P22-CuCP
- *E. coli* MG1655  $\Delta glgC$   $\Delta pgm$   $\Delta lacZ$   $\Delta agp$  (4KO) P22-BaSP P22-CuCP

Để đạt được điều này, tiến hành thử nghiệm trong bình lắc. Môi trường chứa môi trường LB được đậm và sucroza và glucoza được bổ sung theo các lượng bằng nhau vào các bình lắc, sao cho nồng độ cuối cùng đạt được trong bình lắc là 1,978g xenlobioza /L (Bảng 5). Các kết quả trong các bình lắc được mô tả trong Fig. 5. Nồng độ (ngoại bào) xenlobioza sản phẩm mong muốn tăng bằng số lượng các đột biến đã được đưa vào.

Bảng 5: Sự tạo xenlobioza của các chủng được cải biến khác nhau

| Chủng                                                                            | Viết tắt              | Xenlobioza (g/L) |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------|
| <i>E. coli</i> MG1655 P22-BaSP P22-CuCP                                          | WT P22-BaSP P22-CuCP  | 0                |
| <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta glgC$ $\Delta pgm$ $\Delta lacZ$ P22-BaSP P22-CuCP | 3KO P22-BaSP P22-CuCP | 0,539            |

|                                                                                                      |                       |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------|
| <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta glgC$<br>$\Delta pgm$ $\Delta lacZ$ $\Delta agp$ P22-<br>BaSP P22-CuCP | 4KO P22-BaSP P22-CuCP | 1,978 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------|

Sự tạo xenlobioza bằng  $\Delta pgm\Delta lacZ\Delta glgC\Delta agp$  (4KO) P22-BaSP P22-CuCP trên môi trường LB được đếm ở quy mô bình phản ứng.

Khả năng của  $\Delta pgm\Delta lacZ\Delta glgC\Delta agp$  P22-BaSP P22-CuCP để tạo ra xenlobioza được xác nhận trên quy mô bình phản ứng trong thử nghiệm sơ bộ. Để đạt được điều này, tiến hành nuôi cấy bằng môi trường LB được đếm. Ở khoảng 9h và vào các thời điểm cụ thể dung dịch chứa 500g/l sucroza và 250g/l glucoza được bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Hiệu quả ngược của khoảng 30% (mol xenlobioza được tạo ra/ mol sucroza được tiêu thụ) đạt được và khoảng 40% gốc glucoza của sucroza hết trong xenlobioza hoặc trong glucoza-1-phosphat. Độ chuẩn của khoảng 15g/l xenlobioza đạt được ở cuối của môi trường nuôi cấy.

Thứ hai, việc tạo xenlobioza được xác nhận trong nuôi cấy theo mẻ bắt đầu từ 70g/l sucroza có nồng độ phosphat cao và nồng độ phosphat thấp. Phosphat cao chỉ ra nồng độ phosphat là phosphat 0,2M, phosphat thấp chỉ ra nồng độ phosphat 13 mM. Điều này ảnh hưởng đáng kể đến sự sản xuất. Nồng độ phosphat cao tạo ra độ chuẩn cuối cùng xấp xỉ 20g/l và sản lượng 0,33 g/g, trong khi nồng độ phosphat thấp tạo ra độ chuẩn cuối cùng là 42g/l và sản lượng trên sucroza tiêu thụ là 0,84g/g (Fig.9).

Ví dụ 7. Cải biến chủng gốc 2 (Sucroza- sucroza syntaza) và việc sử dụng nó

Bằng cách cải biến về mặt chuyển hóa chủng gốc *E. coli* được tạo cấu trúc mà là vật tạo hiệu quả các hydratcacbon chuyên biệt và các dẫn xuất của chúng con đường của nó khởi đầu từ UDP-glucoza.

Bằng cách đưa sucroza syntaza vào (ví dụ, có nguồn gốc từ *Solanum tuberosum*), sucroza được tách thành fructoza và UDP-glucoza. Bằng cách bất hoạt thêm các gen mã hóa UDP-glucoza 4 epimeraza (*galE*), UDP-glucoza galactoza-1-P uridilyltransferaza (*galT*), glucoza-1-P uridilyltransferaza (*galU*, *galF*), 5'-nucleotidaza / UDP-đường hydrolaza (*ushA*), UDP-glucoza 6-dehydrogenaza (*ugd*), thuộc operon axit colanic (ca) thể đột biến được tạo cấu trúc mà tích lũy UDP-glucoza (Bảng 6).

Bảng 6: Chủng gốc UDP-Glucoza

| Bất hoạt gen    | Phản ứng                                                                                   |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| ca              | → axit colanic                                                                             |
| galU            | G1P +UTP <-->UDP-Glc + PPi                                                                 |
| galF            | G1P +UTP <-->UDP-Glc + PPi                                                                 |
| galE            | UDP-Glc <--> UDP-Gal                                                                       |
| galT            | UDP-Glc + Gal1P <--> UDP-Gal + G1P                                                         |
| ushA            | UDP-đường + H <sub>2</sub> O <--> uridin-5'-phosphat + 2H <sup>+</sup> + aldoza-1-phosphat |
| ugd             | 2 NAD +UDP-đường + H <sub>2</sub> O <--> 2 NADH + UDP-glucuronat + 3H <sup>+</sup>         |
| Hoạt hóa gen    | Phản ứng                                                                                   |
| Sucroza syntaza | Suc + UDP → UDP Glu + Fruc                                                                 |

Ví dụ 8. Biểu hiện của sucroza syntaza ở *E. coli*

Hoạt tính của sucroza syntaza được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm *in vitro*. Sucroza syntaza từ *Solanum tuberosum* được biểu hiện khác loại ở *E. coli* BL21. Từ môi trường nuôi cấy này, dịch chiết enzym được điều chế, mà được ủ với 500mM sucroza và 2mM UDP. Sự chuyển hóa lượng UDP-Glucoza được tạo ra được nêu trong Bảng 7.

Bảng 7: Thử nghiệm enzym sucroza syntaza minh họa hoạt động của phản ứng phân cắt sucroza syntaza (Hỗn hợp chứa 500mM sucroza và 2mM UDP)

| Thời gian nạp mẫu | UDP-Glucoza được tạo ra |
|-------------------|-------------------------|
| 0h 10 phút        | 5mg/L                   |
| 1h 40 phút        | 64mg/L                  |
| 24h               | 300mg/L                 |

### Ví dụ 9. Tạo sophoroza

Bắt đầu từ chủng gốc 2 (UDP-Glucose), chủng được tạo cấu trúc mà tạo ra lượng lớn sophoroza, dưới dạng polyme của các đơn vị sophoroza. Điều này đạt được bằng cách đưa bổ sung gen *tts* từ *Streptococcus pneumoniae* (50). Các đơn vị sophoroza có thể được tạo ra của polymer sophoroza theo hai cách, tức là, qua sự thủy phân axit hoặc qua sự chuyển hóa enzym. Enzym này cũng có thể được biểu hiện quá mức trong chủng sản xuất.

Để đánh giá tiềm năng của chiến lược cải biến về mặt chuyển hóa, polyme sophoroza được xác định đối với chủng *E. coli* MG1655 P22-BaSP P22-*tts*, và 6KO P22-BaSP P22-*tts* (*E. coli* MG1655  $\Delta glgC$   $\Delta pgm$   $\Delta lacZ$   $\Delta agp$   $\Delta ptsG$   $\Delta glk$ ) bằng cách cho các chủng này sinh trưởng trên môi trường tối thiểu chứa lactoza là nguồn cacbon duy nhất. Các kết quả được nêu trong Fig. 15. Các kết quả này chỉ ra rằng các chủng đột biến tạo ra có hiệu quả nhiều polymer sophoroza so với chủng đại.

### Ví dụ 10. Cải biến (Lactoza- lactoza phosphorylaza) của chủng gốc 3 và sự sử dụng nó

Bằng cách đưa lactoza phosphorylaza vào (20), lactoza được tách thành glucose và galactoza-1-P. Bằng cách loại bỏ bổ sung các gen mã hóa *agp*, *galE*, *galT*, *lacZ*, và sự chuyển hóa được tách thành hai phần tách rời. Tuy nhiên, tất cả sự kết hợp có thể có của các gen này dẫn đến sự tích lũy galactoza-1-phosphat tăng. Thay vì bất hoạt các gen này, mục tiêu này cũng có thể đạt được bằng cách cho chúng có nhược điểm hoặc bằng cách làm giảm sự biểu hiện của chúng (Bảng 8).

Bảng 8: Galactoza-1-phosphat của chủng gốc 3 (Lactoza- lactoza phosphorylaza)

| Bất hoạt gen          | Phản ứng                                        |
|-----------------------|-------------------------------------------------|
| <i>lacZ</i>           | Glu + Gal $\leftrightarrow$ Lactoza             |
| <i>galE</i>           | UDP-Glc $\leftrightarrow$ UDP-Gal               |
| <i>agp</i>            | G1P + H <sub>2</sub> O $\rightarrow$ Glu + Pi   |
| <i>galT</i>           | UDP-Glc + Gal1P $\leftrightarrow$ UDP-Gal + G1P |
| Hoạt hóa gen          | Phản ứng                                        |
| Lactoza phosphorylaza | Lactoza + Pi $\rightarrow$ Gal1P + Glucoza      |

### Ví dụ 11. Tạo galactosa ( $\beta$ 1-4)L-Rhamnoza

Có nguồn gốc từ chủng gốc 3, cấu trúc tạo Gal( $\beta$ 1-4)L-Rha được cải biến bằng cách chèn thêm vào gen mã hóa (Ga)lacto-N-bioza D-galactosyl-( $\beta$ 1-4)-L-rhamnoza phosphorylaza, chúng chuyển hóa Galactosa-1-phosphat và rhamnoza thành Gal( $\beta$ 1-4)L-Rha và phosphat.

Tiến hành lên men sử dụng Lactoza làm nguồn cacbon chính thu được lượng Gal( $\beta$ 1-4)L-Rha. L-rhamnoza được bổ sung vào môi trường. Ngăn ngừa sự suy giảm rhamnoza không mong muốn bằng cách bất hoạt gen liên quan đến sự suy giảm rhamnoza (*rhaA*, *rhaB*, *rhaC*, *rhaD*).

### Ví dụ 12. Cải biến chủng 4 (Lactoza – lactoza syntaza) và sử dụng nó

Bằng việc chèn lactoza sythaza (71, 72) lactoza được tách ra thành glucoza và UDP-galactosa. Bằng cách bất hoạt thêm gen mã hóa beta-galactosidaza (*lacZ*), UDP-glucoza, galactosa-1-P uridyltransferaza (*galT*) UDP-glucoza 4 epimeraza (*galE*), 5'-nucleotidaza/UDP-đường hydrolaza (*ushA*), UDP-glucoza 6-dehydrogenaza (*ugd*), thuộc về operon axit colanic (*ca*), sự đột biến được tạo ra gây tích lũy UDP-Galactosa (Bảng 9).

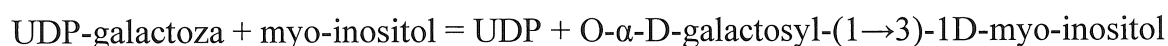
Bảng 9: UDP-Galactosa (Lactoza syntaza) của chủng gốc 4

| Bất hoạt gen    | Phản ứng                                                                                                |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>lacZ</i>     | Glu + Gal $\leftrightarrow$ Lactoza                                                                     |
| <i>galE</i>     | UDP-Glc $\leftrightarrow$ UDP-Gal                                                                       |
| <i>galT</i>     | UDP-Glc + Gal1P $\leftrightarrow$ UDP-Gal + G1P                                                         |
| <i>ca</i>       | $\rightarrow$ axit colanic                                                                              |
| <i>ushA</i>     | UDP-đường + H <sub>2</sub> O $\leftrightarrow$ uridin-5'-phosphat + 2H <sup>+</sup> + aldoza-1-phosphat |
| <i>ugd</i>      | 2 NAD + UDP-đường + H <sub>2</sub> O $\leftrightarrow$ 2 NADH + UDP-glucuronat + 3H <sup>+</sup>        |
| Hoạt hóa gen    | Phản ứng                                                                                                |
| Lactoza syntaza | Lactoza $\rightarrow$ UDP-Gal + Glu                                                                     |



### Ví dụ 13. Tạo galactinol

Có nguồn gốc từ chủng gốc 4, cấu trúc tạo galactinol được cải biến bằng cách chèn thêm vào gen mã hóa inositol 3- $\alpha$ -galactosyltransferaza, enzym này xúc tác sự chuyển hóa:



Tiến hành lên men sử dụng lactoza làm nguồn cacbon chính để thu được lượng galactinol trong đó myo-inositol được bổ sung vào môi trường.

### Ví dụ 14. Tạo globotrioza

Có nguồn gốc từ chủng gốc 4, cấu trúc tạo globotrioza được cải biến bằng cách chèn thêm gen *lgtC* từ *Neisseria meningitidis* (3) mã hóa  $\alpha$ -1,4-Gal transferaza, enzym này xúc tác sự chuyển hóa  $\text{UDP-Gal} + \text{Lactoza} \rightarrow \text{UDP} + \text{Globotrioza}$ . Tiến hành lên men sử dụng Lactoza làm nguồn cacbon chính để thu được lượng globotrioza.

### Ví dụ 15. Cải biến chủng gốc 5 và tạo đường fucosyl hóa

Có nguồn gốc từ chủng gốc 5, chủng này làm giàu fructoza-6-phosphat, (được mô tả ở ví dụ 20 và ví dụ 28), dẫn xuất đường fucosyl hóa như fucosyllactoza và cụ thể hơn là 1,2-fucosyllactoza có thể được sản xuất. Để kết thúc, chủng này được biến đổi so cho tế bào có khả năng tạo fructoza-6-phosphat là tiền chất của GDP-fucoza. Glucoza hoặc glucoza-1-phosphat (nếu enzym bắt đầu hoặc là sucraza hoặc sucroza phosphorylaza) sau đó được cung cấp sự chuyển hóa cacbon chính thông qua con đường pentoza phosphat. Fig.10 thể hiện quy trình đạt được sự sản phẩm và sinh khối và những bất hoạt gen cần thiết để đạt được điều này. Để tránh mất fructoza-6-phosphat thông qua glycolysis, *pfkA*, *pfkB* và *pgi* được bất hoạt. Để tránh tích tụ pyruvat, quy trình Entner Douderoff được bất hoạt (*edd* và *eda*).

Vì GDP-fucoza là chất trung gian của con đường sinh tổng hợp axit colanic, con đường này được cải biến. Gen từ operon axit colonic có thể giảm bớt tiềm ẩn lượng sản phẩm bị bất hoạt. Các gen này là *gmm*, *wcaA*, *wcaBi*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *wcaI*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL* và/hoặc, *wcaM*. Các gen *manA*, *cpsG*, *cpsB*, *gmd* và, *fcl* (lần lượt mã hóa cho manosa-6-phosphat isomeraza, phosphomanomutaza, manosa-1-phosphat guanylyltransferaza, GDP-manoza 4,6-dehydrataza và GDP-fucoza syntaza) được tăng cường trong sự biểu hiện tăng lượng GDP-fucoza. Hoặc operon axit colanic

được bất hoạt hoàn toàn, với việc chèn lại vào gen cần thiết cho sự biểu hiện quá mức yếu tố khởi đầu (yếu tố khởi đầu phiên mã gen) nhân tạo từ thư viện chứa các yếu tố khởi đầu, hoặc operon được cải biến sao cho các gen như mô tả ở trên là các gen bị bất hoạt bằng một hoặc nhiều gen còn lại trong operon được tăng cường biểu hiện bằng cách thay đổi yếu tố khởi đầu của operon bằng yếu tố khởi đầu tạo thành nhân tạo (23). GDP-fucoza cuối cùng được liên kết với lactoza thành  $\alpha$ -1,2-fucosyllactoza bằng  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferaza. Fucosyltransferazas đã bắt đầu thử nghiệm từ *Helicobacter pylori*, *Bacteroides sp.*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus* and, *Dictyostelium discoideum*.

Ví dụ 16. Cải biến chủng gốc 3 *E. coli* (Galactoza-1-P) và sử dụng nó

Bằng cách bất hoạt gen mã hóa phosphataza (*agp*), UDP-glucoza, galactoza-1-P uridilyltransferaza (*galT*), UDP-glucoza-4-epimeraza (*galE*) một đột biến được hình thành liên quan đến việc tích tụ galactoza-1-P. Bằng cách biểu hiện quá mức gen mã hóa galactokinaza (*galK*) và/hoặc galactoza-1-epimeraza (*galM*), sự tạo thành galactoza-1-P được tăng cường (Bảng ).

Bảng 10: Chủng gốc galactoza-1-phosphat

| Bất hoạt gen | Phản ứng                                                                                |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>galT</i>  | $\text{Gal1P} + \text{UDP-Glucoza} \leftrightarrow \text{UDP-Galactoza} + \text{G1P}$   |
| <i>galE</i>  | $\text{UDP-Glucoza} \leftrightarrow \text{UDP-Galactoza}$                               |
| <i>agp</i>   | $\text{Glucoza-1-phosphat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pi} + \text{glucoza}$ |
| Hoạt hóa gen | Phản ứng                                                                                |
| <i>galK</i>  | $\alpha\text{-galactoza} + \text{ATP} \rightarrow \text{Gal1P} + \text{ADP}$            |
| <i>galM</i>  | $\beta\text{-galactoza} \leftrightarrow \alpha\text{-galactoza}$                        |

Ví dụ 17. Cải biến chủng gốc 3 (Galactosa-1P) và sử dụng nó

Bằng cách bất hoạt gen mã hóa phosphataza (*agp*), UDP-glucoza, galactosa-1-P uridilyltransferaza (*galT*), UDP-glucoza-4-epimeraza (*galE*) và bằng cách biểu hiện quá mức thêm gen mã hóa galactokinaza (*galK*), đột biến được cải biến tạo ra sự tích tụ galactosa-1-P (Bảng 11).

Bảng 11: *E. coli* chủng gốc galactosa-1-phosphat

| Bất hoạt gen | Phản ứng                                                                                |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>galT</i>  | $\text{Gal1P} + \text{UDP-Glucoza} \leftrightarrow \text{UDP-Galactosa} + \text{G1P}$   |
| <i>galE</i>  | $\text{UDP-Glucoza} \leftrightarrow \text{UDP-Galactosa}$                               |
| <i>galK</i>  | $\alpha\text{-galactosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{Gal1P} + \text{ADP}$            |
| <i>galM</i>  | $\beta\text{-galactosa} \leftrightarrow \alpha\text{-galactosa}$                        |
| <i>agp</i>   | $\text{glucoza-1-phosphat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pi} + \text{glucoza}$ |
| Hoạt hóa gen | Phản ứng                                                                                |
| <i>galK</i>  | $\alpha\text{-galactosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{Gal1P} + \text{ADP}$            |

Để đánh giá tiềm năng của chiến lược cải biến về mặt chuyển hóa, nồng độ galactosa-1-phosphat được xác định đối với *E. coli* MG1655  $\Delta galET$  P22 *galK* chủng đại, *E. coli* MG1655  $\Delta galETKM \Delta agp$  P22 *galK*, *E. coli* MG1655  $\Delta galET$  P22 *galK*, và *E. coli* MG1655  $\Delta galETKM \Delta agp$  P22 *galK* + orotat (2g/L) bằng cách làm tăng trưởng chủng trong môi trường tối thiểu chứa lactoza (15g/L) làm nguồn cacbon chính. Kết quả được mô tả trong bảng 12.

Bảng: 12 Nồng độ galactosa-1-P của các đột biến *E. coli* khác nhau

| Chủng                                                                        | Galactosa-1-P (mg/L) |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| <i>E. coli</i> MG1655                                                        | Không phát hiện được |
| <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ galET P22 galK                                | 15,73                |
| <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ galETKM $\Delta$ agp P22 galK                 | 69,08                |
| <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ galET P22 galK                                | 12,48                |
| <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta$ galETKM $\Delta$ agp P22 galK + orotat (2g/L) | 64,90                |

Ví dụ 18. Tạo glucoza-6-phosphat sử dụng sucroza phosphorylaza trong *E. coli*

Bằng cách bổ sung sucroza phosphorylaza, sucroza được tách ra thành glucoza-1-P và fructoza. Bằng cách bất hoạt thêm gen mã hóa phosphataza (*agp*), glucoza 6-phosphat-1-dehydrogenaza (*zwf*), phosphoglucoza isomeraza (*pgi*), glucoza-1-phosphat adenylyltransferaza (*glgC*), đột biến được cải biến để tích lũy glucoza-6-P.

Đột biến KO được chọn theo cách mà quá trình chuyển hóa được tách ra thành hai phần không liên quan đến nhau. Tuy nhiên, tất cả sự kết hợp có thể của các gen này làm tăng nguồn dự trữ. Thay vì bất hoạt những gen này, mục đích này cũng đạt được bằng cách làm cho chúng bị khuyết hoặc làm giảm sự biểu hiện của chúng.

Bằng cách cải biến chuyển hóa *E. coli*, chủng gốc được tạo cấu trúc là cấu trúc có chức năng của carbohydrat đặc hiệu và dẫn xuất của chúng, chúng có quy trình có nguồn gốc từ Glucoza-6-P (Bảng 13).

Bảng 13: Glucoza-6-phosphat của chủng gốc sử dụng sucroza phosphorylaza

| Bất hoạt gen | Phản ứng                                                 |
|--------------|----------------------------------------------------------|
| <i>zwf</i>   | $G6P + NADP \rightarrow 6PG + NADPH$                     |
| <i>agp</i>   | $G1P + H_2O \rightarrow Glc + Pi$                        |
| <i>glgC</i>  | $G1P + ATP + H \leftrightarrow ADP\text{-glucoza} + PPi$ |

|                       |                                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| <i>pgi</i>            | $G6P \leftrightarrow F6P$         |
| Hoạt hóa gen          | Phản ứng                          |
| Sucroza phosphorylaza | $Suc + P_i \rightarrow G1P + Fru$ |
| <i>pgm</i>            | $G6P \leftrightarrow G1P$         |

Ví dụ 19. Tạo glucoza-6-phosphat sử dụng invertaza ở *E. coli*

Bằng cách chèn vào sucroza hydrolaza/invertaza, sucroza được tách ra thành glucoza và fructoza. Bằng cách bất hoạt thêm gen mã hóa phosphataza (*agp*), glucoza 6-phosphat-1-dehydrogenaza (*zwf*), phosphoglucoza isomeraza (*pgi*), glucoza-1-phosphat adenylyltransferaza (*glgC*), phosphoglucomutaza (*pgm*), cấu trúc đột biến được tạo ra, nó tích lũy glucoza-6-P (Bảng 14).

Bảng 14: Glucoza-6-phosphat của chủng gốc sử dụng invertaza trong *E. coli*

| Bất hoạt gen | Phản ứng                             |
|--------------|--------------------------------------|
| <i>zwf</i>   | $G6P + NADP \rightarrow 6PG + NADPH$ |
| <i>agp</i>   | $G1P + H_2O \rightarrow Glu + P_i$   |
| <i>pgi</i>   | $G6P \leftrightarrow F6P$            |
| <i>pgm</i>   | $G6P \leftrightarrow G1P$            |
| Hoạt hóa gen | Phản ứng                             |
| invertaza    | $Suc + H_2O \rightarrow Glc + Fru$   |

Ví dụ 20. Tạo fructoza-6-phosphat sử dụng invertaza trong *E. coli*

Bằng cách chèn vào sucroza hydrolaza/invertaza, sucroza được tách ra thành glucoza và fructoza. Bằng cách bất hoạt thêm gen mã hóa phosphataza (*agp*), phosphofructokinaza (*pfkA* và *pfkB*), phosphoglucoza isomeraza (*pgi*), glucoza-1-phosphat adenylyltransferaza (*glgC*), phosphoglucomutaza (*pgm*), cấu trúc đột biến được tạo ra, nó tích tụ fructoza-6-phosphat (Bảng 15).

Bảng 15: Fructoza-6-phosphat của chủng gốc

| Bất hoạt gen | Phản ứng                           |
|--------------|------------------------------------|
| <i>pfkA</i>  | $F6P + ATP \rightarrow FBP + ADP$  |
| <i>pfkB</i>  | $F6P + ATP \rightarrow FBP + ADP$  |
| <i>agp</i>   | $G1P + H_2O \rightarrow Glc + Pi$  |
| <i>pgi</i>   | $G6P \leftrightarrow F6P$          |
| <i>pgm</i>   | $G6P \leftrightarrow G1P$          |
| Hoạt hóa gen | Phản ứng                           |
| invertaza    | $Suc + H_2O \rightarrow Glc + Fru$ |

Ví dụ 21. Tạo  $\beta$ -glucoza-1-phosphat sử dụng maltoza phosphorylaza trong *E. coli*

Bằng cách chèn vào maltoza phosphorylaza, maltoza được tách ra thành  $\beta$ -D-glucoza 1-phosphat và glucoza. Bằng cách bất hoạt thêm gen mã hóa phosphataza (*agp*, *yfbT*), phosphoglucomutaza (*ycjU*), maltoza hydrolaza (*malPQ*), cấu trúc đột biến được tạo ra, nó tích tụ  $\beta$ -glucoza -1-P. Thể đột biến KO được chọn, trong đó quy trình chuyển hóa được tách ra thành phần không liên quan đến nhau. Tuy nhiên, tất cả sự kết hợp có thể của những gen này làm tăng nguồn dự trữ. Thay vì bất hoạt các gen này, mục đích này cũng có thể cũng đạt được bằng cách làm cho chúng bị khuyết hoặc làm giảm sự biểu hiện của chúng (Bảng 16).

Bảng 16:  $\beta$ -D-Glucoza-1-phosphat của chủng gốc sử dụng maltoza phosphorylaza trong *E. coli*

| Bất hoạt gen | Phản ứng                                                         |
|--------------|------------------------------------------------------------------|
| <i>malPQ</i> | Maltoza $\rightarrow$ glucoza                                    |
| <i>yfbT</i>  | $\beta$ -D-glucoza 1-phosphat $+H_2O \rightarrow$<br>glucoza+ Pi |
| <i>agp</i>   | Glucoza-1-phosphat $+H_2O \rightarrow$<br>glucoza+ Pi            |

|                            |                                                                                  |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <i>ycjU</i>                | $\beta$ -D-glucoza 1-phosphat $\rightleftharpoons$ $\beta$ -D-glucoza-6-phosphat |
| Hoạt hóa gen               | Phản ứng                                                                         |
| Maltoza phosphorylaza (MP) | Maltoza + Pi $\rightarrow$ Glucoza-1P + Glucoza                                  |

Ví dụ 22. Tạo  $\beta$ -glucoza-1-phosphat sử dụng trehaloza phosphorylaza trong *E. coli*

Bằng cách đưa trehaloza vào, trehaloza phosphorylaza được tách ra thành  $\beta$ -D-glucoza 1-phosphat và glucoza. Bằng cách bất hoạt thêm gen mã hóa phosphatase (*agp*, *yfbT*), phosphoglucomutaza (*ycjU*), các enzym suy biến trehaloza tự nhiên không mong muốn (*treABC*, *treC*, *treE*, *treF*), cấu trúc đột biến được tạo ra, nó tích tụ  $\beta$ -glucoza -1-phosphat (Bảng 17).

Thế đột biến KO được chọn trong đó sự chuyển hóa được tách ra thành hai phần không liên quan đến nhau. Tuy nhiên, tất cả sự kết hợp có thể của các gen này làm tăng năng suất. Thay vì bất hoạt các gen này, mục đích này có thể đạt được bằng cách làm cho chúng bị khuyết hoặc làm giảm sự biểu hiện của chúng.

Bảng 17:  $\beta$ -D-glucoza-1-phosphat của chủng gốc sử dụng trehaloza phosphorylaza trong *E. coli*

| Bất hoạt gen | Phản ứng                                                                                                     |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>treA</i>  | trehaloza + H <sub>2</sub> O $\rightarrow$ 2 $\beta$ -D-glucoza                                              |
| <i>treC</i>  | trehaloza 6-phosphat + H <sub>2</sub> O $\rightarrow$ $\beta$ -D-glucoza-6-phosphat + $\beta$ -D-glucoza     |
| <i>treE</i>  | trehaloza 6-phosphat + H <sub>2</sub> O $\leftrightarrow$ $\beta$ -D-glucoza-6-phosphat + $\beta$ -D-glucoza |
| <i>treF</i>  | trehaloza + H <sub>2</sub> O $\leftrightarrow$ 2 $\beta$ -D-glucoza                                          |
| <i>yfbT</i>  | $\beta$ -D-glucoza 1-phosphat + H <sub>2</sub> O $\rightarrow$ Glucoza + Pi                                  |
| <i>agp</i>   | glucoza 1-phosphat + H <sub>2</sub> O $\rightarrow$ Glucoza + Pi                                             |

|                                 |                                                                               |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>ycjU</i>                     | $\beta$ -D-glucosa 1-phosphat $\leftrightarrow$ $\beta$ -D-glucosa-6-phosphat |
| Hoạt hóa gen                    | Phản ứng                                                                      |
| Trehaloza<br>Phosphorylaza (TP) | Trehaloza + Pi $\rightarrow$ $\beta$ -D-Glucosa-1P + Glucosa                  |
| <i>otsB</i>                     | Trehaloza-6-phosphat + H <sub>2</sub> O $\rightarrow$ trehaloza + Pi          |

### Ví dụ 23. Tạo kojibioza

Bằng cách bổ sung thêm kojibioza phosphorylaza trong chủng tích lũy  $\beta$ -D-glucosa 1-phosphat và bất hoạt thêm gen mã hóa glucokinaza (*glk*) và, hệ phosphotransferaza (*ptsG*), cấu trúc đột biến được tạo ra, nó tạo kojibioza.

Sự lên men đạt được với chủng đột biến *E. coli* ( $\Delta$ *lacZ* $\Delta$ *glgC* $\Delta$ *agp* $\Delta$ *ptsG* $\Delta$ *malPQ* $\Delta$ *ycjU* pCXp22MPp22KP) sử dụng maltoza và glucosa làm nguồn cacbon chính thu được kojibioza. (Fig. 16).

### Ví dụ 24. Tạo UDP glucosa từ sucroza thông qua sucroza phosphorylaza

Bằng cách cho sucroza phosphorylaza vào (ví dụ, có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*), sucroza được tách ra thành fructoza và glucosa-1-P. Có nguồn gốc từ chủng tích lũy glucosa-1-phosphat (xem ví dụ ở trên) và bằng cách bất hoạt thêm gen mã hóa UDP-glucosa 4 epimeraza (*galE*), UDP-glucosa galactoza-1-P uridilyltransferaza (*galT*), 5'-nucleotidaza/UDP-đường hydrolaza (*ushA*), UDP-glucosa 6-dehydrogenaza (*ugd*), thể đột biến được tạo cấu trúc, nó tích lũy UDP-glucosa bằng cách cũng biểu hiện quá mức gen mã hóa UDP-glucosa pyrophosphorylaza (ví dụ, đến từ *Bifidobacterium bifidum*) (Bảng 18).

Bảng 18: Chủng gốc UDP-glucosa từ sucroza qua sucroza phosphorylaza trong *E. coli*

| Bất hoạt gen | Phản ứng                                    |
|--------------|---------------------------------------------|
| <i>lacZ</i>  | Glu + Gal $\leftrightarrow$ Lactoza         |
| <i>galE</i>  | UDP-Glucosa $\leftrightarrow$ UDP-Galactoza |
| <i>galT</i>  | Gal1P + UDP-Glucosa $\leftrightarrow$ UDP-  |



|                       |                                                                                                      |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       | Galactoza + G1P                                                                                      |
| <i>ca</i>             | → axit colanic                                                                                       |
| <i>ushA</i>           | a UDP-đường + H <sub>2</sub> O ↔ uridin-5'-phosphat + an α-D-aldoza-1-phosphat + 2 H <sup>+</sup>    |
| <i>ugd</i>            | 2 NAD <sup>+</sup> + UDP-D-glucoza + H <sub>2</sub> O ↔ 2 NADH + UDP-D-glucuronat + 3 H <sup>+</sup> |
| <i>pgm</i>            | G1P ↔ G6P                                                                                            |
| <i>glgC</i>           | G1P + ATP + H ↔ ADP-glucoza + PPi                                                                    |
| <i>agp</i>            | G1P + H <sub>2</sub> O → Glu + Pi                                                                    |
| <i>ptsG</i>           | Glc + PEP → G6P + Pyr                                                                                |
| <i>glk</i>            | Glc + ATP → G6P + ADP                                                                                |
| Hoạt hóa gen          | Phản ứng                                                                                             |
| <i>galU/F</i>         | G1P + UTP → UDP-Glucoza + PPi                                                                        |
| Sucroza phosphorylaza | Suc → G1P + Fru                                                                                      |

Ví dụ 25. Tạo UDP-glucoza trong *E. coli* với sucroza-6-phosphat syntaza kết hợp với sucroza PTS

Bằng cách chèn sucroza PTS (94) và sucroza-6-phosphat syntaza (69), sucroza được chuyển hóa thành fructoza-6-phosphat và UDP-glucoza. Có nguồn gốc từ chủng được mô tả trong ví dụ 4, không có sucroza phosphorylaza, và bằng cách bất hoạt thêm gen mã hóa phosphataza (*agp*), UDP-glucoza 4 epimeraza (*galE*), UDP-glucoza galactoza-1-P uridilyltransferaza (*galT*), 5'-nucleotidaza / UDP-đường hydrolaza (*ushA*), UDP-glucoza 6-dehydrogenaza (*ugd*), cấu trúc đột biến được tạo ra, nó tích lũy UDP-glucoza bằng cách biểu hiện thêm gen mã hóa UDP-glucoza pyrophosphorylaza (*Bifidobacterium bifidum*) (Bảng 19).

Bảng 19: UDP-glucoza với sucroza-6-phosphat syntaza của chủng gốc kết hợp với sucroza PTS

| Bất hoạt gen       | Phản ứng                                                                                             |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>galE</i>        | UDP-Glucoza ↔ UDP-Galactoza                                                                          |
| <i>galU/galF</i>   | UTP + G1P ↔ UDP-Glucoza + PPi                                                                        |
| <i>galT</i>        | Gal1P + UDP-Glucoza ↔ UDP-Galactoza + G1P                                                            |
| <i>ca</i>          | → axit colanic                                                                                       |
| <i>ushA</i>        | a UDP-đường + H <sub>2</sub> O ↔ uridin-5'-phosphat + α-D-aldoza-1-phosphat + 2 H <sup>+</sup>       |
| <i>ugd</i>         | 2 NAD <sup>+</sup> + UDP-D-glucoza + H <sub>2</sub> O ↔ 2 NADH + UDP-D-glucuronat + 3 H <sup>+</sup> |
| Hoạt hóa gen       | Phản ứng                                                                                             |
| Sucroza 6P syntaza | UDP-glucoza + D-fructoza 6-phosphat →<br>UDP + Sucroza 6-phosphat                                    |
| Sucroza PTS        | Sucroza + PEP → Sucroza-6-phosphat + Pyruvat                                                         |

#### Ví dụ 26. Tạo UDP galactoza thông qua galactokinaza

Bằng cách biểu hiện quá mức gen mã hóa galactokinaza (*galK*) và galactoza-1-phosphat uridylyltransferaza (ví dụ, có nguồn gốc từ *Bifidobacterium bifidum*), sự tạo thành UDP-galactoza được tăng cường bằng cách bất hoạt thêm gen mã hóa phosphataza) (*agp*), UDP-glucoza, galactoza-1-P uridylyltransferaza (*galT*), UDP-glucoza-4-epimeraza (*galE*) cấu trúc đột biến được tạo ra, nó tích lũy galactoza-1-P (Bảng 20).

Bảng 20: UDP-galactoza của chủng gốc thông qua galactokinaza

| Bất hoạt gen                             | Phản ứng                                                                                |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>galT</i>                              | $\text{Gal1P} + \text{UDP-Glucoza} \leftrightarrow \text{UDP-Galactoza} + \text{G1P}$   |
| <i>galE</i>                              | $\text{UDP-Glucoza} \leftrightarrow \text{UDP-Galactoza}$                               |
| <i>galK</i>                              | $\alpha\text{-galactoza} + \text{ATP} \rightarrow \text{Gal1P} + \text{ADP}$            |
| <i>galM</i>                              | $\beta\text{-galactoza} \leftrightarrow \alpha\text{-galactoza}$                        |
| <i>agp</i>                               | $\text{glucoza 1-phosphat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pi} + \text{glucoza}$ |
| Hoạt hóa gen                             | Phản ứng                                                                                |
| <i>galK</i>                              | $\alpha\text{-galactoza} + \text{ATP} \rightarrow \text{Gal1P} + \text{ADP}$            |
| Galactoza-1-phosphat uridylyltransferaza | $\text{Gal1P} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-Galactoza} + \text{PPi}$               |

## Ví dụ 27. Tạo UDP galactoza thông qua lactoza phosphorylaza

Bằng cách chèn lactoza phosphorylaza (20), lactoza được tách ra thành glucoza và galactoza-1-P. Bằng cách bất hoạt gen mã hóa phosphataza (*agp*), UDP-glucoza, galactoza-1-P uridylyltransferaza (*galT*), UDP-glucoza-4-epimeraza (*galE*) cấu trúc đột biến được tạo ra, nó tích lũy galactoza-1-P. Bằng cách biểu hiện quá mức gen mã hóa galactoza-1-phosphat uridylyltransferaza (ví dụ, lấy từ *Bifidobacterium bifidum*), sự tạo thành UDP-galactoza được tăng cường (Bảng 21).

Thế đột biến KO được chọn trong đó sự chuyển hóa được tách ra thành hai phần không liên quan. Tuy nhiên, tất cả sự kết hợp có thể của các gen này làm tăng sản lượng. Thay vì bất hoạt gen này, mục đích này có thể đạt được bằng cách làm khuyết chúng hoặc bằng cách làm giảm sự biểu hiện của chúng.

Bảng 21: UDP-galactoza của chủng gốc thông qua lactoza phosphorylaza

| Bất hoạt gen                             | Phản ứng                                                                    |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <i>lacZ</i>                              | $\text{Glu} + \text{Gal} \leftrightarrow \text{Lactoza}$                    |
| <i>galE</i>                              | $\text{UDP-Glc} \leftrightarrow \text{UDP-Gal}$                             |
| <i>agp</i>                               | $\text{G1P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glu} + \text{Pi}$        |
| <i>galT</i>                              | $\text{UDP-Glc} + \text{Gal1P} \leftrightarrow \text{UDP-Gal} + \text{G1P}$ |
| Hoạt hóa gen                             | Phản ứng                                                                    |
| Lactoza phosphorylaza                    | $\text{Lactoza} + \text{Pi} \rightarrow \text{Gal1P} + \text{Glucoza}$      |
| Galactoza-1-phosphat uridylyltransferaza | $\text{Gal1P} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-Galactoza} + \text{PPi}$   |

Ví dụ 28. Tích lũy fructoza-6-phosphat trong *E. coli*

Sự chuyển hóa được tách ra để tích lũy fructoza-6-phosphat. Điều này đạt được bằng cách bất hoạt gen mã hóa phosphoglucoza isomeraza và hoạt tính phosphofructokinaza. Trong *E. coli* hoạt tính này được mã hóa bằng gen *pgi*, *pfkA* và *pfkB*. Tốc độ tăng trưởng của chủng không có hoạt tính này được mô tả trong Bảng 22 về sự sinh trưởng trên glucoza và sucroza. Tốc độ tăng trưởng của chủng đại có phần bị ảnh hưởng khi sinh trưởng trên sucroza sau khi thêm vào sucroza phosphorylaza so với sự sinh trưởng trên glucoza, tuy nhiên sự đưa vào sự bất hoạt *pgi* và đột biến kép *pfkA* và *pfkB* dẫn đến giảm đáng kể tốc độ tăng trưởng, với tốc độ tăng trưởng sau đó cực thấp ( $0,02\text{h}^{-1}$ ) trên glucoza. Ngạc nhiên là chủng đột biến  $\Delta pgi\Delta pfkA\Delta pfkB$  có tốc độ tăng trưởng tương tự với đột biến đơn  $\Delta pgi$ .

Bảng 22: Tốc độ tăng trưởng cụ thể của chủng bất hoạt glycolysis trong môi trường tối thiểu với glucoza và sucroza. Ở chủng sinh trưởng trên sucroza, plasmit mã hóa sucroza phosphorylaza được đưa vào.

| Chủng                                | Tốc độ sinh trưởng trên glucoza (h-1) | Tốc độ sinh trưởng trên sucroza (h-1) |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Loại đại                             | 0,64                                  | 0,41                                  |
| $\Delta pgi$                         | 0,18                                  | 0,23                                  |
| $\Delta pfkA \Delta pfkB$            | 0,02                                  | n.d.                                  |
| $\Delta pgi \Delta pfkA \Delta pfkB$ | 0,23                                  | 0,24                                  |

Chỉ chủng đột biến  $\Delta pgi \Delta pfkA \Delta pfkB$  tích lũy fructoza-6-phosphat trong môi trường khi sinh trưởng trên sucroza, các chủng khác không bộc lộ bất kỳ sự tích lũy F6P nào. Các chỉ số tăng trưởng và tích lũy F6P ở chủng này được thể hiện trong Fig. 17.

Ví dụ 29. Tích lũy  $\alpha$ glucoza-1-phosphat trong *Saccharomyces cerevisiae*

Vì bản chất *Saccharomyces cerevisiae* tách sucroza, tất cả các sucroza khác làm giảm phản ứng (invertaza), chúng được mã hóa bằng gen SUC2, MAL32, MAL12, YJL216C, YGR287c, được bất hoạt. Để tránh sự đồng hóa  $\alpha$ -glucoza-1-phosphat, enzym chuyển hóa cacbohydrat hoạt hóa này được hoàn lại chức năng kém hoặc không có chức năng. Các enzym này là phosphoglucomutaza, được mã hóa bởi PGM1 và PGM2, và glucoza-1-phosphataza, được mã hóa bởi INM1 và INM2. Bằng cách chèn sucroza phosphorylaza (ví dụ, có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*), tương tự với sự chuyển hóa phân cắt của *E. coli* (xem ví dụ ở trên). Sự chuyển hóa ở *Saccharomyces cerevisiae* được tách ra thành hai phần dẫn đến sự tích lũy  $\alpha$ glucoza-1-phosphat.

Ví dụ 30. Tạo xellobioza bằng *Saccharomyces cerevisiae*

Vì bản chất *Saccharomyces cerevisiae* phân cắt sucroza, tất cả các sucroza khác làm giảm phản ứng (invertaza), chúng được mã hóa bằng gen SUC2, MAL32, MAL12, YJL216C, YGR287c, được bất hoạt. Để tránh sự đồng hóa  $\alpha$ -glucoza-1-phosphat, enzym chuyển hóa carbohydrate hoạt hóa này được hoàn lại chức năng kém hoặc không có chức năng. Các enzym là phosphoglucomutaza, được mã hóa bởi PGM1 và

PGM2, và glucoza-1-phosphataza, được mã hóa bởi INM1 và INM2. Bằng cách chèn sucroza phosphorylaza (ví dụ, có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*), tương tự với sự chuyển hóa phân cắt của *E. coli* (xem ví dụ ở trên). Sự chuyển hóa ở *Saccharomyces cerevisiae* được tách ra thành hai phần dẫn đến sự tích lũy  $\alpha$ glucoza-1-phosphat. Bằng cách chèn gen xellobioza phosphorylaza có nguồn gốc từ *Cellulomonas uda*, *Saccharomyces cerevisiae* có khả năng tạo xellobioza.

Để tránh sự phân hủy glucoza, hoạt tính glucokinaza, mã hóa bởi GLK1 cũng được bất hoạt. Vì hexokinaza trong *Saccharomyces cerevisiae* không đặc hiệu, chúng được thay thế bằng hexokinaza đặc hiệu chất nền khác loại cụ thể. Fructokinaza có nguồn gốc từ *E. coli* hoặc *Bifidobacterium adolescentis* thể hiện hoạt tính glucoza thấp và có thể thay thế gen mã hóa hexokinaza tự nhiên được mã hóa bởi HXK1 và HXK2.

Ví dụ 31. Sự tích lũy fructoza-6-phosphat trong *Saccharomyces cerevisiae* bằng cách chèn sucroza phosphorylaza

Vì bản chất *Saccharomyces cerevisiae* phân cắt sucroza, tất cả các sucroza khác làm giảm phản ứng (invertaza), chúng được mã hóa bằng các gen SUC2, MAL32, MAL12, YJL216C, YGR287c, được bất hoạt. Bằng cách chèn sucroza phosphorylaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*, sucroza được tách ra thành fructoza và glucoza-1-phosphat. Để tránh sự chuyển hóa fructoza-6-phosphat thành sinh khối, hoạt tính của enzym phosphoglucoza isomeraza và phosphofructokinaza được giảm hoặc loại bỏ bằng cách lần lượt làm cho các gen PGM1, PFK1 và PFK2 giảm chức năng hoặc không có chức năng.

Ví dụ 32. Sự tích lũy galactoza-1-phosphat trong *Saccharomyces cerevisiae*

Galactoza-1-phosphat có nguồn gốc từ disaccarit lactoza. Vì bản chất *Saccharomyces cerevisiae* không phân cắt lactoza, heterologous  $\beta$ -galactosidaza (ví dụ, từ *E. coli*) được chèn vào. Điều này dẫn đến sự phân hủy lactoza thành galactoza và glucoza. Mục đích là để làm tăng nguồn galactoza-1-phosphat cho con đường sinh tổng hợp của carbohydrat cụ thể. Do đó, galactoza-1-phosphat có thể không được chuyển hóa một chút nào thành sinh khối, nó được xúc tác bằng UDP-glucoza-hexoza-1-phosphat uridylyltransferaza, aldoza reductaza. Điều này đạt được bằng cách bất hoạt gen mã hóa tương ứng UDP-glucoza-hexoza-1-phosphat uridylyltransferaza và aldoza reductaza, GAL7 và GRE3. Để tránh sự phân hủy của galactoza-1-phosphat này, gen

mã hóa galactoza-1-phosphataza được bất hoạt. Chúng là INM1 và INM2. Galactokinaza được biểu hiện quá mức để tăng cường sự tạo thành galactoza-1-phosphat từ galactoza.

Ví dụ 33. Sự tích lũy glucoza-6-phosphat trong *Saccharomyces cerevisiae* thông qua invertaza tự nhiên

Để phân cắt chuyển hóa ở *Saccharomyces cerevisiae* thành hai phần (để tăng cường nguồn glucoza-6-phosphat sao cho nó có thể được sử dụng làm chất phong tỏa tạo cấu trúc đối với carbohydrate cụ thể), glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, phosphoglucomutaza và phosphoglucoza isomeraza, mà lần lượt được mã hóa bởi gen ZWF1, PGM1 và PGM2, và PGI1 được bất hoạt. Trong chủng này, sucroza được cắt thành fructoza và glucoza bằng invertaza tự nhiên và được phosphoryl hóa thành fructoza-6-phosphat và glucoza-6-phosphat bằng hexokinaza tự nhiên. Sau đó, glucoza-6-phosphat được cung cấp cho quá trình sinh tổng hợp carbohydrat đặc biệt và fructoza-6-phosphat được chuyển hóa thành sinh khối.

Ví dụ 34. Sự tích lũy glucoza-6-phosphat trong *Saccharomyces cerevisiae* thông qua sucroza phosphorylaza

*Saccharomyces cerevisiae* được cải biến để tạo glucoza-6-phosphat từ sucroza với sucroza phosphorylaza có nguồn gốc từ *Bifidobacterium adolescentis*. Vì sucroza phosphorylaza cạnh tranh về sucroza với invertaza, các gen mã hóa hoạt tính invertaza được bất hoạt. Các gen này là SUC2, MAL32, MAL12, YJL216C, và YGR287c. Sau đó, glucoza-1-phosphat cũng được chuyển hóa thành glucoza-6-phosphat với phosphoglucomutaza được mã hóa bởi PGM1 và PGM2. Để tránh sự phân hủy glucoza-1-phosphat thành glucoza, glucoza-1-phosphataza được mã hóa bởi INM1 và INM2 được bất hoạt. Sự đồng hóa của saccarit đã hoạt hóa này cũng được giảm bằng cách loại bỏ hoạt tính UTP glucoza-1-phosphat uridylyltransferaza trong tế bào, bằng cách hoàn lại gen YHL012W và UGP1 có chức năng kém hoặc không có chức năng. Gốc fructoza được phosphoryl hóa bằng hexokinaza tự nhiên được mã hóa bởi HXK1 và HXK2 và được chuyển hóa thành sinh khối.

Ví dụ 35. Tăng cường sự tạo thành UDP-glucoza trong *Saccharomyces cerevisiae* thông qua sucroza syntaza

Vì bản chất *Saccharomyces cerevisiae* phân cắt, tất cả sucroza khác làm giảm phản ứng (invertazas) mà được mã hóa bằng gen SUC2, MAL32, MAL12, YJL216C, YGR287c, được bất hoạt. Sucroza syntaza, ví dụ, có nguồn gốc từ *Solanum tuberosum*, được chèn vào sao cho sucroza được tách ra thành UDP-glucoza và fructoza. Để tránh sự chuyển hóa UDP-glucoza thành sinh khối, hoạt tính của enzym UDP-glucoza diphosphorylaza, UDP-glucoza 4-epimeraza, UDP-glucoza-hexose-1-phosphat uridylyltransferaza, UDP-glucoza-glycogen glucosyltransferaza, UDP-glucoza-1,3-beta-D-glucan glucosyltransferaza, UDP-glucoza-glucosylphosphat glucosyltransferaza được làm cho kém chức năng hoặc không có chức năng, các enzym này lần lượt được mã hóa bởi các gen UGP1 và YHL012W, GAL10, GAL7, GSY1 và GSY2, FEN1 và FKS1 và GSC2, và TPS1. Gốc fructoza moiety được phosphoryl hóa bằng hexokinaza tự nhiên được mã hóa bởi HXK1 và HXK2 và được chuyển hóa thành sinh khối.

Ví dụ 36. Tăng cường sự tạo thành UDP-glucoza trong *Saccharomyces cerevisiae* thông qua sucroza Sucroza phosphorylaza

Để tăng cường nguồn UDP-glucoza trong *Saccharomyces cerevisiae*, chủng như mô tả trong ví dụ 29 cũng được cải biến bằng cách biểu hiện quá mức gen GAL7 mã hóa UTP-glucoza-1-phosphat uridylyltransferaza xúc tác sự chuyển hóa  $\alpha$ -glucoza-1-phosphat thành UDP-glucoza.

Ví dụ 37. Tăng cường sự tạo thành UDP-galactoza trong *Saccharomyces cerevisiae* thông qua  $\beta$ -galactosidaza

Để tăng cường nguồn UDP-galactoza trong *Saccharomyces cerevisiae*, chủng như mô tả trong ví dụ 32 cũng được cải biến thêm bằng cách biểu hiện quá mức gen mã hóa UTP-galactoza-1-phosphat uridylyltransferaza (ví dụ, có từ *Bifidobacterium bifidum*) xúc tác sự chuyển hóa  $\alpha$ -galactoza-1-phosphat thành UDP-galactoza.

Ví dụ 38. Chèn vào hoạt tính dictyostellium discoideum  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferaza

*Dictyostelium discoideum*  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferaza (FT) là một phần của loại glycosyltransferaza mới. Tất cả FT thuộc về loại GT11, trong khi FT của *D. discoideum* thuộc về loại GT74. FT này có, đến nay, chỉ tìm thấy trong hai sinh vật khác cụ thể là, *Desulfococcus oleovorans* và *Desulfotomaculum reducens*. Loại thứ ba là GT37, nó chỉ chứa FT thực vật (Fig.18). Sự liên kết clustalW và Tcoffee chỉ ra rằng



với *H. pylori* lần lượt 9,7% và 15,5%. Sự biến đổi được bảo tồn của GT11 được thể hiện trong Fig.19 và chúng không xuất hiện trong tất cả protein *Dictyostelium* (67). Những vùng này phân biệt đối với hoạt tính fucosyl hóa của transferaza. Hai sự biến đổi đầu tiên giống nhau đối với  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferaza và  $\alpha$ -6-fucosyltransferaza, trong khi sự biến đổi thứ ba khác về enzym so với hai biến đổi trên.  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferaza chứa hai sự biến đổi bảo tồn khác nhau hoàn toàn.

Tuy nhiên, FT của *Dictyostelium discoideum* FT đã được mô tả chỉ có hoạt tính trên lacto-N-bioza và không có hoạt tính trên galactoza phenyl- $\beta$ -galactosit, Gal $\beta$ 1-6-GlcNac, Lactoza, Gal $\beta$ 1-6Gal, Xyl, Glc, GlcNac và GalNac (92).

Trong Fig.20 phân tích LC MSMS của thử nghiệm fucosyltransferaza của *Dictyostellium discoideum* được thể hiện. Thử nghiệm này đã cho thấy điều đáng ngạc nhiên rằng, fucosyltransferaz được biểu hiện khác loại có hoạt tính với Lactoza làm yếu tố nhận và GDP-fucoza và làm yếu tố cho fucoza. Hoạt tính của enzym này là  $0,19 \pm 0,01$ U/mg protein và được xác định theo phương pháp của Persson và Palcic (68).

Vì chỉ một nửa enzym của *Dictyostelium discoideum* có vai trò về hoạt tính  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferaza, phần này được tách dòng theo cách giống với enzym hoàn chỉnh, tuy nhiên với mã khởi đầu bổ sung (mã hóa bởi ATG) ở phía trước trình tự nucleotit. Enzym mới này được tạo trong chủng đột biến  $\Delta lacZ \Delta glgC \Delta manA \Delta CA$  và được phân tích hoạt tính  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferaza với LC MSMS. Fig.21 thể hiện rõ ràng rằng một phần enzym này vẫn có khả năng tạo ra 2-fucosyllactoza từ GDP-fucoza và lactoza.

#### Ví dụ 39. Tạo myo-inositol trong *E. coli*

Có nguồn gốc từ chủng gốc tích lũy glucoza-6-phosphat, cấu trúc tạo myo-inositol được cải biến bằng cách chèn thêm vào gen mã hóa myo-inositol-1-phosphat syntaza (INO1, có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*) và myo-inositol-1(hoặc 4)-monophosphataza (INM1 và INM2, có nguồn gốc từ *Saccharomyces cerevisiae*).

#### Ví dụ 40. Tạo lacto-N-bioza trong *E. coli*

Có nguồn gốc từ chủng gốc tích lũy galactoza-1-phosphat, cấu trúc tạo lacto-N-bioza được cải biến bằng cách chèn thêm vào gen mã hóa lacto-N-bioza phosphorylaza (Inbp, *Bifidobacterium longum*). Tiến hành lên men sử dụng lactoza và N-axetylglucoamin làm nguồn cacbon. Sự phân hủy N-axetylglucosamin được ức chế

trong chủng tạo bằng cách loại bỏ hoạt tính N-acetyl-D-glucosamin kinaza bất kỳ (*nagK*) và hoạt tính N-acetylglucosamin PTS (*nagE*, *ptsH*, *ptsI*, *manXYZ*).

#### Danh mục chữ viết tắt

|       |                                                                                                |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3KO   | chủng đột biến trong đó gen <i>pgm</i> , <i>lacZ</i> và <i>glgC</i> được bất hoạt              |
| 4KO   | chủng đột biến trong đó gen <i>pgm</i> , <i>lacZ</i> , <i>glgC</i> và <i>agp</i> được bất hoạt |
| 6PG   | 6-phosphogluconat                                                                              |
| BA    | <i>Bifidobacterium adolescentis</i>                                                            |
| BaSP  | Sucroza phosphorylaza có nguồn gốc từ <i>Bifidobacterium adolescentis</i>                      |
| CA    | operon axit colanic được xác định bởi Stevenson và cộng sự (86)                                |
| CDW   | Trọng lượng khô tế bào                                                                         |
| CuCP  | xellobioza phosphorylaza của <i>Cellulomonas uda</i>                                           |
| F6P   | Fructoza-6-phosphat                                                                            |
| FBP   | Fructoza-1,6-bisphosphat                                                                       |
| Fru   | Fructoza                                                                                       |
| FT    | $\alpha$ 1,2-fucosyltransferaza                                                                |
| G1P   | Glucoza-1-phosphat                                                                             |
| Gal1P | Galactoza-1-phosphat                                                                           |
| Glc   | Glucoza                                                                                        |
| Glu   | Glucoza                                                                                        |
| KI    | Hoạt hóa gen (knock-in)                                                                        |
| KO    | Bất hoạt gen (knock-out)                                                                       |
| KP    | Kojibioza phosphorylaza                                                                        |
| LA    | <i>Lactobacillus acidophilus</i>                                                               |
| LB    | dịch Luria Bertani                                                                             |
| LM    | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>                                                               |

|         |                                                                        |
|---------|------------------------------------------------------------------------|
| MP      | Maltoza phosphorylaza                                                  |
| P22     | Gen hoạt hóa 22 trong thư viện gen hoạt hóa De Mey <i>et al</i> (2007) |
| pCXp22  | Plasmit chứa gen hoạt hóa P22 theo Aerts <i>et al</i> (1)              |
| PEP     | PhosphoenolPyruvat                                                     |
| Pi      | Phosphat vô cơ                                                         |
| PPi     | Pyrophosphat                                                           |
| Pyr     | Pyruvat                                                                |
| rpm     | vòng/phút                                                              |
| SM      | <i>Streptococcus mutans</i>                                            |
| SP      | Sucroza phosphorylaza                                                  |
| Suc     | Sucroza                                                                |
| UDP-gal | UDP-galactoza                                                          |
| UDP-glc | UDP-glucoza                                                            |
| WT      | Chủng đại                                                              |

## Tài liệu tham khảo

1. Aerts, D., T. Verhaeghe, M. De Mey, T. Desmet, and W. Soetaert. 2010. A constitutive expression system for high throughput screening. *Engineering in Life Sciences* 10:DOI: 10.1002/elsc.201000065.
2. Agrawal, N., P. V. N. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, and S. K. Mukherjee. 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:657-685.
3. Antoine, T., C. Bosso, A. Heyraud, and E. Samain. 2005. Large scale in vivo synthesis of globotriose and globotetraose by high cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biochimie* 87:197-203.
4. Avihoo, A., I. Gabdank, M. Shapira, and D. Barash. 2007. *In silico* design of small RNA switches. *IEEE Transactions on Nanobioscience* 6:4-11.
5. Ayres, E. K., V. J. Thomson, G. Merino, D. Balderes, and D. H. Figurski. 1993. Precise deletions in large bacterial genomes by Vector-mediated Excision (VEX) : The trfA gene of promiscuous plasmid RK2 is essential for replication in several gram-negative hosts. *Journal of Molecular Biology* 230:174-185.
6. Badet, B., P. Vermoote, P. Y. Haumont, F. Lederer, and F. Le Goffic. 1987. Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry* 26:1940-1948.
7. Balbás, P., M. Alexeyev, I. Shokolenko, F. Bolivar, and F. Valle. 1996. A pBRINT family of plasmids for integration of cloned DNA into the *Escherichia coli* chromosome. *Gene* 172:65-69.
8. Balbas, P., and G. Gosset. 2001. Chromosomal editing in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology* 19:1-12.
9. Beauprez, J. 2010. Metabolic modelling and engineering of *Escherichia coli* for succinate production. PhD. Ghent University, Ghent.
10. Boles, E., W. Liebetrau, M. Hofmann, and F. K. Zimmermann. 1994. A family of hexosephosphat mutases in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 220:83-96.

11. Buchholz, A., R. Takors, and C. Wandrey. 2001. Quantification of Intracellular Metabolites in *Escherichia coli* K12 Using Liquid Chromatographic-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Techniques. *Analytical Biochemistry* 295:129-137.
12. Burda, P., and M. Aepli. 1998. The ALG10 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the  $\alpha$ -1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation. *Glycobiology* 8:455-462.
13. Byun, S.-G., M.-D. Kim, W.-H. Lee, K.-J. Lee, N. Han, and J.-H. Seo. 2007. Production of GDP-l-fucose, l-fucose donor for fucosyloligosaccharide synthesis, in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:768-775.
14. Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9-14.
15. Chow, T., M. J. Goldenthal, J. D. Cohen, M. Hegde, and J. Marmur. 1983. Identification and physical characterization of yeast maltase structural genes. *Molecular and General Genetics MGG* 191:366-371.
16. Chow, T. H. C., P. Sollitti, and J. Marmur. 1989. Structure of the multigene family of *MAL* loci in *Saccharomyces*. *Molecular and General Genetics MGG* 217:60-69.
17. Czar, M. J., J. C. Anderson, J. S. Bader, and J. Peccoud. 2009. Gene synthesis demystified. *Trends in Biotechnology* 27:63-72.
18. Daran, J. M., N. Dallies, D. Thines-Sempoux, V. Paquet, and J. François. 1995. Genetic and Biochemical Characterization of the UGP1 Gene Encoding the UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 233:520-530.
19. Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings*

of the national academy of sciences of the United States of America 97:6640-6645.

20. De Groeve, M., V. Depreitere, T. Desmet, and W. Soetaert. 2009. Enzymatic production of  $\alpha$ -D-galactose 1-phosphat by lactose phosphorolysis. *Biotechnology Letters* 31:1873-1877.
21. De Mey, M. 2007. Metabolic modelling and engineering of *Escherichia coli* to minimize acetate formation in recombinant DNA fermentation processes. Ghent University, Ghent.
22. De Mey, M., A. Cerdobbel, K. Van Nieuland, J. Maertens, W. Soetaert, and E. J. Vandamme. 2006. Promoter Engineering: A Useful Tool for Fine Tuning Gene Expression in *Escherichia coli*. Department of Biochemical and Microbial Technology, Ghent University.
23. De Mey, M., J. Maertens, G. J. Lequeux, W. K. Soetaert, and E. J. Vandamme. 2007. Construction and model-based analysis of a promoter library for *E. coli*: an indispensable tool for metabolic engineering. *BMC Biotechnology* 7:34-48.
24. De Virgilio, C., N. BÜRckert, W. Bell, P. JenÖ, T. Boller, and A. Wiemken. 1993. Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphat synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphat and loss of trehalose-6-phosphat phosphatase activity. *European Journal of Biochemistry* 212:315-323.
25. Dedhia, N. N., T. Hottiger, and J. E. Bailey. 1994. Overproduction of glycogen in *Escherichia coli* blocked in the acetate pathway improves cell growth. *Biotechnology and Bioengineering* 44:132-139.
26. Dickinson, J. R. 1991. Biochemical and genetic studies on the function of, and relationship between, the PGI1- and CDC30-encoded phosphoglucose isomerases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 137:765-770.
27. Dippel, R., and W. Boos. 2005. The Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Metabolism and Transport. *J. Bacteriol.* 187:8322-8331.

28. Edwards, C. J., D. J. Innes, D. M. Burns, and I. R. Beacham. 1993. UDP-sugar hydrolase enzymes in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*: silent alleles of *ushA* in related strains of group I *Salmonella* isolates, and of *ushB* in wild type and K12 strains of *Escherichia coli* indicate recent and early silencing events, respectively. *FEMS Microbiology Letters* 114:293-298.
29. Egan, S. E., R. Fliege, S. Tong, A. Shibata, R. E. Wolf, Jr., and T. Conway. 1992. Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon. *Journal of Bacteriology* 174:4638-4646.
30. Farkas, I., T. A. Hardy, A. A. DePaoli-Roach, and P. J. Roach. 1990. Isolation of the GSY1 gene encoding yeast glycogen synthase and evidence for the existence of a second gene. *Journal of Biological Chemistry* 265:20879-20886.
31. Farkas, I., T. A. Hardy, M. G. Goebel, and P. J. Roach. 1991. Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. *Journal of Biological Chemistry* 266:15602-15607.
32. Flores, N., L. Leal, J. C. Sigala, R. de Anda, A. Escalante, A. Martinez, O. T. Ramirez, G. Gosset, and F. Bolivar. 2007. Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13:105-116.
33. Goedl, C., A. Schwarz, A. Minani, and B. Nidetzky. 2007. Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: Characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of  $\alpha$ -D-glucose 1-phosphate. *Journal of Biotechnology* 129:77-86.
34. Gorsich, S., B. Dien, N. Nichols, P. Slininger, Z. Liu, and C. Skory. 2006. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71:339-349.

35. Gräslund, S., P. Nordlund, J. Weigelt, B. M. Hallberg, J. Bray, O. Gileadi, S. Knapp, U. Oppermann, C. Arrowsmith, R. Hui, J. Ming, S. dhe-Paganon, H.-w. Park, S. Alexei, A. Yee, A. Edwards, R. Vincentelli, C. Cambillau, R. Kim, S.-H. Kim, Z. Rao, Y. Shi, T. C. Terwilliger, C.-Y. Kim, L.-W. Hung, G. S. Waldo, Y. Peleg, S. Albeck, T. Unger, O. Dym, J. Prilusky, J. L. Sussman, R. C. Stevens, S. A. Lesley, I. A. Wilson, A. Joachimiak, F. Collart, I. Dementieva, M. I. Donnelly, W. H. Eschenfeldt, Y. Kim, L. Stols, R. Wu, M. Zhou, S. K. Burley, J. S. Emtage, J. M. Sauder, D. Thompson, K. Bain, J. Luz, T. Gheyi, F. Zhang, S. Atwell, S. C. Almo, J. B. Bonanno, A. Fiser, S. Swaminathan, F. W. Studier, M. R. Chance, A. Sali, T. B. Acton, R. Xiao, L. Zhao, L. C. Ma, J. F. Hunt, L. Tong, K. Cunningham, M. Inouye, S. Anderson, H. Janjua, R. Shastry, C. K. Ho, D. Wang, H. Wang, M. Jiang, G. T. Montelione, D. I. Stuart, R. J. Owens, S. Daenke, A. Schütz, U. Heinemann, S. Yokoyama, K. Büssow, and K. C. Gunsalus. 2008. Protein production and purification. *Nature Methods* 5:135-146.
36. Hashimoto, H., A. Sakakibara, M. Yamasaki, and K. Yoda. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* VIG9 Encodes GDP-mannose Pyrophosphorylase, Which Is Essential for Protein Glycosylation. *Journal of Biological Chemistry* 272:16308-16314.
37. Hebert, C. G., J. J. Valdes, and W. E. Bentley. 2008. Beyond silencing -- engineering applications of RNA interference and antisense technology for altering cellular phenotype. *Current opinion in biotechnology* 19:500-505.
38. Heillisch, J., R. G. Ritzel, R. C. von Borstel, A. Aguilera, R. Rodicio, and F. K. Zimmermann. 1989. The phosphofructokinase genes of yeast evolved from two duplication events. *Gene* 78:309-321.
39. Heinisch, J. 1986. Isolation and characterization of the two structural genes coding for phosphofructokinase in yeast. *Molecular and General Genetics MGG* 202:75-82.
40. Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma, and H. P. Schweizer. 1998. A broad-host-range FLP-FRT recombination system for site-specific



excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77-86.

41. Ishihara, S., A. Hirata, S. Nogami, A. Beauvais, J.-P. Latge, and Y. Ohya. 2007. Homologous Subunits of 1,3-Beta-Glucan Synthase Are Important for Spore Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 6:143-156.
42. Keasling, J. D. 1999. Gene-expression tools for the metabolic engineering of bacteria. *Trends in Biotechnology* 17:452-460.
43. Kiino, D. R., R. Licudine, K. Wilt, D. H. Yang, and L. B. Rothman-Denes. 1993. A cytoplasmic protein, NfrC, is required for bacteriophage N4 adsorption. *Journal of Bacteriology* 175:7074-7080.
44. Kim, C., S. Song, and C. Park. 1997. The D-allose operon of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 179:7631-7637.
45. Kogure, T., N. Wakisaka, H. Takaku, and M. Takagi. 2007. Efficient production of 2-deoxy-scylo-inosose from D-glucose by metabolically engineered recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 129:502-509.
46. Kornberg, H. L. 2001. Routes for fructose utilization by *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3:355-359.
47. Kristensen, C. S., L. Eberl, J. M. Sanchez-Romero, M. Givskov, S. Molin, and V. De Lorenzo. 1995. Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *Journal of Bacteriology* 177:52-58.
48. Kuznetsova, E., M. Proudfoot, C. F. Gonzalez, G. Brown, M. V. Omelchenko, I. Borozan, L. Carmel, Y. I. Wolf, H. Mori, A. V. Savchenko, C. H. Arrowsmith, E. V. Koonin, A. M. Edwards, and A. F. Yakunin. 2006. Genome-wide Analysis of Substrate Specificities of the *Escherichia coli* Haloacid Dehalogenase-like Phosphatase Family. *Journal of Biological Chemistry* 281:36149-36161.
49. Lasserre, J.-P., E. Beyne, S. Pyndiah, D. Lapaillerie, S. Claverol, and M. Bonneu. 2006. A complexomic study of *Escherichia coli* using two-

- dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis 27:3306-3321.
50. Llull, D., E. Garcia, and R. Lopez. 2001. Tts, a Processive b-Glucosyltransferase of *Streptococcus pneumoniae*, Directs the Synthesis of the Branched Type 37 Capsular Polysaccharide in Pneumococcus and Other Gram-positive Species. Journal of Biological Chemistry 276:21053-21061.
  51. Lopez, F., M. Leube, R. Gil-Mascarell, J. P. Navarro-Aviñó, and R. Serrano. 1999. The yeast inositol monophosphatase is a lithium- and sodium-sensitive enzyme encoded by a non-essential gene pair. Molecular Microbiology 31:1255-1264.
  52. Maitra, U. S., and H. Ankel. 1973. The intermediate in the uridine diphosphate galactose 4-epimerase reaction: Resolution of an apparent ambiguity. Journal of Biological Chemistry 248:1477-1479.
  53. Markovitz, A., R. J. Sydiskis, and M. M. Lieberman. 1967. Genetic and biochemical studies on mannose-negative mutants that are deficient in phosphomannose isomerase in *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology 94:1492-1496.
  54. Marolda, C., L., and M. Valvano, A. . 1996. The GalF protein of *Escherichia coli* is not a UDP-glucose pyrophosphorylase but interacts with the GalU protein possibly to regulate cellular levels of UDP-glucose. Molecular Microbiology 22:827-840.
  55. Marquardt, J. L., E. D. Brown, C. T. Walsh, and K. S. Anderson. 1993. Isolation and structural elucidation of a tetrahedral intermediate in the UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvoyl transferase enzymic pathway. Journal of the American Chemical Society 115:10398-10399.
  56. Mazur, P., N. Morin, W. Baginsky, M. el-Sherbeini, J. Clemas, J. Nielsen, and F. Foor. 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. Mol. Cell. Biol. 15:5671-5681.
  57. Meijer, W. H., I. J. van der Klei, M. Veenhuis, and J. A. K. W. Kiel. 2007. ATG Genes Involved in Non-Selective Autophagy are Conserved from Yeast to

- Man, but the Selective Cvt and Pexophagy Pathways also Require Organism-Specific Genes. *Autophagy* 3:106-116.
58. Moretti, S., F. Armougom, I. M. Wallace, D. G. Higgins, C. V. Jongeneel, and C. Notredame. 2007. The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic Acids Research* 35:W645-W648.
  59. Mu, J., C. Cheng, and P. J. Roach. 1996. Initiation of Glycogen Synthesis in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 271:26554-26560.
  60. Müller, S., F. K. Zimmermann, and E. Boles. 1997. Mutant studies of phosphofructo-2-kinases do not reveal an essential role of fructose-2, 6-bisphosphat in the regulation of carbon fluxes in yeast cells. *Microbiology* 143:3055-3061.
  61. Murray, M., and M. L. Greenberg. 2000. Expression of yeast INM1 encoding inositol monophosphatase is regulated by inositol, carbon source and growth stage and is decreased by lithium and valproate. *Molecular Microbiology* 36:651-661.
  62. Nassau, P. M., S. L. Martin, R. E. Brown, A. Weston, D. Monsey, M. R. McNeil, and K. Duncan. 1996. Galactofuranose biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: identification and cloning of UDP-galactopyranose mutase. *Journal Of Bacteriology* 178:1047-1052.
  63. Neidhardt, F. C. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, D.C.
  64. Nogae, I., and M. Johnston. 1990. Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphat dehydrogenase. *Gene* 96:161-169.
  65. Novotny, M. J., J. Reizer, F. Esch, and M. H. Saier, Jr. 1984. Purification and properties of D-mannitol-1-phosphat dehydrogenase and D-glucitol-6-phosphat dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159:986-990.
  66. Oh, C.-S., D. A. Toke, S. Mandala, and C. E. Martin. 1997. ELO2 and ELO3, Homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 Gene, Function in Fatty

- Acid Elongation and Are Required for Sphingolipid Formation. *Journal of Biological Chemistry* 272:17376-17384.
67. Oriol, R., R. Mollicone, A. Cailleau, L. Balanzino, and C. Breton. 1999. Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria. *Glycobiology* 9:323-334.
  68. Persson, M., and M. M. Palcic. 2008. A high-throughput pH indicator assay for screening glycosyltransferase saturation mutagenesis libraries. *Analytical Biochemistry* 378:1-7.
  69. Porchia, A. C., and G. L. Salerno. 1996. Sucrose biosynthesis in a prokaryotic organism: Presence of two sucrose-phosphat synthases in *Anabaena* with remarkable differences compared with the plant-enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:13600-13604.
  70. Priem, B., M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, A. Heyraud, and E. Samain. 2002. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology* 12:235-240.
  71. Ramakrishnan, B., and P. K. Qasba. 2001. Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the [beta]1,4-galactosyltransferase-I. *Journal of Molecular Biology* 310:205-218.
  72. Ramakrishnan, B., P. S. Shah, and P. K. Qasba. 2001. a-Lactalbumin (LA) Stimulates Milk b-1,4-Galactosyltransferase I (b4Gal-T1) to Transfer Glucose from UDP-glucose to N-Acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry* 276:37665-37671.
  73. Rasmussen, L., H. Sperling-Petersen, and K. Mortensen. 2007. Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *Microbial Cell Factories* 6:24.
  74. Rider, M. H., L. Bertrand, D. Vertommen, P. A. Michels, G. G. Rousseau, and L. Hue. 2004. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal* 381:561-579.

75. Riitta, V., and V. Martti. 1995. Comparison of the phenotypes of the *lpxA* and *lpxD* mutants of *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters 134:227-232.
76. Rodriguez, A., T. De La Cera, P. Herrero, and F. Moreno. 2001. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 355:625-631.
77. Ruffing, A., and R. R. Chen. 2006. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. Microbial Cell Factories 5.
78. Rush, J. S., P. D. Rick, and C. J. Waechter. 1997. Polyisoprenyl phosphat specificity of UDP-GlcNAc:undecaprenyl phosphat N-acetylglucosaminyl 1-P transferase from *E.coli*. Glycobiology 7:315-322.
79. Sauer, B. 1987. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology 7:2087-2096.
80. Schweizer, H. P. 2003. Applications of the *Saccharomyces cerevisiae* Flp- FRT system in bacterial genetics. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 5:67-77.
81. Segawa, T., and T. Fukasawa. 1979. The enzymes of the galactose cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of galactose-1-phosphat uridylyltransferase. Journal of Biological Chemistry 254:10707-10709.
82. Sinnott, M. L. 1978. Ions, ion-pairs and catalysis by the lacZ b-galactosidase of *Escherichia coli*. FEBS Letters 94:1-9.
83. Smith, D. J., A. Proudfoot, L. Friedli, L. S. Klig, G. Paravicini, and M. A. Payton. 1992. PMI40, an intron-containing gene required for early steps in yeast mannosylation. Mol. Cell. Biol. 12:2924-2930.
84. Stagljar, I., S. te Heesen, and M. Aebi. 1994. New phenotype of mutations deficient in glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide: cloning of the ALG8 locus. Proceedings of the National Academy of Sciences 91:5977-5981.

85. Sternberg, N., D. Hamilton, and R. Hoess. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination : II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *Journal of Molecular Biology* 150:487-507.
86. Stevenson, G., K. Andrianopoulos, M. Hobbs, and P. R. Reeves. 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of Bacteriology* 178:4885-4893.
87. Stevenson, G., B. Neal, D. Liu, M. Hobbs, N. H. Packer, M. Batley, J. W. Redmond, L. Lindquist, and P. Reeves. 1994. Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *Journal of Bacteriology* 176:4144-4156.
88. Tallon, R., P. Bressollier, and M. C. Urdaci. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology* 154:705-712.
89. Taussig, R., and M. Carlson. 1983. Nucleotide sequence of The yeast SUC2 gene for invertase. *Nucleic Acids Research* 11:1943-1954.
90. Teste, M.-A., J. M. François, and J.-L. Parrou. 2010. Characterization of a New Multigene Family Encoding Isomaltases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the IMA Family. *Journal of Biological Chemistry* 285:26815-26824.
91. Thoden, J. B., and H. M. Holden. 2005. The Molecular Architecture of Galactose Mutarotase/UDP-Galactose 4-Epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 280:21900-21907.
92. Trinchera, M., and S. Bozzaro. 1996. *Dictyostelium* cytosolic fucosyltransferase synthesizes H type 1 trisaccharide *in vitro*. *FEBS Letters* 395:68-72.
93. Tsuda, M. 1998. Use of a transposon-encoded site-specific resolution system for construction of large and defined deletion mutations in bacterial chromosome. *Gene* 207:33-41.
94. Wang, J., E. D. Gilles, J. W. Lengeler, and K. Jahreis. 2001. Modeling of inducer exclusion and catabolite repression based on a PTS-dependent sucrose

- and non-PTS-dependent glycerol transport systems in *Escherichia coli* K-12 and its experimental verification. *Journal of Biotechnology* 92:133-158.
95. Watzele, G., and W. Tanner. 1989. Cloning of the glutamine:fructose-6-phosphat amidotransferase gene from yeast. Pheromonal regulation of its transcription. *Journal of Biological Chemistry* 264:8753-8758.
  96. Wedekind, J. E., P. A. Frey, and I. Rayment. 1996. The Structure of nucleotidylated histidine-166 of galactose-1-phosphat uridylyltransferase provides insight into phosphoryl group Transfer. *Biochemistry* 35:11560-11569.
  97. Weissborn, A. C., Q. Liu, M. K. Rumley, and E. P. Kennedy. 1994. UTP: alpha-D-glucose-1-phosphat uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the *galU* gene and purification of the enzyme. *Journal of Bacteriology* 176:2611-2618.
  98. Williams, J., J. Luke, and C. Hodgson. 2009. Strain engineering by genome mass transfer: Efficient chromosomal trait transfer method utilizing donor genomic DNA and recipient recombineering hosts. *Molecular Biotechnology* 43:41-51.
  99. Yamamoto, K., A. Nakayama, Y. Yamamoto, and S. Tabata. 2004. Val216 decides the substrate specificity of alpha-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 271:3414-3420.
  100. Zhang, J. B., P. Kowal, X. Chen, and P. G. Wang. 2003. Large-scale synthesis of globotriose derivatives through recombinant *E. coli*. *Organic & Biomolecular Chemistry* 1:3048-3053.
  101. Zhao, J., T. Baba, H. Mori, and K. Shimizu. 2004. Global metabolic response of *Escherichia coli* to *gnd* or *zwf* gene-knockout, based on <sup>13</sup>C-labeling experiments and the measurement of enzym activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:91-98.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa cho việc tạo ra fucosyllactoza, đặc trưng ở chỗ vi khuẩn này:

a) được biến đổi gen bằng cách đưa vào gen không tương đồng mã hóa sucroza phosphorylaza có khả năng cắt sucroza thành glucoza-1-phosphat và fructoza;

b) chứa fructokinaza để xúc tác sự chuyển hóa của fructoza thành fructoza-6-phosphat;

c) được biến đổi gen thêm để ngăn ngừa sự mất fructoza-6-phosphat thông qua đường phân do sự phá vỡ gen của gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza, phosphoglucoza isomeraza, hoặc tổ hợp của chúng; và

d) chứa các enzym sau đây chuyển hóa fructoza-6-phosphat đã nêu thành fucosyllactoza:

(i) manaza-6-phosphat isomeraza để xúc tác sự chuyển hóa của fructoza-6-phosphat thành manaza-6-phosphat;

(ii) phosphomanomutaza để xúc tác sự chuyển hóa của manaza-6-phosphat thành mannoza-1-phosphat;

(iii) manaza-1-phosphat guanylyltransferaza để xúc tác sự chuyển hóa của manaza-1-phosphat thành GDP-manoza;

(iv) GDP manaza dehydrataza để xúc tác sự chuyển hóa của GDP-manoza thành GDP-4-dehydro-6-deoxy-manoza;

(v) GDP fucoza synthaza để xúc tác sự chuyển hóa của GDP-4-dehydro-6-deoxy-manoza thành GDP-fucoza; và

(vi) fucosyltransferaza để xúc tác sự chuyển hóa của GDP-fucoza thành fucosyllactoza.

2. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa cho việc tạo ra fucosyllactoza, đặc trưng ở chỗ nấm men này:

a) được biến đổi gen bằng cách đưa vào gen không tương đồng mã hóa sucroza phosphorylaza có khả năng cắt sucroza thành glucoza-1-phosphat and fructoza;

b) chứa fructokinaza để xúc tác sự chuyển hóa của fructoza thành fructoza-6-phosphat;



c) được biến đổi gen thêm để ngăn ngừa sự mất fructoza-6-phosphat thông qua đường phân do sự phá vỡ gen của gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza, phosphoglucoza isomeraza, hoặc tổ hợp của chúng; và

d) chứa các enzym sau đây chuyển hóa fructoza-6-phosphat đã nêu thành fucosyllactoza:

(i) manaza-6-phosphat isomeraza để xúc tác sự chuyển hóa của fructoza-6-phosphat thành manaza-6-phosphat;

(ii) phosphomanomutaza để xúc tác sự chuyển hóa của manaza-6-phosphat thành mannoza-1-phosphat;

(iii) manaza-1-phosphat guanylyltransferaza để xúc tác sự chuyển hóa của manaza-1-phosphat thành GDP-manoza;

(iv) GDP manaza dehydrataza để xúc tác sự chuyển hóa của GDP-manoza thành GDP-4-dehydro-6-deoxy-manoza;

(v) GDP fucoza synthaza để xúc tác sự chuyển hóa của GDP-4-dehydro-6-deoxy-manoza thành GDP-fucoza; và

(vi) fucosyltransferaza để xúc tác sự chuyển hóa của GDP-fucoza thành fucosyllactoza.

3. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1 trong đó vi khuẩn này còn được tiếp tục biến đổi gen bằng cách đưa vào một hoặc nhiều gen không tương đồng mã hóa một hoặc nhiều enzym tăng cường sự chuyển hóa của fructoza-6-phosphat đã nêu thành fucosyllactoza đã nêu.

4. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2 trong đó nấm men này còn được tiếp tục biến đổi gen bằng cách đưa vào một hoặc nhiều gen không tương đồng mã hóa một hoặc nhiều enzym tăng cường sự chuyển hóa của fructoza-6-phosphat đã nêu thành fucosyllactoza đã nêu.

5. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó vi khuẩn này có khả năng sinh trưởng trên disacarit, oligosacarit, polysacarit hoặc hỗn hợp của chúng như là nguồn cacbon chủ yếu.

6. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó nấm men này có khả năng sinh trưởng trên disacarit, oligosacarit, polysacarit hoặc hỗn hợp của chúng như là nguồn cacbon chủ yếu.

7. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó vi khuẩn này là *Escherichia coli*.

8. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 3, trong đó một hoặc nhiều enzym mà được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen không tương đồng được chọn từ nhóm bao gồm: manosa-6-phosphat isomeraza, phosphomanomutaza, manosa-1-phosphat guanylyltransferaza, GDP manosa dehydrataza, GDP fucosa synthaza, và fucosyltransferaza có nguồn gốc từ sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm *Helicobacter pylori*, *Bacteroides* sp., *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos Taurus*, và *Dictyostelium discoideum*.

9. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 4, trong đó một hoặc nhiều enzym mà được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen không tương đồng được chọn từ nhóm bao gồm: manosa-6-phosphat isomeraza, phosphomanomutaza, manosa-1-phosphat guanylyltransferaza, GDP manosa dehydrataza, GDP fucosa synthaza, và fucosyltransferaza có nguồn gốc từ sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm *Helicobacter pylori*, *Bacteroides* sp., *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos Taurus*, và *Dictyostelium discoideum*.

10. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó sucroza phosphorylaza đã nêu là từ *Bifidobacterium adolescentis*.

11. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó sucroza phosphorylaza đã nêu là từ *Bifidobacterium adolescentis*.

12. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza bị phá vỡ.

13. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza bị phá vỡ.

14. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho gen nội sinh mã hóa phosphoglucoza isomeraza bị phá vỡ.
15. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho gen nội sinh mã hóa phosphoglucoza isomeraza bị phá vỡ.
16. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho một trong số gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza và gen nội sinh mã hóa phosphoglucoza isomeraza bị phá vỡ.
17. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho một trong số gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza và gen nội sinh mã hóa phosphoglucoza isomeraza bị phá vỡ.
18. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó nấm men này là *Saccharomyces cerevisiae*.
19. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó fucosyllactoza được chọn từ nhóm bao gồm 1,2-fucosyllactoza, 1,3-fucosyllactoza, 1,4-fucosyllactoza, 1,6-fucosyllactoza, và tổ hợp bất kỳ của chúng.
20. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó fucosyllactoza được chọn từ nhóm bao gồm 1,2-fucosyllactoza, 1,3-fucosyllactoza, 1,4-fucosyllactoza, 1,6-fucosyllactoza, và tổ hợp bất kỳ của chúng.
21. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó fucosyllactoza là 1,2-fucosyllactoza.
22. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó fucosyllactoza là 1,2-fucosyllactoza.
23. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó fucosyllactoza là 1,3-fucosyllactoza.
24. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó fucosyllactoza là 1,3-fucosyllactoza.

25. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó fucosyllactaza là 1,4-fucosyllactaza.
26. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó fucosyllactaza là 1,4-fucosyllactaza.
27. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó fucosyllactaza là 1,6-fucosyllactaza.
28. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó fucosyllactaza là 1,6-fucosyllactaza.
29. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1, trong đó phosphofructokinaza đã nêu xúc tác sự chuyển hóa của fructoza-6-phosphat thành fructoza-1,6-bisphosphat, và phosphoglucoza isomeraza đã nêu xúc tác sự chuyển hóa của fructoza-6-phosphat thành glucoza-6-phosphat.
30. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2, trong đó phosphofructokinaza đã nêu xúc tác sự chuyển hóa của fructoza-6-phosphat thành fructoza-1,6-bisphosphat, và phosphoglucoza isomeraza đã nêu xúc tác sự chuyển hóa của fructoza-6-phosphat thành glucoza-6-phosphat.
31. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 8, trong đó fucosyltransferaza có nguồn gốc từ *Helicobacter pylori*.
32. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 9, trong đó fucosyltransferaza có nguồn gốc từ *Helicobacter pylori*.
33. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 8, trong đó sucroza phosphorylaza đã nêu là từ *Bifidobacterium adolescentis*.
34. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 9, trong đó sucroza phosphorylaza đã nêu là từ *Bifidobacterium adolescentis*.
35. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 8, trong đó vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza bị phá vỡ.

36. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 9, trong đó nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza bị phá vỡ.

37. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 8, trong đó vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho gen nội sinh mã hóa phosphoglucoza isomeraza bị phá vỡ.

38. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 9, trong đó nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho gen nội sinh mã hóa phosphoglucoza isomeraza bị phá vỡ.

39. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 8, trong đó vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho một trong số gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza và gen nội sinh mã hóa phosphoglucoza isomeraza bị phá vỡ.

40. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 9, trong đó nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa này được biến đổi gen sao cho một trong số gen nội sinh mã hóa phosphofructokinaza và gen nội sinh mã hóa phosphoglucoza isomeraza bị phá vỡ.

41. Vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 8, trong đó vi khuẩn này là *Escherichia coli*.

42. Nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 9, trong đó nấm men này là *Saccharomyces cerevisiae*.

43. Phương pháp tạo ra fucosyllactoza, phương pháp này bao gồm các bước:

i) nuôi cấy vi khuẩn được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 1 hoặc nấm men được cải biến về mặt chuyển hóa theo điểm 2; và

ii) chiết và tinh sạch fucosyllactoza.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Inbiose N.V.

<120> VI KHUẨN HOẶC NẤM MEN ĐƯỢC CẢI BIẾN VỀ MẶT CHUYỂN HÓA CHO VIỆC  
TẠO RA FUCOSYLLACTOZA VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA FUCOSYLLACTOZA

<130> UG-042-PCT

<140> PCT/EP2011/061891

<141> 2011-07-12

<150> EP10169304.2

<151> 2010-07-12

<160> 54

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 768

<212> PRT

<213> *Dictyostellium discoideum*

<400> 1

Met Asn Asp Ser Pro Ile Ile Ser Val Val Leu Pro Phe Leu Ile Lys  
1 5 10 15

Asp Asn Asp Asp Lys Ser Leu Asn Tyr Gln Gly Ile Asn Asn Leu Ile  
20 25 30

Ile Ser Ile Asp Ser Ile Ile Glu Gln Thr Phe Lys Glu Trp Glu Leu  
35 40 45

Ile Leu Val Asp Asp Gly Ser Asn Asn Glu Ile Leu Glu Gln Leu Leu  
50 55 60

Ser Lys Arg Tyr Ser Thr Asp Asn Arg Ile Lys Phe Ile Ile Asn Lys  
65 70 75 80

Glu Asn Lys Gly Ile Val Lys Ser Leu Asn Asp Ala Ile Leu Asn His  
85 90 95

Cys Ser Pro Thr Ser Lys Tyr Ile Ala Arg Met Asp Ser Asp Asp Ile  
100 105 110

Ser His Pro Thr Arg Leu Gln Ser Gln Leu Lys Tyr Leu Gln Ser Asn  
115 120 125

Glu Thr Ile Asp Ile Leu Gly Cys Pro Ile Lys Met Phe Asn Asn Asn,  
130 135 140

Lys Leu Ile Glu Ile Leu Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ile Asn  
145 150 155 160

Asn Asn Val Lys Glu Leu Ile Asn Ile Ile Asn Asn Glu Glu Ser Phe  
165 170 175

Lys Phe Ile Gln His Pro Asp Lys Asp Ile Leu Met Trp Ser Met Phe  
180 185 190

Phe Asn Cys Cys Ile Val His Pro Ser Val Ile Phe Lys Arg Ser Ile  
195 200 205

Phe Thr Ile Glu His Cys Tyr Glu Glu Asn Asn Gln Phe Pro Phe Ile  
210 215 220

Glu Asp Tyr Leu Phe Trp Leu Lys Ser Leu Ile Met Lys Gly Leu Asn  
225 230 235 240

Ile Ser Asn Ile Gln Ser Ser Thr Pro Leu Leu Tyr Leu Arg Lys His  
245 250 255

Asn Asn Ser Ile Ser Phe Lys Asn Ile Glu Lys Gln Lys Asp Ser Thr  
260 265 270

Ala Asn Ala Ser Cys Tyr Tyr Leu Asn Ile Leu Phe Lys Arg Phe Asn  
275 280 285

Ile Asp Ser Glu Ile Ile Gln Asn Ser Ser Leu Ser Met Lys Glu Ile  
290 295 300

Ile Gln Phe Phe Gln Leu Ser Pro Ser Ser Leu Ser Lys Ile Asn Asn  
305 310 315 320

Ile Ser Ile Glu Leu Phe Glu Phe Ala Phe Lys Tyr Leu Glu Leu Ile  
325 330 335

Glu Lys Ser Cys Thr Lys Gln Gln Pro Asn Tyr Ser Asn Ser Ile Lys  
340 345 350

Asp Ala Ala Asn Glu Lys Met Gly Glu Leu Val Ser Leu Cys Leu Ser  
355 360 365

Asn Tyr Pro Asn Asn Gln Lys Ser Ser Leu Leu Trp Glu Lys Trp Leu  
370 375 380

Ser Arg Asn Pro Thr Ser Gln Leu Leu Ser Leu Leu Ser Asn Leu Asn  
385 390 395 400

Val Lys Ser Ser Thr Thr Ile Ile Asn Asn Asn Ile Asn Asn Asn Asn  
405 410 415

Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn  
420 425 430

Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Ile Leu Asn Phe Ile Ser Gly  
435 440 445

Ile Asn Ser Asn Lys Ile Asn Thr Pro Lys Ser Asn Asn Asn Lys Phe  
450 455 460

Lys Glu Asn Gly Ile Arg Ile Ile Cys Phe Ser Lys Asp Arg Ala Phe  
465 470 475 480

Gln Leu Lys Glu Tyr Leu Arg Thr Phe Phe Lys Tyr Leu Lys Asn Asp  
485 490 495

Asp Asn Gly Asn Asp Lys Phe Glu Ile Ile Val Asp Val Leu Phe Thr  
500 505 510

Tyr Ser Asn Glu Lys Phe Lys Asn Ser Tyr Gln Leu Val Ile Glu Ser  
515 520 525

Phe Pro Gln Val Asn Phe Ile Lys Glu Glu Asn Phe Thr Asp Gln Leu  
530 535 540

Ile Asn Leu Val Gln Lys Thr Asn Lys Leu Glu Tyr Val Met Phe Ser  
545 550 555 560

Val Asp Asp Ile Leu Tyr Tyr Asn Glu Phe Asn Leu Lys Glu Tyr Cys  
565 570 575

Leu Ser Leu Asn Ser Glu Pro Leu Ala Leu Gly Phe Tyr Met Lys Leu  
580 585 590

Asn Lys Asn Ile Thr Tyr Cys His Thr Cys Asn Gln Asp Ile Thr Ile  
595 600 605

Pro Leu Asn Ser Asn Thr Ile Ser Arg Thr Glu Asn Asn Phe Lys Tyr  
610 615 620

Leu Lys Trp Asn Arg Asn Asp Asn Asp Cys Lys Lys Asp Trp Asn Tyr



|                                                                 |  |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| 625                                                             |  | 630 |     | 635 |     | 640 |
| Pro Trp Asp Leu Cys Ser Thr Ile Tyr Arg Cys Asn Asp Ile Asp Ser |  |     |     |     |     |     |
|                                                                 |  | 645 |     | 650 |     | 655 |
|                                                                 |  |     |     |     |     |     |
| Ile Ile Asn Gly Ile Val Lys Tyr Tyr Gly Ile Arg Asn Gly Ile Asn |  |     |     |     |     |     |
|                                                                 |  | 660 |     | 665 |     | 670 |
|                                                                 |  |     |     |     |     |     |
| His Pro Asn Arg Phe Glu Phe Asn Gly Asn Arg Pro Ile Ile Gln Lys |  |     |     |     |     |     |
|                                                                 |  | 675 |     | 680 |     | 685 |
|                                                                 |  |     |     |     |     |     |
| Gln Ile Tyr Gln Asn Lys Pro Tyr Cys Leu Cys Leu Ser Asp His Tyr |  |     |     |     |     |     |
|                                                                 |  | 690 |     | 695 |     | 700 |
|                                                                 |  |     |     |     |     |     |
| Ser Pro Met Ser Val Val Thr Ile Asn Arg Val Gln Asp Val Tyr Asp |  |     |     |     |     |     |
| 705                                                             |  |     | 710 |     | 715 | 720 |
|                                                                 |  |     |     |     |     |     |
| Asn Pro Ile Tyr Asp Gln Thr Leu Ser Leu Asp Asp Leu Asp Gln Leu |  |     |     |     |     |     |
|                                                                 |  | 725 |     | 730 |     | 735 |
|                                                                 |  |     |     |     |     |     |
| Leu Tyr Ser Asn Lys Ser Leu Asn Asp Glu Lys Tyr Lys Glu Asn Ser |  |     |     |     |     |     |
|                                                                 |  | 740 |     | 745 |     | 750 |
|                                                                 |  |     |     |     |     |     |
| Leu Ser Leu Asn Phe Lys Ser Val His Ile Gly Glu Leu Phe Ile Ser |  |     |     |     |     |     |
|                                                                 |  | 755 |     | 760 |     | 765 |

<210>     2

<211>     2307

<212>     ADN

<213>     Trình tự nhân tạo

<220>

<223>     Trình tự được tối ưu hóa codon mã hóa SEQ ID NO 1

<400>     2

```
atgaacgata gcccgattat tagcgttggt ctgccgtttc tgatcaaaga taacgatgat
60

aaaagcctga actaccaggg cattaacaac ctgattatta gcatcgatag catcatcgag
120

cagaccttta aagaatggga actgattctg gttgatgatg gcagcaataa cgaaattctg
180

gaacagctgc tgagcaaacg ttatagcacc gataaccgca tcaaatttat tattaataaa
240

gaaaataaag gcattgtgaa aagcctgaat gatgccattc tgaatcattg tagcccgacc
300

agcaaataata ttgcacgtat ggatagcgac gatattagcc atccgacccg tctgcagago
360
```

cagctgaaat atctgcagag caatgaaacc attgatattc tgggttgccc gatcaaaatg  
420

tttaataata ataaactgat tgaaattctg aataataata acaataacaa caatattaat  
480

aataatgtga aagaactgat taatattatt aataatgaag aaagctttaa atttattcag  
540

catccggata aagatattct gatgtggtcc atgttcttca attgctgtat tgttcatccg  
600

agcgtgattt ttaaacgcag cttttttacc atcgagcact gctatgaaga gaataatcag  
660

tttccgttca tcgaggatta cctgttttgg ctgaaatccc tgattatgaa aggctgaac  
720

attagcaata tccagagcag cacaccgctg ctgtatctgc gtaaacataa taacagcatt  
780

agctttaaaa atattgaaaa acagaaagat agcaccgccca atgccagctg ttattatctg  
840

aacattctgt tcaaacgctt taacatcgac agcgaaatta ttcagaatag cagcctgagc  
900

atgaaagaaa tcatccagtt ttttcagctg agcccgagca gcctgtccaa aattaataac  
960

attagcatcg aactgtttga atttgccttt aaatatctgg aactgatcga gaaaagctgt  
1020

accaaacagc agccgaatta tagcaacagc attaaagatg cagccaacga aaaaatgggt  
1080

gaactggta gcctgtgtct gagcaattat ccgaataatc agaaaagcag tctgctgtgg  
1140

gaaaaatggc tgagccgtaa tccgaccagc cagctgctga gtctgctgag caatctgaat  
1200

gttaaaagca gcaccacat tattaataac aatattaaca acaacaataa taataacaac  
1260

aataataaca ataacaataa caataataac aacaacaaca ataataataa taacaacaac  
1320

agcattctga attttattag cggcattaat agcaataaaa ttaatacccc gaaaagcaac  
1380

aataacaaat ttaaagagaa tggcattcgc attatttgct tcagcaaaga tcgtgcattc  
1440

cagctgaaag aatatctgcg caccttcttc aaatatctga aaaatgatga taatggcaat  
1500

gataaatttg aaattattgt ggatgtgctg tttaacctata gcaatgaaaa attcaaaaat  
1560

agctatcagc tggatgatcga aagctttccg cagggttaact ttattaaaga agaaaacttt  
1620

accgatcagc tgattaacct ggtgcagaaa accaacaac tggaatatgt gatgttcagc  
1680

gtggatgata tcctgtatta caacgagttc aatctgaaag agtattgcct gagcctgaat  
1740

agcgaaccgc tggcactggg tttttatatg aaactgaata aaaatattac ctattgccat  
1800

acctgcaacc aggatattac cattccgctg aatagcaata ccattagccg caccgaaaat  
1860

aactttaaat acctgaaatg gaatcgcaac gataatgatt gcaaaaaaga ctggaactat  
1920

ccgtgggatc tgtgtagcac cttttatcgt tgcaacgaca ttgacagcat cattaatggt  
1980

attgtgaaat attatggtat tcgcaacggc attaatcatc cgaatcgctt tgaatttaat  
2040

ggcaaccgtc cgattattca gaaacaaatc taccagaaca aaccgtattg tctgtgcctg  
2100

agcgatcatt attcaccgat gagcgttggt accattaatc gtgttcagga tgtgtatgat  
2160

aacccgattt atgatcagac cctgagcctg gatgatctgg atcaactgct gtatagcaat  
2220

aatccctga acgatgaaaa atataaagaa aacagcctga gtctgaactt caaaagcgtt  
2280

catattggcg aactgttcat cagctaa  
2307

<210> 3

<211> 2307

<212> ADN

<213> *Dictyostellium discoideum*

<400> 3

atgaatgatt caccaataat aagtgtagtt ttaccttttt taataaagga caatgacgat  
60

aatcattaa attaccaagg aataaataat ttaataatat caatagatag cattattgaa  
120

caaactttta aagaatggga attaatttta gttgatgatg gatcaaataa tgaaattttg  
180

gagcaattac tttcaaaaag atatagtaca gataatagaa ttaaattcat aataaataaa  
240

gagaataaag gtattgttaa aagtttaaat gatgcaattt taaatcattg ttcaccaact  
300

tcaaaatata ttgctcgtat ggattcagat gatatttctc atccaacaag attacaatct  
360

caacttaa atcttcaatc aaatgaaaca attgatatat taggttgtcc aattaaatg  
420

tttaataata ataaattaat tgaaatttta aataataata ataataataa taatattaat  
480

aataatgtga aagagttaat taatataatt aataatgaag aatcttttaa atttattcaa  
540

catcctgata aagatatttt aatgtggta atgtttttca attgttgtat tgttcaccct  
600

tctgtaatat ttaaaagatc gatattcact attgaacatt gttatgaaga aaacaaccaa  
660

tttccattca ttgaagatta cttattttgg ttaaaatcct taataatgaa aggtttaaat  
720

atttcaaata tccaatcatc aacaccatta ctatatttaa gaaaacataa taactctata  
780

tcttttaaaa atattgaaaa acaaaaagat tccactgcta atgcatcttg ttattatcta  
840

aatatacttt ttaaaagatt taatattgat tctgaaatta ttcaaaattc ttcactctca  
900

atgaaagaaa ttattcagtt ctttcaactt tcaccatcat ctttatcaaa aatcaataat  
960

atttcaattg aattatttga atttgcattt aaatatctag aattaattga aaaatcatgt  
1020

acaaaacaac aaccaaacta ttcaaacagt ataaaagatg cagcaaatga aaaaatgggt  
1080

gaattagtat ctttatgttt atcaaattat ccaaataatc aaaaatcatc attactttgg  
1140

gaaaaatgggt tatcaagaaa tccaacctca caattactat cacttttctc aaatttaa  
1200

gtaaaatctt caactactat aattaataat aatattaata ataataataa taataataat  
1260

aataataata ataataataa taataataat aataataata ataataataa taataataat  
1320

tcaattttta attttatatc tggcattaat agtaataaaa taaatactcc aaaatcta  
1380

aataataaat ttaaagaaaa tggaattaga ataatttggt tctcaaaaga tagagcattt  
1440

caattaaaag aatatcttag aacatttttt aaatatttaa aaaatgatga taatggaaat  
1500

gataaatttg aaattattgt tgatgtatta ttacatatt caaatgagaa attcaaaaac  
1560

tcttatcaat tagttattga aagttttcca caagttaatt ttattaaaga agagaatttc  
1620

actgatcaat taattaattt agttcaaaaa acaaataaac ttgaatatgt catgttttca  
1680

gttgatgata ttctttatta taatgaattc aatctcaaag aatattgttt atctttgaat  
1740

agtgagccat tggcattagg tttctatatg aagttaaata aaaatattac ctattgtcat  
1800

acttgtaatc aagatataac aataccatta aattcaaata ctattagtag aacagagaat  
1860

aattttaaat atttaaaatg gaatagaaat gataatgatt gtaaaaagga ttggaattat  
1920

ccatgggatt tatgttcaac catttataga tgtaatgata ttgattcaat cattaatggg  
1980

atagttaaat attatggaat tagaaatggg attaatcatc caaatagatt cgaattcaat  
2040

ggtaatagac caatcattca aaagcaaatc tatcaaaaata aaccctactg tttatgttta  
2100

tcagatcact attctccaat gtctgttgta actattaata gagttcaaga tgtctatgat  
2160

aatccaattt atgaccaaac cctatcttta gatgatttag atcaattact ttattcaaac  
2220

aaatcattaa atgatgaaaa atataaagaa aatagtttat ctttaaattt taaaagtgtt  
2280

catattggtg aactttttat ttcttaa  
2307

<210> 4

<211> 329

<212> PRT

<213> *Dictyostellium discoideum*

<400> 4

Met Ser Ile Leu Asn Phe Ile Ser Gly Ile Asn Ser Asn Lys Ile Asn  
1 5 10 15

Thr Pro Lys Ser Asn Asn Asn Lys Phe Lys Glu Asn Gly Ile Arg Ile  
20 25 30

Ile Cys Phe Ser Lys Asp Arg Ala Phe Gln Leu Lys Glu Tyr Leu Arg  
35 40 45

Thr Phe Phe Lys Tyr Leu Lys Asn Asp Asp Asn Gly Asn Asp Lys Phe  
 50 55 60

Glu Ile Ile Val Asp Val Leu Phe Thr Tyr Ser Asn Glu Lys Phe Lys  
 65 70 75 80

Asn Ser Tyr Gln Leu Val Ile Glu Ser Phe Pro Gln Val Asn Phe Ile  
 85 90 95

Lys Glu Glu Asn Phe Thr Asp Gln Leu Ile Asn Leu Val Gln Lys Thr  
 100 105 110

Asn Lys Leu Glu Tyr Val Met Phe Ser Val Asp Asp Ile Leu Tyr Tyr  
 115 120 125

Asn Glu Phe Asn Leu Lys Glu Tyr Cys Leu Ser Leu Asn Ser Glu Pro  
 130 135 140

Leu Ala Leu Gly Phe Tyr Met Lys Leu Asn Lys Asn Ile Thr Tyr Cys  
 145 150 155 160

His Thr Cys Asn Gln Asp Ile Thr Ile Pro Leu Asn Ser Asn Thr Ile  
 165 170 175

Ser Arg Thr Glu Asn Asn Phe Lys Tyr Leu Lys Trp Asn Arg Asn Asp  
 180 185 190

Asn Asp Cys Lys Lys Asp Trp Asn Tyr Pro Trp Asp Leu Cys Ser Thr  
 195 200 205

Ile Tyr Arg Cys Asn Asp Ile Asp Ser Ile Ile Asn Gly Ile Val Lys  
 210 215 220

Tyr Tyr Gly Ile Arg Asn Gly Ile Asn His Pro Asn Arg Phe Glu Phe  
 225 230 235 240

Asn Gly Asn Arg Pro Ile Ile Gln Lys Gln Ile Tyr Gln Asn Lys Pro  
 245 250 255

Tyr Cys Leu Cys Leu Ser Asp His Tyr Ser Pro Met Ser Val Val Thr  
 260 265 270

Ile Asn Arg Val Gln Asp Val Tyr Asp Asn Pro Ile Tyr Asp Gln Thr  
 275 280 285

Leu Ser Leu Asp Asp Leu Asp Gln Leu Leu Tyr Ser Asn Lys Ser Leu  
 290 295 300

Asn Asp Glu Lys Tyr Lys Glu Asn Ser Leu Ser Leu Asn Phe Lys Ser  
 305 310 315 320

Val His Ile Gly Glu Leu Phe Ile Ser  
 325

<210> 5

<211> 990

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tối ưu hóa codon mã hóa một phần của SEQ ID NO 2

<400> 5

atgagcattc tgaattttat tagcggcatt aatagcaata aaattaatac cccgaaaagc  
 60

aacaataaca aatttaaaga gaatggcatt cgcattatct gcttcagcaa agatcgtgca  
 120

ttccagctga aagaatatct gcgcaccttc ttcaaatact tgaaaaatga tgataatggc  
 180

aatgataaat ttgaaattat tgtggatgtg ctgtttacct atagcaatga aaaattcaaa  
 240

aatagctatc agctgggtgat cgaaagcttt ccgcagggtta actttattaa agaagaaaac  
 300

tttaccgatc agctgattaa cctgggtgcag aaaaccaaca aactggaata tgtgatgttc  
 360

agcgtggatg atatcctgta ttacaacgag ttcaatctga aagagtattg cctgagcctg  
 420

aatagcgaac cgctggcact gggtttttat atgaaactga ataaaaatat tacctattgc  
 480

catacctgca accaggatat taccattccg ctgaatagca ataccattag ccgcaccgaa  
 540

aataacttta aatacctgaa atggaatcgc aacgataatg attgcaaaaa agactggaac  
 600

tatccgtggg atctgtgtag caccatttat cgttgcaacg acattgacag catcattaat  
 660

gggtattgtga aatattatgg tattcgcaac ggcattaatc atccgaatcg ctttgaattt  
 720

aatggcaacc gtccgattat tcagaaacaa atctaccaga acaaaccgta ttgtctgtgc  
 780

ctgagcgatc attattcacc gatgagcgtt gttaccatta atcgtgttca ggatgtgtat  
840

gataacccga tttatgatca gaccctgagc ctggatgatc tggatcaact gctgtatagc  
900

aataaatccc tgaacgatga aaaatataaa gaaaacagcc tgagtctgaa cttcaaaagc  
960

gttcatattg gcgaactgtt catcagctaa  
990

<210> 6

<211> 987

<212> ADN

<213> *Dictyostellium discoideum*

<400> 6

tcaattttta attttatatc tggcattaat agtaataaaa taaataactcc aaaatcta  
60

aataataaat ttaaagaaaa tggattaga ataatttgtt tctcaaaaga tagagcattt  
120

caattaaaag aatatcttag aacatttttt aaatatttaa aaaatgatga taatggaaat  
180

gataaatttg aaattattgt tgatgtatta tttacatatt caaatgagaa attcaaaaac  
240

tcttatcaat tagttattga aagttttcca caagttaatt ttattaaaga agagaatttc  
300

actgatcaat taattaattt agttcaaaaa acaaataaac ttgaatatgt catgttttca  
360

gttgatgata ttctttatta taatgaattc aatctcaaag aatattgttt atctttgaat  
420

agtgagccat tggcattagg tttctatatg aagttaaata aaaatattac ctattgtcat  
480

acttgtaatc aagatataac aataccatta aattcaaata ctattagtag aacagagaat  
540

aattttaaat atttaaaatg gaatagaaat gataatgatt gtaaaaagga ttggaattat  
600

ccatgggatt tatgttcaac catttataga tgtaatgata ttgattcaat cattaatgg  
660

atagttaaatt attatggaat tagaaatggg attaatcatc caaatagatt cgaattcaat  
720

ggtaatagac caatcattca aaagcaaac tatcaaaaata aaccctactg tttatgttta  
780

tcagatcact attctccaat gtctgttgta actattaata gagttcaaga tgtctatgat  
840



aatccaattt atgaccaaac cctatcttta gatgatttag atcaattact ttattcaaac  
900

aaatcattaa atgatgaaaa atataaagaa aatagtttat ctttaaattt taaaagtgtt  
960

catattggtg aactttttat ttcttaa  
987

<210> 7  
<211> 74  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mọi

<400> 7  
cataatggat ttccttacgc gaaatacggg cagacatggc ctgcccggtt attagtgtag  
60

gctggagctg cttc  
74

<210> 8  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mọi

<400> 8  
gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tcatatgaat  
60

atcctcctta g  
71

<210> 9  
<211> 75  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mọi

<400> 9  
agaccgccgg ttttaagcag cggaacatc tctgaacata catgtaaac ctgcagtgtg  
60

ggctggagct gcttc  
75

<210> 10  
<211> 82  
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi

<400> 10

gtctggcagg gacctgcaca cggattgtgt gtgttccaga gatgataaaa aaggagttag  
60

tccatatgaa taccctcctt ag  
82

<210> 11

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi

<400> 11

catatttctg tcacactctt tagtgattga taacaaaaga ggtgccagga gtgtaggctg  
60

gagctgcttc  
70

<210> 12

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi

<400> 12

taaaaacgtt taaccagcga ctccccgct tctcgcgggg gagttttctg catatgaata  
60

tcctccttag  
70

<210> 13

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi

<400> 13

ggcgctacaa tcttccaaag tcacaattct caaaatcaga agagtattgc gtgtaggctg  
60

gagctgcttc  
70

<210> 14  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Mối

<400> 14  
 ggttgccgga tgcggcgtga acgccttatc cggcctacat atcgacgatg catatgaata  
 60

tcctccttag  
 70

<210> 15  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Mối

<400> 15  
 gacttccggc aacagatttc attttgcatt ccaaagttca gaggtagtcg tgtaggctgg  
 60

agctgcttc  
 69

<210> 16  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Mối

<400> 16  
 gcttctgtca tcggtttcag ggtaaaggaa tctgcctttt tccgaaatcc atatgaatat  
 60

cctccttag  
 69

<210> 17  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Mối

<400> 17  
 cactttccgc tgattcgggtg ccagactgaa atcagcctat aggaggaaat ggtgtaggct  
 60

ggagctgctt c  
71

<210> 18  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 18  
gttgccgaca gggtggtgat gattccccca atgctggggg aatgtttttg catatgaata  
60

tcctccttag  
70

<210> 19  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 19  
tgagaagggtt tgcggaacta tctaaaacgt tgcagacaaa ggacaaagca gtgtaggctg  
60

gagctgcttc  
70

<210> 20  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 20  
catacgtaaa aaagggcgat cttgcgaccg cccttttttt attaaatgtg tcatatgaat  
60

atcctcctta g  
71

<210> 21  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 21

tgagaagggtt tgcggaacta tctaaaacgt tgcagacaaa ggacaaagca acgaaaggct  
60

cagtcgaaag  
70

<210> 22  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 22  
catacgtaaa aaagggcgat cttgcgaccg cccttttttt attaaatgtg tagaaactcca  
60

gcatgagatc c  
71

<210> 23  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 23  
tgagaagggtt tgcggaacta tctaaaacgt tgcagacaaa ggacaaagca gtgtaggctg  
60

gagctgcttc  
70

<210> 24  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 24  
catacgtaaa aaagggcgat cttgcgaccg cccttttttt attaaatgtg tcatccgtca  
60

ggatggcctt c  
71

<210> 25  
<211> 72  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi

<400> 25

gccacgctg agaacgtaaa aaaagcacc atactcagga gcactctcaa ttgtgtaggc  
60

tggagctgct tc  
72

<210> 26

<211> 75

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi

<400> 26

cacctgtaaa aaaggcagcc atctggctgc cttagtctcc ccaacgtctt acggacatat  
60

gaatatcctc cttag  
75

<210> 27

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi

<400> 27

cgagaaggcc cggattgtca tggacgatga gatacaccgg aatatcatgg gtgtaggctg  
60

gagctgcttc  
70

<210> 28

<211> 76

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi

<400> 28

ccaggatatt acagtgtgag aaagaattat tttagacttta gcggagcagt tgaagacata  
60

tgaatatcct cttag  
76

<210> 29

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mọi

<400> 29

atatccagcc agtcttccgg ctgtagtcct aacagagcac tgttactgtc agcattacac  
60

gtcttgagcg

70

<210> 30

<211> 70

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mọi

<400> 30

gctttaagtg gttgagatca catttccttg ctcattccccg caactcctcc catatgaata  
60

tcctccttag

70

<210> 31

<211> 68

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mọi

<400> 31

atatccagcc agtcttccgg ctgtagtcct aacagagcac tgttactgtc gtaaaacgac  
60

ggccagtg

68

<210> 32

<211> 72

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mọi

<400> 32

caacggccat tttttgcact tagatacaga ttttctgcgc tgtattgcat tgccgggcatc  
60

cgatgcatat gg

72

<210> 33  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Mồi

<400> 33  
 tttttattttg cccttcaatg ggaccgctac caaacatcag gaggatgaat gaaacagcat  
 60

tacacgtctt gagcg  
 75

<210> 34  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Mồi

<400> 34  
 ttccgttgaa ggcaacagta attgcgcccc ggttaagccc gcgccgatcc catatgaata  
 60

tcctccttag  
 70

<210> 35  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Mồi

<400> 35  
 gtagcattgt tcctaagtat gactccattt ttccaggaat ggtcgcaaatt cgtgtaggct  
 60

ggagctgctt c  
 71

<210> 36  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Mồi

<400> 36  
 ttcacgccgc atccggcaag caaaccagct cataagccgg gagaacaacc catatgaata  
 60



tcctccttag  
70

<210> 37  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 37  
ttcacgccgc atccggcaag caaaccagct cataagccgg gagaacaacc ccgcttacag  
60

acaagctgtg  
70

<210> 38  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 38  
gtagcattgt tcctaagtat gactccattt ttccaggaat ggtcgcaaatt cagccatgac  
60

ccgggaatta c  
71

<210> 39  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 39  
atcgccgacc acttcgcgcc gctgatggtt ttttcacgta agtcatatc ccgcttacag  
60

acaagctgtg  
70

<210> 40  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 40

ggatcttccc ttacccact gcgggtaagg ggctaataac aggaacaacg agccatgacc  
60

cggaattac  
70

<210> 41  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 41  
gggggcccc ggggtatga gcttacgtga aaaaaccatc ag  
42

<210> 42  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 42  
ggggcgggc ccgggcgttg ttcctgttat tagccctta ccc  
43

<210> 43  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 43  
atgccgacc acttcgcgcc gctgatggtt ttttcacgta agctcatatc gtgtaggctg  
60

gagctgcttc  
70

<210> 44  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 44  
ggatcttccc ttacccact gcgggtaagg ggctaataac aggaacaacg catatgaata  
60

tcctccttag  
70

<210> 45  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mỗi

<400> 45  
ttttgatatc gaaccagacg ctccattcgc ggatgtactc aaggtcgaac gtgtaggctg  
60

gagctgcttc  
70

<210> 46  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mỗi

<400> 46  
tctatgggtgc aacgcttttc agatatcacc atcatgtttg ccggactatg catatgaata  
60

tcctccttag  
70

<210> 47  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mỗi

<400> 47  
tagccaaatg cgttggcaaa cagagattgt gttttttctt tcagactcat ctttgtttcc  
60

tccgaattcg  
70

<210> 48  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mỗi

<400> 48

cggttcgacg catgcaggca tgaaccgcg tcttttttca gataaaaagc catatgaata  
60

tcctccttag  
70

<210> 49  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 49  
accaatcaaa ttcacgcggc caggcgcctg aatggtgtga gtggcagggt agccaaatgc  
60

gttggcaaac  
70

<210> 50  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Mối

<400> 50  
gtcggtagtg ctgaccttg cggaggcggc cttagcacc tctccggcca acggttcgac  
60

gcatgcaggc  
70

<210> 51  
<211> 1841  
<212> ADN  
<213> *Escherichia coli*

<400> 51  
agcatgatcg aacacatcat gcagtcgatg caattcccgg cggaattgat tgagaagggt  
60

tgcggaacta tctaaaacgt tgcagacaaa ggacaaagca atggcaatcc acaatcgtgc  
120

aggccaacct gcacaacaga gtgatttgat taacgtcgcc caactgacgg cgcaatatta  
180

tgtactgaaa ccagaagcag ggaatgcgga gcacgcggtg aaattcggta cttccggtca  
240

ccgtggcagt gcagcgcgcc acagctttaa cgagccgcac attctggcga tcgctcaggc  
300

aattgctgaa gaacgtgcga aaaacggcat cactggccct tgctatgtgg gtaaagatac  
360

tcacgccctg tccgaacctg cattcatttc cgttctggaa gtgctggcag cgaacggcgt  
420

tgatgtcatt gtgcaggaaa acaatggctt cccccgacg cctgccgttt ccaatgccat  
480

cctggttcac aataaaaaag gtggcccgtt ggcagacggt atcgtgatta caccgtccca  
540

taacccgccg gaagatgggtg gaatcaaata caatccgcc aatgggtggcc cggctgatac  
600

caacgtcact aaagtgggtg aagacagggc caacgcactg ctggccgatg gcctgaaagg  
660

cgtgaagcgt atctccctcg acgaagcgat ggcattccgt catgtgaaag agcaggatct  
720

ggtgcagccg ttcgtggaag gtctggccga tatcgttgat atggccgcga ttcagaaagc  
780

gggcctgacg ctgggcgttg atccgctggg cggttccggt atcgaatact ggaagcgtat  
840

tggcgagtat tacaacctca acctgactat cgttaacgat caggtcgatc aaaccttccg  
900

ctttatgcac cttgataaag acggcgcgat ccgtatggac tgctcctccg agtgtgcgat  
960

ggcgggcctg ctggcactgc gtgataagtt cgatctggcg ttgctaacg acccgatta  
1020

tgaccgtcac ggtatcgta ctccggcagg tttgatgaat ccgaaccact acctggcggt  
1080

ggcaatcaat tacctgttcc agcatcgacc gcagtggggc aaagatgttg ccgtcggtaa  
1140

aacgtgggtt tcattctgca tgatcgaccg tgtgggtcaac gacttgggac gtaaactggt  
1200

agaagtcccg gtaggtttca aatggtttgt cgatgggtctg ttcgacggca gcttcggctt  
1260

tggcggcgaa gagagtgcag gggcttcctt cctgcgtttc gacggcacgc cgtggtccac  
1320

cgacaaagac ggcattcatca tgtgtctgct ggcggcgga atcaccgctg tcaccggtaa  
1380

gaacccgcag gaacactaca acgaactggc aaaacgcttt ggtgcgccga gctacaaccg  
1440

tttgcaggca gctgcgactt ccgcacaaaa agcggcgctg tctaagctgt ctccggaaat  
1500

ggtgagcgcc agcaccctgg caggtgaccc gatcaccgcg cgcctgactg ctgctccggg  
1560

caacgggtgct tctattggcg gtctgaaagt gatgactgac aacggctggt tcgccgcgcg  
1620

tccgtcaggc acggaagacg catataagat ctactgcgaa agcttcctcg gtgaagaaca  
1680

tcgcaagcag attgagaaag aagcggttga gattgttagc gaagttctga aaaacgcgta  
1740

aacacattta ataaaaaaag ggcggtcgca agatcgccct tttttacgta tgacaaacac  
1800

agaattgcct gatgcgctac gcttatcagg cctacgagga t  
1841

<210> 52

<211> 509

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 52

cgtacacgcg ttacttttgc ggcagatgaa caaacgctgc tgaaaaatgg taatcagacc  
60

aagccgaaac atgtgccagg cacgccgtat tgggtgatca ccaacaccaa caccggccgt  
120

aaatgcagca tgatcgaaca catcatgcag tcgatgcaat tcccggcgga attgattgag  
180

aaggtttgcg gaactatcta aaacgttgca gacaaaggac aaagcagtgt aggctggagc  
240

tgcttcgaag ttcctatact ttctagagaa taggaacttc ggaataggaa ctaaggagga  
300

tattcatatg acacatttaa taaaaaaagg gcggtcgcaa gatcgccctt ttttacgtat  
360

gacaaacaca gaattgcctg atgcgctacg cttatcaggc ctacgaggat ggtgcaatat  
420

attgaattta agcgattttg taggccggat aaggcgttca cgccgcatcc ggcaaaaaca  
480

acgaacactt tgtcaacaaa ctgagtagc  
509

<210> 53

<211> 2061

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> đặc điểm misc

<222> (707)..(707)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 53

cgtacacgcg tttactttgc ggcagatgaa caaacgctgc tgaaaaatgg taatcagacc  
60

aagccgaaac atgtgccagg cacgccgtat tgggtgatca ccaacaccaa caccggccgt  
120

aatgcagca tgatcgaaca catcatgcag tcgatgcaat tcccggcgga attgattgag  
180

aaggtttgcg gaactatcta aaacgttgca gacaaaggac aaagcagtgt aggctggagc  
240

tgcttcgaag ttctataact ttctagagaa taggaacttc ggaataggaa ctaaggagga  
300

tattcatatg gaccgatatc ccgggcggcc gcttcattta taaatttctt gacattttgg  
360

aatagatgtg atataatgtg tacatatcca tggcggccgc tctagaagaa gcttgggatc  
420

cgctcgacctc gaattcggag gaaacaaaga tgggggggttc tcatcatcat catcatcatg  
480

gtatggctag catgagtaaa ggagaagaac ttttactggt agttgtccca attcttggtg  
540

aattagatgg tgatgttaat gggcaciaat tttctgtcag tggagaggggt gaaggtgatg  
600

caacatacgg aaaacttacc cttaaattta tttgcactac tggaaaacta cctgttccat  
660

ggccaacact tgtcactact ttcgggtatg gtgttcaatg ctttgcnaga taccagatc  
720

atatgaaaca gcatgacttt ttcaagagtg ccatgcccga aggttatgta caggaaagaa  
780

ctatatTTTTT caaagatgac gggaactaca agacacgtgc tgaagtcaag tttgaagggtg  
840

atacccttgt taatagaatc gagttaaaag gtattgattt taaagaagat ggaaacattc  
900

ttggacacaa attggaatac aactataact cacacaatgt atacatcatg gcagacaaac  
960

aaaagaatgg aatcaaagtt aacttcaaaa ttagacacaa cattgaagat ggaagcgttc  
1020

aactagcaga ccattatcaa caaaatactc caattggcga tggccctgtc cttttaccag  
1080

acaaccatta cctgtccaca caatctgccc tttcgaaaga tcccaacgaa aagagagacc  
1140

acatggtcct tcttgagttt gtaacagctg ctgggattac acatggcatg gatgaactat  
1200

acaaataact gcaggtcgac catatgggag agctcccaac gcgttgatg caggcatgca  
1260

agcttggtg ttttggcgga tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac  
1320

gcagaagcgg tctgataaaa cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtcccacctg  
1380

accccatgcc gaactcagaa gtgaaacgcc gtagcgccga tggtagtgtg gggctctccc  
1440

atgcgagagt agggaaactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg  
1500

gcctttcggtt ttatctgttg tttgtcgggt aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccc  
1560

ggagcggatt tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggt ggcgggcagg acgcccgcc  
1620

taaactgccca ggcatacaat taagcagaag gccatcctga cggatgctac tgcgaaagct  
1680

tcctcgggtga agaacatcgc aagcagattg agaaagaagc ggttgagatt gttagcgaag  
1740

ttctgaaaaa cgcgtaacta ctgcgaaagc ttctcgggtg aagaacatcg caagcagatt  
1800

gagaaagaag cggttgagat tgtagcgaa gttctgaaaa acgcgtaaac acatttaata  
1860

aaaaaagggc ggtcgcaaga tcgccctttt ttacgtatga caaacacaga attgcctgat  
1920

gcgctacgct tatcaggcct acgaggatgg tgcaatatat tgaatttaag cgattttgta  
1980

ggccggataa ggcgttcacg ccgcatccgg caaaaacaac gaacactttg tcaacaaact  
2040

gagtagctca aggaaatccc a  
2061

<210> 54  
<211> 1735  
<212> ADN  
<213> *Escherichia coli*

<400> 54  
cgtacacgcg tttactttgc ggcagatgaa caaacgctgc tgaaaaatgg taatcagacc  
60

aagccgaaac atgtgccagg cacgccgtat tgggtgatca ccaacaccaa caccggccgt  
120



aaatgcagca tgatcgaaca catcatgcag tcgatgcaat tcccggcgga attgattgag  
180

aaggtttgcg gaactatcta aaacgttgca gacaaaggac aaagcaacga aaggctcagt  
240

cgaagactg ggcctttcgt tttatctggt gtttgtcggg gaacgctctc ctgagtagga  
300

caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccgagggg tggcgggcag  
360

gacgccccgc ataaactgcc aggcataaaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc  
420

tttttgcgtg gccagtgcc aagcttgcag cagattgcag cattacacgt cttgagcgat  
480

tgtgtaggct ggagctgctt cgaagttcct atactttcta gagaatagga acttcggaat  
540

aggaacttca agatccccctc acgctgccgc aagcactcag ggcgcaaggg ctgctaaagg  
600

aagcggaaca cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct gaccccgcat gaatgtcagc  
660

tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcagt  
720

gggcttacat ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg  
780

ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg gatggctttc  
840

ttgccgcaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga  
900

tcgtttcgca agatccccctc acgctgccgc aagcactcag ggcgcaaggg ctgctaaagg  
960

aagcggaaca cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct gaccccgcat gaatgtcagc  
1020

tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcagt  
1080

gggcttacat ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg  
1140

ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg gatggctttc  
1200

ttgccgcaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga  
1260

tcgtttcgcg cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgacgcc aacctgccat  
1320

cacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaagggtt gggcttcgga atcgttttcc  
1380

gggacgccgg ctggatgata ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc tctactgcga  
1440

aagcttcctc ggtgaagaac atcgcaagca gattgagaaa gaagcgggtg agattgttag  
1500

cgaagttctg aaaaacgcgt aaacacattt aataaaaaaa gggcggtcgc aagatcgccc  
1560

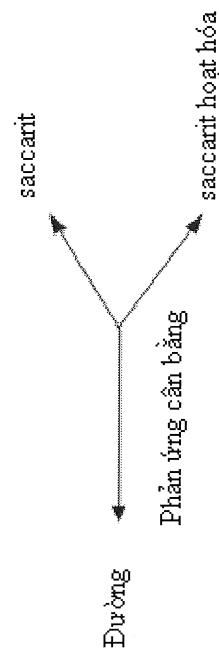
ttttttacgt atgacaaaca cagaattgcc tgatgcgcta cgcttatcag gcctacgagg  
1620

atggtgcaat atattgaatt taagcgattt tgtaggccgg ataaggcggt cacgccgcat  
1680

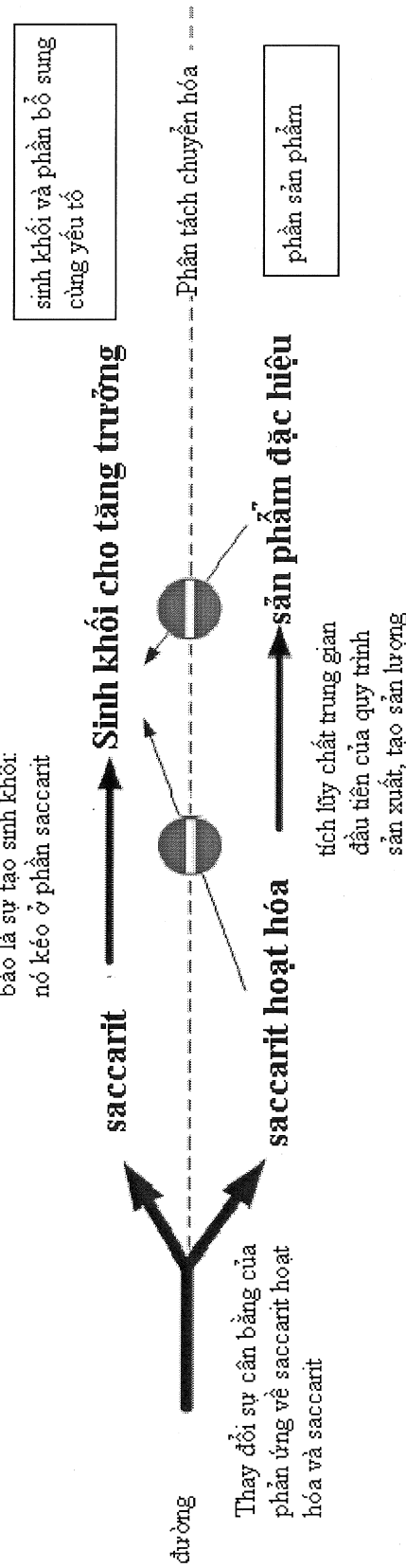
ccggcaaaaa caacgaacac tttgtcaaca aactgagtag ctcaaggaaa tccca  
1735

Fig.1

(A) Phản ứng cân bằng



(B) Nguyên tắc kéo/dẩy



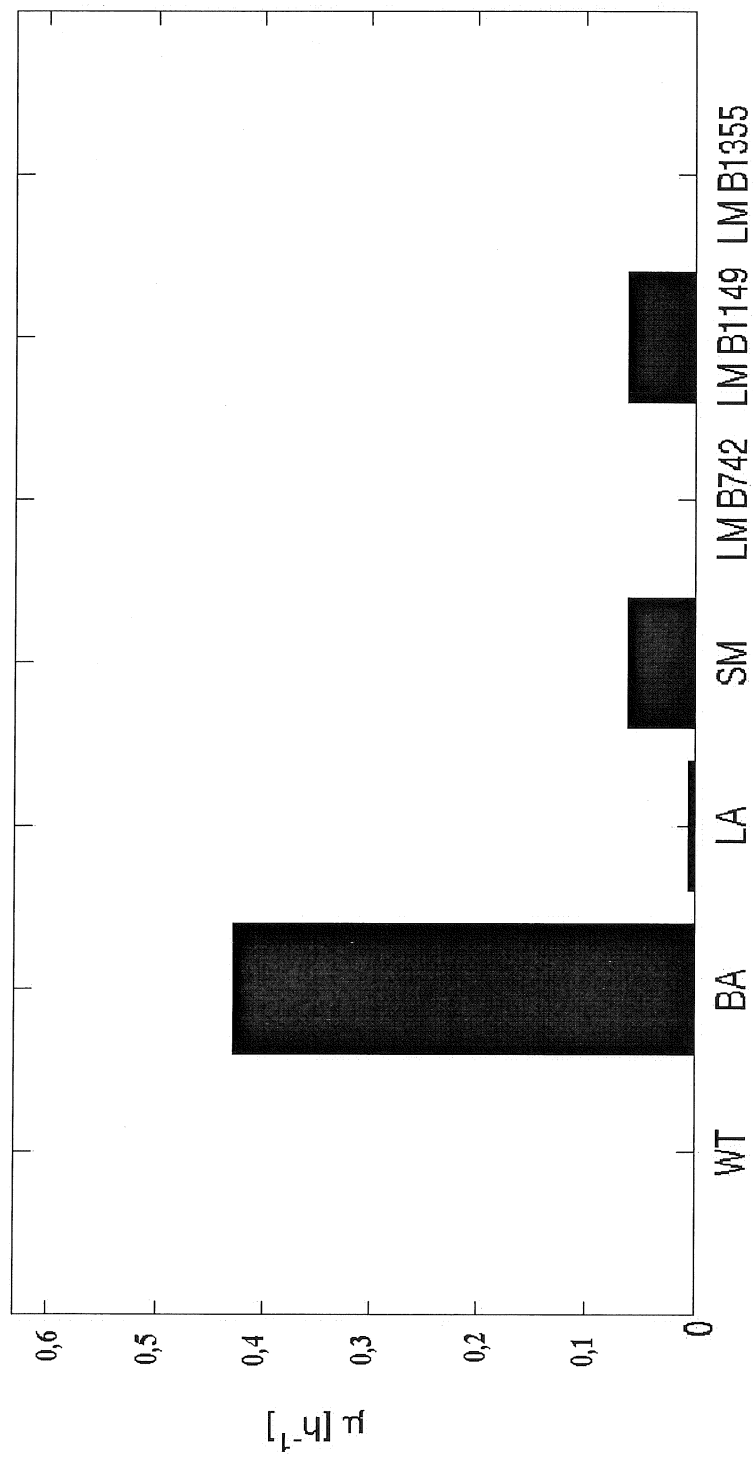


Fig.2



Fig.4

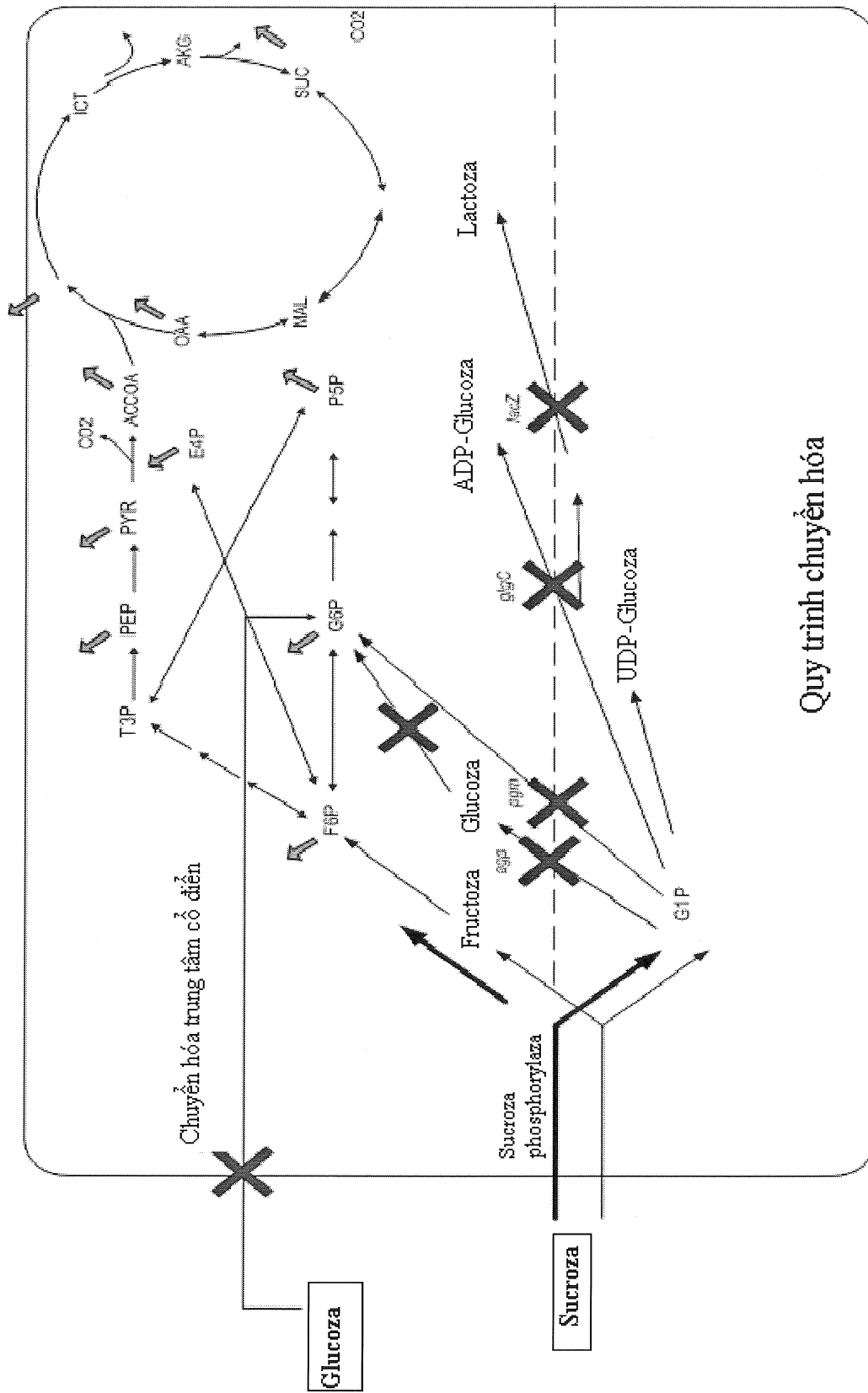
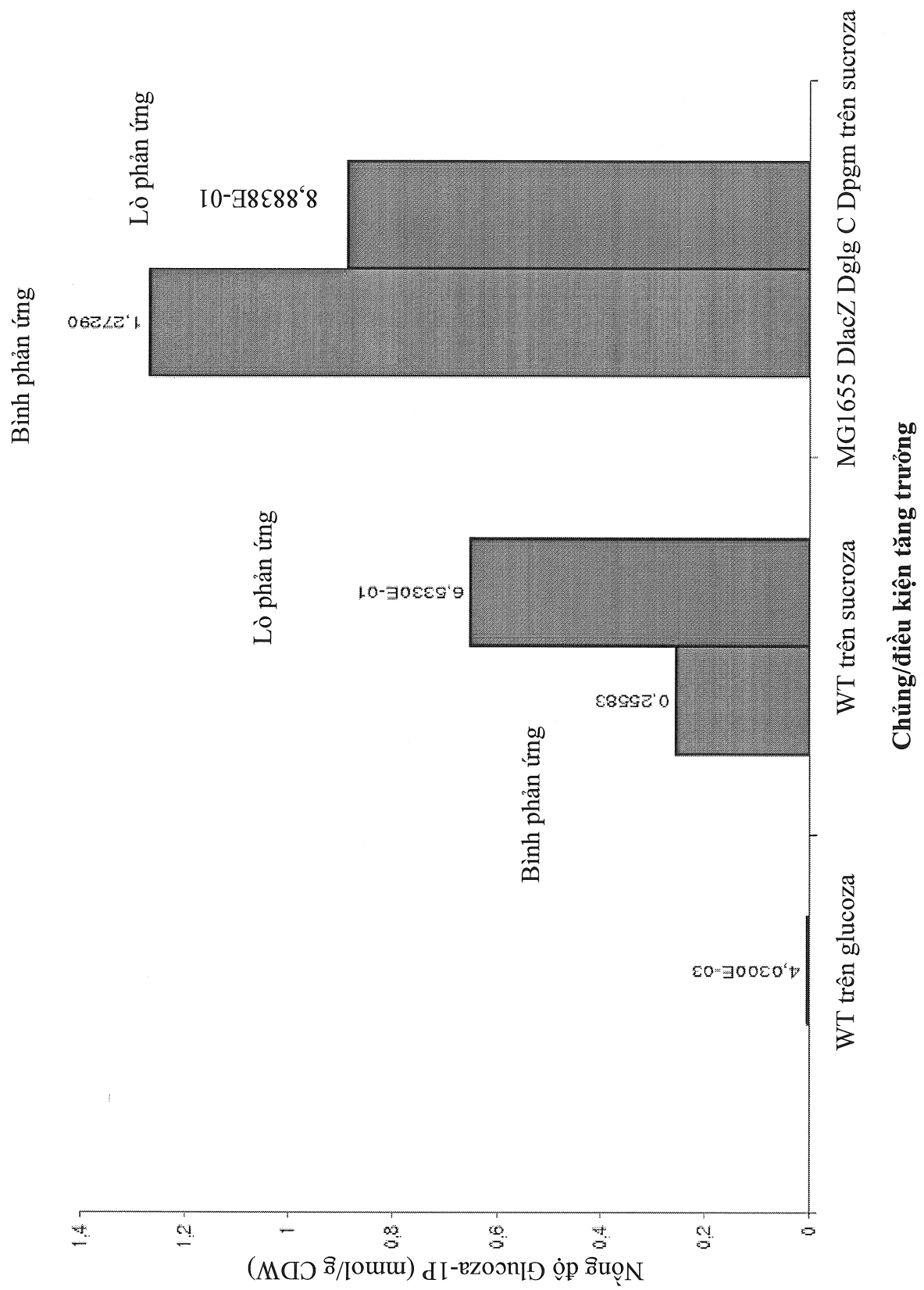


Fig.5



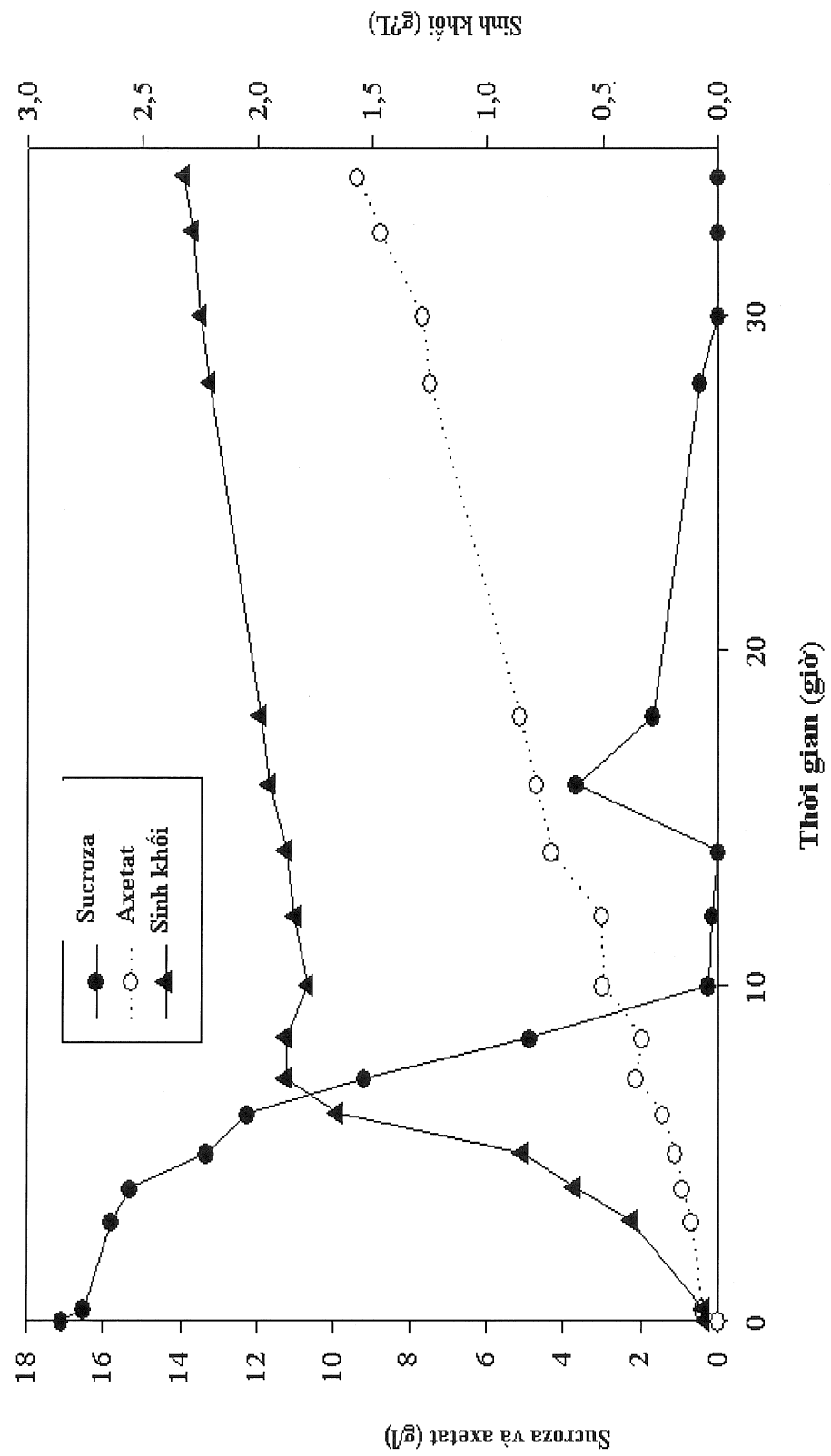


Fig.6



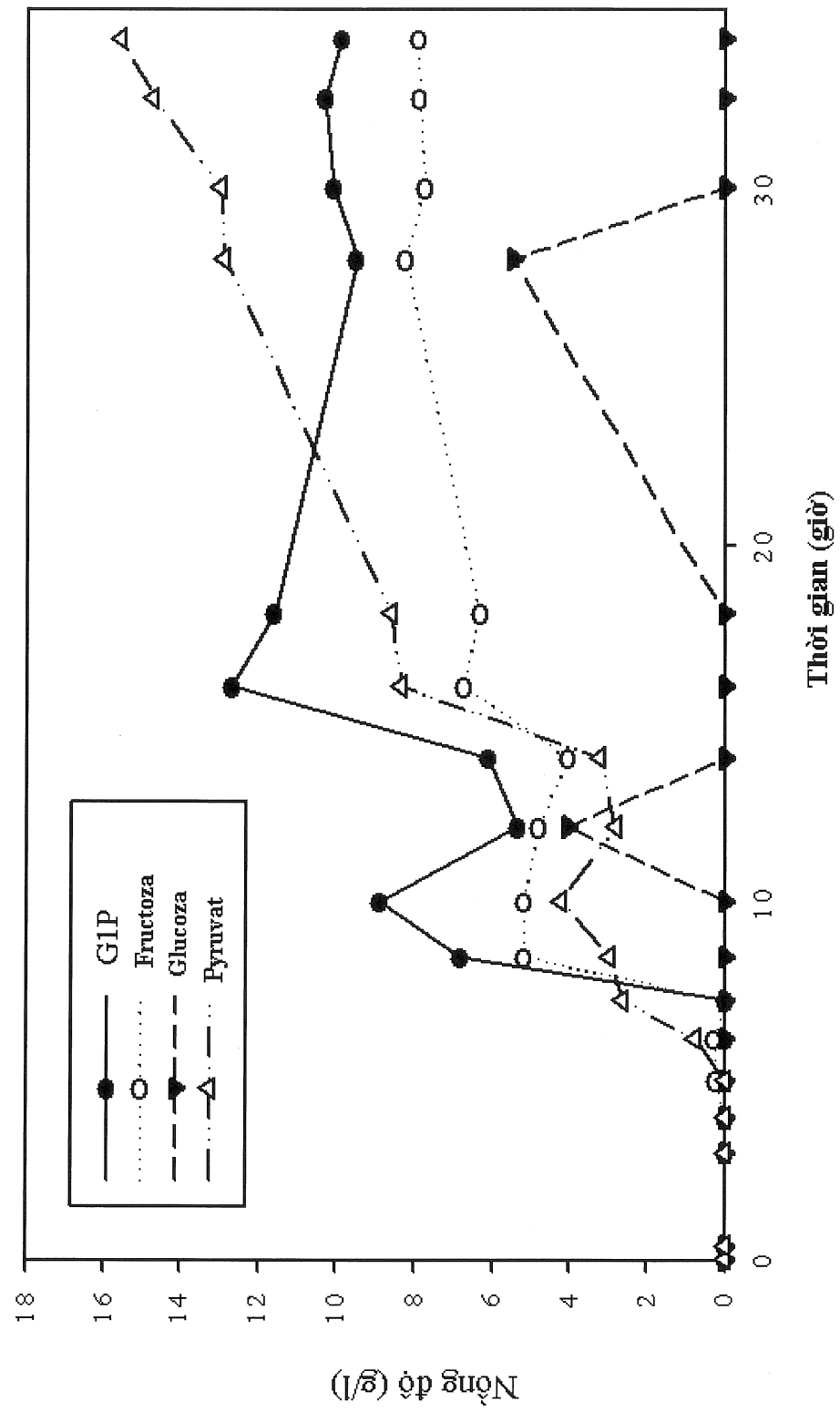
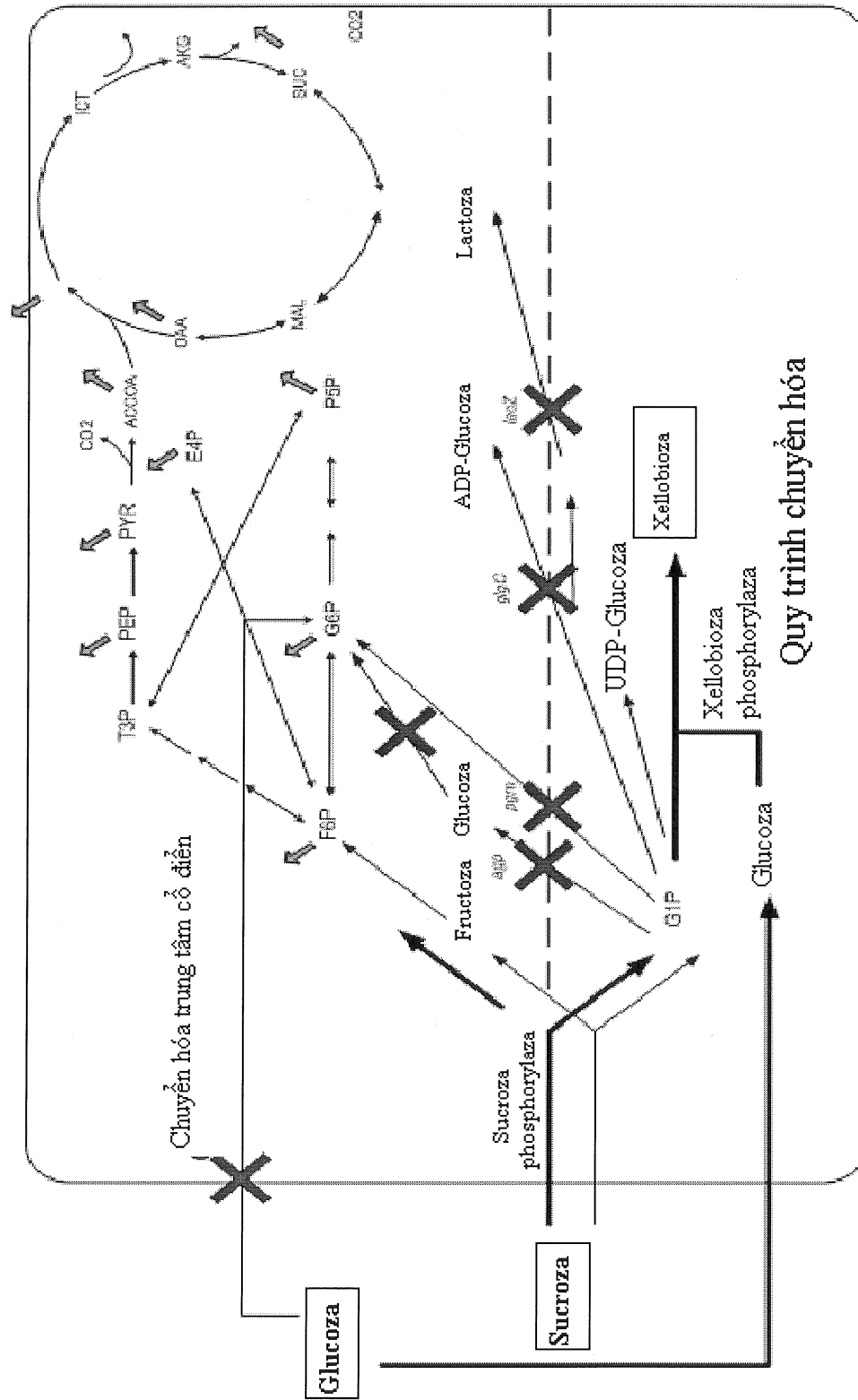


Fig.7

Fig.8



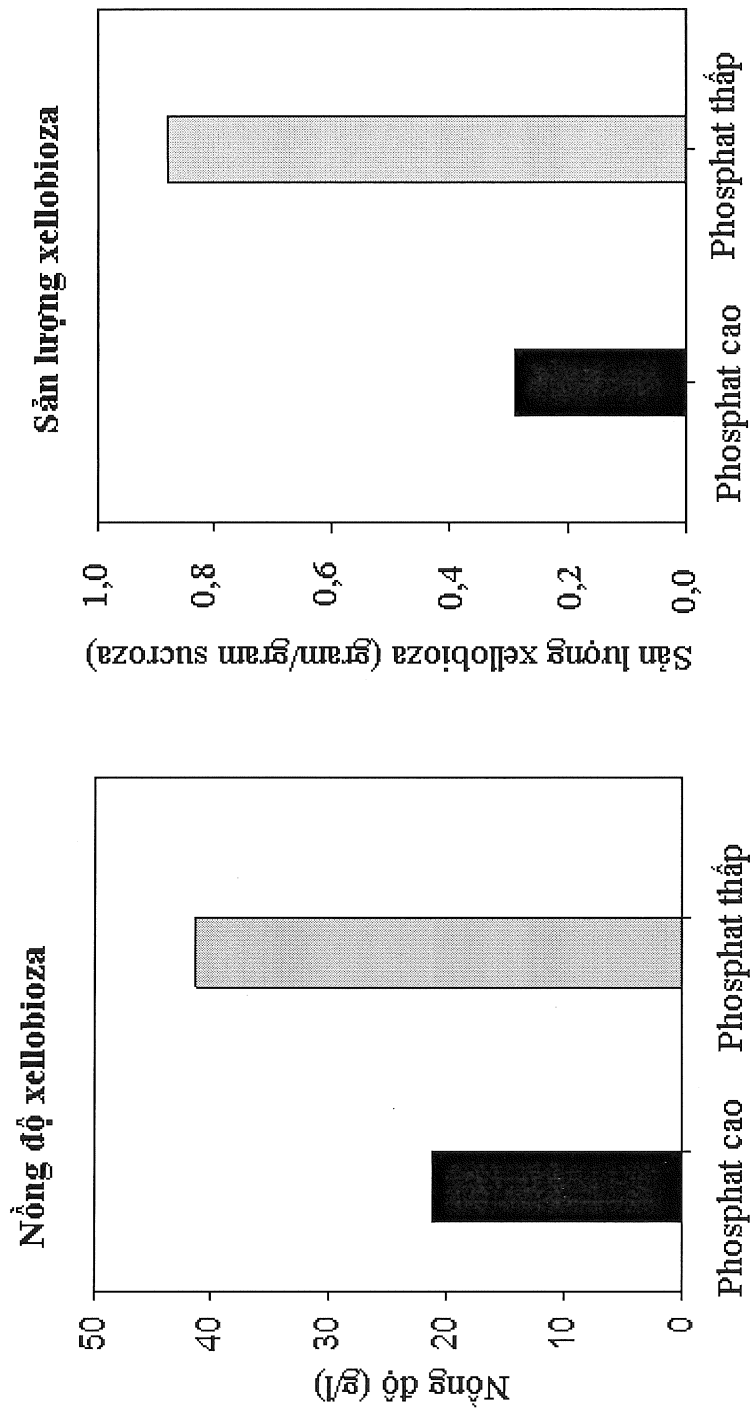


Fig.9

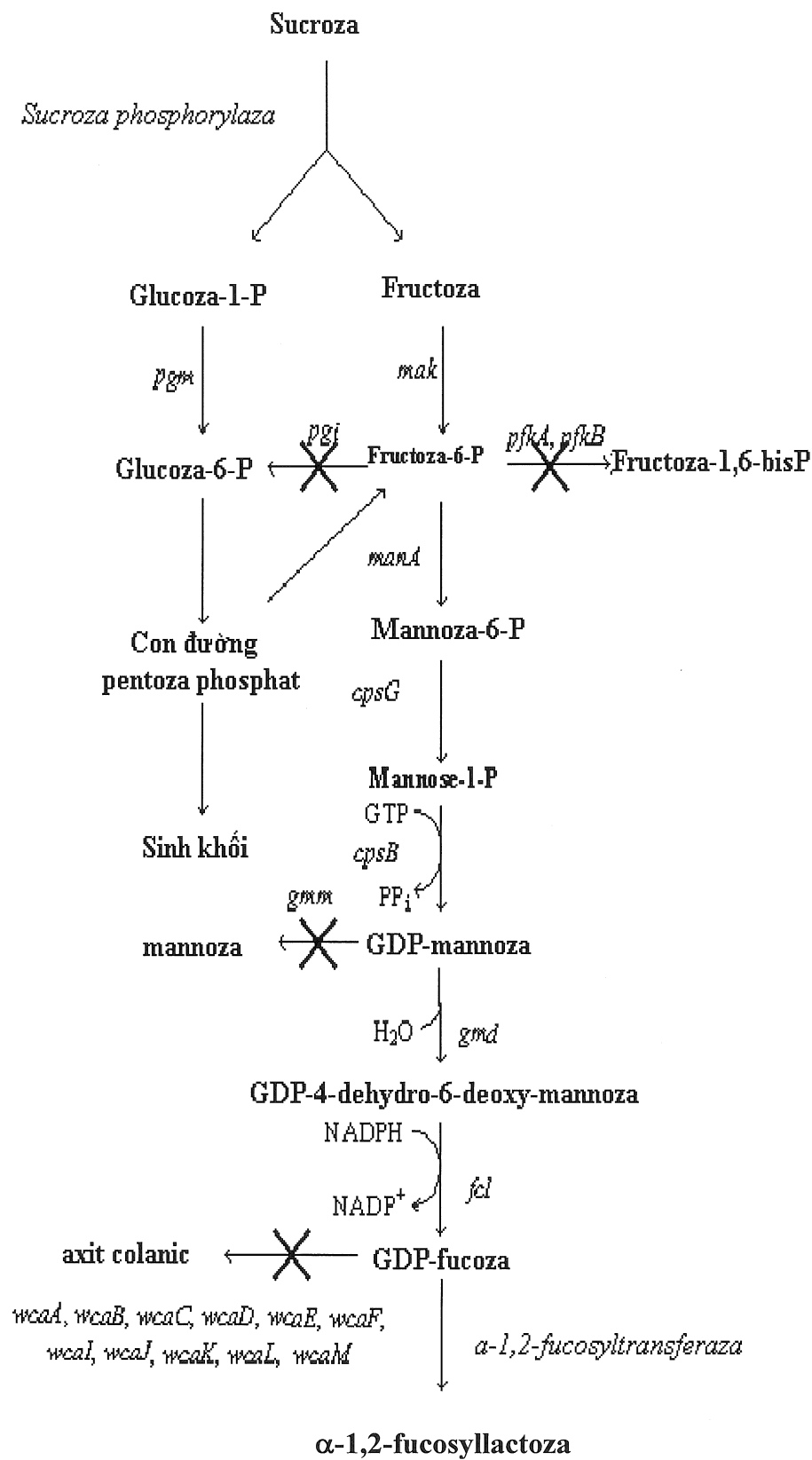


Fig. 10

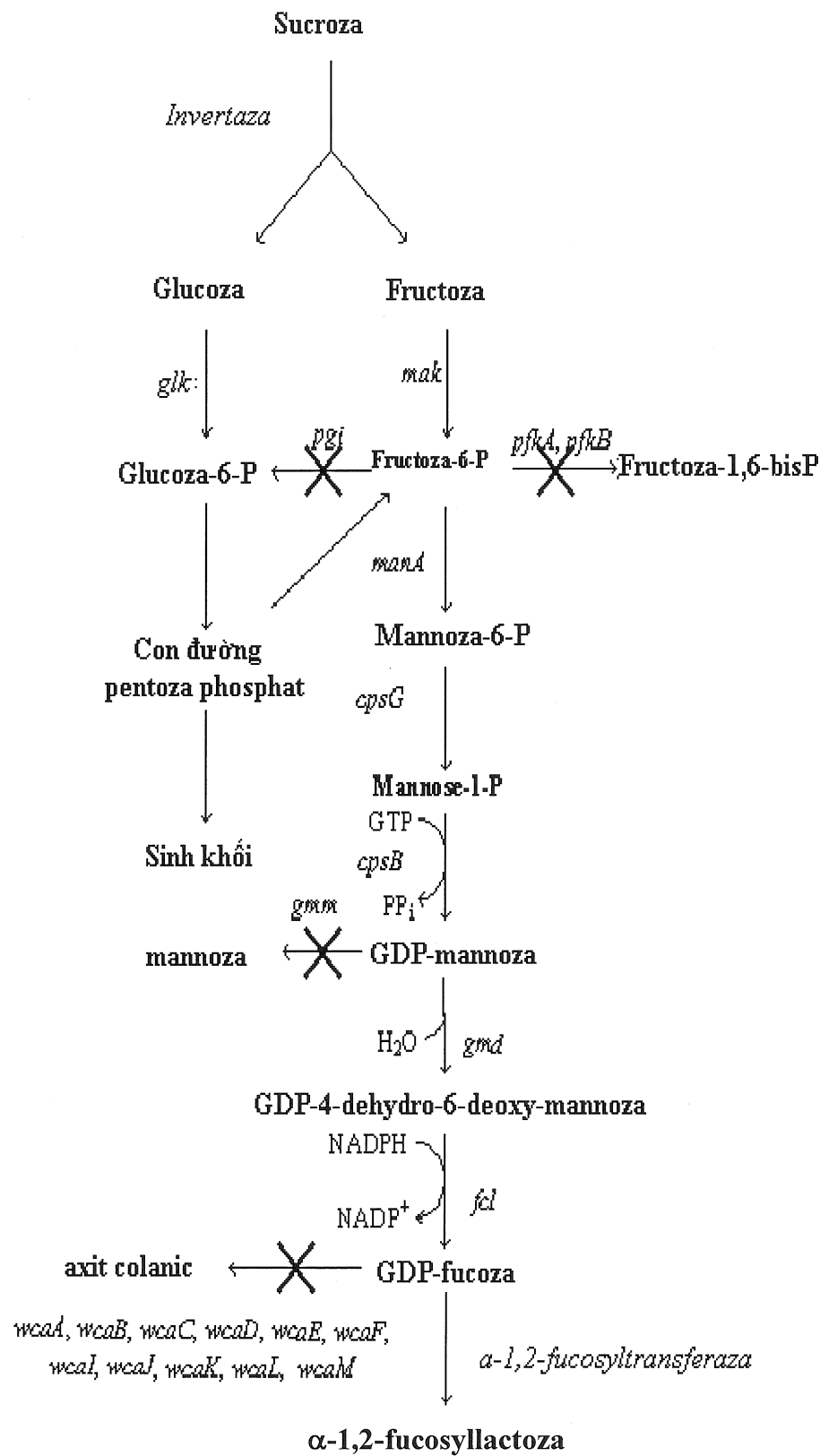


Fig. 10 (tiếp)

Fig.11

AGCATGATCGAACACATCATGCAGTCGATGCAATTCCTGGCGGAATTGATTGAGAAGG  
 TTTGCGGAACCTATCTAAAACGTTGCAGACAAAGGACAAAGCA**ATGGCAATCCACAATC**  
**GTGCAGGCCAACCTGCACAACAGAGTGATTTGATTAACGTCGCCCACTGACGGCGCA**  
**ATATTATGTACTGAAACCAGAAGCAGGGAATGCGGAGCACGCGGTGAAATTCGGTACT**  
**TCCGGTCACCGTGGCAGTGCAGCGCGCCACAGCTTTAACGAGCCGCACATTCTGGCGA**  
**TCGCTCAGGCAATTGCTGAAGAACGTGCGAAAAACGGCATCACTGGCCCTTGCTATGT**  
**GGGTAAAGATACTACGCCCTGTCCGAACCTGCATTCAATTTCCGTTCTGGAAGTGCTG**  
**GCAGCGAACGGCGTTGATGTCATTGTGCAGGAAAAACAATGGCTTCACCCCGACGCCTG**  
**CCGTTTCCAATGCCATCCTGGTTCAATAAAAAAGGTGGCCCGCTGGCAGACGGTAT**  
**CGTGATTACACCGTCCCATAAACCGCCGGAAGATGGTGGAATCAAAATACAATCCGCCA**  
**AATGGTGGCCCGGTGATACCAACGTCACTAAAGTGGTGGAAGACAGGGCCAAACGCAC**  
**TGCTGGCCGATGGCCTGAAAGGCGTGAAAGCGTATCTCCCTCGACGAAGCGATGGCATC**  
**CGGTCAATGTGAAAGAGCAGGATCTGGTGCAGCCGTTCTGTGGAAGGTCTGGCCGATATC**  
**GTTGATATGGCCGCGATTTCAGAAAGCGGGCCTGACGCTGGGCGTTGATCCGCTGGGCG**  
**GTTCCGGTATCGAATACTGGAAGCGTATTGGCGAGTATTACAACCTCAACCTGACTAT**  
**CGTTAACGATCAGGTGATCAAAACCTTCCGCTTTATGCACCTTGATAAAGACGGCGCG**  
**ATCCGTATGGACTGCTCCTCCGAGTGTGCGATGGCGGGCCTGCTGGCACTGCGTGATA**  
**AGTTGATCTGGCGTTTGCTAACGACCCGATTATGACCGTCACGGTATCGTCACTCC**  
**GGCAGGTTTGATGAATCCGAACCACTACCTGGCGGTGGCAATCAATTACCTGTTCCAG**  
**CATCGTCCGCAGTGGGGCAAAGATGTTGCCGTCGGTAAACGCTGGTTTCATCTGCGA**  
**TGATCGACCGTGTGGTCAACGACTTGGGCCGTAAACTGGTAGAAGTCCCGGTAGGTTT**  
**CAAATGGTTTGTGATGGTCTGTTTCGACGGCAGCTTCGGCTTTGGCGGCGAAGAGAGT**  
**GCAGGGGCTTCCTTCTGCTGCGTTTCGACGGCACGCCGTGGTCCACCGACAAAGACGGCA**  
**TCATCATGTGTCTGCTGGCGGCGGAAATCACCGCTGTCACCGGTAAAGAACCCGAGGA**  
**ACACTACAACGAACTGGCAAAACGCTTTGGTGCGCCGAGCTACAACCGTTTGCAGGCA**  
**GCTGCGACTTCCGCACAAAAAGCGGGCGCTGTCTAAGCTGTCTCCGGAATGGTGAGCG**  
**CCAGCACCCCTGGCAGGTGACCCGATCACCGCGCGCCTGACTGCTGCTCCGGGCAACGG**  
**TGCTTCTATTGGCGGTCTGAAAGTGATGACTGACAACGGCTGGTTTCGCCGCGCGTCCG**  
**TCAGGCACGGAAGACGCATATAAGATCTACTGCGAAAGCTTCCTCGGTGAAGAACATC**  
**GCAAGCAGATTGAGAAAGAAGCGGTTGAGATTGTTAGCGAAGTTCTGAAAAACGCGTA**  
**AACACATTTAATAAAAAAAGGGCGGTGCGAAGATCGCCCTTTTTTACGTATGACAAAC**  
**ACAGAATTGCCTGATGCGCTACGCTTATCAGGCCTACGAGGAT**

Fig.12

CGTACACGCGTTTACTTTGCGGCAGATGAACAAACGCTGCTGAAAAATGGTAATCAGA  
 CCAAGCCGAAACATGTGCCAGGCACGCCGTATTGGGTGATCACCAACACCAACACCGG  
 CCGTAAATGCAGCATGATCGAACACATCATGCAGTCGATGCAATTCCTGGCGGAATTG  
 ATTGAGAAGGTTTGCAGAACTATCTAAAACGTTGCAGACAAAGGACAAAGCA**GTGTAG**  
**GCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCTTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTTCGGAATAGGAA**  
**CTAAGGAGGATATTCATATG**ACACATTTAATAAAAAAAGGGCGGTGCGAAGATCGCCC  
 TTTTTTACGTATGACAAACACAGAATTGCCTGATGCGCTACGCTTATCAGGCCTACGA  
 GGATGGTGCAATATATTGAATTTAAGCGATTTTGTAGGCCGGATAAGGCGTTCACGCC  
 GCATCCGGCAAAAAACAACGAACACTTTGTCAACAACTGAGTAGC

Fig.13

CGTACACGCGTTTACTTTGCGGCAGATGAACAAACGCTGCTGAAAAATGGTAATCAGACCA  
 AGCCGAAACATGTGCCAGGCACGCCGTATTGGGTGATCACCAACACCAACACCGGCCGTAA  
 ATGCAGCATGATCGAACACATCATGCAGTCGATGCAATTCCTGGCGGAATTGATTGAGAAG  
 GTTTGCGGAACTATCTAAAACGTTGCAGACAAAGGACAAAGCA**GTGTAGGCTGGAGCTGCT**  
**TCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAAATAGGAAGTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTC**  
**ATATGGACCGATATCCCGGGCGGCCGCTTCATTTATAAAATTTCTTGACATTTTGGAATAGA**  
**TGTGATATAATGTGTACATATCCATGGCGGCCGCTCTAGAAGAAGCTTGGGATCCGTCGAC**  
**CTCGAATTCGGAGGAAACAAAGATGGGGGGTTCTCATCATCATCATCATGATGGTATGGCT**  
**AGCATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATG**  
**GTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGG**  
**AAAACTTACCCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAAACACTT**  
**GTCACTACTTTTCGGGTATGGTGTTCATGCTTTGCNAGATACCCAGATCATATGAAACAGC**  
**ATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAA**  
**AGATGACGGGAACCTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTGTAAAT**  
**AGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGACACAAATTGG**  
**AATACAACTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAAATGGAATCAA**  
**AGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTAT**  
**CAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCA**  
**CACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTT**  
**TGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAACTGCAGGTCGAC**  
**CATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGAT**  
**GAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAAGCGGTCTGATAAAACA**  
**GAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTG**  
**AAACGCCGCTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGG**  
**CATCAAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGT**  
**CGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCCAAGCA**  
**ACGGCCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAG**  
**AAGGCCATCCTGACGGATG**CTACTGCGAAAGCTTCCTCGGTGAAGAACATCGCAAGCAGAT  
 TGAGAAAGAAGCGGTTGAGATTGTTAGCGAAGTTCTGAAAAACGCGTAACCTACTGCGAAAG  
 CTTCTCGGTGAAGAACATCGCAAGCAGATTGAGAAAGAAGCGGTTGAGATTGTTAGCGAA  
 GTTCTGAAAAACGCGTAAACACATTTAATAAAAAAAGGGCGGTCGCAAGATCGCCCTTTTT  
 TACGTATGACAAACACAGAATTGCCTGATGCGCTACGCTTATCAGGCCTACGAGGATGGTG  
 CAATATATTGAATTTAAGCGATTTTGTAGGCCGGATAAGGCGTTCACGCCGCATCCGGCAA  
 AAACAACGAACACTTTGTCAACAACTGAGTAGCTCAAGGAAATCCCA

Fig.14

CGTACACGCGTTTACTTTGCGGCAGATGAACAAACGCTGCTGAAAAATGGTAATCAGACC  
 AAGCCGAAACATGTGCCAGGCACGCCGTATTGGGTGATCACCAACACCAACACCGGCCGT  
 AAATGCAGCATGATCGAACACATCATGCAGTCGATGCAATTCCCGGCGGAATTGATTGAG  
 AAGGTTTGCGGAACTATCTAAACGTTGCAGACAAAGGACAAAGCA**ACGAAAGGCTCAGT**  
**CGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGA**  
**CAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAG**  
**GACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCC**  
**TTTTTGCGTGGCCAGTGCCAAGCTTGCGATGCAGATTGCAGCATTACACGTCTTGAGCGAT**  
**TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAAC TTCGGAAT**  
**AGGAACTTCAAGATCCCCTCACGCTGCCGCAAGCACTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGG**  
**AAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGC**  
**TACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGT**  
**GGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACC CGGAATTG**  
**CCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTC**  
**TTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGA**  
**TCGTTTTCGCAAGATCCCCTCACGCTGCCGCAAGCACTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGG**  
**AAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGC**  
**TACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGT**  
**GGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACC CGGAATTG**  
**CCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTC**  
**TTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGA**  
**TCGTTTTCGCGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCAT**  
**CACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCC**  
**GGGACGCCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTCTACTGCGA**  
 AAGCTTCCTCGGTGAAGAACATCGCAAGCAGATTGAGAAAGAAGCGGTTGAGATTGTTAG  
 CGAAGTTCTGAAAAACGCGTAAACACATTTAATAAAAAAAGGGCGGTCGCAAGATCGCCC  
 TTTTTTACGTATGACAAACACAGAATTGCCTGATGCGCTACGCTTATCAGGCCTACGAGG  
 ATGGTGCAATATATTGAATTTAAGCGATTTTGTAGGCCGATAAGGCGTTCACGCCGCAT  
 CCGGCAAAAACAACGAACACTTTGTCAACAACTGAGTAGCTCAAGGAAATCCCA



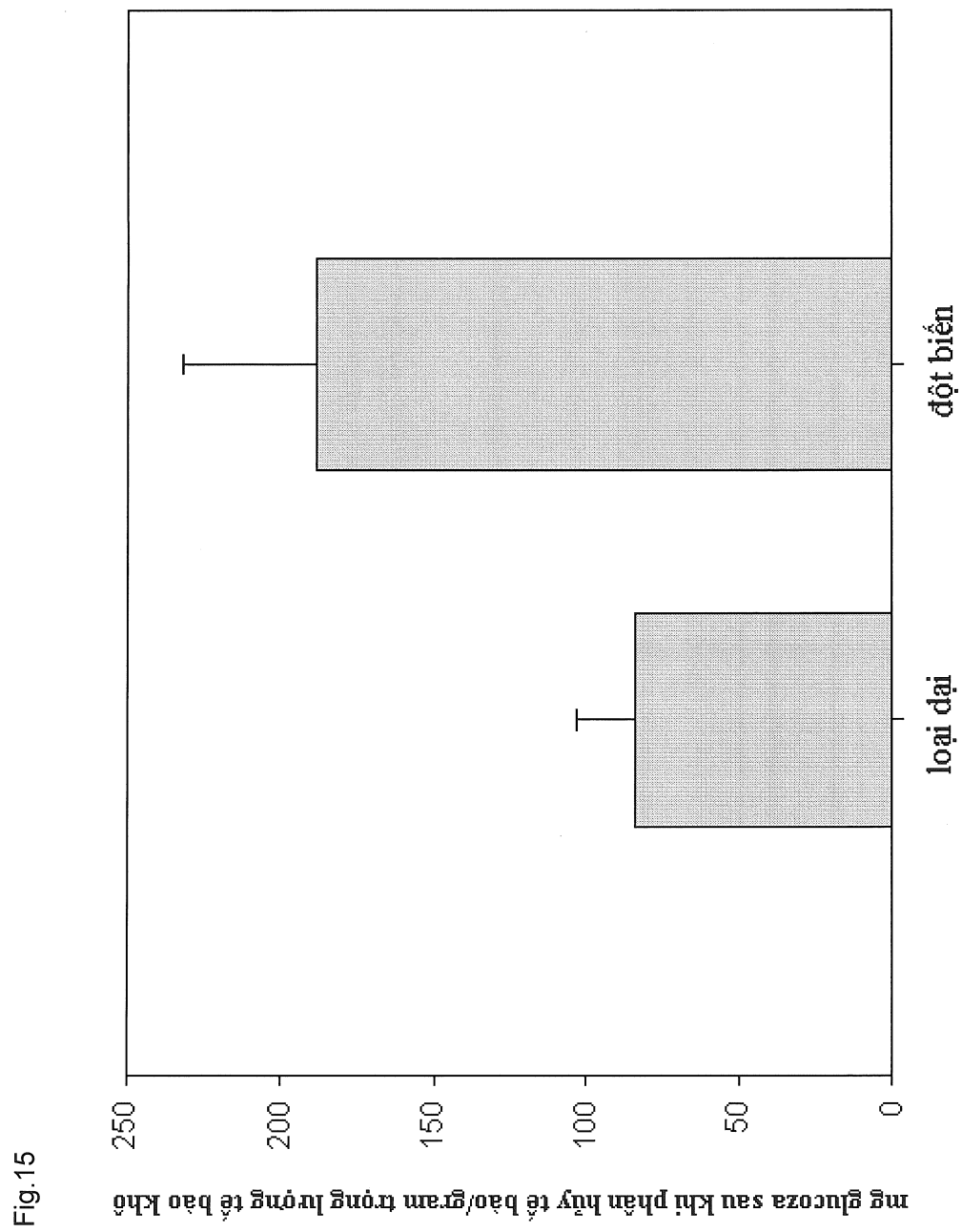
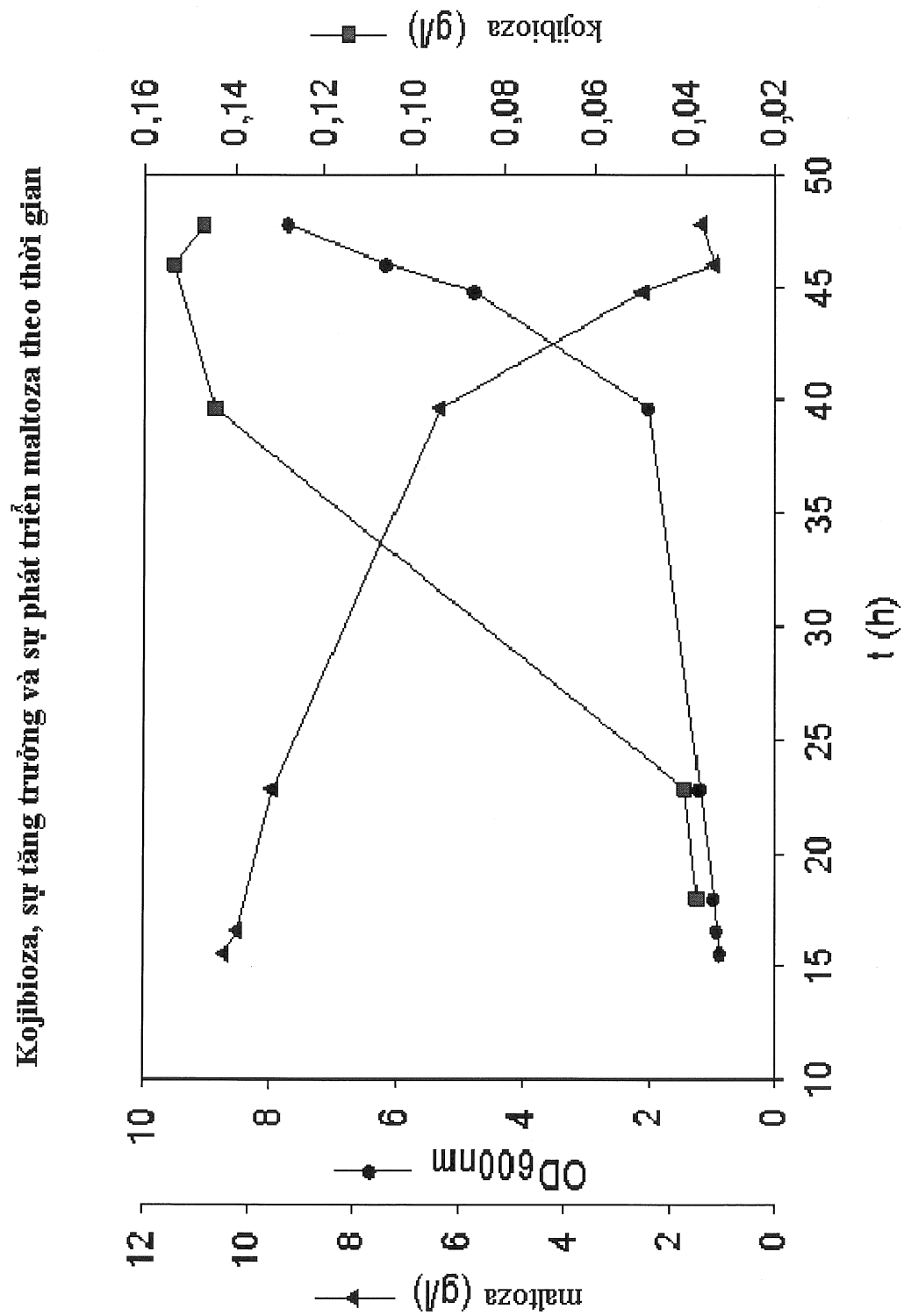


Fig.16



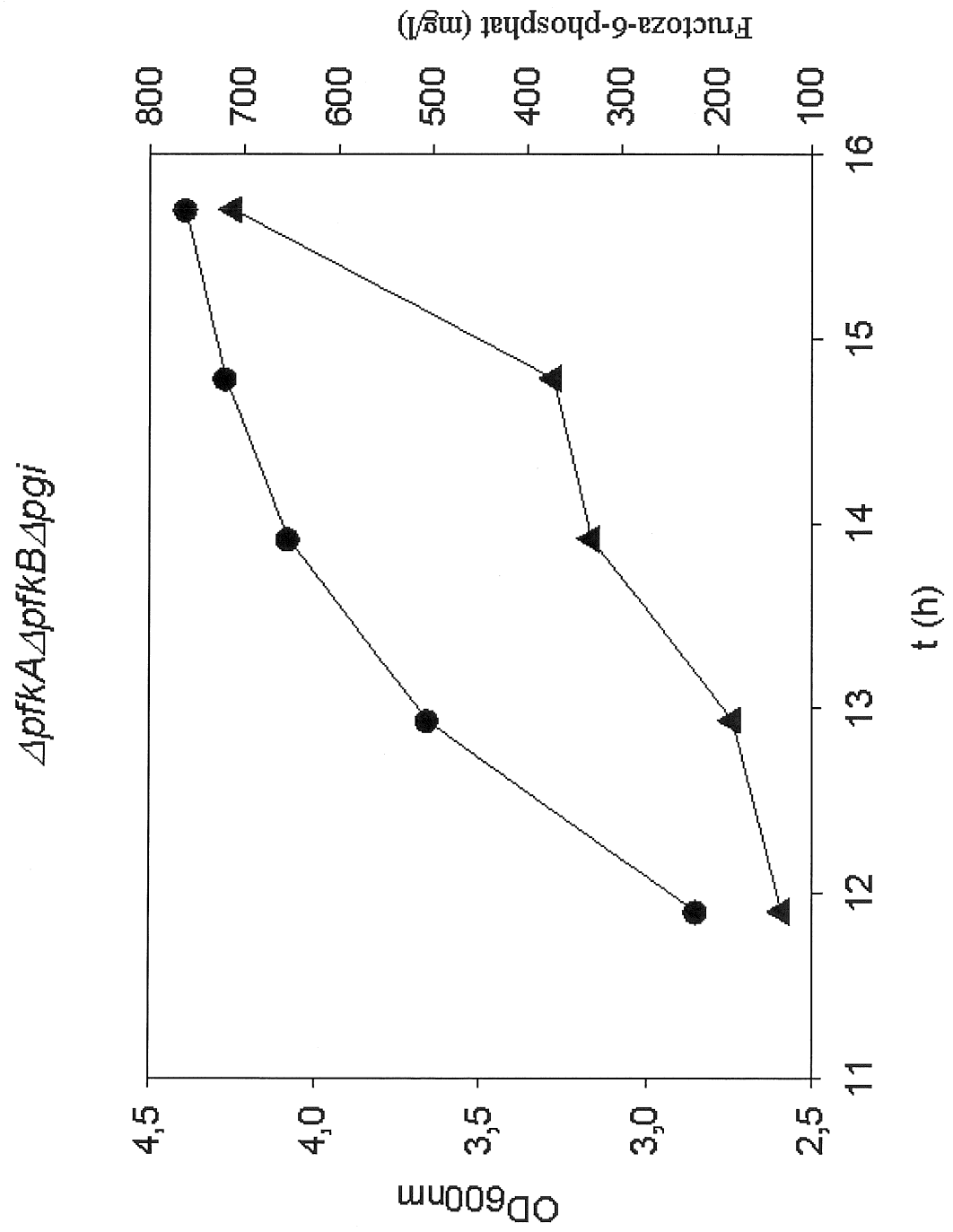


Fig.17

Fig.18

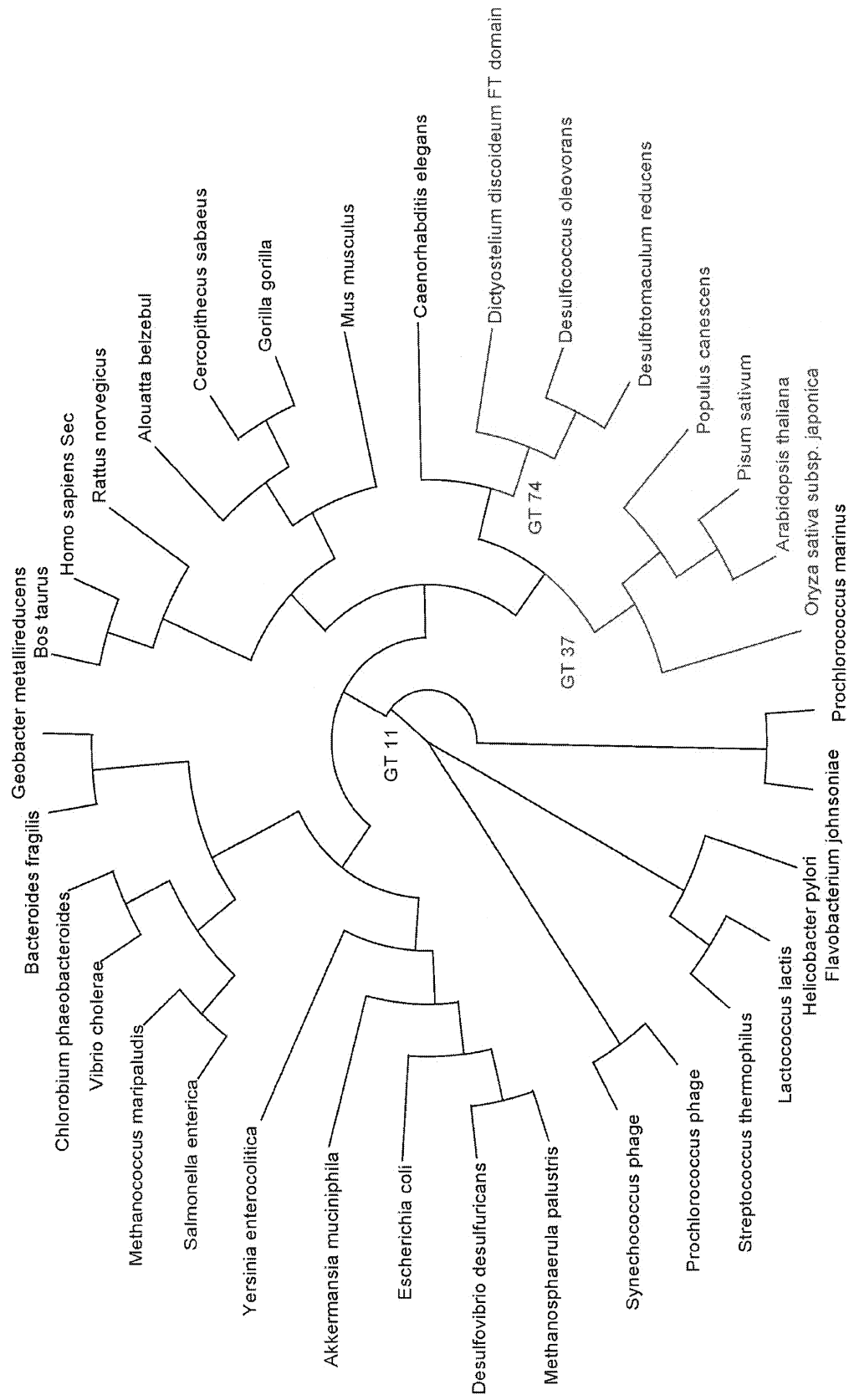




Fig.20

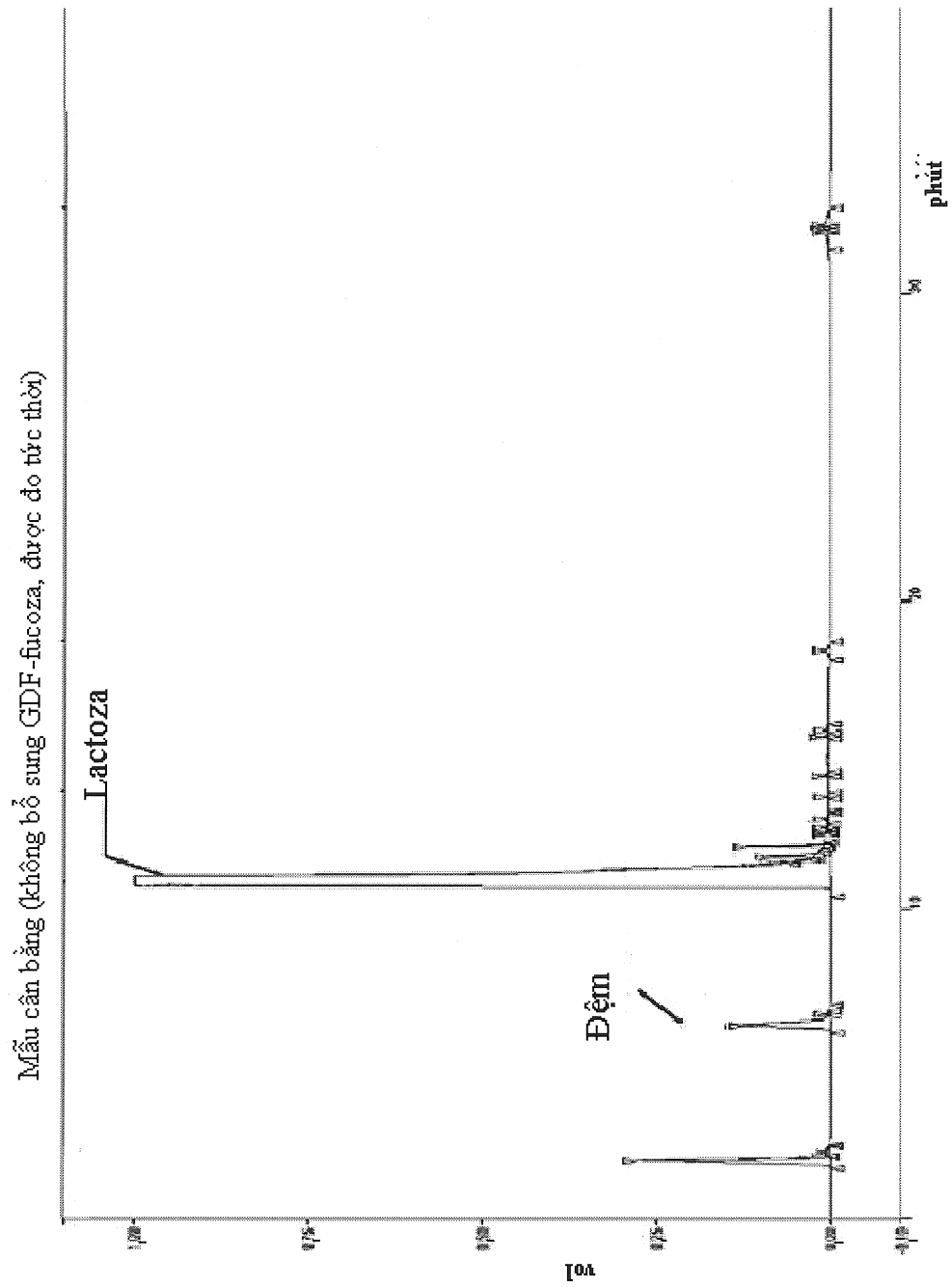


Fig.20 (tiếp)

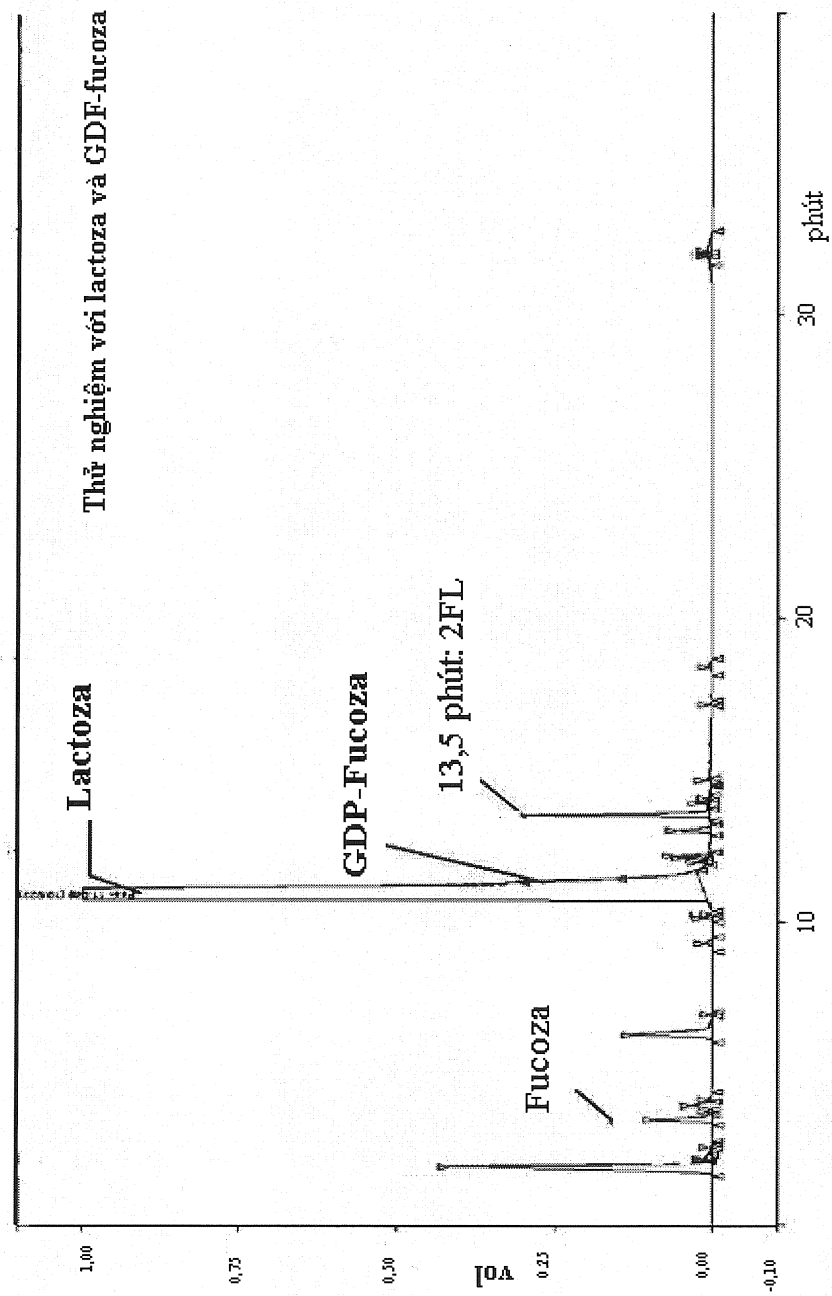


Fig.21

