



(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)



1-0027887

(51)⁷ C12N 1/21; C12P 19/32; C12P 13/14

(13) B

(21) 1-2015-02430

(22) 23/01/2014

(86) PCT/JP2014/052013 23/01/2014

(87) WO 2014/115896 31/07/2014

(30) 2013-011535 24/01/2013 JP

(45) 25/04/2021 397

(43) 26/10/2015 331A

(73) Mitsui Chemicals, Inc. (JP)

5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 1057117, Japan

(72) MADHAVAN, Anjali (IN); FUJII, Ryota (JP); HIDEAKI, Tomonori (JP);
CHONG, Su Sun (MY).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT GLUTAMIC

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, mà thu được bằng cách truyền các hoạt tính enzym malat thiokinaza và hoạt tính enzym malyl-CoA lyaza cho vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d) dưới đây, mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d), hoặc, ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c) hoặc (d) được truyền, không cho phép các chức năng của chúng có tác dụng: (a) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat, (b) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat, (c) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA hoặc (d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất axetyl-CoA và phương pháp sản xuất axit glutamic.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có khả năng tạo ra các chất hóa học có nguồn gốc từ axetyl-CoA, ví dụ, axit L-glutamic, có năng suất và hiệu suất cao bằng cách đưa vào con đường cố định cacbon dioxit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axetyl-CoA là chất trung gian rất quan trọng trong các quá trình chuyển hóa của vi sinh vật. Nhiều chất chuyển hóa khác nhau được sản xuất thông qua axetyl-CoA. Các ví dụ đã biết về các chất được sản xuất thông qua axetyl-CoA bao gồm các axit amin như axit L-glutamic, L-glutamin, L-prolin, L-arginin, L-leuxin và L-isoleuxin; các axit hữu cơ như axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit caproic, axit xitric, axit 3-hydroxybutyric, axit 3-hydroxyisobutyric, axit 3-aminoisobutyric, axit 2-hydroxyisobutyric, axit metacrylic và axit poly-3-hydroxybutyric; các rượu như rượu isopropyllic, etanol và butanol; axeton; và axit polyglutamic.

Axit L-glutamic, hoặc axit 2-aminopentandioic, là axit amin có trong tự nhiên và là thành phần của thực phẩm được lên men như sốt tương, sốt cá, phomat và bột đậu được lên men. Muối natri của axit glutamic, đã biết đến là mononatri glutamat hoặc MSG, được sử dụng rộng rãi trong công nghệ thực phẩm làm chất gia vị.

Chất dự bị đầy hứa hẹn để sản xuất axit glutamic công nghiệp là vi khuẩn Gram âm thuộc chi *Pantoea* từ họ *Enterobacteriaceae*. Ngoài việc tạo ra hàm lượng axit glutamic cao, vi khuẩn *Pantoea ananatis* còn chịu được các nồng độ axit glutamic cao và có thể phát triển ở độ pH axit (Appl. Microbiol. Biotechnol. 93:331–341 (2012)). Với việc thiết lập các kỹ thuật thao tác gen cho *P. ananatis*, các chủng tái tổ hợp tốt hơn được phát triển thành công chứng minh về căn bản khả năng sản xuất axit glutamic cao hơn (US6331419B1, US7015010B1).

Ở *P. ananatis*, nguồn cacbon giống như glucoza được chuyển hóa nhờ quá trình Embden-Meyerhof-Parnas tạo ra pyruvat. Rồi sau đó, axetyl-CoA được tạo ra từ pyruvat bằng cách cho pyruvat dehydrogenaza và/hoặc pyruvat format lyaza tác động với sự thiếu hụt đồng thời cacbon có giá trị lấy từ đường ở dạng sản phẩm phụ giống như cacbon đioxit và/hoặc format. Sau đó, axit glutamic được tạo ra từ axetyl-CoA qua chất trung gian 2-oxoglutarat của chu trình Krebs. Về mặt tự nhiên, trong quá trình này, hiệu suất tối đa của axit glutamic có thể đạt được bị giới hạn bởi sự thiếu hụt

cacbon vốn có như cacbon dioxit và do đó, việc thiết kế quá trình thay thế mà có thể tránh sự thiếu hụt này và/hoặc gây ra sự cố định cacbon dioxit trong quá trình có thể trợ giúp để cải thiện hiệu suất toàn phần, hiệu quả và tính kinh tế của quy trình lên men.

Có một số quá trình đã biết, trong đó cacbon dioxit được cố định để tạo ra nguồn cacbon trong vi sinh vật (Appl. Environ. Microbiol. 77(6), 1925-1936(2011)). Các ví dụ cụ thể về các quá trình này bao gồm chu trình Calvin-Benson, chu trình TCA khử, quá trình Wood-Ljungdahl, chu trình 3-hydroxypropionat, và chu trình 4-hydroxybutyrat. Chu trình Calvin-Benson là quá trình cố định CO₂ tồn tại ở thực vật và vi khuẩn quang hợp, và bao gồm khoảng 12 loại enzym, trong đó CO₂ được cố định bằng ribuloza-1, 5-bisphosphat carboxylaza (RubisCO) tạo ra glyxeraldehyt 3-phosphat. Chu trình TCA khử là chu trình được tìm thấy trong vi khuẩn kỵ khí và vi khuẩn ưa vi khí bao gồm vi khuẩn lưu huỳnh xanh lục, và bao gồm 11 loại enzym. Chu trình này được đặc trưng bởi các enzym cố định CO₂ sử dụng ferredoxin làm coenzym (axetyl-CoA carboxylaza, 2-oxoglutarat synthaza), và pyruvat được tạo ra từ CO₂ bằng phản ứng theo hướng nghịch đảo của chu trình TCA thông thường. Quá trình Wood-Ljungdahl là quá trình được tìm thấy trong vi khuẩn kỵ khí như vi khuẩn sản xuất axit axetic, và bao gồm 9 loại enzym, trong đó CO₂ và format trên coenzym được khử bởi format dehydrogenaza, CO dehydrogenaza và tương tự để cuối cùng đạt được sự chuyển hóa thành axetyl-CoA. Chu trình 3-hydroxypropionat được tìm thấy trong vi khuẩn *Chloroflexus* và tương tự, và bao gồm 13 loại enzym, trong đó CO₂ được cố định bằng sự tác động của axetyl-CoA (propionyl-CoA) carboxylaza và axetyl-CoA được tạo ra qua malonyl-CoA và tương tự. Chu trình 4-hydroxybutyrat là quá trình tồn tại trong vi khuẩn cổ và tương tự. Trong chu trình này, CO₂ được cố định bằng các phản ứng của pyruvat synthaza, axetyl-CoA (propionyl-CoA) carboxylaza và phosphoenolpyruvat carboxylaza, và axetyl-CoA được tạo ra qua 4-hydroxybutyryl-CoA và tương tự.

Tài liệu patent US7785858B2 mô tả việc thiết kế quá trình thay thế cho sự hình thành axetyl-CoA với việc tạo ra cacbon dioxit được khử bằng cách tăng cường hoạt tính của quá trình Bifidum enzym D-xyluloza-5-phosphat phosphoketolaza và/hoặc fructoza-6-phosphat phosphoketolaza. Kết quả là, về mặt lý thuyết, 1 mol CO₂ có thể được giữ lại tính theo mỗi mol glucoza tiêu thụ bằng con đường thay thế. Khi quá trình này được đưa vào chủng *P. ananatis* sản xuất axit glutamic, hàm lượng axit glutamic tăng lên là 2,6 g/L tương ứng với việc tăng 6% hiệu suất toàn phần của axit glutamic.

Mặt khác, một số báo cáo đã được thực hiện ở dạng các ý tưởng thử nghiệm đưa quá trình cố định cacbon dioxit vào vi sinh vật sản xuất hợp chất hữu dụng để tạo ra chất hữu dụng. Ví dụ, WO2009/094485 và WO2010/071697 bộc lộ việc sử dụng vi sinh vật mà đưa vào đó quá trình tương tự với quá trình Wood-Ljungdahl trong vi khuẩn axit axetic, để tạo ra axetyl-CoA từ cacbon dioxit. Hơn nữa, đối với ví dụ về việc sản xuất hợp chất hữu dụng bằng cách cố định CO₂, WO2009/046929 bộc lộ thử nghiệm để sử dụng vi sinh vật mà đưa vào đó hydrogenaza và tetrahydrofolat lyaza, để tạo ra axit lactic từ cacbon dioxit. Hơn nữa, WO2011/099006 đề xuất chu trình trong đó CO₂ được cố định qua phản ứng cố định cacbon dioxit trên axetyl-CoA và phản ứng khử của malonyl-CoA. DE 102007059248 A đề xuất việc sản xuất axetyl-CoA bằng quá trình tương tự với chu trình 4-hydroxybutyrat.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế

Như được mô tả ở trên, có thể nói rằng để cố định CO₂ và cho phép chuyển hóa nó thành axetyl-CoA, sẽ lý tưởng nếu (a) mỗi enzym có liên quan đến quá trình này có hoạt tính đủ cao; (b) chu trình không bao gồm enzym tiêu thụ axetyl-CoA; và (c) ngoài ra, số lượng các enzym được truyền là nhỏ và chu trình đơn giản. Tuy nhiên, không có ví dụ nào cho việc sản xuất axetyl-CoA hoặc chất hóa học có nguồn gốc từ axetyl-CoA thông qua sự cố định CO₂ được báo cáo cho đến nay thỏa mãn tất cả các điều kiện từ (a) đến (c), và khả năng thực hiện tất cả các ví dụ này là thấp.

Để thực hiện sản xuất công nghiệp các chất hóa học có nguồn gốc từ axetyl-CoA với giá thành cạnh tranh hơn, hàm lượng sản phẩm và hiệu suất cao hơn được mong muốn. Do đó, cần thiết kể quá trình có hiệu quả và hoạt tính cao để chuyển hóa glucoza thành axetyl-CoA hoặc các chất hóa học có nguồn gốc từ axetyl-CoA qua sự cố định CO₂. Sự tăng thêm bất kỳ quan sát được về hiệu suất của các chất hóa học có nguồn gốc từ axetyl-CoA, như axit glutamic, trong khi lên men thực tế là bộc lộ việc tăng hiệu suất của tiền chất axetyl-CoA của nó. Do đó, một cách để xác định hiệu quả của quá trình cố định CO₂ được đưa vào để làm tăng hiệu suất của axetyl-CoA là để quan sát hiệu quả về hiệu suất của các sản phẩm có nguồn gốc từ axetyl-CoA giống như axit glutamic.

Khía cạnh quan trọng tương đương khác theo quan điểm công nghiệp là giảm thiểu sự hình thành các sản phẩm bỏ đi mà mặt khác cần chi phí bổ sung cho việc tinh chế, tái sinh hoặc vứt bỏ. Các sản phẩm bỏ đi có thể bao gồm sản phẩm phụ hóa học,

muối kết tủa, khối lượng tế bào và mảnh vỡ tế bào và tương tự có lẫn dòng sản phẩm. Việc làm giảm sự hình thành các chất hóa học hoặc sản phẩm sinh học bỏ đi bất kỳ này trong suốt quá trình lên men là rất thuận lợi để giảm chi phí cho việc xử lý sản phẩm đầu ra, tái sinh hoặc vứt bỏ.

Sáng chế được thực hiện trong các trường hợp được mô tả ở trên và nhằm mục đích đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Pantoea* là hữu dụng để sản xuất axetyl-CoA và các chất hóa học có nguồn gốc từ axetyl-CoA hiệu suất cao, như axit glutamic, bằng cách đưa quá trình cố định cacbon dioxid hiệu quả vào. Theo cách khác, sáng chế nhằm mục đích đề xuất vi sinh vật là vi khuẩn thuộc chi *Pantoea* có quá trình cố định cacbon dioxid có khả năng chuyển hóa cacbon dioxid thành chất chuyển hóa hữu dụng qua axetyl-CoA với hiệu suất cao và hiệu quả và các sản phẩm phụ giảm. Sáng chế còn nhằm mục đích đề xuất phương pháp sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng, trong đó vi sinh vật được sử dụng.

Giải quyết vấn đề

Cụ thể hơn, sáng chế bao gồm các khía cạnh sau:

1. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA thuộc chi *Pantoea* mà thu được bằng cách truyền các hoạt tính enzym malat thiokinaza và hoạt tính enzym malyl-CoA lyaza vào vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d) dưới đây, mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d), hoặc, ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c) hoặc (d) được truyền, không cho phép các chức năng của chúng có tác dụng:

(a) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;

(b) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat;

(c) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA; và

(d) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ CO₂ thành format.

2. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA, phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được mô tả ở khía cạnh 1 tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon; và thu gom sản phẩm đích nhận được bằng cách tiếp xúc.

3. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA được mô tả ở khía cạnh 2, phương pháp này còn bao gồm bước: cung cấp ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat, ion hydro carbonat, khí cacbon dioxid và chất khử vào môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

4. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA được mô tả ở khía cạnh 2 hoặc 3, phương pháp này còn bao gồm bước: thu gom khí chứa cacbon dioxid được tạo ra bằng cách nuôi cấy, và cung cấp khí vào môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

5. Phương pháp sản xuất axit glutamic, phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được mô tả ở khía cạnh 1 tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon; và thu gom axit glutamic nhận được bằng cách tiếp xúc.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, vi sinh vật thuộc chi *Pantoea* là hữu dụng để sản xuất các chất hóa học có nguồn gốc từ axetyl-CoA hiệu suất cao, như axit glutamic, bằng cách có thể đề xuất việc đưa quá trình cố định cacbon dioxid hiệu quả vào, và phương pháp sản xuất axetyl-CoA hoặc chất chuyển hóa hữu dụng giống như axit glutamic sử dụng vi sinh vật cũng có thể được đề xuất. Nói cách khác, theo sáng chế, có thể đề xuất vi sinh vật mà là vi khuẩn của chi *Pantoea* có quá trình cố định cacbon dioxid có khả năng chuyển hóa cacbon dioxid thành chất chuyển hóa hữu dụng qua axetyl-CoA với hiệu quả cao. Hơn nữa, theo sáng chế, có thể đề xuất phương pháp sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng, trong đó vi sinh vật được sử dụng.

Là ưu điểm được bổ sung, vi sinh vật theo sáng chế tạo ra ít các chất hóa học sản phẩm phụ bỏ đi trong suốt quá trình lên men, và do đó, vi sinh vật rất có thuận lợi để giảm chi phí cho việc xử lý sản phẩm đầu ra, tái sinh hoặc vứt bỏ. Hơn nữa, vi sinh vật theo sáng chế tạo ra ít sinh khối trong dòng bỏ đi mà dòng này có sự liên quan đáng kể trong việc làm giảm chi phí tái sinh và vứt bỏ chất bỏ đi trong quá trình xử lý công nghiệp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế là vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA thuộc chi *Pantoea* mà thu được bằng cách truyền các hoạt tính enzym malat thiokinaza và hoạt tính enzym malyl-CoA lyaza vào vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d) dưới đây, mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d),

hoặc, ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c) hoặc (d) được truyền, không cho phép các chức năng của chúng có tác dụng:

(a) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;

(b) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat;

(c) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA;

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format.

Theo sáng chế, bằng cách truyền các hoạt tính/hoạt tính enzym, chu trình cố định cacbon dioxit mà cố định CO₂ tạo ra trong sự chuyển hóa đường hoặc CO₂ được cung cấp từ bên ngoài được tạo cấu trúc, và có thể đề xuất vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có quá trình sản xuất axetyl-CoA mà cho phép chuyển hóa hiệu quả CO₂ thành axetyl-CoA.

Nghĩa là, sáng chế được thực hiện bằng cách nghiên cứu tập trung sự chuyển hóa CO₂ thành axetyl-CoA và, kết quả là, tìm ra, như được mô tả ở trên, CO₂ có thể được chuyển hóa thành axetyl-CoA bằng cách truyền hoạt tính enzym malat thiokinaza và hoạt tính enzym malyl-CoA lyaza vào vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d) dưới đây, mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d), hoặc, ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c) hoặc (d) được truyền, không cho phép các chức năng của chúng có tác dụng:

(a) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;

(b) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat;

(c) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA;

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format.

Hơn nữa, bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA chuyển hóa CO₂ thành axetyl-CoA, hoặc bằng cách truyền tiếp các hoạt tính/hoạt tính enzym vào vi

sinh vật, axetyl-CoA và chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA như các chất bao gồm rượu isopropyl, etanol, axeton, axit xitric, axit itaconic, axit axetic, axit butyric, axit (poly-)3-hydroxybutyric, axit 3-hydroxyisobutyric, axit 3-aminoisobutyric, axit 2-hydroxyisobutyric, axit metacrylic, axit (poly)glutamic, glutamin, arginin, ornithin, xitruilin, leuxin, isoleuxin và prolin có thể được tạo ra một cách hiệu quả.

Sáng chế được mô tả dưới đây.

Thuật ngữ “cố định CO₂” trong sáng chế nghĩa là sự chuyển hóa CO₂ sinh ra trong sự trao đổi đường hoặc sự chuyển hóa CO₂ được cung cấp từ bên ngoài thành hợp chất hữu cơ. CO₂ cũng có thể là HCO₃⁻. Trong sáng chế này, “cố định CO₂” cũng có thể đề cập đến ở dạng “sự cố định cacbon dioxit”.

Thuật ngữ “bước” trong sáng chế này bao gồm không chỉ các bước độc lập. Ngay cả khi bước này không thể được phân biệt rõ ràng với các bước khác, thì bước được bao gồm trong thuật ngữ này miễn là mục đích mong muốn của bước có thể đạt được. Hơn nữa, trong sáng chế này, mỗi khoảng bằng số được thể hiện bằng cách sử dụng “đến” nghĩa là khoảng có các giá trị bằng số được mô tả trước và sau “đến” lần lượt ở dạng giá trị tối thiểu và giá trị tối đa.

Trong sáng chế này, khi lượng mỗi thành phần trong chế phẩm được nêu và chế phẩm chứa nhiều chất tương ứng với mỗi thành phần, lượng này nghĩa là tổng lượng của nhiều chất chứa trong chế phẩm trừ khi có quy định khác.

“Khử” hoạt tính enzym trong sáng chế này nghĩa là trạng thái khi đó hoạt tính enzym bị khử đáng kể bằng công nghệ tái tổ hợp gen dùng cho gen mã hóa enzym, so với trạng thái trước khi thực hiện xử lý.

Sự “tăng cường” “hoạt tính” trong sáng chế này hiểu rộng ra là sự tăng cường nhiều hoạt tính enzym trong vi sinh vật so với các hoạt tính trước khi tăng cường.

Phương pháp tăng cường không bị giới hạn miễn là các hoạt tính enzym của vi sinh vật có thể được tăng lên, và ví dụ về phương pháp này bao gồm sự tăng cường bằng gen enzym được đưa vào từ bên ngoài tế bào, sự tăng cường bằng cách tăng sự biểu hiện của gen enzym trong tế bào, và sự kết hợp các phương pháp này.

Ví dụ cụ thể về sự tăng cường bằng gen enzym được đưa vào từ bên ngoài tế bào bao gồm: đưa gen mã hóa enzym có hoạt tính cao hơn enzym được lấy từ chủ thể từ bên ngoài tế bào của vi sinh vật chủ bằng công nghệ tái tổ hợp gen để thêm hoạt

tính enzym bằng gen enzym được đưa vào hoặc thay thế hoạt tính enzym vốn có của chủ thể bằng hoạt tính enzym này; làm tăng số gen enzym lấy từ chủ thể hoặc gen enzym từ bên ngoài tế bào đến không nhỏ hơn 2; và sự kết hợp các phương pháp này.

Các ví dụ cụ thể của việc tăng cường bằng cách tăng sự biểu hiện của gen enzym ở vi sinh vật bao gồm: đưa vào trình tự bazơ mà làm tăng biểu hiện của gen enzym từ bên ngoài vi sinh vật chủ vào vi sinh vật; thay thế gen khởi đầu của gen enzym giữ lại trong bộ gen của vi sinh vật chủ bằng gen khởi đầu khác làm tăng sự biểu hiện của gen enzym; và sự kết hợp các phương pháp này.

Việc “truyền” “hoạt tính” trong sáng chế này hiểu rộng ra là đưa gen enzym từ bên ngoài vào sinh vật không có gen enzym dự định này, để truyền hoạt tính của enzym dự định này. Phương pháp truyền không bị giới hạn cụ thể miễn là hoạt tính của enzym dự định có thể được truyền vào vi sinh vật, và các ví dụ về phương pháp này bao gồm sự biến nạp với plasmid có gen enzym, đưa gen enzym vào bộ gen, và sự kết hợp các phương pháp này.

Gen khởi đầu được sử dụng để “tăng cường” hoặc “truyền” “hoạt tính” không bị giới hạn miễn là gen khởi đầu này cho phép biểu hiện gen, và ví dụ về gen khởi đầu này bao gồm gen khởi đầu cơ định và gen khởi đầu cảm ứng.

Dù vi sinh vật có gen enzym dự định hay không, nó được xác định, có thể dựa vào, ví dụ, thông tin về gen cho mỗi chủng được đăng ký trong KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>) hoặc NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Trong sáng chế này, chỉ có thông tin gen được đăng ký trong KEGG hoặc NCBI được sử dụng.

Theo sáng chế này, hoạt tính enzym có thể được truyền bằng cách đưa gen mã hóa enzym từ bên ngoài tế bào của vi sinh vật chủ vào tế bào bằng công nghệ tái tổ hợp gen. Trong trường hợp này, các loại gen enzym được đưa vào được lấy từ có thể là cùng loại hoặc khác loại tế bào chủ.

Việc điều chế ADN bộ gen cần thiết để đưa gen từ bên ngoài tế bào vào tế bào, phân cắt và nối ADN, biến nạp, PCR (phản ứng chuỗi polymeraza - Polymerase Chain Reaction), và việc thiết kế và tổng hợp các oligonucleotit được sử dụng làm đoạn nối có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương pháp này được mô tả trong, ví dụ,

Sambrook, J., et al., “Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).

Thuật ngữ “bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen” trong sáng chế bao gồm các trường hợp bất kỳ miễn là trình tự bazơ được biến đổi bằng cách cài xen ADN khác vào trình tự bazơ của gen vốn có, hoặc bằng cách thay thế hoặc làm khuyết phần bất kỳ của gen, hoặc sự kết hợp của các phương pháp này. Sự biến đổi này cũng có thể là do, ví dụ, xuất hiện sự đột biến.

“Vật chủ” theo sáng chế nghĩa là vi sinh vật, thuộc chi *Pantoea*, ở trạng thái mà có thể tạo ra hiệu quả của sáng chế, là trạng thái thu được bằng cách đưa vào một hoặc nhiều gen từ bên ngoài vi sinh vật.

“Vật chủ” theo sáng chế còn có nghĩa là vi sinh vật, thuộc chi *Pantoea*, mà có thể có khả năng sản xuất axetyl-CoA từ nguồn nguyên liệu cacbon bằng cách sử dụng cách thức nhất định, bất kể vi sinh vật vốn có có khả năng sản xuất axetyl-CoA từ nguồn nguyên liệu cacbon hay không.

“Vật chủ” theo sáng chế có thể có quá trình sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng. “Chất chuyển hóa hữu dụng” theo sáng chế là thuật ngữ chung cho các chất chuyển hóa chính trong các quá trình chuyển hóa của vi sinh vật, như rượu, axit amin, axit hữu cơ và terpen. Vi sinh vật có thể là vi sinh vật có khả năng sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng bằng cách sử dụng cách thức nhất định, bất kể vi sinh vật vốn có có khả năng sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng hay không.

“Chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA” theo sáng chế là thuật ngữ chung cho các chất chuyển hóa hữu dụng được sản xuất qua axetyl-CoA trong các quá trình chuyển hóa. Đối với rượu, các ví dụ về chất chuyển hóa hữu dụng bao gồm rượu isopropyl, etanol và butanol. Đối với axit amin, các ví dụ về chất chuyển hóa hữu dụng bao gồm axit L-glutamic, L-glutamin, L-arginin, L-ornithin, L-citrulin, L-leucin và L-prolin. Đối với các axit hữu cơ, các ví dụ về chất chuyển hóa hữu dụng bao gồm axit 3-hydroxybutyric, axit poly-3-hydroxybutyric, axit polyglutamic, axit 3-hydroxyisobutyric, axit 3-aminoisobutyric, axit 2-hydroxyisobutyric, axit metacrylic, axit citric, axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit caproic và axit mevalonic. Đối với terpen, các ví dụ về chất chuyển hóa hữu dụng bao gồm isopren, squalen, steroid và carotenoid. Các ví dụ khác về chất chuyển hóa hữu dụng bao gồm axeton. Vi sinh vật có thể là vi sinh vật có khả năng sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA bằng cách sử dụng cách thức nhất

định, bất kể vi sinh vật vốn có có khả năng sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA hay không.

“Sự sản xuất axetyl-CoA” theo sáng chế nghĩa là sự chuyển chất nhất định thành axetyl-CoA trong quá trình chuyển hóa. Vì axetyl-CoA là chất trung gian chuyển hóa và chuyển hóa nhanh thành nhiều chất khác nhau trong quá trình chuyển hóa, lượng axetyl-CoA biểu kiến quan sát được không nhất thiết tăng. Tuy nhiên, hiệu quả có thể đã được biết đến một cách gián tiếp bởi sự phát hiện nhãn có nguồn gốc từ CO_2 trong chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA, bằng cách quan sát sự tăng hiệu suất của chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA so với sự tiêu thụ đường, hoặc bằng cách tương tự. Vì nhiều yếu tố khác nhau (ví dụ, lượng coenzym, lượng cơ chất, và sự thay đổi chuyển hóa do sự ức chế phản hồi) có liên quan đến sự chuyển hóa, lượng sản xuất axetyl-CoA không nhất thiết tỷ lệ thuận với lượng của tất cả các chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA. Tuy nhiên, nếu quá trình sản xuất từ axetyl-CoA thành chất cụ thể được tăng cường hoặc quá trình sản xuất này vốn đã mạnh (ví dụ, trong trường hợp vi sinh vật sản xuất axit glutamic được mô tả dưới đây), hiệu quả chuyển hóa sau từ axetyl-CoA hầu như không bị tác động bởi các yếu tố bên ngoài, để hiệu quả sản xuất của chất có thể có thể được đánh giá là chỉ số hiệu quả sản xuất axetyl-CoA.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế là vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền hoạt tính enzym malat thiokinaza và hoạt tính enzym malyl-CoA lyaza vào vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d) dưới đây, mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d), hoặc, ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c) hoặc (d) được truyền, không cho phép các chức năng của chúng có tác dụng:

(a) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;

(b) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO_2 thành pyruvat;

(c) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO_2 thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA;

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO_2 thành format.

Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tốt hơn là được truyền hoạt tính enzym của malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza.

Thuật ngữ “(vốn đã) không có” ở đây nghĩa là vi sinh vật chủ vốn đã không có chu trình trong môi trường tự nhiên.

“Chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat” theo sáng chế này nghĩa là các chu trình từ (1) đến (7) dưới đây:

- (1) chu trình được thể hiện trên Fig. 1 của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành malonyl-CoA, 3-hydroxypropionat, propionyl-CoA, axit malic và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA;
- (2) chu trình được thể hiện trên Fig. 4A của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành malonyl-CoA, malonat semialdehyt, β -alanin, axit malic và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA;
- (3) chu trình được thể hiện trên Fig. 4B, 16 hoặc 18 của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành malonyl-CoA, hydroxypropionat, (R)-lactat hoặc (S)-lactat, malat và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA.
- (4) chu trình được thể hiện trên Fig. 8 của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành malonyl-CoA, malonat semialdehyt hoặc hydroxypropionat, pyruvat, malat và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA;
- (5) chu trình được thể hiện trên Fig. 9A, 9B hoặc 9C của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành malonyl-CoA, hydroxypropionat, 2-ketoglutarat, malat và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA;
- (6) chu trình được thể hiện trên Fig. 9D hoặc 9F của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành malonyl-CoA, hydroxypropionat, methylmalonyl-CoA, malat và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA; và
- (7) chu trình được thể hiện trên Fig. 17 của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành malonyl-CoA, malonat semialdehyt hoặc hydroxypropionat, methylmalonyl-CoA, pyruvat, oxaloaxetat, malat và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA.

Tất cả chu trình cố định cacbon dioxit từ (1) đến (7) được mô tả ở trên có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat. Các phản ứng này được xúc tác bằng malonat semialdehyt dehydrogenaza hoặc malonyl-CoA reductaza (WO2011/099006). Được tin rằng các phản ứng khử của axit

carboxylic hoặc (thio)este của nó như khử succinyl-CoA hoặc khử malonyl-CoA là khó tiến hành dưới dạng phản ứng enzym nói chung và nên tránh dùng chúng trong các quá trình lên men nhiều nhất có thể (Atsumi et al., *Nature*, 451,(3), 86-89, 2008; Yim et al., *Nat. Chem. Biol.*, 7, 445-452, 2011).

“Chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat” theo sáng chế này nghĩa là các chu trình từ (8) đến (10) dưới đây:

(8) chu trình được thể hiện trên Fig. 1 của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành pyruvat, phosphoenolpyruvat, oxaloaxetat, malat và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA;

(9) chu trình được thể hiện trên Fig. 7C, 7D hoặc 7E của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành pyruvat, malat và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA; và

(10) chu trình được thể hiện trên Fig. 9M của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa thành pyruvat, 2-ketoglutarat, malat và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA.

Tất cả các chu trình cố định cacbon dioxit từ (8) đến (10) có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat. Phản ứng này được xúc tác bởi pyruvat synthaza (WO 2011/099006). Phản ứng tổng hợp pyruvat bởi pyruvat synthaza đòi hỏi năng suất khử mạnh qua ferredoxin; phản ứng chỉ diễn ra chậm; và phản ứng chỉ diễn ra trong các điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt bởi vì phản ứng là nhạy với oxy.

“Chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA” theo sáng chế này nghĩa là chu trình được thể hiện trên Fig. 9H hoặc 9J của WO2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa qua crotonyl-CoA, etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA, oxaloaxetat, malat và malyl-CoA, mà lại được chuyển hóa thành axetyl-CoA.

Sự chuyển hóa được mô tả ở trên từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA được xúc tác bởi crotonyl-CoA carboxylaza/reductaza hoặc methylcrotonyl-CoA carboxylaza. Vì crotonyl-CoA carboxylaza/reductaza có Km đối với carbonat là cao (14 mM; PNAS 104(25)10631-10636, (2007)), hoạt tính không thể được mong đợi ở khoảng nồng độ thấp. Hơn nữa, crotonyl-CoA làm cơ chất được sản xuất từ 3-hydroxybutyryl-CoA bằng phản ứng khử nước, và, trong enzym này, phản ứng hydrat hóa, là phản ứng nghịch đảo, là nổi bật trong môi trường nước thông

thường. Do đó, không thể mong đợi tốc độ đủ cao. Ngoài ra, hoạt tính đặc hiệu đã được báo cáo của methylcrotonyl-CoA carboxylaza không cao như vậy (0,2 U/mg đến 0,6 U/mg; Arch Biochem Biophys. 310(1) 64-75, (1994)), và, tương tự với trường hợp nêu trên, tốc độ sản xuất crotonyl-CoA đủ cao làm cơ chất không thể được mong đợi, tốc độ này là không chắc chắn.

“Chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format” theo sáng chế này nghĩa là chu trình được thể hiện trên các Fig. 5, Fig. 6, Fig. 13 hoặc Fig. 14 của WO2009/046929, nghĩa là, chu trình có quá trình trong đó phản ứng bắt nguồn từ CO₂ qua format và serin, và oxaloaxetat được chuyển hóa thành malat, malyl-CoA và glyxerat, mà lại được chuyển hóa thành oxaloaxetat.

Phản ứng enzym từ CO₂ thành format đòi hỏi năng suất khử mạnh; phản ứng chỉ diễn ra chậm; và phản ứng chỉ diễn ra trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt vì phản ứng là nhạy với oxy.

Trong sáng chế này, thuật ngữ “không thể hiện chức năng của chu trình cố định cacbon dioxit được tác dụng ngay cả khi chu trình cố định cacbon dioxit được truyền” nghĩa là gen của enzym có hoạt tính được đưa vào vi sinh vật không có gen enzym dự định này, để truyền hoạt tính của enzym dự định, nhưng chu trình cố định cacbon dioxit không thực hiện chức năng. Thực tế là “chu trình cố định cacbon dioxit không thực hiện chức năng” có thể đã được biết đến gián tiếp, ví dụ, bởi thực tế là, trong thử nghiệm sử dụng CO₂ được dán nhãn, nhãn có nguồn gốc từ CO₂ không được tìm thấy trong các chất chuyển hóa trong chu trình hoặc chất có nguồn gốc từ các chất chuyển hóa, hoặc thực tế là không có sự tăng hiệu suất của chất có nguồn gốc từ các chất chuyển hóa trong chu trình so với sự tiêu thụ đường.

Quá trình sản xuất axetyl-CoA được tạo cấu trúc trong vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được mô tả ở trên là quá trình chứa malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza. Quá trình sản xuất axetyl-CoA không có enzym mà tiêu thụ axetyl-CoA, như axetyl-CoA carboxylaza hoặc pyruvat synthaza.

Các hoạt tính enzym được truyền cho vi sinh vật thuộc chi *Pantoea* không bị giới hạn cụ thể miễn là các hoạt tính enzym malat thiokinaza và hoạt tính enzym malyl-CoA lyaza được truyền, và các hoạt tính enzym với quá trình cố định cacbon dioxit theo sáng chế có thể được tạo cấu trúc về mặt chức năng có thể được chọn lọc, thích hợp, theo loại vi sinh vật chủ.

Enzym tiêu thụ axetyl-CoA nghĩa là enzym sử dụng axetyl-CoA làm cơ chất và cho phép chuyển hóa thành chất khác. Ví dụ về enzym này bao gồm axetyl-CoA carboxylaza, mà được phân loại dưới dạng mã enzym số 6.4.1.2 dựa trên báo cáo của Tiểu ban enzym của Hội hóa sinh quốc tế (Enzyme commission of International Union of Biochemistry: I.U.B.) và chuyển hóa axetyl-CoA thành malonyl-CoA, và pyruvat synthaza, mà được phân loại dưới dạng mã enzym số 1.2.7.1 và chuyển hóa axetyl-CoA thành pyruvat.

Malat thiokinaza được phân loại dưới dạng mã enzym số 6.2.1.9 dựa trên báo cáo của Tiểu ban enzym của Hội hóa sinh quốc tế (I.U.B.), và là thuật ngữ chung của các enzym gắn kết malat với CoA để đạt được sự chuyển hóa thành malyl-CoA. Trong phản ứng này, một phân tử ATP được tiêu thụ tạo ra một phân tử ADP và một phân tử phosphat. Enzym có cấu trúc siêu phân tử lớn gồm khoảng 400 axit amin và cấu trúc siêu phân tử nhỏ gồm khoảng 300 axit amin. Trong gen này, theo sau cấu trúc siêu phân tử lớn thường là cấu trúc siêu phân tử nhỏ. Trong sáng chế này, để thuận tiện, cấu trúc siêu phân tử lớn được gọi là mtkB, và cấu trúc siêu phân tử nhỏ được gọi là mtkA. Hoạt tính đặc hiệu của enzym này được báo cáo là, ví dụ, 2,5 U/mg đối với enzym đã được tinh chế (Anal Biochem. 227(2), 363-367 (1995)).

Enzym này chủ yếu được tìm thấy trong quá trình đồng hóa đối với các nguồn cacbon C1 như metan (J. Bacteriol. 176(23), 7398-7404 (1994)) và quá trình 3-hydroxypropionat (Arch. Microbiol., 151, 252-256(1989)), và khác biệt ở chỗ malyl-CoA lyaza có mặt trong vùng lân cận trong bộ gen. Enzym này có thể được sử dụng thích hợp.

Ví dụ về malat thiokinaza bao gồm các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens*, các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* và *Hyphomicrobium denitrificans*, các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Rhizobium* như *Rhizobium* sp. NGR234, các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Granulibacter* như *Granulibacter bethesdensis*, các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Nitrosomonas* như *Nitrosomonas europaea*, các malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*, và các malat thiokinaza có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria.

Xét về hiệu quả sản xuất các chất hữu dụng thông qua axetyl-CoA, các ví dụ được đặc biệt ưu tiên của trình tự axit amin bao gồm các trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium*, các trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Rhizobium*, các trình

tự axit amin có nguồn gốc từ *Nitrosomonas*, các trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Methylococcus*, và các trình tự axit amin có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria.

Malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium*, malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Rhizobium* và malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Nitrosomonas* có 65% đến 80% độ tương đồng trình tự với nhau. Malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylococcus* có 70% đến 80% độ tương đồng trình tự với malat thiokinaza có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria.

Malat thiokinaza có không ít hơn 70% độ tương đồng trình tự với mỗi trong số các trình tự axit amin của malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium*, malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Rhizobium*, malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Nitrosomonas*, malat thiokinaza có nguồn gốc từ *Methylococcus* và malat thiokinaza có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria được bộc lộ trong sáng chế này, và có hoạt tính malat thiokinaza có thể được sử dụng thích hợp để sản xuất axetyl-CoA hoặc sản xuất sản phẩm hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA theo sáng chế.

Để làm gen mã hóa malat thiokinaza (mtk), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa malat thiokinaza thu được từ mỗi trong số các sinh vật có nguồn gốc nêu trên hoặc trình tự ADN tổng hợp được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này.

Ví dụ được ưu tiên về ADN bao gồm các ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens*, gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* và *Hyphomicrobium denitrificans*, gen có nguồn gốc từ *Rhizobium* như *Rhizobium* sp. NGR234, gen có nguồn gốc từ *Granulibacter* như *Granulibacter bethesdensis*, gen có nguồn gốc từ *Nitrosomonas* như *Nitrosomonas europaea*, gen có nguồn gốc từ *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*, và gen có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria.

Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, các ví dụ được ưu tiên về ADN bao gồm các ADN có các trình tự bazơ có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium*, các trình tự bazơ có nguồn gốc từ *Rhizobium*, các trình tự bazơ có nguồn gốc từ *Granulibacter*, các trình tự bazơ có nguồn gốc từ *Nitrosomonas*, các trình tự bazơ có nguồn gốc từ *Methylococcus*, và các trình tự bazơ có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria.

Các ví dụ đặc biệt được ưu tiên về các trình tự bazơ bao gồm các trình tự bazơ có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium*, các trình tự bazơ có nguồn gốc từ *Rhizobium* sau

khi tối ưu hóa codon, các trình tự bazơ có nguồn gốc từ *Nitrosomonas*, các trình tự bazơ có nguồn gốc từ *Methylococcus*, và các trình tự bazơ có nguồn gốc từ Gammaproteobacteria.

Malyl-CoA lyaza là enzym mà được phân loại dưới dạng mã enzym số 4.1.3.24 dựa trên báo cáo của Tiểu ban enzym của Hội hóa sinh quốc tế (I.U.B.) và sản xuất glyoxylat và axetyl-CoA từ malyl-CoA. Ví dụ về enzym bao gồm các enzym có nguồn gốc từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens*, *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* và *Hyphomicrobium denitrificans*, *Chloroflexus* như *Chloroflexus aurantiacus*, *Nitrosomonas* như *Nitrosomonas europaea*, và *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*.

Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, các ví dụ đặc biệt được ưu tiên về trình tự axit amin bao gồm trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Methylobacterium*, các trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium*, trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Nitrosomonas*, và trình tự axit amin có nguồn gốc từ *Methylococcus*.

Ví dụ, hoạt tính đặc hiệu của malyl-CoA lyaza trong *Methylobacterium extorquens* được báo cáo là 28,1 U/mg đối với enzym đã được tinh chế (Biochem. J. 139, 399-405, (1974)).

Để làm gen mã hóa malyl-CoA lyaza (mcl), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa malyl-CoA lyaza thu được từ mỗi trong số các sinh vật có nguồn gốc nêu trên hoặc trình tự ADN tổng hợp được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này. Các ví dụ được ưu tiên về ADN bao gồm các ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens*, gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* và *Hyphomicrobium denitrificans*, và gen có nguồn gốc từ *Chloroflexus* như *Chloroflexus aurantiacus*. Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, các ví dụ đặc biệt được ưu tiên về ADN bao gồm các ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium* và gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium*.

Các ví dụ đặc biệt được ưu tiên về các trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium* bao gồm trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylobacterium extorquens*; các ví dụ đặc biệt được ưu tiên về các trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium* bao gồm trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium methylovorum* và trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Hyphomicrobium denitrificans*; các ví dụ đặc biệt được ưu tiên về các trình tự bazơ của gen có nguồn

gốc từ *Nitrosomonas* bao gồm trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Nitrosomonas europaea*; và các ví dụ đặc biệt được ưu tiên về các trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylococcus* bao gồm trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus*.

Axetyl-CoA carboxylaza được phân loại dưới dạng mã enzyme số 6.4.1.2 dựa trên báo cáo của Tiểu ban enzyme của Hội hóa sinh quốc tế (I.U.B.), và là thuật ngữ chung của các enzyme mà chuyển hóa axetyl-CoA và CO₂ thành malonyl-CoA.

Malonat semialdehyt dehydrogenaza được phân loại dưới dạng mã enzyme số 1.2.1.18 dựa trên báo cáo của Tiểu ban enzyme của Hội hóa sinh quốc tế (I.U.B.), và là thuật ngữ chung của các enzyme mà chuyển hóa malonyl-CoA thành malonat semialdehyt.

Malonyl-CoA reductaza là thuật ngữ chung của các enzyme mà chuyển hóa malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat.

Crotonyl-CoA carboxylaza/reductaza được phân loại dưới dạng mã enzyme số 1.3.1.85 dựa trên báo cáo của Tiểu ban enzyme của Hội hóa sinh quốc tế (I.U.B.), và là thuật ngữ chung của các enzyme mà chuyển hóa crotonyl-CoA thành etylmalonyl-CoA.

Methylcrotonyl-CoA carboxylaza được phân loại dưới dạng mã enzyme số 6.4.1.4 dựa trên báo cáo của Tiểu ban enzyme của Hội hóa sinh quốc tế (I.U.B.), và là thuật ngữ chung của các enzyme mà chuyển hóa crotonyl-CoA thành glutaconyl-CoA.

Pyruvat synthaza được phân loại dưới dạng mã enzyme số 1.2.7.1 dựa trên báo cáo của Tiểu ban enzyme của Hội hóa sinh quốc tế (I.U.B.), và là thuật ngữ chung của các enzyme mà chuyển hóa axetyl-CoA thành pyruvat.

Phosphoenolpyruvat carboxylaza được phân loại dưới dạng mã enzyme số 4.1.1.31 dựa trên báo cáo của Tiểu ban enzyme của Hội hóa sinh quốc tế (I.U.B.), và là thuật ngữ chung của các enzyme mà chuyển hóa phosphoenolpyruvat và cacbon dioxit thành oxaloacetat và phosphat. Ví dụ về enzyme này bao gồm các enzyme có nguồn gốc từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*; vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*; vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*; vi khuẩn *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum*; vi khuẩn *Starkeya* như *Starkeya novella*; vi khuẩn *Rhodopseudomonas* như *Rhodopseudomonas* sp.; và vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces coelicolor*.

Để làm gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza (ppc), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza thu được từ mỗi trong số các sinh vật có nguồn gốc nêu trên hoặc trình tự ADN tổng hợp được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ đã biết của gen này. Các ví dụ được ưu tiên về ADN bao gồm các ADN có trình tự bazơ của gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*; vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*; vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*; vi khuẩn *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum*; vi khuẩn *Starkeya* như *Starkeya novella*; vi khuẩn *Rhodopseudomonas* như *Rhodopseudomonas* sp.; và vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces coelicolor*.

Ngoài quá trình chuyển hóa axetyl-CoA thành chất chuyển hóa hữu dụng, vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có thể có quá trình mà sản xuất chất chuyển hóa khác sử dụng axetyl-CoA làm nguyên liệu thô, hoặc hoạt tính enzym có liên quan đến quá trình sản xuất chất chuyển hóa khác có thể được tăng cường. Bằng cách này, chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA có thể được sản xuất từ nguồn nguyên liệu cacbon và cacbon dioxit, trong khi hiệu suất của chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA có thể được tăng lên.

Vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn miễn là vi sinh vật thuộc chi *Pantoea*, và không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), hoặc (d) dưới đây:

(a) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;

(b) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ đến pyruvat;

(c) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA;

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format.

Ví dụ về các chủng đại diện của vi khuẩn *Pantoea* bao gồm *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Pantoea agglomerans*, và *Pantoea citrea*. Ví dụ cụ thể về các chủng này bao gồm như sau.

· *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614) (EP 0952221 A)

· *Pantoea ananatis* AJ13356 (FERM BP-6615) (EP 0952221 A)

Mặc dù các chủng này được mô tả là *Enterobacter agglomerans* trong EP 0952221 A, nhưng các chủng này được phân loại lại thành *Pantoea ananatis* như được mô tả ở trên dựa trên phân tích trình tự bazơ của 16S rARN và dạng tương tự.

Ví dụ về quá trình sản xuất các chất chuyển hóa khác sử dụng axetyl-CoA làm nguyên liệu thô bao gồm quá trình sản xuất axit glutamic từ axetyl-CoA. Vi sinh vật được sản xuất bằng cách sử dụng vi sinh vật có quá trình sản xuất axit glutamic hiệu quả (sau đây có thể được gọi là “vi sinh vật sản xuất axit glutamic”) làm vật chủ và truyền hoặc tăng cường các hoạt tính enzym tương ứng được mô tả ở trên trong quá trình sản xuất axit glutamic từ axetyl-CoA hoặc làm bất hoạt hoặc làm giảm các hoạt tính enzym làm ức chế sự sản xuất axit glutamic từ axetyl-CoA có thể là một ví dụ được ưu tiên về vi sinh vật có quá trình sản xuất các chất chuyển hóa khác hoặc sản xuất vi sinh vật có hoạt tính enzym có liên quan đến quá trình sản xuất chất chuyển hóa được tăng cường.

Vi sinh vật sản xuất axit glutamic có thể là vi sinh vật bất kỳ miễn là có thể đưa vào hoặc biến đổi gen để truyền khả năng sản xuất axit glutamic. Tốt hơn nữa là, vi sinh vật sản xuất axit glutamic có thể là vi khuẩn *Pantoea* mà truyền sơ bộ khả năng sản xuất axit glutamic, và, bằng cách này, axit glutamic có thể được sản xuất hiệu quả hơn.

Ví dụ về phương pháp truyền khả năng sản xuất axit glutamic vào vi sinh vật bao gồm việc biến đổi vi sinh vật sao cho biểu hiện của gen mã hóa enzym có liên quan đến quá trình sinh tổng hợp của axit L-glutamic được tăng lên và/hoặc gen được quá biểu hiện. Ví dụ về enzym sinh tổng hợp axit L-glutamic bao gồm glutamat dehydrogenaza, glutamin synthetaza, glutamat synthaza, isoxitrat dehydrogenaza, aconitat hydrataza, xitrat synthaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, pyruvat carboxylaza, pyruvat dehydrogenaza, pyruvat kinaza, phosphoenolpyruvat synthaza, enolaza, phosphoglyxeromutaza, phosphoglyxerat kinaza, glyxeraldehyt 3-phosphat dehydrogenaza, trioza phosphat isomeraza, fructoza bisphosphat aldolaza, phosphofructokinaza và glucoza phosphat isomeraza. Tốt hơn là, trong số các enzym này, một hoặc nhiều xitrat synthaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza và glutamat dehydrogenaza có hoạt tính tăng, và, tốt hơn nữa là, tất cả trong số ba enzym này có hoạt tính được tăng cường.

Ví dụ về vi sinh vật sản xuất axit glutamic bao gồm vi sinh vật sản xuất axit glutamic được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (JP-A) số 2005-278643.

Đối với vi sinh vật sản xuất axit L-glutamic, có thể sử dụng vi sinh vật có khả năng tích lũy axit L-glutamic với lượng vượt quá nồng độ bão hòa của axit L-glutamic trong môi trường lỏng khi vi sinh vật được nuôi cấy trong các điều kiện có tính axit (sau đây có thể được gọi là khả năng tích lũy axit L-glutamic trong các điều kiện có tính axit). Ví dụ, chủng có độ bền axit L-glutamic tăng lên trong môi trường có độ pH thấp có thể thu được bằng phương pháp được mô tả trong EP 1078989 A, để truyền khả năng tích lũy axit L-glutamic với lượng vượt quá nồng độ bão hòa.

Ví dụ cụ thể về vi sinh vật vốn có khả năng tích lũy axit L-glutamic trong các điều kiện có tính axit bao gồm chủng *Pantoea ananatis* AJ13356 (FERM BP-6615) và chủng AJ13601 (FERM BP-7207) (xem EP 0952221 A đối với các chủng này). *Pantoea ananatis* AJ13356 được nộp lưu vào National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (tên hiện nay: International Patent Organism Depositary, National Institute of Technology and Evaluation (IPOD, NITE); địa chỉ: Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan) theo số truy cập FERM P-16645 vào ngày 19 tháng 2 năm 1998, và mẫu nộp lưu được chuyển đến cơ quan nộp lưu quốc tế theo Hiệp ước Budapest theo số truy cập FERM BP-6615 vào ngày 11 tháng 1 năm 1999. Lưu ý là chủng này được nhận diện là *Enterobacter agglomerans* và được nộp lưu ở dạng *Enterobacter agglomerans* AJ13355 khi chủng này được phân lập lần đầu tiên, nhưng, theo phân tích trình tự bazơ gần đây của 16S rRNA và dạng tương tự, chủng này được phân loại lại là *Pantoea ananatis* (xem các ví dụ dưới đây). Hơn nữa, mặc dù các chủng AJ13356 và AJ13601 nêu dưới đây có nguồn gốc từ AJ13355 được nộp lưu tương tự vào cơ quan nộp lưu nêu trên ở dạng *Enterobacter agglomerans*, nhưng các chủng này được mô tả ở dạng *Pantoea ananatis* trong bản mô tả này. AJ13601 được nộp lưu vào National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (tên hiện nay: International Patent Organism Depositary, National Institute of Technology and Evaluation (IPOD, NITE) theo số truy cập FERM P-17156 vào ngày 18 tháng 8 năm 1999, và mẫu nộp lưu được chuyển đến cơ quan nộp lưu quốc tế theo Hiệp ước Budapest theo số truy cập FERM BP-7207 vào ngày 6 tháng 7 năm 2000.

Các ví dụ khác về phương pháp truyền hoặc tăng cường khả năng sản xuất axit L-glutamic bao gồm phương pháp trong đó truyền độ bền đối với chất tương tự axit hữu cơ hoặc chất ức chế hô hấp, và phương pháp trong đó truyền độ nhạy đối với chất

ức chế sự tổng hợp thành tế bào. Các ví dụ cụ thể về phương pháp này bao gồm phương pháp trong đó truyền độ bền đối với axit monofloaxetic (JP 50-113209 A), phương pháp trong đó truyền độ bền đối với adenin hoặc độ bền đối với thymin (JP 57-065198 A), phương pháp trong đó làm yếu ureaza (JP 52-038088 A), phương pháp trong đó truyền độ bền đối với axit malonic (JP 52-038088 A), phương pháp trong đó truyền độ bền đối với benzopyron hoặc naphthoquinon (JP 56-1889 A), phương pháp trong đó truyền độ bền đối với HOQNO (JP 56-140895 A), phương pháp trong đó truyền độ bền đối với axit α -ketomalonic (JP 57-2689 A), phương pháp trong đó truyền độ bền đối với guanidin (JP 56-35981 A), và phương pháp trong đó truyền độ bền đối với penixilin (JP 4-88994 A).

Các ví dụ cụ thể về vi sinh vật có tính bền này bao gồm các chủng sau.

- *Brevibacterium flavum* AJ3949 (FERM BP-2632; xem JP 50-113209A)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11628 (FERM P-5736; xem JP 57-065198A)
- *Brevibacterium flavum* AJ11355 (FERM P-5007; xem JP 56-1889 A)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11368 (FERM P-5020; xem JP 56-1889A)
- *Brevibacterium flavum* AJ11217 (FERM P-4318; xem JP 57-2689 A)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11218 (FERM P-4319; xem JP 57-2689 A)
- *Brevibacterium flavum* AJ11564 (FERM P-5472; xem JP 56-140895 A)
- *Brevibacterium flavum* AJ11439 (FERM P-5136; xem JP 56-35981 A)
- *Corynebacterium glutamicum* H7684 (FERM BP-3004; xem JP 04-88994 A)
- *Brevibacterium lactofermentum* AJ11426 (FERM P-5123; xem JP 56-048890 A)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11440 (FERM P-5137; xem JP 56-048890 A)
- *Brevibacterium lactofermentum* AJ11796 (FERM P-6402; xem JP 58-158192 A)

Các ví dụ về vi sinh vật vốn đã có mtk và mcl bao gồm vi sinh vật methanotrophic như *Methylobacterium extorquens*. Vì các hệ vectơ thích hợp đối với vi sinh vật methanotrophic hoặc các kỹ thuật để cải biến các gen trong bộ gen của vi sinh vật methanotrophic đã không được phát triển, nên thao tác di truyền của các vi

sinh vật này là khó khăn hơn so với các vi sinh vật như *Pantoea*. Hơn nữa, các vi sinh vật này thường sinh trưởng chậm và do đó không thích hợp để sản xuất các chất chuyển hóa hữu dụng.

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA hoặc axit glutamic theo sáng chế bao gồm việc sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA để sản xuất axetyl-CoA hoặc axit glutamic làm sản phẩm mong muốn từ nguồn nguyên liệu cacbon. Nghĩa là, phương pháp sản xuất axetyl-CoA bao gồm các bước: đưa vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA vào tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon và tiến hành nuôi cấy (dưới đây được gọi là bước nuôi cấy); và thu hồi sản phẩm mong muốn (axetyl-CoA hoặc axit glutamic) thu được bởi sự tiếp xúc này (dưới đây được gọi là bước thu hồi).

Theo phương pháp sản xuất axetyl-CoA, vì vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được đưa vào tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon khi vi sinh vật này được nuôi cấy, nên nguồn nguyên liệu cacbon được đồng hóa bởi vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, và sản phẩm mong muốn có thể được sản xuất hiệu quả trong khi cacbon dioxit được cố định.

Nguồn nguyên liệu cacbon không bị giới hạn miễn là nguyên liệu này chứa nguồn cacbon mà có thể được đồng hóa bởi vi sinh vật, và nguyên liệu này tốt hơn là nguyên liệu có nguồn gốc từ thực vật.

Ví dụ về nguyên liệu có nguồn gốc thực vật bao gồm các cơ quan như rễ, thân, thân cây, cành, lá, hoa và hạt; phần chính của thực vật chứa các cơ quan này; và sản phẩm phân hủy của các cơ quan của thực vật. Hơn nữa, trong số các nguồn cacbon thu được từ phần chính của thực vật, các cơ quan của thực vật và sản phẩm phân hủy của chúng, các phần mà có thể được dùng làm các nguồn cacbon trong việc nuôi cấy vi sinh vật cũng có trong nguyên liệu có nguồn gốc thực vật.

Ví dụ về nguồn cacbon có trong nguyên liệu có nguồn gốc thực vật thường bao gồm đường như tinh bột, sucroza, glucoza, fructoza, galactoza, mannoza, xyloza và arabinoza; các sản phẩm phân hủy của nguyên liệu thảo mộc và gỗ chứa lượng lớn các thành phần này; xenluloza hydrolysat; và hỗn hợp của chúng. Hơn nữa, glyxerin và axit béo có nguồn gốc từ dầu thực vật cũng có thể có trong nguồn cacbon theo sáng chế.

Các ví dụ được ưu tiên về nguyên liệu có nguồn gốc thực vật bao gồm các cây trồng như ngũ cốc; ngô; lúa; lúa mì; đậu tương; mía; củ cải đường; cây bông; và hỗn

hợp của chúng. Các ví dụ về cách dùng nguyên liệu thô bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các sản phẩm thô, nước ép và sản phẩm được ép. Nguồn cacbon cũng có thể được sử dụng.

Ở bước nuôi cấy, vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA thường được đưa vào tiếp xúc với nguyên liệu có nguồn gốc thực vật bằng cách nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong môi trường chứa nguyên liệu có nguồn gốc thực vật.

Mật độ tiếp xúc khi nguyên liệu có nguồn gốc thực vật được đưa vào tiếp xúc với vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA thay đổi tùy thuộc vào hoạt tính của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, và nồng độ của nguyên liệu có nguồn gốc thực vật trong môi trường có thể thường không cao hơn 20% theo khối lượng đối với nồng độ đường ban đầu được tính bằng cách chuyển hóa thành glucoza, so với tổng khối lượng hỗn hợp. Xét độ dung nạp glucoza của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, nồng độ đường ban đầu tốt hơn là có thể không cao hơn 15% theo khối lượng. Các thành phần khác không bị giới hạn miễn là các thành phần này được bổ sung vào ở lượng thường được dùng cho môi trường nuôi cấy cho vi sinh vật.

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA hoặc axit glutamic có thể còn bao gồm bước cung cấp ion carbonat, ion hydro carbonat, khí cacbon dioxit (khí CO₂) và/hoặc chất khử vào môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy (dưới đây được gọi là "quy trình cấp"). Đối với các điều kiện trong quy trình cấp như nhiệt độ hoặc độ pH, có thể dùng các điều kiện giống như trong quy trình nuôi cấy.

Việc cung cấp ion carbonat, ion hydro carbonat và/hoặc khí cacbon dioxit cho môi trường nuôi cấy sử dụng để nuôi cấy gia tăng hoạt tính enzym của, ví dụ, phosphoenolpyruvat carboxylaza, pyruvat carboxylaza và/hoặc phosphoenolpyruvat carboxykinaza, và làm tăng lượng cacbon dioxit cố định, nhờ đó axetyl-CoA hoặc chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA có thể được sản xuất hiệu quả.

Ion carbonat hoặc ion hydro carbonat có thể có nguồn gốc từ chất có khả năng tạo ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat khi được cấp vào môi trường nuôi cấy. Các ví dụ về chất có khả năng tạo ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat bao gồm natri carbonat, natri hydro carbonat, kali carbonat, kali hydro carbonat, amoni carbonat, amoni hydro carbonat, magie carbonat và canxi carbonat.

Lượng ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat được cấp vào môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là axetyl-CoA hoặc chất chuyển hóa hữu dụng có

nguồn gốc từ axetyl-CoA có thể được sản xuất hiệu quả. Ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat tốt hơn là được cấp vào ở lượng tổng là 150 mmol hoặc nhiều hơn tính theo 1L môi trường nuôi cấy. Việc cấp ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat ở lượng 150 mmol/L hoặc nhiều hơn đủ làm tăng hiệu suất của axetyl-CoA hoặc chất tương tự, và do đó được ưu tiên. Các ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat tốt hơn nữa là được cấp vào ở lượng tổng là 200 mmol hoặc nhiều hơn tính theo 1L môi trường nuôi cấy.

Tổng lượng ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat được cấp tốt hơn là 5 mol hoặc ít hơn tính theo 1L môi trường nuôi cấy. Khi tổng lượng cấp vào tính theo 1L môi trường nuôi cấy là 5 mol hoặc ít hơn, thì ít có khả năng các ion carbonat và các ion hydro carbonat, mà không được sử dụng bởi vi sinh vật, có mặt trong quy trình nuôi cấy với lượng lớn. Tổng lượng ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat được cấp tính theo 1L môi trường nuôi cấy tốt hơn nữa là 3 mol hoặc ít hơn, và còn tốt hơn nữa là 2 mol hoặc ít hơn.

Phương pháp cấp ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat vào môi trường nuôi cấy có thể là phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat có thể được cấp ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy hoặc trong suốt quá trình nuôi cấy, và giai đoạn mà tại đó các ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat được cấp không bị giới hạn cụ thể. Tất cả các ion carbonat và/hoặc ion hydro carbonat có thể được cấp một lần, hoặc nhiều lần thành nhiều phần.

Khí cacbon dioxid có thể là khí bất kỳ chứa cacbon dioxid, và có thể là, ví dụ, không khí. Nồng độ cacbon dioxid của khí cacbon dioxid tốt hơn là bằng hoặc cao hơn nồng độ cacbon dioxid của không khí, tốt hơn nữa là 0,1% v/v (thể tích) hoặc cao hơn, và còn tốt hơn nữa là 1% v/v hoặc cao hơn.

Nồng độ cacbon dioxid tốt hơn là 75% v/v hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 50% v/v hoặc thấp hơn, và còn tốt hơn nữa là 25% v/v hoặc thấp hơn.

Khí cacbon dioxid có thể được hòa tan trong môi trường nuôi cấy bằng cách tạo bọt, v.v.. Đường kính bọt trung bình của khí cacbon dioxid được cấp cho môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là axetyl-CoA hoặc chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA có thể được sản xuất hiệu quả.

Tốt hơn là, khí cacbon dioxid có đường kính bọt trung bình, ví dụ, 100 μm hoặc hơn. Khí cacbon dioxid có đường kính bọt trung bình là 100 μm hoặc hơn được ưu tiên.

vì, với đường kính bọt trung bình nằm trong khoảng này, không chắc thực hiện được việc tiếp tục nuôi cấy lên men khó khăn bằng cách tăng dư bọt khí trong môi trường nuôi cấy. Khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 200 μm hoặc hơn được ưu tiên hơn, và khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 500 μm hoặc hơn được ưu tiên hơn nữa. Tuy nhiên, đường kính bọt trung bình của khí cacbon dioxit tốt hơn là 100 μm hoặc nhỏ hơn. Đường kính bọt trung bình là 100 μm hoặc nhỏ hơn được ưu tiên vì, với đường kính bọt trung bình nằm trong khoảng này, cacbon dioxit hòa tan đủ trong môi trường nuôi cấy. Khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 50 μm hoặc nhỏ hơn được ưu tiên hơn, và khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 20 μm hoặc nhỏ hơn được ưu tiên hơn nữa.

Khí cacbon dioxit có thể được cấp cho môi trường nuôi cấy, sử dụng máy tạo bọt được dùng thông thường. Ví dụ về các máy tạo bọt bao gồm máy phun không khí.

Ví dụ về các phương pháp đo đường kính bọt trung bình bao gồm LS 13 320 (được sản xuất bởi hãng Beckman Coulter Inc.), đo đường kính bọt trung bình sử dụng phương pháp tán xạ nhiễu xạ laze, Multisizer 3 (được sản xuất bởi hãng Beckman Coulter Inc), đo đường kính bọt trung bình sử dụng phương pháp điện trở lỗ rỗng, và phương pháp chụp hình ảnh được tạo bóng sử dụng máy quay video tốc độ cao, và thu được đường kính bọt trung bình thông qua việc xử lý hình ảnh dạng nhị phân.

Chất khử không bị giới hạn cụ thể miễn là chất khử có khả năng khử các thành phần trong môi trường nuôi cấy hoặc trong vi sinh vật trong suốt quá trình nuôi cấy trong khi tự chất khử bị oxy hóa. Các ví dụ của chúng bao gồm các hợp chất chứa lưu huỳnh, các hợp chất cacbon, hydro, v.v..

Ví dụ về hợp chất chứa lưu huỳnh bao gồm sulfite (như natri sulfite, natri hydro sulfite, kali sulfite và amoni sulfite), thiosulfat (như natri thiosulfat và kali thiosulfat), các muối của ion sulfua (như natri sulfua, natri hydro sulfua, kali sulfua và amoni sulfua), xystein, lưu huỳnh dioxit và hydro sulfua.

Ví dụ về các hợp chất chứa cacbon bao gồm rượu, axit béo, parafin và cacbon monooxit.

Ví dụ về các chất khử được ưu tiên bao gồm các hợp chất chứa lưu huỳnh, và, trong số chúng, natri sulfite, natri hydro sulfite, natri sulfat và xystein được ưu tiên, và natri sulfite được ưu tiên nhất.

Nồng độ chất khử được cấp vào môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là axetyl-CoA hoặc chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA có thể được sản xuất hiệu quả, và có thể được đặt, nếu thích hợp, theo các thành phần được cung cấp. Ví dụ, nồng độ natri sulfit tốt hơn là 0,01 g hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 0,1 g hoặc cao hơn, và còn tốt hơn nữa là 1 g hoặc cao hơn, tính theo 1L môi trường nuôi cấy. Nồng độ chất khử được cấp tốt hơn là 50 g/L hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 20 g/L hoặc thấp hơn, và còn tốt hơn nữa là 10 g/L hoặc thấp hơn.

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA hoặc axit glutamic có thể còn bao gồm việc thu gom khí chứa cacbon dioxid được tạo ra bằng cách nuôi cấy, và cung cấp khí vào môi trường nuôi cấy được sử dụng cho việc nuôi cấy (dưới đây được gọi là "quy trình cấp khí"). Nói cách khác, thừa rằng khí cacbon dioxid thoát ra ở dạng khí thải còn hơn được tiêu thụ trong môi trường nuôi cấy có thể được tái sinh trong suốt quá trình tuần hoàn bằng cách cung cấp lại cho môi trường nuôi cấy.

Phương pháp dùng để cung cấp khí cho môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là phương pháp này thường được dùng cho mục đích này. Ví dụ về phương pháp này bao gồm: phương pháp phun khí, bằng cách tăng áp, vào chất lỏng qua lỗ nhỏ hình tròn hoặc hình chữ nhật (được đề cập đến ở dạng "chất thông khí" hoặc "sự thông khí" trong trường hợp khí là không khí); phương pháp cung cấp khí từ ống rỗng có các lỗ trên chu vi bề mặt ống (được gọi là "ống hút"); và phương pháp sử dụng máy phun không khí (thiết bị khuếch tán khí), là ống nhựa hoặc ống thép không gỉ có vật liệu rỗng có nhiều lỗ để sinh ra bọt khí nhỏ hoặc tương tự được gắn với phần cuối của ống.

Thành phần vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong môi trường thay đổi phụ thuộc vào loại và hoạt tính của vi sinh vật, và lượng huyền phù của vi sinh vật được nuôi cấy sơ bộ ban đầu được cung cấp cho việc nuôi cấy có thể là từ 0,1% theo khối lượng đến 30% theo khối lượng đối với dịch lỏng nuôi cấy, tốt hơn là 1% theo khối lượng đến 10% theo khối lượng xét về sự kiểm soát điều kiện nuôi cấy.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA không bị giới hạn miễn là môi trường này là môi trường thông thường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ và ion vô cơ, cũng như các chất dinh dưỡng vi lượng vô cơ, axit nucleic và vitamin cần cho vi sinh vật để sản xuất sản phẩm mong muốn.

Các điều kiện nuôi cấy ở bước nuôi cấy không bị giới hạn, và, ví dụ, có thể tiến hành nuôi cấy trong các điều kiện ưa khí trong khi độ pH và nhiệt độ được điều chỉnh

thích hợp nằm trong khoảng pH từ 4 đến 9, tốt hơn là độ pH từ 6 đến 8, và nhiệt độ từ 20°C đến 50°C, tốt hơn là 25°C đến 42°C.

Tốc độ thông khí của hỗn hợp không bị giới hạn, và, chỉ khi không khí được sử dụng làm khí, tốc độ thông khí thường là 0,02 vvm đến 2,0 vvm (vvm: thể tích thông khí [mL]/thể tích lỏng [mL]/thời gian [phút]) ở 50 đến 600 vòng/phút (revolutions per minute: rpm). Xét về việc ngăn chặn sự bất lợi về mặt vật lý đối với vi sinh vật, thực hiện sự thông khí tốt hơn là ở 0,1 vvm đến 2,0 vvm, tốt hơn nữa là ở 0,1 vvm đến 1,0 vvm.

Bước nuôi cấy có thể được tiếp tục từ lúc bắt đầu nuôi cấy cho đến khi nguồn nguyên liệu cacbon trong hỗn hợp được tiêu thụ, hoặc cho đến khi hoạt tính vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA biến mất. Khoảng thời gian của bước nuôi cấy thay đổi phụ thuộc vào số lượng và hoạt tính của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong hỗn hợp, và phụ thuộc vào số lượng nguồn nguyên liệu cacbon. Nói chung, khoảng thời gian này có thể là không ít hơn 1 giờ, tốt hơn là không ít hơn 4 giờ. Ngoài ra, bằng cách cung cấp nguồn nguyên liệu cacbon và/hoặc vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, khoảng thời gian nuôi cấy này có thể được kéo dài mà không giới hạn, nhưng, xét về hiệu quả xử lý, nói chung khoảng thời gian này có thể không quá 5 ngày, tốt hơn là không quá 72 giờ. Đối với các điều kiện khác, có thể dùng các điều kiện được sử dụng trong việc nuôi cấy thông thường.

Phương pháp thu hồi sản phẩm mong muốn được tích lũy trong dịch lỏng nuôi cấy là không bị giới hạn, và ví dụ về phương pháp có thể được dùng bao gồm phương pháp trong đó tế bào vi sinh vật được loại bỏ khỏi dịch lỏng nuôi cấy bằng cách ly tâm hoặc tương tự, sau đó tách sản phẩm mong muốn bằng phương pháp tách thông thường như kết tinh hoặc tách sắc ký hoặc tách màng trong các điều kiện phụ thuộc vào loại sản phẩm mong muốn.

Phương pháp theo sáng chế để sản xuất axetyl-CoA có thể bao gồm, trước bước nuôi cấy, bước nuôi cấy sơ bộ để điều chỉnh thích hợp số lượng tế bào và/hoặc trạng thái hoạt tính của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được sử dụng. Bước nuôi cấy sơ bộ không bị giới hạn miễn là bước này là nuôi cấy trong các điều kiện thông thường được dùng phụ thuộc vào loại vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA.

Phương pháp sản xuất axit glutamic theo sáng chế bao gồm việc sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA để sản xuất axit glutamic làm sản phẩm mong muốn từ nguồn nguyên liệu cacbon. Nghĩa là, phương pháp sản xuất axit glutamic bao gồm các bước:

đưa vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA vào tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon và tiến hành nuôi cấy (dưới đây được gọi là bước nuôi cấy); và thu hồi sản phẩm mong muốn (axit glutamic) thu được bằng sự tiếp xúc này (dưới đây được gọi là bước thu hồi).

Theo phương pháp sản xuất axit glutamic, vi vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được đưa vào tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon khi vi sinh vật được nuôi cấy, nên nguồn nguyên liệu cacbon được đồng hóa bởi vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, và sản phẩm mong muốn có thể được sản xuất hiệu quả trong khi cacbon dioxit được cố định.

Môi trường được sử dụng cho việc nuôi cấy không bị giới hạn miễn là nó là môi trường bình thường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ và muối vô cơ, cũng như chất dinh dưỡng vi lượng hữu cơ như các axit amin và vitamin, nếu cần. Môi trường tổng hợp hoặc môi trường tự nhiên có thể được sử dụng. Nguồn cacbon và nguồn nitơ sử dụng trong môi trường có thể là loại bất kỳ miễn là các nguồn này có thể được dùng bởi chúng được nuôi cấy.

Ví dụ về nguồn nguyên liệu cacbon có thể được sử dụng bao gồm đường như glucoza, glyxerol, fructoza, sucroza, maltoza, manosa, galactoza, dịch thủy phân tinh bột, và ri đường. Các axit hữu cơ như axit axetic hoặc axit xitric, và rượu như etanol có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với các nguồn cacbon khác.

Ví dụ về nguồn nitơ có thể được sử dụng bao gồm amoniac, các muối amoni như amoni sulfat, amoni cacbonat, amoni clorua, amoni phosphat, hoặc amoni axetat, và muối axit nitric.

Ví dụ về chất dinh dưỡng vi lượng hữu cơ có thể được sử dụng bao gồm axit amin, vitamin, axit béo và axit nucleic; và pepton, axit casamino, chất chiết nấm men và dịch thủy phân protein đậu tương chứa các chất dinh dưỡng vi lượng này. Chúng đột biến dị tăng trưởng cần (các) axit amin và/hoặc chất tương tự cho sự phát triển được sử dụng, (các) chất dinh dưỡng cần thiết tốt hơn là được bổ sung.

Ví dụ về các muối vô cơ có thể được sử dụng bao gồm các muối của axit phosphoric, muối magie, muối canxi, muối sắt và muối mangan.

Việc nuôi cấy tốt hơn là được tiến hành ở nhiệt độ lên men nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C ở độ pH từ 3 đến 9 trong điều kiện thông khí. Để điều chỉnh độ pH, chất axit hoặc kiềm, vô cơ hoặc hữu cơ, khí amoniac, và/hoặc tương tự có thể được sử dụng.

dụng. Trong các điều kiện này, tốt hơn là axit L-amino được tích lũy trong dịch lỏng nuôi cấy hoặc trong tế bào sau khi nuôi cấy vi sinh vật trong 10 giờ đến 120 giờ.

Hơn nữa, khi axit L-amino mong muốn là axit L-glutamic, thì có thể tiến hành nuôi cấy sử dụng môi trường lỏng có các điều kiện được điều chỉnh sao cho axit L-glutamic có thể được kết tủa, trong khi cho phép sản xuất và tích lũy axit L-glutamic trong môi trường bằng cách kết tủa. Ví dụ về các điều kiện cho phép kết tủa axit L-glutamic bao gồm độ pH từ 5,0 đến 4,0, tốt hơn là độ pH từ 4,5 đến 4,0, tốt hơn nữa là độ pH từ 4,3 đến 4,0, đặc biệt tốt hơn là độ pH=4,0. Để đạt được cả sự phát triển tăng và sự kết tủa hiệu quả axit L-glutamic trong các điều kiện có tính axit, tốt hơn là độ pH từ 5,0 đến 4,0, tốt hơn nữa là 4,5 đến 4,0, còn tốt hơn nữa là 4,3 đến 4,0. Việc nuôi cấy ở độ pH đã được mô tả ở trên có thể được thực hiện trong toàn bộ thời gian nuôi cấy hoặc trong một phần của khoảng thời gian nuôi cấy.

Axit L-amino có thể được thu gom từ dịch lỏng nuôi cấy sau khi kết thúc nuôi cấy theo phương pháp thu gom đã biết. Ví dụ, việc thu gom có thể được thực hiện bởi phương pháp trong đó sự kết tinh theo nồng độ được tiến hành sau khi loại bỏ tế bào khỏi dịch nuôi cấy, hoặc bằng sắc ký trao đổi ion. Khi tiến hành nuôi cấy trong các điều kiện cho phép axit L-glutamic kết tủa trong môi trường, có thể thu được axit L-glutamic được kết tủa trong dịch lỏng nuôi cấy bằng cách ly tâm, lọc hoặc cách tương tự. Trong nhiều trường hợp, axit L-glutamic còn lại hòa tan trong môi trường có thể được kết tinh, và axit L-glutamic đã kết tinh có thể được tách cùng nhau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả một cách chi tiết bằng các ví dụ sau. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1

Tạo thành plasmit pMWGKC

Để thu được gen khởi đầu GAPDH, tiến hành khuếch đại PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng MG1655 *Escherichia coli* làm mẫu, và các gen khởi đầu CGAGCTACATATGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 1) và CGCGCGCATGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 2). Mảnh ADN khuếch đại được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *NdeI* và *SphI*, để thu được mảnh ADN dài khoảng 110 bp tương ứng với gen khởi đầu GAPDH. Trộn lẫn mảnh ADN thu được với mảnh thu được bằng cách tiêu hóa plasmit pBR322 (Số đăng ký ngân

hàng Gen là J01749) với các enzym giới hạn *NdeI* và *SphI*, và các mảnh được nối với nhau sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả nạp của chủng DH5α *Escherichia coli* (Toyobo Co., Ltd., DNA-903) được biến đổi với sản phẩm nối thu được, và thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB được bổ sung 50 µg/mL ampicilin. Các cụm khuẩn thu được được nuôi cấy trong canh LB được bổ sung 50 µg/mL ampicilin ở 37°C qua đêm, và plasmit pBRgapP được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được.

Sau đó, tiến hành khuếch đại PCR bằng cách sử dụng pBRgapP làm mẫu, và các đoạn mồi CCGCTCGAGCATATGCTGTCGCAATGATTGACACG (SEQ ID NO: 3) và GCTATTCCATATGCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO: 4). Mảnh ADN khuếch đại được phosphoryl hóa sử dụng T4 Polynucleotit Kinaza (Takara), thu được mảnh ADN chứa gen khởi đầu GAPDH. Hơn nữa, plasmit pMW119 (Số đăng ký ngân hàng Gen là AB005476) được xử lý bằng các enzym giới hạn *AatII* và *NdeI*, và các đầu của mảnh ADN đã tiêu hóa được làm cùn đầu bằng KOD cộng với ADN polymeraza (Takara), thu được mảnh ADN có gốc sao chép của pMW119. Các mảnh ADN chứa gen khởi đầu GAPDH và gốc sao chép của pMW119 được nối với nhau sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả nạp của chủng *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối thu được, và thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB được bổ sung 50 µg/mL ampicilin. Cụm khuẩn thu được được nuôi cấy trong canh LB được bổ sung 50 µg/mL ampicilin ở 37°C qua đêm, và thu hồi plasmit pMWG từ tế bào vi khuẩn thu được.

Để thu được gen kháng cloramphenicol, tiến hành khuếch đại PCR bằng cách sử dụng pTH18cs1 (Số đăng ký ngân hàng Gen là AB019610) làm mẫu, và các đoạn mồi TCGGCACGTAAGAGGTTCC (SEQ ID NO: 5) và CGGGTCGAATTTGCTTTCG (SEQ ID NO: 6), và mảnh ADN được phosphoryl hóa sử dụng T4 Polynucleotit Kinaza (Takara), thu được mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol. Sau đó, tiến hành khuếch đại PCR bằng cách sử dụng pMWG làm mẫu, và các đoạn mồi CTAGATCTGACAGTAAGACGGGTAAGCC (SEQ ID NO: 7) và CTAGATCTCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO: 8). Trộn mảnh thu được với mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol và nối với nhau sử dụng ligaza. Tế bào khả nạp của chủng *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối thu được, thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB được bổ sung 25 µg/mL cloramphenicol. Cụm khuẩn thu được được nuôi cấy trong canh LB được bổ sung 25 µg/mL cloramphenicol ở 37°C qua đêm, và plasmit thu được được thiết kế pMWGC.

Tiến hành khuếch đại PCR bằng cách sử dụng pMWGC gene làm mẫu, và các đoạn mồi CCTTTGGTTAAAGGCTTTAAGATCTTCCAGTGGACAAACTATGCC (SEQ ID NO: 9) và GGCATAGTTTGTCCACTGGAAGATCTTAAAGCCTTTAACCAGG (SEQ ID NO: 10), tiếp đó tiến hành biến nạp tế bào khả nạp của chủng *Escherichia coli* DH5 α . Sau đó, thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB được bổ sung 25 μ g/mL cloramphenicol. Cụm khuẩn thu được được nuôi cấy trong canh LB được bổ sung 25 μ g/mL cloramphenicol ở 37°C qua đêm, và thu hồi plasmit pMWGKC từ tế bào vi khuẩn thu được.

Ví dụ 2

Tạo cấu trúc của plasmit cho sự biểu hiện của malat thiokinaza và maly-CoA lyaza có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009

ADN bộ gen của *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009D-5 được mua từ ATCC. PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN nhiễm sắc thể của *Methylococcus capsulatus* làm mẫu, và các đoạn mồi GGAATTCCATATGGCTGTAAAAATCGTCTAC (SEQ ID NO: 11) và GCTCTAGATCAGAATCTGATTCCGTGTTC (SEQ ID NO: 12) thu được mảnh mcl-mtk của *Methylococcus*. Mảnh được nối với plasmit pMWGKC đã được điều chế trong Ví dụ 1. Do đó, plasmit thu được được thiết kế ở dạng pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc).

pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) plasmit có trình tự gen mcl (SEQ ID NO: 13), gen mtkA (SEQ ID NO: 14) và gen mtkB (SEQ ID NO: 15) có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus*. Trình tự axit amin của mcl, trình tự axit amin của mtkA và trình tự axit amin của mtkB có nguồn gốc từ *Methylococcus capsulatus* lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18.

Ví dụ 3

Tạo cấu trúc chủng *Pantoea ananatis* PA.

Plasmit RSFCPG được thu hồi từ *Pantoea ananatis* AJ13601 (chủng vi khuẩn được nộp lưu BP-7207). Plasmit RSFCPG là plasmit kháng tetracyclin có enzym glutamat dehydrogenaza, xitrat synthaza và phosphoenolpyruvat carboxylaza mà xúc tác cho phản ứng sinh tổng hợp của axit L-glutamic (JP 2001-333769 A). *Pantoea ananatis* AJ417 (chủng vi khuẩn được nộp lưu BP-8646) được biến nạp với RSFCPG

sử dụng phương pháp CaCl_2 (Molecular Cloning, 3rd edition, Cold Spring Harbor press, 2001), và được nuôi cấy trong canh LB được bổ sung 10 $\mu\text{g/mL}$ tetracyclin, thu được *Pantoea ananatis* AJ417/RSFCPG (sau đây có thể được viết tắt là chủng PA).

Ví dụ 4

Tạo cấu trúc các chủng *Pantoea ananatis* để đánh giá

Chủng *Pantoea ananatis* PA được điều chế trong Ví dụ 3 được biến nạp với plasmit pMWGKC được mô tả trong Ví dụ 1 và pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) được mô tả trong Ví dụ 2 bằng cách xung điện. Các thể biến nạp được sàng lọc trên môi trường thạch LB được bổ sung 30 $\mu\text{g/mL}$ cloramphenicol và 10 $\mu\text{g/mL}$ tetracyclin, và các cụm khuẩn thu được được sử dụng ở dạng các chủng để đánh giá. Các chủng đã tạo cấu trúc được tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1

Tên chủng	Plasmit/chủng	Đặc điểm
PA/pMWGKC	pMWGKC/RSFCPG/ <i>P. ananatis</i> AJ417	Không có sự quá biểu hiện mtk hoặc mcl
PA/pMWGKC-mtk-mcl	pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)/RSFCPG/ <i>P. ananatis</i> AJ417	mtk và mcl quá biểu hiện

Ví dụ 5

Sản xuất axit glutamic bằng các chủng được tạo cấu trúc của *Pantoea ananatis*

Đối với việc đánh giá tốc độ sản xuất và hiệu suất axit glutamic bằng các chủng *Pantoea ananatis* được tạo cấu trúc được mô tả trong Bảng 1, đầu tiên mỗi trong số các chủng *Pantoea* được nuôi cấy sơ bộ trong 30 ml môi trường trong bình hình nón dung tích 125-ml được trang bị van điều tiết. Môi trường nuôi cấy sơ bộ bao gồm 25 g/L LB, 0,5 g/L glucoza, 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L NaCl, 1 g/L NH_4Cl , 6 g/L Na_2HPO_4 , 0,2 g/L canxi pantothenat, 0,2 g/L L-lysin hydroclorua, 0,2 g/L L-methionin và 0,2 g/L axit 2,6-diaminopimelic. Bổ sung kháng sinh vào theo yêu cầu ở nồng độ 30 $\mu\text{g/mL}$ cloramphenicol và 10 $\mu\text{g/mL}$ tetracyclin. Môi trường nuôi cấy sơ bộ được cấy từ dung dịch gốc glyxerol của chủng và sinh trưởng ở 34°C trong lò ủ quay kèm lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 2 ngày. Thể tích thích hợp của môi trường nuôi cấy sơ bộ được ly tâm ở 6000 vòng/phút và 25°C trong 15 phút và phần

dịch nổi của nó được loại bỏ. Các viên tế bào được cấy vào 5 ml môi trường lên men trong bình hình nón dung tích 125-ml được trang bị van điều tiết thu được giá trị mật độ tế bào ban đầu (OD_{600}) nằm trong khoảng 0,2-0,25. Môi trường lên men (độ pH 7) bao gồm 50 g/L glucoza, 20 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L NaCl, 0,25 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 20 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 mg/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,72 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,64 mg/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,72 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,4 mg/L axit boric, 1,2 mg/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 2 g/L chất chiết nấm men, 0,2 g/L canxi pantothenat, 0,2 g/L L-lysin hydroclorua, 0,2 g/L L-methionin, 0,2 g/L axit 2,6-diaminopimelic và 20 g/L canxi carbonat. Kháng sinh được bổ sung vào theo yêu cầu ở nồng độ 30 $\mu g/mL$ cloramphenicol và 10 $\mu g/mL$ tetracyclin. Đo mật độ quang (OD_{600}) ở 600 nm sau khi pha loãng các mẫu lên men bằng HCl 2N. Tiến hành lên men axit glutamic ở 34°C trong lò ủ quay kèm lắc ở tốc độ 250 vòng/phút trong 48 giờ. Ví dụ được rút ra ở các khoảng định kỳ và được phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp (High Performance Liquid Chromatography - HPLC). Quan sát sự tiêu thụ glucoza sử dụng cột Ultron PS-80H (Shinwa Chemical Industries Ltd., Japan) được hoạt động trong các điều kiện tiêu chuẩn trong khi đánh giá sự sản xuất axit glutamic sử dụng cột RSpak NN-814 (Showa Denko K. K., Japan) được hoạt động trong các điều kiện tiêu chuẩn. Kết quả so sánh việc tiến hành lên men của các chủng *Pantoea* được tạo cấu trúc sau 48 giờ lên men được tóm tắt trong Bảng 2.

Bảng 2

Tên chủng	Độ chuẩn axit glutamic	Hiệu suất axit glutamic	Sự phát triển tế bào (OD_{600})
PA/pMWGKC	25,15	0,40	25,4
PA/pMWGKC-mtk-mcl	33,66	0,54	16,6

¹Thời gian lên men là 48 giờ

²Các kết quả thể hiện là giá trị trung bình của ba thử nghiệm lặp lại

Số liệu trong Bảng 2 thể hiện rằng sự quá biểu hiện của mtk và mcl trong *Pantoea* dẫn đến hầu như hiệu suất và sự sản xuất axit glutamic tăng cao hơn 35% so với chủng đối chứng không có mtk và mcl. Việc cải thiện hiệu suất đáng kể này có thể giúp làm giảm toàn bộ chi phí sản xuất axit glutamic và cải thiện đáng kể hiệu quả của quy trình. Ngoài ra, sự quan sát không mong đợi quan sát thấy sự hình thành sinh khối

ở chủng quá biểu hiện mtk và mcl là thấp hơn đáng kể so với chủng đối chứng mặc dù việc sản xuất axit glutamic tăng lên. Việc này gợi ý rằng chủng quá biểu hiện mtk và mcl được thiết kế có thể tiêu thụ nguồn cacbon để sản xuất axit glutamic hiệu quả hơn ở tốc độ và hiệu suất cao hơn khi so sánh với chủng đối chứng. Sự hình thành sinh khối thấp trong quá trình lên men cũng thuận lợi cho quy trình công nghiệp liên quan đến việc giảm phát sinh chất thải sinh học mà mặt khác cần được tái sinh hoặc vứt bỏ.

Ví dụ 6

Đánh giá chất phụ gia

Tiến hành nuôi cấy và phân tích theo cùng cách như trong Ví dụ 5, ngoại trừ PA/pMWGKC-mtk-mcl được tạo cấu trúc trong Ví dụ 4 được sử dụng làm biến thể được đánh giá, và muối carbonat, khí cacbon dioxit hoặc chất khử được cung cấp, ở dạng chất phụ gia, vào môi trường nuôi cấy.

Kết quả phân tích, các nhóm lần lượt được cấp khí carbonat, khí cacbon dioxit và chất khử bộc lộ hiệu suất đối với đường cao hơn so với nhóm không được cấp muối carbonat, khí cacbon dioxit hoặc chất khử (nhóm trong đó PA/pMWGKC-mtk-mcl được tạo cấu trúc trong Ví dụ 4 được sử dụng làm biến thể để đánh giá mà không cung cấp bất kỳ chất nào trong số muối carbonat, khí cacbon dioxit hoặc chất khử).

Do đó, được chỉ ra rằng, ở chủng *Pantoea* mà truyền quá trình cố định CO₂, việc cấp muối carbonat, khí cacbon dioxit hoặc chất khử là hiệu quả xét về việc tăng hiệu suất đối với đường.

Ví dụ 7

Tạo thành plasmit pMWGKC2

Để thu được gen khởi đầu GAPDH, tiến hành khuếch đại PCR bằng cách sử dụng ADN bộ gen của chủng *Escherichia coli* MG1655 làm mẫu, và các đoạn môi CTACTAGTCTGTCGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO: 19) và GCTCGAATTCCCATATGTTCCACCAGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO: 20). Mảnh ADN khuếch đại được tiêu hóa bằng enzym giới hạn *EcoRI*. Mảnh ADN được phosphoryl hóa sử dụng T4 Polynucleotit Kinaza (Takara), thu được mảnh ADN chứa gen khởi đầu GAPDH. Hơn nữa, xử lý plasmit pMW119 (Số đăng ký ngân hàng Gen AB005476) bằng enzym giới hạn *NdeI*, và các đầu của mảnh ADN được tiêu hóa được làm cùn đầu bằng KOD cộng với ADN polymeraza (Takara), và mảnh được xử lý bằng enzym giới hạn *EcoRI* thu được mảnh ADN có gốc sao chép

của pMW119. Các mảnh ADN chứa gen khởi đầu GAPDH và gốc sao chép của pMW119 được nối với nhau sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả nạp của chủng *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối thu được, và thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB được bổ sung 50 μ g/mL ampicilin. Cụm khuẩn thu được được nuôi cấy trong canh LB được bổ sung 50 μ g/mL ampicilin ở 37°C qua đêm, và plasmit pMWG2 được thu hồi từ các tế bào vi khuẩn thu được.

Để thu được gen kháng cloramphenicol, tiến hành khuếch đại PCR bằng cách sử dụng pTH18cs1 (Số đăng ký ngân hàng Gen AB019610) làm mẫu, và các đoạn môi TCGGCACGTAAGAGGTTCC (SEQ ID NO: 5) và CGGGTCGAATTTGCTTTTCG (SEQ ID NO: 6), và mảnh ADN thu được được phosphoryl hóa sử dụng T4 Polynucleotide Kinaza (Takara), thu được mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol. Tiếp đó, tiến hành khuếch đại PCR bằng cách sử dụng pMWG2 làm mẫu, và các đoạn môi CTAGATCTGACAGTAAGACGGGTAAGCC (SEQ ID NO: 7) và CTAGATCTCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO: 8). Trộn mảnh thu được với mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol và nối với nhau sử dụng ligaza. Tế bào khả nạp chủng *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối thu được, thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB được bổ sung 25 μ g/mL cloramphenicol. Cụm khuẩn thu được được nuôi cấy trong canh LB được bổ sung 25 μ g/mL cloramphenicol ở 37°C qua đêm, và plasmit thu được được thiết kế pMWGC2.

Tiến hành khuếch đại PCR bằng cách sử dụng gen pMWGC2 làm mẫu, và các đoạn môi CCTTTGGTTAAAGGCTTTAAGATCTTCCAGTGGACAAACTATGCC (SEQ ID NO: 9) và GGCATAGTTTGTCCACTGGAAGATCTTAAAGCCTTTAACCAGG (SEQ ID NO: 10), tiếp đó tiến hành biến nạp tế bào khả nạp của chủng *Escherichia coli* DH5 α . Sau đó, thu được các thể biến nạp sinh trưởng trên đĩa thạch LB được bổ sung 25 μ g/mL cloramphenicol. Cụm khuẩn thu được được nuôi cấy trong canh LB được bổ sung 25 μ g/mL cloramphenicol ở 37°C qua đêm, và plasmit pMWGKC2 được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được.

Ví dụ 8

Sản xuất axit glutamic bằng các chủng được tạo cấu trúc của *Pantoea ananatis* bằng cách sử dụng vectơ pMWGKC2

Theo cùng cách như Ví dụ 2, chèn mảnh mcl-mtk của *Methylococcus* vào pMWGKC2, và thiết kế plasmit thu được ở dạng pMWGKC2_mcl(Mc)_mtk(Mc).

Theo cùng cách như Ví dụ 4, chủng *Pantoea ananatis* PA được biến nạp với các plasmit pMWGKC2 và pMWGKC2_mcl(Mc)_mtk(Mc), và thiết kế các chủng thu được lần lượt ở dạng PA/pMWGKC2 và PA/pMWGKC-mtk-mcl2. Đánh giá việc sản xuất axit glutamic bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 5, để thể hiện cùng xu hướng về độ chuẩn axit glutamic, hiệu suất và sự phát triển tế bào như được thể hiện trong Bảng 2.

Tiến hành nuôi cấy và phân tích theo cùng cách như trong Ví dụ 6, và cung cấp muối carbonat, khí cacbon dioxid hoặc chất khử, ở dạng chất phụ gia, vào môi trường nuôi cấy. Dựa vào kết quả phân tích, các nhóm được cấp muối carbonat, khí cacbon dioxid và chất khử lần lượt bộc lộ hiệu suất đối với đường cao hơn so với nhóm không bổ sung bất kỳ trong số muối carbonat, khí cacbon dioxid hoặc chất khử bất kỳ (nhóm trong đó PA/pMWGKC-mtk-mcl2 được sử dụng làm biến thể để đánh giá mà không cung cấp bất kỳ trong số muối carbonat, khí cacbon dioxid hoặc chất khử).

Phần bộc lộ của đơn yêu cầu cấp patent Nhật số 2013-011535 nộp ngày 24 tháng 01 năm 2013 được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Tất cả tài liệu, tài liệu Patent, và các tiêu chuẩn kỹ thuật được trích dẫn ở đây cũng được đưa vào bản mô tả này để tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất axit glutamic bao gồm các bước:

nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon; và

thu gom axit glutamic nhận được bằng cách tiếp xúc,

trong đó, vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền các hoạt tính enzym malat thiokinaza và hoạt tính enzym malyl-CoA lyaza cho vi sinh vật thuộc chi *Pantoea* không có bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d) dưới đây, mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c) hoặc (d), hoặc, ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c) hoặc (d) được truyền, không cho phép các chức năng của chúng có tác dụng:

(a) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;

(b) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat;

(c) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA; và

(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format.

2. Phương pháp sản xuất axit glutamic theo điểm 1, phương pháp này còn bao gồm bước:

cung cấp ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat, ion hydro carbonat, khí cacbon dioxit và chất khử vào môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

3. Phương pháp sản xuất axit glutamic theo điểm 1 hoặc điểm 2, phương pháp này còn bao gồm bước:

thu gom khí chứa cacbon dioxit được tạo ra bằng cách nuôi cấy, và cung cấp khí vào môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT GLUTAMIC

<130> P001301430

<150> JP 2013-011535

<151> 2013-01-24

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 1

cgagctacat atgcaatgat tgacacgatt ccg

33

<210> 2

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 2

cgcgcgcatg ctatttggtta gtgaataaaa gg

32

<210> 3

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 3

ccgctcgagc atatgctgtc gcaatgattg acacg

35

<210> 4

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 4

gctattccat atgcaggggtt attgtctcat gagc

34

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 5

tcggcacgta agaggttcc

19

<210> 6

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 6

cgggtcgaat ttgctttcg

19

<210> 7

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 7

ctagatctga cagtaagacg ggtaagcc

28

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 8

ctagatctca gggttattgt ctcatgagc

29

<210> 9
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 9
 cctttgggta aaggcttta gatcttccag tggacaaact atgcc

45

<210> 10
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 10
 ggcatagttt gtccactgga agatcttaaa gcctttaacc aaagg

45

<210> 11
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 11
 ggaattccat atggctgtta aaaatcgtct ac

32

<210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Gen khởi đầu cho PCR

<400> 12
 gctctagatc agaattctgat tccgtgttc

29

<210> 13
 <211> 963
 <212> ADN

<213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 13

```

atggctgtca agaaccgtct acaccgcagc gaactcgcgg tgccgggcag caatccacgc      60
atgctcgaga aagcgccgga agccggcgcc gacatcgtct ttctggacct ggaagatgcg      120
gttgcgccgg atgacaagga gcaagcgcg cggaacatcg tcttcgcgct caacacctac      180
gactggtcca gatgcgcggt ctccgtccgc atcaacggcc tcgacaccca ttacgcctac      240
cgggacctcg ttgagatcgt cgagtcctgc ggcgacaagc tcgacaccat tctggtgccg      300
aaagtccgga gcgccctcga cgttctgttc gtcgcgactt tactttccca gatcgaggcc      360
tacaaagggt tcaaaccgat caatatccac gtgctgatcg aaacggccat gggcatggcc      420
aacgtggagg agatcgcccg cacctgtcct gaacgcattg aggccatggt gttcggcgctg      480
gccgactacg ctgcgtcggg gcgcgcccgc acgaccaaca tcggcgggcg caaccgggat      540
tacggcatgc tgaccgaccc tgacgaaagc ggtaccgcgc cctatcactg ggccgaccag      600
tggcatttcg gcatttcccg catggtcgcg gcctgcgcgc cctatgggct tcgccccatc      660
gacggcccct tcggcgatct cagcgatccg gaaggattcc gcgccgcagc ccgccgtgcc      720
gcggcactgg gctgcgaagg gaagtgggcg atccatccct ccagattcc actgtgcaac      780
gaaatcttca caccacgga aaaagaggtc acgcgggcct accgcatcct ggaagccatg      840
gagcaggcgg caaaggaggg caaaggcgcg gtgtctctgg atgggcggct gatcgatgcc      900
gcctcgatcc ggatggcgga gaacgtggtc cgccagatga agcagatcga gtcgcgtcgg      960
tag                                                                 963

```

<210> 14

<211> 903

<212> ADN

<213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 14

```

atgagcgtat tcgttaacaa gcaactccaag gtcattcttc agggcttcac cggcgagcac      60
gccaccttcc acgccaagga cgccatgcgg atgggcaccc gggtaggtcgg cggtagtcacc      120
cctggcaaag gcggcacccg ccatcccgat ccggaactcg ctcatctgcc ggtgttcgac      180
accgtggctg aagccgtggc cgccaccggc gccgacgtct ccgccgtggt cgtgccggcg      240
cccttcaatg cggacgcggt gatggaagcc atagacgccg gcatccgggt cgccgtgacc      300

```

atcgccgacg gcatcccggt acacgacatg atccgactgc agcgctaccg ggtgggtaag 360
 gattccatcg tgatcggacc gaacaccccc ggcatcatca cgccgggcga gtgcaagggtg 420
 ggcatcatgc cttcgcacat ttacaagaag ggcaacgtcg gcatcgtgtc gcgctccggc 480
 accctcaatt acgaggcgac ggaacagatg gccgcgcttg ggctgggcat caccacctcg 540
 gtcggtatcg gcggtgacct catcaacgga accgatttcg tcaactgtcct gcgcgccttc 600
 gaagccgacc cggaaccga gatcgtggtg atgatcggcg aaatcggcgg cccccaggaa 660
 gtcgcccgcg cccgctgggc caaggaaaac atgacaaagc cggtcatcgg cttcgtcgca 720
 ggcttgccg caccgaccgg ccgacgcatg ggccatgccg gcgccatcat ctccagcgag 780
 gccgacaccg ccggagccaa gatggacgcc atggaagcct tggggctgta tgtcgcccg 840
 aaccggcac agatcggcca gaccgtgcta cgcgccgcgc aggaacacgg aatcagattc 900
 tga 903

<210> 15
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 15
 gtgaatatcc atgagtacca ggccaaggag ctgctcaaga cctatggcgt gcccgtgccc 60
 gacggcgccg ttgcctattc cgacgcgcag gccgccagcg tcgccgagga gatcggcggc 120
 agccgctggg tggtaaggc gcagatccat gccggcggtc gcggcaaggc cgggggcgta 180
 aaggtcgccc actccatcga ggaagtccgc caatacgccg acgccatgct cggcagccac 240
 ctgctcacc atcagaccgg cccgggaggc tcgctgggtc agcgtctgtg ggtggaacag 300
 gccagccata tcaaaaagga atactacctg ggcttcgtga tcgatcgcg caatcaacgc 360
 atcaccctga tcgcctccag cgagggcggc atggaaatcg aggaagtcgc aaaggaaacc 420
 ccggagaaaa tcgtcaagga agtcgtcgat ccggccatag gcctgctgga cttccagtgc 480
 cgcaaggctc ccacggcgat cggcctgaaa ggcaactga tgcccaggc cgtcaggctg 540
 atgaaggcca tctaccgctg catgcgcgac aaagatgccc tgcaggccga aatcaatcct 600
 ctggccatcg tgggcgaaag cgacgaatcg ctcatgggtc tggatgccaa gttcaacttc 660
 gacgacaacg ccctgtaccg gcagcgcacc atcaccgaga tgcgcgacct ggccgaggaa 720
 gacccgaaag aggtcgaagc ctccggccac ggtctcaatt acatcgccct cgacggcaac 780

```

atcggctgca tcgtcaatgg cgccggcctc gccatggctt cgctcgacgc catcaccctg      840
catggcggcc gtccggccaa cttcctcgac gtgggcggcg ggcctcccc cgagaaggtc      900
accaatgcct gccgcatcgt actggaagat cccaacgtcc gctgcatcct ggtcaacatc      960
tttgccggca tcaaccgctg tgactggatc gccaaaggcc tgatccaggc ctgcgacagc     1020
ctgcagatca aggtgccgct gatcgtgcgc ctggccggga cgaacgtcga cgagggccgc     1080
aagatcctgg ccgaatccgg cctctccttc atcaccgcgg aaaatctgga cgacgcggcc     1140
gccaaggccg tcgccatcgt caagggataa                                     1170

```

```

<210> 16
<211> 320
<212> PRT
<213> Methylococcus capsulatus

```

```
<400> 16
```

```

Met Ala Val Lys Asn Arg Leu His Arg Ser Glu Leu Ala Val Pro Gly
1              5              10              15

```

```

Ser Asn Pro Arg Met Leu Glu Lys Ala Pro Glu Ala Gly Ala Asp Ile
          20              25              30

```

```

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

```

```

Ala Arg Arg Asn Ile Val Phe Ala Leu Asn Thr Tyr Asp Trp Ser Arg
          50              55              60

```

```

Cys Ala Val Ser Val Arg Ile Asn Gly Leu Asp Thr His Tyr Ala Tyr
65              70              75              80

```

```

Arg Asp Leu Val Glu Ile Val Glu Ser Cys Gly Asp Lys Leu Asp Thr
          85              90              95

```

```

Ile Leu Val Pro Lys Val Gly Ser Ala Ser Asp Val Leu Phe Val Ala
          100              105              110

```

```

Thr Leu Leu Ser Gln Ile Glu Ala Tyr Lys Gly Phe Lys Pro Ile Asn
          115              120              125

```

Ile His Val Leu Ile Glu Thr Ala Met Gly Met Ala Asn Val Glu Glu
 130 135 140

Ile Ala Arg Thr Cys Pro Glu Arg Met Glu Ala Met Val Phe Gly Val
 145 150 155 160

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

Ala Asn Pro Asp Tyr Gly Met Leu Thr Asp Pro Asp Glu Ser Gly Thr
 180 185 190

Arg Ala Tyr His Trp Ala Asp Gln Trp His Phe Gly Ile Ser Arg Met
 195 200 205

Val Ala Ala Cys Arg Ala Tyr Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe
 210 215 220

Gly Asp Phe Ser Asp Pro Glu Gly Phe Arg Ala Ala Ala Arg Arg Ala
 225 230 235 240

Ala Ala Leu Gly Cys Glu Gly Lys Trp Ala Ile His Pro Ser Gln Ile
 245 250 255

Pro Leu Cys Asn Glu Ile Phe Thr Pro Thr Glu Lys Glu Val Thr Arg
 260 265 270

Ala Tyr Arg Ile Leu Glu Ala Met Glu Gln Ala Ala Lys Glu Gly Lys
 275 280 285

Gly Ala Val Ser Leu Asp Gly Arg Leu Ile Asp Ala Ala Ser Ile Arg
 290 295 300

Met Ala Glu Asn Val Val Arg Gln Met Lys Gln Ile Glu Ser Arg Arg
 305 310 315 320

<210> 17

<211> 300

<212> PRT

<213> Methylococcus capsulatus

<400> 17

Met Ser Val Phe Val Asn Lys His Ser Lys Val Ile Phe Gln Gly Phe
 1 5 10 15

Thr Gly Glu His Ala Thr Phe His Ala Lys Asp Ala Met Arg Met Gly
 20 25 30

Thr Arg Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Thr Arg His
 35 40 45

Pro Asp Pro Glu Leu Ala His Leu Pro Val Phe Asp Thr Val Ala Glu
 50 55 60

Ala Val Ala Ala Thr Gly Ala Asp Val Ser Ala Val Phe Val Pro Pro
 65 70 75 80

Pro Phe Asn Ala Asp Ala Leu Met Glu Ala Ile Asp Ala Gly Ile Arg
 85 90 95

Val Ala Val Thr Ile Ala Asp Gly Ile Pro Val His Asp Met Ile Arg
 100 105 110

Leu Gln Arg Tyr Arg Val Gly Lys Asp Ser Ile Val Ile Gly Pro Asn
 115 120 125

Thr Pro Gly Ile Ile Thr Pro Gly Glu Cys Lys Val Gly Ile Met Pro
 130 135 140

Ser His Ile Tyr Lys Lys Gly Asn Val Gly Ile Val Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160

Thr Leu Asn Tyr Glu Ala Thr Glu Gln Met Ala Ala Leu Gly Leu Gly
 165 170 175

Ile Thr Thr Ser Val Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Asn Gly Thr Asp
 180 185 190

Phe Val Thr Val Leu Arg Ala Phe Glu Ala Asp Pro Glu Thr Glu Ile
 195 200 205

Val Val Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Val Ala Ala Ala
 210 215 220

Arg Trp Ala Lys Glu Asn Met Thr Lys Pro Val Ile Gly Phe Val Ala
 225 230 235 240

Gly Leu Ala Ala Pro Thr Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile
 245 250 255

Ile Ser Ser Glu Ala Asp Thr Ala Gly Ala Lys Met Asp Ala Met Glu
 260 265 270

Ala Leu Gly Leu Tyr Val Ala Arg Asn Pro Ala Gln Ile Gly Gln Thr
 275 280 285

Val Leu Arg Ala Ala Gln Glu His Gly Ile Arg Phe
 290 295 300

<210> 18
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Methylococcus capsulatus

<400> 18

Met Asn Ile His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Lys Thr Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Pro Val Pro Asp Gly Ala Val Ala Tyr Ser Asp Ala Gln Ala Ala
 20 25 30

Ser Val Ala Glu Glu Ile Gly Gly Ser Arg Trp Val Val Lys Ala Gln
 35 40 45

Ile His Ala Gly Gly Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Ala His
 50 55 60

Ser Ile Glu Glu Val Arg Gln Tyr Ala Asp Ala Met Leu Gly Ser His
 65 70 75 80

Leu Val Thr His Gln Thr Gly Pro Gly Gly Ser Leu Val Gln Arg Leu
 85 90 95

Trp Val Glu Gln Ala Ser His Ile Lys Lys Glu Tyr Tyr Leu Gly Phe
 100 105 110

Val Ile Asp Arg Gly Asn Gln Arg Ile Thr Leu Ile Ala Ser Ser Glu
 115 120 125

Gly Gly Met Glu Ile Glu Glu Val Ala Lys Glu Thr Pro Glu Lys Ile
 130 135 140

Val Lys Glu Val Val Asp Pro Ala Ile Gly Leu Leu Asp Phe Gln Cys
 145 150 155 160

Arg Lys Val Ala Thr Ala Ile Gly Leu Lys Gly Lys Leu Met Pro Gln
 165 170 175

Ala Val Arg Leu Met Lys Ala Ile Tyr Arg Cys Met Arg Asp Lys Asp
 180 185 190

Ala Leu Gln Ala Glu Ile Asn Pro Leu Ala Ile Val Gly Glu Ser Asp
 195 200 205

Glu Ser Leu Met Val Leu Asp Ala Lys Phe Asn Phe Asp Asp Asn Ala
 210 215 220

Leu Tyr Arg Gln Arg Thr Ile Thr Glu Met Arg Asp Leu Ala Glu Glu
 225 230 235 240

Asp Pro Lys Glu Val Glu Ala Ser Gly His Gly Leu Asn Tyr Ile Ala
 245 250 255

Leu Asp Gly Asn Ile Gly Cys Ile Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met
 260 265 270

Ala Ser Leu Asp Ala Ile Thr Leu His Gly Gly Arg Pro Ala Asn Phe
 275 280 285

Leu Asp Val Gly Gly Gly Ala Ser Pro Glu Lys Val Thr Asn Ala Cys
 290 295 300

Arg Ile Val Leu Glu Asp Pro Asn Val Arg Cys Ile Leu Val Asn Ile

305	310	315	320
Phe Ala Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Ile Ala Lys Gly Leu Ile Gln 325 330 335			
Ala Cys Asp Ser Leu Gln Ile Lys Val Pro Leu Ile Val Arg Leu Ala 340 345 350			
Gly Thr Asn Val Asp Glu Gly Arg Lys Ile Leu Ala Glu Ser Gly Leu 355 360 365			
Ser Phe Ile Thr Ala Glu Asn Leu Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ala Val 370 375 380			
Ala Ile Val Lys Gly 385			

```
<210> 19
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Gen khởi đầu cho PCR

34

<210>	20
<211>	48
<212>	ADN
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Gen khởi đầu cho PCR

48