



(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)



1-0028340

(51)⁷ C12N 15/52; C12P 7/16; C12N 9/00;
C12N 1/21

(13) B

(21) 1-2016-01523

(22) 26/09/2014

(86) PCT/KR2014/009067 26/09/2014

(87) WO/2015/046978 02/04/2015

(30) 10-2013-0115682 27/09/2013 KR

(45) 25/05/2021 398

(43) 27/06/2016 339A

(73) GS CALTEX CORPORATION (KR)

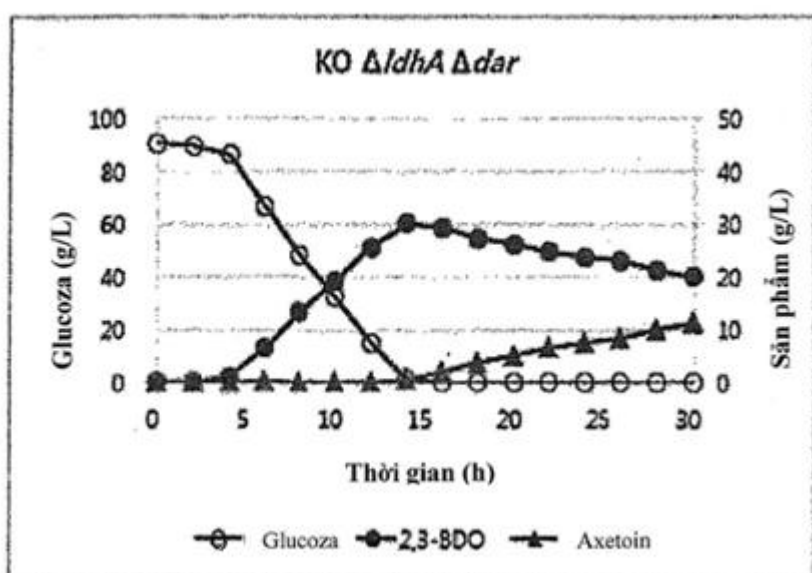
508 Nonhyeon-ro Gangnam-gu, Seoul 135-985, Republic of Korea

(72) YANG, Taek-Ho (KR); SONG, Hyo-Hak (KR); PARK, Jong-Myoung (KR);
RATHNASI, Chelladural (KR).

(74) Công ty cổ phần Sở hữu trí tuệ BROSS và Cộng sự (BROSS & PARTNERS., JSC)

(54) VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT 2,3-BUTANDIOL GIA
TĂNG

(57) Sáng chế đề cập đến gen mã hóa enzyme có hoạt tính chuyển hóa giữa axetoin và 2,3-butandiol và có trình tự nucleotit là SEQ ID NO: 12. Sáng chế còn đề cập đến protein được mã hóa bằng gen này. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp mà kim hãm hoạt tính của protein này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng và phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

2,3-butandiol là rượu (có công thức $\text{CH}_3\text{CHOHCHOHCH}_3$) có bốn nguyên tử cacbon và hai nhóm hydroxyl (-OH) và có thể được chuyển hóa hóa học và xúc tác thành 1,3-butadien, mà là nguyên liệu thô để sản xuất cao su tổng hợp, và methyl ethyl keton (methyl ethyl ketone - MEK), mà là phụ gia và dung môi cho nhiên liệu (Ji et al., *Biotechnol. Adv.*, 29: 351, 2011). 2,3-butandiol là hợp chất trung gian rất quan trọng trong công nghiệp vì 2,3-butandiol có thể được sử dụng làm chất tăng chỉ số octan bằng cách trộn lẫn với xăng (Celinska et al., *Biotechnol. Adv.*, 27: 715, 2009).

2,3-butandiol có thể được tạo ra bằng quá trình tổng hợp hóa học và quá trình lên men vi sinh vật. Tuy nhiên, do chi phí sản xuất cao, nên không thể sản xuất 2,3-butandiol trên quy mô công nghiệp. Trong những năm gần đây, với sự phát triển nhanh chóng về kỹ thuật sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men vi sinh vật, việc giá nhiên liệu thô hóa thạch đang tăng nhanh và việc đưa vào áp dụng quy định quốc tế nghiêm ngặt về việc ô nhiễm môi trường, tầm quan trọng của việc tìm ra các phương pháp sản xuất 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học bằng quá trình lên men vi sinh vật đang được tập trung nghiên cứu và phát triển nhanh.

Việc nghiên cứu về phương pháp sản xuất 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học bằng quá trình lên men vi sinh vật đã được thực hiện chia thành các lĩnh vực như lĩnh vực tối ưu hóa quá trình lên men (bao gồm nhiệt độ, độ pH, lượng oxy hòa tan, và các yếu tố tương tự) và lĩnh vực phát triển vi sinh vật (bao gồm phát hiện vi sinh vật, tìm hiểu đặc tính sinh lý của vi sinh vật được phát hiện, thực hiện sự đột biến và kỹ thuật di truyền, và các yếu tố tương tự). Đối với lĩnh vực tối ưu hóa quá trình lên men, các điều kiện khác nhau như nhiệt độ, độ pH, lượng oxy hòa tan, và các yếu tố khác để đảm bảo cho quá trình sản xuất một cách hiệu quả 2,3-butandiol được xác định (Ji et al., *Bioresour. Technol.*, 100: 3410, 2009; Nakashimada et al.,

J. Biosci. Bioeng., 90: 661, 2000; Nakashimada et al., Biotechnol. Lett., 20: 1133, 1998). Tuy nhiên, quá trình sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men vi sinh vật dưới các điều kiện trên đây vẫn gặp phải vấn đề về hiệu suất và sản lượng thấp, gây khó khăn trong việc sử dụng một cách trực tiếp làm quá trình sản xuất thương mại. Ngoài ra, quá trình sản xuất này có nhược điểm ở chỗ các sản phẩm phụ như axit hữu cơ bao gồm axit lactic, rượu bao gồm etanol, và các sản phẩm tương tự, cũng được tạo ra, cùng với 2,3-butandiol trong quá trình lên men.

Việc tạo ra các sản phẩm phụ không những làm giảm hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol đối với nguyên liệu sinh khối, mà còn cần chi phí rất lớn để tách và làm sạch trong quá trình thu hồi 2,3-butandiol ra khỏi chất lỏng môi trường nuôi cấy. Do đó, việc phát triển vi sinh vật liên quan đến quá trình sản xuất 2,3-butandiol đã được nghiên cứu thực hiện nhằm làm giảm việc tạo ra sản phẩm phụ. Ji và các cộng sự, đã thành công một phần trong việc ngăn ngừa sự tạo ra axit hữu cơ dưới dạng sản phẩm phụ, bằng cách cho chủng *Klebsiella oxytoca* thể tự nhiên tiếp xúc với tia tử ngoại (UV), làm phương pháp gây đột biến gen (Ji et al., Biotechnol. Lett., 30: 731, 2008). Ngoài ra, cũng có thể nâng cao quá trình sản xuất 2,3-butandiol bằng cách sử dụng chùm ion tác dụng lên chủng *Klebsiella pneumoniae*, nhờ đó tăng tốc độ tiêu thụ nguyên liệu sinh khối (Ma et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 82: 49, 2009). Đối với nghiên cứu để giảm việc tạo ra sản phẩm phụ bằng kỹ thuật di truyền chọn lọc, vi sinh vật đột biến được tạo ra bằng cách loại bỏ gen (*ldhA*) chịu trách nhiệm cho quá trình sản xuất axit lactic dưới dạng một trong số các sản phẩm phụ chính thể hiện đặc tính tốt nhất dưới các điều kiện chung. Ngoài ra, đã có các ví dụ cho thấy rằng gen (*adhE*, *aldA*) chịu trách nhiệm cho quá trình sản xuất etanol được loại bỏ để giảm việc tạo ra etanol dưới dạng sản phẩm phụ (Ji et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 85: 1751, 2010). Đối với các ví dụ, hoạt tính của pyruvat format lyaza chịu trách nhiệm cho việc tạo ra axit formic trong vi khuẩn sinh axit lactic (lactic acid bacteria - LAB) được làm giảm (WO2010/037114 A1).

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng gen mà có hoạt tính chuyển hóa đối với 2,3-butandiol, và vi sinh vật tái tổ hợp trong đó hoạt tính của gen này bị kìm hãm có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng và việc tiêu thụ 2,3-butandiol được tạo ra được ngăn ngừa. Dựa trên phát hiện này, các tác giả sáng chế đã tạo ra sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng và phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

Cách thức giải quyết vấn đề

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất gen mã hóa enzyme có hoạt tính chuyển hóa giữa acetoin và 2,3-butandiol và có trình tự nucleotit là SEQ ID NO: 12.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp chứa gen này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất protein được mã hóa bằng gen này. Ngoài ra, theo một số phương án, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp mà không bị ức chế hoạt tính của protein này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng gia tăng sản xuất 2,3-butandiol trong đó hoạt tính của protein bị ức chế trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp 2,3-butandiol và lactat.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp này có hoạt tính chuyển hóa giữa acetoin và 2,3-butandiol, và enzyme có hoạt tính đối với quá trình chuyển hóa 2,3-butandiol thành acetoin cao hơn so với hoạt tính đối với quá trình chuyển hóa acetoin thành 2,3-butandiol bị ức chế trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp 2,3-butandiol và lactat.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bao gồm bước: nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp trên đây; và thu hồi 2,3-butandiol từ dung dịch của môi trường nuôi cấy.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo các phương án của sáng chế có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng và có thể làm giảm tốc độ tiêu thụ 2,3-butanoldiol được tạo ra. Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn tạo ra lượng nhỏ acetoin tích tụ trong khi nuôi cấy.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện con đường sinh tổng hợp của 2,3-butandiol (A) và con đường tiêu thụ của 2,3-butandiol (B và C) trong chủng tạo ra 2,3-butandiol.

Fig. 2 thể hiện operon (nhóm gen liên hệ chặt chẽ với nhau điều hòa sự sản sinh enzym) của gen liên quan đến quá trình tổng hợp 2,3-butandiol trong *Klebsiella oxytoca*.

Fig. 3 thể hiện sơ đồ của quá trình tạo cấu trúc vector tái tổ hợp để biểu hiện trong *Escherichia coli* (E. coli JM109) để xác định chức năng tế bào của gen liên quan đến quá trình tổng hợp 2,3-butandiol trong *Klebsiella oxytoca*.

Fig. 4 thể hiện khả năng sản xuất 2,3-butandiol trong quá trình lên men theo mẻ (lên men gián đoạn) của *Escherichia coli* tái tổ hợp, và Fig. 5 thể hiện khả năng sản xuất axetoin trong quá trình lên men theo mẻ của *Escherichia coli* tái tổ hợp (●: pBRbudRAB/E. coli JM109, ▲: pBRbudRABC/E. coli JM109, ■: pBRbudRABD/E. coli JM109).

Fig. 6 thể hiện đường tăng trưởng của các chủng tái tổ hợp của *Klebsiella* được phát triển trong môi trường nuôi cấy cơ sở M9 bằng cách sử dụng 2,3-butandiol làm nguồn cacbon duy nhất.

Fig. 7 thể hiện nồng độ của 2,3-butandiol còn lại khi các chủng tái tổ hợp của *Klebsiella* được phát triển trong môi trường nuôi cấy cơ sở M9 bằng cách sử dụng 2,3-butandiol làm nguồn cacbon duy nhất (●: KO Δ ldhA, ▲: KO Δ dha Δ budC, ■: KO Δ ldhA Δ dar, ◆: KO Δ ldhA Δ budC Δ dar.)

Fig. 8 đến 11 thể hiện kết quả của quá trình sản xuất 2,3-butandiol bằng quá trình lên men theo mẻ các chủng tái tổ hợp của *Klebsiella* (Fig. 8: KO Δ ldhA, Fig. 9: KO Δ ldhA Δ budC, Fig. 10: KO Δ ldhA Δ dar, Fig. 11: KO Δ ldhA Δ budC Δ dar).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến gen mà mã hóa enzym có hoạt tính chuyển hóa giữa axetoin và 2,3-butandiol và có trình tự nucleotit là SEQ ID NO: 12.

Sáng chế đề cập đến vector tái tổ hợp chứa gen này.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến protein được mã hóa bằng gen này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp mà kìm hãm hoạt tính của protein này.

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng, trong đó hoạt tính của protein bị kìm hãm trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp 2,3-butandiol và lactat.

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-

butandiol gia tăng, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp này có hoạt tính chuyển hóa giữa axetoin và 2,3-butandiol, và enzym có hoạt tính đối với quá trình chuyển hóa 2,3-butandiol thành axetoin cao hơn so với hoạt tính chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol bị kìm hãm trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp 2,3-butandiol và lactat.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bao gồm bước: nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế; và thu hồi 2,3-butandiol từ dung dịch của môi trường nuôi cấy.

Sau đây, các phương án theo sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn.

Hoạt tính chuyển hóa giữa axetoin và 2,3-butandiol

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có khả năng sản xuất 2,3-butandiol. Trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, axetoin được chuyển hóa thành 2,3-butandiol, và ngược lại. Con đường chuyển hóa thành axetoin và 2,3-butandiol này còn được gọi là hoạt tính chuyển hóa giữa axetoin và 2,3-butandiol, cụ thể là hoạt tính biến đổi tương hỗ.

Con đường sinh tổng hợp của 2,3-butandiol được mô tả trong Fig. 1(A). Hầu hết các chủng tạo ra 2,3-butandiol có thể sử dụng 2,3-butandiol làm nguồn cacbon duy nhất. Tại thời điểm này, 2,3-butandiol có thể được tiêu thụ bằng cách sử dụng axetoin làm chất trung gian, như được thể hiện trong hai con đường sau đây. Trong con đường 2, hai phân tử 2,3-butandiol được chuyển hóa thành một phân tử 2,3-butandiol và hai phân tử axit axetic bằng “chu trình 2,3-butandiol”.

Con đường 1

2,3-butandiol $\rightarrow$ axetoin $\rightarrow$ axetaldehyt, coenzym axetyl A (axetyl-CoA) $\rightarrow$ TCA (Fig. 1(B)).

Con đường 2

2,3-butandiol $\rightarrow$ axetoin $\rightarrow$ diaxetyl $\rightarrow$ axit axetic, axetylaxeton (AAc) $\rightarrow$ axit axetic và axetylbutandiol (ABD)(Fig. 1(C)).

Gen có trình tự nucleotit là SEQ ID NO: 12

Sáng chế đề cập đến gen mã hóa enzym có hoạt tính chuyển hóa giữa axetoin và 2,3-butandiol và có trình tự nucleotit là SEQ ID NO: 12. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến vectơ tái tổ hợp chứa gen này. Vectơ có thể là vectơ bất kỳ thường

được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, như plasmit và tương tự, và không bị giới hạn một cách cụ thể.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến protein được mã hóa bằng gen này. Protein có trình tự amino axit (trình tự axit amin) được mô tả trong SEQ ID NO: 11 hoặc trình tự amino axit có độ đồng nhất 90% hoặc cao hơn với trình tự amino axit được mô tả trong SEQ ID NO: 11.

Vi sinh vật tái tổ hợp

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp này có hoạt tính chuyển hóa giữa axetoin và 2,3-butandiol, và enzym có hoạt tính đối với quá trình chuyển hóa 2,3-butandiol thành axetoin cao hơn so với hoạt tính chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol bị kìm hãm trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp 2,3-butandiol và lactat.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp mà kìm hãm hoạt tính của protein mà được mã hóa bằng gen có trình tự SEQ ID NO: 12 trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp 2,3-butandiol và lactat. Protein được mã hóa bằng gen có trình tự SEQ ID NO: 12 có thể là protein có trình tự amino axit được mô tả trong SEQ ID NO: 11, protein có trình tự amino axit tương đồng với 90% hoặc cao hơn với trình tự amino axit được mô tả trong SEQ ID NO: 11, protein AR2, hoặc protein có hoạt tính enzym tương đồng với 90% hoặc cao hơn với AR2, và protein tương tự.

Hoạt tính của protein có thể bị kìm hãm bằng cách ức chế sự biểu hiện của protein, ức chế hoạt tính enzym, và cách tương tự. For example, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng kìm hãm hoạt tính của protein bằng cách chọn phương pháp thích hợp, như loại bỏ gen mà mã hóa protein, ví dụ, gen *dar*, gen có trình tự SEQ ID NO: 12, hoặc gen có trình tự nucleotit tương đồng với 90% hoặc cao hơn với trình tự nucleotit được mô tả trong SEQ ID NO: 12; mà gây ra sự đột biến trong gen (sự đột biến như ức chế sự biểu hiện của gen bình thường bằng cách biến đổi, thay thế hoặc loại bỏ một phần trình tự nucleotit hoặc bổ sung một phần trình tự nucleotit); điều hòa sự biểu hiện của gen trong quá trình phiên mã hoặc dịch mã, và cách tương tự.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể kìm hãm con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat. Lactat dehydrogenaza điều hòa quá trình chuyển

hóa của pyruvat thành lactat. Con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat có thể bị kìm hãm bằng cách kìm hãm lactat dehydrogenaza. Việc kìm hãm lactat dehydrogenaza có thể được thực hiện bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen của lactat dehydrogenaza, ức chế hoạt tính enzym của lactat dehydrogenaza, và cách tương tự. Ví dụ, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể kìm hãm lactat dehydrogenaza bằng cách chọn phương pháp thích hợp, như loại bỏ gen mã hóa lactat dehydrogenaza, ví dụ, *ldhA*, mà gây ra sự đột biến trong gen (sự đột biến như ức chế sự biểu hiện của gen bình thường bằng cách biến đổi, thay thế hoặc loại bỏ một phần trình tự nucleotit hoặc bổ sung một phần trình tự nucleotit), điều hòa sự biểu hiện của gen trong quá trình phiên mã hoặc dịch mã, và cách tương tự.

Enzym chuyển hóa 2,3-butandiol chịu trách nhiệm cho việc sản xuất và tiêu thụ 2,3-butandiol. Trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, gen *dar* có hoạt tính tiêu thụ cao bị kìm hãm, và do đó việc tiêu thụ 2,3-butandiol được tạo ra được làm giảm trong khi đó vẫn duy trì việc sản xuất 2,3-butandiol. Do đó, năng suất tạo 2,3-butandiol, cụ thể là, khả năng sản xuất 2,3-butandiol được gia tăng. Ngoài ra, sự tích tụ của axetoin, mà là một trong các sản phẩm phụ tiêu biểu trong quá trình sản xuất 2,3-butandiol cũng được làm giảm, mà giúp giảm chi phí trong quá trình tách/tinh chế.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật có khả năng sản xuất 2,3-butandiol. Vi sinh vật tái tổ hợp này có thể được chọn từ nhóm bao gồm giống *Klebsiella*, giống *Bacillus*, và giống *Enterobacter*. Tốt hơn nếu vi sinh vật tái tổ hợp này là vi sinh vật thuộc giống *Klebsiella*.

Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bao gồm bước: nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế; và thu hồi 2,3-butandiol từ dung dịch của môi trường nuôi cấy.

Quá trình nuôi cấy được thực hiện dưới điều kiện hiếu khí, tốt hơn nếu dưới điều kiện vi hiếu khí. Ví dụ, quá trình nuôi cấy có thể được thực hiện bằng cách cấp oxy, cụ thể là không khí, trong quá trình nuôi cấy. Cụ thể, quá trình nuôi cấy được thực hiện bằng cách khuấy, mà không bị giới hạn một cách cụ thể.

Ưu điểm và dấu hiệu của sáng chế và phương pháp thực hiện sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn thông qua các ví dụ sau đây. Tuy nhiên cần phải hiểu rằng sáng chế

không bị giới hạn ở các ví dụ này và có thể được biến đổi theo các cách khác nhau, và các ví dụ này được mô tả để minh họa một cách chi tiết hơn cho sáng chế và giúp người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ sáng chế. Sáng chế sẽ được xác định bằng yêu cầu bảo hộ kèm theo và các phương án tương đương của nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu và phương pháp

Chủng *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP $\Delta ldhA$ (KO $\Delta ldhA$)

Chủng của gen của lactat dehydrogenaza (*ldhA*) được loại bỏ *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP $\Delta ldhA$ (KO $\Delta ldhA$) được tạo cấu trúc như sau. Đầu tiên, để nhân dòng gen của lactat dehydrogenaza của *Klebsiella oxytoca*, vị trí tương đồng 1 (SEQ ID NO: 2) của gen đích *ldhA* (SEQ ID NO: 1) được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi có SEQ ID NO: 3 và 4 bằng phản ứng chuỗi trùng hợp (polymerase chain reaction - PCR). Ngoài ra, vị trí tương đồng 2 (SEQ ID NO: 5) được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi có SEQ ID NO: 6 và 7 bằng PCR. Sau đó, vị trí tương đồng 1 và 2 được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi tương tự như mẫu đối với PCR, nhờ đó thu được mảnh ADN hoàn chỉnh (SEQ ID NO: 8) trong đó vị trí tương đồng 1 và 2 được kết nối với nhau. Mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm gen kháng kháng sinh và gen tương tự để nâng cao khả năng tái tổ hợp của gen đích. Ngoài ra, mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm gen *sacB* mã hóa enzym levansucraza để tách gen kháng kháng sinh được tái tổ hợp trong nhiễm sắc thể.

Mảnh ADN được tạo ra được chuyển đến *Klebsiella oxytoca* kiểu dại bằng phương pháp điện biến nạp (25 uF, 200 Ω , 18 kV/cm), trong đó gen đích là được loại bỏ bằng cơ chế tái tổ hợp tương đồng bẩm sinh (xem, Bảng 1)

Ví dụ thực nghiệm 1: Enzym chuyển hóa 2,3-butandiol

Enzym liên quan đến con đường tổng hợp và tiêu thụ 2,3-butandiol được sàng lọc bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) và cơ sở dữ liệu NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) dựa trên thông tin về bộ gen của *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP. Kết quả là, tất cả các loài thuộc *Klebsiella oxytoca*, thông tin về bộ gen của nó mà đã biết, được xác định là có ít

nhất hai enzym chuyển hóa 2,3-butandiol (AR1 và AR2). Fig. 2 thể hiện sơ đồ của nhóm gen dựa trên nguyên liệu trên đây.

Trình tự amino axit của AR1 được mô tả trong SEQ ID NO: 9, và trình tự nucleotit là *budC* mà mã hóa AR1 được mô tả trong SEQ ID NO: 10. Trong khi đó, trình tự amino axit của AR2 được mô tả trong SEQ ID NO: 11, và trình tự nucleotit là *dar* mà mã hóa AR2 được mô tả trong SEQ ID NO: 12 (xem, Bảng 2).

Hiện nay, vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol bao gồm giống vi sinh vật *Klebsiella* được biết là có một enzym chuyển hóa 2,3-butandiol. Ngoài ra, nói chung đối với giống vi sinh vật *Klebsiella*, enzym chuyển hóa 2,3-butandiol tương ứng với AR1 tồn tại dưới dạng operon với enzym liên quan (ALDC và ALS) (Oppermann, U. et al., Chem. Biol. Interact. 143: 247-253). Cụ thể là, AR2 được xác định theo sáng chế là enzym mới mà chưa được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và AR2 được đặc trưng là có các đặc tính như được mô tả trong mục từ (1) đến (3) sau đây:

1) enzym chuyển hóa 2,3-butandiol thuộc họ dehydrogenaza/reductaza mạch ngắn (short-chain dehydrogenase/reductase - SDR). SDR được đặc trưng là có 250 đến 350 phần gốc amino axit.

2) enzym chuyển hóa 2,3-butandiol có vị trí liên kết với NADH mà là coenzym tại đầu N của nó (TGXXXGXG giàu Glyxin và vùng hoạt động đặc trưng (motif) NNAG).

3) enzym chuyển hóa 2,3-butandiol có phần gốc amino axit Asn-Ser-Tyr-Lys bậc bốn có hoạt tính xúc tác và vị trí hoạt hóa YXXXXK.

Ví dụ thực nghiệm 2: Quá trình xác định enzym chuyển hóa 2,3-butandiol

Để xác định bằng thực nghiệm hoạt tính chuyển hóa 2,3-butandiol của AR1 và AR2, plasmit tái tổ hợp được mô tả trong Fig. 3 được tạo cấu trúc. PBBR1MCS bao gồm gen kháng cloramphenicol được sử dụng làm vectơ cơ sở (Kovach, M. E., et al., Biotechniques 16: 800-802).

pBRbudRAB bao gồm gen hoạt hóa phiên mã (transactivator - TA), gen axetolactat synthaza (axetolactatesynthase - ALS), và gen axetoin dicarboxylaza (ALDC), và được cho là thực hiện quá trình tổng hợp axetoin. PBRbudRABC bao gồm gen hoạt hóa phiên mã (TA), gen axetolactat synthaza (ALS), gen axetoin dicarboxylaza (ALDC), và gen của enzym chuyển hóa 2,3-butandiol (AR1), và được cho là đảm bảo thực hiện quá trình sản xuất 2,3-butandiol. Trong khi đó,

pBRbudRABD bao gồm gen hoạt hóa phiên mã (TA), gen axetolactat synthaza (ALS), gen axetoin dicarboxylaza (ALDC), và gen của enzym chuyển hóa 2,3-butandiol (AR2), và do đó quá trình sản xuất 2,3-butandiol là phụ thuộc vào chức năng của AR2.

Escherichia coli (*E. coli* JM109) được biến đổi bằng plasmit được tạo cấu trúc trên đây, nhờ đó thu được *Escherichia coli* tái tổ hợp. *Escherichia coli* tái tổ hợp được sử dụng để thực hiện quá trình lên men. Để duy trì vector tái tổ hợp được thêm vào trong tất cả các bước của quá trình nuôi cấy, cloramphenicol được bổ sung với lượng 30µg/ml. Quá trình lên men được thực hiện bằng cách cấy *Escherichia coli* tái tổ hợp trong 250 ml môi trường hỗn hợp bao gồm 9 g/L glucoza (50mM, glucoza), nuôi cấy *Escherichia coli* tái tổ hợp ở 37°C trong 16 giờ và cấy dung dịch môi trường nuôi cấy thu được trong 3L của môi trường hỗn hợp. Điều kiện quá trình lên men như sau: điều kiện vi hiếu khí; tốc độ hiếu khí 1 vvm, (tốc độ khuấy 400 vòng/phút), 90 g/L của nồng độ glucoza ban đầu, pH là 6,8, nhiệt độ nuôi cấy 37°C. Trong quá trình lên men, NaOH 5N được sử dụng để điều chỉnh pH. Các mẫu được lấy ra trong quá trình lên men sử dụng *Escherichia coli* tái tổ hợp. Tốc độ phát triển được xác định bằng cách đo OD600 (mật độ quang học) của các mẫu. Mẫu xét nghiệm được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó bằng cách phân tích nồng độ của chất chuyển hóa và 2,3-butandiol trong dịch nổi bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC).

Kết quả là, sau 24 giờ của quá trình lên men, pBRbudRAB/*E. coli* JM109 được xác định là tạo ra 2,0 g/L của 2,3-butandiol và 30,0 g/L của axetoin. On contrary, pBRbudRABC/*E. coli* JM109 được xác định là tạo ra 34,0 g/L của 2,3-butandiol và 4,7 g/L của axetoin. PBRbudRABD/*E. coli* JM109 được xác định là tạo ra 12,6 g/L của 2,3-butandiol và 13,0 g/L của axetoin (Fig. 4: khả năng sản xuất 2,3-butandiol và Fig. 5: khả năng sản xuất axetoin. ●: pBRbudRAB/*E. coli* JM109, ▲: pBRbudRABC/*E. coli* JM109, ■: pBRbudRABD/*E. coli* JM109).

Nói cách khác, chủng tái tổ hợp được xác định bao gồm *dar* mã hóa AR2 cũng chắc chắn tạo ra quá trình sản xuất 2,3-butandiol, mặc dù khả năng tổng hợp 2,3-butandiol là kém hơn so với khả năng của chủng tái tổ hợp bao gồm gen *budC* mã hóa AR1. Do đó, có thể thấy rằng cả hai AR1 và AR2 là các enzym có hoạt tính chuyển hóa 2,3-butandiol.

Ví dụ thực nghiệm 3: Quá trình tạo cấu trúc các chủng tái tổ hợp với AR1 và AR2

được loại bỏ

Để thực hiện quá trình loại bỏ gen mã hóa AR1 (được mã hóa bằng gen *budC*) và AR2 (được mã hóa bằng gen *dar*) mà được xác định là enzym chuyển hóa 2,3-butandiol trong Ví dụ thực nghiệm 2 từ bộ gen của *Klebsiella oxytoca*, cơ chế tái tổ hợp tương đồng của vi sinh vật được sử dụng. Mảnh ADN tái tổ hợp không kích hoạt gen đích có trình tự *Klebsiella oxytoca* bao gồm vùng tương đồng với gen cần được loại bỏ, và gen *sacB* mã hóa enzym levansucraza để loại bỏ gen kháng kháng sinh được tái tổ hợp trong nhiễm sắc thể sao cho khả năng tái tổ hợp được gia tăng. Nếu mảnh ADN được tạo cấu trúc được thêm vào vi sinh vật đích (*Klebsiella oxytoca*), gen đích được loại bỏ bằng cơ chế tái tổ hợp giữa vùng tương đồng của gen trong mảnh ADN và gen trong bộ gen vi sinh vật bằng recombinaza.

Plasmid tái tổ hợp đối với quá trình loại bỏ gen AR1(*budC*) và gen AR2 (*dar*) của *Klebsiella oxytoca* được tạo cấu trúc theo cách tương tự như được mô tả sau đây.

Đầu tiên, để loại bỏ AR1, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 13) của gen đích *budC* (SEQ ID NO: 10) được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi có SEQ ID NO: 14 và 15. Vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 16) được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi có SEQ ID NO: 17 và 18. Sau đó, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 13) và 2 (SEQ ID NO: 16) được sử dụng một cách đồng thời làm mẫu cho quá trình khuếch đại bằng PCR, nhờ đó thu được mảnh ADN (SEQ ID NO: 19) trong đó vùng tương đồng 1 và 2 được nối với nhau (xem, Bảng 3).

Ngoài ra, để loại bỏ AR2, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 20) của gen đích *dar* (SEQ ID NO: 12) được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi có SEQ ID NO: 21 và 22. Vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 23) được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi có SEQ ID NO: 24 và 25. Sau đó, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 20) và 2 (SEQ ID NO: 23) được sử dụng một cách đồng thời làm mẫu cho quá trình khuếch đại bằng PCR, nhờ đó thu được mảnh ADN (SEQ ID NO: 26) trong đó vùng tương đồng 1 và 2 được kết nối với nhau (xem, Bảng 4).

Klebsiella oxytoca KCTC 12133BP ΔdhA (KO ΔdhA) trong đó gen mã hóa lactat dehydrogenaza (*ldhA*) được loại bỏ được điều chế. Mảnh ADN có SEQ ID NO: 19 và 26 lần lượt được thêm vào *Klebsiella oxytoca* (KO ΔdhA) bằng phương pháp điện biến nạp (25 uF, 200 Ω , 18 kV/cm). Do đó, chủng tái tổ hợp (KO

$\Delta dhA \Delta budC$) trong đó gen AR1 (*budC*) được loại bỏ ra khỏi KO ΔdhA , và chủng tái tổ hợp (KO $\Delta dhA \Delta dar$) trong đó gen AR2 (*dar*) được loại bỏ ra khỏi KO ΔdhA được tạo cấu trúc một cách tương ứng.

Ngoài ra, plasmit pKOV deltaAR2 được thêm vào chủng tái tổ hợp (KO $\Delta dhA \Delta budC$) trong đó AR1 (*budC*) được loại bỏ, nhờ đó thu được chủng tái tổ hợp (KO $\Delta dhA \Delta budC \Delta dar$) trong đó gen AR2 (*dar*) còn được tiếp tục loại bỏ.

Phương pháp chung để loại bỏ gen sau khi bổ sung mảnh ADN bao gồm phương pháp thử nghiệm kháng kháng sinh và phương pháp thử nghiệm kháng sucroza, và quá trình loại bỏ gen tương ứng được xác định bằng cách thực hiện PCR trực tiếp từ khuẩn lạc.

Ví dụ thực nghiệm 4: Nghiên cứu chức năng của AR1 và AR2

Chức năng của protein AR1 và AR2 được nghiên cứu bằng con đường tiêu thụ của 2,3-butandiol bằng cách sử dụng axetoin làm chất trung gian. Cụ thể hơn, sự phát triển của các chủng tái tổ hợp của *Klebsiella oxytoca* và nồng độ của 2,3-butandiol còn lại được quan sát bằng cách sử dụng 2,3-butandiol làm nguồn cacbon duy nhất trong môi trường cơ sở M9. Các chủng được cấy thành vạch trong môi trường rắn LB, tiếp theo nuôi cấy ở 30°C trong 16 giờ, và sau đó nuôi cấy cụm khuẩn duy nhất trong 3 ml của môi trường lỏng LB trong 8 giờ. Dung dịch môi trường nuôi cấy được làm sạch bằng môi trường cơ sở M9 hai lần để loại bỏ thành phần môi trường LB còn lại. 100 ml môi trường cơ sở M9 bao gồm 10 g/L 2,3-butandiol được cấy truyền với dung dịch tạo thành, và sau đó được nuôi cấy. Các mẫu được lấy ra trong khi nuôi cấy các chủng tái tổ hợp. Mẫu xét nghiệm được đo OD600 (mật độ quang học), nhờ đó xác định được tốc độ phát triển. Mẫu xét nghiệm được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút. Nồng độ của chất chuyển hóa và 2,3-butandiol trong dịch nổi được phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Kết quả là, các chủng (KO $\Delta ldhA$ và KO $\Delta ldhA \Delta budC$) bao gồm gen *dar* mã hóa AR2 trong bộ gen được phát triển bằng cách sử dụng 2,3-butandiol làm nguồn cacbon, và nồng độ của 2,3-butandiol còn lại giảm theo sự phát triển. Ngược lại, các chủng (KO $\Delta ldhA \Delta dar$ và KO $\Delta ldhA \Delta budC \Delta dar$) với gen *dar* được loại bỏ không phát triển sau 200 giờ nuôi cấy. Nồng độ của 2,3-butandiol còn lại được duy trì ở nồng độ ban đầu của quá trình nuôi cấy. Cụ thể là, các chủng tái tổ hợp được xác định là có thể sử dụng hoặc có thể không sử dụng 2,3-butandiol làm

nguồn cacbon phụ thuộc vào sự có mặt của gen AR2 (*dar*) bất chấp sự có mặt của gen *budC* mã hóa AR1 (Fig. 6: Kết quả phát triển. ●: KO Δ *ldhA*, ▲: KO Δ *ldhA* Δ *budC*, ■: KO Δ *ldhA* Δ *dar*. ◆: KO Δ *ldhA* Δ *budC* Δ *dar*. Fig. 7: Nồng độ của 2,3-butandiol còn lại. ●: KO Δ *ldhA*, ▲: KO Δ *ldhA* Δ *budC*, ■: KO Δ *ldhA* Δ *dar*. ◆: KO Δ *ldhA* Δ *budC* Δ *dar*).

Do đó, AR2 được xác định là đóng vai trò quan trọng trong hai con đường tiêu thụ 2,3-butandiol. Ngoài ra, AR2 được xác định là có chức năng làm 2,3-butandiol dehydrogenaza có thể chuyển hóa 2,3-butandiol thành axetoin trong tế bào.

Từ kết quả của Ví dụ thực nghiệm 1 và 2, AR2 được xác định là có hoạt tính chuyển hóa giữa axetoin và 2,3-butandiol, và hoạt tính chuyển hóa 2,3-butandiol thành axetoin cao hơn hoạt tính chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol. Mặt khác, AR1 được xác định là có hoạt tính chuyển hóa giữa axetoin và 2,3-butandiol, và hoạt tính chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol cao hơn hoạt tính chuyển hóa 2,3-butandiol thành axetoin.

Ví dụ thực nghiệm 5: Quá trình sản xuất 2,3-butandiol

Các chủng tái tổ hợp được tạo cấu trúc trong Ví dụ thực nghiệm 3 được nuôi cấy, nhờ đó tạo ra 2,3-butandiol. Để làm mẫu đối chứng so sánh, *Klebsiella oxytoca* KCTC 12133BP Δ *ldhA* (KO Δ *ldhA*) được sử dụng.

Mỗi chủng tái tổ hợp được cấy trong 250 ml của môi trường hỗn hợp bao gồm 9 g/L glucoza (50mM, glucoza), sau đó nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ. 3 L của môi trường hỗn hợp được cấy truyền với dung dịch môi trường nuôi cấy thu được, và được lên men. Điều kiện quá trình lên men như sau: điều kiện vi hiếu khí (tốc độ hiếu khí 1 vvm, tốc độ khuấy 400 vòng/phút), 90 g/L của nồng độ glucoza ban đầu, pH là 6,8, nhiệt độ quá trình nuôi cấy là 37°C. Trong khi lên men, NaOH 5N được sử dụng để điều chỉnh pH. Các mẫu được lấy ra trong khi lên men bằng cách sử dụng *Klebsiella* tái tổ hợp. Tốc độ phát triển được xác định bằng cách đo OD600 (mật độ quang học) của mẫu xét nghiệm. Mẫu xét nghiệm được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó phân tích nồng độ của chất chuyển hóa và 2,3-butandiol trong dịch nổi bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Kết quả là, chủng tái tổ hợp (KO Δ *ldhA* Δ *budC*) với gen AR1 được loại bỏ có năng suất tạo ra 2,3-butandiol thấp hơn chủng KO Δ *ldhA* (Fig. 8) dùng làm mẫu so sánh, ngược lại chủng (KO Δ *ldhA* Δ *budC*) có sự tích tụ axetoin lớn hơn

so với chủng KO $\Delta ldhA$ (Fig. 9). Trái lại, trong việc tiêu thụ đường, chủng tái tổ hợp (KO $\Delta ldhA \Delta dar$) với gen AR2 được loại bỏ có năng suất tạo 2,3-butandiol tương tự với chủng KO $\Delta ldhA$ dùng làm mẫu so sánh. Sau khi tiêu thụ hết đường, tốc độ tiêu thụ 2,3-butandiol và tốc độ tích tụ axetoin thấp hơn so với các tốc độ tương ứng của mẫu so sánh (Fig. 10). Các chủng với cả hai gen AR1 và AR2 được loại bỏ hầu như không có khả năng sản xuất thêm 2,3-butandiol để sản xuất axetoin (Fig. 11). Do đó, các chủng với gen AR1 mà không phải gen AR2 được loại bỏ (KO $\Delta ldhA \Delta dar$) được xác định là có ưu điểm tốt hơn xét trên quan điểm về việc tạo ra 2,3-butandiol và lưu trữ sau khi hoàn thành quá trình lên men (xem, Bảng 5).

Bảng 5

Chủng	Thời gian nuôi cấy			
	14 giờ		30 giờ	
	2,3-butandiol	Axetoin	2,3-butandiol	Axetoin
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
KO $\Delta ldhA$	30,8	1,7	13,5	16,6
KO $\Delta ldhA \Delta budC$	6,2	12,7	15,4	16,7
KO $\Delta ldhA \Delta dar$	30,2	0,4	20,0	11,2
KO $\Delta ldhA \Delta budC \Delta dar$	0,6	14,1	4,0	25,3

Các trình tự

SEQ ID NO: 1 là trình tự nucleotit của gen *ldhA*, SEQ ID NO: 2 là vùng tương đồng 1 của gen *ldhA*, SEQ ID NO: 3 và 4 là đoạn môi trong quá trình khuếch đại của vùng tương đồng 1 của gen *ldhA*. SEQ ID NO: 5 là vùng tương đồng 2 của gen *ldhA*, SEQ ID NO: 6 và 7 đoạn môi trong quá trình khuếch đại bằng PCR của vùng tương đồng 2 của gen *ldhA*, SEQ ID NO: 8 là mảnh ADN trong đó vùng tương đồng 1 và 2 của gen *ldhA* được nối với nhau.

SEQ ID NO: 9 là trình tự amino axit của AR1, SEQ ID NO: 10 là trình tự nucleotit của gen *budC* mà mã hóa AR1.

SEQ ID NO: 11 là trình tự amino axit của AR2, SEQ ID NO: 12 là trình tự nucleotit của gen *dar* mà mã hóa AR2.

SEQ ID NO: 13 là vùng tương đồng 1 của gen *budC*, SEQ ID NO: 14 và 15

đoạn mỗi trong quá trình khuếch đại bằng PCR của vùng tương đồng 1 của gen *budC*. SEQ ID NO: 16 là vùng tương đồng 2 của gen *budC*, SEQ ID NO: 17 và 18 đoạn mỗi trong quá trình khuếch đại bằng PCR của vùng tương đồng 2 của gen *budC*. SEQ ID NO: 19 là mảnh ADN trong đó vùng tương đồng 1 và 2 của gen *budC* được nối với nhau.

SEQ ID NO: 20 là vùng tương đồng 1 của gen *dar*, SEQ ID NO: 21 và 22 đoạn mỗi trong quá trình khuếch đại bằng PCR của vùng tương đồng 1 của gen *dar*. SEQ ID NO: 23 là vùng tương đồng 2 của gen *dar*, SEQ ID NO: 24 và 25 đoạn mỗi trong quá trình khuếch đại bằng PCR của vùng tương đồng 2 của gen *dar*. SEQ ID NO: 26 là mảnh ADN trong đó vùng tương đồng 1 và 2 của gen *dar* được nối với nhau.

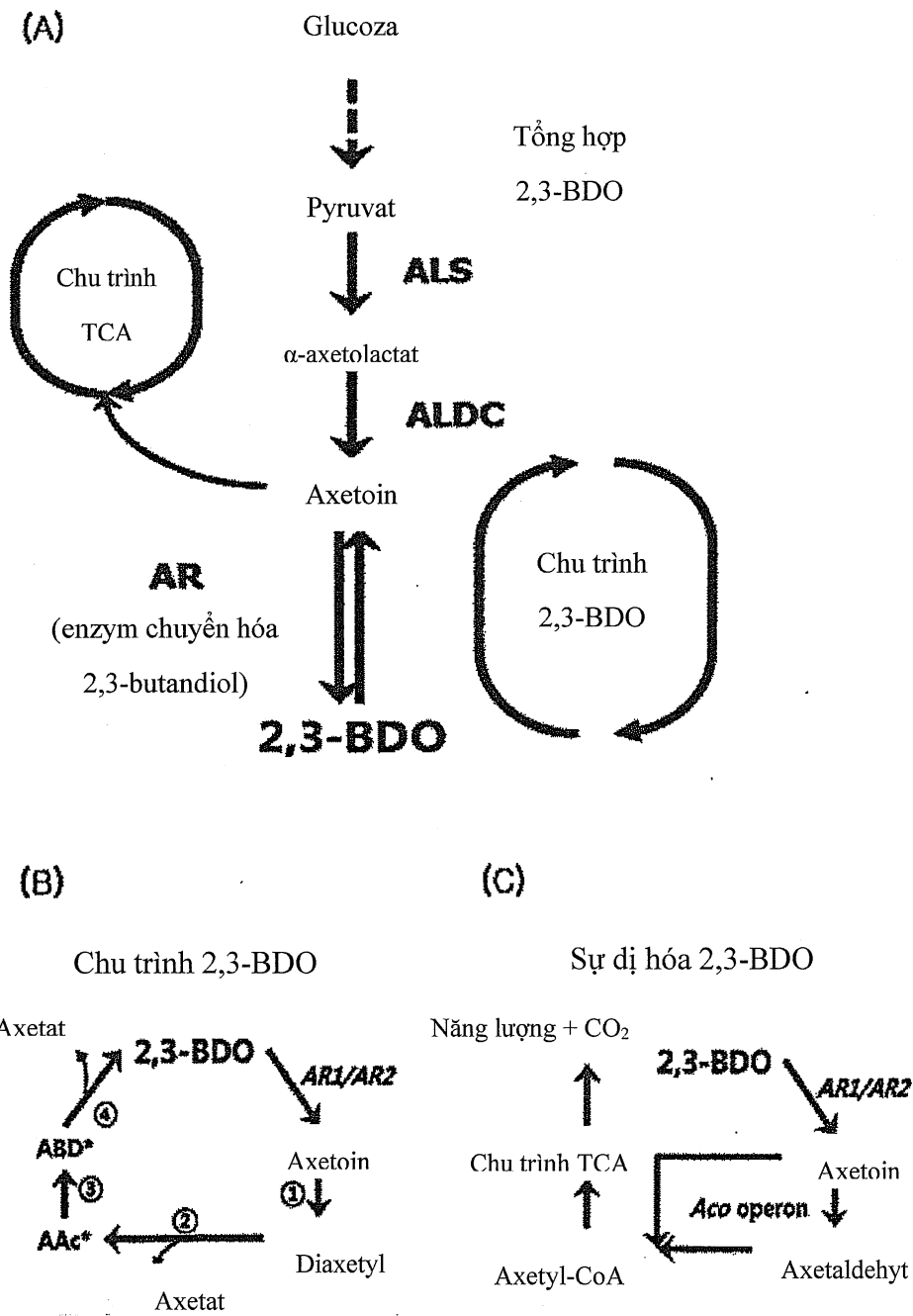
Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng và phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bằng cách sử dụng vi sinh vật này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật tái tổ hợp kìm hãm hoạt tính của protein có trình tự amino axit SEQ ID NO: 11 so với vi sinh vật thể tự nhiên, trong đó vi sinh vật là *Klebsiella*.
2. Vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng gia tăng sản xuất 2,3-butandiol so với vi sinh vật thể tự nhiên, trong đó hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen có trình tự amino axit SEQ ID NO: 12 bị kìm hãm trong vi sinh vật có con đường sinh tổng hợp 2,3-butandiol và lactat,
trong đó vi sinh vật là *Klebsiella*.
3. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 2, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat cũng bị kìm hãm.
4. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 2, trong đó hoạt tính của lactat dehydrogenaza cũng bị kìm hãm.
5. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 2, trong đó gen *ldhA* mà mã hóa lactat dehydrogenaza được loại bỏ.

FIG. 1



*ABD: Axetylbutandiol, AAc: Axetylacetoin

FIG. 2



FIG. 3

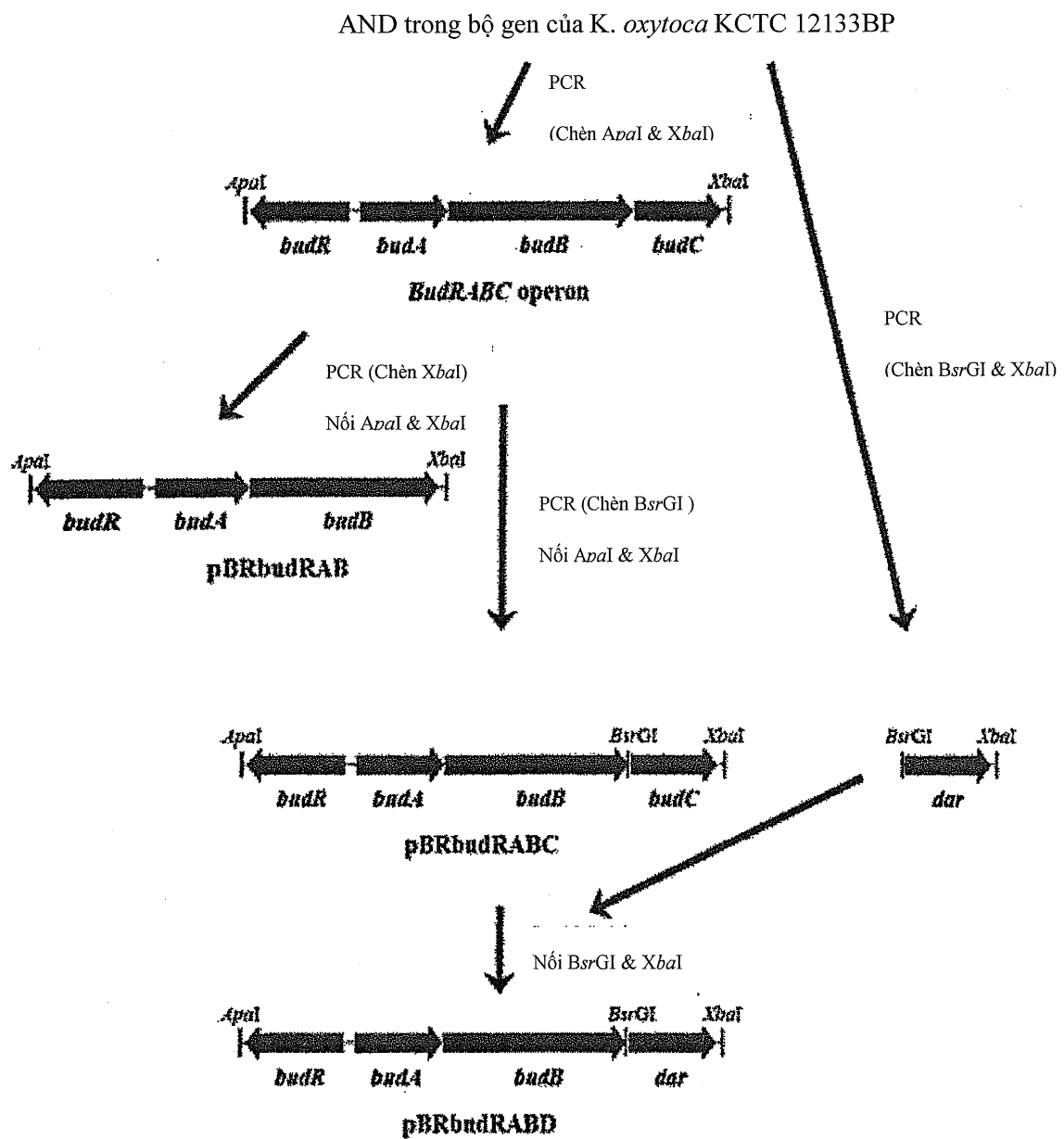


FIG. 4

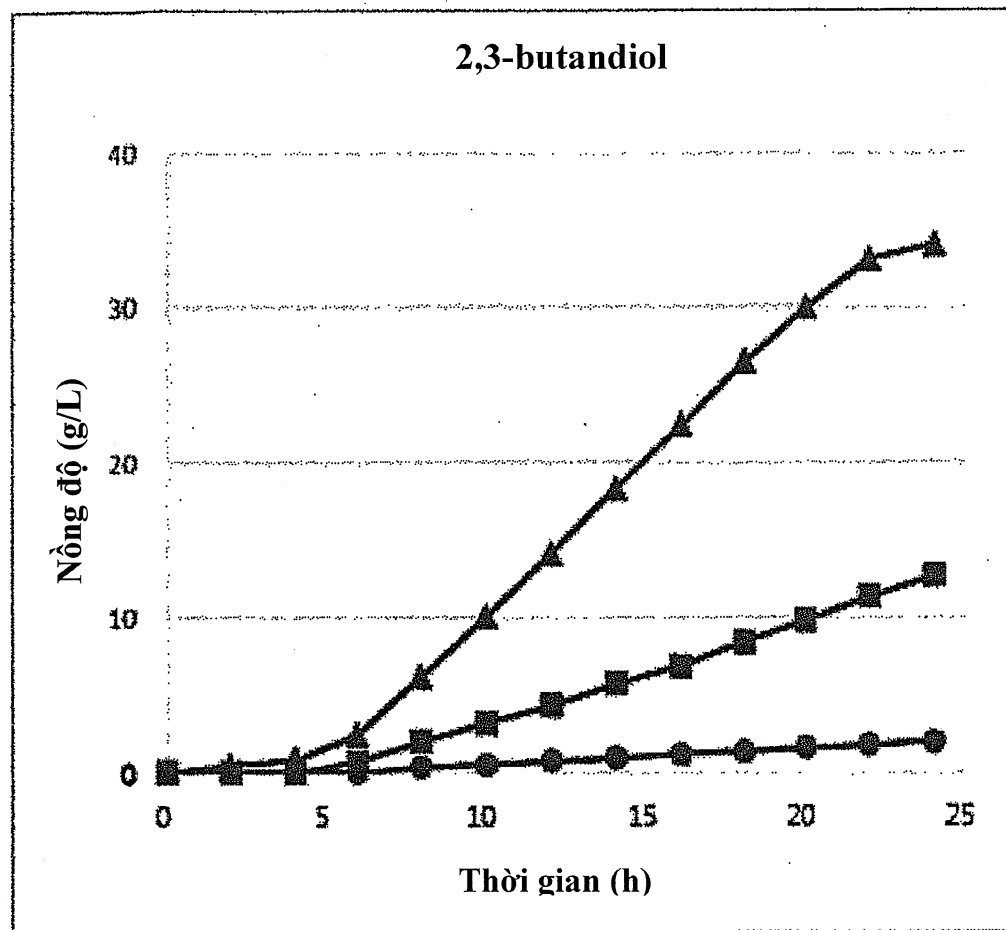


FIG. 5

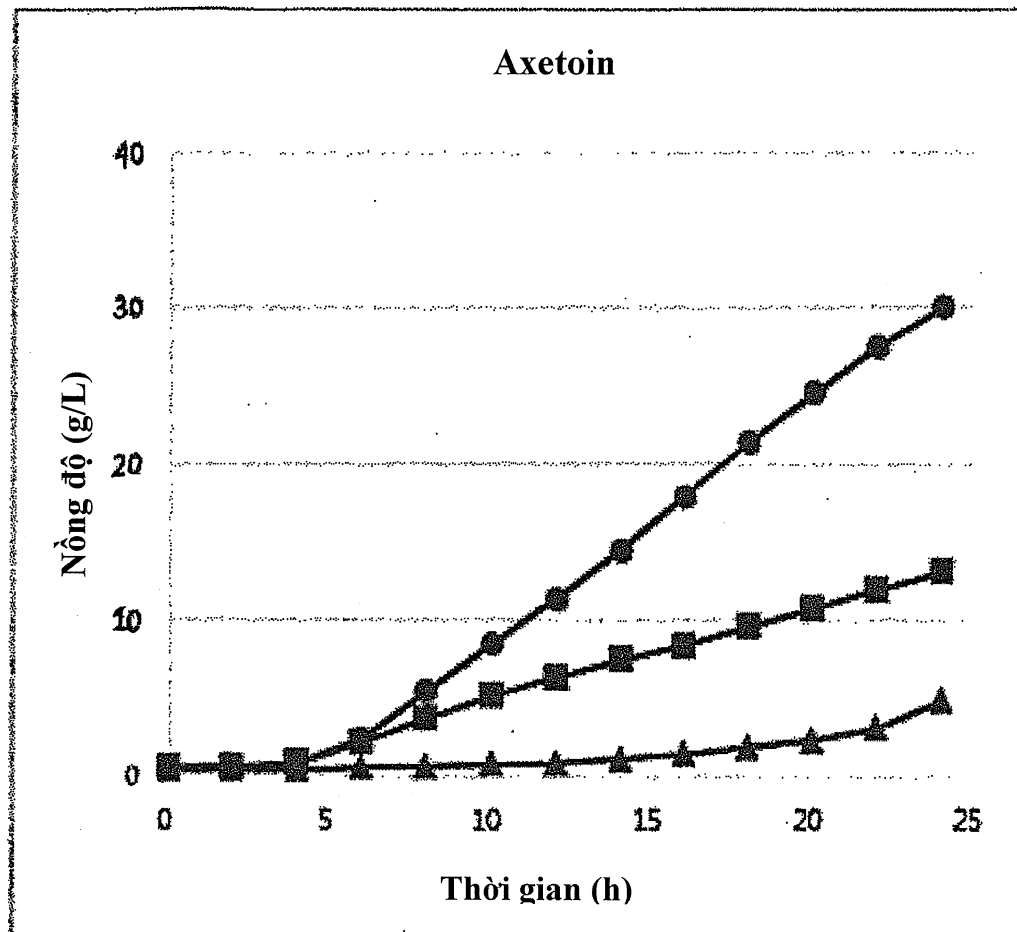


FIG. 6

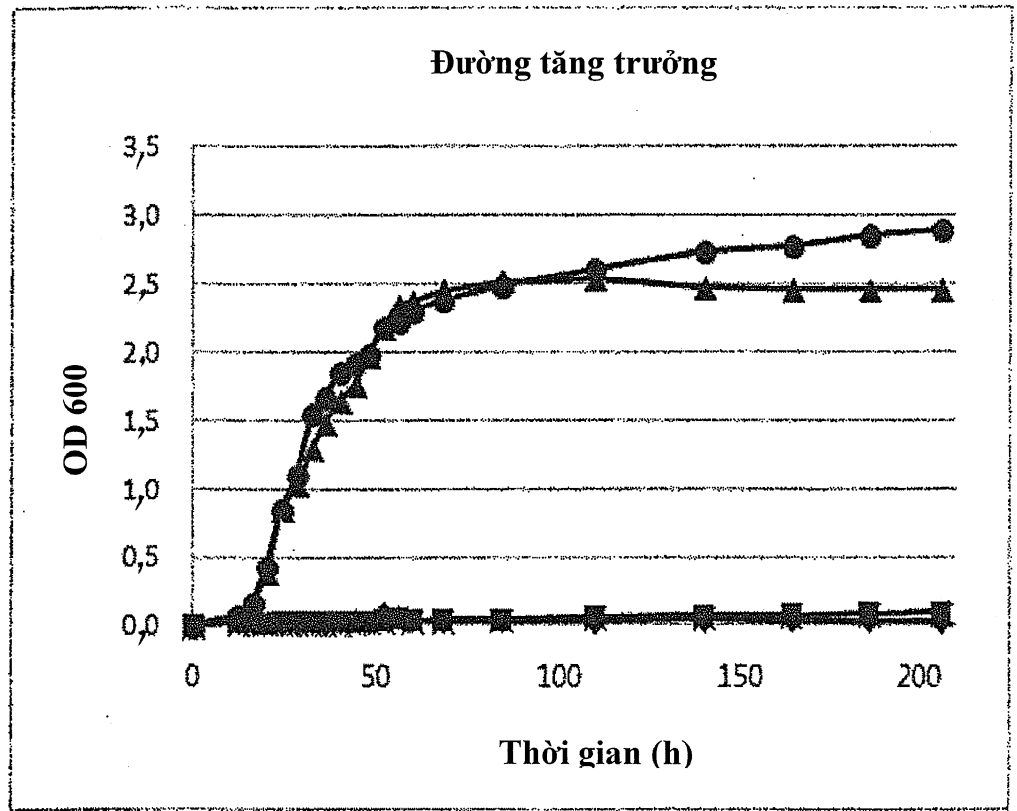


FIG. 7

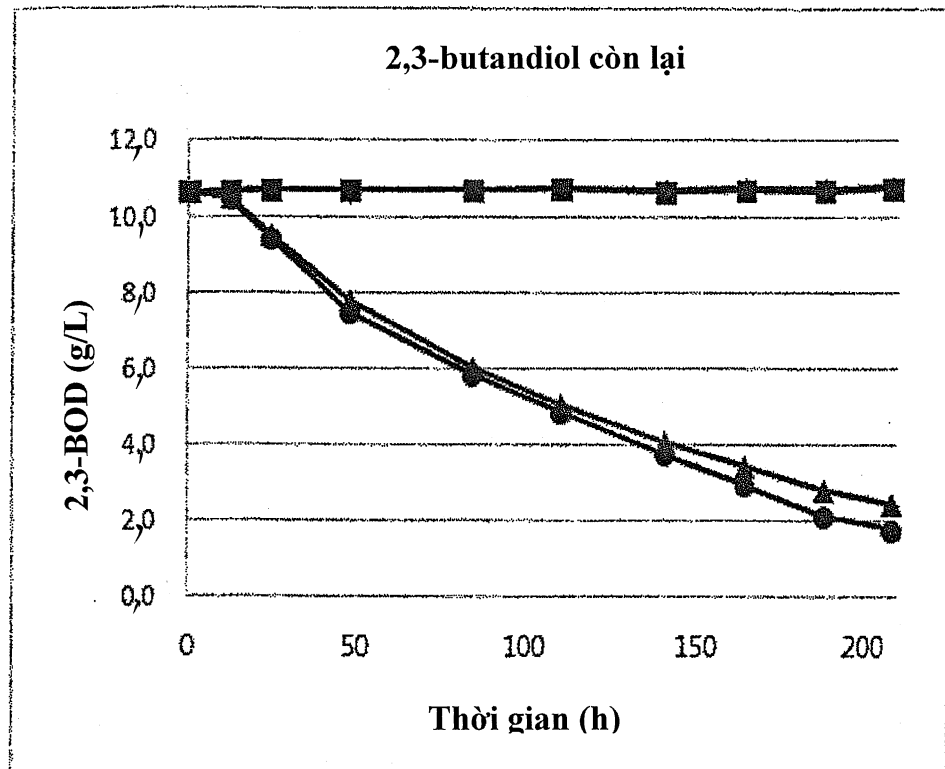


FIG. 8

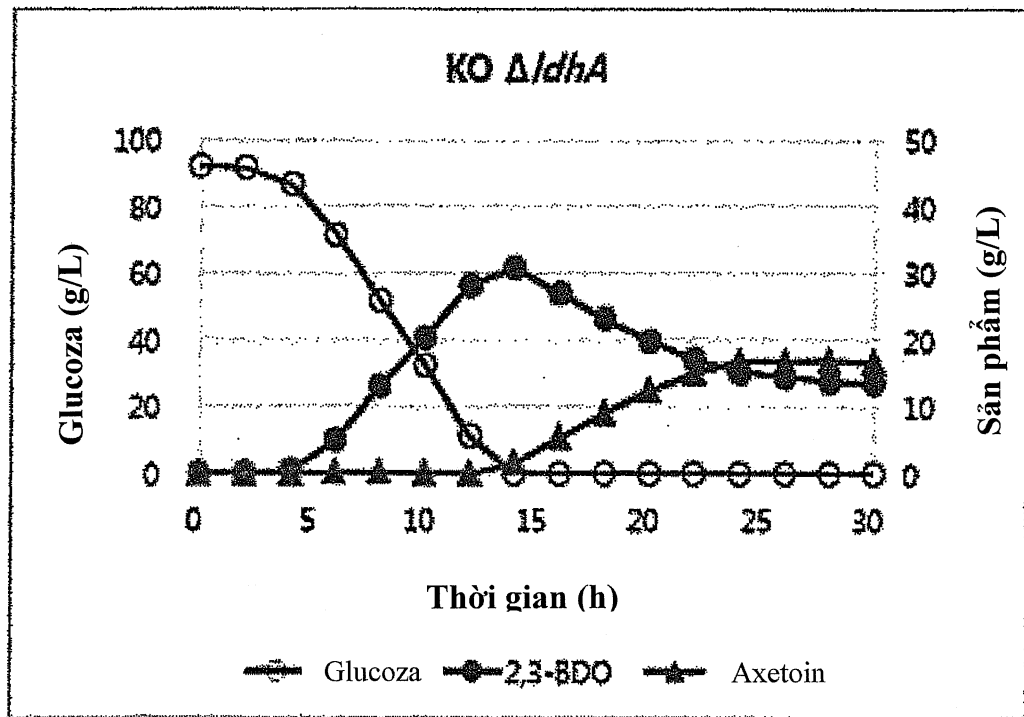


FIG. 9

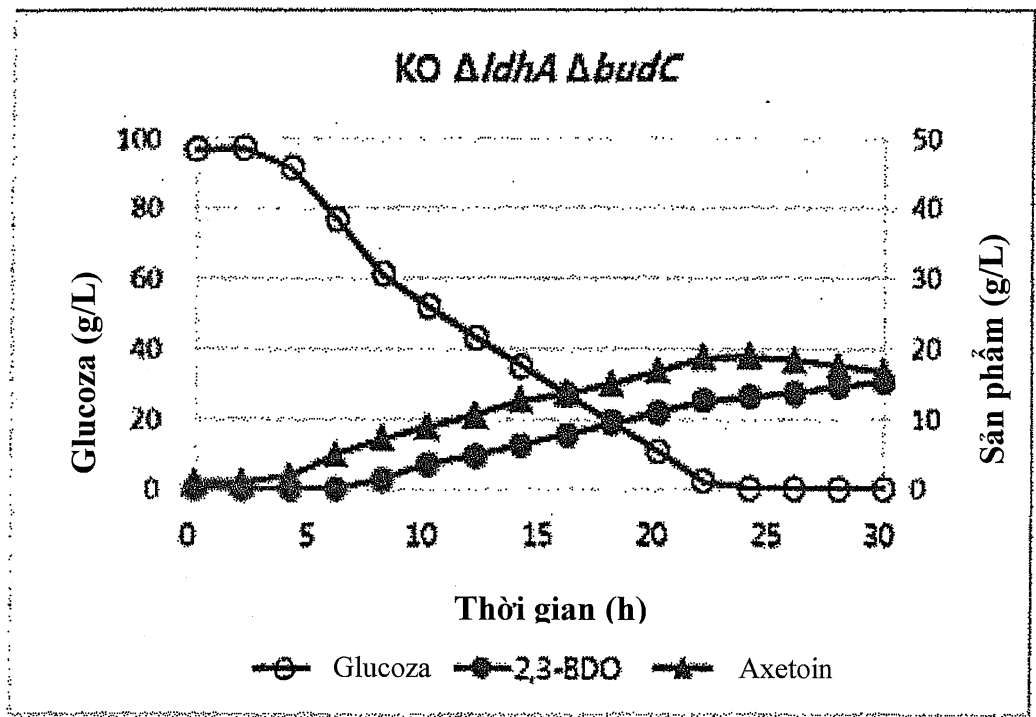


FIG. 10

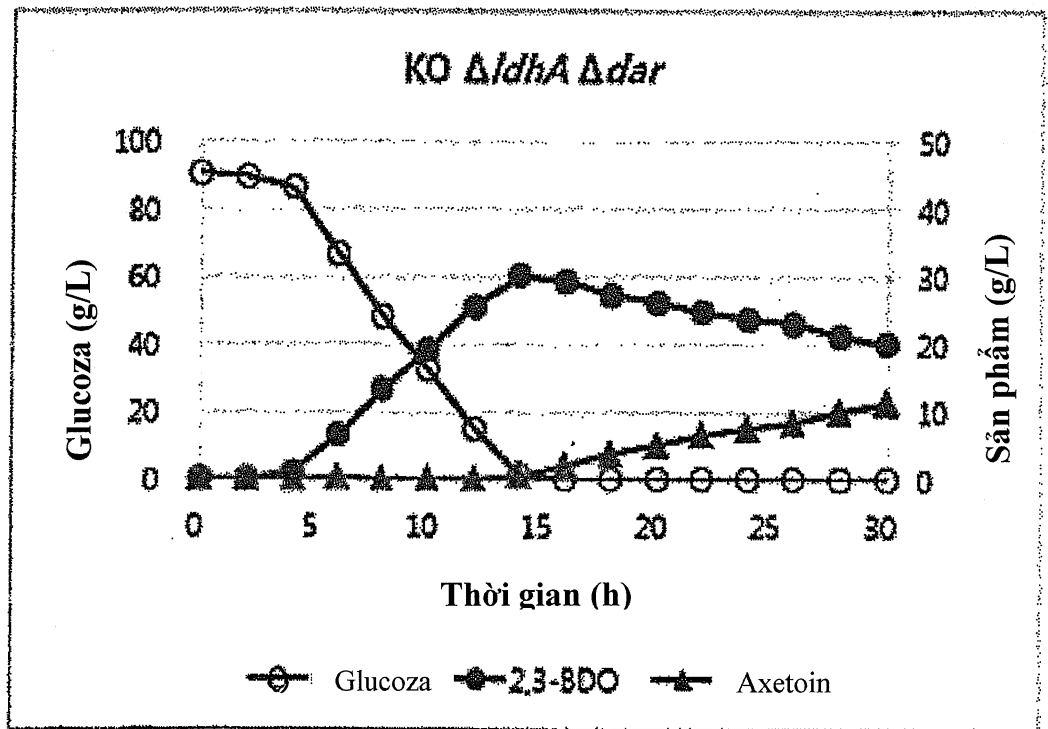
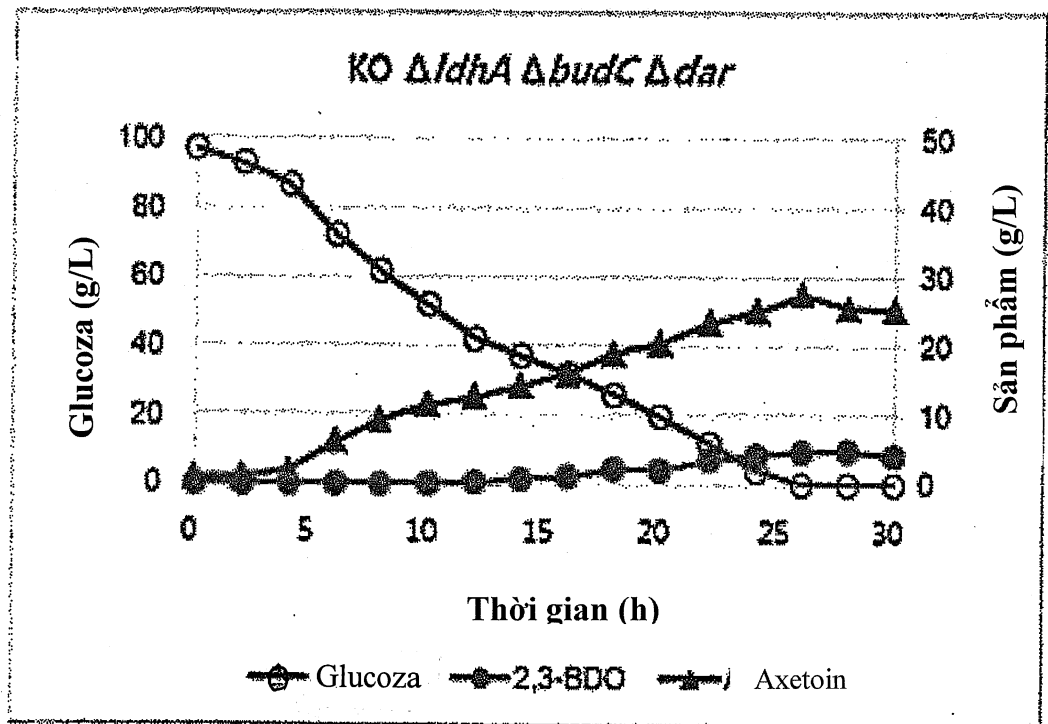


FIG. 11



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	GS CALTEX	
<120>	Vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butadiol gia tăng	
<130>	GSP120801	
<160>	26	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	990	
<212>	ADN	
<213>	Klebsiella oxytoca	
<400>	1	
	atgaaaatcg ctgtgtatag tacaaaacag tacgacaaga agtatctgca gcatgttaat	60
	gatgcatatg gctttgaact ggagtttttt gacttcctgc taaccgaaaa aaccgccaaa	120
	accgccaacg gctgtgaagc ggtgtgtatc ttcgtaaacy atgacggtag ccgcccggta	180
	cttgaagaac tgaaagccca cggcgtgcag tacatcgcg cgcgctgcgc ggggttcaac	240
	aacgttgacc tcgatgccgc caaagagctg ggctgcggg tggcgcgcgt ccgggcctac	300
	tcgccggaag cggcgcgtga gcacgcgatc ggcatgatga tgcgcgtgaa ccgccgcatt	360
	caccgtgcct atcagcgcac ccgcgacgcg aacttctctc tggaagggtt gaccggtttc	420
	accatgcacg gtaaaaccgc cggcgttatt ggcaccggtt aaatcgccgt cgcgcgcgtg	480
	cgcattctta aaggcttcgg tatgcgtctg ctggcgtttg atccctaccc aagcgcgcc	540
	gcgctggata tgggcgtgga gtatgtcgat cttgaaaccc tgtaccggga gtccgatgtt	600
	atctcactgc actgcccact gaccgatgaa aactaccatt tgcctgaacca tgccgcgttc	660
	gatcgcatga aagacggggt gatgatcatc aacaccagcc gcggcgcgtt catcgattcg	720
	caggcagcga tcgacgccct gaagcatcag aaaattggcg cgctggggat ggacgtgtat	780
	gagaacgaac gcgatctgtt ctttgaagat aagtctaatt acgtgattca ggatgatgtg	840
	ttccgcgctc tctccgcctg ccataacgtc ctgtttaccg gtcaccaggc gtttctgacc	900
	gcggaagcgt tgatcagcat ttcgcaaacc accctcgaca acctgcgtca agtggatgca	960
	ggcgaaacct gtcctaacgc actggtctga	990
<210>	2	
<211>	595	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự nhân tạo	
<400>	2	
	atgacgttcg ctaaactctg cgcgcgtcatc tcgctgctga tcccgggcac ctccgggcta	60

ctgctgttcg gcaccctggc atcggccagc ccgggacatt tctgtttaat gtggatgagc 120
gccagcctcg gcgctatcgg cggattcttg ctctcgtggc tgacgggcta ccgctaccgg 180
taccatctgc atcgatatccg ctggcttaat gccgaacgcc tcgctcgcgg ccagttgttc 240
ctgcgcgcgc acggcgcggtg ggcagtcctt tttagccgct ttctctctcc gcttcgcgcc 300
accgtgccgc tggtaacggc gccagcggc acctctctct ggcagtttca gctcgccaac 360
gtcagctccg ggctgctctg gccgctgac ctgctggcgc caggcgcggt aagcctcagc 420
ttttgatgaa aggtattgtc ttttaaagag atttcttaac accgcgatat gctctagaat 480
tattactata acctgctgat taaactagtt tttaacatct gtaagattat ttttaattatg 540
ctaccgtgac ggtattatca ctggagaaaa gtcttttttc cttgcccttt tgtgc 595

<210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400> 3
cacgcatcca tgacgttcgc taaatcctgc 30

<210> 4
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400> 4
gcacaaaagg gcaaggaaaa aagacttttc tccagtata 40

<210> 5
<211> 591
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nhân tạo

<400> 5
tatcactgga gaaaagtctt ttttccttgc ctttttgtgc tcccccttcg cggggggcac 60
attcagataa tccccacaga aattgcctgc gataaagtta caatcccttc atttattaat 120
acgataaata tttatggaga ttaaatgaac aagtatgctg cgctgctggc ggtgggaatg 180
ttgctatcgg gctgcgttta taacagcaag gtgtcgacca gagcggaaca gcttcagcac 240
cacggttttg tgctgaccag cggttaacggg cagccgctga atgccgcgga taagccgcag 300

gagctgagct tcggcgaaaa gatgcccatt acgggcaaga tgtctgtttc aggtaatatg 360
 tgcaaccgct tcagcggcac gggcaaagtc tctgacggcg agctgaaggt tgaagagctg 420
 gcaatgaccc gcatgctctg cacggactcg cagcttaacg ccttggacgc cacgctgagc 480
 aaaatgctgc gcgaaggcgc gcaggtcgac ctgacggaaa cgcagctaac gctggcgacc 540
 gccgaccaga cgctggtgta taagctcgcc gacctgatga attaataatt a 591

<210> 6
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400> 6
 tatcactgga gaaaagtctt ttttccttgc ccttttgtgc 40

<210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400> 7
 cctgcggccg ctaattatta attcatcagg tc 32

<210> 8
 <211> 1146
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<400> 8
 atgacgttcg ctaaactcctg cgccgtcatc tcgctgctga tcccgggcac ctccgggcta 60
 ctgctgttcg gcaccctggc atcggccagc ccgggacatt tcctgttaat gtggatgagc 120
 gccagcctcg gcgctatcgg cggattctgg ctctcgtagc tgacgggcta ccgctaccgg 180
 taccatctgc atcgatatcg ctggcttaat gccgaacgcc tcgctcgagg ccagttgttc 240
 ctgcgcccgc acggcgcgctg ggcagtcttt tttagccgct ttctctctcc gcttcgagcc 300
 accgtgccgc tggttaaccgg cgccagcggc acctctctct ggcagtttca gctcgccaac 360
 gtcagctccg ggctgctctg gccgctgatc ctgctggcgc caggcgcggt aagcctcagc 420
 ttttgatgaa aggtattgtc ttttaaagag atttcttaac accgcgatat gctctagaat 480

tattactata acctgctgat taaactagtt ttttaacattt gtaagattat ttttaattatg 540
ctaccgtgac ggtattatca ctggagaaaa gtcttttttc cttgcccttt tgtgctcccc 600
cttcgcgggg ggcacattca gataatcccc acagaaattg cctgcgataa agttacaatc 660
ccttcattta ttaatacgat aaatatttat ggagattaaa tgaacaagta tgctgcgctg 720
ctggcggtgg gaatgttgct atcgggctgc gtttataaca gcaaggtgtc gaccagagcg 780
gaacagcttc agcaccaccg ttttgtgctg accagcggtta acgggcagcc gctgaatgcc 840
gcggataagc cgcaggagct gagcttcggc gaaaagatgc ccattacggg caagatgtct 900
gtttcaggta atatgtgcaa ccgcttcagc ggcacgggca aagtctctga cggcgagctg 960
aaggttgaag agctggcaat gacccgcatg ctctgcacgg actcgcagct taacgccctg 1020
gacgccacgc tgagcaaaat gctgcgcgaa ggcgcgcagg tcgacctgac ggaaacgcag 1080
ctaacgctgg cgaccgccga ccagacgctg gtgtataagc tcgccgacct gatgaattaa 1140
taatta
1146

<210> 9
<211> 256
<212> PRT
<213> Klebsiella oxytoca

<400> 9
Met Lys Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Gly Gln Gly Ile Gly Lys
1 5 10 15
Ala Ile Ala Leu Arg Leu Val Lys Asp Gly Phe Ala Val Ala Ile Ala
20 25 30
Asp Tyr Asn Asp Ala Thr Ala Gln Ala Val Ala Asp Glu Ile Asn Arg
35 40 45
Ser Gly Gly Arg Ala Leu Ala Val Lys Val Asp Val Ser Gln Arg Asp
50 55 60
Gln Val Phe Ala Ala Val Glu Gln Ala Arg Lys Gly Leu Gly Gly Phe
65 70 75 80
Asp Val Ile Val Asn Asn Ala Gly Val Ala Pro Ser Thr Pro Ile Glu
85 90 95
Glu Ile Arg Glu Glu Val Ile Asp Lys Val Tyr Asn Ile Asn Val Lys
100 105 110
Gly Val Ile Trp Gly Ile Gln Ala Ala Val Glu Ala Phe Lys Lys Glu
115 120 125
Gly His Gly Gly Lys Ile Ile Asn Ala Cys Ser Gln Ala Gly His Val
130 135 140
Gly Asn Pro Glu Leu Ala Val Tyr Ser Ser Ser Lys Phe Ala Val Arg
145 150 155 160
Gly Leu Thr Gln Thr Ala Ala Arg Asp Leu Ala His Leu Gly Ile Thr
165 170 175

Val Asn Gly Tyr Cys Pro Gly Ile Val Lys Thr Pro Met Trp Ala Glu
 180 185 190

Ile Asp Arg Gln Val Ser Glu Ala Ala Gly Lys Pro Leu Gly Tyr Gly
 195 200 205

Thr Gln Glu Phe Ala Lys Arg Ile Thr Leu Gly Arg Leu Ser Glu Pro
 210 215 220

Glu Asp Val Ala Ala Cys Val Ser Tyr Leu Ala Gly Pro Asp Ser Asn
 225 230 235 240

Tyr Met Thr Gly Gln Ser Leu Leu Ile Asp Gly Gly Met Val Phe Asn
 245 250 255

<210> 10
 <211> 768
 <212> ADN
 <213> Klebsiella oxytoca

<400> 10
 atgaaaaaag tcgcactcgt caccggcgcg gccagggtg tcggtaaagc tatcgccctt 60
 cgtctggtga aagatggttt tgccgtggct atcgccgatt ataacgacgc caccgcgcag 120
 gcggtcgctg atgaaattaa ccgcagcggc gccggggcgc tagcggtgaa ggtggatgtg 180
 tctcaacgcg atcaggtttt tgccgccgtc gaacaggcgc gcaagggctc cggcggtttt 240
 gacgtgatcg tcaacaacgc cggggttgcg ccctccacac caatcgaaga gattcgcgag 300
 gaggtgatcg ataaagtcta caatatcaac gttaaaggcg ttatctgggg catccaggcc 360
 gcggtagagg cgtttaaaaa agagggccac gccggcaaaa ttatcaacgc ctgctcccag 420
 gcggggccatg taggtaaccc ggagctggcg gtctatagct ccagtaaatt tgccgtgcgc 480
 ggcttgacgc aaaccgcccgc ccgcgatctg gcgcattctg ggattaccgt aaacggctac 540
 tgcccgggga tcgtcaaaac cccaatgtgg gcggaaattg accgccaggt ttccgaagcg 600
 gcgggtaaac cgctgggcta cggaaccag gagttcgcca aacgcattac ccttgggcgg 660
 ctatccgagc cggaagacgt cgcagcctgc gtctcttata tcgccgtgcc ggaactccaat 720
 tatatgaccg gccaatcgct gctgatcgat gccggcatgg tatttaac 768

<210> 11
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Klebsiella oxytoca

<400> 11
 Met Ala Ile Glu Asn Lys Val Ala Leu Val Thr Gly Ala Gly Gln Gly
 1 5 10 15

Ile Gly Arg Gly Ile Ala Leu Arg Leu Ala Lys Asp Gly Ala Ser Val
 20 25 30

Met Leu Val Asp Val Asn Pro Glu Gly Ile Ala Ala Val Ala Ala Glu
35 40 45

Val Glu Ala Leu Gly Arg Lys Ala Ala Thr Phe Val Ala Asn Ile Ala
50 55 60

Asp Arg Ala Gln Val Tyr Ala Ala Ile Asp Glu Ala Glu Lys Gln Leu
65 70 75 80

Gly Gly Phe Asp Ile Ile Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Gln Val Gln
85 90 95

Ala Leu Ala Asp Val Thr Pro Glu Glu Val Asp Arg Ile Met Arg Ile
100 105 110

Asn Val Gln Gly Thr Leu Trp Gly Ile Gln Ala Ala Ala Lys Lys Phe
115 120 125

Ile Asp Arg Gln Gln Lys Gly Lys Ile Ile Asn Ala Cys Ser Ile Ala
130 135 140

Gly His Asp Gly Phe Ala Leu Leu Gly Val Tyr Ser Ala Thr Lys Phe
145 150 155 160

Ala Val Arg Ala Leu Thr Gln Ala Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Ser Arg
165 170 175

Gly Ile Thr Val Asn Ala Tyr Cys Pro Gly Ile Val Gly Thr Gly Met
180 185 190

Trp Thr Glu Ile Asp Lys Arg Phe Ala Glu Ile Thr Gly Ala Pro Val
195 200 205

Gly Glu Thr Tyr Lys Lys Tyr Val Glu Gly Ile Ala Leu Gly Arg Ala
210 215 220

Glu Thr Pro Asp Asp Val Ala Ser Leu Val Ser Tyr Leu Ala Gly Pro
225 230 235 240

Asp Ser Asp Tyr Val Thr Gly Gln Ser Ile Leu Ile Asp Gly Gly Ile
245 250 255

Val Tyr Arg

<210> 12
<211> 777
<212> ADN
<213> Klebsiella oxytoca

<400> 12
atggctatcg aaaataaagt tgcgctggta accggcgccg gtcagggcat tggccgcggt 60
attgcgttgc gtctggccaa agacggcgcg tcggtgatgc tggtcgacgt gaaccctgaa 120
gggattgccg ccgtcgccgc cgaagtggaa gcgctgggac gcaaagcagc caccttcgtc 180
gctaacatcg ccgatcgcg gcaggtgtac gccgccattg atgaagcgga aaaacagctg 240
ggcggctttg atattatcgt gaacaacgcc gggatcgccc aggttcaggc gctggccgat 300
gtgacgcctg aagaagtgga ccgcatcatg cgcacaaacg ttcagggtac cctgtggggg 360

attcaggcgg cggcgaaaaa attcatcgat cgtcagcaga aagggaaaat catcaacgcc 420
 tgctctatcg ccggtcatga tggtttcgcg ctgctgggcg tttattccgc caccaaattt 480
 gccgtacgcg ccctgacgca ggcggcgggcg aaggagtatg ccagccgcg cattaocggtt 540
 aatgcctact gtccggggat tgtgggaacc gggatgtgga ccgaaatcga taagcgcttt 600
 gcggaaatta ccggtgcgcc ggtgggcgaa acttataaaa aatacgttga aggcacgcgc 660
 cttggccgcg ccgaaacgcc ggacgatgtg gcaagcctgg tctcttatct ggcaggcccg 720
 gattccgatt atgttaccgg tcagtcgatt ctgatcgatg gcggtattgt ttaccgt 777

<210> 13
 <211> 640
 <212> ADN
 <213> Klebsiella oxytoca

<400> 13
 gctgcgcacg gttcgcgcca tgcaggacat cgtcaatagc gatgtcaccc tgaccgtcga 60
 tatggggagc tttcatatct ggatcgcccg ctatctctac agcttttcgcg ccggtcaggt 120
 catgatttcc aacggtcaac agaccatggg cgtggcgctg ccgtgggcga ttggcgccctg 180
 gctggtcaat ccgcagcgca aagtggtttc cgtttccggc gacggcggtt tcctgcagtc 240
 cagcatggag ctggagaccg ctgtacggct gaaagcgaac gtcctgcata tcctctgggt 300
 cgataacggc tacaacatgg tggcgattca ggaggagaaa aaataaccagc ggctctccgg 360
 cgttgagttc ggcccgggtg attttaaagt ctacgccgaa gccttcggcg ccaaaggggt 420
 tgcggtagag agcgccgaag cccttgagcc gacgctgcgg gcggcgatgg acgtcgacgg 480
 ccccgccgct gtagccatcc ccgtggatta ccgcgataac ccgctgctga tgggccagct 540
 ccatctcagt caactacttt gagtcactac agaaggaatc tatcaatgaa aaaagtcgca 600
 ctcgtgaccg gcgcgatgac cggccaatcg ctgctgatcg 640

<210> 14
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400> 14
 ggatccgctg cgcacgttc gcgcatgc 29

<210> 15
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400>	15	
	cgatcagcag cgattggccg gtcacgcgc cggtcacgag tgcgactt	48
<210>	16	
<211>	606	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự nhân tạo	
<400>	16	
	aagtcgcaact cgtgaccggc gcgatgaccg gccaatcgct gctgatcgat ggcgccatgg	60
	tatttaacta ataataaata agctctgaca tggtttgccc cggcgtcacc gccggggctt	120
	ttttatttca acctttaggg aagatccaca ggctcgctgac gggcaatgtc agatggcaac	180
	gctcggcac gcgcagcgcg ctgccgtagg cgcgtatggc gaaatcatcg ccttcagtgc	240
	gaaacagata ctcccagcgg tcgccgaggt acatgctggt caacagcggc agcgccagca	300
	tgttctcttc aggcgcggaa gcgatgcgca aacgctcaac gcggatcacc gccgtcgctt	360
	cttccccac gctaaccct tccccgccca tccccatag cggcagctg gccccctcaa	420
	tgcgcgccc accgttctcc agcgcgctaa cggtgccatg caggcgatta ttactgcca	480
	taaactcggc ggcaaacagc gttttcgggc tgcgtacat ctctcgggg gttccctgct	540
	gctcgatcac gccgttggtta agcagcagaa tgcgatcgga aatcgccatc gcctcgttct	600
	gatcgt	
	606	
<210>	17	
<211>	48	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự nhân tạo	
<400>	17	
	aagtcgcaact cgtgaccggc gcgatgaccg gccaatcgct gctgatcg	48
<210>	18	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự nhân tạo	
<400>	18	
	gcggccgcac gatcagaacg aggcgatggc gat	33

<210> 19
 <211> 1198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<400> 19
 gctgcgcatc gttcgcgcca tgcaggacat cgtcaatagc gatgtcaccc tgaccgtcga 60
 tatggggagc ttccatatct ggatcgcccg ctatctctac agcttttcgcg cccgtcaggt 120
 catgatttcc aacgggtcaac agaccatggg cgtggcgctg ccgtgggcga ttggcgctg 180
 gctggtcaat ccgcagcgca aagtggtttc cgtttccggc gacggcggtt tcctgcagtc 240
 cagcatggag ctggagaccg ctgtacggct gaaagcgaac gtccctgcata tcatctgggt 300
 cgataacggc tacaacatgg tggcgattca ggaggagaaa aaataccagc ggctctccgg 360
 cgttgagttc ggcccgggtg attttaaagt ctacgccga gccttcggcg ccaaagggtt 420
 tgcggtagag agcgccgaag cccttgagcc gacgctgcgg gcggcgatgg acgtcgacgg 480
 ccccgccgtc gtagccatcc ccgtggatta ccgcgataac ccgctgctga tgggccagct 540
 ccatctcagt caactacttt gagtcactac agaaggaatc tatcaatgaa aaaagtcgca 600
 ctgctgaccg gcgcgatgac cggccaatcg ctgctgatcg atggcggtat ggtatttaac 660
 taataataaa taagctctga catggtttgc cccggcgctc ccgcccgggc ttttttatit 720
 caaccttttag ggaagatcca caggctcgctg acgggcaatg tcagatggca acgctcggca 780
 tcgcgcagcg cgctgccgta ggcgcgtatg gcgaaatcat cgccttcagt gcgaaacaga 840
 tactcccagc ggtcgccgag gtacatgctg gtcaacagcg gcagcgccag catgttctct 900
 tcaggcgcgg aagcgatgcg caaacgctca acgcggatca ccgcccgtcg ctcttcccc 960
 acgctaaccc ctccccccgc cattccccat agcgcccagc tggccccctc aatgcgcgcc 1020
 cgaccgttct ccagcgcgct aacggtgcc tgcaggcgat tattactgcc cataaactcg 1080
 gcggcaaaca gcgttttcgg gctgcgtac atctcctcg ggttccctg ctgctcgatc 1140
 acgcccgttg taagcagcag aatcgatcg gaaatcgcca tcgcctcggt ctgatcgt 1198

<210> 20
 <211> 621
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<400> 20
 ggaggtcggc cggaagctcg ccttgacgca gctgcagaaa cgacgggctc caccctgcc 60

acaagggccg cagcgccctcc tgcagatagc gtataaacag tagcggcgcg ttgtcatcct 120
 cttcaagggt cagccaggcc agcgcatccc cttgtcgaag gcggtgtcga taccactgcg 180
 ccagcagggt ggTTTTGCCA aatccggcgg gcgcgcgcac cagggttaaa cggcgggaga 240
 cggcggcgtc gaggcgctgt agcaggcgct cccgcgatag cagactttcc ggcgtaagg 300
 gcggcgtaaa gcgcgtggag ataagcggca gcgtccccgt gaagcgtaaa ggttcctgat 360
 gaacaagcgc tgccagcgca tcatccgccg aggataaaaa ggccatacca cgattactcc 420
 ttaatccagt ccgtacgctc attatcccc ccatcagggg ggtaggccac gcttatcgcg 480
 cccgatagag tagtgccatt cgccgcagcg gctacgacga catcgccgc gggcctccct 540
 agtttattaa tcagtacaag gtgagtacag acatggctat cgaaaataaa gttgcgaccg 600
 gtcagtcgat tctgatcgat g 621

<210> 21
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400> 21
 tctagaggat ccggaggctg gccggaagct cgcc 34

<210> 22
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400> 22
 catcgatcag aatcgactga ccggtcgcaa ctttattttc gatagccatg tc 52

<210> 23
 <211> 608
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<400> 23
 gacatggcta tcgaaaataa agttgcgacc ggtcagtcga ttctgatcga tggcgggtatt 60
 gtttaccgtt aagggataaa cccggcgag aacgcgccgg gtttttgcgg gggttacgcgt 120
 tagccgcggg ctctgcggc ttgtcgctac ggggtgtttc cagcatccgg cgaaccggaa 180

caatcagcag gcacagcacc gcggcgaga tcagcagcgc aatagagcag cgtgcgaaca 240
 ggtcgggcag catatccagc tgatcggcct tcacgtgacc gccaatcaga cccgccgcca 300
 ggttccccag ggcgctggcg cagaaccaca gcccacatcat ctggccgcgc attctttccg 360
 gcgccagcag cgtcatggtc gcgaggccaa tcgggctgag gcacagctcg cccagcgtca 420
 gcatcagaat actgcccacc agccacatcg gcgagacgcc cgcgccgttg ttgctcagga 480
 cgttttgcgc cgccagcatc atcaggccaa agcccgcgc cgcgcataaa ataccgataa 540
 caaacttggg gatgctgctc ggacgcacgt ttttacgcgc cagcgcaggg cagcccagc 600
 taaatacc
 608

<210> 24
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400> 24
 gacatggcta tcgaaaataa agttgcgacc ggtcagtcga ttctgatcga tg 52

<210> 25
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi nhân tạo

<400> 25
 atcgcggccg cggatatttag ctgggcgtgg cctgc 35

<210> 26
 <211> 1177
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<400> 26
 ggaggtcggc cggaagctcg ccttgcagca gctgcagaaa cgacgggctc caccctgcc 60
 acaagggccg cagcgctcc tgcagatagc gtataaacag tagcggcgcg ttgtcatcct 120
 cttcaaggct cagccaggcc agcgcacccc cttgtcgaag gcggtgtcga taccactgcg 180
 ccagcagggt ggttttgcca aatccggcg gcgcgcgcac cagggttaaa cggcgggaga 240
 cggcggcgct gaggcgctgt agcaggcgt cccgcgatag cagactttcc ggcgtacggg 300

gcggcgtaaa gcgcgtggag ataagcggca gcgtccccgt gaagcgtaaa ggttcctgat	360
gaacaagcgc tgccagcgca tcatccgccg aggataaaaa ggccatacca cgattactcc	420
ttaatccagt ccgtacgctc attatcccc ccatcagggg ggtaggccac gcttatcgcg	480
cccgatagag tagtgccatt cgccgcagcg gctacgacga catcggccgc gggcctccct	540
agtttattaa tcagtacaag gtgagtacag acatggctat cgaaaataaa gttgcgaccg	600
gtcagtcgat tctgatcgat ggcggtattg tttaccgtta agggataaac ccggcgcaga	660
acgcgccggg tttttgctgg gttacgcgtt agccgcgggc tcctgcggtt tgtcgctacg	720
ggtgttttcc agcatccggc gaaccggaac aatcagcagg cacagcaccg cggcgcagat	780
cagcagcgca atagagcagc gtgcgaacag gtcgggcagc atatccagct gatcggcctt	840
cacgtgaccg ccaatcagac ccgccgccag gttccccagg gcgctggcgc agaaccacag	900
ccccatcatc tggccgcgca ttctttccgg cgccagcagc gtcattggtc cgaggccaat	960
cgggctgagg cacagctcgc ccagcgtcag catcagaata ctgccacca gccacatcgg	1020
cgagacgccc gcgccgttgt tgctcaggac gttttgcgcc gccagcatca tcaggccaaa	1080
gcccgccgcc gcgcataaaa taccgataac aaacttggtg atgctgctcg gacgcacgtt	1140
tttacgcgcc agcgcaggcc acgcccagct aaatacc	1177