



(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)



1-0029556

(51)⁷ C12N 1/21; C12P 7/16; C12R 1/22;
C12N 15/52

(13) B

(21) 1-2016-04516

(22) 21/04/2015

(86) PCT/KR2015/003991 21/04/2015

(87) WO/2015/163682 29/10/2015

(30) KR 10-2014-0047683 21/04/2014 KR

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/04/2017 349A

(73) GS CALTEX CORPORATION (KR)

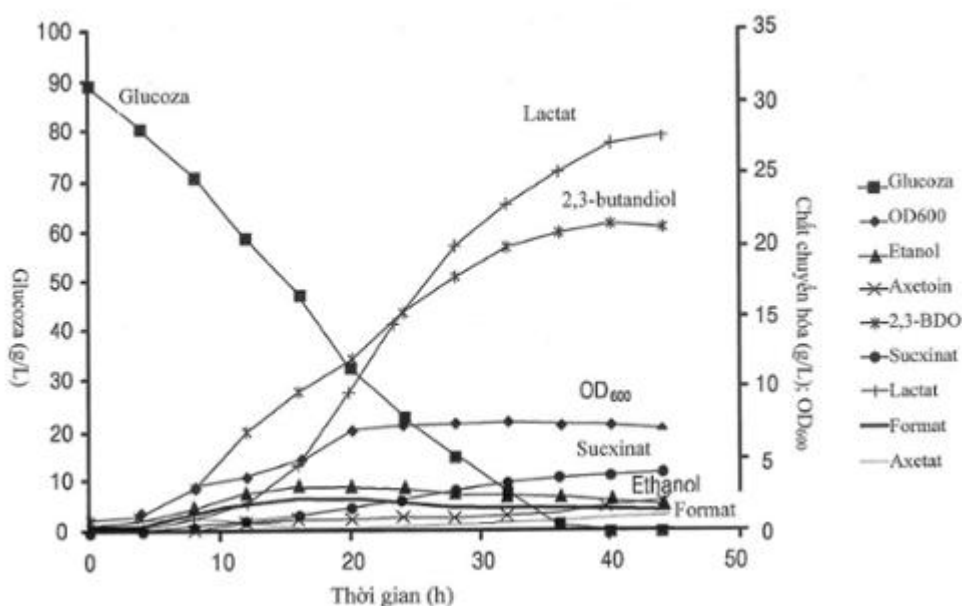
508 Nonhyeon-ro Gangnam-gu, Seoul 135-985, Republic of Korea

(72) PARK, Jong-Myoung (KR); RATHNASI, Chelladural (KR); SONG, Hyo-Hak (KR);
YANG, Taek-Ho (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 VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT 2,3-BUTANDIOL BẰNG CÁCH SỬ
DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất 2,3-butandiol trong đó con
đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat, con đường chuyển hóa alpha-
axetolactat thành axetoin, hoặc con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol, được
gia tăng trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.



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 cacbon và hai nhóm hydroxyl (-OH) và có thể được chuyển hóa chất xúc tác hóa học thành 1,3-butadien mà là nguyên liệu thô để điều chế cao su, và methyl ethyl keton (methyl ethyl ketone - MEK) được sử dụng làm chất phụ gia nhiên liệu và dung môi (Ji et al., *Biotechnol. Adv.*, 29: 351, 2011). Ngoài ra, 2,3-butandiol là chất trung gian rất quan trọng trong các ngành công nghiệp nhiên liệu 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. 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, cùng với việc giá nhiên liệu thô hóa thạch đang tăng nhanh và việc đưa vào áp dụng quy định quốc tế nghiêm ngặt về vấn đề gây 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 đang được tập trung nghiên cứu và phát triển nhanh.

Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học là chuyển hóa nguyên liệu sinh khối thành 2,3-butandiol thông qua quá trình lên men vi sinh có khả năng sản xuất 2,3-butandiol. 2,3-butandiol được tạo ra bằng các vi sinh vật khác nhau như vi sinh vật chi *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Serratia*

(Maddox IS, *Biotechnol.*, 6: 269, 1996). Trong số các vi sinh vật này, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), và *Paenibacillus polymyxa* tạo ra lượng tương đối lớn của 2,3-butandiol, và đặc biệt là, *K. pneumoniae* và *K. oxytoca* có thuật lợi ở chỗ chúng có thể được nuôi cấy một cách dễ dàng, phát triển nhanh, và có thể tạo ra 2,3-butandiol từ các loại nguyên liệu sinh khối khác nhau bao gồm đường pentoza có nguồn gốc từ gỗ (Ji et al., *Biotechnol. Adv.*, 29: 351, 2011; Chandel et al., *Sustainable Biotechnol.*, 63, 2010; Jansen et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 362, 1984; Jansen et al., *Adv. Biochem. Eng.*, 27: 85, 1983).

Việc nghiên cứu phương pháp sản xuất 2,3-butandiol trên cơ sở sinh học bằng quá trình lên men vi sinh đã được thực hiện trong 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 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 lactat, 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* kiểu dại tiếp xúc với tia tử ngoại (UV), mà là một trong các phương pháp gây đột biến gen lý/hóa học (Ji et al., *Biotechnol. Lett.*, 30: 731, 2008). Ngoài ra, cũng có các nỗ lực để nâng cao hiệu suất của 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). Tuy nhiên, các chủng được phát triển này vẫn có vấn đề ở chỗ là chúng không thể sử dụng trong quy trình sản xuất ở quy mô công nghiệp xét về các khía cạnh như sản lượng, nồng độ cuối, và hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol.

Do đó, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu vi sinh vật tái tổ hợp trong đó sản lượng, nồng độ, và hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol là cao, và phát hiện ra rằng vi sinh vật tái tổ hợp trong đó gen cụ thể được bổ sung có độ chọn lọc cao và sản lượng sản xuất 2,3-butandiol cao, và nhờ đó đã tạo ra sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được 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 khía cạnh, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất 2,3-butandiol trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat, con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin, hoặc con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol, được gia tăng trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bao gồm các bước: ủ vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế; và nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp này.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể có sản lượng sản xuất 2,3-butandiol cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện con đường sinh tổng hợp 2,3-butandiol trong chủng sản xuất 2,3-butandiol.

FIG. 2 thể hiện plasmit pGSC-budA.

FIG. 3 thể hiện plasmit pGSC-budAB.

FIG. 4 thể hiện plasmit pGSC-budABC.

FIG. 5 thể hiện kết quả lên men của chủng *Klebsiella oxytoca* kiểu đại của Ví dụ so sánh 1.

FIG. 6 thể hiện kết quả lên men của chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp (*K. oxytoca* $\triangle$ ldhA $\triangle$ pflB) của Ví dụ so sánh 2.

FIG. 7 thể hiện kết quả lên men của chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp (*K. oxytoca* kiểu đại + pGSC-budRABC) của Ví dụ 1.

FIG. 8 thể hiện kết quả lên men của chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp (*K. oxytoca* $\triangle$ ldhA $\triangle$ pflB + pGSC-budRA) của Ví dụ 2.

FIG. 9 thể hiện kết quả lên men của chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp (*K. oxytoca* $\triangle$ ldhA $\triangle$ pflB + pGSC-budRAB) của Ví dụ 3.

FIG. 10 thể hiện kết quả lên men của chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp (*K. oxytoca* $\triangle$ ldhA $\triangle$ pflB + pGSC-budRABC) của Ví dụ 4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất 2,3-butandiol trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat, con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin, hoặc con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol, được gia tăng trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bao gồm các bước: ủ vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế; và nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp này.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Vi sinh vật tái tổ hợp có khả năng sản xuất 2,3-butandiol gia tăng

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất 2,3-butandiol trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat, con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin, hoặc con đường chuyển

hóa axetoin thành 2,3-butandiol, được gia tăng trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp trong đó hoạt tính của một hoặc nhiều enzym được làm gia tăng, enzym này được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat synthaza, axetolactat decarboxylaza, và axetoin reductaza, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp trong đó hoạt tính của hai hoặc nhiều enzym là được làm gia tăng, enzym này được chọn từ nhóm bao gồm axetolactat synthaza, axetolactat decarboxylaza, và axetoin reductaza, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp trong đó hoạt tính của axetolactat synthaza, hoạt tính của axetolactat decarboxylaza, và hoạt tính của axetoin reductaza được làm gia tăng, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất 2,3-butandiol trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, hoặc con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat, bị ức chế (bị kìm hãm), và con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat, con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin, hoặc con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol, được gia tăng, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Trong trường hợp này, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế đặc trưng ở chỗ con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, và con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat, có thể bị ức chế, và con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat có thể được gia tăng, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế đặc trưng ở chỗ con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, và con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat, có thể bị ức chế, và con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat, và con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin có thể được gia tăng, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế đặc trưng ở chỗ con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, và con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat, có thể bị ức chế, và con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat, con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin, và con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol có thể được gia tăng, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể là vi sinh vật tái tổ hợp trong đó hoạt tính của pyruvat-format lyaza, và hoạt tính của lactat dehydrogenaza bị ức chế, và hoạt tính của axetolactat synthaza là được làm gia tăng, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp có thể là vi sinh vật tái tổ hợp trong đó hoạt tính của pyruvat-format lyaza, và hoạt tính của lactat dehydrogenaza bị ức chế, và hoạt tính của axetolactat synthaza, và hoạt tính của axetolactat decarboxylaza được làm gia tăng, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp có thể là vi sinh vật tái tổ hợp trong đó hoạt tính của pyruvat-format lyaza, và hoạt tính của lactat dehydrogenaza bị ức chế, và hoạt tính của axetolactat synthaza, hoạt tính của axetolactat decarboxylaza, và hoạt tính của axetoin reductaza được làm gia tăng, trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có độ chọn lọc cao, hiệu suất cao, nồng độ cao, và sản lượng sản xuất 2,3-butandiol cao. Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể có khả năng tạo ra sản phẩm phụ như axit formic, lactat, v.v., bị ức chế do được tái tổ hợp, khi so với vi sinh vật kiểu dại.

Con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể là vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol có các con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat. Con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA theo sáng chế nghĩa là con đường trong đó axetyl-CoA được tổng hợp từ chất chuyển hóa cụ thể trong vi sinh vật. Con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA theo sáng chế có thể con đường tổng hợp axetyl-CoA từ pyruvat, v.v.

Con đường sinh tổng hợp lactat

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể là vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol có các con đường sinh tổng hợp axetyl-CoA và lactat. Con đường sinh tổng hợp lactat theo sáng chế nghĩa là con đường trong đó lactat được tổng hợp từ chất chuyển hóa cụ thể trong vi sinh vật. Con đường sinh tổng hợp lactat theo sáng chế có thể con đường tổng hợp lactat từ pyruvat, v.v.

Vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể là vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra bằng cách tái tổ hợp gen của vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol. Vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol theo sáng chế là, ví dụ, vi sinh vật thuộc chi *Klebsiella*, chi *Bacillus*, chi *Serratia*, hoặc chi *Enterobacter*, tốt hơn là, *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), v.v., và tốt nhất là, *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*). Quá trình sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế bằng cách sử dụng *Klebsiella oxytoca* là thuận lợi cho quá trình sản xuất 2,3-butandiol ở quy mô công nghiệp khi so với quá trình sản xuất bằng cách sử dụng *Klebsiella pneumoniae*.

Quá trình ức chế con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA

Enzym pyruvat-format lyaza kiểm soát quá trình chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA. Con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA có thể bị ức chế bằng cách ức chế pyruvat-format lyaza. Quá trình ức chế pyruvat-format lyaza có thể được thực hiện bằng cách ức chế sự biểu hiện của pyruvat-format lyaza, ức chế hoạt tính enzym của pyruvat-format lyaza, v.v. Ví dụ, pyruvat-format lyaza có thể bị ức chế bằng cách chọn lựa sử dụng phương pháp thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, phương pháp thích hợp như loại bỏ *pflB* mà là gen mã hóa pyruvat-format lyaza, gây đột biến trong gen (sự đột biến trong đó sự biểu hiện của gen bình thường bị ức chế bằng cách làm đột biến, thay thế hoặc loại bỏ một phần các bazơ ra khỏi gen, hoặc bằng cách bổ sung một phần các bazơ vào trong gen), điều hòa của sự biểu hiện của gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, v.v.

Quá trình ức chế con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic

Pyruvat-format lyaza kiểm soát quá trình chuyển hóa pyruvat thành axit formic. Con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic có thể bị ức chế bằng

cách ức chế pyruvat-format lyaza. Quá trình ức chế pyruvat-format lyaza có thể được thực hiện bằng cách ức chế sự biểu hiện của pyruvat-format lyaza, ức chế hoạt tính enzym của pyruvat-format lyaza, v.v. Ví dụ, pyruvat-format lyaza có thể bị ức chế bằng cách chọn lựa sử dụng phương pháp thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, phương pháp thích hợp như loại bỏ pflB mà là gen mã hóa pyruvat-format lyaza, gây đột biến trong gen (sự đột biến trong đó sự biểu hiện của gen bình thường bị ức chế bằng cách làm đột biến, thay thế hoặc loại bỏ một phần các bazơ ra khỏi gen, hoặc bằng cách bổ sung một phần các bazơ vào trong gen), điều hòa của sự biểu hiện của gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, v.v.

Quá trình ức chế con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat

Lactat dehydrogenaza kiểm soát quá trình chuyển hóa pyruvat thành lactat. Con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat có thể bị ức chế bằng cách ức chế lactat dehydrogenaza. Quá trình ức chế lactat dehydrogenaza có thể được thực hiện bằng cách ức chế sự biểu hiện của lactat dehydrogenaza, ức chế hoạt tính enzym của lactat dehydrogenaza, v.v. Ví dụ, lactat dehydrogenaza có thể bị ức chế bằng cách chọn lựa sử dụng phương pháp thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, phương pháp thích hợp như loại bỏ IdhA mà là gen mã hóa lactat dehydrogenaza, gây đột biến trong gen (sự đột biến trong đó sự biểu hiện của gen bình thường bị ức chế bằng cách làm đột biến, thay thế hoặc loại bỏ một phần các bazơ ra khỏi gen, hoặc bằng cách bổ sung một phần các bazơ vào trong gen), điều hòa của sự biểu hiện của gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, v.v.

Quá trình làm gia tăng con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat

Axetolactat synthaza điều hòa quá trình chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat tham gia vào trong quá trình sản xuất alpha-axetolactat. Con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat có thể được gia tăng bằng cách làm tăng hoạt tính của axetolactat synthaza. Việc làm tăng hoạt tính của axetolactat synthaza có thể được thực hiện bằng cách khuếch đại sự biểu hiện của gen của axetolactat synthaza, làm tăng hoạt tính enzym của axetolactat synthaza, v.v. Ví dụ, hoạt tính của axetolactat synthaza có thể được làm gia tăng bằng cách chọn lựa sử dụng phương pháp thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh

vực này, phương pháp thích hợp như bổ sung budB mà là gen mã hóa axetolactat synthaza vào trong vi sinh vật, gây đột biến trong gen (sự đột biến trong đó sự biểu hiện của gen được khuếch đại bằng cách làm đột biến, thay thế hoặc loại bỏ một phần các bazơ, hoặc bằng cách bổ sung một phần các bazơ vào trong gen), điều hòa của sự biểu hiện của gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, v.v.

Quá trình làm gia tăng con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin

Axetolactat decarboxylaza điều hòa quá trình chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin tham gia vào trong quá trình sản xuất axetoin. Con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin có thể được gia tăng bằng cách làm tăng hoạt tính của axetolactat decarboxylaza. Việc làm tăng hoạt tính của axetolactat decarboxylaza có thể được thực hiện bằng cách khuếch đại sự biểu hiện của gen của axetolactat decarboxylaza, làm tăng hoạt tính enzym của axetolactat decarboxylaza, v.v. Ví dụ, hoạt tính của axetolactat dehydrogenaza có thể được làm gia tăng bằng cách chọn lựa sử dụng phương pháp thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, phương pháp thích hợp như bổ sung budA mà là gen mã hóa axetolactat dehydrogenaza vào trong vi sinh vật, gây đột biến trong gen (sự đột biến trong đó sự biểu hiện của gen được khuếch đại bằng cách làm đột biến, thay thế hoặc loại bỏ một phần các bazơ, hoặc bằng cách bổ sung một phần các bazơ vào trong gen), điều hòa của sự biểu hiện của gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, v.v.

Quá trình làm gia tăng con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol

Axetoin reductaza điều hòa quá trình chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol tham gia vào trong quá trình sản xuất 2,3-butandiol. Con đường chuyển hóa axetoin reductaza thành 2,3-butandiol có thể được gia tăng bằng cách làm tăng hoạt tính của axetoin reductaza. Việc làm tăng hoạt tính của axetoin reductaza có thể được thực hiện bằng cách khuếch đại sự biểu hiện của gen của axetoin reductaza, làm tăng hoạt tính enzym của axetoin reductaza, v.v. Ví dụ, axetoin reductaza có thể được làm gia tăng bằng cách chọn lựa sử dụng phương pháp thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, phương pháp thích hợp như bổ sung budC mà là gen mã hóa axetoin reductaza vào trong vi sinh vật, gây đột biến trong gen (sự đột biến trong đó sự biểu hiện

của gen được khuếch đại bằng cách làm đột biến, thay thế hoặc loại bỏ một phần các bazơ, hoặc bằng cách bổ sung một phần các bazơ vào trong gen), điều hòa của sự biểu hiện của gen trong quá trình phiên mã hoặc quá trình dịch mã, v.v.

Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol

Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế; và thu hồi 2,3-butandiol từ môi trường nuôi cấy.

Bước nuôi cấy

Bước nuôi cấy của vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế được thực hiện dưới điều kiện hiếu khí, tốt hơn là, điều kiện vi hiếu khí. Ví dụ, bước nuôi cấy được thực hiện với việc đồng thời cấp oxy, mà là, không khí trong khi nuôi cấy, và cụ thể hơn, việc cấp oxy có thể được thực hiện bằng cách, nhưng không chỉ giới hạn ở, khuấy. Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường hỗn hợp, và môi trường hỗn hợp là không bị giới hạn một cách cụ thể, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng chọn môi trường hỗn hợp có bán sẵn trên thị trường một cách thích hợp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ưu điểm và dấu hiệu khác theo sáng chế và phương pháp theo sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn thông qua các Ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả này mà có thể được thực hiện theo các dạng khác nhau. Các phương án này được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế để người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu được sáng chế và phạm vi của sáng chế một cách đầy đủ. Do đó, sáng chế sẽ được xác định bởi phạm vi của yêu cầu bảo hộ đính kèm sau đây.

Nguyên liệu và phương pháp

Chủng *Klebsiella oxytoca* kiểu đại KCTC 12132BP được điều chế và được sử dụng làm chủng của Ví dụ so sánh 1. Ngoài ra, vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra trong mục 1-1 đến 1-3 dưới đây bằng cách sử dụng chủng này.

Klebsiella oxytoca KCTC 12132BP

Tên văn phòng lưu trữ: Viện nghiên cứu Sinh học và Kỹ thuật sinh học Hàn Quốc (Korea Research Institute của Bioscience và Biotechnology -KRIBB)

Mã số nhận biết đặc hiệu: KCTC12132BP

Ngày đăng ký: Ngày mùng 8 tháng hai, 2012.

- Nồng độ của 2,3-butandiol (g/L): Lượng 2,3-butandiol được tạo ra mỗi đơn vị thể tích

- Hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol (g/g): Lượng 2,3-butandiol tạo ra (g) / nguồn cacbon (g) $\times 100$

- Sản lượng của 2,3-butandiol (g/L/h): Lượng 2,3-butandiol được tạo ra mỗi đơn vị thời gian và đơn vị thể tích

1-1) Quá trình sản xuất *K. oxytoca* tái tổ hợp trong đó *ldhA* và *pflB* được loại bỏ

Việc tạo cấu trúc của mảnh ADN bao gồm vùng tương đồng của gen đích

Để làm bất hoạt gen đích của *K. oxytoca*, cơ chế tái tổ hợp của vi khuẩn được sử dụng, và vùng tương đồng của gen cần loại bỏ được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. Sau đó, mảnh ADN tương ứng bao gồm vùng tương đồng được chuyển đến vi khuẩn, và sau đó, gen đích được loại bỏ bằng cơ chế tái tổ hợp bằng recombinaza (enzym tái tổ hợp) giữa vùng tương đồng của gen trong mảnh ADN và gen trong nhiễm sắc thể của *Klebsiella oxytoca*.

Đầu tiên, để thực hiện quá trình tạo dòng lactat dehydrogenaza của *Klebsiella oxytoca*, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 2) của *ldhA* (SEQ ID NO: 1) mà là gen đích được khuếch đại bằng đoạn mồi có SEQ ID NO: 3 và 4 bằng PCR. Ngoài ra, vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 5) của nó được khuếch đại bằng đoạn mồi có SEQ ID NO: 6 và 7 bằng PCR. Sau đó, cả hai vùng tương đồng 1 và 2 cùng được sử dụng làm mẫu và được khuếch đại bằng PCT, nhờ đó tạo ra mảnh ADN hoàn chỉnh (SEQ ID NO: 8) bao gồm vùng tương đồng 1 và 2.

Đồng thời, để thực hiện quá trình tạo dòng vùng tương đồng của pyruvat-format lyaza của *Klebsiella oxytoca*, vùng tương đồng 1 (SEQ ID NO: 10) của *pflB* (SEQ ID NO: 9) mà gen đích được khuếch đại bằng đoạn mồi có

SEQ ID NO: 11 và 12 bằng PCR. Ngoài ra, vùng tương đồng 2 (SEQ ID NO: 13) của nó được khuếch đại bằng đoạn mồi có SEQ ID NO: 14 và 15 bằng PCR. Sau đó, cả hai vùng tương đồng 1 và 2 cùng được sử dụng làm mẫu và được khuếch đại bằng PCT, nhờ đó tạo ra mảnh ADN (SEQ ID NO: 16) bao gồm vùng tương đồng 1 và 2 (xem, Bảng 1 dưới đây). Để tăng khả năng tái tổ hợp của gen đích, mảnh ADN hoàn chỉnh có thể bao gồm gen kháng thuốc kháng sinh, v.v., và có thể bao gồm gen *sacB* mã hóa enzym levansucraza để loại bỏ gen kháng thuốc kháng sinh tái tổ hợp trong nhiễm sắc thể.

Quá trình sản xuất *K. oxytoca* tái tổ hợp trong đó *ldhA* và *pflB* được loại bỏ

Mảnh ADN được tạo cấu trúc được chuyển đến *Klebsiella oxytoca* KCTC 12132BP bằng cách sử dụng kỹ thuật điện di (25 uF, 200 Ω , 18 kV/cm), và gen đích có thể được loại bỏ bằng cách sử dụng cơ chế tái tổ hợp của vi sinh vật.

Mảnh ADN bao gồm vùng tương đồng của gen *IdhA* được chuyển đến *Klebsiella oxytoca* kiểu dại để tạo ra *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp trong đó gen *IdhA* được loại bỏ. Ngoài ra, sau khi gen *ldhA* được loại bỏ từ *Klebsiella oxytoca* kiểu dại, mảnh ADN bao gồm vùng tương đồng của gen *pflB* được chuyển để tạo ra *Klebsiella oxytoca* trong đó gen *pflB* còn được loại bỏ cùng với việc loại bỏ gen *IdhA*.

Vi sinh vật tái tổ hợp *K. oxytoca* KCTC 12132BP được tạo ra trên đây trong đó *ldhA* và *pflB* được loại bỏ (sau đây, còn được gọi là “Ví dụ so sánh 2”, “*K. oxytoca* $\triangle$ *ldhA* $\triangle$ *pflB*”) được sử dụng để thực hiện quá trình tái tổ hợp và thử nghiệm lên men sau đây.

1-2) Quá trình sản xuất plasmid pGSC-budA, plasmid pGSC-budAB, và plasmid pGSC-budABC

Plasmid tái tổ hợp được sử dụng để khuếch đại sự biểu hiện của gen mã hóa axetolactat decarboxylaza (*budA*), axetolactat synthaza (*budB*), và axetoin reductaza (*budC*) lần lượt được tạo ra từ *Klebsiella oxytoca*, được tạo ra.

Để tạo ra vector tái tổ hợp để khuếch đại sự biểu hiện của gen đích của *Klebsiella oxytoca*, gen cần khuếch đại cần được tạo dòng trong plasmid

pBBR1MCS (Kovach et al., Biotechniques, 800-802, 1994) bao gồm vị trí enzym giới hạn, các vị trí tạo dòng, và gen kháng chloramphenicol. Sau khi plasmid tương ứng được tạo dòng vào trong vi khuẩn, sự biểu hiện của gen được khuếch đại trong tế bào bằng cơ chế sao chép của plasmid.

Để tạo dòng gen mã hóa axetolactat decarboxylaza (budA, SEQ ID NO: 17), gen mã hóa axetolactat synthaza (budB, SEQ ID NO: 18), và gen mã hóa axetoin reductaza (budC, SEQ ID NO: 19) của *Klebsiella oxytoca*, gen đích được khuếch đại bằng PCR (xem, Bảng 2 sau đây). Trong trường hợp này, mỗi budR, gen điều hòa, còn được bổ sung thêm (SEQ ID NO: 20). Để khuếch đại, đoạn mồi bao gồm vị trí enzym giới hạn (XbaI, ApaI, v.v.) có trong các vị trí tạo dòng của plasmid được sử dụng. Mảnh ADN bao gồm mỗi gen và plasmid được xử lý với enzym giới hạn có trong các vị trí tạo dòng, và sau đó, hai mảnh được kết hợp cùng với ligaza ADN T4 để làm hoàn chỉnh pGSC-budA và pGSC-budAB và plasmid pGSC-budABC (các FIG. 2 đến 4).

1-3) Việc khuếch đại sự biểu hiện của gen mã hóa axetolactat decarboxylaza, axetolactat synthaza, và axetoin reductaza

Sự biểu hiện của gen mã hóa axetolactat decarboxylaza (budA), axetolactat synthaza (budB), và axetoin reductaza (budC) được tạo ra từ *Klebsiella oxytoca* được khuếch đại.

Plasmid pGSC-budA, plasmid pGSC-budAB, và plasmid pGSC-budABC được tạo ra trong mục 1-2 trên đây được tạo dòng vào trong *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của các Ví dụ so sánh 1 và 2, bằng cách sử dụng kỹ thuật điện di (25 uF, 200 Ω , 18 kV/cm). Cụ thể hơn, plasmid pGSC-budABC được tạo dòng vào trong *Klebsiella oxytoca* kiểu dại KCTC 12132BP (Ví dụ so sánh 1), nhờ đó tạo ra *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp trong đó sự biểu hiện của gen được khuếch đại (sau đây, còn được gọi là Ví dụ 1, “*K. oxytoca* kiểu dại + pGSC-budABC”). Ngoài ra, plasmid pGSC-budA, plasmid pGSC-budAB, và plasmid pGSC-budABC lần lượt được tạo dòng trong *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của Ví dụ so sánh 2 mà là vi sinh vật tái tổ hợp trong đó cả *ldhA* và *pflB* cùng được loại bỏ, nhờ đó tạo ra chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp, trong đó sự biểu hiện của gen lần lượt được khuếch đại (các Ví dụ 2 đến 4). Trong trường hợp này, mỗi

budR, gen điều hòa, còn được bổ sung thêm. Kỹ thuật điện di được thực hiện, và chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp tương ứng được nuôi cấy ở 30 °C trong 1 giờ và được làm ổn định. Sau đó, vi sinh vật tái tổ hợp này được nuôi cấy bằng cách phân phối chúng trên môi trường LB hỗn hợp rắn chứa chloramphenicol ở 37 °C. Sau đó, các cụm khuẩn phát triển trong môi trường rắn chứa chloramphenicol được lấy ra. Plasmid chứa các cụm khuẩn được lấy ra được tách riêng (Miniprep) và việc thực hiện quá trình tạo dòng gen được xác định bằng kỹ thuật điện di. Kết quả là, vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra như được mô tả dưới đây (xem, Bảng 3).

Bảng 3

	Chủng	Mô tả chi tiết
Ví dụ 1	<i>K. oxytoca</i> kiểu dại + pGSC-budRABC	<i>K. oxytoca</i> KCTC 12132BP trong đó budA, budB, và budC được khuếch đại.
Ví dụ 2	<i>K. oxytoca</i> Δ ldhA Δ pflB + pGSC-budRA	<i>K. oxytoca</i> KCTC 12132BP trong đó ldhA và pflB được loại bỏ, và budA được khuếch đại.
Ví dụ 3	<i>K. oxytoca</i> Δ ldhA Δ pflB + pGSC-budRAB	<i>K. oxytoca</i> KCTC 12132BP trong đó ldhA và pflB được loại bỏ, và budA và budB được khuếch đại.
Ví dụ 4	<i>K. oxytoca</i> Δ ldhA Δ pflB + pGSC-budRABC	<i>K. oxytoca</i> KCTC 12132BP trong đó ldhA và pflB được loại bỏ, và budA, budB, và budC được khuếch đại

Ví dụ thực nghiệm 1: Khả năng tạo ra 2,3-butandiol trong vi sinh vật kiểu dại và vi sinh vật tái tổ hợp, trong đó ldhA và pflB được loại bỏ

Khả năng lên men tạo ra 2,3-butandiol được đánh giá bằng cách sử dụng chủng *Klebsiella* kiểu dại theo Ví dụ so sánh 1 và chủng *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp trong đó ldhA và pflB cùng được loại bỏ theo Ví dụ so sánh 2.

Klebsiella oxytoca kiểu dại theo Ví dụ so sánh 1 và *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp trong đó ldhA và pflB cùng được loại bỏ theo Ví dụ so sánh 2 được cho lên men. Quá trình nuôi cấy các vi sinh vật này được thực hiện như mô tả dưới đây.

Đầu tiên, các vi sinh vật này được ủ trong 250 ml của môi trường hỗn hợp bao gồm 9 g/L glucoza (50 mM) và được nuôi cấy ở 37 °C trong 16 giờ, và

sau đó, chất lỏng nuôi cấy được ủ trong 3 L của môi trường hỗn hợp. Trong trường hợp này, quá trình lên men được thực hiện dưới điều kiện vi hiếu khí (tốc độ sục khí 1 vvm (thể tích khí/thể tích chất lỏng/phút) và tốc độ khuấy 150 vòng/phút), ở nồng độ glucoza ban đầu 90 g/L, pH là 6,8, và nhiệt độ nuôi cấy 37°C. 25 mg/L của chloramphenicol được bổ sung vào môi trường này. NaOH 5N được sử dụng để điều chỉnh pH trong quá trình lên men. Các mẫu trong chủng *Klebsiella* kiểu dại và chủng *Klebsiella* tái tổ hợp được lấy ra trong quá trình lên men, và tốc độ phát triển được theo dõi bằng cách đo mật độ quang 600 (OD 600) của các mẫu được lấy ra. Sau đó, các mẫu được lấy ra được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút, và nồng độ của chất chuyển hóa của phần dịch nổi và 2,3-butandiol được phân tích bằng sắc ký lỏng (HPLC).

Kết quả là, khi lactat dehydrogenaza (*ldhA*) và pyruvat-format lyaza (*pflB*) được loại bỏ ra khỏi *Klebsiella oxytoca*, lượng 2,3-butandiol tạo ra là 39,49 g/L, và hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol (số g của 2,3-butandiol/số g của glucoza) là 0,45. Sản lượng (g/L/h) của vi sinh vật tái tổ hợp của Ví dụ so sánh 2 là 0,58. Khi so với kiểu dại chủng của Ví dụ so sánh 1, vi sinh vật tái tổ hợp của Ví dụ so sánh 2 có nồng độ sản xuất, hiệu suất, sản lượng đều được gia tăng và độ chọn lọc đối với 2,3-butandiol và có khả năng tạo ra 2,3-butandiol được làm gia tăng đồng thời làm giảm đáng kể việc tạo ra lactat, axit formic, và etanol (Bảng 4) (các FIG. 5 và 6).

Bảng 4

Chủng	2,3-butandiol		
	Nồng độ (g/L)	Hiệu suất (g/g)	Sản lượng (g/L/h)
Ví dụ so sánh 1 (<i>K. oxytoca</i> kiểu dại)	17,31	0,18	0,50
Ví dụ so sánh 2 (<i>K. oxytoca</i> $\triangle$ <i>ldhA</i> $\triangle$ <i>pflB</i>)	39,49	0,45	0,58

Ví dụ thực nghiệm 2: Khả năng tạo ra 2,3-butandiol của vi sinh vật tái tổ hợp trong đó *budA*, *budAB*, và *budABC* gen được khuếch đại và biểu hiện một cách chọn lọc

Quá trình lên men được thực hiện đối với các vi sinh vật *Klebsiella oxytoca* tái tổ hợp của các Ví dụ 1 to 4 như được tạo ra trong mục 1-3.

Quá trình lên men cụ thể được thực hiện như mô tả dưới đây. Đầu tiên, các vi sinh vật này mà là đối tượng thử nghiệm được ủ trong 250 ml của môi trường hỗn hợp bao gồm 9 g/L glucoza (50 mM) và được nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ, và sau đó, chất lỏng nuôi cấy được ủ trong 3 L của môi trường hỗn hợp. Trong trường hợp này, quá trình lên men được thực hiện dưới điều kiện vi hiếu khí (tốc độ sục khí 1 vvm và tốc độ khuấy 150 vòng/phút), ở nồng độ glucoza ban đầu 90 g/L, pH là 6,8, và nhiệt độ nuôi cấy 37°C. 25 mg/L của chloramphenicol được bổ sung vào môi trường này. NaOH 5N được sử dụng để điều chỉnh pH trong quá trình lên men. Các mẫu trong vi sinh vật tái tổ hợp được lấy ra trong quá trình lên men, và tốc độ phát triển được theo dõi bằng cách đo mật độ quang 600 (OD 600) của các mẫu được lấy ra. Sau đó, các mẫu được lấy ra được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút, và nồng độ của chất chuyển hóa của phần dịch nổi và 2,3-butandiol được phân tích bằng sắc ký lỏng (HPLC).

Kết quả là, có thể thấy rằng Ví dụ 1 (trường hợp trong đó budABC được khuếch đại và được biểu hiện trong kiểu dại) có hiệu suất và nồng độ của 2,3-butandiol được làm gia tăng khi so với Ví dụ so sánh 1 (kiểu dại). Tuy nhiên, có thể thấy rằng lượng sản phẩm phụ (lactat), v.v., vẫn lớn hơn so với lượng của 2,3-butandiol.

Đồng thời, khi so sánh Ví dụ 1 trong đó gen *pflB* và *ldhA* không được loại bỏ với Ví dụ 4 trong đó gen *pflB* và *ldhA* được loại bỏ, có thể xác định được rằng Ví dụ 4 có tác dụng tuyệt vời trong việc làm giảm lượng sản phẩm phụ như lactat, v.v., và có hiệu suất, nồng độ, và sản lượng của 2,3-butandiol tốt hơn khi so với Ví dụ 1 (xem, Bảng 4, và các FIG. 7 và 10).

Ngoài ra, có thể thấy rằng vi sinh vật tái tổ hợp của Ví dụ 2 có hiệu suất và sản lượng của 2,3-butandiol được làm gia tăng đáng kể khi so với hiệu suất và sản lượng của vi sinh vật tái tổ hợp của Ví dụ so sánh 2 (*K. oxytoca* Δ *ldhA* Δ *pflB*). Ngoài ra, khi so sánh vi sinh vật tái tổ hợp của các Ví dụ 2 và 3, có thể xác định được rằng hiệu suất của 2,3-butandiol được cải thiện ngay cả khi budB được khuếch đại cùng với việc khuếch đại budA. Ngoài ra, khi so sánh vi sinh

vật tái tổ hợp của các Ví dụ 3 và 4, có thể xác định được rằng hiệu suất của 2,3-butandiol được cải thiện ngay cả khi budC được khuếch đại. Kết quả là, có thể thấy rằng vi sinh vật tái tổ hợp của Ví dụ 4 trong đó tất cả budABC được khuếch đại có hiệu suất tạo ra 2,3-butandiol được cải thiện nhiều nhất khi so với hiệu suất của vi sinh vật tái tổ hợp của Ví dụ so sánh 2.

Do đó, có thể xác định được rằng việc khuếch đại sự biểu hiện của gen mã hóa axetolactat decarboxylaza, gen mã hóa axetolactat synthaza, và gen mã hóa axetoin reductaza của *Klebsiella* là rất quan trọng cũng như việc loại bỏ các gen, pflB và ldhA, để loại bỏ sản phẩm phụ, trong quá trình sản xuất 2,3-butandiol (xem, Bảng 5, các FIG. 7 đến 10, FIG. 7: Ví dụ 1, FIG. 8: Ví dụ 2, FIG. 9: Ví dụ 3, FIG. 10: Ví dụ 4).

Bảng 5

Chủng	2,3-butandiol		
	Nồng độ (g/L)	Hiệu suất (g/g)	Sản lượng (g/L/h)
Ví dụ so sánh 1 (K, oxytoca kiểu dại)	17,31	0,18	0,50
Ví dụ so sánh 2 (K, oxytoca Δ ldhA Δ pflB)	39,49	0,45	0,58
Ví dụ 1 (K, oxytoca kiểu dại + pGSC-budRABC)	21,29	0,24	0,48
Ví dụ 2 (K, oxytoca Δ ldhA Δ pflB + pGSC-budRA)	38,74	0,47	0,79
Ví dụ 3 (K, oxytoca Δ ldhA Δ pflB + pGSC-budRAB)	43,12	0,50	0,60
Ví dụ 4 (K, oxytoca Δ ldhA Δ pflB + pGSC-budRABC)	46,08	0,50	0,68

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất 2,3-butandiol trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat, con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin, hoặc con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol, được gia tăng trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1 là trình tự bazơ của *IdhA* mà là gen mã hóa lactat dehydrogenaza của *Klebsiella oxytoca*. SEQ ID NO: 2 là vùng tương đồng 1 của *ldhA* và SEQ ID NO: 3 và 4 là đoạn nối để khuếch đại vùng tương đồng 1 của *IdhA* bằng PCR. SEQ ID NO: 5 là vùng tương đồng 2 của *ldhA* và SEQ ID NO: 6 và 7 là đoạn nối để khuếch đại vùng tương đồng 2 của *IdhA* bằng PCR. SEQ ID NO: 8 là mảnh ADN được tạo ra bằng cách khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đồng thời vùng tương đồng 1 và 2 của *ldhA*, làm mẫu.

SEQ ID NO: 9 là trình tự bazơ của *pflB* mà là gen mã hóa pyruvat-format lyaza của *Klebsiella oxytoca*. SEQ ID NO: 10 là vùng tương đồng 1 của *pflB* và SEQ ID NO: 11 và 12 là đoạn nối để khuếch đại vùng tương đồng 2 của *pflB* bằng PCR. SEQ ID NO: 13 là vùng tương đồng 2 của *pflB* và SEQ ID NO: 14 và 15 là đoạn nối để khuếch đại vùng tương đồng 2 của *pflB* bằng PCR. SEQ ID NO: 16 là mảnh ADN được tạo ra bằng cách khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng đồng thời vùng tương đồng 1 và 2 của *pflB* làm mẫu.

SEQ ID NO: 17 là trình tự bazơ của *budA* mà là gen mã hóa axetolactat decarboxylaza của *Klebsiella oxytoca*, SEQ ID NO: 18 là trình tự bazơ của *budB* mà là gen mã hóa axetolactat synthaza, và SEQ ID NO: 19 là trình tự bazơ của *budC* mà là gen mã hóa axetoin reductaza, và SEQ ID NO: 20 là trình tự bazơ của *budR* mà là gen điều hòa.

Yêu cầu bảo hộ

1. Vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất 2,3-butandiol trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic, và con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế,
con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin được gia tăng trong vi sinh vật sản xuất 2,3-butandiol, và
vi sinh vật này là *Klebsiella*.
2. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat được gia tăng hơn, và
con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat này được gia tăng bằng cách làm tăng hoạt tính của axetolactat synthaza.
3. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó:
con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat được gia tăng hơn, và
con đường chuyển hóa pyruvat thành alpha-axetolactat này được gia tăng bằng cách làm tăng sự biểu hiện của budB mà là gen mã hóa axetolactat synthaza.
4. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa alpha-axetolactat thành axetoin được gia tăng bằng cách làm tăng hoạt tính của axetolactat decarboxylaza.
5. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa axetolactat thành axetoin được gia tăng bằng cách làm tăng sự biểu hiện của budA mà là gen mã hóa axetolactat decarboxylaza.
6. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol được gia tăng hơn, và

con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol này được gia tăng bằng cách làm tăng hoạt tính của axetoin reductaza.

7. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol được gia tăng hơn, và

con đường chuyển hóa axetoin thành 2,3-butandiol này được gia tăng bằng cách làm tăng sự biểu hiện của budC mà là gen mã hóa axetoin reductaza.

8. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành axetyl-CoA, hoặc con đường chuyển hóa pyruvat thành axit formic bị ức chế bằng cách ức chế pyruvat-format lyaza.

9. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó con đường chuyển hóa pyruvat thành lactat bị ức chế bằng cách ức chế lactat dehydrogenaza.

10. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều pflB, mà là gen mã hóa pyruvat-format lyaza, và ldhA, mà là gen mã hóa lactat dehydrogenaza, được loại bỏ hoặc bị ức chế.

11. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó sự biểu hiện của budA mà là gen mã hóa axetolactat decarboxylaza được gia tăng.

12. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp là *Klebsiella oxytoca*.

13. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp đặc trưng ở chỗ sản lượng tạo ra 2,3-butandiol cao hơn so với sản lượng tạo ra lactat.

14. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó sự biểu hiện của budB mà là gen mã hóa axetolactat synthaza và budC mà là gen mã hóa axetoin reductaza được gia tăng.

15. Phương pháp sản xuất 2,3-butandiol bao gồm các bước:

- i) ủ vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14; và
- ii) nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp này.

Fig. 1

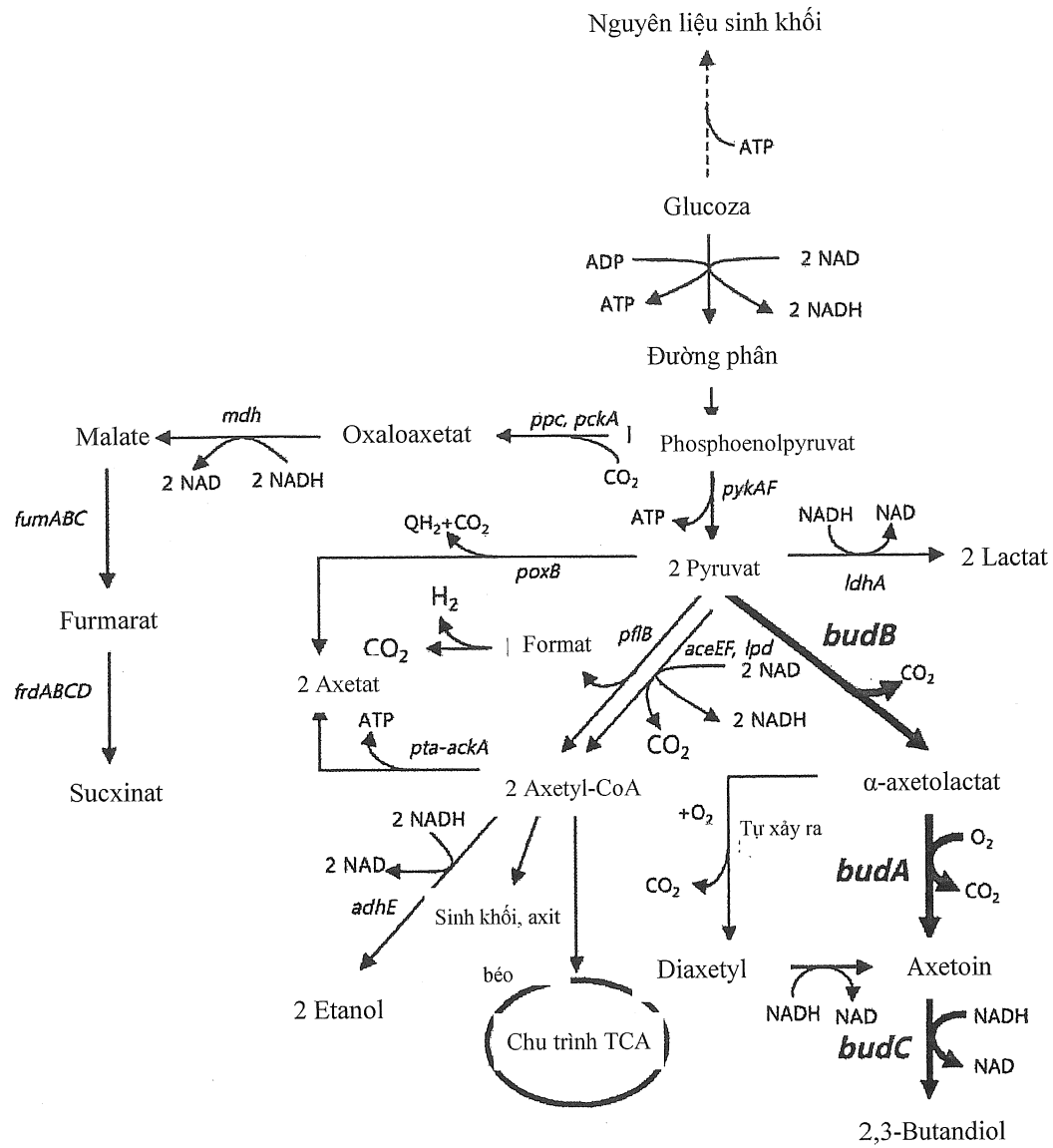


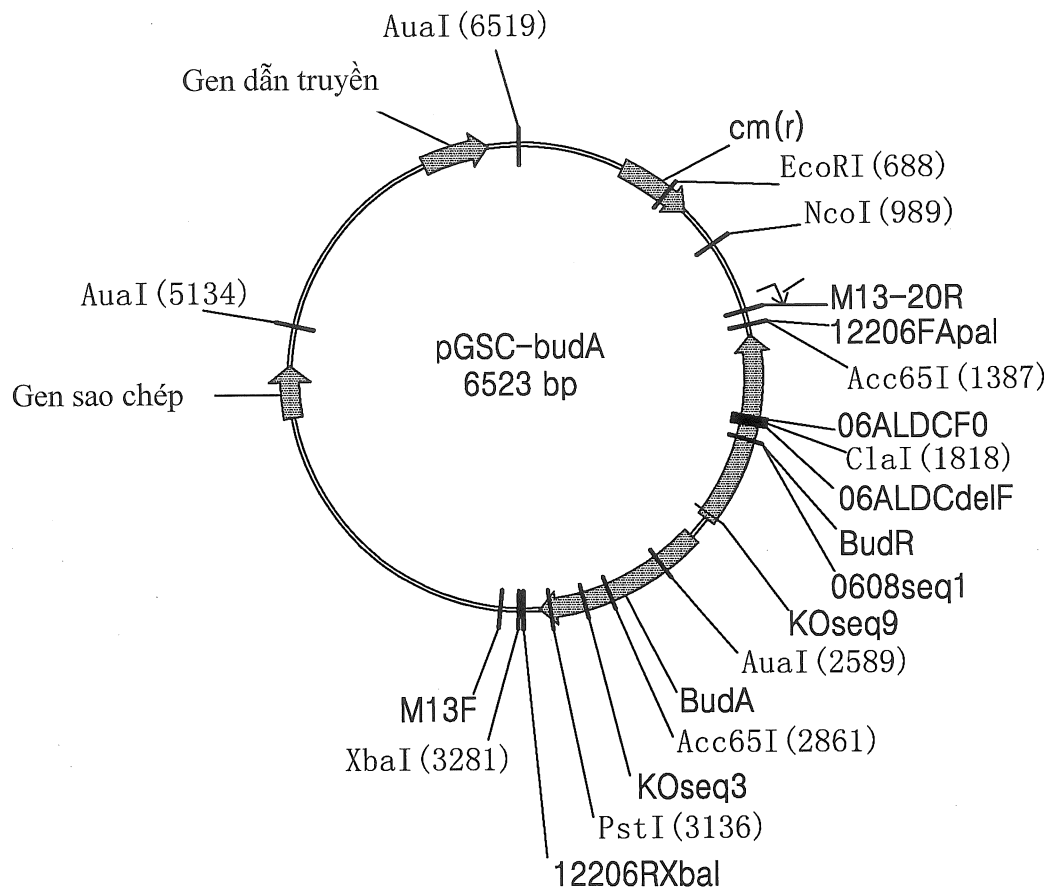
Fig. 2

Fig. 3

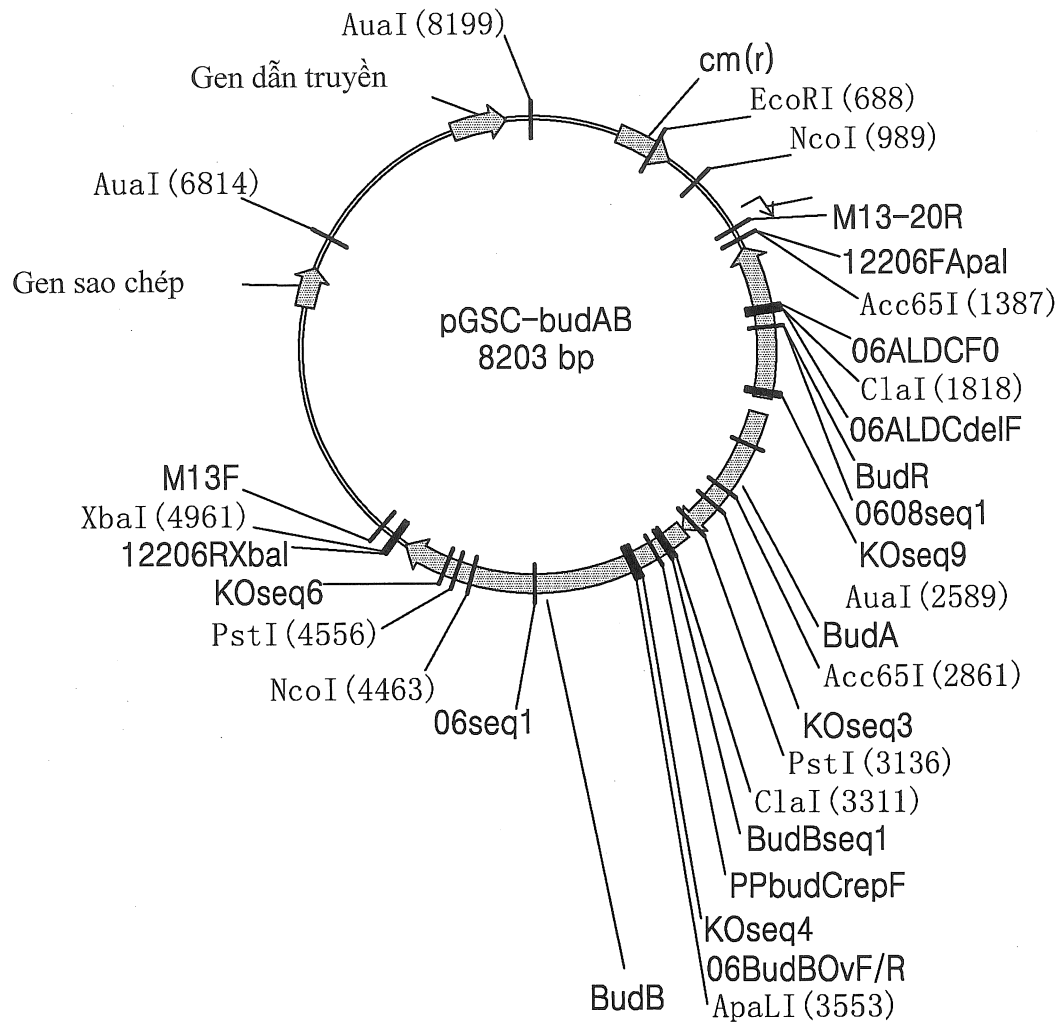


Fig. 4

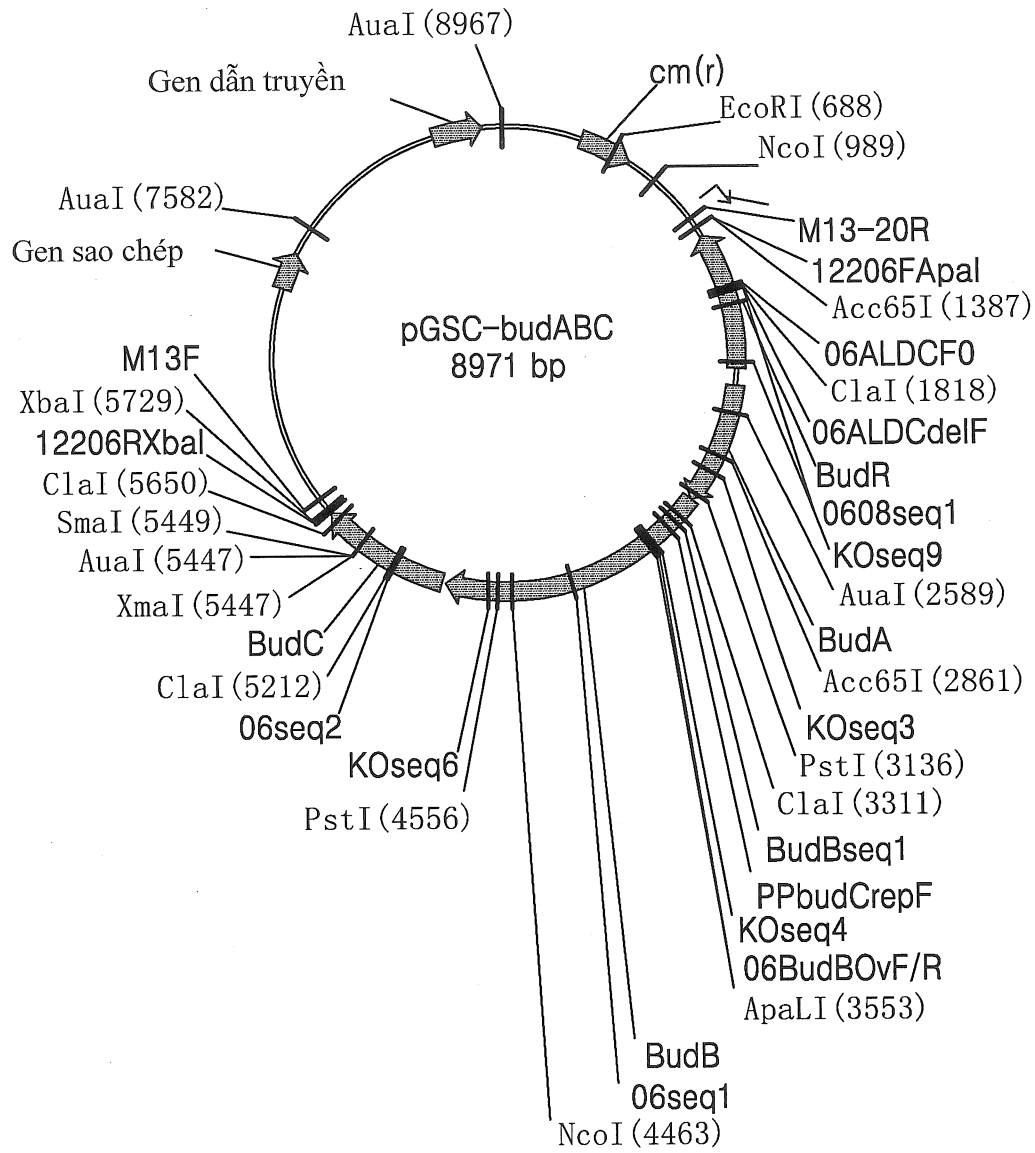


Fig. 5

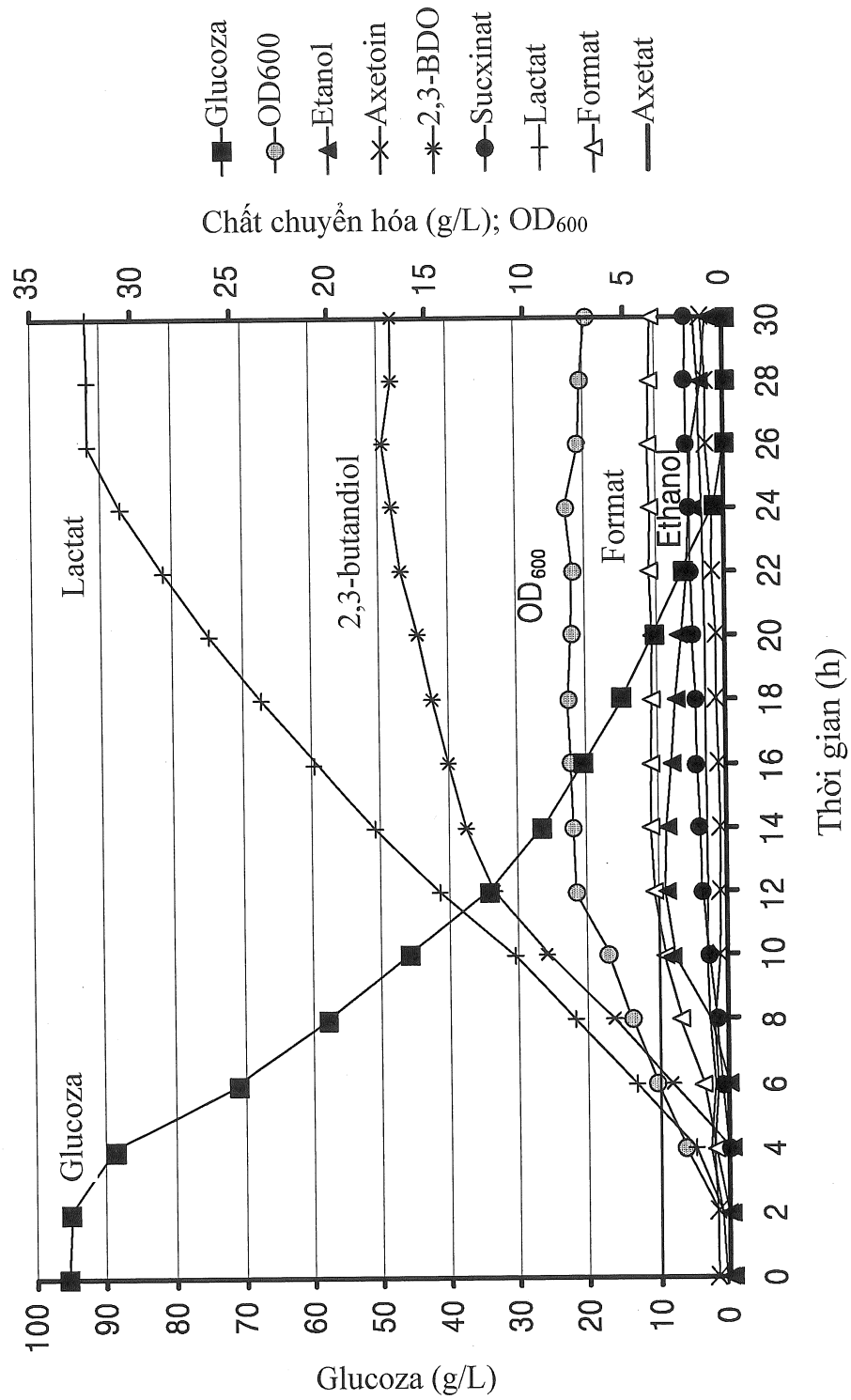


Fig. 6

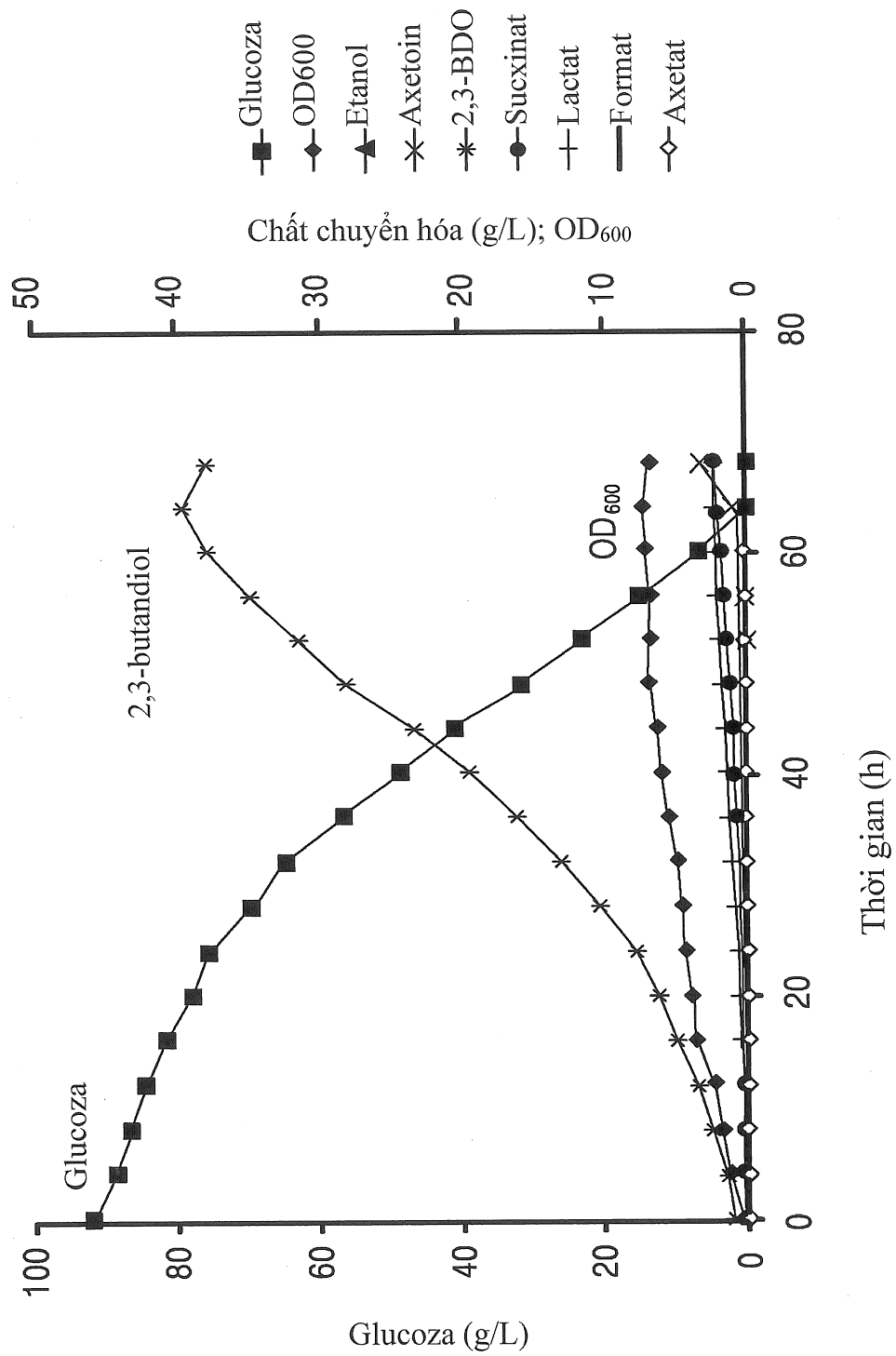


Fig. 7

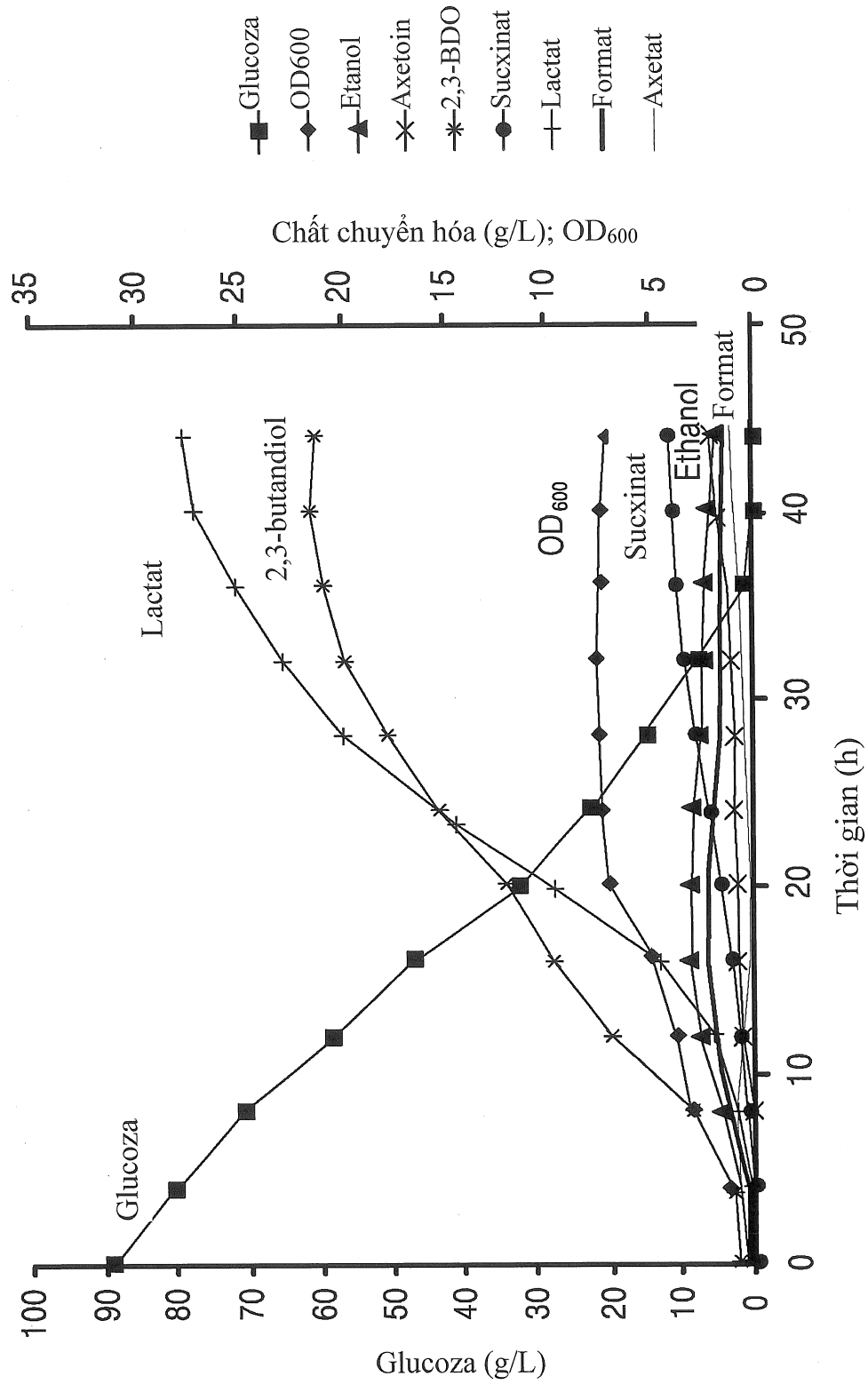


Fig. 8

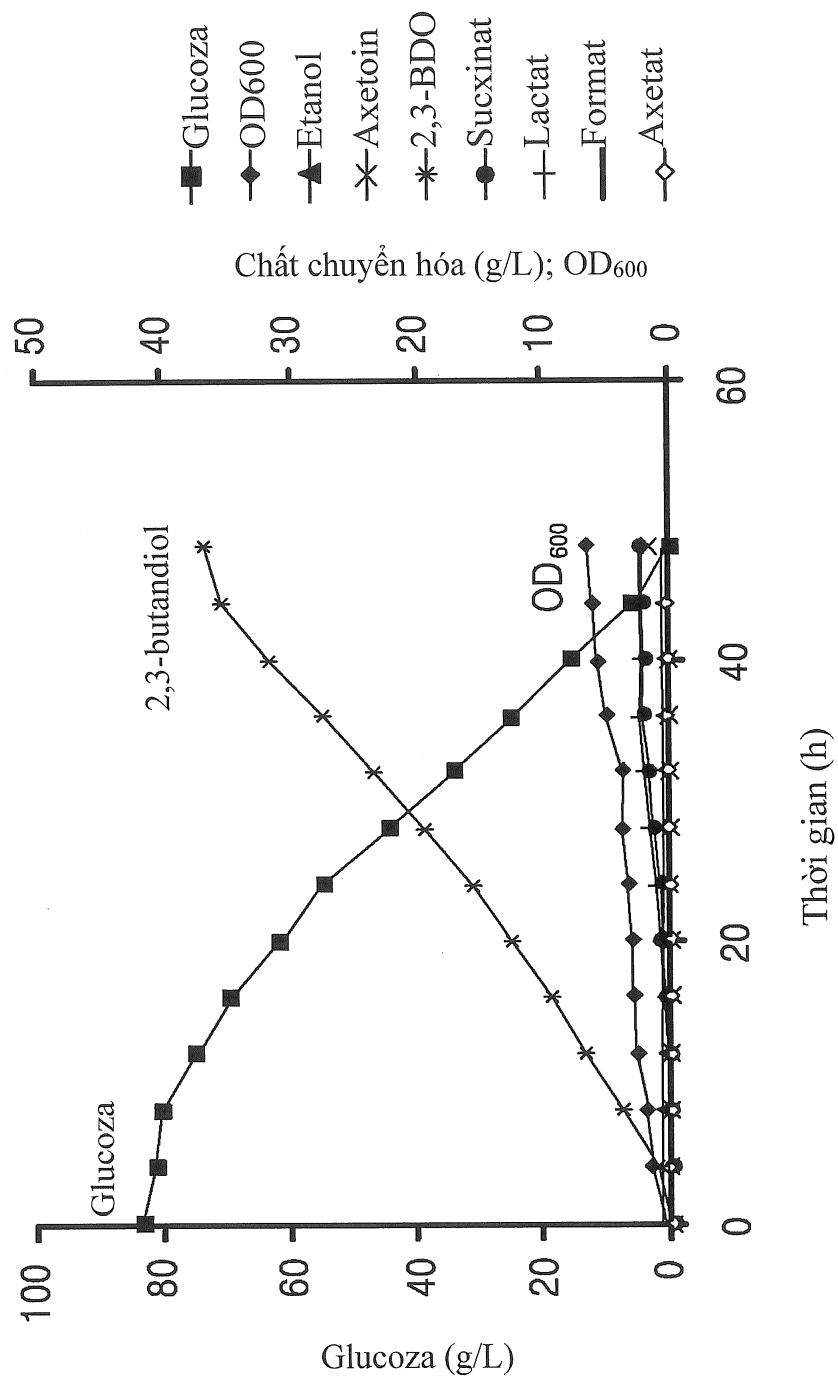


Fig. 9

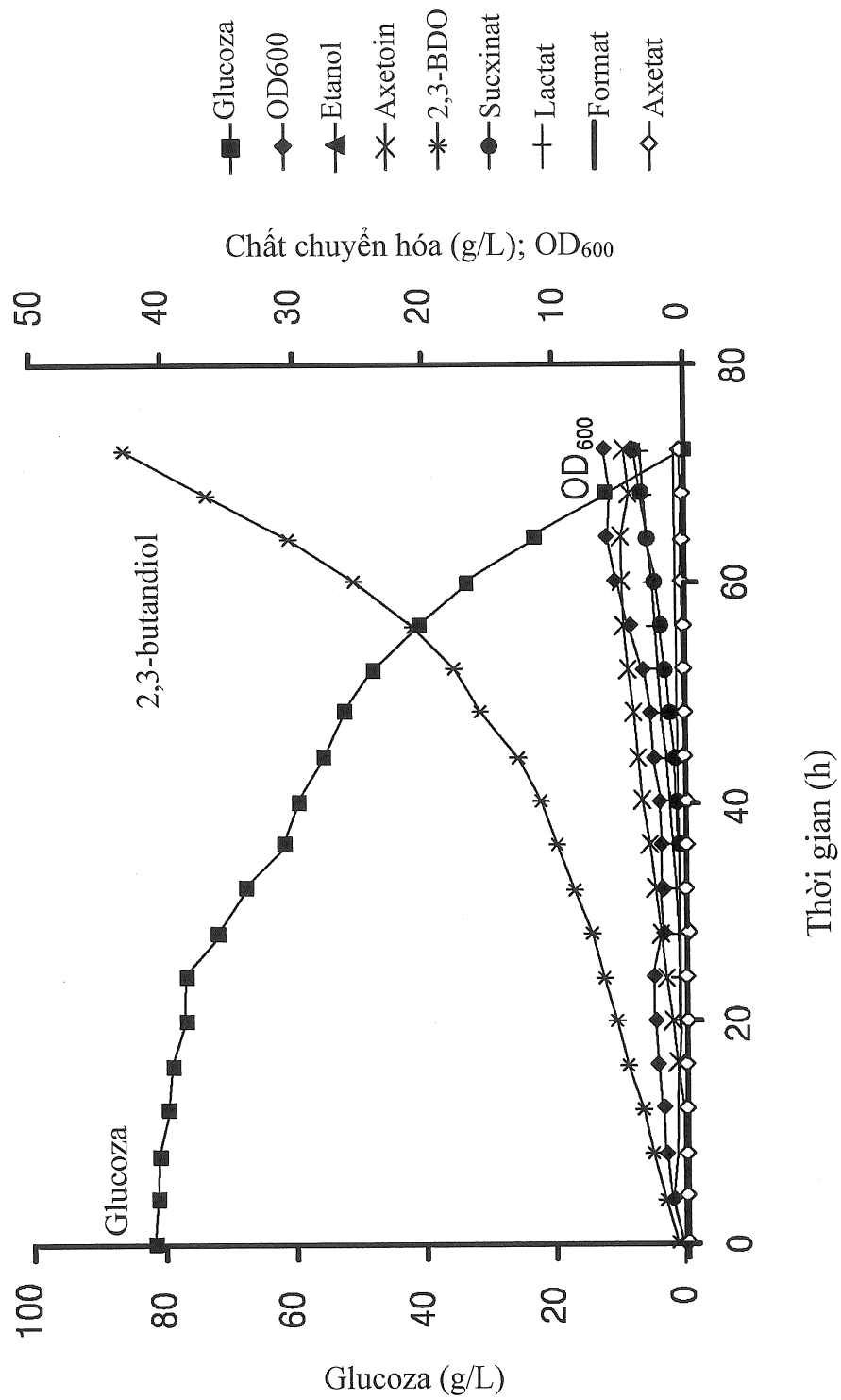
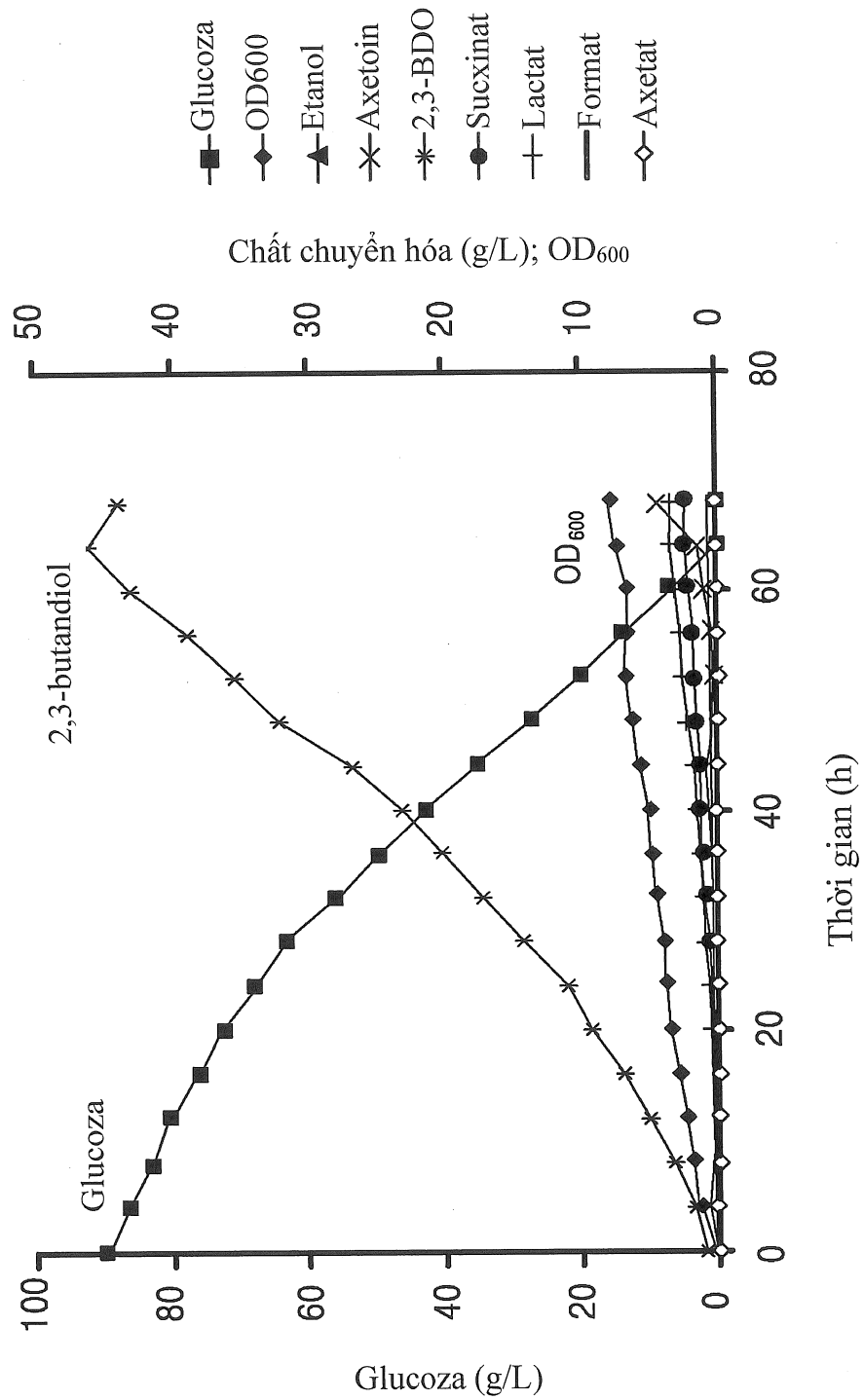


Fig. 10



Bảng 1

SEQ ID NO:	Trình tự
1	ATGAAAATCGCTGTGTATAGTACAAAACAGTACGACAAGAAGTATCTGCAGCATGTTAATGATG CATATGGCTTTGAACTGGAGTTTTTTGACTTCCTGCTAACCGAAAAAACCGCCAAAACCGCCA ACGGCTGTGAAGCGGTGTGTATCTTCGTAAACGATGACGGTAGCCGCCCGGTACTTGAAGAA CTGAAAGCCACGGCGTGCAGTACATCGCGCTGCGCTGCGCGGGGTTCAACAACGTTGACC TCGATGCCGCCAAAGAGCTGGGCCTGCGGGTGGTGCGCGTCCCGGCCTACTCGCGGAAG CGGTGCTGAGCACGCGATCGGCATGATGATGTCGCTGAACCGCCGCATTACCGTGCCTA TCAGCGCACCCGCGACGCGAACTTCTCTGGAAGGGCTGACCGGTTTACCATGCACGGT AAAACCGCCGCGCTTATTGGCACCGGTAAAATCGCGCTGCGCGCGCTGCGCATTCTTAAAG GCTTCGGTATGCGTCTGCTGGCGTTTGATCCCTACCCAAGCGCCGCGCGCTGGATATGGG CGTGGAGTATGTCGATCTTGAAACCTGTACCGGGAGTCCGATGTTATCTCACTGCACTGCC CACTGACCGATGAAAACCTACCATTTGCTGAACCATGCCGCGTTCGATCGCATGAAAGACGGG GTGATGATCATCAACACCAGCCGCGCGCGCTCATCGATTGCGAGGCAGCGATCGACGCC TGAAGCATCAGAAAATTGGCGCGCTGGGGATGGACGTGTATGAGAACGAACGCGATCTGTT TTTGAAGATAAGTCTAATGACGTGATTGAGGATGATGTGTTCCGCGCTCTCTCCGCTGCCAT AACGTCCTGTTTACCGGTCACCAAGCGTTTCTGACCGCGGAAGCGTTGATCAGCATTTGCA AACCACCTCGACAACCTGCGTCAAGTGGATGCAGGCGAAACCTGTCTAACGCACTGGTCT GA
2	ATGACGTTGCTAAATCCTGCGCCGTCATCTGCTGCTGATCCCGGGCACCTCCGGGCTACT GCTGTTCCGGCACCTGGCATCGGCCAGCCCGGGACATTTCTGTTAATGTGGATGAGCGCC AGCCTCGGCGCTATCGGCGGATTCTGGCTCTCGTGGCTGACGGGCTACCGCTACCGGTACC ATCTGCATCGTATCCGCTGGCTTAATGCCGAACGCCTCGCTCGCGGCCAGTTGTTCTGCGC CGCCACGGCGCGTGGGCAGTCTTTTTAGCCGCTTCTCTCTCCGCTTCGCGCCACCGTGC CGCTGGTAACCGGCGCCAGCGGCACCTCTCTGCGCAGTTTCAGCTCGCCAACGTGAGCTC CGGGCTGCTCTGGCCGCTGATCCTGCTGGCGCCAGGCGCGTTAAGCCTCAGCTTTTGATGA AAGGTATTGCTTTTAAAGAGATTTCTTAACACGCGATATGCTCTAGAATTATTACTATAACCT GCTGATTAACCTAGTTTTTAACTTTGTAAGATTATTTAATTATGCTACCGTGACGGTATTATCA CTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGCCCTTTTGTGC

Bảng 1 (tiếp theo)

3	Ko_IdhA_FP1 – CACGGATCCATGACGTTTCGCTAAATCCTGC
4	Ko_IdhA_RP1 – GCACAAAAGGGCAAGGAAAAAGACTTTTCTCCAGTGATA
5	TATCACTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGGCCCTTTTGTGCTCCCCCTTCGCGGGGGGCACATT CAGATAATCCCCACAGAAATTGCCTGCGATAAAGTTACAATCCCTTCATTTATTAACGATAA ATATTTATGGAGATTAATGAACAAGTATGCTGCGCTGCTGGCGGTGGGAATGTTGCTATCGG GCTGCGTTTATAACAGCAAGGTGTCGACCAGAGCGGAACAGCTTCAGCACCAACCGTTTTGTG CTGACCAGCGTTAACGGGCAGCCGCTGAATGCCGCGGATAAGCCGCAAGGAGCTGAGCTTC GGCGAAAAGATGCCATTACGGGCAAGATGCTCTGTTTCAGGTAATATGTGCAACCGCTTCAG CGGCACGGGCAAAGTCTCTGACGGCGAGCTGAAGGTTGAAGAGCTGGCAATGACCCGCATG CTCTGCACGGACTCGCAGCTTAACGCCCTGGAACGCCAGCTGAGCAAAATGCTGCGGGAAG GCGCGCAGGTGACCTGACGGAAACGCGAGCTAACGCTGGCGACCGCCGACAGAGCTGG TGTATAAGCTCGCCGACCTGATGAATTAATAATTA
6	Ko_IdhA_FP2 – TATCACTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGGCCCTTTTGTGC
7	Ko_IdhA_RP2 – CCTGCGGCCGCTAATTATTAATTCATCAGGTC
8	ATGACGTTTCGCTAAATCCTGCGCCGTCATCTCGCTGCTGATCCCGGGCACCTCCGGGCTACT GCTGTTTCGGCACCCCTGGCATCGGCCAGCCCGGGACATTTCTGTTAATGTGGATGAGCGCC AGCCTCGGCGCTATCGGCGGATTTCTGGCTCTCGTGGCTGACGGGCTACCGCTACCGGTACC ATCTGCATCGTATCGGCTGGCTTAATGCCGAACGCCCTCGCTCGCGGCCAGTTGTTCCCTGCGC CGCCACGGCGCGTGGGCAAGTCTTTTTAGCCGCTTTCTCTCTCGGCTTCGCGCCACCGTGC CGCTGGTAACCGGCGCCAGCGGCACCTCTCTCTGGCAGTTTCAGCTCGCCAACGTCAGCTC CGGGCTGCTCTGGCCGCTGATCCTGCTGGCGCCAGCGCGTTAAGCCTCAGCTTTTGATGA AAGGTATTGCTTTTAAAGAGATTTCTTAACACCGCGATATGCTCTAGAATTATTACTATAACCT GCTGATTAACTAGTTTTTAACATTTGTAAGATTATTTAATTATGCTACCGTGACGGTATTATCA CTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGGCCCTTTTGTGCTCCCCCTTCGCGGGGGGCACATTGAGAT AATCCCCACAGAAATTGCCTGCGATAAAGTTACAATCCCTTCATTTATTAATACGATAAATATT ATGGAGATTAAATGAACAAGTATGCTGCGCTGCTGGCGGTGGGAATGTTGCTATCGGGCTGC GTTTATAACAGCAAGGTGTCGACCAGAGCGGAACAGCTTCAGCACCAACCGTTTTGTGCTGAC CAGCGTTAACGGGCAGCCGCTGAATGCCGCGGATAAGCCGCAAGGAGCTGAGCTTCGGCGA AAAGATGCCATTACGGGCAAGATGCTGTTTCAGGTAATATGTGCAACCGCTTCAGCGGCA CGGGCAAAGTCTCTGACGGCGAGCTGAAGGTTGAAGAGCTGGCAATGACCCGCATGCTCTG CACGGACTCGCAGCTTAACGCCCTGGACGCCACGCTGAGCAAAATGCTGCGCGAAGGCGC GCAGGTGACCTGACGGAAACGCGAGCTAACGCTGGCGACCGCCGACAGAGCTGGTGTA TAAGCTCGCCGACCTGATGAATTAATAATTA
9	ATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTAGCCACAGCCCTGGGAAGGTTTTGCGAAAGGTGACTGGCA GAACGAAGTCAACGTCGCGCACTTCATCCAGAAAACTATACCCCGTACGAAGGTGACGAGT CCTTCTCGGCTGGCGCAACTGACGCGACCAAGCTGTGGGACACCGTAATGGAAGGCGT TAAACAGGAAAAACCGCACTCACGCGCCTGTTGATTTTGATACTTCCCTTGCATCCACCATCAC TTCTCATGACGCTGGCTACATCGAGAAAGGTCTCGAGAAAATCGTTGGTCTGACAGCTGAAG CTCCGCTGAAACGCGCGATTATCCCGTTCGGCGGCATCAAAATGGTTCGAAGGTTCTGCAAA GCGTACGATCGCGAGCTGGACCCGATGCTGAAGAAAATCTTCACTGAATACCGTAAACTCA CAACCAGGGCGTGTTTGACGTTTACACCAAAGACATCCTGAACTGCCGTAATCTGGTGTCT GACCGGTCTGCCGATGCCATATGGCGTGCTGATCATCGGTGACTACCGTGGCGTTGCG CTGTACGGTATCGACTTCTGATGAAAGACAAATACGCTCAGTTCTGTTCTCTGCAAGAGAAA CTGGAAAACGGCGAAGATCTGGAAGCAACCATCCGCTCTGCGCGAAGAAATCTCTGAACAGCA CCGCGCGCTGGGTGAGATCAAAGAAATGGCGGCTAAATATGGCTGCGATATCTCTGGTCTCTG CTACCACCGCTCAGGAAGCTATCCAGTGGACCTACTTCGGTTACCTGGCTGCGGTAAATCT CAGAAACGGCGCGGCAATGTCCTTCGGTCTGACCTCCAGCTTCTGGACATCTTCATCGAACG

Bảng 1 (tiếp theo)

	TGACCTGAAAGCCGGTAAATCACCAGCAAGACGCACAGGAAATGATTGACCACCTGGTCA TGAAACTGCGTATGGTTCGTTTCCTGCGTAACCCCTGAATATGATGAACCTGTTCTCTGGCGACC CGATCTGGGCAACAGAATCTATCGGCGGTATGGGCGTTGACGGCCGTAATCTGGTCAACAA AAACAGCTTCCGTTTCCTGAACACCCCTGTACACCATGGGCGCGTCTCCGGAGCCGGAACATCA CCATTCTGTGGTCTGAAAAACTGCCGCTGAGCTTCAAAAAATAACGCGCGGAAAGTGTCCATC GATACCTCTCTCTGCAGTACGAGAACGATGACCTGATGCGTCTGACTTCAACAACGATGAC TACGCTATCGCTTCTGCTGCGTAAGCCCGATGGTTGTTGGTAAGCAAATGCAGTTCTTGGGCGC GCGTGCTAACCTGGCGAAAAACATGCTGTACGCAATCAACGGCGGCGTTGATGAAAACTGA AAATGCAGGTTGGTCTAAATCTGAACCGATCAAAGGCGACGTTCTGAACCTCGACGAAGTGA TGGACCGCATGGATCACTTCTGGACTGGCTGGCTAAACAGTACGTCACTGCGCTGAACATC ATCCACTACATGCACGACAAGTACAGCTACGAAGCTTCCCTGATGGCGCTGCACGACCGTGA TGTTATCCGCAACATGGCATGTGGTATCGCAGGTCTTTCCGTTGCGGGCTGACTCCCTGTCTG CAATCAAATATGCGAAAGTTAAACCGATTCTGTACGAAAAACGGTCTGGCTGTGCACTTCGAAA TCGAAGGCGAATACCCGCGATTTGGTAACAACGACTCTCGCGTGCATGATATGGCCGTTGAC CTGGTTGAACGTTTCATGAAGAAAATTCAGAACTGCACACCTACCGCAACGCTATCCCGACT CAGTCCGTTCTGACCATCACCTCTAACGTTGTGTATGGTAAGAAAAACGGCAACACCCCTGA CGGTCTGTCGCGCTGGCGCTCCGTTGCGACCAAGGTGCTAACCCGATGCACGGCCGTGACCA GAAAGGCGCTGTTGCTCTCTGACCTCCGTTGCAAAAACTGCCGTTTGGTTACGCGAAAGATG GTATTTCTTACACCTTCTCTATCGTGCCGAACGCGCTGGGTAAAGACGACGAAGTTCTGAAAA CTAACCTCGCCGGCTGATGGATGGTTACTTCCACCACGAAGCGTCCATCGAAGGCGGTCA GCATCTGAACGTCAACGTTATGAACCGCGAAATGCTGCTCGACGCGATGGAAAAACCGGAAA AATATCCGCGAGCTGACCATCCGCTATCCGGCTACCGCAGTACGTTTTAACTCCCTGACTAAAG AACAGCAGCAGGACGTTATTACTGTAACCTTCACTCAGACCATGTAA
10	GGGTCAACTGGCGAAAAACTGGCTCAACGTCTATGTTGGTAACCTGATTGGTTGCTTACTGTT TGTATTGCTGATGTGGCTTTCCAGGCGAATATATGACTGCCAACGGTCAATGGGGACTTAACGT TCTGCAAAACCGCCGACCACAAAATGCACCATACTTTTGTGAAGCCGTGTGCCTGGGTATCCT GGCAAAACCTGATGGTCTGCCTTGCGGTATGGATGAGTTACTCCGGCCGTAGCCTGATGGATA AAGCCATGATTATGGTTTTACCGGTGGCAATGTTTGTGCCAGCGGGTTTGAGCACAGTATCG CGAACATGTTTATGATCCCGCTGGGTATCGTTATCCGCGACTTTGCAAGCCCGGAATTCGGA CCGCAAGTTGGTTCAACTCCGGAAAGTTTCTCTCACCTGACCGTCATGAACCTCATCACTGATA ACCTGATTCCGGTAACTATCGGGAACATCATCGGCGGTGGTCTGCTGGTTGGGTTGACATAC TGGGTCAATTTACCTGCGTGGCGACGACCATCACTAAGGGTTGTTTCAGGCAGTAAATAAAAAA TCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTT ATTACTC
11	Ko_pflB_FP1 - ATCGGATCCGGGTCAACTGGCGAAAACTGGCTCAACGT
12	Ko_pflB_RP1 - GAGTAATAACGTCCTGCTGCTGTAACCTTTTCATTAAGCTCGGACAT
13	ATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTTATTACTCGTACCTTCACTCAGACC ATGTAATGGTATTGACTGAAATCGTACAGTAAAAAGCGTACAATAAAGGCTCCACGCAAGTGG GGCCTTTTAGCAATATCATCCTGCCCGAGTCTCTTTGTCTGCTGTCTATACTTTATGGATAA CAGCCAAAACAGACTCGACATAGCCTTTGAGCTGTGCATCTACATAGGCCCGGATGGGCCA AATTCGGAGATATCACCGCAATGTAAACAATTGGTCGCATTCACTCCTTTGAATCCTGTGGCA CGTGGATGGCCCGGGGATTGCTTTATCACTTCTCCAGGGCTGCTGATGCGCTGCCTC TATTGCCACAACCGCGATACCTGGGATACCAACGGCGGCAAGAGATTACCGTTGAAGAGCT GATGAAAGAGGTGGTGACCTATCGCCACTTTATGAACGCTTCCGGCGGCGGCGTGACGGCA TCCGGCGGCGAGGCTATCCTGCAGGCGGAATTTGTTGCGGACTGGTTCCGCGCCTGTAAGA AAGAAGGTATTACACTGTCTCGATACCAACGGCTTTGTGCGCCGCTACGATCCGTTATTG ATGAACTGCTGGAGGTACCGACCTGGTGATGCTCGATCTCAAGC
14	Ko_pflB_FP2 - ATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTTATTACTC

Bảng 1 (tiếp theo)

15	Ko_pflB_RP2 - ACTGCGGCCGCGCTTGAGATCGAGCATCACCAGGTCGGTGA
16	GGGTCAACTGGCGAAAACTGGCTCAACGTCTATGTTGGTAACCTGATTGGTTGCTTACTGTT TGTATTGCTGATGTGGCTTTCAGGCGAATATATGACTGCCAACGGTCAATGGGGACTTAACGT TCTGCAAACCGCCGACCACAAAATGCACCATACTTTTGTGAAGCCGTGTGCCTGGGTATCCT GGCAAACCTGATGGTCTGCCTTGCGGTATGGATGAGTTACTCCGGCCGTAGCCTGATGGATA AAGCCATGATTATGGTTTTACCGGTGGCAATGTTTGTGOCAGCGGGTTTGAGCACAGTATCG CGAACATGTTTATGATCCCGCTGGGTATCGTTATCCGCGACTTTGCAAGCCCGGAATTCTGGA CCGCAGTTGGTTCAACTCCGAAAAGTTTCTCTCACTGACCGTCATGAACTTCATCACTGATA ACCTGATTCCCGTAACATATCGGGAACATCATCGGCGGTGGTCTGCTGGTTGGGTGACATAC TGGGTCATTTACCTGCGTGGCGACGACCATCACTAAGGGTTGTTTCAGGCAGTAAATAAAAAA TCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTT ATTACTCGTACCTTCACTCAGACCATGTAATGGTATTGACTGAAATCGTACAGTAAAAAGCGTA CAATAAAGGCTCCACGCAAGTGGGGCCTTTTAGCAATATCATCCTGCCCCAGTCTCTTTTGT CTGCTGTCTATACTTTATGGATAACAGCCAAAACAGACTCGACATAGCCTTTGAGCTGTGCAT CTACATAGGCCCCCGGATGGGCCAAATTGGGAGATATCACCGCAATGTCAACAATTGGTCGCA TTCACTCCTTTGAATCCTGTGGCACCGTCGATGGCCCGGGGATTGCTTTATCACCTTCTTCC AGGGCTGCCTGATGCGCTGCCTCTATTGCCACAACCGCGATACCTGGGATACCCACGGCGG CAAAGAGATTACCGTTGAAGAGCTGATGAAAGAGGTGGTGACCTATCGCCACTTTATGAACG CTTCGGCGGGCGGGCGTGACGGCATCCGGCGGGCGAGGCTATCCTGCAGGCCGAATTTGTTT GCGACTGGTTCCGCGCCTGTAAGAAAGAAGGTATTCATACCTGTCTCGATACCAACGGCTTT GTGCGCCGCTACGATCCGGTTATTGATGAACTGCTGGAGGTCAACGACCTGGTGATGCTCG ATCTCAAGC

Bảng 2

SEQ ID NO:	Trình tự
17	ATGAACCATTCTGCTGAATGCTCTTGTGAAGAGAGCCTGTGTGAAACTCTACGAGGAT TTTCCGCGCAACATCCCGATAGCGTCATCTACCAGACCTCTCTGATGAGCGCGCTGTT AAGCGGCGTTTATGAAGGTAATACGACCATCGCCGATTTGCTCACCACGGCGATTTTC GGCCTCGGGACCTTTAATGAACTGGACGGCGAGCTGATCGCGTTTAGCAGCGAAGTTT ACCAGCTGCGCGCCGACGGCAGCGCCCGCAAAGCCCGTATGGAACAGCGTACGCCGTT CGCGGTGATGACCTGGTTTCAGCCGCAGTATCGCAAAACGTTGATAAAACGGTCAGC CGTGAACAACCTGCACGACATCATCGACCAGCAAATTCGTCGGACAATCTGTTCTGCG CCCTGCGTATTAACGGCCATTTTCGCCACGCCCATACCCGCAAGGTACCGCGCCAGAC GCCGCCATACCGGGCGATGACCGACGTA CTGACGACCAAGCCGGTTTTTCGCTTCAAC CAGCGCGAGGGTGTCTGGTTGGGTTTCAGAAGCCCGCAGCATATGCAGGGCATTAAACG TGGCCGGCTACCATGAACACTTCATCACCGATGACCGCCAGGGCGCGGCCATCTGCT CGATTATCAGCTCGACCACGGCGTTCTGACCTTTGGCGAGATCCACAAATTGATGATT GACCTTCCTGCCGATAGCGCTTCCTGCAGGCGGATCTGCATCCAGACAATCTTGATG CCGCCATTTCGCTCAGTCGAAAACATAA
18	GTGGATAATCAACATCAACCGCGCCAGTGGGCGCACGGCGCCGACCTCATCGTCAGCCAGC TTGAGGCCCCAGGGGGTACGCCAGGTGTTGGGCATTCCGGGGGCCAAAATCGATAAAGTCTT CGATTGCTGCTCGACTCCTCCATTGCGATTATCCCGGTGCGCCACGAAGCCAAACGCGCCT TTATGGCCGCGCGCGTTGGCCGATCAACGGCAAAGCGGGCGTCGCGCTGGTCACGTCCG GACCGGGCTGCTCTAACCTGATTACCGGGATGGCAACGGCCAAATAGCGAAGGCGACCCGGT GGTGGCGCTGGGCGGCGCGGTAAACGCGCCGACAAGGCCAAACAGGTGCACACAGATAT GGATACGGTGACGATGTTTAGCCCGGTGACCAATACTCGGTGGAAGTCACCGCGCCGGAA GCGCTGGCGGAAGTTGCTCCAAAGCGTTTCGTGCAGCCGAGCAGGGACGCCCGGGCAGC GCCTTCGTAGCCTGCCGCGAGGACGTGCTCGACGGGCGCGTCCACGCCAGGGTTCTGCC GCCGGCGATGCGCGCAGACCGCGCGCGCGGACGACGCCATTGCGCGAGTCCGCGAA GATGATTGCCGGCGCGAAAAATCCGATATTTCTGCTCGGCCTGATGGCCAGCCAGACGGAAA ACAGCGCGCGCGCTGCGCGAATTGCTGAAAAAAAGTCATATCCCGGTGACACGACCTATCAG GCCGCCGGCGCAGTCAATCAGGATCACTTACCCGCTTCGCCGGACGGGTTGGTCTGTTCA

Bảng 2 (tiếp theo)

	ACAACCAGGCAGGGGATCGACTCCTGCATCTCGCCGACCTGGTCATCTGCATCGGCTATAGT CCGGTGGAGTACGAGCCGGCCATGTGGAATAACGGTAAAGCCACGCTGGTACATATCGACG TGCTGCCCCGCTTACGAAGAGCGTAATTATACCCCGGACGTCGAGCTGGTCGGCAATATCGCC GCCACCCTGAACAACTGTCTCAACGCATCGACCACCAGCTGGTGCTCTCGCCGAGGCCG CCGAGATCCTTGTGACCGCCAGCATCAGCGGGAGCTCCTCGACCGCCGCGGTGCGCACC TGAACCAGTTGCGCGTTTCATCCGCTGCGCATCGTTGCGGCCATGCAGGACATCGTCAATAGC GATGTCAACCTGACCGTCGATATGGGGAGCTTTTCATATCTGGATCGCCCGCTATCTCTACAG CTTTCGGGCCCCGTGAGGTGATGATTTCCAAACGGTCAACAGACCATGGGCGTGCGGCTGCCG TGGGCGATTGGCGCTGGCTGGTCAATCCGCGAGCGCAAAGTGGTTTCGGTTTCGGGCGACG GCGGTTTCCTGCAGTCCAGCATGGAGCTGGAGACCCTGTACGGCTGAAAGCGAACGTCCT GCATATCATCTGGGTGATAACGGCTACAACATGGTGGCGATTGAGGAGGAGAAAAATACC AGCGGCTCTCCGGCTTGAGTTCCGGCCCGGTGGATTTTAAAGTCTACGCCGAAGCCTTCGG CGCCAAAGGGTTTGGCGTAGAGAGCGCCGAAGCCCTTGAGCCGACGCTGCGGGCGGGCAT GGAGCTCGACGGCCCCCGCGTCTAGCCATCCCGTGGATTACCGCGATAACCCGCTGCT GATGGGCCAGCTCCATCTCAGTCAACTACTTTGA
19	ATGAAAAAGTCGCACTCGTCACCCGGCGCGGGCCAGGGTATCGGTAAAGCTATCGCCCTTC GTCTGGTGAAAGATGGTTTTGCCGTGGCTATCGCCGATTATAACGACGCCACCGCGCAGGC GGTGCGTGATGAAATTAACCGCAGCGCGCGCGCGCGCTAGCGGTGAAGGTGGATGTGTCT CAACGCGATCAGGTTTTTGCCGCGCTCGAACAGGCGCGCAAGGGTCTCGGCGGTTTTGACG TGATCGTCAACAACGCCGGGGTTGCGCCCTCCACACCAATCGAAGAGATTGCGGAGGAGGT GATCGATAAAGTCTACAATATCAACGTTAAAGGCGTTATCTGGGGCATCCAGGCCGCGGTAG AGGCGTTTAAAAAGAGGGCCACGGCGGCAAAATTATCAACGCGCTGCTCCAGGCGGGCCA TGTAGGTAACCCGGAGCTGGCGGTCTATAGCTCCAGTAAATTTGCCGTGCGCGGCTGACG CAAACCGCCCGCCGCGATCTGGCGCATCTGGGGATTACCGTAAACGGCTACTGCCCGGGGA TCGTCAAAACCCCAATGTGGGCGGAAATTGACCGCCAGGTTTTCCGAAGCGGCGGGTAAACC GCTGGGCTACGGMACCCAGGAGTTGCCAAAACGATTACCCCTGGGCGGCTATCCGAGCCG GAAGACGTGCGACGCTGCGTCTCTTATCTCGCCGCTCCGGACTCCAATTATGACCGGCCA ATCGCTGCTGATCGATGGCGGCATGGTATTAACTAA
20	ATGGAACCTCGTTATCTGCGCTACTTGTGCGCGTCGCGAGGGCGCGGCACTTCACTAAAGC GGCAAAAGAACTTGGTATCTCCAGCCACCGCTAAGTCAGCAAATCAACGGCTTGAAAGAG AAATTGGCACACCGCTTTTCCGCCGATTAAAGCGGGGCGTCGAGCTGACGGAAGCGGGGGA GTCGTTTTATGAGGATGCTTGCCAGATTCTGGCGTTAAGCGACGCGGCGCTGGA AAAACCA AGGGAATTGCCCGCGGGCTGAACGGTCGGCTCTGCTGGGCATTACAGCTCTGATGCTTT TCATCCGCAAACTTTAGCCTGTTACAGCAGTTTCAGCAGAGTTATCCGGGGGTGACGTTGCA TCAGGTGGAAGGCAATATGCCGACGCTGATGGGGGCGCTTGCGGAAGCGGAGCTGGATATT GCTTTTGATCGCCTGCCCTGCGAGAGCAGTAAAGCGTTCAATCTGCGGATTATCGATCAAGA ACCGATGGTGATTGCCCTGGCGGTTTCGCACCCGCTATCGTCCACCGCGAGCTGACGCTG GAGCAACTGACGGACGTGGCGCCGATTCTTTCCCGCGTGAAGTGGCCCTGGCCTGTATG AGCTGGTGTTCAACAGCTATCTGCGCGCCGGTGTGACGTGCAGCGAGCCTATCAGTCATCG CAAATATCATGCTGCTCAGCATGGTGGAGGCTGGCTTCGGCTTTGCGCTGGTGCCGAGT CGATGACCTGCATCACGCTCCCCAACGTGAGCTATCACCCGCTGATGGGTACACCGCTGAAA ACCGATATCGCTATCGCCTGGCGGCGCTACGAGCGCTCGCGCACGGTGAAGCGTTTTCTGG CCATGTTTTAA

<110> gs caltex

<120> VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT 2,3-BUTANEDIOL
GIA TĂNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT 2,3-BUTANDIOL BẰNG CÁCH SỬ
DỤNG VI SINH VẬT NÀY

<130> DOp150044PCT

<150> KR 10-2014-0047683

<151> 2014-04-21

<160> 20

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 990

<212> DNA

<213> Klebsiella oxytoca

<400> 1

atgaaaatcg ctgtgtatag tacaaaacag tacgacaaga agtatctgca gcatgttaat 60
gatgcatatg gctttgaact ggagttttt gacttctgc taaccgaaaa aaccgceaaa 120
accgccaacg gctgtgaagc ggtgtgtatc ttgtaaagc atgacggtag ccgcccggta 180
cttgaagaac tgaagccca cggcgtgcag tacatcgccg tgcgtgcgc ggggttcaac 240
aacgttgacc tcgatgccgc caaagagctg ggctgcggg tggcgcgct cccggcctac 300
tcgccgaag cggtcgctga gcacgcgac ggcatgatga tgcgctgaa ccgcgcatt 360
caccgtgect atcagcgac ccgcgacgc aacttctc tggaagggt gaccggttc 420
accatgcacg gtaaaaccgc cggcggtatt ggcaccggta aaatcggcgt cgcgcgctg 480
cgcattctta aaggcttcgg tatgcgtctg ctggcgttg atccctacc aagcgcgcc 540
gcgctggata tggcgctgga gtatgtgat ctgaaacc tgtaccgga gtcgatgtt 600
atctcactgc actgccact gaccgatga aactaccatt tgcgaacca tgcgcgttc 660
gatgcatga aagacggggt gatgatcgc aacaccagc cggcgcgct catcgattcg 720
caggcagcga tcgacgcct gaagcatcag aaaattggcg cgtggggat ggacgtgat 780
gagaacgaac gcgatctgtt cttgaagat aagtctaat acgtgattca ggatgatgtg 840
ttccgcgtc tctccgctg ccataacgc ctgtttacc gtcaccagc gttctgacc 900
gcggaagcgt tgatcagcat ttgcaaacc accctcgaca acctgcgtca agtggatgca 960
ggcgaaacct gtctaaccg actggtctga 990

<210> 2

<211> 595

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 2

atgacgttcg ctaaatcctg cgccgtcatc tcgctgctga tcccgggcac ctccgggcta 60
ctgtgttcg gcaccctggc atcgccagc cggggacatt tctgttaat gtggatgagc 120
gccagcctcg gcctatcgg cggattctgg ctctgtggc tgacgggcta ccgtaccgg 180
taccatctgc atcgatccg ctggctaat gccgaacgc tcgctcgcg ccagttgttc 240
ctgcgcgcc acggcgctg ggcagtctt ttagecgt ttctctcc gcttcgcgc 300
accgtgccg tggtaccgg cgcagcggc acctctctt ggcagttca gtcgccaac 360
gtcagctccg ggctgctct gccgtgac ctgctggcg caggcgctt aagcctcagc 420
ttttgatgaa aggtattgtc tttaaagag atttctaac accgcgatat gctctagaat 480
tattactata acctgctgat taaactagtt ttaacattt gtaagattat ttaattatg 540
ctaccgtgac ggtattatca ctggagaaaa gtcttttc cttgccctt tgtgc 595

<210> 3

<211> 30

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự nhân tạo
 <400> 3
 cacggatcca tgacgttcgc taaatcctgc 30
 <210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự nhân tạo
 <400> 4
 gcacaaaagg gcaaggaaaa aagacttttc tccagtgata 40
 <210> 5
 <211> 591
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự nhân tạo
 <400> 5
 tatactgga gaaaagtctt tttccttgc cctttgtgc tcccccttcg cggggggcac 60
 attcagataa tccccacaga aattgcctgc gataaagta caatcccttc atttattaat 120
 acgataaata tttatggaga ttaaatgaac aagtatgctg cgctgctggc ggtgggaatg 180
 ttgctatcgg gctgcgttta taacagcaag gtgtcgacca gagecggaaca gcttcagcac 240
 caccgttttg tgctgaccag cgtaacggg cagccgctga atgccgcgga taagccgcag 300
 gagctgagct tcggcgaaaa gatgccatt acgggcaaga tgtctgttc agtaatatg 360
 tgcaaccgct tcagcggcac gggcaaagtc tctgacggcg agctgaaggt tgaagagctg 420
 gcaatgaccc gcatgctctg cacggactcg cagcttaacg cctggacgc 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 nhân tạo
 <400> 6
 tatactgga gaaaagtctt tttccttgc cctttgtgc 40
 <210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự 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 ctaaatctcg cgccgtcacc tcgtgtctga tcccgggcac ctccgggcta 60
ctgctgttcg gcaccctggc atcgccagc ccgggacatt tctgttaat gtggatgagc 120
gccagcctcg gcgctatcgg cggattctgg ctctcgtggc tgacgggcta ccgctaccgg 180
taccatctgc atcgatccg ctggcttaat gccgaacgcc tcgtctcgcg ccagttgttc 240
ctgcgcgcgc acggcgcggt ggcagctttt tttagccgct ttctctctcc gcttcgcgcc 300
accgtgcgcg tggttaaccgg gccagcggc acctctctct ggcagtttca gctcgccaac 360
gtcagctccg ggctgctctg gccgctgac ctgctggcgc caggcgcggt aagcctcagc 420
ttttagttaa aggtattgtc ttttaagag atttctaac acccgatat gctctagaat 480
tattactata acctgctgat taaactagtt ttaacattt gtaagattat ttaattatg 540
ctaccgtgac ggtattatca ctggagaaaa gtctttttc ctgcccctt ttgtctccc 600
cttcgccccg ggcacattca gataatcccc acagaaattg cctgcgataa agttacaac 660
cttcatttta ttaatacgaat aaatatttat ggagattaaa tgaacaagta tgcgtcgctg 720
ctggcggttg gaatgtgct atcgggctgc gtttataaca gcaaggtgtc gaccagagcg 780
gaacagcttc agcaccaccg tttgtgctg accagcgta acgggcagcc gctgaatgcc 840
gcggataagc cgcaggagct gagcttcggc gaaaagatgc ccattacggg caagatgtct 900
gttcaggtta atatgtgcaa ccgcttcagc ggcacgggca aagtctctga cggcgagctg 960
aaggttgaag agctggcaat gaccgcgat ctctgcacgg actgcagct taacgccctg 1020
gacgccacgc tgagcaaaat gctgcgcgaa ggcgcgcagg tcgacctgac ggaaacgcag 1080
ctaacgctgg cgaccgccga ccagacgctg gtgtataagc tcgccgacct gatgaattaa 1140
taatta 1146

<210> 9

<211> 2283

<212> ADN

<213> Klebsiella oxytoca

<400> 9

atgtccgagc ttaatgaaaa gttagccaca gcctgggaag gttttgcgaa aggtgactgg 60
cagaacgaag tcaacgtccg cgacttcac cagaaaaact ataccctgta cgaaggtgac 120
gagtccttcc tggttgccgc aactgacgcg accaccaagc tgtgggacac cgtaattgaa 180
ggcgtaaac aggaaaaccg cactcacgcg cctgttgatt ttgatactc ccttgcaccc 240
accatcactt ctatgacgc tggttacac gagaaaggc tcgagaaaa cgttggtctg 300
cagactgaag ctccgtgaa acgcgcgatt atccgcttc gcggcatcaa aatggtcgaa 360
ggttctctca aagcgtacga tcgcgagctg gaccgatgc tgaagaaaat ctactctgaa 420
taccgtaaaa ctacaccca gggcggtgtt gacgtttaca ccaaagacat cctgaactgc 480
cgtaaatctg gtgttctgac cggctgcgc gatgcctatg gccgtggtcg tatcatcggt 540
gactaccgtc gcgttgcgct gtacggtatc gacttctga tgaaagacaa atacgctcag 600
ttcgtttctc tgcaagagaa actggaaaac ggcgaagatc tggaagcaac catcgtctg 660
cgcaagaaa tctctgaaca gcaccgcgc ctgggtcaga tcaagaaaat ggccgctaaa 720
tatggctgcg atatctctgg tctgctacc accgctcagg aagctatcca gtggacctac 780
ttcggttacc tggtgcgct aaaatctcag aacggcgcgg caatgtcctt cggtcgtacc 840
tccagcttcc tggacatct catgaacgt gacctgaaag ccggtaaaat caccgagcaa 900
gacgcacagg aaatgattga ccacctggc atgaaactgc gtatggttcg ttctctgcgt 960
accctgaat atgatgaact gttctctggc gaccgatct gggcaacaga atctatcggc 1020
ggtatgggcg ttgacggccg tactctggtc accaaaaaca gttccgttt cctgaacacc 1080
ctgtacacca tggggcgctc tccggagccg aacatcacca ttctgtggtc tgaaaaactg 1140
ccgctgagct tcaaaaaata cgccgcgaaa gtgtccatcg atacctctc tctgcagtac 1200
gagaacgatg acctgatgcg tctgacttc aacaacgatg actacgctat cgcttgctgc 1260

gtaagcccgga tgggtgttgg taagcaaatg cagttcttcg gcgcgcgtgc taacctggcg 1320
 aaaaccatgc tgtacgcaat caacggcggc gttgatgaaa aactgaaaat gcaggttggg 1380
 cctaatactg aaccgatcaa aggcgacgtt ctgaacttcg acgaagtgat ggaccgcatg 1440
 gatcacttca tggactggct ggctaaacag tacgtcactg cgtgaacat catccactac 1500
 atgcacgaca agtacageta cgaagcttc ctgatggcgc tgcacgaccg tgatgttate 1560
 cgcaccatgg catgtggtat cgcaggtctt tccgttgccg ctgactccct gtctgcaatc 1620
 aaatatgcga aagttaaacc gattcgtgac gaaaacggtc tggctgtoga cttcgaaatc 1680
 gaaggcgaat acccgaggtt tggtaacaac gactctcgcg tcgatgatat ggccgttgac 1740
 ctggttgaac gtttcatgaa gaaaattcag aaactgcaca cctaccgcaa cgtatcccg 1800
 actcagtcg tctgacat cactctaac gttgtgtatg gtaagaaaac cggcaacacc 1860
 cctgacggtc gtcgcgtgg cgtccgttc ggaccaggtg ctaaccgat gcacggcgt 1920
 gaccagaaag gcgtgttgc ctctctgacc tccgttgcaa aactgccgtt tgcttacgcg 1980
 aaagatggta tttctacac cttctctatc gtgcegaacg cgtgggtaa agacgacgaa 2040
 gttcgtaaaa ctaacctcgc cgccctgatg gatggttact tccaccacga agcgtccatc 2100
 gaaggcggtc agcatctgaa cgtcaacgtt atgaaccgcg aaatgctgct cgacgcgatg 2160
 gaaaaccggg aaaaatatcc gcagctgacc atccgcgtat cgggtacgc agtacgtttt 2220
 aactccctga ctaagaaca gcagcaggac gttattact gtaccttcac tcagaccatg 2280
 taa 2283

<210> 10

<211> 635

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 10

gggtcaactg gcgaaaaact ggctcaacgt ctatgttggg aacctgattg gttgcttact 60
 gtttgattg ctgatgtggc tttcaggcga atatatgact gccaacggtc aatggggact 120
 taacgttctg caaacgccg accacaaaat gcaccatact tttgtgaag ccgtgtgcct 180
 gggtatcctg gcaaacctga tggctgcct tgcggatgg atgagttact ccggccgtag 240
 cctgatggat aaagccatga ttatggttt accggtggca atgttgttg ccagcgggtt 300
 tgagcacagt atcgcaaca tgtttatgat cccgtgggt atcgttatcc gcgacttgc 360
 aagcccggaa ttctggaccg cagttgggtc aactccggaa agtttctctc acctgaccgt 420
 catgaacttc atactgata acctgattcc ggtaactatc gggaacatca tcggcggtgg 480
 tetgctggtt ggggtgacat actgggtcat ttacctgcgt ggcgacgacc atactaagg 540
 gttgtttcag gcagtaata aaaaatccac ttaagaaggt aggtgttaca tgccgagct 600
 taatgaaaag ttacagcagc aggacgttat tactc 635

<210> 11

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 11

atcggatccg ggtcaactgg cgaaaaactg gctcaacgt 39

<210> 12

<211> 46

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nhân tạo

<400> 12

gagtaataac gtcctgctgc tgtaactttt cattaagctc ggacat 46

<210> 13

<211> 669

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 13

atgtccgagc ttaatgaaaa gttacagcag caggacgtta ttactcgtac cttcactcag 60

accatgtaat ggtattgact gaaatcgtac agtaaaaagc gtacaataaa ggctccacgc 120

aagtggggcc ttttagcaa taccatcctg cccagctc tttgtctgc tgtctatact 180

ttatggataa cagccaaaac agactcgaca tagccttga gctgtgcac tacataggcc 240

ccggatgggc caaatcgga gatcacccg caatgtcaac aattggctgc attcactcct 300

ttgaatcctg tggcaccgct gatggcccgg ggaatcgctt taccacctc ttccagggt 360

gcctgatgcg ctgcctctat tgccacaacc gcgatactg ggataccac ggccggcaaag 420

agattaccgt tgaagagctg atgaaagagg tggtagccta tcgccacttt atgaacgctt 480

ccggcggcgg cgtgacggca tccggcggcg aggctatcct gcaggccgaa tttgttcgcg 540

actgggtccg cgctgtgaag aaagaaggta ttacatactg tctcgatacc aacggctttg 600

tgcgcgcgta cgatccgggt attgatgaac tgctggaggt caccgacctg gtgatgctcg 660

atctcaagc 669

<210> 14

<211> 46

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 14

atgtccgagc ttaatgaaaa gttacagcag caggacgtta ttactc 46

<210> 15

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 15

actgcggccg cgcttgagat cgagcatcac caggctcggtg a 41

<210> 16

<211> 1258

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 16

gggtcaactg gcaaaaaact ggctcaacgt ctatgttggg aacctgattg gttgcttact 60

gtttgtattg ctgatgtggc ttccaggcga atatatgact gccaacgggc aatggggact 120

taacgttctg caaacgccg accacaaaat gcaccatact tttgtgaag ccgtgtgcct 180

gggtatcctg gcaaacctga tggctgcct tgcggtatgg atgagttact ccggccgtag 240

cctgatggat aaagccatga ttatggttt accgggtggca atgtttgtg ccagcgggtt 300

tgagcacagt atcggaaca tgttatgat cccgctgggt atcgtatcc gcgactttgc 360

aagccccgaa ttctggaccg cagttgggtc aactccggaa agtttctctc acctgaccgt 420
 catgaacttc atcactgata acctgattcc ggtaactatc gggaacatca tcggcgggtg 480
 tctgtggtt ggggtgacat actgggtcat ttacctgcgt ggcgacgacc atcactaagg 540
 gttgtttcag gcagtaaata aaaaatccac ttaagaaggt aggtgttaca tgtccgagct 600
 taatgaaaag ttacagcagc aggacgttat tactcgtacc ttcactcaga ccatgtaatg 660
 gtattgactg aaatcgtaca gtaaaaagcg tacaataaag gctccacgca agtggggcct 720
 ttttagcaat atcactctgc cccagtctct tttgtctgct gtctatactt tatggataac 780
 agccaaaaca gactcgacat agcctttgag ctgtgcatct acataggccc cggatggggc 840
 aaattcggag atatcaccgc aatgtcaaca attggtcgca ttcactcett tgaatcctgt 900
 ggcaccgtcg atggcccggg gattcgcttt atcacttct tccagggtcg cctgatgcgc 960
 tgctctatt gccacaaccg cgatactgg gatacccacg gcggcaaaga gattaccgtt 1020
 gaagagctga tgaaagaggt ggtgacctat cgccacttta tgaacgcttc cggcggcggc 1080
 gtgacggcat ccggcggcga ggctatcctg caggccgaat ttgttcgca ctggttccgc 1140
 gcctgtaaga aagaaggtat tcatactgt ctgatacca acggctttgt gcgccgtac 1200
 gatccgggta ttgatgaact gctggaggtc accgacctgg tgatgctega tctcaagc 1258

<210> 17

<211> 780

<212> ADN

<213> Klebsiella oxytoca

<400> 17

atgaaccatt ctgctgaatg ctctgtgaa gagagcctgt gtgaaactct acgaggattt 60
 tccgcgaac atcccgatag cgctcatctac cagacctctc tgatgagcgc gctgttaagc 120
 ggcgtttatg aaggtataac gaccatcgcc gatttgctca cccacggcga ttccggcctc 180
 gggaccttta atgaactgga cggcgagctg atcgcttta gcagcgaagt ttaccagctg 240
 cgcgccgacg gcagcgcccc caaagcccgt atggaacage gtacgccgtt cgcggtgatg 300
 acctggttc agccgcagta tcgcaaacg ttcgataaac cggtcagccg tgaacaactg 360
 cagcacatca tcgaccagca aattccgtcg gacaatctgt tctgcgccct gcgtattaac 420
 ggccatttgc gccacgccc tacccgcacg gtaccgcgcc agacgccgcc ataccgggcg 480
 atgaccgacg tactcgacga ccagccggtt ttctgctca accagcgcgga ggggtgctctg 540
 gttgggttca gaacgccgca gcatatgcag ggcattaacg tggccggcta ccatgaacac 600
 ttcacaccg atgaccgcca gggcggcggc catctgctcg attatcagct cgaccacggc 660
 gttctgacct ttggcgagat ccacaaattg atgattgacc ttctgcccga tagcgcttc 720
 ctgcaggcgg atctgcatcc agacaatctt gatgccgcca ttcgtcagt cgaaaactaa 780

780

<210> 18

<211> 1680

<212> ADN

<213> Klebsiella oxytoca

<400> 18

gtggataatc aacatcaacc gcgccagtgg gcgcacggcg ccgacctcat cgtcagccag 60
 cttgagggcc aggggggtacg ccaggtgttc ggcattccgg gggccaaaat cgataaagtc 120
 ttgatctgc tgctcgactc ctccattcgc attatcccg tgccgccaga agccaacgcc 180
 gcctttatgg ccgcccggtt tggccgcac accggcaaag cgggcgtcgc gctggtcacg 240
 tccggaccgg gctgctctaa cctgattacc gggatggcaa cggccaatag cgaaggcgac 300
 ccggtggtgg cgtggtggcg cgcggtaaaa cgcgccgaca aggccaaaca ggtgcaccag 360
 agtatggata cggtagcatg gtttagcccg gtgaccaaat actcgggtgga agtcaccgcg 420
 ccggaagcgc tggcgggaag tgtctccaac gcgttctgt cagccgagca gggacgcccc 480
 ggcagcgctc tcgtcagct cccgcaggac gtggtcgacg ggccgggtcca cgccagggtt 540
 ctgcccgcgc gcgatgcgcc gcagaccggc gcggcgccgg acgacgccat tgcgcgagtc 600
 gcgaagatga ttgccggcgc gaaaaatccg atatttctgc tcggcctgat ggccagccag 660

acggaaaaca gcgcggcgct gcgcgaattg ctgaaaaaa gtcataccc ggtgaccagc 720
 acctatcagg ccgccggcgc agtcaatcag gatcacttta cccgcttcgc cggacgggtt 780
 ggtctgttca acaaccaggc aggggatcga ctctgcac tcgccgacct ggtcatctgc 840
 atcggtata gtccggtgga gtacgagccg gccatgtgga ataacggtaa cggcacgctg 900
 gtacatacgc acgtgctgcc cgcttacgaa gagcgtaatt ataccccgga cgtcgagctg 960
 gtcggcaata tcgccgccac cctgaacaaa ctgtctcaac gcatcgacca ccagctggtg 1020
 ctctcgccgc agggcccgga gatccttgc gaccgccagc atcagcggga gctcctcgac 1080
 cggcgcggtg cgcacctgaa ccagtccgc ctctacccgc tgcgcatcgt tcgcgccatg 1140
 caggacatcg tcaatagcga tgcaccctg accgtcgata tggggagctt tcatacttg 1200
 atcgcccgct atctctacag ctctcgccgc cgtcagggtc tgattccaa cggtaacag 1260
 accatgggcg tggcgctgcc gtggcgatg ggcgcctggc tggtaatcc gcagcgcaaa 1320
 gtggttccg ttccggcgga cggcggttgc ctgcagtcga gcatggagct ggagaccgct 1380
 gtacggctga aagcgaaagt cctgcatac atctgggtcg ataacggcta caaatggtg 1440
 gcgattcagg aggagaaaaa ataccagcgg ctctccggcg ttgagtcgg cccggtggat 1500
 tttaaagtct acgccgaagc ctccggcgcc aaagggttgc cggtagagag cggcgaagcc 1560
 ctgagccga cgtcgcgggc ggcgatggac gtcgacggcc ccgccgtcgt agccatcccc 1620
 gtggattacc gcgataccc gctgctgatg ggccagctcc atctcagtc actacttga 1680
 1680

<210> 19

<211> 771

<212> ADN

<213> Klebsiella oxytoca

<400> 19

atgaaaaaag tcgcactcgt caccggcgcg ggccagggtg tcggtaaagc tatcgccctt 60
 cgtctggtga aagatggtt tgccgtggt atcgccgatt ataacgacgc caccgcgcag 120
 gcggtcgtg atgaaattaa ccgcagcggc ggccggggcg tagcggtgaa ggtggatgtg 180
 tctcaacgcg atcaggttt tgccgccgc gaacaggcgc gcaagggtct cggcggtttt 240
 gacgtgatcg tcaacaacgc cggggttgc cctccacac caatcgaaga gattcgcgag 300
 gaggtgatcg ataaagtcta caatatcaac gttaaaggcg ttatctgggg catccaggcc 360
 gcggtagagg cgttataaaa agagggccac ggccggcaaaa ttatcaacgc ctgtcccgag 420
 gcgggccatg taggtaaccc ggagctggcg gtctatagct ccagtaaatt tgccgtgcgc 480
 ggctgacgc aaaccgccgc ccgcgatctg gcgcatctgg ggattaccgt aaacggctac 540
 tgccgggga tcgtcaaaac ccaatgtgg gcggaaattg accgccaggt ttccgaagcg 600
 gcgggtaaac cgtgggcta cggaaaccag gattcgcca aacgcattac cttggggcg 660
 ctatccgagc cggaaagcgt cgcagcctgc gtctctatc tcgccgtcc ggactccaat 720
 tatatgaccg gcaatcgt gctgatgat ggccgcatgg tatttaacta a 771

<210> 20

<211> 873

<212> ADN

<213> Klebsiella oxytoca

<400> 20

atggaacttc gttatctgcg ctacttcgt gccgtgcgc aggcgcggca ctactactaa 60
 gcggcaaaag aacttggtat ctcccagcca ccgctaagtc agcaaattca acggcttgaa 120
 agagaaattg gcacaccgct ttccgccga ttaacgcggg gcgtcgagct gacggaagcg 180
 ggggagtcgt ttatgagga tgcctgccag attctggcgt taagcgacgc ggcgtggaa 240
 aaaaccaagg gaattgccc cgggctgaac ggtcggtct cgtgggcat taccagctct 300
 gatgctttc atccgcaat cttagcctg ttacagcagt ttcagcagag ttatccgggg 360
 gtgacgtgc atcaggtcga aggcaatat gcgacgtga tggggcgct tggcgaagcg 420
 gagctggata ttgctttgt acgctgccc tgcgagagca gtaaagcgt caatctgcg 480
 attatcgatc aagaaccgat ggtgattgcc ctggcgctt cgcaccgct atcgccac 540

cgcgagctga cgctggagca actgacggac gtggcgccga ttctttccc gcgtgaagtg 600
gcccctggcc tgtatgagct ggtgttcaac agctatctgc gcgccggtgt tgacgtgcag 660
cgagcctatc agtcacgca aatatcatcg tcgtcagca tggaggagge tggttcggc 720
ttgcgctgg tgccgcagtc gatgacctgc atcacgtcc ccaacgtgag ctatccccg 780
ctgatgggta caccgtgaa aaccgatatc gctatgcct ggcggcgcta cgagcgctcg 840
cgcacgggta agcgtttct ggccatgtt taa 873