



(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)



1-0031922

(51)⁷ C07K 14/245; C12N 15/70; C12P 13/06; (13) B
C12N 1/20

(21) 1-2017-04882

(22) 02/06/2016

(86) PCT/EP2016/062457 02/06/2016

(87) WO 2016/193351 08/12/2016

(30) 62/171,036 04/06/2015 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 27/08/2018 365A

(73) BASF SE (DE)

Carl-Bosch-Strasse 38, 67056 Ludwigshafen am Rhein, Germany

(72) WANG, Qingzhao (US); RATANI, Shakir Siraj (US); GUO, Zheyuan (US);
SCHROEDER, Hartwig (DE); HARTMANN, Holger (DE); POMPEJUS, Markus
(DE).

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

(54) VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP CÓ HIỆU SUẤT VÀ/HOẶC NĂNG SUẤT ALANIN
CAO TRONG QUY TRÌNH SẢN XUẤT LÊN MEN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN
XUẤT PYRUVAT, SUXINAT, ASPARTAT, MALAT, LACTAT, VALIN,
LEUXIN VÀ/HOẶC ALANIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật tái tổ hợp, và phương pháp sản xuất pyruvat, suxinat,
aspartat, malat, lactat, valin, leuxin và/hoặc alanin sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic tái tổ hợp, vi sinh vật tái tổ hợp, đến phương pháp sản xuất pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin, leuxin và/hoặc alanin và đến việc sử dụng phân tử axit nucleic tái tổ hợp hoặc vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất lên men pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin, leuxin và/hoặc alanin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit amin là các hợp chất hữu cơ có nhóm carboxy và nhóm amin. Các axit amin quan trọng nhất là các alpha-axit amin trong đó nhóm amin nằm ngay bên cạnh nhóm carboxy. Các protein được dựa trên các alpha-axit amin.

Alanin thu hút sự quan tâm đặc biệt vì nó được sử dụng làm chất phụ gia trong các ngành công nghiệp thực phẩm, thức ăn gia súc và dược phẩm. Ngoài ra, alanin còn là nguyên liệu thô để sản xuất quy mô công nghiệp đối với alanin, N,N-bis(carboxymetyl)-, muối trinati (MGDA, tên thương mại Trilon M) là chất chelat hóa mạnh, có tính chất hòa tan ở mức độ hữu cơ và vô cơ rất tốt (WO94/29421, WO2012/150155). Các loại trilon M dễ bị phân hủy sinh học theo các thử nghiệm OECD chuẩn. Do có đặc trưng về mặt sinh thái học và độc tố nổi trội, các loại Trilon M đặc biệt thích hợp để sử dụng cho các sản phẩm cho người tiêu dùng sau cùng và nhu cầu về các chất tạo phức có khả năng phân hủy sinh học như vậy đang tăng dần.

Alanin có thể được sản xuất bằng cách lên men bằng vi khuẩn Coryneform (Hermann, 2003: Industrial production of amino acids by Coryneform bacteria, J. of Biotechnol, 104, 155- 172.) hoặc *E. coli* (WO2007/120198, WO2008/119009).

Gần đây, được mô tả rằng sự biểu hiện quá của gen ygaW giúp cải thiện quá trình sản xuất lên men alanin của vi sinh vật (WO2012/172822).

Việc sản xuất alanin ở *E. coli* cho hiệu quả cao hơn và được sử dụng rộng rãi

trong sản xuất alanin quy mô công nghiệp làm nguyên liệu thô trong ngành công nghiệp hóa chất. Do nhu cầu về alanin trong công nghiệp hóa chất đang ngày một tăng, vẫn cần có phương pháp để cải thiện năng suất của quy trình sản xuất lên men alanin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật có thể được sử dụng trong sản xuất lên men alanin với hiệu suất và tính hiệu quả cao.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất vi sinh vật tái tổ hợp thuộc họ *Escherichia coli* (*E. coli*) có, so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng, ít nhất một trong số i) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* và/hoặc ii) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc iii) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc iv) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc v) hoạt tính thay đổi của gen *lpxD*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình xác nhận sự tách dòng sau khi bất hoạt gen *ackA-pta*.

A: đơn vị siêu sao chép PCR thu được từ ADN bộ gen của *E. coli* W Δ *ackA-pta::FRT* với các đoạn mồi P395-*ackA-pta-check2* và P395-*ackA-pta-check5* (338 bp). M: gen đánh dấu kích thước ADN. B: Đọc trình tự đơn vị siêu sao chép PCR với P395-*ackA-pta-check2* và P395-*ackA-pta-check5* xác nhận sự biến đổi chính xác cặp bazơ của ổ gen *ackA-pta*. Các nucleotit được xác nhận bằng cách đọc trình tự được thể hiện bởi các chữ in nghiêng. Vị trí FRT còn lại được thể hiện bằng màu xanh lục, vị trí liên kết đoạn mồi kẹp sườn được thể hiện bằng màu đỏ. Chữ hoa: trình tự mã hóa. Chữ thường: vùng giữa các gen.

Fig. 2 là hình xác nhận sự tách dòng sau khi bất hoạt gen *adhE*.

A: đơn vị siêu sao chép PCR thu được từ ADN bộ gen của *E. coli* W Δ *ackA-pta::FRT* Δ *adhE::FRT* với các đoạn mồi P395—*adhE-check2* và P395-*adhE-check5* (569 bp). M: gen đánh dấu kích thước ADN. B: Đọc trình tự đơn vị siêu sao chép PCR với P395-*adhE-check2* và P395-*adhE-check5* xác nhận sự biến đổi chính xác cặp bazơ

của ô gen *adhE*. Các nucleotit được xác nhận bằng cách đọc trình tự được thể hiện bởi các chữ in nghiêng. Vị trí FRT còn lại được thể hiện bằng màu xanh lục, vị trí liên kết đoạn mỗi kẹp sườn được thể hiện bằng màu đỏ. Chữ hoa: trình tự mã hóa. Chữ thường: vùng giữa các gen.

Fig. 3 là hình xác nhận sự tách dòng sau khi bất hoạt gen *frdABCD*.

A: đơn vị siêu sao chép PCR thu được từ ADN bộ gen của *E. coli* W Δ ackA-pta::FRT Δ adhE::FRT Δ frdABCD::FRT với các đoạn mồi P395-frd-check1 và P395-frd-check4 (797 bp). M: gen đánh dấu kích thước ADN. B: Đọc trình tự đơn vị siêu sao chép PCR với P395-frd-check1 và P395-frd-check4 xác nhận sự biến đổi chính xác cặp bazơ của ô gen *frd*. Các nucleotit được xác nhận bằng cách đọc trình tự được thể hiện ở các chữ in nghiêng. Vị trí FRT còn lại được thể hiện bằng màu xanh lục, vị trí liên kết đoạn mỗi kẹp sườn được thể hiện bằng màu đỏ. Chữ hoa: trình tự mã hóa. Chữ thường: vùng giữa các gen.

Fig. 4 là hình xác nhận sự tách dòng sau khi bất hoạt gen *pflB*.

A: đơn vị siêu sao chép PCR thu được từ ADN bộ gen của *E. coli* W Δ ackA-pta::FRT Δ adhE::FRT Δ frdABCD::FRT Δ pflB::FRT với các đoạn mồi P395-pflB-check1 và P395-pflB-check3 (511 bp). M: gen đánh dấu kích thước ADN. B: Đọc trình tự đơn vị siêu sao chép PCR với P395-pflB-check1 và P395-pflB-check3 xác nhận sự biến đổi chính xác cặp bazơ của ô gen *pflB*. Các nucleotit được xác nhận bằng cách đọc trình tự được thể hiện ở các chữ in nghiêng. Vị trí FRT còn lại được thể hiện bằng màu xanh lục, vị trí liên kết đoạn mỗi kẹp sườn được thể hiện bằng màu đỏ. Chữ hoa: trình tự mã hóa. Chữ thường: vùng giữa các gen.

Fig. 5 là hình xác nhận sự tách dòng sau khi kết hợp gen *alaD-gstear*.

A: đơn vị siêu sao chép PCR thu được từ ADN bộ gen của *E. coli* W Δ ackA-pta::FRT Δ adhE::FRT Δ frdABCD::FRT Δ pflB::FRT Δ ldhA::alaD-gstear với các đoạn mồi P395-ldhA-check1 và P395-ldhA-check2 (1833 bp). M: gen đánh dấu kích thước ADN. B: Đọc trình tự đơn vị siêu sao chép PCR với P395-ldhA-check1 và P395-ldhA-check2 xác nhận sự biến đổi chính xác cặp bazơ của ô gen *ldhA* và sự kết hợp của *alaD-gstear*. Các nucleotit được xác nhận bằng cách đọc trình tự được thể hiện ở các chữ in nghiêng. *AlaD-gstear* ORF được thể hiện bằng màu xanh lơ, vị trí liên kết đoạn mỗi kẹp sườn được thể hiện bằng màu đỏ. Chữ hoa: trình tự mã hóa. Chữ

thường: vùng giữa các gen.

Fig. 6 là hình thể hiện sơ đồ chuyển hóa của quá trình tổng hợp alanin trong vi sinh vật theo sáng chế

Ngôi sao màu đỏ mô tả sự bất hoạt hoạt tính enzym

Mũi tên màu xanh lục mô tả hoạt tính enzym được đưa vào

J7 biểu thị ldh - lactat dehydrogenaza, KO làm giảm sản xuất lactat.

J6 biểu thị frdABCD - fumarat reductaza, KO làm giảm sản xuất suxinat.

J8 biểu thị pfl – pyruvat format lyaza, KO làm giảm sản xuất axetat và etanol.

J10 biểu thị ack-pta - phosphotransaxetylaza-axetat kinaza, KO làm giảm sản xuất axetat.

J11 biểu thị adhE- dehydrogenaza rượu, KO làm giảm sản xuất etanol.

Fig. 7 là hình thể hiện sự tạo thành alanin trong quá trình lên men theo mẻ của *E. coli* QZ20 và *E. coli* QZ48 (ArgP A96E) trong 500mL môi trường AM 1 với 140g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Fig. 8 là hình thể hiện năng suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thể tích thiết bị phản ứng và cho thời gian, của *E. coli* QZ20 và QZ48 (ArgP A96E) sau 46 giờ lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon.

Fig. 9 là hình thể hiện sự tạo thành alanin trong quá trình lên men theo mẻ của *E. coli* QZ20/pACYC184 plasmit điều khiển và *E. coli* QZ20/pACYC184-argP trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Fig. 10 là hình thể hiện năng suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thiết bị phản ứng thể tích và cho thời gian, của *E. coli* QZ20/pACYC184 plasmit điều khiển và *E. coli* QZ20/pACYC184-argP sau 20 giờ lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon.

Fig. 11 là hình thể hiện sự tạo thành alanin trong quá trình lên men của *E. coli* QZ20

và *E. coli* QZ58 (gcvA/B trình tự khởi đầu SNP) trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Fig. 12 là hình thể hiện năng suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thiết bị phản ứng thể tích và cho thời gian, của *E. coli* QZ20 và QZ58 (trình tự khởi đầu gcvA/B SNP) sau 46 giờ lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon.

Fig. 13 là hình thể hiện sự tạo thành alanin trong quá trình lên men của *E. coli* QZ48 (ArgP A96E) và *E. coli* QZ66 (Arg A96E, trình tự khởi đầu gcvA/B SNP) trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Fig. 14 là hình thể hiện năng suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thiết bị phản ứng thể tích và cho thời gian, của *E. coli* QZ48 (ArgP A96E) và *E. coli* QZ66 (ArgP A96E, trình tự khởi đầu gcvA/B SNP) sau 46 giờ lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon.

Fig. 15 là hình thể hiện kết quả phân tích sự phiên mã gen tương đối của (A) gcvA và (B) gcvB trong *E. coli* QZ20 và QZ23 ở các thời điểm 8 giờ, 11 giờ và 28 giờ trong quá trình lên men theo mẻ so với *E. coli* QZ20 8 giờ. Tất cả các dữ liệu thu được từ qPCR được chuẩn hóa so với gen rrsA dùng làm tham chiếu.

Fig. 16 là hình thể hiện sự tạo thành alanin trong quá trình lên men của *E. coli* QZ20/pACYC184 plasmit điều khiển, *E. coli* QZ20/pACYC184-gcvA và *E. coli* QZ20/pACYC184-gcvB trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Fig. 17 là hình thể hiện năng suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thiết bị phản ứng thể tích và cho thời gian, của *E. coli* QZ20 với plasmit điều khiển pACYC184, pACYC184-gcvA và pACYC184-gcvB sau 46 giờ lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon.

Fig. 18 là hình thể hiện sự tạo thành alanin trong quá trình lên men của *E. coli* QZ20 và *E. coli* QZ71 (bất hoạt *gcvB*) trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Fig. 19 là hình thể hiện năng suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thiết bị phản ứng thể tích và cho thời gian, của *E. coli* QZ20 và *E. coli* QZ71 (bất hoạt *gcvB*) sau 46 giờ lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon.

Fig. 20 là hình thể hiện sự tạo thành alanin trong quá trình lên men của *E. coli* QZ20, *E. coli* QZ57 (brnQΔ667-764) và *E. coli* QZ69 (brnQ KO) trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Fig. 21 là hình thể hiện năng suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thiết bị phản ứng thể tích và cho thời gian, của *E. coli* QZ20, *E. coli* QZ57 (brnQΔ667-764) và *E. coli* QZ69 (brnQ KO) sau 46 giờ lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon.

Fig. 22 là hình thể hiện sự tạo thành alanin trong quá trình lên men của *E. coli* QZ20 và *E. coli* QZ56 (LpxD A15T) trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Fig. 23 là hình thể hiện năng suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thiết bị phản ứng thể tích và cho thời gian, của *E. coli* QZ20 và QZ56 (LpxD A15T) sau 46 giờ lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon.

Fig. 24 là hình thể hiện sự tạo thành alanin trong quá trình lên men của *E. coli* QZ68 (argP A96E, trình tự khởi đầu *gcvA/B* SNP, brnQΔ667-764) và *E. coli* QZ70 (argP A96E, trình tự khởi đầu *gcvA/B* SNP, brnQΔ667-764, lpxD A15T) trong 500 mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Fig. 25 là hình thể hiện năng suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thiết bị phản ứng thể tích và cho thời gian, của *E. coli* QZ68 (argP A96E, trình tự khởi đầu gcvA/B SNP, brnQΔ667-764) và *E. coli* QZ70 (argP A96E, trình tự khởi đầu gcvA/B SNP, brnQΔ667-764, lpxD A15T) sau 46 giờ lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon.

Fig. 26 là hình thể hiện lượng dư đồng phân đối quang của các mẫu alanin được lấy từ *E. coli* chủng QZ30 và *E. coli* chủng QZ23 ở nhiều thời điểm khác nhau trong quá trình lên men theo mẻ trong 500mL môi trường AM 1 với 140 g/L glucoza làm nguồn cacbon. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH = 6,8 với NH₄OH 5N không có sục khí.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ”, nghĩa là mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ đáng kể và còn bao gồm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính không phát hiện được của các enzym tương ứng.

Thuật ngữ “cao hơn”, “tăng” hoặc “được tăng cường”, ví dụ liên quan đến mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym hoặc đến hiệu suất hoặc năng suất, nghĩa là mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính hoặc hiệu suất hoặc hiệu suất cao hơn, được tăng hoặc được tăng cường đáng kể.

Thuật ngữ mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym “được thay đổi” nghĩa là mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym trong vi sinh vật tái tổ hợp khác đáng kể so với mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym tương ứng trong vi sinh vật không tái tổ hợp, kiểu dại.

Bất ngờ là, đã tìm ra rằng vi sinh vật có ít nhất một trong số i) mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen brnQ bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc ii) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen argP được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc iii) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen gcvA được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc iv) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen gcvB bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc v) hoạt tính của gen lpxD được thay đổi có hiệu suất và/hoặc năng suất alanin cao hơn

trong quá trình sản xuất lên men khi so với cùng vi sinh vật không có mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *brnQ* tương ứng bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* được thay đổi.

Do đó, một phương án của sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp có, so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng, ít nhất một trong số i) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc ii) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc iii) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc iv) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc v) hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi và có hiệu suất và/hoặc năng suất alanin cao hơn trong quá trình sản xuất lên men so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Thuật ngữ “vi sinh vật tham chiếu” như được sử dụng trong bản mô tả nghĩa là vi sinh vật đối chứng dùng để so sánh với vi sinh vật tái tổ hợp. Vi sinh vật tham chiếu này về cơ bản có cùng kiểu gen với vi sinh vật tái tổ hợp ngoại trừ sự khác biệt cần được phân tích. Tốt hơn là, vi sinh vật tham chiếu là chủng từ đó vi sinh vật tái tổ hợp được tạo ra. Ví dụ, gen được đưa vào vi sinh vật kiểu đại, từ đó tạo ra vi sinh vật tái tổ hợp, khi đó vi sinh vật kiểu đại này sẽ là vi sinh vật tham chiếu thích hợp cho vi sinh vật tái tổ hợp. Cũng có thể đưa một đột biến khác vào vi sinh vật tái tổ hợp A, từ đó tạo ra vi sinh vật tái tổ hợp B. Vi sinh vật tái tổ hợp A khi đó sẽ là vi sinh vật tham chiếu thích hợp cho vi sinh vật tái tổ hợp B. Trong trường hợp này, đặc tính của vi sinh vật tái tổ hợp và vi sinh vật tham chiếu tương ứng sẽ được so sánh cả hai vi sinh vật được cho phát triển ở các điều kiện về cơ bản là giống nhau.

Đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, rõ ràng là vi sinh vật có hiệu suất và/hoặc năng suất alanin tăng cũng có thể được sử dụng để sản

xuất các chất chuyển hóa khác có quan hệ gần gũi với alanin, ví dụ chất chuyển hóa là các hợp chất trung gian trong con đường alanin, có chung các hợp chất trung gian thông thường với con đường alanin hoặc là các chất chuyển hóa sử dụng alanin làm hợp chất trung gian trong con đường của chúng. Vi sinh vật theo sáng chế cũng có thể dễ dàng được làm cho thích hợp để có hiệu suất và/hoặc năng suất của các chất chuyển hóa liên quan này được tăng bằng cách tăng hoặc đưa vào các hoạt tính enzym nhất định hoặc bằng cách làm bất hoạt hoặc làm giảm hoạt tính của enzym nhất định.

Các chất chuyển hóa này là, ví dụ pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và leuxin.

Ví dụ, để sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế để sản xuất suxinat, các gen *ldh*, *pfl*, *pta* và *adhE* phải bị bất hoạt và gen PEP carboxylaza và/hoặc gen pyruvat carboxylaza phải được đưa vào trong bộ gen của vi sinh vật theo sáng chế. Con đường tương ứng và các đột biến cần thiết được mô tả, ví dụ trong tài liệu Zhang et al. (2009), PNAS (106) pp20180-20185.

Do đó, phương án khác của sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp có, so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng, ít nhất một trong số i) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc ii) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc iii) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc iv) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa phi protein mã hóa ARN bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc v) hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi và có hiệu suất và/hoặc năng suất pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin cao hơn trong quá trình sản xuất lên men so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Theo một số phương án, vi sinh vật là tế bào không nhân hoặc tế bào nấm men. Tế bào không nhân thích hợp bao gồm tế bào vi khuẩn Gram dương, Gram âm và Gram biến đổi, tốt hơn nếu là tế bào Gram âm.

Do đó, vi sinh vật mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng

không giới hạn ở, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperdae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*, *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantium*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Micrococcus* sp. CCM825, *Morganella morganii*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovolans*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus* sp. ATCC 15592, *Rhodococcus* sp. ATCC 19070, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio tyrogenes*, *Actinomadura madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flavelus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmulleri*, *Xanthomonas citri* và v.v..

Theo một số phương án, vi sinh vật là tế bào nhân chuẩn. Tế bào nhân chuẩn thích hợp bao gồm tế bào nấm men, ví dụ *Saccharomyces spec*, như *Saccharomyces*

cerevisiae, *Hansenula* spec, như *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces* spec, như *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* spec, như *Kluyveromyces lactis* và *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia* spec, như *Yarrowia lipolytica*, *Pichia* spec, như *Pichia methanolica*, *Pichia stipites* và *Pichia pastoris*, *Zygosaccharomyces* spec, như *Zygosaccharomyces rouxii* và *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida* spec, như *Candida boidinii*, *Candida utilis*, *Candida freyschussii*, *Candida glabrata* và *Candida sonorensis*, *Schwanniomyces* spec, như *Schwanniomyces occidentalis*, *Arxula* spec, như *Arxula adenivorans*, *Ogataea* spec như *Ogataea minuta*, *Klebsiella* spec, như *Klebsiella pneumonia*.

Nhiều chủng vi khuẩn công nghiệp đặc biệt thích hợp để sử dụng trong phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả. Theo một số phương án, vi sinh vật là loài thuộc chi *Corynebacterium*, ví dụ *C. acetophilum*, *C. glutamicum*, *C. callunae*, *C. acetoacidophilum*, *C. aceto-glutamicum*. Theo một số phương án, vi sinh vật là loài thuộc chi *Bacillus*, ví dụ, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. lentils*, *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. lautus*, *B.coagulans*, *B. brevis*, *B. firmus*, *B. alkaophilus*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. stearothermophilus*, *B. halodurans*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, và *B. amyloliquefaciens*. Theo một số phương án, vi sinh vật là loài thuộc chi *Erwinia*, ví dụ, *E. uredovora*, *E. carotovora*, *E. ananas*, *E. herbicola*, *E. punctata* và *E. terreus*. Theo một số phương án, vi sinh vật là loài thuộc chi *Escherichia*, ví dụ, *E. coli*. Theo phương án khác, vi sinh vật là loài thuộc chi *Pantoea*, ví dụ, *P. citrea* hoặc *P. agglomerans*. Vẫn theo phương án khác, vi sinh vật là loài thuộc chi *Streptomyces*, ví dụ, *S. ambofaciens*, *S. achromogens*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *S. aureofaciens*, *S. aureus*, *S. fungicidicus*, *S. griseus* hoặc *S. lividans*. Theo phương án khác nữa, vi sinh vật là loài thuộc chi *Zymomonas*, ví dụ, *Z. mobilis* hoặc *Z. lipolytica*. Theo phương án khác nữa, vi sinh vật là loài thuộc chi *Rhodococcus*, ví dụ *R. opacus*.

Tốt hơn là, vi sinh vật được chọn từ họ *Enterobacteriaceae*, tốt hơn là thuộc chi *Escherichia*, ví dụ *Escherichia coli* (*E. coli*), tốt hơn nếu là chủng *E. coli* W, tương ứng với DSMZ 1116, tương ứng với ATCC9637.

Ngoài hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng

cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn có (a) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *pflB* mã hóa pyruvat format lyaza I bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó sự giảm, ức chế hoặc xóa bỏ hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *pflB* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Ngoài hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa phi protein mã hóa ARN bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn có thể có (b) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *adhE* mã hóa ancol dehydrogenaza/pyruvat-format lyaza deactivaza phụ thuộc vào axetaldehyt-CoA dehydrogenaza hai chức/sắt) bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó sự giảm, ức chế hoặc xóa bỏ hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *adhE* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Ngoài hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển mạch nhánh axit amin bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp

theo sáng chế còn có thể có (c) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ldhA* mã hóa D-lactat dehydrogenaza lên men phụ thuộc NAD bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó sự giảm, ức chế hoặc xóa bỏ hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ldhA* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Ngoài việc có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn có thể có (d) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *pta* mã hóa phosphat axetyltransferaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó sự giảm, ức chế hoặc xóa bỏ hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *pta* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Ngoài việc có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn có thể có (e) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ackA* mã hóa axetat kinaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó sự giảm, ức chế hoặc xóa bỏ hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ackA* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Ngoài việc có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị

xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn có thể có (f) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *frdA* mã hóa fumarat reductaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó sự giảm, ức chế hoặc xóa bỏ hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *frdA* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Ngoài việc có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có axit amin mạch nhánh hoạt tính chất vận chuyển bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn có thể có (g) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *alaD* mã hóa alanin dehydrogenaza được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, trong đó sự tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *alaD* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Ngoài việc có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có axit amin mạch nhánh hoạt tính chất vận chuyển bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa *argP* protein có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc được đưa vào, hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-

hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn có thể có (h) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *dadX* mã hóa alanin racemaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó sự giảm, ức chế hoặc xóa bỏ hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *dadX* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Ngoài việc có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn có thể có (i) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ygaW* mã hóa chất vận chuyển alanin được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, trong đó sự tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ygaW* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng như được mô tả trong WO2012/172822 và PCT/IB2014/064426, tài liệu thứ hai được kết hợp vào bằng cách viện dẫn.

Ngoài việc có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn có thể có (j) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *zipA* mã hóa protein phân chia tế bào liên quan đến cụm vòng Z được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, trong đó sự tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *zipA* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng như được

mô tả trong PCT/IB2014/064426 được kết hợp vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Ngoài việc có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế còn có thể có (k) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *lpd* mã hóa lipoprotein dehydrogenaza được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, trong đó sự tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *lpd* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng như được mô tả trong PCT/IB2014/064426.

Tốt hơn là, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có ít nhất một trong số hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi còn có ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất bốn, còn tốt hơn nữa là ít nhất năm, còn tốt hơn nữa là ít nhất sáu, còn tốt hơn nữa là ít nhất bảy, còn tốt hơn nữa là ít nhất tám, tốt nhất là tất cả các dấu hiệu được chọn từ nhóm gồm:

- (a) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *pflB* mã hóa pyruvat format lyaza I bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, và
- (b) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *adhE* mã hóa alcohol dehydrogena-

za/pyruvat-format lyaza deactivaza) phụ thuộc vào axetaldehyt-CoA dehydrogenaza hai chức/sắt bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, và

- (c) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ldhA* mã hóa D-lactat dehydrogenaza lên men phụ thuộc NAD bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, và
- (d) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *pta* mã hóa phosphat axetyltransferaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, và
- (e) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ackA* mã hóa axetat kinaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, và
- (f) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *frdA* mã hóa fumarat reductaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, và
- (g) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *alaD* mã hóa alanin dehydrogenaza được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường,
- (h) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *dadX* mã hóa alanin reductaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, và
- (i) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ygaW* mã hóa chất vận chuyển alanin được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, và
- (j) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *zipA* mã hóa protein phân chia tế bào liên quan đến cụm vòng Z được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, và
- (k) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *lpd* mã hóa lipoamit dehydrogenaza được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường,

trong đó sự giảm, ức chế, xóa bỏ, tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Gen *alaD* có thể thu được từ sinh vật bất kỳ hoặc có thể là gen tổng hợp được thiết kế bởi con người, ví dụ có cách dùng codon được tối ưu hóa để biểu hiện trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế hoặc được tối ưu hóa cho hoạt tính enzym, ví dụ có V_{max} hoặc K_m được cải thiện. Tốt hơn là, gen *alaD* thu được từ vi sinh vật của một trong số các chi *Bacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Halobacillus*, *Brevibacillus*. Theo phương án được ưu tiên, gen *alaD* thu được từ vi sinh vật của chi *Geobacillus*.

Theo phương án được ưu tiên nhất, gen *alaD* thu được từ *Geobacillus stearothermophilus*.

Theo một phương án được ưu tiên, gen *alaD* được tối ưu hóa codon để biểu hiện trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế.

Vi sinh vật theo sáng chế còn có thể chứa các biến đổi gen, như các đột biến, bất hoạt gen hoặc hoạt tính enzym được tăng cường hoặc được đưa vào để làm cải thiện thêm hiệu suất và/hoặc năng suất của alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn nếu là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin.

Theo phương án khác nữa, gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc
- (iii) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 1 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc
- (v) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (ii), (iii) hoặc (v) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 2, và

trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Theo một ví dụ, gen brnQ mã hóa protein brnQ có hoạt tính chất vận chuyển axit amin mạch nhánh có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3, mã hóa protein có SEQ ID NO: 4.

Theo phương án khác nữa, gen argP mã hóa protein argP có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã với hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 45, hoặc
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 45, hoặc
- (iii) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 45 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 46, hoặc
- (v) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60% tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 46,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (ii), (iii) hoặc (v) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 46, và

trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Theo một ví dụ, gen argP mã hóa protein argP có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã với hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, có trình tự được nêu

trong SEQ ID NO: 47, mã hóa protein có SEQ ID NO: 48.

Theo phương án khác nữa, gen gcvA mã hóa protein liên kết ADN có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 53, hoặc
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 53, hoặc
- (iii) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 53 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 54, hoặc
- (v) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 54,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (ii), (iii) hoặc (v) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 54, và

trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Theo phương án khác nữa, gen gcvB mã hóa ARN mã hóa phi protein có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 58, hoặc
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất

97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 58, hoặc

- (iii) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 58 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

trong đó hoặc phi protein mã hóa ARN được mã hóa bởi (ii), (iii) hoặc (v) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như hoặc ARN mã hóa phi protein có SEQ ID NO: 58, và

trong đó vi sinh vật chứa gen đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Theo phương án khác nữa, gen lpxD mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-acyltransferaza có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện được thay đổi trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 49, hoặc
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 49, hoặc
- (iii) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 49 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 50, hoặc
- (v) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 50, và

trong đó codon của các gen từ (i) đến (v) tương ứng với vị trí 43 đến 45 của SEQ ID NO: 49 không mã hóa axit amin alanin và không phải là codon kết thúc hoặc axit amin của protein được mã hóa bởi các gen từ (i) đến (v) tương ứng với vị trí 15 của

SEQ ID NO: 50 không phải là alanin, và

trong đó protein được mã hóa bởi gen như được xác định ở trên trong mục từ (1) đến (5) có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện thay đổi so với protein có SEQ ID NO: 50, và

trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Theo một ví dụ, gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế được thay đổi, có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 51, mã hóa protein có SEQ ID NO: 52.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có ít nhất một trong số hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* mã hóa protein *argP* có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa phi protein bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ và/hoặc hoạt tính của gen *lpxD* mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyltransferaza được thay đổi có thể còn có một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc tất cả các dấu hiệu như được xác định từ (a) đến (k) ở trên,

trong đó gen *pflB* được chọn từ nhóm gồm:

- (A) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 5, hoặc
- (B) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 5, hoặc
- (C) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 5 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(D) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 6, hoặc

(E) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 6,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (B), (C) hoặc (E) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 6, và

trong đó gen adhE được chọn từ nhóm gồm:

(F) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 7, hoặc

(G) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 7, hoặc

(H) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 7 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(I) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 8, hoặc

(J) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 8,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (G), (H) hoặc (J) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 8, và

trong đó gen ldhA được chọn từ nhóm gồm:

(K) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc

- (L) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc
- (M) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 9 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (N) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 10, hoặc
- (O) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 10, trong đó polypeptit được mã hóa bởi (L), (M) hoặc (O) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 10, và trong đó gen pta được chọn từ nhóm gồm:
- (P) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 11, hoặc
- (Q) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 11, hoặc
- (R) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 11 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (S) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 12, hoặc
- (T) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 12,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (Q), (R) hoặc (T) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 12, và

trong đó gen ackA được chọn từ nhóm gồm:

- (U) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 120, hoặc
- (V) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 120, hoặc
- (W) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 120 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (X) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 121, hoặc
- (Y) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 121,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (V), (W) hoặc (Y) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 121, và

trong đó gen frdA được chọn từ nhóm gồm:

- (Z) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 13, hoặc
- (AA) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 13, hoặc
- (BB) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 13 ở điều kiện

nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(CC) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 14, hoặc

(DD) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 14,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (AA), (BB) hoặc (DD) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 14, và

trong đó gen alaD được chọn từ nhóm gồm:

(EE) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 15, hoặc

(FF) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 15, hoặc

(GG) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 15 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(HH) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 16, hoặc

(II) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 16,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (FF), (GG) hoặc (II) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 16, và

trong đó gen dadX được chọn từ nhóm gồm:

(JJ) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 118, hoặc

(KK) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 118, hoặc

(LL) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 118 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(MM) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 119, hoặc

(NN) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 119,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (KK), (LL) hoặc (NN) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 119, và

trong đó gen ygaW được chọn từ nhóm gồm:

(OO) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 109, hoặc

(PP) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 109, hoặc

(QQ) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 109 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(RR) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 110, hoặc

(SS) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là

ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 110,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (PP), (QQ) hoặc (SS) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 110, và

trong đó gen zipA được chọn từ nhóm gồm:

(TT) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 111, hoặc

(UU) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 111, hoặc

(VV) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 111 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(WW) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 112, hoặc

(XX) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 112,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (UU), (VV) hoặc (XX) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 112, và

trong đó gen lpd được chọn từ nhóm gồm:

(YY) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 113, hoặc

(ZZ) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất

97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 113, hoặc

(AAA) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 113 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(BBB) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 114, hoặc

(CCC) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 114,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (ZZ), (AAA) hoặc (CCC) có ít nhất 10%, 20%, tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90%, tốt nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 114.

Tốt hơn là, phân tử axit nucleic như được xác định trong mục từ (EE) đến (II) chịu sự điều khiển của trình tự có chức năng như trình tự khởi đầu trong vi sinh vật có trình tự gồm:

- (1) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 115 hoặc 116, hoặc
- (2) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 115 hoặc 116, hoặc
- (3) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 115 hoặc 116 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (4) đoạn chứa ít nhất 10 nucleotit, tốt hơn là ít nhất 20 nucleotit, ít nhất 30 nucleotit hoặc ít nhất 40 nucleotit, tốt hơn nữa là đoạn chứa ít nhất 50 nucleotit, ít nhất 75 nucleotit hoặc ít nhất 100 nucleotit, còn tốt hơn nữa là ít nhất 150 hoặc ít nhất 200 nucleotit của phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 115 hoặc 116. Tốt hơn là

đoạn được nêu trong SEQ ID NO: 115 hoặc 116 là đoạn chứa vùng 3' của SEQ ID NO: 115 hoặc 116, do đó đoạn này chứa phần xóa ở đầu 5' của SEQ ID NO: 115 hoặc 116.

Phương án khác nữa của sáng chế là chế phẩm chứa một hoặc nhiều vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế như được xác định ở trên. Chế phẩm này có thể còn bao gồm môi trường cho phép vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế phát triển. Môi trường này có thể còn chứa nguồn cacbon như hexoza, pentoza hoặc cácpolyol ví dụ sucroza, glucoza, fructoza, galactoza, manosa, rafinoza, xyloza, arabinoza, xyluloza, glyxerol, manitol, arabitol, xylitol, tinh bột, xenluloza, lignoxenluloza hoặc tổ hợp của chúng. Tốt hơn nếu nguồn cacbon là glucoza hoặc sucroza, tốt hơn nữa nếu nguồn cacbon là glucoza.

Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm chứa vi sinh vật theo sáng chế và môi trường NBS, môi trường AM1 hoặc môi trường PPM01. Tốt hơn nữa nếu chế phẩm còn chứa nguồn cacbon, tốt hơn nếu là đường. Các thành phần của môi trường này là đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Tốt hơn nếu với mỗi lít môi trường NBS chứa,

1-5g, tốt hơn là 3,5g KH_2PO_4 và

1-10g, tốt hơn là 5,0g K_2HPO_4 và

1-5g, tốt hơn là 3,5g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ và

0,1-1g, tốt hơn là 0,25g $\text{MgSO}_4 - 7 \text{H}_2\text{O}$ và

5-25mg, tốt hơn là 15mg $\text{CaCl}_2 - 2 \text{H}_2\text{O}$ và

0,1-1mg, tốt hơn là 0,5mg Thiamin và

0,1-5ml, tốt hơn là 1ml nguồn kim loại vi lượng,

trong đó nguồn kim loại vi lượng bao gồm 0,5-5g, tốt hơn là 1,6g $\text{FeCl}_3 - 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,05-0,5g, tốt hơn là 0,2g $\text{CoCl}_2 - 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,01-0,5g, tốt hơn là 0,1g $\text{CuCl}_2 - 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,1-0,5g, tốt hơn là 0,2g ZnCl_2 ; 0,05-0,5g, tốt hơn là 0,2g $\text{NaMoO}_4 - 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,001-0,1g, tốt hơn là 0,05g H_3BO_3 với mỗi lít HCl 0,01-1M, tốt hơn là 0,1M.

Nguồn cacbon được ưu tiên trong môi trường NBS là glucoza hoặc sucroza, tốt hơn là 2%-18% glucoza hoặc 2%-16% sucroza.

Tốt hơn nếu với mỗi lít môi trường AM 1 chứa, dung dịch betain 0,1-10mM, tốt hơn là 1mM

1-10g, tốt hơn là 2,6g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ và

0,1-5g, tốt hơn là 0,87g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ và

0,05-2,5 g, tốt hơn là 0,15g KCl và

0,05-5g, tốt hơn là 0,37g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và

0,1-5ml, tốt hơn là 1ml nguồn kim loại vi lượng,

trong đó nguồn kim loại vi lượng chứa, với mỗi lít HCl 0,01-1M, tốt hơn là 0,12M, 1-5g, tốt hơn là 2,4g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1-1g, tốt hơn là 0,3g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1-1g, tốt hơn là 0,21g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1-1g, tốt hơn là 0,3g ZnCl_2 ; 0,1-1g, tốt hơn là 0,27g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,01-0,5g, tốt hơn là 0,068g H_3BO_3 và 0,1-1g, tốt hơn là 0,5g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,

và tùy ý 1-30g, tốt hơn là 15g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Nguồn cacbon được ưu tiên trong môi trường NBS là glucoza hoặc sucroza, tốt hơn là 2%-18% glucoza hoặc 2%-16% sucroza.

Tốt hơn nếu với mỗi lít môi trường PPM01 chứa,

0,05-5g, tốt hơn là 0,37g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và

0,1-10g, tốt hơn là 1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và

0,05-5g, tốt hơn là 0,46g betain và

0,001-0,5g, tốt hơn là 0,05g xyanocobalamin (B12) và

1-10g, tốt hơn là 3,74g KH_2PO_4 và

0,1-5ml, tốt hơn là 1ml nguồn kim loại vi lượng,

trong đó nguồn kim loại vi lượng chứa, với mỗi lít axit sulfuric 10-100 mM, tốt hơn là 60 mM, 1-10g, tốt hơn là 3,48g $(\text{NH}_4)_2\text{Fe(II)(SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1-1g, tốt hơn là 0,35g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1-1g, tốt hơn là 0,31g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,1-5g, tốt hơn là 0,63g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1-1g, tốt hơn là 0,27g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,01-1g, tốt hơn là 0,07g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 0,1-5g, tốt hơn là 0,43g H_3BO_3 .

Nguồn cacbon được ưu tiên trong môi trường PPM01 là glucoza monohydrat,

tốt hơn là 10-500g, tốt hơn nữa là 140g glucoza monohydrat với mỗi lít môi trường.

Phương án khác nữa của sáng chế là phương pháp sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp với hiệu suất hoặc năng suất alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là hiệu suất hoặc năng suất suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là hiệu suất hoặc năng suất alanin được tăng cường, phương pháp này bao gồm các bước sau đây:

- (I) i) làm giảm, ức chế hoặc xóa bỏ một hoặc nhiều hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* hoặc như được xác định ở trên trong các mục từ (i) đến (v) và/hoặc ii) đưa vào, làm tăng, tăng cường một hoặc nhiều hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* như được xác định ở trên trong các mục từ (i) đến (v) và/hoặc iii) đưa vào, làm tăng, tăng cường một hoặc nhiều hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* như được xác định ở trên trong các mục từ (i) đến (v) và/hoặc iv) làm giảm, ức chế hoặc xóa bỏ một hoặc nhiều hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvB* như được xác định ở trên trong các mục từ (i) đến (v) và/hoặc v) làm thay đổi hoạt tính của gen *lpxD* như được xác định ở trên trong các mục từ (i) đến (v) ở vi sinh vật; và
- (II) tạo ra, nhận diện và phân lập vi sinh vật tái tổ hợp có hiệu suất hoặc năng suất alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là hiệu suất hoặc năng suất suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là hiệu suất hoặc năng suất alanin được tăng cường so với vi sinh vật tương ứng mà không có sự cải biến như được xác định ở trên trong mục (I).

Theo một phương án ưu tiên, gen *brnQ* có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3 và/hoặc mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án ưu tiên, gen *argP* có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 47 và/hoặc mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 48.

Theo một phương án, gen *gcvA* được ưu tiên có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường được liên kết về mặt chức năng với trình tự khởi đầu có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 56 hoặc 57.

Theo một phương án, gen *gcvB* được ưu tiên có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ được liên kết về mặt chức năng với trình tự khởi đầu có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 60 hoặc 61.

Theo một phương án, gen *lpxD* được ưu tiên có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện được thay đổi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 51 và/hoặc mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 52.

Theo một phương án được ưu tiên của phương pháp sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, phương pháp này còn bao gồm bước làm giảm, ức chế hoặc xóa bỏ hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất sáu hoặc tất cả các gen *pflB*, gen *adhE*, gen *ldhA*, gen *pta*, gen *ackA*, gen *frdA* hoặc gen *dadX*, ví dụ như được xác định ở trên trong các mục (A) đến (DD) và (JJ) đến (NN) và/hoặc bước đưa vào, làm tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba hoặc tất cả các gen *alaD*, gen *ygaW*, gen *zipA* hoặc gen *lpd*, ví dụ như được xác định ở trên trong các mục (EE) đến (II) và (OO) đến (CCC).

Theo phương án được ưu tiên khác nữa của phương pháp sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, phân tử axit nucleic như được xác định trong các mục (EE) đến (II) chịu sự điều khiển của trình tự đóng vai trò làm trình tự khởi đầu trong vi sinh vật có trình tự gồm:

- (1) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 115 hoặc 116, hoặc
- (2) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 115 hoặc 116, hoặc
- (3) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 115 hoặc 116 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (4) đoạn chứa ít nhất 10 nucleotit, tốt hơn là ít nhất 20 nucleotit, ít nhất 30 nucleotit hoặc ít nhất 40 nucleotit, tốt hơn nữa là đoạn chứa ít nhất 50 nucleotit, ít nhất 75

nucleotit hoặc ít nhất 100 nucleotit, còn tốt hơn nữa là ít nhất 150 hoặc ít nhất 200 nucleotit của phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 115 hoặc 116. Tốt hơn là, đoạn được nêu trong SEQ ID NO: 115 hoặc 116 là đoạn chứa vùng 3' được nêu trong SEQ ID NO: 115 hoặc 116, do đó đoạn này chứa phần xóa ở đầu 5' được nêu trong SEQ ID NO: 115 hoặc 116.

Tốt nhất là, phương pháp sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm bước làm giảm, ức chế hoặc xóa bỏ hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của tất cả các gen *brnQ*, gen *gcvB*, gen *pflB*, gen *adhE*, gen *ldhA*, gen *pta*, gen *ackA*, gen *frdA* và gen *dadX* và bước đưa vào, làm tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của tất cả các gen *alaD*, gen *ygaW*, gen *zipA*, gen *lpd*, gen *argP* và gen *gcvA* và bước làm thay đổi hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *lpxD*.

Theo một phương án của phương pháp sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, vi sinh vật được chọn từ nhóm gồm vi sinh vật không nhân bao gồm, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter laticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperdae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*, *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantium*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Micrococcus* sp. CCM825, *Morganella morganii*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovolans*, *Pseudomonas mucidolens*,

Pseudomonas testosteroni, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus sp. ATCC 15592*, *Rhodococcus sp. ATCC 19070*, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio tyrogenes*, *Actinomadura madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flavelus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmulleri*, *Xanthomonas citri*, *Synechocystis sp.*, *Synechococcus elongatus*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc sp.*, *N. commune*, *N. sphaericum*, *Nostoc punctiforme*, *Spirulina platensis*, *Lyngbya majuscula*, *L. lagerheimii*, *Phormidium tenue*, *Anabaena sp.*, *Leptolyngbya sp.*, v.v..

Theo một số phương án, vi sinh vật là tế bào nhân chuẩn. Tế bào nhân chuẩn thích hợp bao gồm tế bào nấm men, ví dụ *Saccharomyces spec*, như *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula spec*, như *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces spec*, như *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces spec*, như *Kluyveromyces lactis* và *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia spec*, như *Yarrowia lipolytica*, *Pichia spec*, như *Pichia methanolica*, *Pichia stipites* và *Pichia pastoris*, *Zygosaccharomyces spec*, như *Zygosaccharomyces rouxii* và *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida spec*, như *Candida boidinii*, *Candida utilis*, *Candida freyschussii*, *Candida glabrata* và *Candida sonorensis*, *Schwanniomyces spec*, như *Schwanniomyces occidentalis*, *Arxula spec*, như *Arxula adeninivorans*, *Ogataea spec* như *Ogataea minuta*, *Klebsiella spec*, như *Klebsiella pneumonia*.

Nhiều chủng vi khuẩn công nghiệp đặc biệt thích hợp để sử dụng trong phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả. Theo một số phương án, vi sinh vật là loài thuộc chi *Corynebacterium*, ví dụ *C. acetophilum*, *C. glutamicum*, *C. callunae*, *C. acetoacidophilum*, *C. acetoglutamicum*. Theo một số phương án, vi sinh vật là loài thuộc chi *Bacillus*, ví dụ, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. lentils*, *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. lautus*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. firmus*, *B. alkaophilus*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. stearothermophilus*, *B. halodurans*, *B. subtilis*, *B. pumilus*,

và *B. amyloliquefaciens*. Theo một số phương án, vi sinh vật là loài thuộc chi *Erwinia*, ví dụ, *E. uredovora*, *E. carotovora*, *E. ananas*, *E. herbicola*, *E. punctata* và *E. terreus*. Theo một số phương án, vi sinh vật là loài thuộc chi *Escherichia*, ví dụ, *E. coli*. Theo phương án khác, vi sinh vật là loài thuộc chi *Pantoea*, ví dụ, *P. citrea* hoặc *P. agglomerans*. Vẫn theo phương án khác, vi sinh vật là loài thuộc chi *Streptomyces*, ví dụ, *S. ambofaciens*, *S. achromogens*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *S. aureofaciens*, *S. aureus*, *S. fungicidicus*, *S. griseus* hoặc *S. lividans*. Theo phương án khác nữa, vi sinh vật là loài thuộc chi *Zymomonas*, ví dụ, *Z. mobilis* hoặc *Z. lipolytica*. Theo phương án khác nữa, vi sinh vật là loài thuộc chi *Rhodococcus*, ví dụ *R. opacus*.

Tốt hơn là, vi sinh vật được chọn từ họ *Enterobacteriaceae*, tốt hơn là thuộc chi *Escherichia*, ví dụ *Escherichia coli* (*E. coli*), tốt hơn là chủng *E. coli* W, tương ứng với DSMZ 1116, tương ứng với ATCC9637.

Phương án khác nữa của sáng chế là phương pháp sản xuất alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin, tốt nhất là L-alanin, bao gồm bước nuôi cấy một hoặc nhiều vi sinh vật tái tổ hợp như được xác định ở trên ở các điều kiện cho phép sản xuất alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin, tốt nhất là L-alanin.

Theo một số phương án, vi sinh vật tái tổ hợp được bao gồm bởi sáng chế được cho phát triển ở các điều kiện lên men theo mẻ hoặc liên tục. Lên men theo mẻ cổ điển là hệ thống kín, trong đó chế phẩm của môi trường được đặt ở thời điểm bắt đầu quá trình lên men và không được đưa qua các biến đổi nhân tạo trong quá trình lên men. Việc thay đổi hệ theo mẻ là lên men bổ sung theo mẻ. Trong việc thay đổi này, cơ chất được bổ sung ở các lượng tăng dần theo tiến trình lên men. Hệ lên men bổ sung theo mẻ là hữu ích khi sự kìm hãm chất dị hóa có thể ức chế sự chuyển hóa của các tế bào và khi mong muốn có lượng cơ chất giới hạn trong môi trường. Lên men theo mẻ và lên men bổ sung theo mẻ là phổ biến và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Lên men liên tục mà cũng được sử dụng trong sáng chế là hệ thống trong đó môi trường lên men xác định được bổ sung liên tục vào thiết bị phản ứng sinh học và lượng ngang bằng của môi trường có điều chỉnh (ví dụ, chứa sản phẩm cuối mong muốn) được loại bỏ đồng thời để xử lý. Lên men liên tục thường duy trì môi trường nuôi cấy ở mật độ cao không đổi trong đó các tế bào chủ yếu là ở pha sinh trưởng ở

đó việc sản xuất các sản phẩm cuối được tăng cường. Hệ lên men liên tục nhằm duy trì các điều kiện sinh trưởng ở trạng thái ổn định. Phương pháp điều biến chất dinh dưỡng và các yếu tố tăng trưởng cho các quá trình lên men liên tục cũng như các kỹ thuật để tối ưu hóa tỷ lệ tạo thành sản phẩm là đã biết trong lĩnh vực vi sinh công nghiệp.

Theo một số phương án, quy trình lên men được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 60°C, khoảng từ 15°C đến 50°C, khoảng từ 20°C đến 45°C, khoảng từ 25°C đến 45°C, khoảng từ 30°C đến 45°C và khoảng từ 25°C đến 40°C. Theo một phương án được ưu tiên, nhiệt độ bằng khoảng 34°C, 35°C hoặc 36°C. Theo phương án được ưu tiên nhất, nhiệt độ bằng khoảng 37°C hoặc 38°C.

Theo một số phương án khác, quy trình lên men được tiến hành trong khoảng thời gian nằm trong khoảng từ 8 giờ đến 240 giờ, khoảng từ 8 giờ đến 168 giờ, khoảng từ 10 giờ đến 144 giờ, khoảng từ 15 giờ đến 120 giờ, hoặc khoảng từ 20 giờ đến 72 giờ. Tốt hơn là, quy trình lên men được tiến hành khoảng từ 20 giờ đến 40 giờ.

Theo một số phương án khác, quy trình lên men được tiến hành ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 9, nằm trong khoảng từ 4,5 đến 8,5, nằm trong khoảng từ 5 đến 8, hoặc nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5. Tốt hơn là, quy trình lên men sẽ được tiến hành ở độ pH bằng 7.

Theo một phương án của phương pháp sản xuất alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin, vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường chứa khoảng từ 1% đến 30% (trọng lượng/thể tích) đường, khoảng từ 5% đến 25% (trọng lượng/thể tích) đường, khoảng từ 10% đến 20% (trọng lượng/thể tích) đường, khoảng từ 11% đến 18% (trọng lượng/thể tích) đường. Tốt hơn là, vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường chứa khoảng từ 12% đến 16% (trọng lượng/thể tích) đường. Tốt hơn nữa là, vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường chứa khoảng từ 13% đến 15% (trọng lượng/thể tích) đường, tốt nhất là, vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường chứa 14% (trọng lượng/thể tích) đường.

Theo phương án khác của phương pháp sản xuất alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin, hiệu suất của alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc

leuxin là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84% hoặc ít nhất 85%. Tốt hơn là, hiệu suất này là ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89% hoặc ít nhất 90%. Tốt hơn nữa là, hiệu suất là ít nhất 90,5%, ít nhất 91%, ít nhất 91,5%, ít nhất 92%, ít nhất 92,5%, ít nhất 93%, ít nhất 93,5%, ít nhất 94% hoặc ít nhất 94,5%. Theo phương án được ưu tiên hơn nữa, hiệu suất này là ít nhất 95% hoặc ít nhất 95,5%. Theo phương án được ưu tiên nhất, hiệu suất này là ít nhất 96%. Phần trăm hiệu suất được tính là số g sản phẩm được tạo ra từ số g glucoza trong môi trường. Do đó, khi môi trường chứa 100g glucoza và việc lên men tạo ra 98g alanin, hiệu suất sẽ là 98%.

Theo phương án khác của phương pháp sản xuất alanin, tốt hơn là L-alanin được tạo ra, trong đó độ tinh khiết bất đối xứng của L-alanin là ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93% hoặc ít nhất 94%. Theo một phương án được ưu tiên, độ tinh khiết bất đối xứng của L-alanin là ít nhất 95% hoặc ít nhất 95,5%. Theo phương án được ưu tiên hơn, độ tinh khiết bất đối xứng của L-alanin là ít nhất 96% hoặc ít nhất 96,5% hoặc ít nhất 97%. Theo phương án được ưu tiên hơn nữa, độ tinh khiết bất đối xứng của L-alanin là ít nhất 97,5%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 98,5% ví dụ ít nhất 99%. Còn tốt hơn nữa là, độ tinh khiết bất đối xứng của L-alanin là ít nhất 99,5% hoặc ít nhất 99,6% ví dụ ít nhất 99,7%, ít nhất 99,8%, hoặc ít nhất 99,9%. Theo phương án được ưu tiên nhất, L-alanin tinh khiết bất đối xứng được tạo ra.

Phương án khác của sáng chế là phương pháp nuôi cấy hoặc phát triển vi sinh vật biến đổi gen bất kỳ như được xác định ở trên, phương pháp này bao gồm bước cấy vào môi trường nuôi cấy một hoặc nhiều vi sinh vật biến đổi gen và nuôi cấy hoặc phát triển vi sinh vật biến đổi gen này trong môi trường nuôi cấy ở các điều kiện như được xác định ở trên.

Việc sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp như được xác định ở trên hoặc chế phẩm như được xác định ở trên để sản xuất lên men alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin, tốt nhất là L-alanin là phương án khác của sáng chế.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ, so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng, ví dụ vi sinh vật kiểu dại, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym được mã hóa bởi gen *brnQ* và/hoặc ARN được mã hóa bởi gen *gcvB* bị

giảm và/hoặc mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym được mã hóa bởi gen *argP* và/hoặc gen *gcvA* được tăng và/hoặc hoạt tính của enzym được mã hóa bởi gen *lpxD* được thay đổi.

Thuật ngữ “mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính bị giảm của”, còn bao gồm vi sinh vật kiểu đại không có mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính phát hiện được của *brnQ* và/hoặc *gcvB*.

Theo một phương án, việc giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen thu được bằng cách khử hoạt tính, gây đột biến hoặc bất hoạt gen. Điều này có thể được thực hiện bằng cách xóa một phần hoặc toàn bộ vùng mã hóa và/hoặc trình tự khởi đầu của gen, bằng cách gây đột biến gen như cài xen hoặc xóa một số nucleotit ví dụ một hoặc hai nucleotit dẫn đến sự xô dịch khung trong vùng mã hóa của gen, đưa codon kết thúc vào vùng mã hóa, bất hoạt trình tự khởi đầu của gen bằng cách, ví dụ xóa hoặc gây đột biến hộp trình tự khởi đầu như phía đi vào ribosom, hộp TATA và tương tự. Việc giảm này cũng có thể đạt được bằng cách phân hủy sản phẩm phiên mã của gen, ví dụ bằng cách đưa vào các ribozym, dsARN, ARN đối mã hoặc oligo-nucleotit đối mã. Việc giảm hoạt tính của gen có thể đạt được bằng cách biểu hiện các kháng thể hoặc aptame trong tế bào liên kết đặc hiệu với enzym đích. Các phương pháp khác để giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen đã được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án được ưu tiên, việc giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *brnQ* đạt được bằng cách đưa đột biến vào gen, tốt hơn là xóa. Theo phương án được ưu tiên, sự xóa được đưa vào giữa vị trí 667 và 764 được nêu trong SEQ ID NO: 1, từ đó xóa 97 nucleotit ra khỏi gen *brnQ*. Axit nucleic bị làm ngắn thu được có trình tự như được mô tả trong SEQ ID NO: 3 và mã hóa protein cắt như được mô tả trong SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án được ưu tiên, việc tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *argP* nhận được bằng cách đưa đột biến vào gen, tốt hơn là đột biến điểm. Tốt hơn nữa là, việc tăng này nhận được bằng cách gây đột biến codon ở vị trí 286 đến 288 của gen *argP* được nêu trong SEQ ID NO: 45 hoặc codon tương ứng của gen tương đồng chức năng. Còn tốt hơn nữa là, codon này được gây đột biến để nó mã hóa axit amin axit glutamic hoặc axit amin axit khác hoặc amit của chúng hoặc axit amin

tương tự với axit glutamic nhưng không phải là alanin. Theo phương án được ưu tiên nhất, codon tương ứng được gây đột biến để nó mã hóa axit amin axit glutamic.

Tốt hơn là, việc tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *argP* nhận được bằng cách đưa đột biến vào gen *argP*, trong đó gen *argP* đột biến có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 47, mã hóa protein được nêu trong SEQ ID NO: 48.

Tốt hơn là, việc tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *gcvA* nhận được bằng cách đưa đột biến vào trình tự khởi đầu của gen *gcvA*, trong đó trình tự khởi đầu đột biến tốt hơn là có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 56 hoặc SEQ ID NO: 57.

Theo một phương án được ưu tiên, việc giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *gcvB* nhận được bằng cách đưa đột biến vào trình tự khởi đầu. Ví dụ, trình tự khởi đầu có thể được gây đột biến bằng cách xóa bất kỳ một hoặc nhiều bazơ T trong vị trí 62 đến 68 được nêu trong SEQ ID NO: 59 hoặc bằng cách đưa đột biến điểm vào vị trí 60 được nêu trong SEQ ID NO: 59, trả A ở vị trí này vào bất kỳ một trong số G, C hoặc T. Tốt hơn là, trình tự khởi đầu đột biến có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 60 hoặc 61.

Tốt hơn là, việc giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *gcvB* nhận được bằng cách đưa đột biến vào trình tự khởi đầu của gen *gcvB*. Tốt hơn là, trình tự khởi đầu kiểu đại có SEQ ID NO: 59 được gây đột biến để có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 60 hoặc 61.

Tốt hơn là, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính được thay đổi của gen *lpxD* nhận được bằng cách đưa đột biến vào gen *lpxD*, trong đó gen *lpxD* đột biến có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 51, mã hóa protein được nêu trong SEQ ID NO: 52.

Mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính giảm của ARN hoặc enzym lần lượt được bộc lộ trong bản mô tả, cụ thể là mức độ biểu hiện giảm và/hoặc hoạt tính giảm của ARN hoặc enzym được mã hóa bởi lactat dehydrogenaza (*ldhA*), pyruvat format lyaza I (*pflB*), ancyl dehydrogenaza/pyruvat-format lyaza deactivaza (*adhE*) phụ thuộc vào axetaldehyt-CoA dehydrogenaza hai chức/sắt, phosphat axetyltransferaza (*pta*), fumarat reductaza (*frdA*), *gcvB* và/hoặc *brnQ*, có thể là sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính ít nhất 50%, so với mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của ARN hoặc enzym đã nêu trong vi sinh vật tham chiếu tương ứng, ví dụ vi sinh vật kiểu đại, hoặc sự

giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính ít nhất 90%, hoặc tốt hơn nữa là sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính ít nhất 95%, hoặc tốt hơn nữa là sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính ít nhất 98%, hoặc còn tốt hơn nữa là sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính ít nhất 99% hoặc còn tốt hơn nữa là sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính ít nhất 99,9%. Theo phương án được ưu tiên nhất, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của ARN hoặc enzym không thể phát hiện trong vi sinh vật theo sáng chế.

Việc mất đi sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *gcvB* và/hoặc gen *brnQ*, và mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *argP* và/hoặc gen *gvcA* được đưa vào hoặc được tăng, và hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *lpxD* được thay đổi dẫn đến năng suất và/hoặc hiệu suất của alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin trong vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế được cải thiện so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng. Do đó, việc mất đi sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *brnQ* hoặc gen *gcvB*, và việc đưa vào hoặc tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *argP* hoặc gen *gcvA*, và sự thay đổi hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *lpxD* có thể được xác định bằng cách đo năng suất hoặc hiệu suất alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin của vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng. Phương pháp sản xuất lên men chất chuyển hóa, ví dụ alanin, là đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và cũng được nêu trong bản mô tả. Hiệu suất được cải thiện của, ví dụ alanin trong quá trình lên men bởi vi sinh vật theo sáng chế so với hiệu suất của alanin trong quá trình lên men bởi vi sinh vật tham chiếu tương ứng là phép đo sự mất đi, giảm, đưa vào hoặc tăng hoặc thay đổi mức độ biểu hiện và hoặc hoạt tính của gen tương ứng.

Phương pháp xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính của lactat dehydrogenaza (*ldhA*) được, ví dụ, bộc lộ bởi Bunch et al. trong “The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia Coli*”, *Microbiology* (1997), Vol. 143, pages 187-155; hoặc Bergmeyer, H.U., Bergmeyer J. và Grassl, M. (1983-1986) trong “Methods of Enzymatic Analysis”, 3rd Edition, Volume III, pages 126-133, Verlag Chemie, Weinheim; hoặc *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Second Edition (2004), Wolfgang Aehle, page 23. Ưu tiên phương pháp cuối.

Phương pháp xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính của pyruvat format lyaza I (pflB) được, ví dụ, bộc lộ trong Knappe J, Blaschkowski HP, Gröbner P, Schmitt T (1974). "Pyruvate formate-lyase of *Escherichia coli*: the acetyl-enzyme intermediate." *Eur J Biochem* 1974;50(1);253-63. PMID: 4615902; in KNAPPE, Joachim, et al. "Pyruvate Formate-Lyase of *Escherichia coli*: the Acetyl-Enzyme Intermediate." *European Journal of Biochemistry* 50.1 (1974): 253-263; in Wong, Kenny K., et al. "Molecular properties of pyruvate formate-lyase activating enzyme." *Biochemistry* 32.51 (1993): 14102-14110 và trong Nnyepi, Mbako R., Yi Peng, và Joan B. Broderick. "Inactivation of *E. coli* pyruvate formate-lyase: Role of AdhE and small molecules." *Archives of biochemistry and biophysics* 459.1 (2007): 1-9.

Phương pháp xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính của ancol dehydrogenaza/pyruvat-format lyaza deactivaza (adhE) phụ thuộc vào axetaldehyt-CoA dehydrogenaza hai chức/sắt được, ví dụ, bộc lộ trong Membrillo-Hernández, Jorge, et al. "Evolution of the adhE Gene Product of *Escherichia coli* from a Functional Reductase to a Dehydrogenase GENETIC and BIOCHEMICAL STUDIES OF THE MUTANT PROTEINS." *Journal of Biological Chemistry* 275.43 (2000): 33869-33875 và trong Mbako R. Nnyepi, Yi Peng, Joan B. Broderick, Inactivation of *E. coli* pyruvate formate-lyase: Role of AdhE and small molecules, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 459, Issue 1, 1 March 2007, Pages 1-9.

Phương pháp xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính của phosphat axetyl-transferaza (pta) được, ví dụ, bộc lộ trong Dittrich, Cheryl R., George N. Bennett, và Ka-Yiu San. "Characterization of the Acetate-Producing Pathways in *Escherichia coli*." *Biotechnology progress* 21.4 (2005): 1062-1067 và in Brown, T. D. K., M. C. Jones-Mortimer, và H. L. Kornberg. "The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*." *Journal of general microbiology* 102.2 (1977): 327-336.

Phương pháp xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính của fumarat reductaza (frdA) được, ví dụ, bộc lộ trong Dickie, Peter, và Joel H. Weiner. "Purification and characterization of membrane-bound fumarate reductase from anaerobically grown *Escherichia coli*." *Canadian journal of biochemistry* 57.6 (1979): 813-821; in Cecchini, Gary, et al. "Reconstitution of quinone reduction and characterization of Esche-

richia coli fumarate reductase activity." Journal of Biological Chemistry 261.4 (1986): 1808-1814 hoặc trong Schröder, I., et al. "Identification of active site residues of Escherichia coli fumarate reductase by site-directed mutagenesis." Journal of Biological Chemistry 266.21 (1991): 13572-13579.

Phương pháp xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính của alanin racemaza (dadX) được, ví dụ, bộc lộ trong J. Wild, J. Hennig, M. Lobočka, W. Walczak, T. Kłopotowski "Identification of the dadX gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in Escherichia coli K12" Mol Gen Genet (1985) 198:315-322 và trong M. Pulliam Lambert và F. C. Neuhaus "Factors Affecting the Level of Alanine Racemase in Escherichia coli" Journal of Bacteriology, Mar. 1972, p. 1156-1161.

Phương pháp xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính của alanin dehydrogenaza (alaD) được, ví dụ, bộc lộ trong Sakamoto, Y., Nagata, S., Esaki, N., Tanaka, H., Soda, K. "Gene cloning, purification and characterization of thermostable alanine dehydrogenase of Bacillus stearothermophilus" J Fermen. Bioeng. 69 (1990):154-158.

Thuật ngữ "mức độ biểu hiện của enzym giảm" bao gồm, ví dụ, sự biểu hiện của enzym bởi vi sinh vật được can thiệp về mặt di truyền (ví dụ, được xử lý về mặt di truyền) ở mức độ thấp hơn so với sự biểu hiện của enzym bởi vi sinh vật tham chiếu tương ứng, ví dụ kiểu đại của vi sinh vật nêu trên. Sự can thiệp về mặt di truyền để làm giảm mức độ biểu hiện của enzym có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xóa gen hoặc phần của nó mã hóa enzym, làm thay đổi hoặc cải biến trình tự điều hòa hoặc vị trí liên quan đến sự biểu hiện của gen mã hóa enzym (ví dụ, bằng cách loại bỏ trình tự khởi đầu mạnh hoặc trình tự khởi đầu ức chế), cải biến protein (ví dụ, protein điều hòa, chất ức chế, chất tăng cường, yếu tố hoạt hóa phiên mã và tương tự) liên quan đến sự phiên mã gen mã hóa enzym và/hoặc sự dịch mã sản phẩm gen, hoặc phương pháp truyền thống bất kỳ khác để làm giảm mức độ biểu hiện của gen cụ thể đã biết trong lĩnh vực (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp sử dụng phân tử axit nucleic đối mã hoặc phương pháp khác để bất hoạt hoặc phong tỏa sự biểu hiện của protein đích). Ngoài ra, có thể đưa các yếu tố làm mất ổn định vào mARN hoặc đưa vào các cải biến di truyền dẫn đến sự suy thoái vị trí liên kết ribosom (RBS) của ARN. Cũng có thể thay đổi việc sử dụng codon của gen theo cách để hiệu quả và tốc độ dịch mã bị giảm.

Hoạt tính enzym bị giảm cũng có thể thu được bằng cách đưa vào một hoặc nhiều đột biến mất đoạn gen dẫn đến hoạt tính của enzym bị giảm. Ngoài ra, việc giảm hoạt tính của enzym cũng có thể bao gồm sự bất hoạt (hoặc mức độ biểu hiện giảm) của enzym hoạt tính cần thiết để hoạt hóa enzym có hoạt tính bị giảm. Bằng phương pháp sau, enzym có hoạt tính bị giảm tốt hơn là được giữ ở trạng thái bất hoạt.

Đột biến mất đoạn theo cách sử dụng này là đột biến bất kỳ bên trong gen bao gồm trình tự khởi đầu và vùng mã hóa dẫn đến hoạt tính protein bị giảm hoặc bị xóa bỏ của protein được mã hóa bởi vùng mã hóa của gen. Các đột biến mất đoạn này bao gồm, ví dụ sự xê dịch khung, việc đưa codon kết thúc vào vùng mã hóa, gây đột biến các yếu tố trình tự khởi đầu như hộp TATA ngăn sự phiên mã và tương tự.

Vi sinh vật có mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính giảm của enzym được mã hóa bởi gen *brnQ* hoặc ARN được mã hóa bởi gen *gcvB* hoặc mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính được tăng cường hoặc được tăng của protein được mã hóa bởi gen *argP* hoặc gen *gcvA* hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện được thay đổi của protein được mã hóa bởi gen *lpxD* có thể có trong tự nhiên, nghĩa là do các đột biến tự phát. Vi sinh vật có thể được biến đổi để không có hoặc có hoạt tính được giảm, được tăng cường hoặc được thay đổi đáng kể của enzym hoặc ARN được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen nêu trên bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, như xử lý hóa chất hoặc chiếu xạ. Về mặt này, vi sinh vật sẽ được xử lý bằng, ví dụ, hóa chất gây đột biến, tia X, hoặc tia UV. Trong bước tiếp theo, các vi sinh vật có mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính được giảm, được tăng cường hoặc được thay đổi của enzym hoặc ARN được mã hóa bởi một hoặc nhiều gen nêu trên sẽ được chọn lựa. Vi sinh vật tái tổ hợp cũng có thể thu được bằng các kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng nhằm gây đột biến, phá vỡ hoặc cắt một hoặc nhiều gen nêu trên trong bộ gen của vi sinh vật hoặc để thay thế một hoặc nhiều gen nêu trên bằng gen tương ứng mã hóa enzym hoặc ARN mà, so với enzym hoặc ARN được mã hóa bởi gen kiểu dại, có mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính được giảm, được tăng cường hoặc được thay đổi.

Theo một phương án của vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, việc giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym hoặc ARN được mã hóa bởi gen *brnQ* hoặc gen *gcvB* nhận được bằng cách cải biến gen *brnQ*, trong đó (các) cải biến gen này tốt hơn là được thực hiện bằng cách xóa một hoặc nhiều gen nêu trên hoặc ít nhất là một

phần của nó, xóa yếu tố điều hòa của một hoặc nhiều gen nêu trên hoặc phần của nó, như trình tự trình tự khởi đầu, hoặc bằng cách đưa ít nhất một đột biến mất đoạn vào một hoặc nhiều gen nêu trên.

Theo một phương án của vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, sự tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym được mã hóa bởi gen *argP* và/hoặc gen *gcvA* có thể nhận được bằng cách cải biến gen *argP* và/hoặc gen *gcvA*, trong đó (các) cải biến gen này tốt hơn là được thực hiện bằng cách nhân nhiều bản của gen *argP* và/hoặc gen *gcvA* trong bộ gen vi sinh vật, bằng cách đưa gen trên vectơ biểu hiện tự sao chép vào vi sinh vật, bằng cách trao đổi trình tự khởi đầu của gen *argP* và/hoặc gen *gcvA* dựa trên trình tự khởi đầu mạnh hơn hoặc bằng cách chuyển trình tự khởi đầu nội sinh của gen vào trình tự khởi đầu mạnh hơn, ví dụ bằng cách đưa các đột biến điểm vào trình tự trình tự khởi đầu.

Ngoài ra, hoạt tính của gen *argP* và/hoặc gen *gcvA* và/hoặc gen *lpxD* có thể được tăng cường hoặc được thay đổi bằng cách gây đột biến gen để nhận được các trao đổi axit amin trong protein làm cải thiện hoặc thay đổi hoạt tính của gen. Các phương pháp này đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc gây đột biến gen nêu trên có thể được thực hiện, ví dụ, bằng phương pháp gây đột biến định hướng vị trí hoặc đột biến ngẫu nhiên, sau đó đưa gen đã biến đổi vào bộ gen của vi sinh vật bằng cách tái tổ hợp. Các biến thể của gen có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến trình tự gen bằng PCR. “Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit” (Stratagene) có thể được sử dụng để tiến hành gây đột biến định hướng. Việc gây đột biến ngẫu nhiên trên toàn bộ trình tự mã hóa, hoặc theo cách khác là chỉ một phần của nó, có thể được thực hiện với sự hỗ trợ của “GeneMorph II Random Mutagenesis Kit” (Stratagene). Tỷ lệ gây đột biến được đặt ở lượng đột biến mong muốn thông qua lượng khuôn ADN sử dụng. Nhiều đột biến được tạo ra bởi sự tổ hợp đích của các đột biến riêng lẻ hoặc bằng việc thực hiện lần lượt một vài chu trình gây đột biến.

Dưới đây, kỹ thuật tái tổ hợp thích hợp để cụ thể là đưa đột biến vào hoặc xóa trình tự được mô tả.

Kỹ thuật này trong bản mô tả đôi khi được gọi là “tái tổ hợp Campbell” (Leenhouts *et al.*, *Appl Env Microbiol.* (1989), Vol. 55, pages 394-400). “Campbell vào”,

như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ thể biến nạp của tế bào chủ ban đầu trong đó toàn bộ phân tử ADN sợi kép vòng tròn (ví dụ plasmid) được kết hợp vào nhiễm sắc thể bằng quy trình tái tổ hợp tương đồng đơn (quy trình cross in), và tạo ra hiệu quả việc cài xen phiên bản thẳng của phân tử ADN vòng tròn nêu trên vào trình tự ADN thứ nhất của nhiễm sắc thể tương đồng với trình tự ADN thứ nhất của phân tử ADN vòng tròn nêu trên. “Được Campbell vào” chỉ việc trình tự ADN thẳng được kết hợp vào nhiễm sắc thể của thể biến nạp “Campbell vào”. “Campbell vào” chứa hai bản sao trình tự ADN tương đồng thứ nhất, mỗi bản bao sao gồm và bao quanh bản sao điểm giao tương đồng tái tổ hợp.

“Campbell ra”, như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ việc tế bào giảm dần từ thể biến nạp “Campbell vào”, trong đó quy trình tái tổ hợp tương đồng thứ hai (quy trình xóa) xảy ra giữa trình tự ADN thứ hai có trong ADN thẳng đã cài xen của ADN “được Campbell vào”, và trình tự ADN thứ hai của gốc nhiễm sắc thể, tương đồng với trình tự ADN thứ hai của đoạn cài xen thẳng nêu trên, quy trình tái tổ hợp thứ hai dẫn đến việc xóa (loại bỏ) phần của trình tự ADN đã kết hợp, nhưng, quan trọng là, còn dẫn đến việc một phần (có thể chỉ là một bazơ đơn) của Campbellled đã kết hợp vào ADN vẫn còn lại trong nhiễm sắc thể, sao cho so với tế bào chủ ban đầu, tế bào “Campbell ra” chứa một hoặc nhiều thay đổi có mục đích trong nhiễm sắc thể (ví dụ, thay thế một bazơ, thay thế nhiều bazơ, cài xen gen hoặc trình tự ADN khác loại, cài xen bản sao hoặc các bản sao khác của gen tương đồng hoặc gen tương đồng đã cải biến, hoặc cài xen trình tự ADN chứa nhiều hơn một trong số các ví dụ nêu trên). Tế bào “Campbell ra” tốt hơn là thu được bằng cách lựa chọn đối lập dựa trên gen có trong phần (phần muốn loại bỏ) của trình tự ADN “Campbellled vào”, ví dụ gen *Bacillus subtilis sacB*, mà gây chết khi được biểu hiện ở tế bào được cho phát triển trong điều kiện có mặt khoảng 5% đến 10% sucroza. Có hoặc không có sự lựa chọn đối lập, tế bào “Campbell ra” mong muốn có thể thu được hoặc được nhận diện bằng cách sàng lọc tế bào mong muốn, sử dụng kiểu hình có thể sàng lọc bất kỳ, như, nhưng không giới hạn ở, hình thái khuẩn lạc, màu sắc khuẩn lạc, sự có mặt hoặc không có mặt tính kháng kháng sinh, sự có mặt hoặc không có mặt trình tự ADN xác định bởi phản ứng chuỗi polymeraza, sự có mặt hoặc không có mặt hiện tượng khuyết dưỡng, sự có mặt hoặc không có mặt của enzym, lai axit nucleic khuẩn lạc, sàng lọc kháng thể, v.v. Thuật ngữ “Campbell vào” và “Campbell ra” cũng có thể được sử dụng làm

động từ trong nhiều nghĩa khác nhau để chỉ phương pháp hoặc quy trình được mô tả ở trên.

Được hiểu rằng quy trình tái tổ hợp tương đồng dẫn đến “Campbell vào” hoặc “Campbell ra” có thể xảy ra trên khoảng bazơ ADN bên trong trình tự ADN tương đồng, và vì các trình tự tương đồng sẽ giống nhau đối với ít nhất một phần của khoảng này, thường không thể xác định chính xác điểm giao nhau xảy ra ở đâu. Nói cách khác, không thể xác định chính xác trình tự nào có nguồn gốc từ ADN đã cài xen, và trình tự nào có nguồn gốc từ ADN nhiễm sắc thể. Hơn nữa, trình tự ADN tương đồng thứ nhất và trình tự ADN tương đồng thứ hai thường được tách biệt bởi vùng không tương đồng một phần, và chính vùng không tương đồng này vẫn nằm trên nhiễm sắc thể của tế bào “Campbell ra”.

Tốt hơn là, trình tự ADN tương đồng thứ nhất và thứ hai có chiều dài ít nhất khoảng 200 cặp bazơ, và có thể có chiều dài lên đến vài nghìn cặp bazơ. Tuy nhiên, quy trình có thể được thực hiện để làm việc với các trình tự ngắn hơn hoặc dài hơn. Ví dụ, chiều dài của các trình tự tương đồng thứ nhất và thứ hai có thể nằm trong khoảng từ 500 đến 2000 bazơ, và việc thu nhận “Campbell ra” từ “Campbell vào” được hỗ trợ bằng cách sắp xếp các trình tự tương đồng thứ nhất và thứ hai ở xấp xỉ cùng chiều dài, tốt hơn là với sự khác nhau ít hơn 200 cặp bazơ và tốt nhất là với trình tự ngắn hơn trong số hai trình tự bằng ít nhất 70% chiều dài của trình tự dài hơn.

Theo một phương án, việc giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *brnQ* và/hoặc *gcvB* nhận được bằng cách làm bất hoạt gen *brnQ* và/hoặc gen *gcvB* lần lượt mã hóa chất vận chuyển axit amin mạch nhánh hoặc ARN mã hóa phi protein.

Theo một phương án, việc làm bất hoạt gen tốt hơn là nhận được bằng cách xóa gen hoặc ít nhất là phần của nó, bằng cách xóa yếu tố điều hòa của gen hoặc ít nhất là một phần của nó hoặc bằng cách đưa ít nhất một đột biến mất đoạn vào gen.

Theo một phương án, việc giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của *argP* nhận được bằng cách hoạt hóa gen *argP* mã hóa protein có hoạt tính liên kết ADN/hoạt hóa sự phiên mã.

Theo một phương án, sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của *gcvA* nhận được bằng cách hoạt hóa gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN.

Thuật ngữ “alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin”, như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế, cần được hiểu theo nghĩa rộng nhất của chúng và bao gồm cả các muối của chúng, ví dụ như muối kim loại kiềm, như muối Na^+ và K^+ , hoặc muối kiềm thổ, như muối Mg^{2+} và Ca^{2+} , hoặc các muối amoni hoặc các anhydrit của alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin.

Tốt hơn là, alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin được tạo ra ở điều kiện vi hiếu khí. Điều kiện hiếu khí hoặc yếm khí cũng có thể được sử dụng.

Vi hiếu khí nghĩa là nồng độ oxy thấp hơn nồng độ oxy có trong không khí. Theo một phương án, vi hiếu khí nghĩa là áp lực oxy nằm trong khoảng từ 5 đến 27 mmHg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 20 mmHg (Megan Falsetta et al. (2011), The composition and metabolic phenotype of *Neisseria gonorrhoeae* biofilms, *Frontiers in Microbiology*, Vol 2, page 1 to 11). Tốt hơn là, điều kiện vi hiếu khí được thiết lập với dòng không khí từ 0,1 đến 1 vvm.

Điều kiện yếm khí có thể được thiết lập bằng các kỹ thuật truyền thống, ví dụ như bằng cách khử khí các thành phần của môi trường phản ứng và duy trì điều kiện yếm khí bằng cách đưa khí cacbon dioxid hoặc nitơ hoặc hỗn hợp của chúng và tùy ý hydro vào ở lưu lượng là, ví dụ, từ 0,1 đến 1 hoặc từ 0,2 đến 0,5 vvm. Điều kiện hiếu khí có thể được thiết lập bằng các kỹ thuật truyền thống, ví dụ như bằng cách đưa không khí hoặc oxy vào ở lưu lượng là, ví dụ, từ 0,1 đến 1 hoặc 0,2 đến 0,5 vvm. Nếu thích hợp, có thể đưa vào quy trình một áp suất nhẹ từ 0,1 đến 1,5 bar.

Theo một phương án của quy trình theo sáng chế, nguồn cacbon có thể đồng hóa có thể là glucoza, glyxerin, glucoza, maltoza, maltodextrin, fructoza, galactoza, mannoza, xyloza, sucroza, arabinoza, lactoza, rafinoza và tổ hợp của chúng.

Theo một phương án được ưu tiên, nguồn cacbon có thể đồng hóa là glucoza, sucroza, xyloza, arabinoza, glyxerol hoặc tổ hợp của chúng. Nguồn cacbon được ưu tiên là glucoza, sucroza, glucoza và sucroza, glucoza và xyloza và/hoặc glucoza, arabinoza và xyloza. Theo một phương án của quy trình theo sáng chế, nguồn cacbon có thể đồng hóa có thể là sucroza, glyxerin và/hoặc glucoza.

Nồng độ ban đầu của nguồn cacbon có thể đồng hóa, tốt hơn là nồng độ ban

đầu, tốt hơn là, được điều chỉnh đến giá trị nằm trong khoảng từ 5 đến 250g/l, tốt hơn là 50 đến 200g/l và tốt hơn nữa là từ 125 đến 150g/l, tốt nhất là khoảng 140g/l và có thể được duy trì trong khoảng nêu trên trong quá trình nuôi cấy. Độ pH của môi trường phản ứng có thể được kiểm soát bằng cách bổ sung bazơ thích hợp ví dụ như, khí amoniac, NH_4OH , NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, NaOH , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH , K_2CO_3 , KHCO_3 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, MgCO_3 , $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, CaO , $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_2$, $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Một phương án khác của sáng chế là quy trình sản xuất lên men alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin, tốt nhất là L-alanin, bao gồm các bước:

- I) cho vi sinh vật theo sáng chế như được xác định ở trên phát triển trong thiết bị lên men, và
- II) thu hồi alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin, tốt nhất là L-alanin từ canh trường lên men thu được ở bước I).

Bước lên men I) theo sáng chế có thể, ví dụ, được thực hiện trong thiết bị lên men có khuấy, cột bọt khí và thiết bị phản ứng dạng vòng. Tổng quan toàn diện về các loại phương pháp có thể có bao gồm cả loại máy khuấy và các kiểu dáng hình học có thể được tìm thấy trong Chmiel: “*Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik*”, Volume 1. Trong quy trình theo sáng chế, các biến thể điển hình có sẵn là các biến thể dưới đây đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được giải thích, ví dụ, trong Chmiel, Hammes và Bailey: “*Biochemical Engineering*”, như lên men theo mẻ, lên men bổ sung theo đợt, lên men bổ sung theo đợt lặp lại hoặc lên men liên tục có và không có sự tuần hoàn sinh khối. Tùy vào chủng sản xuất, việc sục không khí, oxy, cacbon dioxit, hydro, nitơ hoặc hỗn hợp khí thích hợp có thể được thực hiện để đạt được hiệu suất cao (YP/S).

Các điều kiện được ưu tiên đặc biệt để sản xuất alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin, tốt nhất là L-alanin trong quy trình bước I) là:

Nguồn cacbon có thể đồng hóa: glucoza

Nhiệt độ: 30 đến 45°C

pH: 6,0 đến 7,0

Điều kiện vi hiếu khí

Trong quy trình bước II), sản phẩm được thu hồi từ canh trường lên men thu được trong quy trình bước I).

Thông thường, quy trình thu hồi bao gồm bước tách các vi sinh vật tái tổ hợp ra khỏi canh trường lên men dưới dạng cái gọi là "sinh khối". Quy trình loại bỏ sinh khối là đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm quy trình lọc, lắng, tách đãi hoặc tổ hợp các quy trình này. Do đó, sinh khối có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng thiết bị ly tâm, tách, bình lắng, bộ lọc hoặc trong thiết bị tách đãi. Để thu hồi tối đa sản phẩm có giá trị, việc rửa sinh khối thường được khuyến khích, ví dụ ở dạng tách chất tan. Việc lựa chọn phương pháp phụ thuộc vào hàm lượng sinh khối trong canh trường lên men và các tính chất của sinh khối, cũng như sự tương tác của sinh khối với hợp chất hữu cơ (sản phẩm có giá trị). Theo một phương pháp, canh trường lên men có thể được tiệt trùng hoặc thanh trùng. Theo phương pháp khác, canh trường lên men được cô đặc. Tùy thuộc vào yêu cầu, việc cô đặc này có thể được thực hiện theo từng mẻ hoặc liên tục. Khoảng áp suất và nhiệt độ cần được lựa chọn sao cho trước tiên không xảy ra hư hại về sản phẩm, và thứ hai là việc sử dụng thiết bị và năng lượng ở mức tối thiểu là cần thiết. Việc lựa chọn khéo léo mức áp suất và nhiệt độ để bay hơi nhiều giai đoạn cụ thể giúp có thể tiết kiệm năng lượng.

Quy trình thu hồi có thể bao gồm bước tinh chế thêm trong đó sản phẩm lên men được tinh chế thêm. Tuy nhiên, nếu sản phẩm lên men được chuyển hóa thành sản phẩm hữu cơ bậc hai bằng các phản ứng hóa học, việc tinh chế thêm sản phẩm lên men có thể, tùy thuộc vào loại phản ứng và điều kiện phản ứng, không nhất thiết cần đến. Đối với việc tinh chế sản phẩm lên men thu được trong bước xử lý II) có thể sử dụng các phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, ví dụ như phương pháp kết tinh, lọc, thẩm tách điện và sắc ký. Dung dịch thu được có thể được tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion để loại bỏ các ion dư không mong muốn.

Theo một phương án, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ của gen brnQ nhận được bằng cách đưa phần mất đoạn vào gen kiểu

dại. Tốt hơn là, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ của gen *brnQ* nhận được bằng cách đưa đột biến đặc hiệu vào giữa các vị trí từ 667 đến 764 của gen kiểu dại có SEQ ID NO: 1 hoặc biến thể mang chức năng của nó.

Do đó, phương án khác nữa của sáng chế là phân tử axit nucleic tái tổ hợp có trình tự được chọn từ nhóm gồm:

- (6) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3, hoặc
- (7) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 3, hoặc
- (8) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 3 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (9) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4, hoặc
- (10) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4

trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định nhưng không phải là gen và/hoặc protein kiểu dại có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Theo một phương án, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính được tăng cường hoặc được tăng của gen *argP* nhận được bằng cách đưa đột biến vào gen kiểu dại. Tốt hơn là, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính được tăng cường hoặc được tăng của gen *argP* nhận được bằng cách đưa các đột biến đặc hiệu vào các vị trí từ 286 đến 288 của gen kiểu dại có SEQ ID NO: 45 hoặc biến thể mang chức năng của nó.

Do đó, phương án khác nữa của sáng chế là phân tử axit nucleic tái tổ hợp có trình tự được chọn từ nhóm gồm:

- (1) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 45, hoặc

- (2) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 45, hoặc
- (3) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 45 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc
- (4) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 46, hoặc
- (5) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 46, và trong đó codon của gen trong các mục (1) đến (5) tương ứng với vị trí 286 đến 288 của SEQ ID NO: 45 không mã hóa axit amin alanin và không phải là codon kết thúc hoặc axit amin của protein được mã hóa bởi gen trong mục (1) đến (5) tương ứng với vị trí 96 của SEQ ID NO: 46 không phải là alanin, và trong đó protein được mã hóa bởi gen như được xác định ở trên trong các mục (1) đến (5) có hoạt tính được tăng cường hoặc được tăng so với protein có SEQ ID NO: 46, và trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Tốt hơn là, phân tử axit nucleic tái tổ hợp có trình tự được chọn từ nhóm gồm:

- (6) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 47, hoặc
- (7) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 47, hoặc
- (8) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 47 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

- (9) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 48, hoặc
- (10) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 48, trong đó codon của các gen trong mục (7) đến (10) tương ứng với vị trí 286 đến 288 của SEQ ID NO: 47 mã hóa axit amin axit glutamic hoặc axit amin liên quan hoặc axit amin của protein được mã hóa bởi các gen trong mục (7) đến (10) tương ứng với vị trí 96 của SEQ ID NO: 48 là axit glutamic hoặc axit amin liên quan, và trong đó protein được mã hóa bởi gen như được xác định ở trên trong mục (7) đến (10) có hoạt tính được tăng cường hoặc được tăng so với protein có SEQ ID NO: 48, và trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Theo một phương án, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính được tăng cường hoặc được tăng của gen *gcvA* nhận được bằng cách đưa đột biến vào trình tự khởi đầu của gen kiểu dại. Tốt hơn là, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính được tăng cường hoặc được tăng của gen *gcvA* nhận được bằng cách đưa đột biến đặc hiệu vào trình tự khởi đầu của gen kiểu dại có SEQ ID NO: 53 hoặc biến thể mang chức năng của nó, trong đó đột biến này tương ứng với đột biến được đưa vào trong SEQ ID NO: 55 dẫn đến SEQ ID NO: 56 hoặc SEQ ID NO: 57.

Do đó, phương án khác nữa của sáng chế là phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa trình tự được chọn từ nhóm gồm:

- (11) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 53, hoặc
- (12) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 53, hoặc
- (13) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 53 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở

điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(14) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 54, hoặc

(15) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 54,

được liên kết về mặt chức năng với trình tự khởi đầu được gây đột biến hoặc trình tự khởi đầu có hoạt tính trong vi sinh vật khác loại với phân tử axit nucleic nêu trên, và

trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein được biểu hiện quá như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Theo một phương án, hiệu suất và/hoặc năng suất được tăng cường hoặc được tăng của alanin hoặc hợp chất liên quan nhận được bằng cách đưa đột biến vào gen kiểu đại lpxD.

Do đó, một phương án của sáng chế là phân tử axit nucleic tái tổ hợp có trình tự được chọn từ nhóm gồm:

(16) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 49, hoặc

(17) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 49, hoặc

(18) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 49 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(19) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 50, hoặc

(20) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 50, và

trong đó codon của gen trong các mục (16) đến (20) tương ứng với vị trí 43 đến 45 của SEQ ID NO: 49 không mã hóa axit amin alanin và không phải là codon kết thúc hoặc axit amin của protein được mã hóa bởi gen trong các mục (6) đến (10) tương ứng với vị trí 15 của SEQ ID NO: 50 không phải là alanin, và

trong đó protein được mã hóa bởi gen như được xác định ở trên trong các mục (16) đến (20) có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện được thay đổi so với protein có SEQ ID NO: 50, và

trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Tốt hơn là, phân tử axit nucleic tái tổ hợp có trình tự được chọn từ nhóm gồm

(21) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 51, hoặc

(22) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85% ví dụ ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% ví dụ ít nhất 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% ví dụ ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 51, hoặc

(23) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 51 ở điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt hơn nữa là ở điều kiện nghiêm ngặt cao, tốt nhất là ở điều kiện nghiêm ngặt rất cao, hoặc

(24) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 52, hoặc

(25) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ tương đồng ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 52,

trong đó codon của gen trong các mục (21) đến (25) tương ứng với vị trí 43 đến 45 của SEQ ID NO: 51 mã hóa axit amin threonin hoặc axit amin liên quan hoặc axit amin của protein được mã hóa bởi gen trong các mục (21) đến (25) tương ứng với vị trí 15 của SEQ ID NO: 52 là threonin hoặc axit amin liên quan, và

trong đó protein được mã hóa bởi gen như được xác định ở trên trong các mục (21) đến (25) có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện được thay đổi so với protein có SEQ ID NO: 50, và

trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Thuật ngữ “axit amin liên quan” hoặc “phần thể axit amin bảo toàn” nghĩa là axit amin được thay bằng axit amin có mạch bên tương tự. Danh mục các axit amin liên quan được đưa ra trong bảng 2 dưới đây. Bảng phần thể bảo toàn là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem ví dụ Creighton (1984) *Proteins*. W.H. Freeman và Company (Eds) và bảng 2 dưới đây).

Bảng 2: Ví dụ về các phần thể axit amin được bảo toàn

Gốc	Phần thể bảo toàn	Gốc	Phần thể bảo toàn
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu, Val		

Theo một phương án được ưu tiên, phân tử axit nucleic tái tổ hợp có SEQ ID NO: 3, 47, 51 và mã hóa protein có SEQ ID NO: 4, 48, 52, theo thứ tự.

Phương án khác nữa của sáng chế là phân tử axit amin tái tổ hợp có trình tự được chọn từ nhóm gồm:

- (26) phân tử axit amin chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 4, hoặc
- (27) phân tử axit amin có độ tương đồng 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4,

trong đó vi sinh vật chứa protein được gây đột biến như được xác định nhưng không

phải là protein kiểu đại có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Tốt hơn là, phân tử axit amin tái tổ hợp theo sáng chế có SEQ ID NO: 4.

Phương án khác nữa của sáng chế là phân tử axit amin tái tổ hợp có trình tự được chọn từ nhóm gồm:

(28) phân tử axit amin chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 48, hoặc

(29) phân tử axit amin có độ tương đồng 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 48,

trong đó axit amin của protein trong mục (29) tương ứng với vị trí 96 của SEQ ID NO: 48 là axit glutamic hoặc axit amin liên quan, và

trong đó protein như được xác định ở trên trong mục (29) có hoạt tính được tăng cường hoặc được tăng so với protein có SEQ ID NO: 46, và

trong đó vi sinh vật chứa protein được gây đột biến như được xác định nhưng không phải là protein kiểu đại có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Tốt hơn là, phân tử axit amin tái tổ hợp theo sáng chế có SEQ ID NO: 48.

Phương án khác nữa của sáng chế là phân tử axit amin tái tổ hợp có trình tự được chọn từ nhóm gồm:

(30) phân tử axit amin chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 52, hoặc

(31) phân tử axit amin có độ tương đồng 60%, tốt hơn là ít nhất 70% ví dụ ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80% ví dụ ít nhất 85%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 90% ví dụ ít nhất 95%, tốt nhất là ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 52,

trong đó axit amin của protein trong mục (31) tương ứng với vị trí 15 của SEQ ID NO: 52 là threonin hoặc axit amin liên quan, và

trong đó protein như được xác định ở trên trong mục (31) có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện được thay đổi so với protein có SEQ ID NO: 50, và

trong đó vi sinh vật chứa gen và/hoặc protein đột biến như được xác định ở trên có hiệu suất alanin được cải thiện trong quá trình lên men.

Tốt hơn là, phân tử axit amin tái tổ hợp theo sáng chế có SEQ ID NO: 52.

Định nghĩa

Cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở phương pháp cụ thể hoặc các quy trình cụ thể. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế, phạm vi của sáng chế sẽ chỉ được giới hạn ở các điểm yêu cầu bảo hộ. Cần lưu ý rằng, như được sử dụng trong bản mô tả và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít "một", và "và" bao gồm các dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh quy định rõ ràng khác. Do đó, ví dụ, việc chỉ dẫn đến "một vectơ" nghĩa là chỉ dẫn đến một hoặc nhiều vectơ và bao gồm các dạng tương đương của nó đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, v.v. Thuật ngữ "khoảng" được sử dụng ở đây có nghĩa là xấp xỉ, gần bằng, quanh hoặc trong khoảng. Khi thuật ngữ "khoảng" được sử dụng kết hợp với một khoảng số, nó thay đổi phạm vi đó bằng cách mở rộng biên lên trên và xuống dưới các giá trị số đã nêu. Nhìn chung, thuật ngữ "khoảng" được sử dụng ở đây để thay đổi một giá trị số ở trên và dưới giá trị đã nêu với biến thiên 20 phần trăm, tốt hơn là 10 phần trăm lên hoặc xuống (cao hơn hoặc thấp hơn). Như được sử dụng trong bản mô tả, từ "hoặc" có nghĩa là một thành phần của một danh sách cụ thể và cũng bao gồm sự tổ hợp bất kỳ của các thành phần trong danh sách đó. Các từ "chứa", "có chứa", "gồm" và "bao gồm" khi sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây nhằm chỉ định sự hiện diện của một hoặc nhiều dấu hiệu, số nguyên, thành phần, hoặc bước đã nêu, nhưng chúng không loại trừ sự hiện diện hoặc bổ sung một hoặc nhiều dấu hiệu, số nguyên, thành phần, bước hoặc nhóm của chúng. Để làm rõ, các thuật ngữ nhất định được sử dụng trong bản mô tả được xác định và được sử dụng như sau:

Vùng hóa mã: Như được sử dụng trong bản mô tả, "vùng mã hóa" khi được sử dụng liên quan đến gen cấu trúc chỉ các trình tự nucleotit mà mã hoá axit amin tìm thấy trong polypeptit mới sinh do sự dịch mã của phân tử mARN. Vùng mã hóa được giới hạn, trong tế bào nhân chuẩn, ở phía đầu 5' bởi bộ ba nucleotit "ATG" mã hóa methionin khởi đầu, các tế bào không nhân cũng sử dụng các bộ ba "GTG" và "TTG" làm codon khởi đầu. Ở phía đầu 3', nó được giới hạn bởi một trong ba bộ ba xác định codon kết thúc (tức là TAA, TAG, TGA). Ngoài ra, một gen có thể bao gồm các trình tự nằm trên cả đầu 5' và 3' của các trình tự có trong sản phẩm phiên mã ARN. Các

trình tự này được gọi là trình tự hoặc vùng "kẹp sườn" (các trình tự kẹp sườn này nằm ở đầu 5' hoặc 3' so với các trình tự không dịch mã có mặt trên sản phẩm phiên mã mARN). Vùng kẹp sườn 5' có thể chứa các trình tự điều hòa như trình tự khởi đầu và các gen tăng cường điều khiển hoặc tác động đến sự mã phiên của gen. Vùng kẹp sườn 3' có thể chứa các trình tự trực tiếp kết thúc quá trình phiên mã, phân cắt sau phiên mã và polyadenyl hóa.

Bổ sung: "bổ sung" hoặc "tính bổ sung" đề cập đến hai trình tự nucleotit gồm các trình tự nucleotit đối song song có khả năng ghép cặp với nhau (theo quy tắc ghép cặp bazơ) khi hình thành các liên kết hydro giữa các gốc bazơ bổ sung trong trình tự nucleotit đối song song. Ví dụ, trình tự 5'-AGT-3' bổ sung cho trình tự 5'-ACT-3'. Tính bổ sung có thể là "một phần" hoặc "toàn bộ". Tính bổ sung "một phần" là khi một hoặc nhiều bazơ axit nucleic không bắt cặp theo quy tắc ghép cặp bazơ. Tính bổ sung "toàn bộ" hoặc "hoàn toàn" giữa các phân tử axit nucleic là khi mỗi và mọi bazơ axit nucleit được bắt cặp với bazơ khác theo quy tắc ghép cặp bazơ. Mức độ bổ sung giữa các sợi phân tử axit nucleic có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả và độ bền của sự lai ghép giữa các sợi phân tử axit nucleic. "Bổ thể" của một trình tự axit nucleit như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến một trình tự nucleotit mà các phân tử axit nucleit của nó cho thấy sự bổ sung toàn bộ với các phân tử axit nucleit của trình tự axit nucleic này.

Nội sinh: trình tự nucleotit "nội sinh" chỉ trình tự nucleotit có mặt trong bộ gen của vi sinh vật kiểu đại.

Mức độ biểu hiện được tăng cường: mức độ biểu hiện "được tăng cường" hoặc "được tăng" của phân tử axit nucleic trong một sinh vật sinh vật được sử dụng tương đương trong bản mô tả và có nghĩa là mức độ biểu hiện của một phân tử axit nucleic trong một vi sinh vật cao hơn so với sinh vật tham chiếu, ví dụ kiểu đại. Các thuật ngữ "được tăng cường" hoặc "được tăng" như được sử dụng trong bản mô tả nghĩa là mức độ biểu hiện của phân tử axit nucleic cần được biểu hiện cao hơn, tốt hơn là cao hơn đáng kể. Như được sử dụng trong bản mô tả, "sự tăng cường" hoặc "sự tăng" hàm lượng của một chất như protein, mARN hoặc ARN có nghĩa là hàm lượng được tăng so với vi sinh vật giống về cơ bản được cho phát triển ở các điều kiện về cơ bản là giống nhau. Như được sử dụng trong bản mô tả, "sự tăng cường" hoặc "sự tăng" hàm lượng một chất, như ví dụ preARN, mARN, rARN, tARN, được biểu hiện bởi gen

mục tiêu và/hoặc của sản phẩm protein được mã hóa bởi nó, có nghĩa là hàm lượng này được tăng 50% hoặc nhiều hơn, ví dụ 100% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 200% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là gấp 5 lần hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là gấp 10 lần hoặc nhiều hơn, tốt nhất là gấp 20 lần hoặc nhiều hơn, ví dụ gấp 50 lần so với vi sinh vật tham chiếu thích hợp. Sự tăng cường hoặc tăng này có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Do đó, sự tăng cường hoặc tăng số lượng axit nucleic hoặc protein có thể được xác định ví dụ bằng phương pháp phát hiện miễn dịch của protein. Ngoài ra, các kỹ thuật như phân tích protein, sự phát huỳnh quang, lai Northern, thử nghiệm bảo vệ nucleaza, phiên mã ngược (RT-PCR định lượng), ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym), thẩm tách Western, thử nghiệm miễn dịch bức xạ (RIA) hoặc các thử nghiệm miễn dịch khác và phân tích tế bào được hoạt hóa huỳnh quang khác (FACS) có thể được sử dụng để đo một protein hoặc ARN cụ thể trong một sinh vật vi. Tùy thuộc vào loại sản phẩm protein được cảm ứng, hoạt tính của nó hoặc tác dụng lên kiểu hình của vi sinh vật cũng có thể được xác định. Phương pháp xác định số lượng protein đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phương pháp có thể được nêu là: phương pháp micro-Biuret (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), phương pháp Folin-Ciocalteu (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) hoặc đo độ hấp thụ của CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254).

Mức độ biểu hiện: "Mức độ biểu hiện" đề cập đến sự sinh tổng hợp sản phẩm gen, tốt hơn là sự phiên mã và/hoặc dịch mã trình tự nucleotit, ví dụ gen nội sinh hoặc gen khác loại, trong một tế bào. Ví dụ, trong trường hợp gen cấu trúc, mức độ biểu hiện liên quan đến sự phiên mã của gen cấu trúc thành mARN và - tùy ý - sau đó dịch mã mARN thành một hoặc nhiều polypeptit. Trong các trường hợp khác, mức độ biểu hiện có thể chỉ đề cập đến sự phiên mã ADN chứa phân tử ARN.

Ngoại lai: Thuật ngữ "ngoại lai" chỉ phân tử axit nucleic bất kỳ (ví dụ, trình tự gen) được đưa vào tế bào bằng các thao tác thử nghiệm và có thể bao gồm các trình tự tìm thấy trong tế bào đó miễn là trình tự đưa vào chứa cải biến nhất định (ví dụ, đột biến điểm, sự hiện diện của một gen đánh dấu có chọn lọc, v.v.) và do đó khác so với trình tự có trong tự nhiên.

Liên kết về mặt chức năng: Thuật ngữ "liên kết về mặt chức năng" hoặc "được

liên kết về mặt chức năng" tương đương với thuật ngữ "liên kết có điều khiển" hoặc "được liên kết có điều khiển" và được hiểu có nghĩa là, ví dụ, sự sắp xếp tuần tự yếu tố điều hòa (ví dụ, trình tự khởi đầu) với trình tự axit nucleic cần được biểu hiện và, nếu thích hợp, các yếu tố điều hòa khác nữa (ví dụ, gen kết thúc) theo cách sao cho mỗi yếu tố điều hòa này có thể hoàn thành chức năng dự định của nó để cho phép, sửa đổi, hỗ trợ hoặc theo cách khác là tác động đến mức độ biểu hiện của trình tự axit nucleic. Là một từ đồng nghĩa, cụm từ "liên kết có điều khiển" hoặc "được liên kết có điều khiển" có thể được sử dụng. Việc biểu hiện có thể xảy ra tùy thuộc vào sự sắp xếp của các trình tự axit nucleic so với ARN mang mã hoặc đối mã. Về mặt này, liên kết trực tiếp theo nghĩa hóa học không nhất thiết cần đến. Các trình tự điều khiển gen như, ví dụ, trình tự gen tăng cường, cũng có thể thể hiện chức năng của chúng đối với trình tự đích từ các vị trí cách xa, hoặc thực sự từ phân tử ADN khác. Các sắp xếp được ưu tiên là các sắp xếp trong đó trình tự axit nucleic cần được biểu hiện tái tổ hợp được đặt sau trình tự đóng vai trò là trình tự khởi đầu, sao cho hai trình tự liên kết cộng hóa trị với nhau. Theo phương án được ưu tiên, trình tự axit nucleic cần được phiên mã được đặt phía sau trình tự khởi đầu theo cách sao cho sự bắt đầu phiên mã giống như sự bắt đầu mong muốn của ARN thể khảm theo sáng chế. Liên kết về mặt chức năng, và cấu trúc biểu hiện, có thể được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp và tách dòng thông thường như đã mô tả (ví dụ, trong Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), Ausubel và cộng sự (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, Gelvin và cộng sự (Eds) (1990) *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Hà Lan). Tuy nhiên, các trình tự khác, ví dụ, hoạt động như phần tử liên kết với các vị trí phân cắt đặc hiệu đối với các enzym giới hạn, hoặc như một peptit tín hiệu, cũng có thể được đặt giữa hai trình tự này. Việc cài xen các trình tự cũng có thể dẫn đến sự biểu hiện của các protein dung hợp. Tốt hơn là, cấu trúc biểu hiện, bao gồm liên kết của vùng điều hòa, ví dụ như trình tự trình tự khởi đầu và axit nucleic cần được biểu hiện, có thể tồn tại ở dạng kết hợp với vector hoặc có thể được cài xen vào bộ gen, ví dụ bằng cách biến nạp.

Gen: Thuật ngữ "gen" chỉ vùng được liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa thích hợp có khả năng điều hòa mức độ biểu hiện của sản phẩm gen (ví dụ, poly-

peptit hoặc ARN chức năng) theo một cách nhất định. Gen bao gồm vùng điều hòa chưa được dịch mã của ADN (ví dụ, trình tự khởi đầu, gen tăng cường, gen kìm hãm, v.v.) trước (ngược chiều) và sau (xuôi chiều) vùng mã hóa (khung đọc mở, ORF). Thuật ngữ "gen cấu trúc" như được sử dụng trong bản mô tả được dự định chỉ trình tự ADN được phiên mã thành mARN, mARN này sau đó được dịch mã thành trình tự axit amin đặc trưng của polypeptit cụ thể.

Bộ gen và ADN bộ gen: Các thuật ngữ "bộ gen" hoặc "ADN bộ gen" đề cập đến thông tin di truyền có thể kế thừa của sinh vật chủ. ADN bộ gen này bao gồm ADN của nucleoít và cả ADN của plasmit tự sao chép.

Khác loại: Thuật ngữ "khác loại" đối với phân tử axit nucleic hoặc ADN chỉ phân tử axit nucleic liên kết có điều khiển với, hoặc được can thiệp để trở thành được liên kết có điều khiển với, phân tử axit nucleic thứ hai mà nó không được liên kết có điều khiển trong tự nhiên, hoặc nó được liên kết có điều khiển ở một vị trí khác trong tự nhiên. Cấu trúc biểu hiện khác loại bao gồm phân tử axit nucleic và một hoặc nhiều phân tử axit nucleic điều hòa (như trình tự khởi đầu hoặc tín hiệu kết thúc phiên mã) liên kết với nó, ví dụ là cấu trúc thu được bằng các thao tác thử nghiệm trong đó hoặc a) phân tử axit nucleic, hoặc b) phân tử axit nucleic điều hòa đã nêu hoặc c) cả hai (tức là (a) và (b)) không nằm trong môi trường gen tự nhiên (bản địa) của nó hoặc đã được biến đổi bằng các thao tác thử nghiệm, ví dụ về việc biến đổi là thay thế, bổ sung, xóa, đảo ngược hoặc cài xen một hoặc nhiều gốc nucleotit. Môi trường gen tự nhiên chỉ ở gen trong bộ gen tự nhiên trong sinh vật gốc, hoặc sự hiện diện trong một thư viện bộ gen. Trong trường hợp thư viện bộ gen, môi trường gen tự nhiên của trình tự phân tử axit nucleic tốt hơn là được giữ lại, ít nhất là một phần. Môi trường này kẹp sườn trình tự axit nucleic ít nhất ở một bên và có trình tự dài ít nhất 50 bp, tốt hơn là ít nhất 500 bp, đặc biệt tốt hơn là ít nhất 1000 bp, rất đặc biệt tốt hơn là ít nhất 5000 bp. Cấu trúc biểu hiện có trong tự nhiên - ví dụ tổ hợp có trong tự nhiên của trình tự khởi đầu với gen tương ứng - trở thành cấu trúc biểu hiện chuyển gen khi nó được biến đổi bằng các phương pháp "nhân tạo" phi tự nhiên, tổng hợp như, ví dụ, gây đột biến. Các phương pháp này đã được mô tả (US 5,565,350, WO 00/15815). Ví dụ, phân tử axit nucleic mã hóa protein liên kết có điều khiển với trình tự khởi đầu, mà không phải là trình tự khởi đầu tự nhiên của phân tử này, được xem là khác loại với trình tự khởi đầu này. Tốt hơn là, ADN khác loại không phải là nội sinh hoặc không được kết hợp

tự nhiên với tế bào mà nó được đưa vào, mà thu được từ tế bào khác hoặc được tổng hợp. ADN khác loại cũng bao gồm trình tự ADN nội sinh, chứa cải biến nhất định, nhiều bản sao không có trong tự nhiên của trình tự ADN nội sinh, hoặc trình tự ADN không được kết hợp tự nhiên với trình tự ADN tự nhiên khác liên kết vật lý với ADN. Thông thường, mặc dù không nhất thiết, ADN khác loại mã hóa ARN hoặc protein thường không được tạo ra bởi tế bào ở đó nó được biểu hiện.

Lai: Thuật ngữ "lai" như được sử dụng trong bản mô tả bao gồm "quy trình bất kỳ nhờ đó sợi phân tử axit nucleic kết hợp với sợi bổ sung thông qua việc ghép cặp bazơ". (J. Coombs (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York). Sự lai và độ bền lai (nghĩa là, độ bền của sự kết hợp giữa các phân tử axit nucleic) bị tác động bởi các yếu tố như mức độ bổ sung giữa các phân tử axit nucleic, độ nghiêm ngặt của các điều kiện liên quan, T_m của thể lai được tạo thành, và tỉ lệ G:C trong các phân tử axit nucleic. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ " T_m " được sử dụng để chỉ "nhiệt độ nóng chảy". Nhiệt độ nóng chảy là nhiệt độ mà tại đó tập hợp các phân tử axit nucleic sợi kép trở nên bị tách đôi thành các sợi đơn. Phương trình tính toán T_m của phân tử axit nucleic là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như được chỉ ra bởi các tham khảo chuẩn, ước tính đơn giản của giá trị T_m có thể được tính bằng phương trình: $T_m = 81,5 + 0,41(\% G + C)$, khi phân tử axit nucleic có trong dung dịch nước ở NaCl 1M [xem ví dụ, Anderson and Young, Quantitative Hybridization, trong Nucleic Acid Hybridization (1985)]. Các tham khảo khác bao gồm các tính toán phức tạp hơn, có tính đến các tính chất cấu trúc cũng như trình tự để tính toán T_m . Các điều kiện nghiêm ngặt, đã được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể được tìm thấy trong Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

Các điều kiện lai thích hợp là, ví dụ lai ở các điều kiện tương đương với lai trong natri dodecyl sulfat (SDS) 7%, NaPO_4 0,5M, EDTA 1mM ở 50°C, rửa trong 2 X SSC, SDS 0,1% ở 50°C (độ nghiêm ngặt thấp) với phân tử axit nucleic chứa ít nhất 50, tốt hơn là ít nhất 100, tốt hơn là ít nhất 150, tốt hơn nữa là ít nhất 200, tốt nhất là ít nhất 250 nucleotit liên tiếp của bộ thể của trình tự. Các điều kiện lai thích hợp khác là lai trong natri dodecyl sulfat (SDS) 7%, NaPO_4 0,5M, EDTA 1mM ở 50°C, rửa trong 1 X SSC, 0,1% SDS ở 50°C (độ nghiêm ngặt trung bình) hoặc 65°C (độ nghiêm ngặt cao) với phân tử axit nucleic chứa ít nhất 50, tốt hơn là ít nhất 100, tốt hơn nữa là ít

nhất 150, tốt hơn nữa là ít nhất 200, tốt nhất là ít nhất 250 nucleotit liên tiếp của bộ thể của trình tự. Các điều kiện lai thích hợp khác là lai trong natri dodecyl sulfat (SDS) 7%, NaPO_4 0,5M, EDTA 1mM ở 50°C, rửa trong 0,1 X SSC, SDS 0,1% ở 65°C (độ nghiêm ngặt cao) với phân tử axit nucleic chứa ít nhất 50, tốt hơn là ít nhất 100, tốt hơn nữa là ít nhất 150, tốt hơn nữa là ít nhất 200, tốt nhất là ít nhất 250 nucleotit liên tiếp của bộ thể của trình tự.

“Độ đồng nhất”: “Độ đồng nhất” khi được sử dụng để so sánh hai hoặc nhiều phân tử axit nucleic hoặc axit amin có nghĩa là các trình tự của các phân tử đã nêu có cùng độ tương đồng trình tự ở mức nhất định, các trình tự này giống nhau một phần.

Để xác định phần trăm độ đồng nhất (độ tương đồng được sử dụng tương đương trong bản mô tả này nếu đề cập đến các trình tự axit nucleic) của hai trình tự axit amin hoặc của hai phân tử axit nucleic, các trình tự được viết kiểu một cái trên một cái dưới để so sánh tối ưu (ví dụ những khoảng trống có thể được chèn vào trình tự protein hoặc axit nucleic để tạo ra sự sắp thẳng tối ưu với protein khác hoặc axit nucleit khác).

Các gốc axit amin hoặc phân tử axit nucleic tại các vị trí axit amin tương ứng hoặc các vị trí nucleotit sau đó được so sánh. Nếu vị trí trong một trình tự bị chiếm bởi cùng một gốc axit amin hoặc cùng một phân tử axit nucleic như là vị trí tương ứng trong trình tự khác, thì các phân tử giống nhau ở vị trí này. Phần trăm độ đồng nhất giữa hai trình tự là hàm của số vị trí giống nhau có chung các trình tự (tức là % độ đồng nhất = số vị trí giống nhau/tổng số vị trí x 100). Các thuật ngữ "độ tương đồng" và "độ đồng nhất" được coi là các từ đồng nghĩa khi đề cập đến các trình tự axit nucleic. Khi đề cập đến độ đồng nhất, thuật ngữ độ đồng nhất chỉ các axit amin giống nhau tại một vị trí cụ thể trong một trình tự, thuật ngữ độ tương đồng chỉ các axit amin tương đồng tại một vị trí cụ thể trong một trình tự. Axit amin tương đồng là axit amin có mạch bên tương tự. Họ các gốc axit amin có các mạch bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phân tử axit nucleic mã hóa protein tương đồng với protein theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách đưa một hoặc nhiều phần thay thế, bổ sung hoặc xóa nucleotit vào trình tự nucleotit sao cho một hoặc nhiều phần thay thế, bổ sung hoặc xóa axit amin được đưa vào protein đã được mã hóa. Các đột biến có thể được đưa vào một trong số các trình tự theo sáng chế bằng các kỹ thuật chuẩn, như gây đột biến

định hướng vị trí và gây đột biến qua trung gian PCR. Tốt hơn là, các thay thế axit amin bảo toàn được thực hiện ở một hoặc nhiều nguồn gốc axit amin không thiết yếu được dự đoán. “Sự thay thế axit amin bảo toàn” là sự thay thế trong đó gốc axit amin được thay bằng gốc axit amin có mạch bên tương tự. Họ các gốc axit amin có các mạch bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các họ này bao gồm axit amin có các mạch bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), mạch bên axit (ví dụ axit aspartic, axit glutamic), các mạch bên phân cực không mang điện tích (ví dụ glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), các mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan), các mạch bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Do đó, gốc axit amin không thiết yếu được dự đoán trong protein theo sáng chế tốt hơn là được thay bằng gốc axit amin khác từ cùng một họ mạch bên.

Hoặc, theo phương án khác, các đột biến có thể được đưa vào ngẫu nhiên dọc theo toàn bộ hoặc một phần của trình tự mã hóa, như bằng việc gây đột biến bão hòa, và các thể đột biến thu được có thể được sàng lọc hoạt tính tương ứng được mô tả ở đây để xác định thể đột biến mà vẫn còn hoạt tính của chúng. Sau khi gây đột biến một trong số các trình tự theo sáng chế, protein đã mã hóa có thể được biểu hiện tái tổ hợp và hoạt tính của protein có thể được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, các thử nghiệm được mô tả ở đây.

Để xác định phân trăm độ đồng nhất của hai hoặc nhiều axit amin hoặc của hai hoặc nhiều trình tự nucleotit, một số chương trình phần mềm máy tính đã được phát triển. Độ đồng nhất của hai hoặc nhiều trình tự có thể được tính toán bằng, ví dụ phần mềm fasta, hiện đã được sử dụng ở phiên bản fasta 3 (WR Pearson and DJ Lipman, PNAS 85, 2444 (1988), WR Pearson, Methods in Enzymology 183, 63 (1990), WR Pearson and DJ Lipman, PNAS 85, 2444 (1988), WR Pearson, Enzymology 183, 63 (1990)). Một chương trình hữu ích khác để tính toán độ đồng nhất của các trình tự khác nhau là chương trình blast chuẩn, được đưa vào phần mềm Biomax Pedant (Biomax, Munich, Đức). Điều này không may là đôi khi dẫn đến kết quả không tối ưu vì việc blast không phải luôn luôn bao gồm các trình tự hoàn chỉnh của đối tượng và trình tự truy vấn. Tuy nhiên, vì chương trình này rất hiệu quả, nó có thể được sử dụng để so sánh một số lượng lớn các trình tự. Các cài đặt sau đây thường được sử

dụng để so sánh các trình tự như vậy:

-p tên chương trình [chuỗi]; -d cơ sở dữ liệu [chuỗi]; mặc định = nr; -i hồ sơ truy vấn [File In]; mặc định = stdin; -e giá trị kỳ vọng (E) [thực]; mặc định = 10,0; -m lựa chọn nhìn sắp thẳng: 0 = từng cặp; 1 = neo trình tự truy vấn thể hiện độ đồng nhất; 2 = neo trình tự truy vấn không đồng nhất; 3 = neo trình tự truy vấn phẳng, thể hiện độ đồng nhất; 4 = neo trình tự truy vấn phẳng, không đồng nhất; 5 = neo trình tự truy vấn không đồng nhất và đầu cùn; 6 = neo trình tự truy vấn phẳng, không đồng nhất và đầu cùn; 7 = XML Blast đầu ra; 8 = dạng bảng; 9 dạng bảng với các dòng nhận xét [Số nguyên]; mặc định = 0; -o hồ sơ đầu ra báo cáo BLAST [File Out] Tùy chọn; mặc định = stdout; -F trình tự truy vấn bộ lọc (DUST với blastn, SEG với các cái khác) [chuỗi]; mặc định = T; -G giá trị mở khoảng trống (0 gọi ra hành vi mặc định) [Số nguyên]; mặc định = 0; -E giá trị kéo dài khoảng trống (0 gọi ra hành vi mặc định) [Số nguyên]; mặc định = 0; -X giá trị giảm X đối với sự sắp thẳng có khoảng trống (theo bit) (0 gọi ra hành vi mặc định); blastn 30, megablast 20, tblastx 0, tất cả các cái khác 15 [Số nguyên]; mặc định = 0; -I thể hiện GI trong dòng mô tả [T/F]; mặc định = F; -q điểm phạt đối với sự bắt cặp sai nucleotit (chỉ blastn) [Số nguyên]; mặc định = -3; -r điểm thưởng đối với sự bắt cặp nucleotit (chỉ blastn) [Số nguyên]; mặc định = 1; -v số trình tự cơ sở dữ liệu để thể hiện các mô tả một dòng đối với (V) [Số nguyên]; mặc định = 500; -b số trình tự cơ sở dữ liệu để thể hiện các sắp thẳng đối với (B) [Số nguyên]; mặc định = 250; -f ngưỡng để kéo dài các hit, mặc định nếu là 0; blastp 11, blastn 0, blastx 12, tblastn 13; tblastx 13, megablast 0 [Số nguyên]; mặc định = 0; -g thực hiện sắp thẳng có khoảng trống (không có sẵn với tblastx) [T/F]; mặc định = T; -Q mã gen truy vấn để sử dụng [Số nguyên]; mặc định = 1; -D mã gen DB (chỉ cho tblast[nx]) [Số nguyên]; mặc định = 1; -a số lượng bộ xử lý để sử dụng [Số nguyên]; mặc định = 1; -O hồ sơ SeqAlign [File Out] Tùy chọn; -J tin cậy dòng mô tả truy vấn [T/F]; mặc định = F; -M ma trận [chuỗi]; mặc định = BLOSUM62; -W cỡ chữ, mặc định nếu là 0 (blastn 11, megablast 28, tất cả các cái khác 3) [Số nguyên]; mặc định = 0; -z chiều dài hiệu quả của cơ sở dữ liệu (sử dụng 0 đối với cỡ thực) [Thực]; mặc định = 0; -K số lượng hit tốt nhất từ vùng để giữ (ngắt bằng mặc định, nếu sử dụng giá trị 100 được khuyến cáo) [Số nguyên]; mặc định = 0; -P 0 đối với nhiều hit, 1 đối với một hit [Số nguyên]; mặc định = 0; -Y chiều dài hiệu quả của khoảng không tra cứu (sử dụng 0 đối với cỡ thực) [Thực]; mặc định = 0; -S sợi truy vấn để tra cứu dựa trên

cơ sở dữ liệu (đối với blast[nx], và tblastx); 3 là cả hai, 1 là đỉnh, 2 là đáy [Số nguyên]; mặc định = 3; -T tạo ra đầu ra HTML [T/F]; mặc định = F; -l giới hạn tra cứu cơ sở dữ liệu ở danh sách GI [chuỗi] tùy chọn; -U sử dụng lọc trường hợp thấp của trình tự FASTA [T/F] tùy chọn; mặc định = F; -y giá trị giảm X đối với các kéo dài không tạo khoảng trống theo bit (0,0 gọi ra hành vi mặc định); blastn 20, megablast 10, tất cả các cái khác 7 [thực]; mặc định = 0,0; -Z giá trị giảm X đối với sự sắp thẳng có khoảng trống cuối cùng theo bit (0,0 gọi ra hành vi mặc định); blastn/megablast 50, tblastx 0, tất cả các cái khác 25 [Số nguyên]; mặc định = 0; -R hồ sơ điểm kiểm tra PSI-TBLASTN [File In] tùy chọn; -n tra cứu MegaBlast [T/F]; mặc định = F; -L định vị trên trình tự truy vấn [chuỗi] tùy chọn; -A cỡ cửa sổ nhiều hit, mặc định nếu là 0 (blastn/megablast 0, tất cả các cái khác 40 [Số nguyên]; mặc định = 0; -w điểm phạt dịch chuyển khung (thuật toán OOF đối với blastx) [Số nguyên]; mặc định = 0; -t chiều dài của intron lớn nhất cho phép trong tblastn để liên kết các HSP (0 không thể liên kết) [Số nguyên]; mặc định = 0.

Kết quả có chất lượng cao đạt được bằng cách sử dụng thuật toán của Needleman và Wunsch hoặc Smith và Waterman. Do đó, các chương trình dựa trên các thuật toán này được ưu tiên. Tốt hơn là, việc so sánh các trình tự có thể được thực hiện với chương trình PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351 (1987), Higgins và cộng sự, CABIOS 5, 151 (1989)) hoặc tốt hơn là với các chương trình "Gap" và "Needle", cả hai chương trình này đều dựa trên các thuật toán của Needleman và Wunsch (J. Mol. Biol 48, 443 (1970)), và "BestFit" dựa trên thuật toán của Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2, 482 (1981)). "Gap" và "BestFit" là một phần của gói phần mềm GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991); Altschul và cộng sự, (Nucleic Acids Res. 25, 3389 (1997)), "Needle" là một phần của gói phần mềm The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) (Trends in Genetics 16 (6), 276 (2000)). Do đó, tốt hơn là các tính toán để xác định phần trăm độ đồng nhất trình tự được thực hiện bằng chương trình "Gap" hoặc "Needle" trên toàn bộ khoảng trình tự. Các điều chỉnh chuẩn sau đây để so sánh các trình tự axit nucleic được sử dụng cho "Needle": ma trận: EDNAFULL, điểm trừ khoảng trống: 10,0, điểm trừ đoạn kéo dài: 0,5. Các điều chỉnh chuẩn sau đây để so sánh các trình tự axit nucleic được sử dụng cho "Gap": lượng khoảng cách: 50, lượng chiều dài: 3, bắt cặp trung bình: 10.000, bắt cặp sai trung bình: 0,000.

Ví dụ một trình tự, được cho là có độ đồng nhất 80% với SEQ ID NO 1 ở cấp độ axit nucleic được hiểu có nghĩa là trình tự, mà khi so sánh với trình tự được biểu thị bởi SEQ ID NO: 1 bởi chương trình "Needle" nêu trên với bộ tham số ở trên, có độ đồng nhất 80%. Tốt hơn là, độ đồng nhất được tính trên toàn bộ chiều dài của trình tự truy vấn, ví dụ SEQ ID NO:1.

Được phân lập: Thuật ngữ "được phân lập" như đã được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa là vật liệu được lấy ra bởi con người và tồn tại bên ngoài môi trường tự nhiên, nguyên thủy của nó và do đó không phải là sản phẩm của tự nhiên. Một vật liệu hoặc phân tử được phân lập (như một phân tử ADN hoặc enzym) có thể tồn tại ở dạng tinh khiết hoặc có thể tồn tại trong môi trường không tự nhiên như, ví dụ, trong tế bào chủ chuyển gen. Ví dụ, phân tử axit nucleic có trong tự nhiên hoặc polypeptit có trong tế bào sống không được phân lập, nhưng cùng một phân tử axit nucleic hoặc polypeptit này, được tách ra khỏi một số hoặc tất cả các vật liệu đang cùng tồn tại trong hệ tự nhiên, được phân lập. Các phân tử axit nucleic này có thể là một phần của một vector và/hoặc các phân tử axit nucleic hoặc polypeptit này có thể là một phần của một chế phẩm, và sẽ được phân lập để vector hoặc chế phẩm này không phải là một phần của môi trường gốc của nó. Tốt hơn là, thuật ngữ "được phân lập" khi được sử dụng liên quan đến phân tử axit nucleic, như trong "trình tự axit nucleic được phân lập" chỉ trình tự axit nucleic được xác định và tách ra từ ít nhất một phân tử axit nucleic tạp mà nó thường được kết hợp trong nguồn tự nhiên của nó. Phân tử axit nucleic được phân lập có mặt ở dạng hoặc thiết lập khác với dạng hoặc thiết lập mà nó được tìm thấy trong tự nhiên. Ngược lại, các phân tử axit nucleic không phân lập là các phân tử axit nucleic như ADN và ARN, được tìm thấy ở trạng thái chúng tồn tại trong tự nhiên. Ví dụ, trình tự ADN nhất định (ví dụ, gen) được tìm thấy trên nhiễm sắc thể của tế bào chủ nằm gần các gen lân cận; trình tự ARN, như trình tự mRNA cụ thể mã hóa protein cụ thể, được tìm thấy trong tế bào ở dạng hỗn hợp với nhiều mRNA khác, mã hóa nhiều protein. Tuy nhiên, trình tự axit nucleic được phân lập chứa, ví dụ SEQ ID NO: 1 bao gồm, ví dụ, các trình tự axit nucleic như vậy trong các tế bào mà thường có SEQ ID NO: 1 trong đó trình tự axit nucleic nằm trong vị trí trong bộ gen hoặc plasmit khác với vị trí của các tế bào tự nhiên, hoặc theo cách khác là được kẹp sườn bởi trình tự axit nucleic khác với trình tự tìm thấy trong tự nhiên. Trình tự axit nucleic có thể có mặt ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Khi trình tự axit nucleic đã phân lập cần được sử

dụng để biểu hiện protein, trình tự axit nucleic này sẽ chứa tối thiểu ít nhất một phần sợi mang mã hoặc mã hóa (nghĩa là, trình tự axit nucleic có thể là sợi đơn). Theo cách khác, nó có thể chứa cả sợi mang mã và đối mã (nghĩa là, trình tự axit nucleic có thể là sợi kép).

Không mã hóa: Thuật ngữ "không mã hóa" chỉ trình tự của phân tử axit nucleic không mã hoá một phần hoặc tất cả các protein được biểu hiện. Các trình tự không mã hóa bao gồm nhưng không giới hạn ở gen tăng cường, vùng trình tự khởi đầu, vùng không được dịch mã 3' và vùng không được dịch mã 5'.

Axit nucleic và nucleotit: Các thuật ngữ "axit nucleic" và "nucleotit" chỉ axit nucleic hoặc nucleotit có trong tự nhiên hoặc tổng hợp hoặc nhân tạo. Các thuật ngữ "axit nucleic" và "nucleotit" bao gồm deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit hoặc dạng tương tự nucleotit bất kỳ và polyme hoặc thể lai của nó ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép, mang mã hoặc đối mã. Trừ khi có quy định khác, trình tự axit nucleic cụ thể còn bao gồm các biến thể được biến đổi bảo toàn của nó (ví dụ, các thay thế codon thoái hóa) và trình tự bổ sung, cũng như trình tự được nêu rõ. Thuật ngữ "axit nucleic" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả với "gen", "cADN", mARN", "oligonucleotit", và "phân tử axit nucleic". Các dạng tương tự nucleotit bao gồm các nucleotit có các biến đổi trong cấu trúc hóa học của bazơ, đường và/hoặc phosphat, bao gồm nhưng không giới hạn ở, các biến đổi pyrimidin vị trí 5, biến đổi purin vị trí 8, biến đổi ở các amin ngoài vòng xytosin, thay thế 5-bromo-uraxil, và tương tự; và các biến đổi đường vị trí 2' bao gồm nhưng không giới hạn ở, ribonucleotit biến đổi đường trong đó 2'-OH được thay thế bằng nhóm được chọn từ H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, hoặc CN. ARN kẹp tóc ngắn (shARN) cũng có thể chứa các thành phần không tự nhiên như bazơ không tự nhiên, ví dụ, ionosin và xanthin, đường không tự nhiên, ví dụ, 2'-metoxy riboza, hoặc liên kết phosphodiester không tự nhiên, ví dụ, methylphosphonat, phosphorothioat và peptit.

Trình tự axit nucleic: Cụm từ "trình tự axit nucleic" chỉ polyme sợi đơn hoặc đôi của các bazơ deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit được đọc từ đầu 5' đến 3'. Nó bao gồm ADN nhiễm sắc thể, các plasmit tự sao chép, các polyme gây nhiễm của ADN hoặc ARN và ADN hoặc ARN thực hiện vai trò cấu trúc chủ yếu. "Trình tự axit nucleic" cũng đề cập đến danh sách liên tiếp các chữ viết tắt, chữ cái, ký tự hoặc từ, biểu thị các nucleotit. Theo một phương án, axit nucleic có thể là "đoạn dò" mà là axit nu-

cleic tương đối ngắn, thường có chiều dài ít hơn 100 nucleotit. Thông thường, đoạn dò axut nucleic có chiều dài nằm trong khoảng từ 50 nucleotit đến 10 nucleotit. "Vùng mục tiêu" của axit nucleic là một phần của axit nucleic được xác định là quan tâm. "Vùng mã hóa" của axit nucleic là phần của axit nucleic, được phiên mã và dịch mã theo cách đặc hiệu trình tự để tạo ra polypeptit hoặc protein cụ thể khi được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự điều hòa thích hợp. Vùng mã hóa được cho là mã hóa polypeptit hoặc protein này.

Oligonucleotit: Thuật ngữ "oligonucleotit" chỉ oligome hoặc polyme của axit ribonucleic (ARN) hoặc axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc dạng mô phỏng của nó, cũng như các oligonucleotit có các phần không có trong tự nhiên có chức năng tương tự. Các oligonucleotit được biến đổi hoặc được thay thế này thường được ưu tiên hơn so với các dạng tự nhiên do có các thuộc tính mong muốn như ví dụ, sự hấp thu tế bào tăng, ái lực đối với nucleit axit mục tiêu tăng và độ ổn định tăng khi có mặt nucleaza. Oligonucleotit tốt hơn là bao gồm hai hoặc nhiều nucleomonomer liên kết cộng hóa trị với nhau bởi các liên kết (ví dụ, phosphodiester) hoặc các liên kết thay thế.

Phần nhô ra: "phần nhô ra" là trình tự nucleotit sợi đơn tương đối ngắn ở đầu 5'-hoặc 3'-hydroxyl của phân tử oligonucleotit sợi kép (còn gọi là "phần mở rộng", "đầu nhô ra" hoặc "đầu dính").

Polypeptit: Thuật ngữ "polypeptit", "peptit", "oligopeptit", "polypeptit", "sản phẩm gen", "sản phẩm biểu hiện" và "protein" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả, chỉ polyme hoặc oligome của các gốc axit amin liên tiếp.

Trình tự khởi đầu: Thuật ngữ "trình tự khởi đầu", hoặc "trình tự trình tự khởi đầu" là các từ tương đương và như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ trình tự ADN mà khi được liên kết có điều khiển với trình tự nucleotit quan tâm có khả năng điều khiển sự phiên mã của trình tự nucleotit quan tâm thành ARN. Trình tự khởi đầu nằm ở vị trí 5' (tức là ngược chiều), gần với vị trí bắt đầu phiên mã của trình tự nucleotit quan tâm có sự phiên mã thành mARN nó điều khiển, và cung cấp một vị trí liên kết đặc hiệu bởi ARN polymeraza và các yếu tố phiên mã khác để khởi đầu quá trình phiên mã. Trình tự khởi đầu không bao gồm vùng mã hóa hoặc vùng không được dịch mã 5'. Trình tự khởi đầu có thể, ví dụ khác loại hoặc tương đồng với tế bào tương ứng. Trình tự phân tử axit nucleic "khác loại với" sinh vật hoặc trình tự phân tử axit

nucleic thứ hai nếu nó có nguồn gốc từ loài ngoại lai, hoặc, nếu từ cùng một loài, được biến đổi từ dạng ban đầu của nó. Ví dụ, trình tự khởi đầu liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa khác loại chỉ trình tự mã hoá từ loài khác với loài từ đó thu được trình tự khởi đầu này, hoặc, nếu từ cùng một loài, trình mã hóa mà không được kết hợp tự nhiên với trình tự khởi đầu (ví dụ trình tự mã hoá được xử lý di truyền hoặc alen từ kiểu sinh thái hoặc giống khác nhau). Trình tự khởi đầu thích hợp có thể thu được từ các gen của các tế bào chủ trong đó có sự biểu hiện hoặc từ các mầm bệnh đối với vật chủ này.

Tinh chế: như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "tinh chế" chỉ các phân tử, hoặc trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin được loại bỏ khỏi môi trường tự nhiên của chúng, được phân lập hoặc tách. Các phân tử "được tinh chế về cơ bản" là không chứa "ít nhất 60%, tốt hơn là không chứa ít nhất 75%, và tốt hơn là không chứa ít nhất 90% các thành phần khác mà chúng được kết hợp trong tự nhiên. Trình tự axit nucleic được tinh chế có thể là trình tự axit nucleic được phân lập.

Tái tổ hợp: Thuật ngữ "tái tổ hợp" đối với phân tử axit nucleic chỉ các phân tử axit nucleic được tạo ra bởi các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Thuật ngữ cũng bao gồm các phân tử axit nucleic mà không tồn tại trong tự nhiên nhưng không được sửa đổi, thay đổi, gây đột biến hoặc theo cách khác là bị can thiệp bởi con người. Tốt hơn là, "phân tử axit nucleic tái tổ hợp" là phân tử axit nucleic không có trong tự nhiên khác về trình tự so với phân tử axit nucleic có trong tự nhiên ít nhất một axit nucleic. "Phân tử axit nucleic tái tổ hợp" cũng có thể bao gồm "cấu trúc tái tổ hợp" chứa, tốt hơn là liên kết có điều khiển với, trình tự của phân tử axit nucleic không có trong tự nhiên ở thứ tự đó. Các phương pháp được ưu tiên để sản xuất phân tử axit nucleic tái tổ hợp có thể bao gồm các kỹ thuật tách dòng, gây đột biến định hướng hoặc không định hướng, kỹ thuật tổng hợp hoặc tái tổ hợp.

Tăng đáng kể: Sự tăng, ví dụ hoạt tính enzym, mức độ biểu hiện gen, hiệu suất hoặc năng suất của một sản phẩm nhất định, mà lớn hơn biên sai số cố hữu trong kỹ thuật đo lường, tốt hơn là tăng khoảng 10% hoặc 25%, tốt hơn là 50% hoặc 75%, tốt hơn nữa là gấp 2 lần hoặc gấp 5 lần hoặc nhiều hơn hoạt tính, mức độ biểu hiện, hiệu suất hoặc năng suất của enzym điều khiển hoặc mức độ biểu hiện trong tế bào điều khiển, hiệu suất hoặc năng suất của tế bào điều khiển, còn tốt hơn nữa là tăng khoảng 10 lần hoặc nhiều hơn.

Giảm đáng kể: Sự giảm, ví dụ hoạt tính enzym, mức độ biểu hiện gen, hiệu suất hoặc năng suất của một sản phẩm nhất định, mà lớn hơn biên sai số cố hữu của kỹ thuật đo lường, tốt hơn là giảm ít nhất khoảng 5% hoặc 10%, tốt hơn là ít nhất khoảng 20% hoặc 25%, tốt hơn là ít nhất khoảng 50% hoặc 75%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 80% hoặc 85%, tốt nhất là ít nhất khoảng 90%, 95%, 97%, 98% hoặc 99%.

Bổ sung đáng kể: Theo nghĩa rộng nhất, thuật ngữ "bổ sung đáng kể", khi được sử dụng trong bản mô tả đối với trình tự nucleotit trong mối quan hệ với trình tự nucleotit tham chiếu hoặc mục tiêu, nghĩa là trình tự nucleotit có phần trăm đồng nhất giữa trình tự nucleotit bổ sung đáng kể với trình tự nucleotit bổ sung chính xác của trình tự nucleotit tham chiếu hoặc mục tiêu là ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80% hoặc 85%, tốt hơn là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 93%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 95% hoặc 96%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 97% hoặc 98%, còn tốt hơn nữa là ít nhất 99% hoặc tốt nhất là 100% (100% tương đương với thuật ngữ "giống nhau" trong ngữ cảnh này). Tốt hơn là, độ đồng nhất được đánh giá trên chiều dài ít nhất là 19 nucleotit, tốt hơn là ít nhất 50 nucleotit, tốt hơn nữa là trên toàn bộ chiều dài của trình tự axit nucleic với trình tự tham khảo (nếu không được quy định khác dưới đây). Các so sánh trình tự được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp phân tích GAP mặc định bằng ứng dụng GAP của University of Wisconsin GCG, SEAPWEB, dựa trên thuật toán của Needleman và Wunsch (Needleman and Wunsch (1970) J Mol, Biol 48: 443-453; được xác định ở trên). Trình tự nucleotit "bổ sung đáng kể" với trình tự nucleotit tham chiếu lại với trình tự nucleotit tham chiếu trong điều kiện có độ nghiêm ngặt thấp, tốt hơn là điều kiện nghiêm ngặt trung bình, tốt nhất là điều kiện nghiêm ngặt cao (như được xác định ở trên).

Gen chuyển: Thuật ngữ "gen chuyển" như được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến trình tự axit nucleic, được đưa vào bộ gen của một tế bào bằng các thao tác thử nghiệm. Gen chuyển có thể là "trình tự ADN nội sinh" hoặc "trình tự ADN khác loại" (tức là "ADN ngoại lai"). Thuật ngữ "trình tự ADN nội sinh" chỉ trình tự nucleotit, được tìm thấy trong tự nhiên trong tế bào mà nó được đưa vào miễn là nó không chứa biến đổi nhất định (ví dụ, đột biến điểm, sự có mặt của gen đánh dấu có chọn lọc, v.v.) so với trình tự có trong tự nhiên.

Chuyển gen: Thuật ngữ chuyển gen khi đề cập đến sinh vật nghĩa là được biến nạp, tốt hơn là được biến nạp ổn định, với phân tử ADN tái tổ hợp mà tốt hơn là chứa

trình tự khởi đầu thích hợp liên kết có điều khiển với trình tự ADN quan tâm.

Vector: Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "vector" chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển phân tử axit nucleic khác mà nó được liên kết với. Một loại vector là vector được kết hợp vào bộ gen, hoặc "vector kết hợp", mà có thể được kết hợp vào ADN bộ gen của tế bào chủ. Một loại vector khác là vector episom, nghĩa là, plasmit hoặc phân tử axit nucleic có khả năng sao chép ngoài nhiễm sắc thể. Vector có khả năng định hướng sự biểu hiện của gen mà chúng được liên kết có điều khiển trong bản mô tả này được gọi là "vector biểu hiện". Trong bản mô tả này, "plasmit" và "vector" được sử dụng thay thế lẫn nhau trừ khi được quy định rõ ràng khác trong phần mô tả.

Kiểu đại: Thuật ngữ "kiểu đại", "tự nhiên" hoặc "nguồn gốc tự nhiên" đối với sinh vật có nghĩa là sinh vật đó không bị biến đổi, bị gây đột biến, hoặc theo cách khác là bị can thiệp bởi con người. Đối với trình tự polypeptit hoặc axit nucleic, nghĩa là trình tự polypeptit hoặc axit nucleic có trong tự nhiên hoặc có sẵn ít nhất một sinh vật có trong tự nhiên không bị biến đổi, bị gây đột biến, hoặc theo cách khác là bị can thiệp bởi con người.

Kiểu đại của vi sinh vật chỉ vi sinh vật mà bộ gen của nó có mặt ở trạng thái như trước khi đưa vào sự biến đổi gen cho một gen nhất định. Việc biến đổi gen có thể, ví dụ là xóa gen hoặc một phần của nó hoặc đột biến điểm hoặc đưa vào gen.

Thuật ngữ "sản lượng" hoặc "năng suất" đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm nồng độ của sản phẩm lên men (ví dụ, alanin) tạo ra trong khoảng thời gian xác định và thể tích lên men xác định (ví dụ, kg sản phẩm trong một giờ trên một lít). Thuật ngữ "hiệu quả sản xuất" bao gồm thời gian cần để đạt được lượng sản xuất cụ thể (ví dụ, mất bao lâu để tế bào đạt được tỷ lệ đầu ra cụ thể của hóa chất tinh khiết). Năng suất cũng có thể là hiệu suất không gian-thời gian được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thể tích thiết bị phản ứng và cho thời gian.

Thuật ngữ "hiệu suất" hoặc "hiệu suất sản phẩm/cacbon" đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm hiệu quả của việc chuyển hóa nguồn cacbon thành sản phẩm (nghĩa là, hóa chất tinh khiết). Nó thường được viết là, ví dụ, kg sản phẩm trên kg nguồn cacbon. Bằng cách tăng hiệu suất hoặc việc sản xuất hợp chất, lượng phân tử được thu hồi hoặc phân tử thu hồi hữu ích của hợp chất đó ở lượng môi trường nuôi

cấy xác định trong một khoảng thời gian xác định được tăng.

Thuật ngữ “vi sinh vật tái tổ hợp” bao gồm vi sinh vật được biến đổi gen sao cho chúng thể hiện kiểu gen và/hoặc kiểu hình được thay đổi hoặc khác (ví dụ, khi sự biến đổi gen tác động đến trình tự axit nucleic mã hóa của vi sinh vật) so với vi sinh vật kiểu đại từ đó chúng thu được. Vi sinh vật tái tổ hợp chứa ít nhất một phân tử ADN tái tổ hợp.

Thuật ngữ “tái tổ hợp” đối với ADN chỉ phân tử ADN được tạo ra bởi con người bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Thuật ngữ này bao gồm phân tử các ADN mà bản thân nó không tồn tại trong tự nhiên hoặc không tồn tại trong sinh vật từ đó thu được ADN này, nhưng được cải biến, biến đổi, được gây đột biến hoặc theo cách khác là được can thiệp bởi con người. Tốt hơn là, “phân tử ADN tái tổ hợp” là phân tử axit nucleic không có trong tự nhiên khác về trình tự với phân tử axit nucleic có trong tự nhiên ít nhất một axit nucleic. “Phân tử ADN tái tổ hợp” cũng có thể bao gồm “cấu trúc tái tổ hợp” chứa, tốt hơn là liên kết có điều khiển với, trình tự của phân tử axit nucleic không có trong tự nhiên theo thứ tự đó. Phương pháp được ưu tiên để sản xuất phân tử ADN tái tổ hợp này có thể bao gồm các kỹ thuật tách dòng, gây đột biến định hướng hoặc không định hướng, tổng hợp gen hoặc kỹ thuật tái tổ hợp.

Ví dụ về ADN tái tổ hợp này là plasmit mà trình tự ADN khác loại được đưa vào đó hoặc gen hoặc trình tự khởi đầu được gây đột biến so với gen hoặc trình tự khởi đầu từ đó thu được ADN tái tổ hợp. Đột biến có thể được đưa vào bằng kỹ thuật gây đột biến định hướng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc bằng kỹ thuật gây đột biến ngẫu nhiên như gây đột biến bằng hóa chất, tia UV hoặc tia X hoặc kỹ thuật tiến hóa có định hướng.

Thuật ngữ “tiến hóa có định hướng” trong bản mô tả này được sử dụng cùng nghĩa với thuật ngữ “tiến hóa chuyển hóa” và bao gồm việc sử dụng áp suất lựa chọn ưu tiên cho việc phát triển thể đột biến với các tính trạng quan tâm. Áp suất lựa chọn có thể dựa trên các điều kiện nuôi cấy khác nhau, ATP và lựa chọn kết hợp với sự phát triển và lựa chọn liên quan đến sự oxy hóa khử. Áp suất lựa chọn có thể được tiến hành bằng phương pháp lên men theo mẻ với loạt cấy chuyển hoặc môi trường nuôi cấy liên tục với cùng một áp suất.

Thuật ngữ “mức độ biểu hiện” hoặc “mức độ biểu hiện gen” nghĩa là sự phiên

mã (các) gen cụ thể hoặc cấu trúc vector gen cụ thể. Thuật ngữ “mức độ biểu hiện” hoặc “mức độ biểu hiện gen” cụ thể nghĩa là sự phiên mã (các) gen hoặc cấu trúc vector gen thành mRNA. Quy trình bao gồm sự phiên mã ADN và có thể bao gồm việc xử lý sản phẩm ARN thu được. Thuật ngữ “mức độ biểu hiện” hoặc “mức độ biểu hiện gen” cũng có thể bao gồm sự dịch mã mRNA và cùng với đó là sự tổng hợp protein được mã hóa, nghĩa là mức độ biểu hiện protein.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Hóa chất và phương pháp chung

Trừ khi được quy định khác, quy trình tách dòng được tiến hành vì mục đích của sáng chế bao gồm cắt giới hạn, điện di gel agarosa, tinh chế axit nucleic, nối axit nucleic, biến nạp, chọn lọc và nuôi cấy các tế bào vi khuẩn được thực hiện như đã được mô tả (Sambrook et al., 1989). Các phân tích trình tự của ADN tái tổ hợp được thực hiện với phần đọc trình tự ADN phát huỳnh quang laze (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sử dụng công nghệ Sanger (Sanger et al., 1977). Trừ khi được quy định khác, các hóa chất và chất phản ứng thu được từ Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), từ Promega (Madison, WI, USA), Duchefa (Haarlem, The Netherlands) hoặc Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Các endonucleaza giới hạn là từ New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) hoặc Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Germany). Oligonucleotit được tổng hợp bởi Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

Ví dụ 1:

E. coli W (LU17032) được xử lý để sản xuất L-alanin bằng cách bất hoạt *ackA-pta*, *adhE*, *frdABCD* và *pflB* ORF và thay thế *ldhA* orF bằng biến thể được tối ưu hóa codon của gen *alaD* (*alaD-gstear*).

ackA-pta, *adhE*, *frdABCD* và *pflB* ORF được bất hoạt bằng cách cài xen catxet kháng kanamycin được kẹp sườn bởi FRT, sau đó loại bỏ catxet kháng kháng sinh này bằng cách tái tổ hợp FLP.

Gen *ldhA* được thay bằng *alaD-gstear* và catxet kháng zeoxin được kẹp sườn bởi FRT cùng chiều, mà cuối cùng được loại bỏ bằng cách tái tổ hợp FLP.

Vật liệu và phương pháp

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

E. coli W (LU17032) được nuôi cấy trong môi trường lỏng Luria-Bertani (LB) hoặc trên môi trường rắn Luria-Bertani. Đôi khi, các quần lạc được chuyển qua thạch tối thiểu M9 chứa Sucroza 10mM để xác nhận độ đồng nhất chủng W. Bổ sung chất kháng sinh vào môi trường lỏng và rắn khi thích hợp, đến nồng độ cuối là 15µg/ml (kanamycin, cloramphenicol), 25µg/ml (zeoxin) hoặc 3 µg/ml (tetracyclin).

Tái tổ hợp Red/ET

Tái tổ hợp Red/ET được thực hiện sử dụng quy trình chuẩn của Gene Bridges GmbH (www.genbridges.com). Tóm tắt là, *E. coli* W thành thạo Red/ET được phát triển hiếu khí ở 30°C đến OD600nm bằng ~0,3. Mức độ biểu hiện của các gen red được cảm ứng bằng cách bổ sung 50µl L-arabinoza 10% (trọng lượng/thể tích), sau đó tăng nhiệt độ đến 37°C. Arabinoza được bỏ ra khỏi môi trường nuôi cấy đối chứng không được cảm ứng. Sau 35 phút nuôi ở 37°C, các tế bào được rửa hai lần bằng glyxerol đá lạnh 10% (thể tích/thể tích) và chạy xung điện với 500ng sản phẩm PCR ở 1,35 kV, 10µF, 600Ω. Sau đó, các tế bào được tạo huyền phù lại trong 1ml môi trường LB đá lạnh và phát triển hiếu khí ở 37°C trong khoảng 1,5 giờ. Giống cấy sau đó được cấy đĩa lên thạch LB chứa 15µg/ml kanamycin (bất hoạt gen) hoặc 25µg/ml zeoxin (cài xen gen).

Tái tổ hợp FLP

Các vị trí kẹp sườn FRT cho phép loại bỏ gen đánh dấu kháng kháng sinh bằng phương pháp tái tổ hợp FLP sau khi biến đổi nhiễm sắc thể *E. coli*. Việc tái tổ hợp FLP để lại vị trí FRT đơn (34bp) cũng như trình tự kẹp sườn ngắn (khoảng 20bp mỗi trình tự) được sử dụng làm vị trí liên kết đoạn môi trong việc khuếch đại catxet.

Để thực hiện tái tổ hợp FLP, plasmit 708-FLPe (Tab. 1) mã hóa FLP recombinaza được đưa vào các tái tổ hợp Red/ET bằng phương pháp xung điện. Thể biến nạp KanR CmR hoặc ZeoR CmR được dùng để cấy vào 0,2ml môi trường nuôi cấy LB, mà đã được ủ ở 30°C trong 3 giờ. Sau đó, hoạt tính FLP được cảm ứng bởi sự dịch chuyển nhiệt độ đến 37°C, sau đó ủ trong ba giờ ở 37°C. Các khuẩn lạc đơn thu được từ môi trường nuôi cấy sau đó được sàng lọc kiểu hình CmS và KanS hoặc ZeoS.

Chuẩn bị ADN và phân tích.

ADN bộ gen (gADN) của *E. coli* được phân lập từ môi trường nuôi cấy qua đêm với Gentra Puregen Yeast/Bact. Kit B (Qiagen, Hilden, Germany). Sản phẩm PCR chứa catxet bất hoạt hoặc cài xen gen được khuếch đại từ plasmit khuôn với ADN polymeraza độ trung thực cao PRECISOR (BioCat, Heidelberg) và phản ứng PCR phân tích được thực hiện với PCR Extender System (5PRIME GmbH, Hamburg, Germany), theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đơn vị siêu sao chép PCR được tinh chế sử dụng kit tinh chế PCR GenJET hoặc kit tách chiết gel GenJET (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) và việc đọc trình tự được thực hiện nhờ GATC BioTech (Konstanz, Germany) hoặc BioSpring (Frankfurt am Main, Germany).

Bảng 1. Plasmit và đoạn mồi

Đặc điểm liên quan / trình tự oligo (5' → 3')		Nguồn
plasmit		
pRed/ET	plasmit biểu hiện <i>red</i> , gốc pSC101, Tc ^R	Gene Bridges
708-FLPe	plasmit biểu hiện FLP recombinaza, gốc pSC101, Cm ^R	Gene Bridges
pQZ11	plasmit gốc pUC57 với catxet cloramphenicol axetyltransferaza (cat)-levansucraza (sacB), amp ^R	Genescript
pACYC184	vectơ tách dòng <i>E. coli</i> , p15A ori, Cm ^R , TC ^R	NEB
Đoạn mồi (BioSpring)	Trình tự	SEQ ID NO
P395-ackA-pta-check1	5'-ACTGCGGTAGTTCTTCACTG-3'	SEQ ID NO: 17
P395-ackA-pta-check2	5'-AGTACCTTTCTGGTTTAGCCG-3'	SEQ ID NO: 18
P395-ackA-pta-check3	5'-GATAGCAGAAACGGAACCAC-3'	SEQ ID NO: 19
P395-ackA-pta-check4	5'-GGTGCTGTTCACTACCGC-3'	SEQ ID NO: 20
P395-ackA-pta-check5	5'-TGACGAGATTACTGCTGCTG-3'	SEQ ID NO: 21

P395-ackA-pta-check6	5'-ATTTCCGGTTCAGATATCCGC-3'	SEQ ID NO: 22
P395-adhE-check1	5'-GGGTTGACCAGCGCAAATAAC-3'	SEQ ID NO: 23
P395-adhE-check2	5'-CAGAAGTGAGTAATCTTGCTTAC-3'	SEQ ID NO: 24
P395-adhE-check3	5'-GATCACTTTATCTTCGACGATAC-3'	SEQ ID NO: 25
P395-adhE-check4	5'-GCGAACGTGGATAAACTGTCTG-3'	SEQ ID NO: 26
P395-adhE-check5	5'-GCTCTTAAGCACCGACGTTGAC-3'	SEQ ID NO: 27
P395-adhE-check6	5'-GTCGGCTCATTAACGGCTATTC-3'	SEQ ID NO: 28
P395-frd-check1	5'-GACGGATCTCCGCCATAATC-3'	SEQ ID NO: 29
P395-frd-check2	5'-TCGCCACCCGCTACTGTATC-3'	SEQ ID NO: 30
P395-frd-check3	5'-CAAAGCGTTCTGACGAACCGG-3'	SEQ ID NO: 31
P395-frd-check4	5'-TGTGCGATGCACAATATCGTTG-3'	SEQ ID NO: 32
P395-pflB-check1	5'-TTGGTTGGGTTGACATACTGG-3'	SEQ ID NO: 33
P395-pflB-check2	5'-TGAACTTCATCACTGATAACC-3'	SEQ ID NO: 34
P395-pflB-check3	5'-TTCAAAGGAGTGAATGCGACC-3'	SEQ ID NO: 35
P395-pflB-check4	5'-GTCGCGGTTATGACAATACAGG-3'	SEQ ID NO: 36
P395-ldhA-check1	5'-TACCGTGCCGACGTTCAATAAC-3'	SEQ ID NO: 37
P395-ldhA-check2	5'-CATCAGCAGGCTTAGCGCAAC-3'	SEQ ID NO: 38
P395-ldhA-check3	5'-ACCTTTACGCGTAATGCGTG-3'	SEQ ID NO: 39
P395-ldhA-check4	5'-ACCGTTTACGCTTTCCAGCAC-3'	SEQ ID NO: 40
P395-csc-check1	5'-CGAATTATCGATCTCGCTCAAC-3'	SEQ ID NO: 41
P395-csc-check2	5'-CGTCTATATTGCTGAAGGTACAG-3'	SEQ ID NO: 42
P395-csc-check3	5'-TCGAAGGTCCATTCACGCAAC-3'	SEQ ID NO: 43
P395-csc-check4	5'-GATTCCCACCGCAACGTTAG-3'	SEQ ID NO: 44
PargP_1_F	5'-ttgctggaagaagagtggctggcgatgaaca aaccggttcgactccgctgatatcggaagccct gggccaac-3'	SEQ ID NO: 62
PargP_1_R	5'tcagccaacacaggagccagtcaggaagca	SEQ ID NO: 63

	accacgtcgccagactgtccacctgagacaacttg	
	ttacagctc-3	
PargP_2_F	5'-actggatgcggtgatactgaacg-3'	SEQ ID NO: 64
PargP_2_R	5'-accactggcgctttcagtaatgcc-3'	SEQ ID NO: 65
PargP_seq_F	5'-ttaccaggagcagacaacagc-3'	SEQ ID NO: 66
PargP_seq_R	5'-ggcagatcgaagtttgctgc-3'	SEQ ID NO: 67
PargP-pACYC_F	5'-tatcatcgataagcttatgttaccgccgacgg	SEQ ID NO: 68
	cttcg-3'	
PargP-pACYC_R	5'-aagggcatcggtcgacgtgaggataacgcctg	SEQ ID NO: 69
	atatgtgc-3'	
PgcvA_1_F	5'-taataggttacacagtgtgatctaattgttaa	SEQ ID NO: 70
	ttcatttaacatcaaaggatatcggaagccctg	
	ggccaac-3'	
PgcvA_1_R	5'-aaactcgtaaaggcatttagcggtggtaatcg	SEQ ID NO: 71
	ttagacatggcttttaaacacctgagacaa	
	cttgttacagctc-3'	
PgcvA_2_F	5'-cgcagaccaattgcaaacac-3'	SEQ ID NO: 72
PgcvA_2_R	5'-ctcgcgcagcagaagagctt-3'	SEQ ID NO: 73
PgcvA_seq_F	5'-agcagatcaaccgtactgac-3'	SEQ ID NO: 74
PgcvA_seq_R	5'-agtttacgcgtcgcttcggt-3'	SEQ ID NO: 75
PgcvA-pACYC_F	5'-tatcatcgataagcttaagtgccgccactata	SEQ ID NO: 76
	ggtatttgc-3'	
PgcvA-pACYC_R	5'-aagggcatcggtcgactggatcatggctgtac	SEQ ID NO: 77
	cctacg-3'	
PgcvB_1_F	5'-tgacgtgaaagagatggtcgaactggat	SEQ ID NO: 78
	cagtaattcgcgatcgcaaggtgatc	
	ggaagccctgggccaac-3'	

PgcvB_1_R	5'-attataaattgtccgttgagcttctaccagc aaatacctatagtgggcgccacctgag acaactgttacagctc-3'	SEQ ID NO: 79
PgcvB_seq_F	5'-gccgcaattatttctgcctgtatgc-3'	SEQ ID NO: 80
PgcvB_seq_R	5'-cacaaaaagctcttctgtcgcg-3'	SEQ ID NO: 81
PgcvB-pACYC_F	5'-tatcatcgataagcttggtcgaactggatc agtaattcgc-3'	SEQ ID NO: 82
PgcvB-pACYC_R	5'-aagggcatcggtcgaccggtggaatcg ttagacatggc-3'	SEQ ID NO: 83
PbrnQ_1_F	5'-tatcgttattgttaacgcggcggttctcgt ggcgttaccgaagcgcgtcgatatcgg aagccctgggccaac-3'	SEQ ID NO: 84
PbrnQ_1_R	5'-gaacgtaagcatgcagaatagcagcg ccgtttgcagactgatcgaccagccac ctgagacaactgttacagctc-3'	SEQ ID NO: 85
PbrnQ_2_F	5'-ggataccgtgggcaacttccttgc-3'	SEQ ID NO: 86
PbrnQ_2_R	5'-gttagaaaccaccatcgagaagccg-3'	SEQ ID NO: 87
PbrnQ_seq_F	5'-cgctgtttatctacagcctgg-3'	SEQ ID NO: 88
PbrnQ_seq_R	5'-ggataaatagcggtcagcacc-3'	SEQ ID NO: 89
PlpxD_1C_F	5'-catcggtaaaacctggtaagtgttctcca caaaggaatgtagtggtagttagcga tatcggaagccctgggccaac-3'	SEQ ID NO: 90
PlpxD_1C_R	5'-ggtgcagttcttgcgtggccccggcgatc ttatattgatcgccctaaagtcacccactg agacaactgttacagctc-3'	SEQ ID NO: 91
PlpxD_fix_F	5'-cgatcaacgaatataactcgctgcg-3'	SEQ ID NO: 92
PlpxD_fix_R	5'-ataataacacggcctgccgcaatcg-3'	SEQ ID NO: 93

PlpxD_flank_F	5'-atgctgtaggcggtaacgccat-3'	SEQ ID NO: 94
PlpxD_flank_R	5'-atacgttgttaccagcttcgc-3'	SEQ ID NO: 95
PlpxD-pACYC_F	5'-tatcatcgataagcttaaatccgttgcca acagccagg-3'	SEQ ID NO: 96
PlpxD-pACYC_R	5'-aagggcatcggtcgacaacacggcctg ccgcaatcg-3'	SEQ ID NO: 97
PargP_RT_F	5'-gcccggactacagaacattacagg-3'	SEQ ID NO: 99
PargP_RT_R	5'-tgagacggctgattgtgtaatgc-3'	SEQ ID NO:100
PgcvA_RT_F	5'-ccatttaagtttactcgcgcagc-3'	SEQ ID NO:101
PgcvA_RT_R	5'-ggcggcggaacagttttagc-3'	SEQ ID NO:102
PgcvB_RT_F	5'-taggcggtgctacattaatcactatgg-3'	SEQ ID NO:103
PgcvB_RT_R	5'-tgttgtgttgcaattggtctgc-3'	SEQ ID NO:104
PlpxD_RT_F	5'-gatatcgatcacccggcggtgc-3'	SEQ ID NO:105
PlpxD_RT_R	5'-gcacaagcctaaatgctcacgg-3'	SEQ ID NO:106
PrrsA_RT_F	5'-ctcttgccatcgatgtgccag-3'	SEQ ID NO:107
PrrsA_RT_R	5'-ccagtgtggtggtcatcctctca-3'	SEQ ID NO:108

1.1. Ổ gen ackA-pta – Nhằm đích ackA-pta

Khoảng 500ng cấu trúc PCR Δ ackA-pta (1737 bp) được chạy xung điện vào các tế bào *E. coli* W thành thạo Red/ET. Tám thể biến nạp KanR được phân tích sự kết hợp chính xác của catxet đánh dấu kháng bằng PCR với đoạn môi đặc hiệu bộ gen. Ba dòng được đưa qua bước tái tổ hợp FLP, mà được thực hiện như được mô tả trong phần vật liệu và phương pháp (dữ liệu không được thể hiện).

Xác nhận sự tách dòng. Việc bất hoạt ổ gen ackA-pta và loại bỏ catxet kháng kanamycin được xác nhận bằng PCR ngang qua sẹo FRT còn lại. Một dòng mà tạo ra tín hiệu PCR chính xác cũng được xác nhận bằng cách đọc trình tự (Fig.1).

1.2. Ổ gen adhE – Nhằm đích adhE

Khoảng 500ng cấu trúc PCR Δ adhE (1093 bp) được chạy xung điện vào các tế

bào *E. coli* W thành thạo Red/ET chứa biến đổi $\Delta ackA-pta::FRT$. Tám thể biến nạp KanR được phân tích sự kết hợp chính xác của catxet đánh dấu kháng bằng PCR với đoạn môi đặc hiệu bộ gen. Hai dòng được đưa qua bước tái tổ hợp FLP, mà được thực hiện như được mô tả trong phần vật liệu và phương pháp (dữ liệu không được thể hiện).

Xác nhận sự tách dòng. Việc bất hoạt ổ gen *adhE* và loại bỏ catxet kháng kanamycin được xác nhận bằng PCR ngang qua sẹo FRT còn lại. Một dòng mà tạo ra tín hiệu PCR chính xác cũng được xác nhận bằng cách đọc trình tự (Fig.2).

1.3. Ổ gen *frd* - Nhằm đích *frdABCD*

Khoảng 500ng cấu trúc PCR $\Delta frdABCD$ (1093 bp) được chạy xung điện vào các tế bào *E. coli* W thành thạo Red/ET chứa các biến đổi $\Delta ackA-pta::FRT$ và $\Delta adhE::FRT$. Tám thể biến nạp KanR được phân tích sự kết hợp chính xác của catxet đánh dấu kháng bằng PCR với đoạn môi đặc hiệu bộ gen. Một dòng được đưa qua bước tái tổ hợp FLP, mà được thực hiện như được mô tả trong phần vật liệu và phương pháp (dữ liệu không được thể hiện).

Xác nhận sự tách dòng. Việc bất hoạt ổ gen *frd* và loại bỏ catxet kháng kanamycin được xác nhận bằng PCR ngang qua sẹo FRT còn lại. Một dòng mà tạo ra tín hiệu PCR chính xác cũng được xác nhận bằng cách đọc trình tự (Fig.3).

1.4. Ổ gen *pflB* - Nhằm đích *pflB*

Khoảng 500ng cấu trúc $\Delta pflB$ PCR (1093 bp) được chạy xung điện vào các tế bào *E. coli* W thành thạo Red/ET chứa các biến đổi $\Delta ackA-pta::FRT$, $\Delta adhE::FRT$ và $\Delta frdABCD::FRT$. Tám thể biến nạp KanR được phân tích sự kết hợp chính xác của catxet đánh dấu kháng bằng PCR với đoạn môi đặc hiệu bộ gen. Bốn dòng được đưa qua bước tái tổ hợp FLP, mà được thực hiện như được mô tả trong phần vật liệu và phương pháp (dữ liệu không được thể hiện).

Xác nhận sự tách dòng. Việc bất hoạt ổ gen *pflB* và loại bỏ catxet kháng kanamycin được xác nhận bằng PCR ngang qua sẹo FRT còn lại. Một dòng mà tạo ra tín hiệu PCR chính xác cũng được xác nhận bằng cách đọc trình tự (Fig.4).

1.5. Ổ gen *ldhA* – Cài gen *alaD-gstear*

Khoảng 500ng cấu trúc PCR $\Delta ldhA::alaD-gstear$ (1783 bp) được chạy xung điện

vào các tế bào *E. coli* W thành thạo Red/ET chứa các biến đổi $\Delta ackA-pta::FRT$, $\Delta adhE::FRT$, $\Delta frdABCD::FRT$ và $\Delta pf1B::FRT$. Bốn thể biến nạp ZeoR được phân tích sự kết hợp chính xác của catxet đánh dấu kháng bằng PCR với đoạn mỗi đặc hiệu bộ gen. Một dòng được đưa qua bước tái tổ hợp FLP, mà được thực hiện như được mô tả trong phần vật liệu và phương pháp (dữ liệu không được thể hiện).

Xác nhận sự tách dòng. Việc kết hợp *alaD-gstear* và loại bỏ catxet kháng zeoxin được xác nhận bằng PCR ngang qua sẹo FRT còn lại. Một dòng mà tạo ra tín hiệu PCR chính xác cũng được xác nhận bằng cách đọc trình tự (Fig.5).

Ví dụ 2. Phát hiện và định lượng alanin bằng HPLC

Phương pháp HPLC dưới đây để phát hiện alanin trong môi trường nuôi cấy tế bào được sử dụng:

Cột: cột Aminex HPX-87C (Bio-Rad), 300×7,8 mm, cỡ hạt i.d. 9µm

Pha động: 90% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ở 0,1mol/L, 10% Axetonitril

Lưu lượng: 0,6 mL/phút

Nhiệt độ cột: 60°C

Phát hiện: máy dò chỉ số khúc xạ

Theo phương pháp trên, các thành phần ước lượng chính trong chất nền mẫu môi trường tế bào có thể được tách khỏi alanin, không cần sự định lượng alanin xen vào.

Lượng alanin trong mẫu được xác định bằng phương pháp hiệu chỉnh chất chuẩn ngoại. Các mẫu chuẩn chứa alanin từ 0,5 đến 10,0 g/L được phun vào và các vùng pic được dùng để hiệu chỉnh. Hệ số hồi quy tuyến tính của đường cong hiệu chỉnh là 0,9995.

Mẫu được phun một lần ở 20µL. Các vùng pic được dùng để tính lượng có mặt trong mẫu bằng phần mềm Waters LC Millenium.

Ví dụ 3. Phát hiện và định lượng glucoza, suxinat, lactat, format, axetat và etanol bằng HPLC

Phương pháp HPLC

Cột: cột Aminex HPX-87H (Bio-Rad), 300×7,8 mm, cỡ hạt i.d. 9µm

Pha động: H_2SO_4 4mM

Lưu lượng: 0,4 mL/phút

Nhiệt độ cột: 45°C

Phát hiện: máy dò chỉ số khúc xạ

Lượng chất phân tích được xác định bằng phương pháp hiệu chỉnh chất chuẩn ngoại. Các mẫu chuẩn chứa glucoza từ 0,1 đến 38,0 g/L, suxinat, lactat, format, axetat và etanol từ 0,05 đến 10,0 g/L được phun vào và các vùng pic được dùng để hiệu chỉnh. Hệ số hồi quy tuyến tính của cả sáu đường cong hiệu chỉnh tốt hơn 0,999.

Mẫu được phun một lần ở 20 μ L. Các vùng pic được dùng để tính lượng có mặt trong mẫu bằng phần mềm Waters LC Millenium.

Ví dụ 4. Tiến hóa chuyển hóa của *E. coli* W gốc thu được từ ví dụ 1 để hiệu suất alanin được cải thiện

E. coli gốc chứa tất cả các đột biến như được mô tả trong ví dụ 1, được gọi là *E. coli* Ex1 hoặc QZ16, được sử dụng cho quy trình tiến hóa chuyển hóa để cải thiện hiệu suất alanin của *E. coli* Ex1 gốc.

Tiến hóa chuyển hóa được thực hiện như sau: Trong lượt tiến hóa thứ nhất và thứ hai, sự tiến hóa liên tục được thực hiện lần lượt trong 500 giờ và 750 giờ trong môi trường NBS 5% glucoza.

Môi trường NBS:

3,5g KH_2PO_4

5,0g K_2HPO_4

3,5g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

0,25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

15mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,5mg thiamin

1ml nguồn kim loại vi lượng

Nguồn kim loại vi lượng được tạo ra trong HCl 0,1M, 1,6g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2g ZnCl_2 ; 0,2g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,05g H_3BO_3 .

Các tế bào được cấy vệt lên đĩa LB và được kiểm tra hiệu suất alanin. *E. coli* gốc tốt nhất (*E. coli* Ev1 hoặc QZ17) thu được trong quá trình lên men với môi trường NBS chứa 5% glucoza trong 24 và 48 giờ ở 37°C ở hiệu suất alanin nằm trong khoảng từ 84% đến 86% so với hiệu suất alanin của *E. coli* Ex1 gốc ban đầu thu được 80% - 83%.

E. coli Ev1 được sử dụng cho các bước tiến hóa tiếp theo mà được thực hiện dưới dạng tiến hóa theo mẻ trong 20 ngày. 5% các tế bào được cấy lại vào môi trường mới sau mỗi 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và v.v. trong môi trường AM1 chứa 14% glucoza ở 37°C.

Môi trường AM1:

19,92mm (NH₄)₂HPO₄= 2,6g /L MW: 132,07

7,56mm NH₄H₂PO₄=0,87g/L MW: 115

2,0mm KCl= 0,15g/L MW: 74,55

1,5 mm MgSO₄-7H₂O=0,37g/L MW: 246,5

15g/L amoni sulfat được bổ sung vào bước cuối cùng

1mm betain

1ml nguồn kim loại vi lượng”

Để tạo ra 1L nguồn kim loại vi lượng:

Nguồn kim loại vi lượng được chuẩn bị trong HCl 0,12M, 2,4g FeCl₃-6H₂O; 0,3g CoCl₂-6H₂O; 0,21g CuCl₂-2H₂O; 0,3g ZnCl₂; 0,27g NaMoO₄-2H₂O; 0,068g H₃BO₃; 0,5g MnCl₂-4H₂O.

Từ quy trình tiến hóa này, gốc *E. coli* Ev2, còn được gọi là QZ18 được phân lập. Gốc này được kiểm tra trong quá trình lên men mà được thực hiện trong thiết bị lên men với môi trường AM1 14% glucoza. *E. coli* Ev2 gốc có hiệu suất alanin nằm trong khoảng từ 92% đến 94% so với hiệu suất alanin của *E. coli* Ev1 từ 91% đến 92% ở cùng điều kiện.

Sau các bước tiến hóa theo mẻ tiếp theo trong 300 giờ trong môi trường AM1 chứa 12% glucoza và 10 bước tiến hóa theo mẻ sau đó trong AM1 chứa 12% glucoza, *E. coli* Ev3 gốc, còn được gọi là QZ20 được phân lập.

Việc kiểm tra hiệu suất alanin cho thấy rằng *E. coli* Ev3 gốc có hiệu suất alanin nằm trong khoảng từ 94% đến 96% trong môi trường AM1 chứa 12% glucoza so với hiệu suất alanin của *E. coli* Ev2 từ 92% đến 93% ở cùng điều kiện.

Sự tiến hóa theo mẻ tuần tự thêm như được mô tả từ trước trong khoảng thời gian 1000 giờ trong môi trường AM1 với 14% glucoza được thực hiện với *E. coli* Ev3 và *E. coli* Ev4 gốc, còn được gọi là QZ23, được phân lập. *E. coli* Ev4 được kiểm tra so sánh với *E. coli* Ev3 trong môi trường AM1 với 14% glucoza. *E. coli* Ev4 gốc cho thấy năng suất alanin được tăng (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thể tích thiết bị phản ứng và cho thời gian, từ 2,0 đến 2,4 g/(Lh) so với từ 1,0 đến 1,3 g/(Lh) của *E. coli* Ev3 gốc sau 46 giờ lên men.

Ví dụ 5. Xác định các đột biến trong *E. coli* Ev4 gốc so với *E. coli* Ev3

Bộ gen của các dòng *E. coli* là *E. coli* Ev4 và *E. coli* Ev3 được đọc trình tự và các kết quả được so sánh để xác định các đột biến dẫn đến năng suất alanin được tăng của dòng *E. coli* Ev4.

Đột biến trong gen *brnQ* được xác định mà làm thay đổi trình tự của gen *brnQ* từ SEQ ID NO: 1, mã hóa protein có SEQ ID NO: 2 trong dòng *E. coli* Ev3 thành SEQ ID NO: 3 mã hóa protein có SEQ ID NO: 4 trong dòng *E. coli* Ev4.

Ngoài ra, đột biến trong gen *argP* được xác định mà làm thay đổi trình tự của gen *argP* từ SEQ ID NO: 45 mã hóa protein có SEQ ID NO: 46 trong dòng *E. coli* Ev3 thành SEQ ID NO: 47 mã hóa protein có SEQ ID NO: 48 trong dòng *E. coli* Ev4.

Ngoài ra, đột biến trong trình tự khởi đầu của gen *gcvA* được xác định mà làm thay đổi trình tự của trình tự khởi đầu của gen *gcvA* từ SEQ ID NO: 55 trong dòng *E. coli* Ev3 thành SEQ ID NO: 56 trong dòng *E. coli* Ev4. Trong chủng độc lập cũng có hiệu suất alanin được tăng cường, đột biến khác được xác định làm thay đổi trình tự của trình tự khởi đầu của gen *gcvA* từ SEQ ID NO: 55 thành SEQ ID NO: 57.

Ngoài ra, đột biến trong trình tự khởi đầu của gen *gcvB* được xác định mà làm thay đổi trình tự của trình tự khởi đầu của gen *gcvB* từ SEQ ID NO: 59 trong dòng *E. coli* Ex1 thành SEQ ID NO: 60 trong dòng *E. coli* Ev1. Trong chủng độc lập cũng có hiệu suất alanin được tăng, đột biến khác trong trình tự khởi đầu của gen *gcvB* được xác định làm thay đổi trình tự khởi đầu trình tự từ SEQ ID NO: 59 thành SEQ ID NO: 61.

Ngoài ra, đột biến trong gen *lpxD* được xác định mà làm thay đổi trình tự của gen *lpxD* từ SEQ ID NO: 49, mã hóa protein có SEQ ID NO: 50 trong dòng *E. coli* Ev3 thành SEQ ID NO: 51, mã hóa protein có SEQ ID NO: 52 trong dòng *E. coli* Ev4.

Để xác định tầm quan trọng của các đột biến đã xác định đối với năng suất và hiệu suất alanin, các đột biến lần lượt được đưa vào chủng *E. coli* chứa các đột biến như được mô tả trong ví dụ 1 và các đột biến như được mô tả trong PCT/IB2014/064426 chứa các đột biến trong các gen *ygaW*, gen *zipA*, gen *lpd* và đột biến trong trình tự khởi đầu điều khiển mức độ biểu hiện của gen *alaD* cũng đã được mô tả ở trên. Các đột biến được đánh giá về tác dụng của chúng đến hiệu suất alanin. Mức độ biểu hiện gen đột biến hoặc gen chịu sự điều khiển của các vùng trình tự khởi đầu được gây đột biến được giám sát bởi qPCR.

Ví dụ 6. Xác nhận tác dụng của SNP trong gen *argP* (*iciA*)

ArgP (hoặc *iciA*) là gen điều hòa sự phiên mã. Nó điều khiển các gen liên quan đến hệ vận chuyển arginin và các gen liên quan đến sự sao chép ADN. SNP dẫn đến đột biến A96E trong protein *ArgP* được xác định trong *E. coli* QZ23 và được đánh giá tác dụng của nó đến hiệu suất alanin.

Xây dựng chủng *E. coli* QZ48

Catxet *argP*-cat-sacB với gen đánh dấu kháng cloramphenicol có chọn lọc và gen đánh dấu *sacB* có chọn lọc bộ đếm (đem lại độ nhạy sucroza) được khuếch đại từ vectơ khuôn pQZ11 (Genscript) với các đoạn mồi *PargP_1_F* và *PargP_1_R* (xem bảng 1) với Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo). Sản phẩm PCR là *DpnI* (NEB) được phân hủy ở 37°C trong 1 giờ để khử nền khuôn plasmit và gel được chiết từ 1% gel agaroza bằng QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Catxet *argP* SNP (543 bp) được khuếch đại từ ADN bộ gen QZ23 với các đoạn mồi *PargP_2_F* và *PargP_2_R* (xem bảng 1) với Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo) và được tinh chế bằng QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Đối với việc tái tổ hợp Red/ET, kit tái tổ hợp Genbridges Red/ET được sử dụng theo quy trình của nhà sản xuất. Khoảng 200ng catxet *argP*-cat-sacB được chuyển xung điện các tế bào *E. coli* QZ20 thành thạo Red/ET. Giống cấy được cấy đĩa lên các

đĩa thạch LB với 10 ug/mL cloramphenicol để lựa chọn các thể biến nạp dương tính sau khi chạy xung điện. Một vài khuẩn lạc được sàng lọc cho việc kết hợp của catxet gen đánh dấu bởi PCR bằng các đoạn mồi đặc hiệu bộ gen PargP_seq_F và PargP_seq_R (xem bảng 1). Dòng được xác nhận bằng PCR được sử dụng để tái tổ hợp Red/ET lần hai với catxet argP SNP để thay catxet gen đánh dấu cat-sacB. Giống cấy được cấy đĩa lên các đĩa thạch LB với 6% sucroza không chứa NaCl để chọn lọc thể biến nạp dương tính sau khi chạy xung điện. Một vài dòng được kiểm tra bằng các đoạn mồi đặc hiệu bộ gen PargP_seq_F và PargP_seq_R (xem bảng 1) đối với sự thất thoát catxet gen đánh dấu cat-sacB. Ít nhất một dòng tạo ra sản phẩm PCR có kích thước chính xác cũng được xác nhận bằng cách đọc trình tự (Genwiz). pRedET plasmit (amp) tái tổ hợp nhạy nhiệt được xử lý từ các chủng ở 42°C qua đêm trên các đĩa LB trước khi các chủng được kiểm tra trong thiết bị phản ứng sinh học. SNP dẫn đến đột biến ArgP A96E được đưa vào chủng *E. coli* QZ20. Chủng thu được được chỉ định là QZ48.

Thử nghiệm lên men của *E. coli* QZ20 so với *E. coli* QZ48

E. coli chủng QZ48 được kiểm tra đặc tính của nó trong quá trình lên men trong thiết bị phản ứng sinh học quy mô phòng thí nghiệm. Sự phát triển của tế bào và sự tạo thành alanin được giám sát so với *E. coli* chủng QZ20.

Các giống tiền nuôi cấy được cho phát triển trong bình lắc chứa môi trường LB, 20% thể tích nạp đầy ở 37°C và 200 vòng/phút qua đêm. Bước lên men được thực hiện trong hệ thiết bị phản ứng sinh học song song dung tích 1,5L DASGIP (Eppendorf) trong 500mL môi trường AM 1 (2,6 g/L (NH₄)₂HPO₄, 0,87 g/L NH₄H₂PO₄, 0,15 g/L Kill, 0,37 g/L MgSO₄ · 7 H₂O, 15 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 mM betain, 1ml/L dung dịch nguồn kim loại vi lượng). Nguồn kim loại vi lượng bao gồm 1,6g/L FeCL₃ · 6 H₂O; 0,2g/L CoCl₂ · 6 H₂O; 0,1g/L CuCl₂ · 2 H₂O; 0,2g/L ZnCl₂; 0,2g/L NaMoO₄ · 2 H₂O; 0,05g/L H₃BO₃, HCL 0,1 M. 140 g/L glucoza được sử dụng làm nguồn cacbon trong môi trường lên men.

Các tế bào *E. coli* tương đương với OD600·mL bằng 7 được thu hoạch thông qua ly tâm và được tạo huyền phù lại trong 5mL môi trường AM 1. # OD600·mL = (OD600 môi trường nuôi cấy chưa pha loãng) x (thể tích môi trường nuôi cấy theo mL). 5mL tế bào đã tạo huyền phù lại được sử dụng để cấy vào 500mL môi trường

lên men trong thiết bị phản ứng sinh học 1,5L DASGIP. Mỗi chủng được chạy hai lần ở 37°C và tốc độ khuấy 400 vòng/phút. Sử dụng NH₄OH 5N để kiểm soát độ pH đến 6,8 và cung cấp amoni cho môi trường nuôi cấy dưới dạng chất tiền thân alanin trong quá trình lên men. Không có không khí được sục trong quá trình lên men và bình không được tạo áp để sau khi tiêu thụ lượng oxy hòa tan ban đầu trong môi trường bởi các tế bào, quy trình lên men được thực hiện ở các điều kiện vi hiếu khí. Các mẫu được lấy trong suốt quá trình lên men và được phân tích nồng độ alanin và glucoza bằng HPLC.

Đột biến ArgP A96E trong QZ48 có sức ảnh hưởng mạnh đến sự tạo thành alanin (Fig.7). Hiệu suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thể tích thiết bị phản ứng và cho thời gian, của QZ20 sau 46 giờ là $1,15 \pm 0,06$ g/(Lh). *E. coli* QZ48 cho thấy hiệu suất alanin theo thể tích được tăng là $1,51 \pm 0,01$ g/(Lh) sau 46 giờ (Fig.8).

Tạo cấu trúc plasmit pACYC184-argP

Để kiểm tra mức độ ảnh hưởng của việc biểu hiện quá argP, plasmit pACYC184-argP (p15 ori, CmR, ~15 bản sao mỗi lỗ) được tạo cấu trúc thông qua công nghệ tách dòng InFusion có trên thị trường (Clontech, Mountain View, CA, USA). Vector thứ nhất pACYC184 (bảng 1) thu được nhờ NEB (Ipswich, MA, USA) và được làm thẳng bằng các enzym giới hạn endonucleaza HindIII và Sall, cũng từ NEB. Sự phân cắt này loại bỏ hầu hết gen kháng tetracyclin. Một cách riêng rẽ, argP orF được khuếch đại PCR từ ADN W *E. coli* kiểu dại bằng Phusion polymeraza (Thermo Scientific, Waltham, MA) với các đoạn mồi PargP-pACYC_F và PargP-pACYC_R (Bảng 1).

Các đoạn mồi chứa phần nhô ra 15 bp bổ sung tương đồng với các đầu vector đã làm thẳng hỗ trợ cho việc tách dòng không có đường nối. Sau đó, phản ứng InFusion được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất với cả khung vector đã làm thẳng được tinh chế lẫn đoạn cài xen argP. Các sản phẩm InFusion thu được sau đó được sử dụng để biến nạp QZ20 thông qua phương pháp xung điện và chọn lọc trên các đĩa cloramphenicol LB. Các dòng dương tính được xác định bằng PCR, được xác nhận bằng cách đọc trình tự ADN, và được sử dụng trong quá trình lên men đối với các nghiên cứu sự biểu hiện quá.

So sánh sự lên men giữa QZ20/pACYC184 và QZ20/pACYC184-argP

Các giống tiền nuôi cấy được cho phát triển trong bình lắc chứa môi trường LB, 20% thể tích nạp đầy ở 37°C và 200 vòng/phút qua đêm. Bước lên men được thực hiện trong hệ thiết bị phản ứng sinh học song song 1,5L DASGIP với 14% glucoza trong môi trường AM 1. Tất cả các điều kiện lên men đã được mô tả ở trên.

Mức độ biểu hiện quá argP dẫn đến tốc độ tạo thành alanin tăng và chuẩn độ alanin cao hơn sau 20 giờ lên men (Fig.9). Hiệu suất alanin theo thể tích (hiệu suất không gian-thời gian), được xác định là lượng sản phẩm tạo ra chia cho thể tích thiết bị phản ứng và cho thời gian, của QZ20/pACYC-argP sau 20 giờ là $0,69 \pm 0,04$ g/(Lh) so với $0,61 \pm 0,02$ g/(Lh) của chủng với sự điều khiển của plasmid pACYC184 (Fig.10).

Ví dụ 7. Xác nhận tác dụng của SNP trong vùng trình tự khởi đầu gcvA/gcvB

Tạo cấu trúc chủng QZ58 và QZ66

Catxet gcvA-cat-sacB được khuếch đại từ vector pQZ11 (Genscript) bằng các đoạn mồi PgcvA_1_F/R (bảng 1). Catxet gcvA/B SNP (320 bp) được khuếch đại từ ADN bộ gen của chủng QZ23 bằng các đoạn mồi PgcvA_2_F/R (bảng 1). Việc tái tổ hợp Red/ET được thực hiện như được mô tả ở trên. Các dòng được kiểm tra bằng PCR khuôn lạc với các đoạn mồi đọc trình tự PgcvA_seq_F/R. SNP trong vùng trình tự khởi đầu gcvA/B được đưa vào *E. coli* QZ20 và chủng thu được được chỉ định là QZ58. SNP còn được đưa vào QZ48 (argP SNP) và chủng thu được được chỉ định là QZ66.

Thử nghiệm lên men của QZ58 và QZ66

Chủng QZ58 (trình tự khởi đầu gcvA/B SNP) được kiểm tra đặc tính của nó trong quá trình lên men như được mô tả ở trên. Sự tạo thành alanin được giám sát so với chủng QZ20.

Trình tự khởi đầu gcvA/B SNP có tác động đáng kể đến sự tạo thành alanin dẫn đến tốc độ tạo thành alanin cao hơn và chuẩn độ alanin bằng khoảng 76 g/L alanin so với khoảng 54 g/L được tạo ra từ QZ20 sau 46 giờ (Fig.11). Hiệu suất alanin theo thể tích của QZ58 là $1,66 \pm 0,02$ g/(Lh) so với $1,15 \pm 0,06$ g/(Lh) trong QZ20 sau 46 giờ (Fig.12).

Trình tự khởi đầu *gcvA/B* SNP cũng được bổ sung lên trên cùng của *argP* SNP trong QZ48 và chủng QZ66 thu được được kiểm tra trong quá trình lên men alanin so với QZ48. Đột biến trình tự khởi đầu *gcvA/B* bổ sung phía trên cùng của đột biến *argP* trong QZ66 dẫn đến tốc độ tạo thành alanin nhanh hơn so với QZ48 và hiệu suất alanin cao hơn sau 46 giờ là khoảng 76 g/L so với khoảng 70 g/L trong QZ48 (Fig.13). Hiệu suất alanin theo thể tích của QZ66 là $1,65 \pm 0,08$ g/(Lh) so với $1,51 \pm 0,01$ g/(Lh) của QZ48 sau 46 giờ (Fig.14).

Phân tích mức độ phiên mã *gcvA* và *gcvB* bằng RT-qPCR

Mức độ phiên mã của *gcvA* và *gcvB* được xác định thông qua phản ứng PCR phiên mã ngược định lượng (RT-qPCR). Kit một bước iTaq Universal từ Biorad được sử dụng cho các phản ứng qPCR phiên mã ngược (RT) một bước dựa trên SYBR Green. Từ quy trình lên men theo mẻ song song của *E. coli* QZ20 và *E. coli* QZ23 mà được thực hiện như đã mô tả ở trên, các mẫu nuôi cấy được lấy ở thời điểm 8 giờ, 11 giờ và 28 giờ. Các mẫu được xử lý ngay bằng chất thử vi khuẩn bảo vệ ARN (Qiagen) để làm ổn định ARN. ARN được tách từ các mẫu bằng AurumTotal RNA Mini Kit (Biorad) theo sổ tay hướng dẫn của nhà sản xuất. ARN đã tách được xử lý thêm bằng kit loại bỏ ADN không chứa ADN (lifetechnologies) để loại bỏ ADN bộ gen tạp và giảm nền trong quá trình chạy qPCR. ARN được định lượng bằng cách đo quang phổ ở $\lambda = 260$ nm.

Dãy pha loãng 10 lần 7 bước của 100ng ARN *E. coli* QZ20 được kiểm tra bằng các đoạn môi RT-qPCR (bảng 1) P_{gcvA}_RT_F/R đối với gen *gcvA*, P_{gcvB}_RT_F/R đối với ARN điều hòa *gcvB* và *rrsA*_RT_F và P_{rrsA}_RT_R, đặc hiệu gen *PrrsA* mã hóa ARN 16 S ribosom, mà đóng vai trò làm gen tham chiếu trong quá trình thử nghiệm qPCR. Khoảng động học tuyến tính thích hợp của các dung dịch pha loãng ARN mà dẫn đến hiệu quả khuếch đại tín hiệu $90\% < E < 110\%$ và hệ số hồi quy tuyến tính $R^2 > 0,985$ được xác định với mỗi bộ đoạn môi RT-qPCR. *rrsA* được kiểm tra tính thích hợp của nó khi làm gen tham chiếu bên trong để chuẩn hóa và được thấy là được biểu hiện ổn định trong số tất cả các mẫu kiểm tra (dữ liệu không được chỉ ra). Các phản ứng RT-qPCR được tiến hành bằng hệ phát hiện PCR thời gian thực CFX96 Touch (Biorad) theo quy trình của nhà sản xuất. Việc định lượng tương đối mức độ biểu hiện gen được tính toán với ARN 8h *E. coli* QZ20 làm yếu tố hiệu chỉnh

nội theo phương pháp $\Delta\Delta C_t$ (Livak và Schmittgen 2001).

Kết quả qPCR xác nhận mức độ biểu hiện quá của *gcvA* trong QZ23 so với QZ20 trong pha số mũ sau 8 giờ và 11 giờ lên men. Việc điều hòa giảm *gcvA* được quan sát trong các mẫu 28 giờ khi mật độ tế bào giảm (Fig.15A). Protein điều hòa *gcvB* được điều hòa giảm trong QZ23 so với QZ20 trong pha số mũ sau 8 giờ và 11 giờ lên men. Việc điều hòa giảm toàn bộ sự phiên mã *gcvB* được quan sát trong mẫu 28 giờ khi mật độ tế bào giảm (Fig.15B).

Tạo cấu trúc plasmit pACYC184-*gcvA* và pACYC184-*gcvB*

Vì trình tự khởi đầu *gcvA/B* SNP dẫn đến mức độ biểu hiện quá của *gcvA*, cần được xác nhận rằng trong thực tế mức độ biểu hiện quá *gcvA* dẫn đến hiệu suất alanin được tăng. Do đó plasmit pACYC184-*gcvA* được tạo cấu trúc nhờ công nghệ tách dòng InFusion có trên thị trường (Clontech, Mountain View, CA, USA). Trước tiên, vectơ pACYC184 (bảng 1) thu được thông qua NEB (Ipswich, MA, USA) và được làm thẳng bằng các enzym giới hạn endonucleaza HindIII và SalI, cũng từ NEB. Việc phân cắt này loại bỏ hầu hết gen kháng tetracyclin. Một cách riêng rẽ, *gcvA* orF được khuếch đại PCR từ ADN *E. coli* W kiểu đại với Phusion polymeraza (Thermo Scientific, Waltham, MA) với các đoạn mồi P*gcvA*-pACYC_F và P*gcvA*-pACYC_R (bảng 1). Tương tự để kiểm tra tác dụng của mức độ biểu hiện quá *gcvB*, plasmit pACYC184-*gcvB* được tạo cấu trúc. Đơn vị phiên mã *gcvB* được khuếch đại PCR với các đoạn mồi P*gcvB*-pACYC_F và P*gcvB*-pACYC_R (bảng 1).

Các đoạn mồi chứa các phần nhô ra 15 bp bổ sung tương đồng với các đầu vectơ được làm thẳng để hỗ trợ tách dòng không có đầu nối. Sau đó, phản ứng InFusion được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất với cả khung vectơ đã làm thẳng được tinh chế lẫn phần cài xen *gcvA* và *gcvB*, theo thứ tự. Các sản phẩm InFusion thu được sau đó được sử dụng để biến nạp QZ20 thông qua phương pháp xung điện và chọn lọc các đĩa chloramphenicol LB. Các dòng dương tính được xác định bằng PCR, được xác nhận bởi đọc trình tự ADN, và được sử dụng trong quá trình lên men đối với các nghiên cứu mức độ biểu hiện quá.

So sánh lên men giữa QZ20/pACYC184, QZ20/pACYC184-*gcvA* và QZ20/pACYC-*gcvB*

Các giống tiền nuôi cấy được cho phát triển trong bình lắc chứa môi trường

LB, 20% thể tích nạp đầy ở 37°C và 200 vòng/phút qua đêm. Bước lên men được thực hiện trong hệ thiết bị phản ứng sinh học song song 1,5L DASGIP với 14% glucoza trong môi trường AM 1. Tất cả các điều kiện lên men như được mô tả ở trên.

Thử nghiệm lên men xác nhận rằng mức độ biểu hiện quá của *gcvA* từ plasmit pACYC184-*gcvA* dẫn đến tốc độ tạo thành alanin và chuẩn độ alanin cao hơn so với đối chứng plasmit trống (Fig.16). Ngược với mức độ biểu hiện quá của ARN điều hòa nhỏ *gcvB* từ plasmit pACYC184-*gcvB* dẫn đến sự giảm đáng kể tốc độ tạo thành alanin và chuẩn độ. *E. coli* QZ20/pACYC184-*gcvA* chỉ ra hiệu suất alanin theo thể tích là $1,50 \pm 0,09$ g/(Lh) so với $1,18 \pm 0,08$ g/(Lh) của QZ20 với đối chứng plasmit. *E. coli* QZ20/pACYC184-*gcvB* chỉ ra hiệu suất alanin theo thể tích giảm là $0,89 \pm 0,01$ g/(Lh) so với đối chứng plasmit (Fig.17).

Tạo cấu trúc chủng QZ20 *gcvB* bất hoạt gen QZ71

Vì mức độ biểu hiện quá của ARN điều hòa *gcvB* từ plasmit pACYC184-*gcvB* dẫn đến làm giảm đáng kể hiệu suất alanin, *gcvB* bị làm bất hoạt gen trong QZ20 và được kiểm tra đặc tính. Catxet *gcvB*-cat-sacB được khuếch đại từ vector pQZ11 (Genscript) với các đoạn môi P*gcvB*_1_F/R (bảng 1). Catxet xóa *gcvB* (400 bp) được sắp đặt làm dsADN gBlock từ IDT (SEQ ID NO: 98). Việc tái tổ hợp Red/ET được thực hiện như được mô tả ở trên. Các dòng được kiểm tra bằng PCR khuôn lạc với các đoạn môi đọc trình tự P*gcvB*_seq_F/R. Phần xóa *gcvB* được đưa vào *E. coli* QZ20 và chủng thu được được chỉ định là QZ71.

Thử nghiệm lên men QZ71

Chủng QZ71 (*gcvB* bất hoạt gen) được kiểm tra đặc tính trong quá trình lên men như được mô tả ở trên. Việc tạo thành alanin được giám sát so với chủng QZ20.

Việc xóa ARN điều hòa *gcvB* từ QZ20 dẫn đến chuẩn độ alanin tăng so với QZ20 (Fig.18). Hiệu suất alanin theo thể tích của QZ71 là $1,28 \pm 0,05$ g/(Lh) so với $1,15 \pm 0,06$ g/(Lh) của QZ20 sau 46 giờ (Fig.19).

Ví dụ 8. Xác nhận tác dụng của phần xóa trong gen *brnQ* ($\Delta 667-764$)

BrnQ là chất vận chuyển axit amin mạch nhánh 439 AA giả định mà vận chuyển leuxin, valin, và isoleuxin vào tế bào dưới dạng symporter natri/axit amin mạch nhánh. Trong QZ23, phần xóa 97 bp ($\Delta 667-764$) được xác định là gây ra sự

dịch chuyển khung đọc. Trong khi 222 axit amin đầu tiên của protein 439 AA không được thay đổi, các 31 AA lại thay đổi do sự dịch chuyển khung và chuỗi đầu tận cùng C còn lại bị cắt ngắn do xuất hiện codon kết thúc. Do giả sử rằng sự xóa một phần 97 bp được tìm thấy trong gen *brnQ* trong QZ23 dẫn đến hoạt tính *BrnQ* bị mất đi, việc xóa hoàn toàn gen *brnQ* (bất hoạt gen) được kiểm tra bên cạnh việc xóa một phần *brnQ*.

Tạo cấu trúc chủng QZ57 và QZ69

Catxet *brnQ*-cat-sacB được khuếch đại từ vector pQZ11 (Genscript) bằng các đoạn mồi P*brnQ*_1_F/R (bảng 1). Catxet xóa một phần *brnQ* (462 bp) được khuếch đại từ ADN bộ gen của chủng QZ23 bằng các đoạn mồi P*brnQ*_2_F/R (bảng 1). Catxet *brnQ* KO (500 bp) được sắp đặt làm dsADN gBlock từ IDT (SEQ ID NO: 117). Việc tái tổ hợp Red/ET được thực hiện như được mô tả trước đó. Các dòng được kiểm tra bằng PCR khuôn lạc với các đoạn mồi đọc trình tự P*brnQ*_seq_F/R. Phần xóa một phần *brnQ* được đưa vào *E. coli* QZ20 và chủng thu được được chỉ định là QZ57. Phần xóa hoàn toàn *brnQ* được đưa vào *E. coli* QZ20 và chủng thu được được chỉ định là QZ69.

Thử nghiệm lên men QZ57 và QZ69

Chủng QZ57 (*brnQ* Δ 667-764) và QZ69 (*brnQ* KO) được kiểm tra đặc tính trong quá trình lên men như được mô tả trước đó. Việc tạo thành alanin được giám sát so với chủng QZ20.

Việc xóa 97 bp *brnQ* trong QZ57 và bất hoạt gen hoàn toàn *brnQ* được thực hiện tương đương. Cả hai trường hợp đều dẫn đến sự tạo thành alanin và chuẩn độ alanin cao hơn QZ20 (Fig.20). Hiệu suất alanin theo thể tích của QZ57 là $1,30 \pm 0,04$ g/(Lh) và hiệu suất của QZ69 là 1,28 g/(Lh) so với $1,15 \pm 0,06$ g/(Lh) trong QZ20 sau 46 giờ (Fig.21).

Ví dụ 9. Xác nhận tác dụng của SNP trong gen *lpxD*

Trong QZ23, SNP được phát hiện trong gen *lpxD* dẫn đến đột biến A15T của enzym được mã hóa. UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl) glucosamin-N-acetyltransferaza được mã hóa bởi *LpxD* là enzym thiết yếu liên quan đến quá trình sinh tổng hợp của A lỏng. A lỏng là phần nguyên của màng ngoài lipopolysaccharit (LPS) của *E. coli*.

Tạo cấu trúc chủng QZ56 và QZ70

Catxet lpxD-cat-sacB được khuếch đại từ vector pQZ11 (Genscript) bằng các đoạn mồi PlpxD_1C_F/R (bảng 1). Catxet lpxD SNP (2588 bp) được khuếch đại từ ADN bộ gen của chủng QZ23 với các đoạn mồi lpxD_fix_F/R (bảng 1). Việc tái tổ hợp Red/ET được thực hiện như được mô tả trước đó. Các dòng được kiểm tra bằng PCR khuôn lạc với các đoạn mồi đọc trình tự PlpxD_flank_F/R. SNP lpxD được đưa vào *E. coli* QZ20 và chủng thu được được chỉ định là QZ56. lpxD SNP cũng được đưa vào QZ68 (argP SNP, trình tự khởi đầu gcvA/B SNP, brnQ Δ 667-764) và chủng thu được được chỉ định là QZ70.

Thử nghiệm lên men QZ56 và QZ70

Chủng QZ56 (lpxD SNP) được kiểm tra đặc tính trong quá trình lên men như được mô tả trước đó. Sự tạo thành alanin được giám sát so với chủng QZ20. Đột biến LpxD A15T trong QZ56 dẫn đến chuẩn độ alanin được tăng so với QZ20 (Fig.22). Hiệu suất alanin theo thể tích của QZ56 là $1,34 \pm 0,06$ g/(Lh) so với $1,15 \pm 0,06$ g/(Lh) trong QZ20 sau 46 giờ (Fig.23).

lpxD SNP cũng được đưa vào QZ68 (argP SNP, trình tự khởi đầu gcvA/B SNP, brnQ Δ 667-764) và chủng thu được QZ70 được kiểm tra trong quá trình lên men alanin so với QZ68. Đột biến LpxD A15T có ảnh hưởng lớn đến sự tạo thành alanin. Tốc độ tạo thành alanin của QZ68 và QZ70 là tương đương nhau, tuy nhiên chuẩn độ alanin của QZ68 được làm ổn định ở khoảng 75 g/L, trong khi sự tạo thành alanin được tiếp tục trong QZ70 cho đến khi tất cả glucoza trong môi trường được tiêu thụ và chuẩn độ alanin là 102 g/L đạt được sau khoảng 37 giờ (Fig.24). Hiệu suất alanin theo thể tích của QZ70 là $2,24 \pm 0,002$ g/(Lh) so với $1,64 \pm 0,03$ g/(Lh) của QZ68 sau 46 giờ (Fig.25).

Ví dụ 10. Tạo cấu trúc chủng *E. coli* với gen dadX bị xóa dẫn đến lượng dư đồng phân đối ảnh của L-alanin cao hơn

E. coli chủng QZ30 được tạo cấu trúc bằng cách xóa gen alanin racemaza dadX (SEQ ID NO: 118) ra khỏi bộ gen của *E. coli* chủng QZ23. dadX orF được bất hoạt bằng cách cài xen catxet kháng kanamycin được kẹp sườn bởi FRT, sau đó loại bỏ catxet kháng kháng sinh bằng phương pháp tái tổ hợp FLP như được mô tả trước đó. Kit tái tổ hợp Genbridges Red/ET được sử dụng theo quy trình của nhà sản xuất.

Catxet kanamycin được kẹp sườn bởi FRT được khuếch đại từ pRED/ET plasmit (Gene Bridges) với các đoạn môi PdadX_KO_F (SEQ ID NO: 122) và PdadX_KO_R (SEQ ID NO: 123), mỗi đoạn môi chứa vùng 50 bp tương đồng với dadX orF để cài xen catxet kháng kanamycin. Việc xóa thành công dadX orF được kiểm tra bằng PCR với các đoạn môi PdadX_seq_F (SEQ ID NO: 124) và PdadX_seq_R (SEQ ID NO: 125) và được xác nhận bằng cách đọc trình tự vùng bộ gen.

E. coli chủng QZ30 có gen dadX được bất hoạt được nuôi cấy so với *E. coli* chủng QZ23 có dadX nguyên vẹn trong thiết bị phản ứng sinh học quy mô phòng thí nghiệm và alanin tạo ra được kiểm tra tính bất đối xứng.

Các giống tiền nuôi cấy được cho phát triển trong bình lắc có môi trường LB, 20% thể tích nạp đầy ở 37° C và 200 vòng/phút qua đêm. Việc lên men được thực hiện trong hệ thiết bị phản ứng sinh học song song 1,5L DASGIP (Eppendorf) trong 500mL môi trường AM 1 (2,6 g/L (NH₄)₂HPO₄, 0,87 g/L NH₄H₂PO₄, 0,15 g/L KCl, 0,37 g/L MgSO₄ • 7 H₂O, 15 g/L (NH₄)₂SO₄, betain 1mM, 1ml/L dung dịch nguồn kim loại vi lượng). Nguồn kim loại vi lượng gồm 1,6g/L FeCl₃ • 6 H₂O; 0,2g/L CoCl₂ • 6 H₂O; 0,1g/L CuCl₂ • 2 H₂O; 0,2g/L ZnCl₂; 0,2g/L NaMoO₄ • 2 H₂O; 0,05g/L H₃BO₃, 0,1M HCL. 140 g/L Glucoza được sử dụng làm nguồn cacbon trong môi trường lên men.

Các tế bào *E. coli* tương đương với OD600•mL là 7 được thu hoạch bằng ly tâm và được tạo huyền phù lại trong 5mL môi trường AM 1. # OD600•mL = (OD600 của môi trường nuôi cấy chưa pha loãng) x (thể tích môi trường nuôi cấy theo mL). 5mL các tế bào được tạo huyền phù lại được sử dụng để cấy 500mL môi trường lên men trong thiết bị phản ứng sinh học 1,5L DASGIP. Mỗi chủng được chạy hai lần ở 37°C và tốc độ khuấy 400 vòng/phút. NH₄OH 5N được sử dụng để kiểm soát độ pH đến 6,8 và cung cấp amoni cho môi trường nuôi cấy dưới dạng chất tiền thân alanin trong quá trình lên men. Không có không khí được sục trong quá trình lên men và bình không được tạo áp để sau sự tiêu thụ lượng oxy hòa tan ban đầu trong môi trường bởi các tế bào, quá trình lên men được diễn ra trong điều kiện vi hiếu khí. Các mẫu được lấy trong quá trình lên men và được phân tích nồng độ alanin và tính bất đối xứng bằng HPLC.

Được thấy rằng *E. coli* chủng QZ30 có gen dadX được bất hoạt tạo ra alanin phù

hợp với lượng dư đồng phân đối ảnh (ee) cao hơn của L-alanin >95%, so với *E. coli* QZ23 có dadX nguyên vẹn (Fig.26). Sau 20 giờ nuôi cấy QZ30 tạo ra L-alanin với lượng dư đồng phân đối ảnh là 98,09% so với 82,5% tạo ra bởi QZ23. Sau 34 giờ nuôi cấy ee của L-alanin tạo ra bởi QZ30 là 97,27% so với 81,65% đối với QZ23 và sau 42 giờ nuôi cấy ee là 97,49% L-alanin tạo ra bởi QZ30 so với 82,2% tạo ra bởi QZ23.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật tái tổ hợp có hiệu suất và/hoặc năng suất alanin trong quy trình sản xuất lên men cao hơn so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp này có:

(A) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *dadX* bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó gen *dadX* được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 118,
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 118,
- (iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 119, và
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 119, và

(B) ít nhất một trong số:

- a) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* hoặc thể tương đồng hoặc biến thể mang chức năng của nó bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ,
- b) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *argP* hoặc thể tương đồng hoặc biến thể mang chức năng của nó được đưa vào, được tăng, được tăng cường hoặc được thay đổi, trong đó gen *argP* hoặc thể tương đồng hoặc biến thể mang chức năng của nó được chọn từ nhóm gồm:

(I) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 45 hoặc phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 45, trong đó codon mã hóa axit amin alanin tương ứng với vị trí 286 đến 288 của SEQ ID NO: 45 được thay bằng codon mã hóa axit amin axit glutamic hoặc axit amin có liên quan đến axit glutamic, hoặc

(II) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 46 hoặc polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 46, trong đó axit amin của protein tương ứng với vị trí 96 của SEQ ID NO: 46 không phải là alanin,

c) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* hoặc thể tương đồng hoặc biến thể mang chức năng của nó được đưa vào, được tăng, được tăng cường hoặc được thay đổi, và/hoặc

d) gen *lpxD* được thay đổi hoặc gen tương đồng mang chức năng của nó, trong đó gen *lpxD* hoặc gen tương đồng mang chức năng của nó được chọn từ:

(I) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 49 hoặc phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 49, trong đó codon tương ứng với vị trí 43 đến 45 của SEQ ID NO: 49 mã hóa axit amin threonin hoặc axit amin có liên quan đến threonin, hoặc

(II) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 50 hoặc polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 50, trong đó axit amin của protein tương ứng với vị trí 15 của SEQ ID NO: 50 không phải là anlanin.

2. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen *brnQ* được chọn từ nhóm gồm:
 - (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 1,
 - (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 1,
 - (iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 2, và
 - (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 2.
3. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen *gcvA* được chọn từ nhóm gồm:
 - (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 53,
 - (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 53,
 - (iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 54, và
 - (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 54.
4. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn chứa gen *gcvB* hoặc gen tương đồng mang chức năng của nó có mức độ biểu hiện của gen *gcvB* hoặc gen tương đồng mang chức năng của nó bị giảm hoặc bị ức chế, hoặc trong đó gen *gcvB* hoặc gen tương đồng mang chức năng của nó bị xóa bỏ.
5. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 4, trong đó gen *gcvB* được chọn từ nhóm gồm:
 - (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 58, và
 - (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 58.
6. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính

và/hoặc mức độ biểu hiện của gen alaD được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, trong đó gen alaD được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 15,
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 15,
- (iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 16, và
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 16.

7. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen pflB bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó gen pflB được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 5,
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 5,
- (iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 6, và
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 6.

8. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen adhE bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó gen adhE được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 7,
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 7,
- (iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 8, và
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 8.

9. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen ldhA bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó gen ldhA được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 9,
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 9,

(iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 10, và

(iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 10.

10. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen pta bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó gen pta được chọn từ nhóm gồm:

(i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 11,

(ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 11,

(iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 12, và

(iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 12.

11. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen ackA bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó gen ackA được chọn từ nhóm gồm:

(i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 120, hoặc

(ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 120,

(iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 121, và

(iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 121.

12. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen frdA bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa bỏ, trong đó gen frdA được chọn từ nhóm gồm:

(i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 13,

(ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 13,

(iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 14, và

(iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 14.

13. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính

và/hoặc mức độ biểu hiện của gen ygaW được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, trong đó gen ygaW được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 109,
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 109,
- (iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 110, và
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 110.

14. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen zipA được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, trong đó gen zipA được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 111,
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 111,
- (iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 112, và
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 112.

15. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật này còn có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen lpd được đưa vào, được tăng hoặc được tăng cường, trong đó gen lpd được chọn từ nhóm gồm:

- (i) phân tử axit nucleic có chứa SEQ ID NO: 113,
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 113,
- (iii) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 114, và
- (iv) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 114.

16. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen alaD được liên kết có điều khiển với trình tự khởi đầu có trình tự được chọn từ nhóm gồm:

- (i) SEQ ID NO: 115 hoặc 116,
- (ii) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO: 115 hoặc 116, và

(iii) mảnh chứa ít nhất 10 nucleotit liên tiếp của axit nucleic có trình tự SEQ ID NO: 115.

17. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật được chọn từ chỉ được chọn từ nhóm bao gồm *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Streptomyces*, *Zymomonas*, *Rhodococcus* và *Saccharomyces*.

18. Phương pháp sản xuất pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin, leuxin và/hoặc alanin bao gồm bước nuôi cấy một hoặc nhiều vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1 ở các điều kiện cho phép sản xuất pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin, leuxin và/hoặc alanin.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường chứa đường với lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 30% (trọng lượng/thể tích).

20. Phương pháp theo điểm 18, trong đó hiệu suất pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin, leuxin và/hoặc alanin là ít nhất 80%.

21. Phương pháp theo điểm 18, trong đó độ tinh khiết bất đối xứng của L-alanin là ít nhất 95%.

22. Phương pháp nuôi cấy hoặc phát triển vi sinh vật biến đổi gen bao gồm các bước:

(I) cấy vào môi trường nuôi cấy một hoặc nhiều vi sinh vật biến đổi gen theo điểm 1, và

(II) nuôi cấy hoặc phát triển vi sinh vật biến đổi gen này trong môi trường nuôi cấy đã nêu.

23. Quy trình sản xuất lên men pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin, leuxin và/hoặc alanin bao gồm các bước:

I) cho vi sinh vật theo điểm 1 phát triển trong canh trường trong thiết bị lên men để thu được canh trường lên men, và

II) thu hồi pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin, leuxin và/hoặc alanin từ canh trường lên men.

Fig.1:

A)

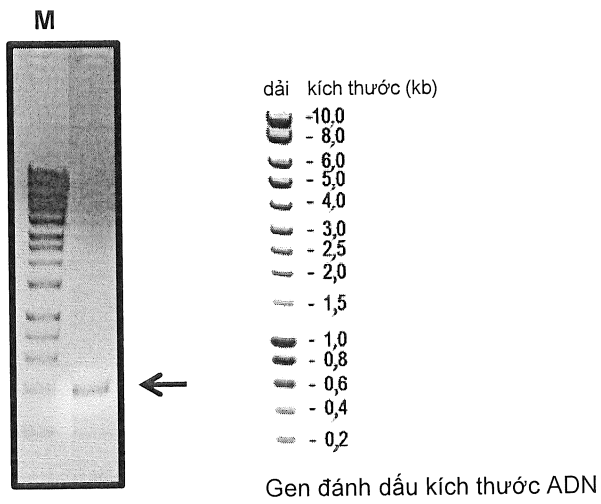


Fig.1 (tiếp):

B)

```

<yfbv
GTCTTTGAGTAATGCTGTCCCGGCGAAACAAGCTAAAAAATTAAACAGAACGATTATCCGGCGTTGACATgcttcacctcaacttcacatatataaagatt
caaaaatttgtgcaaatccacaactcagcgggacaaacgttcaaaaacatttgtctccataccactatcaggtatccttttagcagcctgaaggcctaagtagtacata
ttcattgagtcgccaattccatatatacatattatgccattggctgaaaattacgcaaaatggcatagactcaagatatcttccatcatgcaaaaaaatttgcagtgcat
acka>
gatggttaataataaaatgctcggtgtcatcatcgcggtacgctctatggtccctgacggttttttagccacgtatcaattataggtaactt...ATGTCGAGTAAGTTAGT
MetSerSerLy sLeuVa
P395-ackA-ptA-check1>
ACTGGTTCTGAACCTGCGGTAGTTCCTCAGTAAATTTGCCATCATCGATGCAGTAAATGGTGAAGAGTACCTTTCTGGTTAGCCGAAATGTTTCCAC
LeuValLeuAsnCy sGlySerSerSerLeuLy sPheAlaIlelleAspAlaValAsnGlyGluGluTy rLeuSerGlyLeuAlaGluCy sPheHis
CTGCCCGAAGCACGTATCAAAATGGAAAATGGACGGCAATAAACAGGAAGCGGCTTTAGGTGCAGGCGCTCACAGCGAAAGCGCTCAACTTTATCa
LeuProGluAlaArglleLy sTrply sMetAspGlyAsnLy sGlnGluAlaAlaLeuGlyAlaAlaHisSerGluAlaLeuAsnPhelleA
FRT>
attaaccctcactaaaagggcgccggaagttcctattctctagaaaagtataggaaacttcctcgagccctatagtgagtcgtatttaGCCGATGCTGCAGGGTATGC
sn
GCAAGCCGGTTAACGACCTGTCCCGTGGCGCACTGGTTGACGATATCGTCTACACCATCGCGCTGACTGCGATTTCAGTCTGCACAGCAGTAATC
P395-ackA-ptA-check5
tcgtcatcatccgcagcttgcgtgcggatatatgaaacccggaaaataatcactatttccggttttttattctcttaaatcgtcattaatcctttctgtattatcttgctta
actgcgctgcataatgaattgcgcatttccactttgcatacttaccactttgtttgtgcaagggaatatattgcgctatgtccgcaatcactgaatccaaacacaa
yfcC>
gaagatggggcaATGCCCGATACGTTGGTGATTATCTTTTTTTTGGCTATTTTAACCAGCCTTGCCACCT

```

Fig.2:

A)

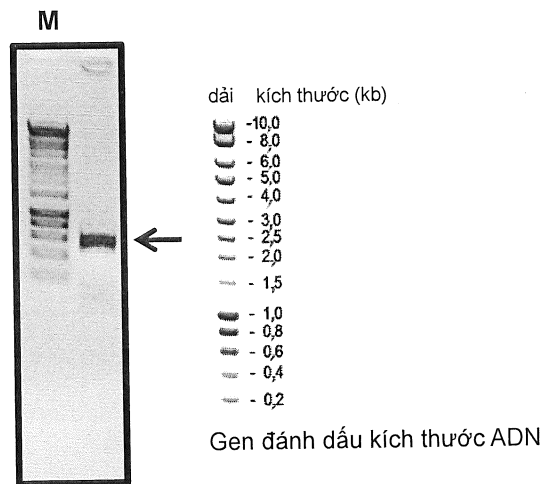


Fig.2 (tiếp):

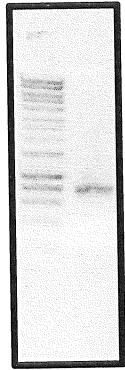
B)

```
CAGGTTGGCTGTAAAGGTTAGTTTTTTTCGCGCTGCCGCTGTCTGTATAACTGGTCATGCTGATAAAGACGGGAATAATCCCTACC
P395 - adhE - check1 >
GGTTGACCGCGCAATAAACCCGATGAAAAATTGAAAGTAAACGGGAAAAATCAAAAAAGGCTGGAATCACGGTTAGTCCGaaagca
aaagccggataaatgttagccataaaataaaggttgaaaagacgcgtgacaataacgcctttttgacagcatttttcacctcctaactacttaaaattg
ctatcattcgttattgtatctagtgtgcaaaaacatgctaattgtagcccaaatcatactacaatttattaaactgttagctataatggcgaaa
P395 - adhE - check2 >
agcgatgctgaaaaggtgtcagcttttgcaaaaatttgatttggatcacgtaatcagtaacccagaagtgagtaaatcttggcttacgcccacctggaaagt
gacgattagagataataaactctaattgtttaactcttttagtaaatcacagtgagtgtagcgcgagtaagcttttgattttcataggttaagc
P395 - adhE - check3 >
aaatcatcacccgactgactatactctcgtatttcgagcagatgattttactaaaaaaagtttaacattatcaggagagca--ATGGCTGTTACTAA
MetAlaValThras
FRT>
TGTCGCTGAACTTAAACGCACTCGTAGAGCGGTGTAAaaatttaacccctcactaaaagggcggaagttcctattctctagaaaaagtatataggaaactt
nValAlaGluLeuAsnAlaLeuValGluArgValLysIleAsnProHis
cgagccctaataatgaactccgtgtaAAGAACCGCTCCGGCTAAAGCTGAGAAAAAAGCGAAAAATCCGCTTAAtcagtagcgctgtct
ggcaatataaaacggcccttctggggccgtttttttgtttacccaaagcaacttttccataaaaccgacagcattagccttcatcatatttggcagac
P395 - adhE - check5 >
gatgtataaacgcctaaaacacaggggataattgtactttacaggtcacaaagtcaggtcggtgcttaagagccctgtgagcggtatagcggttataa
aaactgccgagaaggggtatatagcccggaagaagtgcgtaaaacgaactgacaggataaaagtgcctgtcaccctgtcagtaaaagaaaaattctt
P395 - adhE - check6 >
aTTAATCGTGCGGATGCCTTTCCTGAAATAGCCGTTAATGAGCCGACTTGTAAACGCCCTCTATATAGTGT
```

Fig.3:

A)

M



dài kích thước (kb)

-10,0
- 8,0
- 6,0
- 5,0
- 4,0
- 3,0
- 2,5
- 2,0
- 1,5

- 1,0
- 0,8
- 0,6
- 0,4
- 0,2



Gen đánh dấu kích thước ADN

Fig.3 (tiếp):

B)

```
CCAGCAGGCGTTTCATATGGTATTCCGGGCTGGTCAATTAACCAGAGATTTCATCCCTCGGAATGCCCGGGGCCAACGAAACGTTGTCTCAAACGGGACC
      P395-frd-check1>
AAATGAATATCGGTTACCGTCGCCCTGGCTCATACAAGGCGTCTCCACCTCCAGCACTCCACGATCGGCAAGAAACGACGGATCTCCGCCATAATCGC
      <poxa>
CGCGCGTTTTTAATAAGTTAGGAATGGATGCGCTCGGCTGCCAGGATGCCGTTTCGCTCATagttaaatctccagttttgacaaagggcacgaagtctactcgc
aacgcgacggcgagacaaaattttacgcagggaatcaaacacgcggtgggcagtgactaaaaaaagcacgatctgatggttagtaattaaatcaatcatcttcagtgataat
ttagccctcttgcgcactaaaaaatcgatctcgtaaaatttcagacttatccatcagactatactgtgtacctataaaggagcagtggaatagcgttcgcagaccgta
      frda>
actttcagggtacttaccctgaagtacgtggctgtgggataaaaaacaatctggagggaatg'GTGCAAAACCTTTCAAGCCGATCTTGCCATTGTAGGCCCGCGGTGG
      ValGlnThrPheGlnAlaAspLeuAlaValGlyAlaGlyGln
      FRT>
CGCGGGGAattaaaccctcactaaaagggcggaagttcctattctctagaaagtatataggaaacttcgagcccctaataatgaactccgtgctaACGCCGATGCA CGATCTGAAAAAT
      yAlaGlyIleAsnProHis
TCACGTGCCCTGCGGGCAAATGGGTTTTTCTACGGTCTGGCTGCTATCCTGCACAGTTGTCA CGCTGATTGGTATCGTTACAATCTAA cgtatcgcgccaatgt
      ampC>
aaatccggcccgccctatggcgggccggttttgtatggaaaccagacccttATGTTCAAAACGACGCTCTGCGCCTTATTAACTTCCCTCTTGCTCCACATTTG
      <P395-frd-check4>
CTGCCCTCAACAAATCAACGATATTGTGCATCGCACAAATTACCCGCTTATAGAGCAACAAAAGATCCCCGGTATGGCGGTGGCGGTAAATTATCAG
GGTAAACCTTATTACTTTACCTGGGGCTATGCGGACATCGCCAAAAGCAGCCCGTCACACAGCAAAACGTTGTTTGTAGTTAGGTTCCGTCAGCAAAAC
ATTTACG
```

Fig.4:

A)

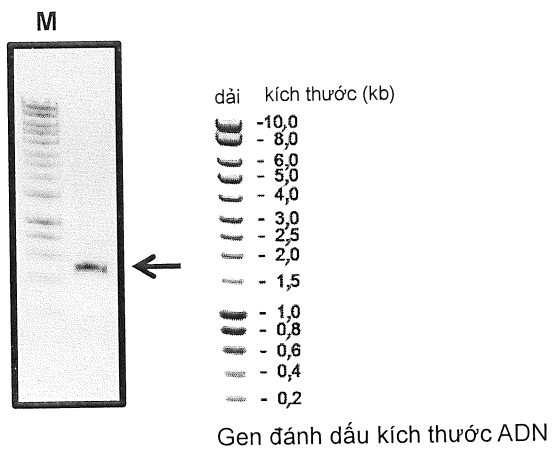


Fig.4 (tiếp):

B)

P395-pflB-check2>
TAATCCGGCACTTCGCATCTCCGGAATTCTGGACCGCTGTGCGTTCTGCACCGGAAAAATTTTCTCACCCTGACCGTGATGAACCTTCATCACTGATAACC
 P395-pflB-check1>
TGATTCCGGTTACGATCGGTAATATTATCGGCGGTGGTTTGTGGTTGGGTTGACATACTGGGTCAATTTACCTGCGTGAACCAACGATCACCATTAAtggt
 pflB>
 tgtcgaagtacgcagtaataataaaaaatccacttaagaaggtaggtgtt--ATGTCCGAGCTTAATGAAAAAGTTAGCCACAGCCTGGGAAGGTTTACCACAAaatta
 ▶MetSerGluLeuAsnGluLysLeuAlaThrAlaTrpGluGlyPheThrLysIleA
 FRT>
 accctcactaaagggcggaagtccctattctctagaaagtatataggaacttcgagccctaataatgaactccgtgctaAAGAAACAGCAGCAGGACGTTATTACTCGTACCT
 ▶snProHis
TCACTCAATCTATGTAAttagatttgactgaaatcgtaaaaaagcgtacagtaaaaaagctacaaataaaaggctccacgaaaagtggggcccttttttagcacgagagccctttttgtcagc
 pflA>
 tatctatactttaaggtgactgccaaaaacagactcgacgtagccttcgagctgcgcacacacggcctcagatgggccacatctggagaaaacacccgcaATGTCAGTTAT
 <P395-pflB-check3
TGGTCGCATTCACTCCTTTGAATCCCTGTGGAACCGTAGACGGCCACAGGTATTCGCTTTATCACCTTTTCCAGGGCTGCCCTGATGCGCTGCCGTATTG
 <P395-pflB-check4
TCATAACCGCGACACCTGGGATACGCATGGC

Fig.5:

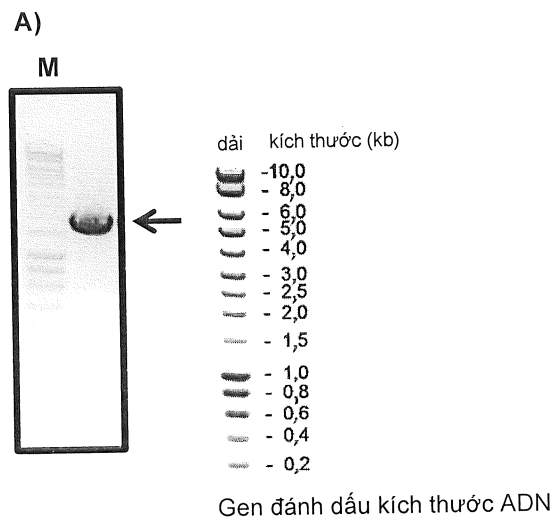


Fig.5 (tiếp)
B)

GAG GGT TTT TGG AGC AGC TGG CGA TTG CTC CGT CTG CGG CAA TTT CGC CAG ACA AGC AGA ATC AAG
P395-ldhA-check1>
TTC TAC CGT GCC GAC GTT CAA TAA CCA GCG GCT GGG ATG TGA AAG GCT GGC GTT GGT GAT ATG CGC
P395-ldhA-check3>
AAG CTG ACA ATC TCC CAC CAG ATA ACG GAG ATC GGG AAT GAT TAA ACC TTT ACG CGT AAT GCG TGG
GCT TTC ATC TAA TGC AAT ACG TGT CCC GAG CGG TAG CCA GAT GCC CGC CAG CGT GGG AAC CCA CAG
CCC GAG CGT CAT CAG CAG CGT CAA CGG CAC AAG AAT AAT CAG TAA TAA CAG CGC GAG AAC GGC TTT
<ydbH
ATA TTT ACC CAG CAT gggtagttaatatctgatttagogaaaaattaagcattcaatacgggtattgtggcatgtttaaccgttcagttgaa
ggttgocgctactaagcatagttgtgatgaattttcaatatcgccatagctttcaattatatgtgaaattttgtaaaatttttagtagcttaaa
alaD gsteaer>
tgtgattcaacatcactggagaaagtctt atg aaa att ggc atc cct aaa gag att aag aac aat gaa aac cgt
M K I G I P K E I K N N E N R
gta gca atc acc ccg gca ggt gtt atg act ctg gtt aaa gcg ggc cac gat gtg tac gtc gaa acc
V A I T P A G V M T L V K A G H D V Y V E T
gaa gcg ggt gcc ggc agc ggc ttc agc gac agc gag tat gag aag gcg ggt gcg gtt att gtg act
E A G A G S G F S D S E Y E K A G A V I V T
aag gcg gag gac gct tgg gca gcc gaa atg gtt ctg aag gtg aaa gaa ccg ctg gcg gag gag ttt
K A E D A W A A E M V L K V K E P L A E E F
cgc tat ttt cgt ccg ggt ctg att ttg ttc acc tac ctg cac ctg gct gcg gcc gag gcg ctg acc
R Y F R P G L I L F T Y L H L A A A E A L T
aag gca ctg gtg gag cag aag gtt gtt ggc atc gcg tac gaa acg gtt caa ctg gcg aat ggt tcc
K A L V E Q K V V G I A Y E T V Q L A N G S
ctg ccg ctg ctg acc cct atg tct gaa gtt gcg ggt cgc atg agc gtt caa gtc gcc gct cag ttt
L P L L T P M S E V A G R M S V Q V G A Q F
ctg gag aaa ccg cac ggt aag ggc att ttg ctg ggt ggt gtt ccg ggt gtc cgc cgt ggt aaa
L E K P H G G K G I L L G G V P G V R R G K
gtg acg atc att ggc ggt ggt acg gcc ggt acg aac gcg gcc aag att gcc gta ggt ctg ggt gca
V T I I G G G T A G T N A A K I A V G L G A
gat gtg acc att ctg gac atc aac gcg gaa cgt ttg cgt gag ctg gac gat ctg ttt ggc gac caa
D V T I L D I N A E R L R E L D D L F G D Q
gtc acc acc ctg atg agc aac agc tac cac atc gcg gag tgc gtc cgt gaa agc gat ttg gtc gtt
V T T L M S N S Y H I A E C V R E S D L V V
ggt gcg gtg ctg atc ccg ggt gca aaa gcc ccg aaa ctg gtg acc gag gag atg gtc cgt agc atg
G A V L I P G A K A P K L V T E E M V R S M
acc ccg ggt tgc gtt ctg gtc gac gtg gca att gac cag ggc ggt atc ttc gaa acc acc gac cgc
T P G S V L V D V A I D Q G G I F E T T D R
gtc acg acc cat gat gac ccg acc tat gtg aaa cat ggc gtg gtt cac tat gcg gtc gcg aat atg
V T T H D D P T Y V K H G V V H Y A V A N M
ccg ggt gca gtg ccg cgc acg tcc acg ttc gcg ctg acg aac gtg acg att cca tac gct ctg cag
P G A V P R T S T F A L T N V T I P Y A L Q
atc gcc aat aag ggc tat cgt gcg gcg tgt ctg gat aat ccg gca ttg ctg aaa ggc atc aat acc
I A N K G Y R A A C L D N P A L L K G I N T
ctg gat ggt cat atc gtt tac gag gct gtg gct gca gca cac aac atg ccg tac act gat gtc cat
L D G H I V Y E A V A A A H N M P Y T D V H
FRT>
agc ttg ctg caa ggc taa aattaaccctcactaaaggcggaagttoctattctctagaaagtataggaacttcgagcccoataatgaactcc
S L L Q G
gtgctatcttgcgcgtcccoctgcattccaggggagctgattccagataatccccaatgacotttccatctctattctttaaatagccctgagtcagaaact
hslJ gene>
gtaattgagaaccaca ATG AAG AAA GTA GCC GCG CTC GTT GCG CTA AGC CTG CTG ATG GCG GGA TGT GTA
AGT AAT GAC AAA ATT GCT GTA ACG CCA GAA CAG TTA CAG CAT CAT CGT TTT GTG CTG GAA AGC GTA
<P395-ldhA-check4
AAC GGT AAG CCC GTG ACC AAC GAT AAA AAT CCG CCA GAA ATC

Fig.6

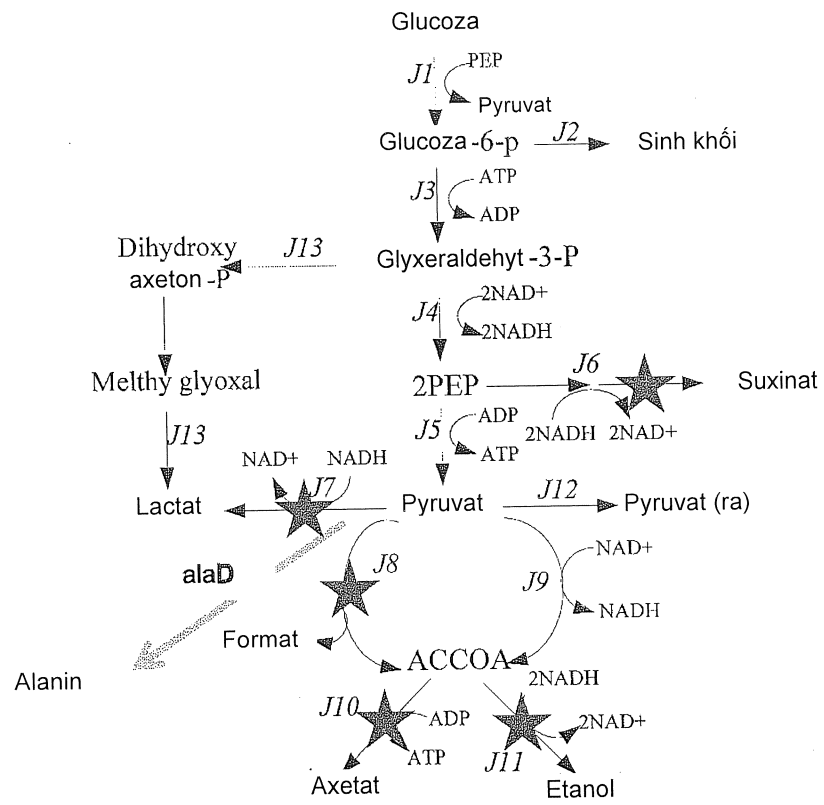


Fig.7

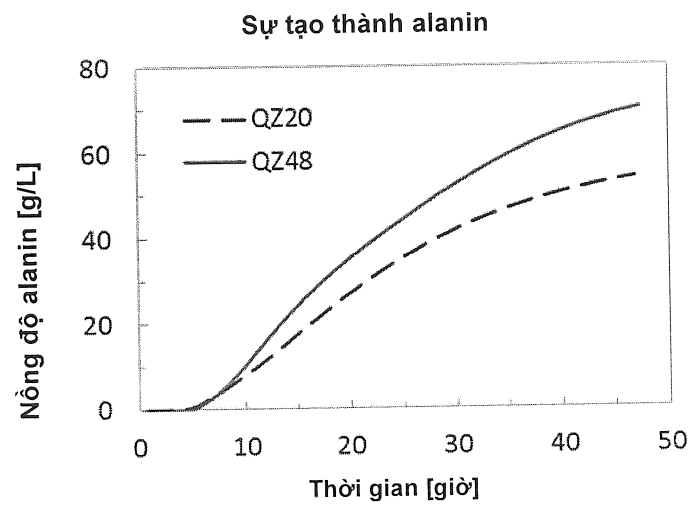


Fig.8

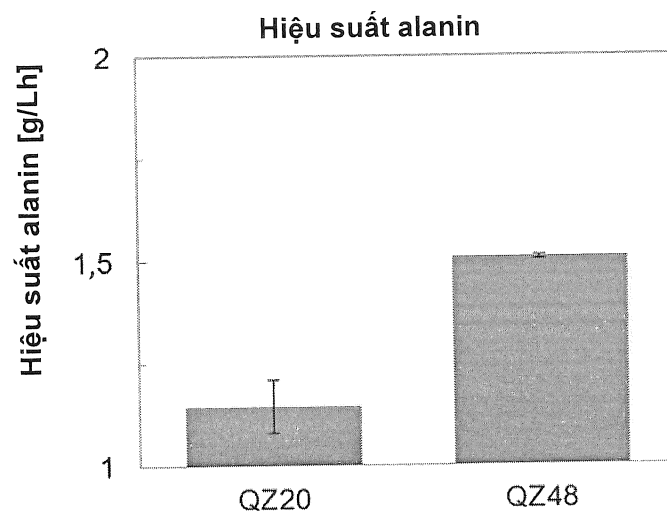


Fig.9

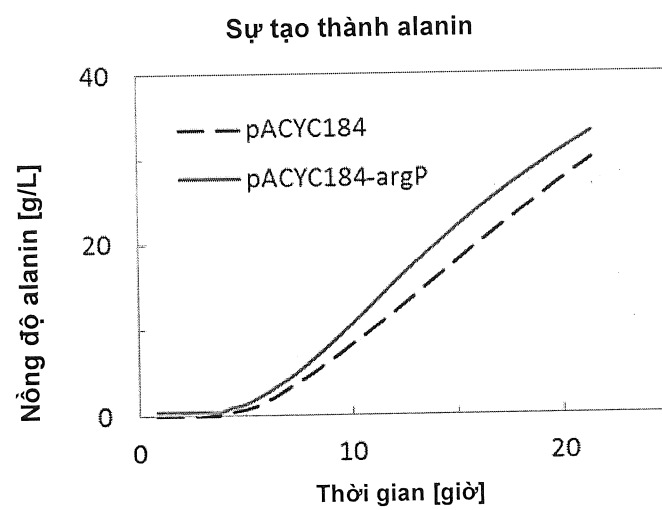


Fig.10:

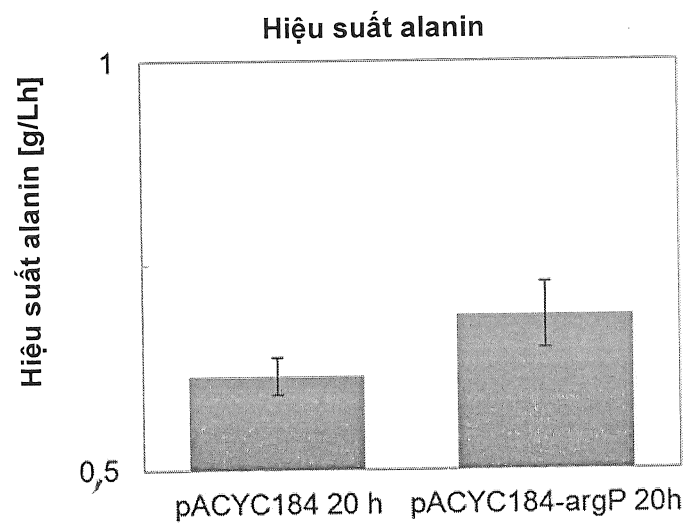


Fig.11:

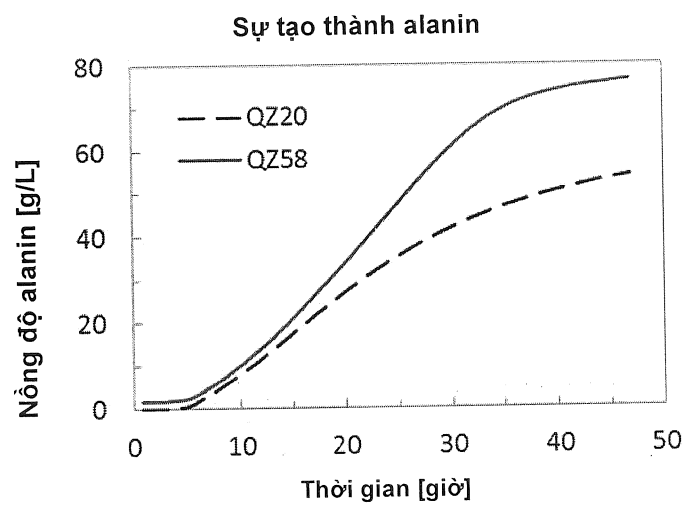


Fig.12:

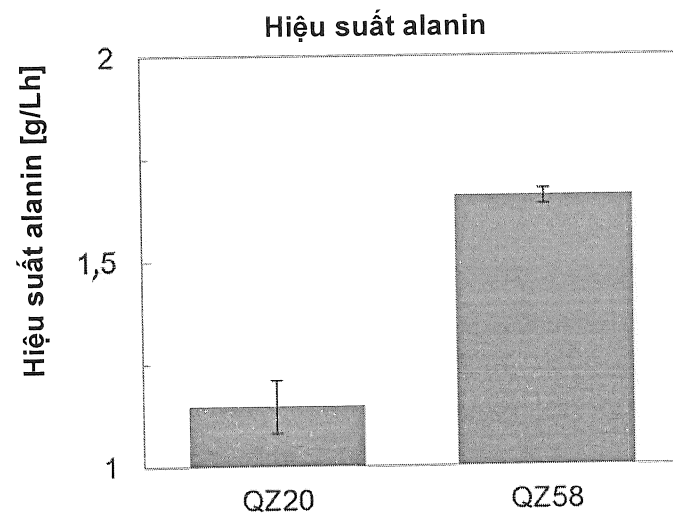


Fig.13:

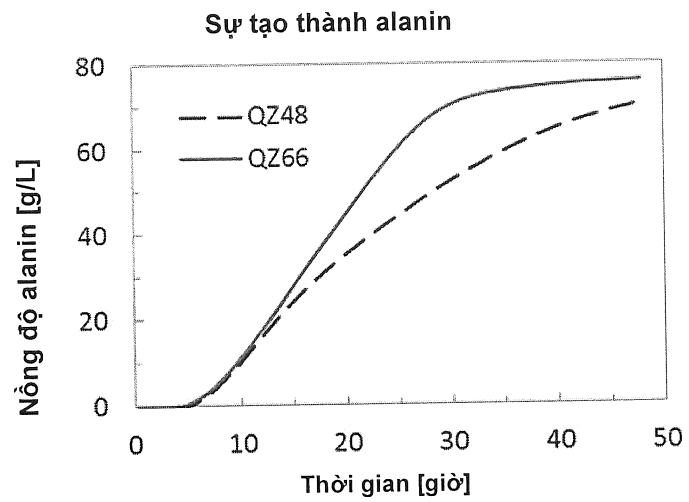


Fig.14:

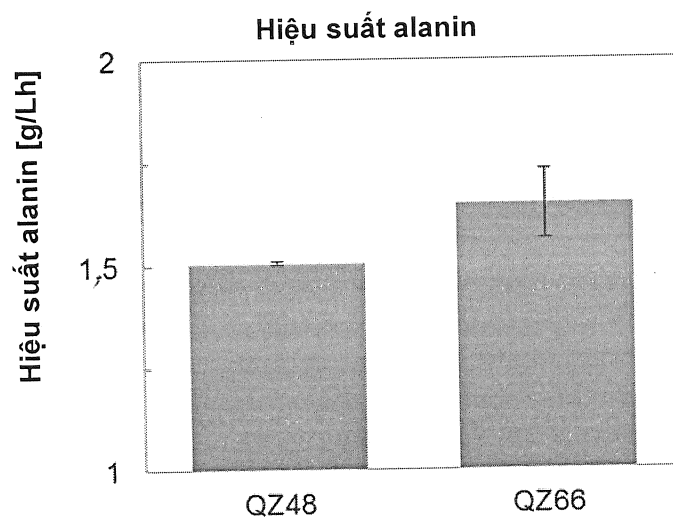


Fig.15:

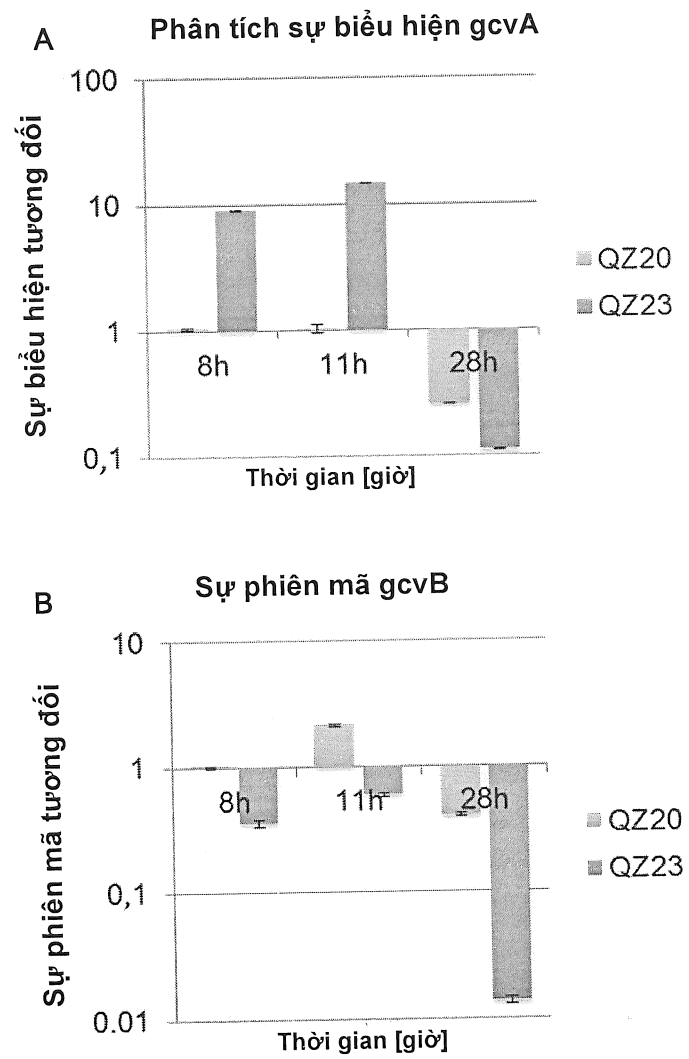


Fig.16:

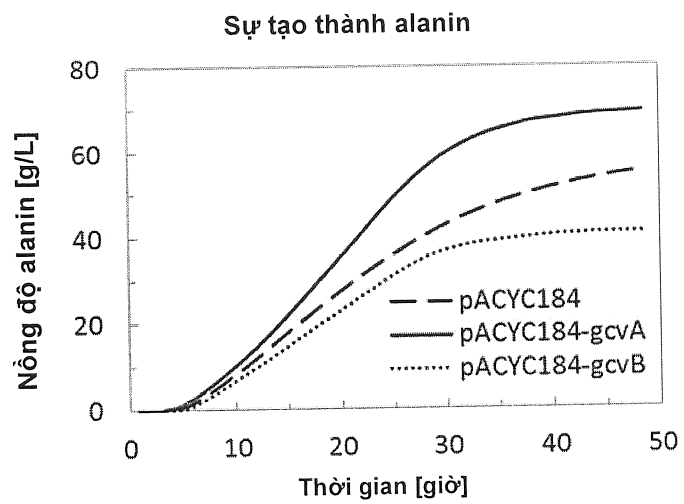


Fig.17:

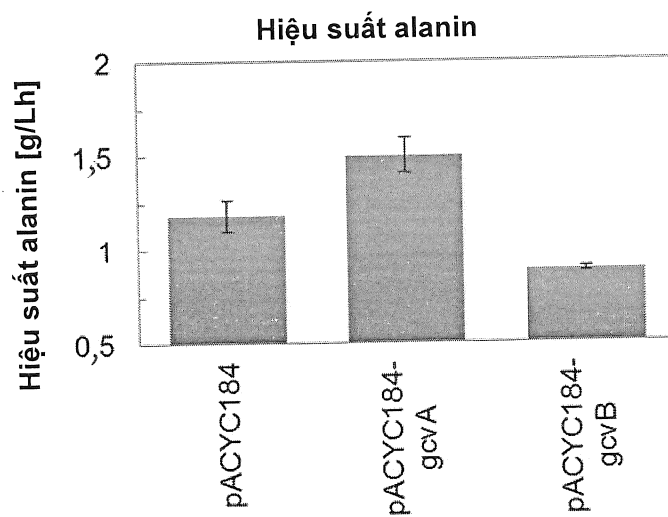


Fig.18:

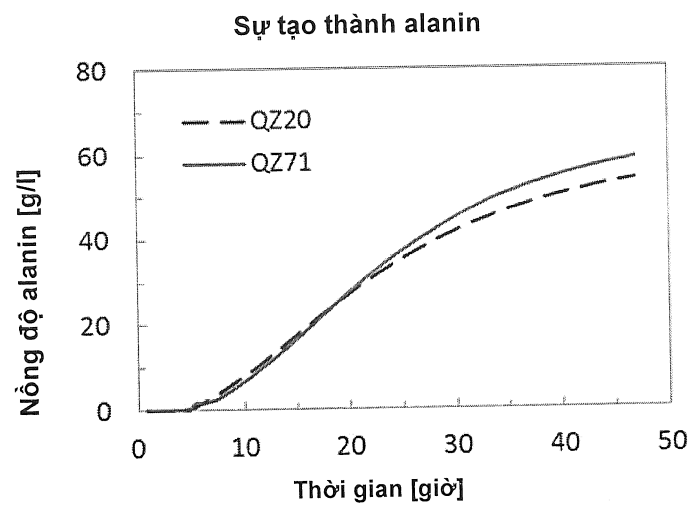


Fig.19:

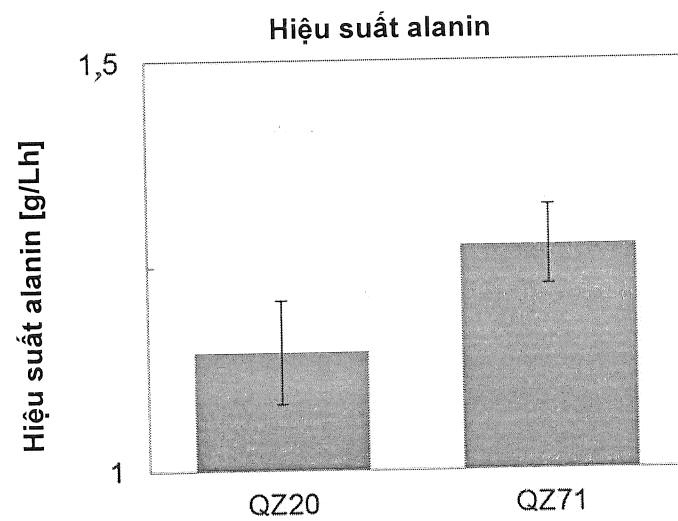


Fig.20:

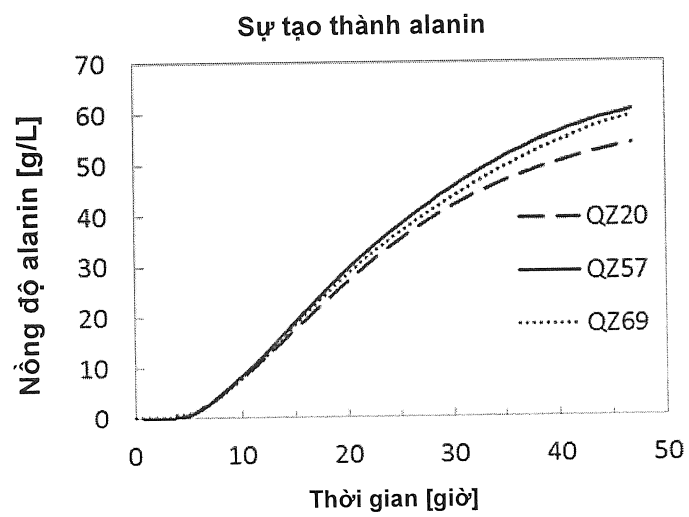


Fig.21:

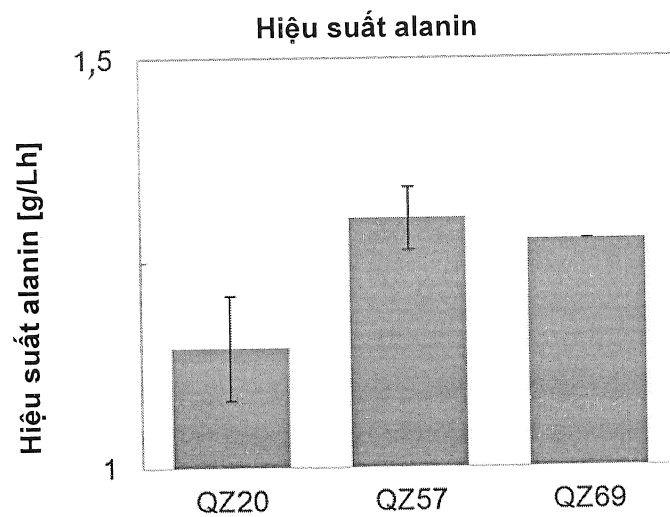


Fig.22:

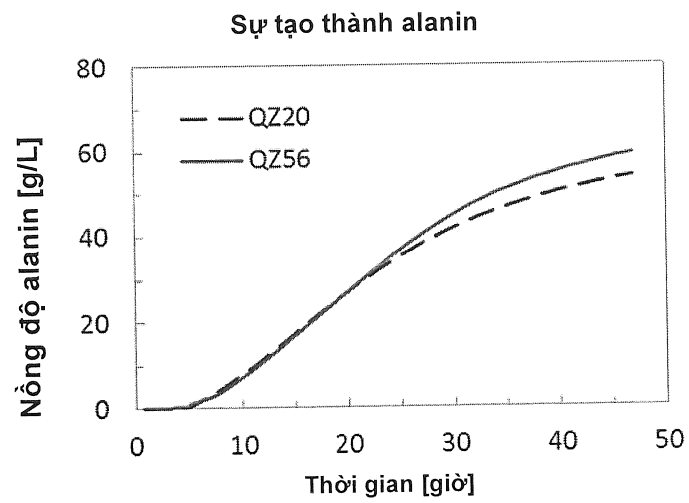


Fig.23:

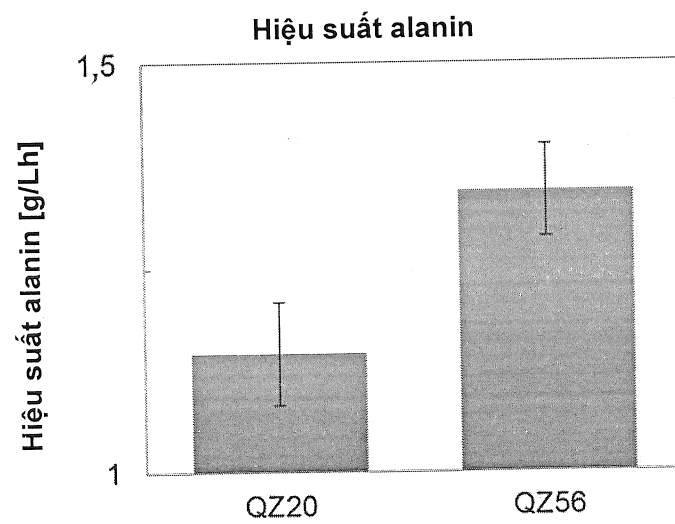


Fig.24:

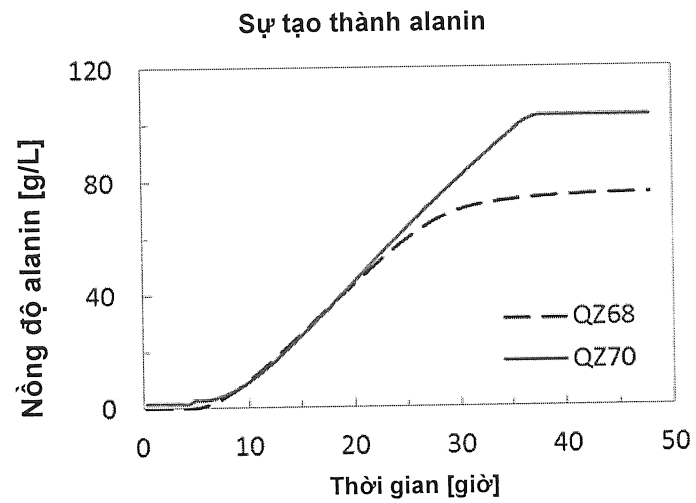


Fig.25:

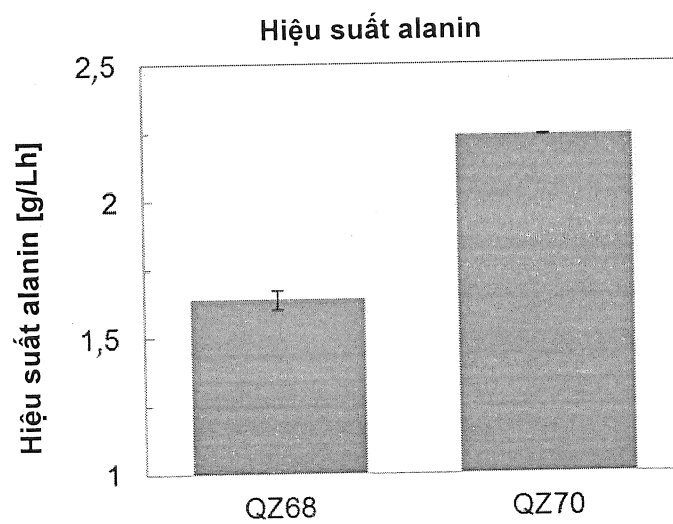
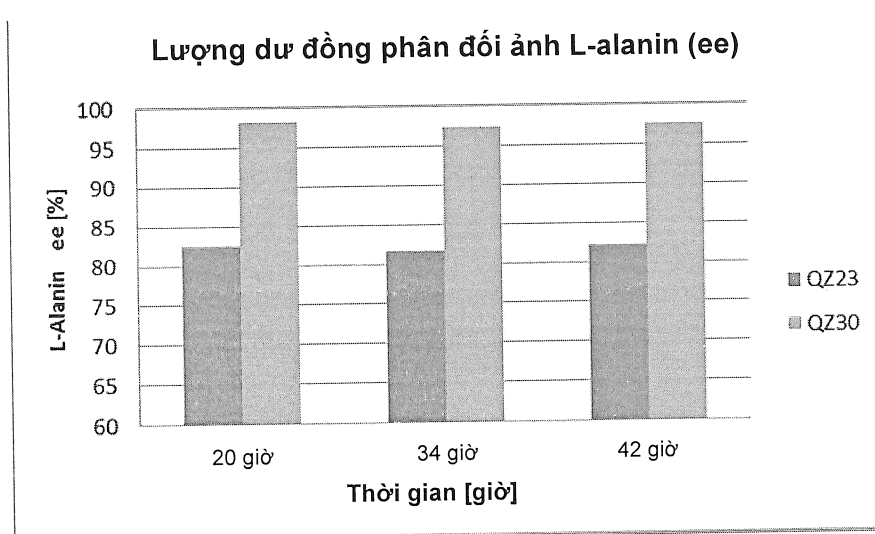


Fig.26:



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BASF SE

<120> VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP CÓ HIỆU SUẤT VÀ/HOẶC NĂNG SUẤT ALANIN CAO TRONG QUY TRÌNH SẢN XUẤT LÊN MEN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PYRUVAT, SUXINAT, ASPARTAT, MALAT, LACTAT, VALIN, LEUXIN VÀ/HOẶC ALANIN SỬ DỤNG VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP NÀY

<130> 0000078588

<150> US 62/171036

<151> 2015 06 04

<160> 125

<170> Theo WIPO Sd. 25

<210> 1

<211> 1320

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> brnQ

<400> 1

atgacccatc	aattaagatc	gcgcgatatc	atcgctctgg	gctttatgac	atttgcgttg	60
ttcgtcggcg	caggtaacat	tattttccct	ccaatggctg	gcttgcaggc	aggcgaacac	120
gtctggactg	cggcattcgg	cttcctcatt	actgccgttg	gcctgccggg	attaacggta	180
gtggcgctgg	caaaagttgg	cggcgggtgt	gacagcctca	gcacgccaat	cggtaaagtc	240
gctggcgctgc	tgctggcaac	ggtttggtac	ctggcggtgg	ggccgctttt	cgctacgccg	300
cgtacagcta	ccgtttccct	tgaagtgggg	attgcgcgcg	tgacgggtga	ttccgcgctg	360
ccgctgttta	tctacagcct	ggtctatttc	gctatcgtta	ttctggtttc	gctctatccg	420
ggcaagctgc	tggataccgt	gggcaacttc	cttgcgccgc	tgaaaattat	cgcgctggtc	480
atcctgtctg	ttgccgcgat	tgtctggccg	gcgggttcta	tcagcacggc	gactgaggct	540
tatcaaaacg	ctgcgttttc	taacggcttc	gttaacggct	atctgaccat	ggatacgctg	600
ggcgcaatgg	tgtttggtat	cgttattggt	aacgcggcgc	gttctcgtgg	cgttaccgaa	660
gcgcgtctgc	tgacccggtta	taccgtctgg	gctggcctga	tggcggtgtg	tgggtctgact	720
ctgctgtacc	tggcgctggt	ccgtctgggt	tcagacagcg	cgtcgctggt	cgatcagtct	780
gcaaacggcg	ctgctattct	gcatgcttac	gttcagcaca	cctttggcgg	cggcggtagc	840
ttcctgctgg	cggcggttaat	cttcacgcgc	tgcctggtaa	cggcagttgg	cctgacctgt	900
gcttgtgcag	aattcctttg	ccagtacgta	ccgctctctt	atcgtaacgt	ggtgtttatc	960
ctcggcggtc	tctcgatggg	ggttttcta	ctcggtta	gccagctgat	ccagatctcc	1020
gtaccgggtg	tgaccgctat	ttatccgcgc	tgtatcgcac	tggttgtatt	aagttttaca	1080
cgctcatggt	ggcataattc	gtcccgcgtg	attgctccgc	cgatgtttat	cagcctgctt	1140
tttggtattc	tcgacgggat	caaagcatct	gcattcagcg	atatcttacc	gtcctggggc	1200
cagcgtttac	cgctggccga	acaaggtctg	gcgtgggtta	tgccaacagt	ggtgatggtg	1260
gttctggcca	ttatctggga	tcgcgcggca	ggtcgtcagg	tgacctccag	cgctcactaa	1320

<210> 2

<211> 439

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> brnQ

<400> 2

Met	Thr	His	Gln	Leu	Arg	Ser	Arg	Asp	Ile	Ile	Ala	Leu	Gly	Phe	Met
1			5					10						15	
Thr	Phe	Ala	Leu	Phe	Val	Gly	Ala	Gly	Asn	Ile	Ile	Phe	Pro	Pro	Met
		20					25					30			
Val	Gly	Leu	Gln	Ala	Gly	Glu	His	Val	Trp	Thr	Ala	Ala	Phe	Gly	Phe
	35					40					45				
Leu	Ile	Thr	Ala	Val	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Thr	Val	Val	Ala	Leu	Ala
	50				55				60						
Lys	Val	Gly	Gly	Gly	Val	Asp	Ser	Leu	Ser	Thr	Pro	Ile	Gly	Lys	Val

65					70					75				80	
Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Ala	Thr	Val	Cys	Tyr	Leu	Ala	Val	Gly	Pro	Leu
			85						90					95	
Phe	Ala	Thr	Pro	Arg	Thr	Ala	Thr	Val	Ser	Phe	Glu	Val	Gly	Ile	Ala
			100					105					110		
Pro	Leu	Thr	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Leu	Phe	Ile	Tyr	Ser	Leu	Val
		115					120					125			
Tyr	Phe	Ala	Ile	Val	Ile	Leu	Val	Ser	Leu	Tyr	Pro	Gly	Lys	Leu	Leu
	130					135					140				
Asp	Thr	Val	Gly	Asn	Phe	Leu	Ala	Pro	Leu	Lys	Ile	Ile	Ala	Leu	Val
145					150					155					160
Ile	Leu	Ser	Val	Ala	Ala	Ile	Val	Trp	Pro	Ala	Gly	Ser	Ile	Ser	Thr
			165					170					175		
Ala	Thr	Glu	Ala	Tyr	Gln	Asn	Ala	Ala	Phe	Ser	Asn	Gly	Phe	Val	Asn
		180					185						190		
Gly	Tyr	Leu	Thr	Met	Asp	Thr	Leu	Gly	Ala	Met	Val	Phe	Gly	Ile	Val
	195					200					205				
Ile	Val	Asn	Ala	Ala	Arg	Ser	Arg	Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Arg	Leu	Leu
	210				215						220				
Thr	Arg	Tyr	Thr	Val	Trp	Ala	Gly	Leu	Met	Ala	Gly	Val	Gly	Leu	Thr
225				230				235							240
Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Leu	Phe	Arg	Leu	Gly	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Leu
			245					250					255		
Val	Asp	Gln	Ser	Ala	Asn	Gly	Ala	Ala	Ile	Leu	His	Ala	Tyr	Val	Gln
		260				265						270			
His	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Phe
	275					280					285				
Ile	Ala	Cys	Leu	Val	Thr	Ala	Val	Gly	Leu	Thr	Cys	Ala	Cys	Ala	Glu
	290				295					300					
Phe	Phe	Ala	Gln	Tyr	Val	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Thr	Leu	Val	Phe	Ile
305				310				315							320
Leu	Gly	Gly	Phe	Ser	Met	Val	Val	Ser	Asn	Leu	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu
			325					330					335		
Ile	Gln	Ile	Ser	Val	Pro	Val	Leu	Thr	Ala	Ile	Tyr	Pro	Pro	Cys	Ile
		340					345					350			
Ala	Leu	Val	Val	Leu	Ser	Phe	Thr	Arg	Ser	Trp	Trp	His	Asn	Ser	Ser
	355					360						365			
Arg	Val	Ile	Ala	Pro	Pro	Met	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Gly	Ile	Leu
	370					375					380				
Asp	Gly	Ile	Lys	Ala	Ser	Ala	Phe	Ser	Asp	Ile	Leu	Pro	Ser	Trp	Ala
385				390				395							400
Gln	Arg	Leu	Pro	Leu	Ala	Glu	Gln	Gly	Leu	Ala	Trp	Leu	Met	Pro	Thr
			405					410					415		
Val	Val	Met	Val	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Trp	Asp	Arg	Ala	Ala	Gly	Arg
		420						425				430			
Gln	Val	Thr	Ser	Ser	Ala	His									
		435													

<210> 3

<211> 1223

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> brnQ Mut

<400> 3

atgacccatc	aattaagatc	gcgcgatatc	atcgctctgg	gctttatgac	atttgcgttg	60
ttcgtcggcg	caggtaacat	tattttccct	ccaatggctg	gcttgcaggc	aggcgaacac	120
gtctggactg	cggcattcgg	cttcctcatt	actgccgttg	gcctgccggt	attaacggta	180
gtggcgctgg	caaaagttgg	cggcggtggt	gacagcctca	gcacgccaat	cggtaaagtc	240
gctggcggtg	tgctggcaac	ggtttggttac	ctggcggtgg	ggccgctttt	cgctacgccg	300
cgtacageta	ccgtttcctt	tgaagtgggg	attgcgccgc	tgacgggtga	ttccgcgctg	360
ccgctgttta	tctacagcct	ggtctatttc	gctatcgtta	ttctggtttc	gctctatccg	420
ggcaagctgc	tggataccgt	gggcaacttc	cttgcgccgc	tgaaaattat	cgcgctggtc	480

```

atcctgtctg ttgccgcat tgtctggccg gcgggttcta tcagcacggc gactgaggct 540
tatcaaaaacg ctgcgttttc taacggcttc gttaacggct atctgaccat ggatacgtg 600
ggcgcaatgg tgtttggtat cgttattgtt aacgcggcgc gttctcgtgg cgttaccgaa 660
gcgcgtcgct ggtcgatcag tctgcaaacg gcgctgctat tctgcatgct tacgttcagc 720
acacctttgg cggcggcggg agcttcctgc tggcggcgtt aatcttcacg gcctgcctgg 780
taacggcagt tggcctgacc tgtgcttggt cagaattctt tgcccagtac gtaccgctct 840
cttatcgtac gctggtgttt atcctcggcg gcttctcgat ggtgggttct aacctcggct 900
taagccagct gatccagatc tccgtaccgg tgctgaccgc tatttatccg ccgtgtatcg 960
cactggttgt attaatgttt acacgctcat ggtggcataa ttcgtcccgc gtgattgctc 1020
cgccgatgtt tatcagcctg ctttttggtt ttctcgacgg gatcaaagca tctgcattca 1080
gcgatatctt accgtcctgg gcgcagcgtt taccgctggc cgaacaaggc ctggcgtggg 1140
taatgccaac agtgggtgat gtggttctgg ccattatctg ggatcgcgcg gcaggctcgc 1200
aggtgacctc cagcgtcac taa 1223

```

<210> 4

<211> 253

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> brnQ_1 Mut1

<400> 4

```

Met Thr His Gln Leu Arg Ser Arg Asp Ile Ile Ala Leu Gly Phe Met
1          5          10          15
Thr Phe Ala Leu Phe Val Gly Ala Gly Asn Ile Ile Phe Pro Pro Met
          20          25          30
Val Gly Leu Gln Ala Gly Glu His Val Trp Thr Ala Ala Phe Gly Phe
          35          40          45
Leu Ile Thr Ala Val Gly Leu Pro Val Leu Thr Val Val Ala Leu Ala
          50          55          60
Lys Val Gly Gly Gly Val Asp Ser Leu Ser Thr Pro Ile Gly Lys Val
65          70          75          80
Ala Gly Val Leu Leu Ala Thr Val Cys Tyr Leu Ala Val Gly Pro Leu
          85          90          95
Phe Ala Thr Pro Arg Thr Ala Thr Val Ser Phe Glu Val Gly Ile Ala
          100          105          110
Pro Leu Thr Gly Asp Ser Ala Leu Pro Leu Phe Ile Tyr Ser Leu Val
          115          120          125
Tyr Phe Ala Ile Val Ile Leu Val Ser Leu Tyr Pro Gly Lys Leu Leu
          130          135          140
Asp Thr Val Gly Asn Phe Leu Ala Pro Leu Lys Ile Ile Ala Leu Val
145          150          155          160
Ile Leu Ser Val Ala Ala Ile Val Trp Pro Ala Gly Ser Ile Ser Thr
          165          170          175
Ala Thr Glu Ala Tyr Gln Asn Ala Ala Phe Ser Asn Gly Phe Val Asn
          180          185          190
Gly Tyr Leu Thr Met Asp Thr Leu Gly Ala Met Val Phe Gly Ile Val
          195          200          205
Ile Val Asn Ala Ala Arg Ser Arg Gly Val Thr Glu Ala Arg Arg Trp
          210          215          220
Ser Ile Ser Leu Gln Thr Ala Leu Leu Phe Cys Met Leu Thr Phe Ser
225          230          235          240
Thr Pro Leu Ala Ala Val Ala Ser Cys Trp Arg Arg
          245          250

```

<210> 5

<211> 2283

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> pflB

<400> 5

```

atgtccgagc ttaatgaaaa gtttagccaca gcctgggaag gttttaccaa aggtgactgg 60
cagaatgaag taaacgtccg tgacttcatt cagaaaaact acactccgta cgagggtgac 120

```

```

gagtccttcc tggctggcgc tactgaagcg accaccaccc tgtgggacaa agtaatggaa 180
ggcggttaaac tggaaaaccg cactcacgcg ccagttgact ttgacaccgc tgttgcttcc 240
accatcacct ctcacgacgc tggctacatc aacaaagcgt tggaaaaagt tgttggtcta 300
cagactgaag ctccgctgaa acgtgctctt atccccgttcg gtggtatcaa aatgatcgag 360
ggttcctgca aagcgtacaa ccgcgaactg gacccgatga tcaaaaaaat cttcactgaa 420
taccgtaaaa ctcacaacca gggcgtgttc gacgtttaca ctccggacat cctgcgttgc 480
cgtaaatccg gtgttctgac cggcttgcca gatgcttatg gccgtggccg tatcatcggt 540
gactaccgtc gcgttgcgct gtacggatc gactacctga tgaagacaa atacgctcag 600
ttcacctctc tgcaggctga tctggaaaac ggcgtaaacc tggaaacagac tatccgtctg 660
cgcgaagaaa tcgctgaaca gcaccgcgct ctgggtcaga tgaagaaat ggctgcgaaa 720
tacggctacg acatctctgg tccggctacc aacgctcagg aagctatcca gtggacttac 780
ttcggctacc tggctgctgt taagtctcag aacggtgctg caatgtcctt cggtcgtacc 840
tccaccttcc tggatgtgta catcgaacgt gacctgaaag ctggcaagat caccgaacaa 900
gaagcgcagg aaatggttga ccacctggtc atgaaactgc gtatggttcg cttcctgcgt 960
actccggaat acgatgaact gttctctggc gacccgatct gggcaaccga atctatcgg 1020
ggtatgggcc tcgacggctc taccctgggt accaaaaaca gcttccgttt cctgaacacc 1080
ctgtacacca tgggtccgct tccggaaccg aacatgacca ttctgtggtc tgaaaaactg 1140
ccgctgaact tcaagaaatt cgccgctaaa gtgtccatcg acacctcttc tctgcaatat 1200
gagaacgatg acctgatgct tccggacttc aacaacgatg actacgctat tgcttgctgc 1260
gtaagcccgga tgatcgttgg taaacaaatg cagttcttcg gtgcgcgtgc aaacctggcg 1320
aaaaccatgc tgtacgcaat caacggcggc gttgacgaaa aactgaaaat gcaggttgg 1380
ccgaagtctg aaccgatcaa aggcgatgtc ctgaactatg atgaagtgat ggagcgcag 1440
gatcacttca tggactggct ggctaaacag tacatcactg cactgaacat catccactac 1500
atgcacgaca agtacagcta cgaagcctct ctgatggcgc tgcacgaccg tgacgttatc 1560
cgcaccatgg cgtgtggtat cgctggctctg tccgttgctg ctgactccct gtctgcaatc 1620
aaatatgcga aagttaaac gattcgtgac gaagacggtc tggctatcga cttcgaaatc 1680
gaaggcgaat acccgagtt tggtaacaat gatccgcgtg tagatgacct ggctgttgac 1740
ctggtagaac gtttcatgaa gaaaattcag aaactgcaca cctaccgtga cgctatccc 1800
actcagtctg ttctgaccat cacttctaac gttgtgtatg gtaagaaaac tggtaacacc 1860
ccagacggtc gtcgtgctgg cgcgccgttc ggaccgggtg ctaaccgcat gcacggctcg 1920
gaccagaaag gtgctgtagc gtctctgact tccgttgcta aactaccgtt tgcttacgct 1980
aaagatggta tctcctacac cttctctatc gttccgaacg cactgggtaa agacgacgaa 2040
gttcgtaaga ccaacctggc tggctctgat gatggttact tccaccacga agcatccatc 2100
gaaggtggtc agcacctgaa cgttaacgtg atgaaccgtg aaatgctgct cgacgcgatg 2160
gaaaaccgga aaaaatatcc gcagctgacc atccgtgtat ctggctacgc agtacgtttc 2220
aactcgctga ctaaagaaca gcagcaggac gttattactc gtaccttcac tcaatctatg 2280
taa

```

<210> 6

<211> 760

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> pflB

<400> 6

```

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

```

His	Asn	Gln	Gly	Val	Phe	Asp	Val	Tyr	Thr	Pro	Asp	Ile	Leu	Arg	Cys
145					150					155					160
Arg	Lys	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Pro	Asp	Ala	Tyr	Gly	Arg	Gly
				165					170						175
Arg	Ile	Ile	Gly	Asp	Tyr	Arg	Arg	Val	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ile	Asp	Tyr
			180					185					190		
Leu	Met	Lys	Asp	Lys	Tyr	Ala	Gln	Phe	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	Leu
		195					200					205			
Glu	Asn	Gly	Val	Asn	Leu	Glu	Gln	Thr	Ile	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile
	210					215					220				
Ala	Glu	Gln	His	Arg	Ala	Leu	Gly	Gln	Met	Lys	Glu	Met	Ala	Ala	Lys
225					230					235					240
Tyr	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Gly	Pro	Ala	Thr	Asn	Ala	Gln	Glu	Ala	Ile
				245					250						255
Gln	Trp	Thr	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly
			260					265					270		
Ala	Ala	Met	Ser	Phe	Gly	Arg	Thr	Ser	Thr	Phe	Leu	Asp	Val	Tyr	Ile
		275					280					285			
Glu	Arg	Asp	Leu	Lys	Ala	Gly	Lys	Ile	Thr	Glu	Gln	Glu	Ala	Gln	Glu
	290					295					300				
Met	Val	Asp	His	Leu	Val	Met	Lys	Leu	Arg	Met	Val	Arg	Phe	Leu	Arg
305					310					315					320
Thr	Pro	Glu	Tyr	Asp	Glu	Leu	Phe	Ser	Gly	Asp	Pro	Ile	Trp	Ala	Thr
				325					330						335
Glu	Ser	Ile	Gly	Gly	Met	Gly	Leu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Val	Thr	Lys
			340					345					350		
Asn	Ser	Phe	Arg	Phe	Leu	Asn	Thr	Leu	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Ser	Pro
		355					360					365			
Glu	Pro	Asn	Met	Thr	Ile	Leu	Trp	Ser	Glu	Lys	Leu	Pro	Leu	Asn	Phe
	370					375					380				
Lys	Lys	Phe	Ala	Ala	Lys	Val	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Ser	Leu	Gln	Tyr
385					390					395					400
Glu	Asn	Asp	Asp	Leu	Met	Arg	Pro	Asp	Phe	Asn	Asn	Asp	Asp	Tyr	Ala
				405					410					415	
Ile	Ala	Cys	Cys	Val	Ser	Pro	Met	Ile	Val	Gly	Lys	Gln	Met	Gln	Phe
			420					425					430		
Phe	Gly	Ala	Arg	Ala	Asn	Leu	Ala	Lys	Thr	Met	Leu	Tyr	Ala	Ile	Asn
		435					440					445			
Gly	Gly	Val	Asp	Glu	Lys	Leu	Lys	Met	Gln	Val	Gly	Pro	Lys	Ser	Glu
	450					455					460				
Pro	Ile	Lys	Gly	Asp	Val	Leu	Asn	Tyr	Asp	Glu	Val	Met	Glu	Arg	Met
465					470					475					480
Asp	His	Phe	Met	Asp	Trp	Leu	Ala	Lys	Gln	Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu	Asn
				485					490					495	
Ile	Ile	His	Tyr	Met	His	Asp	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Glu	Ala	Ser	Leu	Met
			500					505					510		
Ala	Leu	His	Asp	Arg	Asp	Val	Ile	Arg	Thr	Met	Ala	Cys	Gly	Ile	Ala
		515					520					525			
Gly	Leu	Ser	Val	Ala	Ala	Asp	Ser	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Tyr	Ala	Lys
	530					535					540				
Val	Lys	Pro	Ile	Arg	Asp	Glu	Asp	Gly	Leu	Ala	Ile	Asp	Phe	Glu	Ile
545					550					555					560
Glu	Gly	Glu	Tyr	Pro	Gln	Phe	Gly	Asn	Asn	Asp	Pro	Arg	Val	Asp	Asp
				565					570					575	
Leu	Ala	Val	Asp	Leu	Val	Glu	Arg	Phe	Met	Lys	Lys	Ile	Gln	Lys	Leu
			580					585					590		
His	Thr	Tyr	Arg	Asp	Ala	Ile	Pro	Thr	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Ile	Thr
		595					600					605			
Ser	Asn	Val	Val	Tyr	Gly	Lys	Lys	Thr	Gly	Asn	Thr	Pro	Asp	Gly	Arg
	610					615					620				
Arg	Ala	Gly	Ala	Pro	Phe	Gly	Pro	Gly	Ala	Asn	Pro	Met	His	Gly	Arg
625					630					635					640
Asp	Gln	Lys	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Thr	Ser	Val	Ala	Lys	Leu	Pro

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

<210> 7

<211> 2676

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> adhE

<400> 7

atggctgtta	ctaattgtcgc	tgaacttaac	gcactcgtag	agcgtgtaaa	aaaagcccag	60
cgtgaatatg	ccagtttcac	tcaagagcaa	gtagacaaaa	tcttccgcgc	cgccgctctg	120
gctgctgcag	atgctcgaat	cccactcgcg	aaaatggccg	ttgccgaatc	cggcatgggt	180
atcgtcgaag	ataaagtgat	caaaaaccac	tttgcttctg	aatatatcta	caacgcctat	240
aaagatgaaa	aaacctgtgg	tgttctgtct	gaagacgaca	cttttggtac	catcactatc	300
gctgaaccaa	tcggtattat	ttgcggtatc	gttccgacca	ctaaccgcac	ttcaactgct	360
atcttcaaat	cgctgatcag	tctgaagacc	cgtaacgcca	ttatcttctc	cccgcacccg	420
cgtgcaaaaag	atgccaccaa	caaagcggct	gatatcgttc	tgcaggctgc	tatcgctgcc	480
ggtgctccga	aagatctgat	cggctggatc	gatcaacctt	ctggtgaact	gtctaacgca	540
ctgatgcacc	acccagacat	caacctgatc	ctcgcgactg	gtgggtccggg	cataggttaa	600
gccgcataca	gctccggtaa	accagctatc	gggtgtaggcg	cgggcaacac	tccagttggt	660
atcgatgaaa	ctgctgatat	caaacgtgca	gttgcatctg	tactgatgtc	caaaaccttc	720
gacaacggcg	taatctgtgc	ttctgaacag	tctgttgggt	ttgttgactc	tgtttatgac	780
gctgtacgtg	aacgttttgc	aaccacggcg	ggctatctgt	tgcagggtaa	agagctgaaa	840
gctgttcagg	atgttatcct	gaaaaacggt	gcgctgaacg	cggctatcgt	tggtcagcca	900
gcctataaaa	ttgctgaact	ggcaggcttc	tctgtaccag	aaaacaccaa	gattctgatc	960
ggtgaagtga	ccgttggtga	tgaaagcgaa	ccgttcgcac	atgaaaaact	gtccccgact	1020
ctggcaatgt	accgcgctaa	agatttcgaa	gacgcggtag	aaaaagcaga	gaaactgggt	1080
gctatgggcg	gtatcgggtc	tacctcttgc	ctgtacactg	accaggataa	ccaaccggct	1140
cgcgttttct	acttcgggtc	gaaaatgaaa	acggctcgta	tcttgattaa	caccccagcg	1200
tctcagggtg	gtatcgggtg	cctgtataac	ttcaaacctg	caccttccct	gactctgggt	1260
tgtggttctt	ggggtggtaa	ctccatctct	gaaaacggtg	gtccgaaaca	cctgatcaac	1320
aagaaaaccg	ttgctaagcg	agctgaaaac	atgttgtggc	acaaacttcc	gaaatctatc	1380
tacttccgcc	gtggctccct	gccaatcgcg	ctggatgaag	tgattactga	tggccacaaa	1440
cgtgcgctca	tcgtgactga	ccgcttccct	ttcaacaatg	gttatgctga	tcagatcact	1500
tccgtactga	aagcagcagg	cgttgaaaact	gaagtcttct	tcgaagtaga	agcggacccg	1560
accctgagca	tcgttcgtaa	aggtgcagaa	ctggcaaac	ccttcaaacc	agacgtgatt	1620
atcgcgctgg	gtggtgggtc	cccgatggac	gccgcgaaga	tcatgtgggt	tatgtacgaa	1680
catccggaaa	ctcacttcga	agagctggcg	ctgcgcttta	tggatatccg	taaacgtatc	1740
tacaagttcc	cgaaaatggg	cgtgaaagcg	aaaatgatcg	ctgtcaccac	cacttctggt	1800
acaggttctg	aagtcaactcc	gtttgcgggt	gtaactgacg	acgctactgg	tcagaaatat	1860
cgcgtggcag	actatgcgct	gactccggat	atggcgattg	tcgacgccaa	cctggttatg	1920
gacatgccga	agtccctgtg	tgctttcggt	gggtctggacg	cagtaactca	cgccatggaa	1980
gcttatgttt	ctgtactggc	atctgagttc	tctgatggtc	aggctctgca	ggcactgaaa	2040
ctgctgaaag	aatatctgcc	agcgtcctac	caogaagggt	ctaaaaatcc	ggtagcgcgt	2100
gaacgtgttc	acagtgcagc	gactatcgcg	ggatatcgct	ttgcgaacgc	cttccctgggt	2160
gtatgtcact	caatggcgca	caaactgggt	tcccagttcc	atattccgca	cggctctggca	2220
aacgccctgc	tgatttgtaa	cgttattcgc	tacaatgcga	acgacaaccc	gaccaagcag	2280
actgcattca	gccagtatga	cgtccgcgag	gctcgccgct	gttatgctga	aattgccgac	2340
cacttgggtc	tgagcgcacc	gggcgaccgt	actgctgcta	agatcgagaa	actgctggca	2400

```

tggctggaaa cgctgaaagc tgaactgggt attccgaaat ctatccgtga agctggcggt 2460
caggaagcag acttcctggc gaacgtggat aaactgtctg aagatgcgtt cgatgaccag 2520
tgcaccggcg ctaaccgcgc ttaccgcgtg atctccgagc tgaaacagat cctgctggat 2580
acctactacg gtcgtgatta tgtagaaggt gaaactgcag cgaaaaaaga agccgctccg 2640
gctaaaagctg agaaaaaagc gaaaaaatcc gcttaa 2676

```

<210> 8

<211> 891

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> adhE

<400> 8

```

Met Ala Val Thr Asn Val Ala Glu Leu Asn Ala Leu Val Glu Arg Val
1          5          10          15
Lys Lys Ala Gln Arg Glu Tyr Ala Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Asp
20          25          30
Lys Ile Phe Arg Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala Arg Ile Pro
35          40          45
Leu Ala Lys Met Ala Val Ala Glu Ser Gly Met Gly Ile Val Glu Asp
50          55          60
Lys Val Ile Lys Asn His Phe Ala Ser Glu Tyr Ile Tyr Asn Ala Tyr
65          70          75          80
Lys Asp Glu Lys Thr Cys Gly Val Leu Ser Glu Asp Asp Thr Phe Gly
85          90          95
Thr Ile Thr Ile Ala Glu Pro Ile Gly Ile Ile Cys Gly Ile Val Pro
100         105         110
Thr Thr Asn Pro Thr Ser Thr Ala Ile Phe Lys Ser Leu Ile Ser Leu
115         120         125
Lys Thr Arg Asn Ala Ile Ile Phe Ser Pro His Pro Arg Ala Lys Asp
130         135         140
Ala Thr Asn Lys Ala Ala Asp Ile Val Leu Gln Ala Ala Ile Ala Ala
145         150         155         160
Gly Ala Pro Lys Asp Leu Ile Gly Trp Ile Asp Gln Pro Ser Val Glu
165         170         175
Leu Ser Asn Ala Leu Met His His Pro Asp Ile Asn Leu Ile Leu Ala
180         185         190
Thr Gly Gly Pro Gly Met Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro
195         200         205
Ala Ile Gly Val Gly Ala Gly Asn Thr Pro Val Val Ile Asp Glu Thr
210         215         220
Ala Asp Ile Lys Arg Ala Val Ala Ser Val Leu Met Ser Lys Thr Phe
225         230         235         240
Asp Asn Gly Val Ile Cys Ala Ser Glu Gln Ser Val Val Val Val Asp
245         250         255
Ser Val Tyr Asp Ala Val Arg Glu Arg Phe Ala Thr His Gly Gly Tyr
260         265         270
Leu Leu Gln Gly Lys Glu Leu Lys Ala Val Gln Asp Val Ile Leu Lys
275         280         285
Asn Gly Ala Leu Asn Ala Ala Ile Val Gly Gln Pro Ala Tyr Lys Ile
290         295         300
Ala Glu Leu Ala Gly Phe Ser Val Pro Glu Asn Thr Lys Ile Leu Ile
305         310         315         320
Gly Glu Val Thr Val Val Asp Glu Ser Glu Pro Phe Ala His Glu Lys
325         330         335
Leu Ser Pro Thr Leu Ala Met Tyr Arg Ala Lys Asp Phe Glu Asp Ala
340         345         350
Val Glu Lys Ala Glu Lys Leu Val Ala Met Gly Gly Ile Gly His Thr
355         360         365
Ser Cys Leu Tyr Thr Asp Gln Asp Asn Gln Pro Ala Arg Val Ser Tyr
370         375         380
Phe Gly Gln Lys Met Lys Thr Ala Arg Ile Leu Ile Asn Thr Pro Ala
385         390         395         400

```

Ser Gln Gly Gly Ile Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Lys Leu Ala Pro Ser
 405 410 415
 Leu Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Gly Asn Ser Ile Ser Glu Asn
 420 425 430
 Val Gly Pro Lys His Leu Ile Asn Lys Lys Thr Val Ala Lys Arg Ala
 435 440 445
 Glu Asn Met Leu Trp His Lys Leu Pro Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Arg
 450 455 460
 Gly Ser Leu Pro Ile Ala Leu Asp Glu Val Ile Thr Asp Gly His Lys
 465 470 475 480
 Arg Ala Leu Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu Phe Asn Asn Gly Tyr Ala
 485 490 495
 Asp Gln Ile Thr Ser Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Glu Thr Glu Val
 500 505 510
 Phe Phe Glu Val Glu Ala Asp Pro Thr Leu Ser Ile Val Arg Lys Gly
 515 520 525
 Ala Glu Leu Ala Asn Ser Phe Lys Pro Asp Val Ile Ala Leu Gly
 530 535 540
 Gly Gly Ser Pro Met Asp Ala Ala Lys Ile Met Trp Val Met Tyr Glu
 545 550 555 560
 His Pro Glu Thr His Phe Glu Glu Leu Ala Leu Arg Phe Met Asp Ile
 565 570 575
 Arg Lys Arg Ile Tyr Lys Phe Pro Lys Met Gly Val Lys Ala Lys Met
 580 585 590
 Ile Ala Val Thr Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe
 595 600 605
 Ala Val Val Thr Asp Asp Ala Thr Gly Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp
 610 615 620
 Tyr Ala Leu Thr Pro Asp Met Ala Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met
 625 630 635 640
 Asp Met Pro Lys Ser Leu Cys Ala Phe Gly Gly Leu Asp Ala Val Thr
 645 650 655
 His Ala Met Glu Ala Tyr Val Ser Val Leu Ala Ser Glu Phe Ser Asp
 660 665 670
 Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Ala
 675 680 685
 Ser Tyr His Glu Gly Ser Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu Arg Val His
 690 695 700
 Ser Ala Ala Thr Ile Ala Gly Ile Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly
 705 710 715 720
 Val Cys His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ser Gln Phe His Ile Pro
 725 730 735
 His Gly Leu Ala Asn Ala Leu Leu Ile Cys Asn Val Ile Arg Tyr Asn
 740 745 750
 Ala Asn Asp Asn Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Ser Gln Tyr Asp Arg
 755 760 765
 Pro Gln Ala Arg Arg Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Gly Leu
 770 775 780
 Ser Ala Pro Gly Asp Arg Thr Ala Ala Lys Ile Glu Lys Leu Leu Ala
 785 790 795 800
 Trp Leu Glu Thr Leu Lys Ala Glu Leu Gly Ile Pro Lys Ser Ile Arg
 805 810 815
 Glu Ala Gly Val Gln Glu Ala Asp Phe Leu Ala Asn Val Asp Lys Leu
 820 825 830
 Ser Glu Asp Ala Phe Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro Arg Tyr
 835 840 845
 Pro Leu Ile Ser Glu Leu Lys Gln Ile Leu Leu Asp Thr Tyr Tyr Gly
 850 855 860
 Arg Asp Tyr Val Glu Gly Glu Thr Ala Ala Lys Lys Glu Ala Ala Pro
 865 870 875 880
 Ala Lys Ala Glu Lys Lys Ala Lys Lys Ser Ala
 885 890

<210> 9
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> ldhA
 <400> 9

atgaaaactcg	ccgtttatag	cacaaaacag	tacgacaaga	agtacctgca	acaggtgaac	60
gagtcctttg	gctttgagct	ggaatttttt	gactttctgc	tgacggaaaa	aaccgctaaa	120
actgccaatg	gctgcgaagc	ggtatgtatt	ttcgtaaacc	atgacggcag	ccgcccgggtg	180
ctggaagagc	tgaaaaagca	cggcggttaa	tatatcgccc	tgcgctgtgc	cggtttcaat	240
aacgtcgacc	ttgacgcggc	aaaagaactg	gggctgaaag	tagtccgtgt	tccagcctat	300
gatccagagg	ccgttgctga	acacgccatc	ggtatgatga	tgacgctgaa	ccgccgtatt	360
caccgcgcgt	atcagcgtac	ccgtgacgct	aacttctctc	tggaaggtct	gaccggcttt	420
actatgtatg	gcaaaacggc	aggcgttatc	ggtaccggta	aaatcggtgt	ggcgatgctg	480
cgcattctga	aaggttttgg	tatgcgtctg	ctggcggttc	atccgtatcc	aagtgcagcg	540
gcgctggaac	tcggtgtgga	gtatgtcgat	ctgccaaacc	tggtctctga	atcagacggt	600
atctctctgc	actgcccgtc	gacaccggaa	aactaccatc	tggtgaacga	agccgccttc	660
gatcatagta	aaaatggcgt	gatgatcgtc	aataccagtc	gcggtgcatt	gattgattct	720
caggcagcaa	ttgaagcgct	gaaaaatcag	aaaattgggt	cgttggtgat	ggacgtgtat	780
gagaacgaac	gcgatctatt	ctttgaagat	aaatccaacg	acgtaattca	ggatgacgta	840
ttccgtcgcc	tgtctgcctg	ccacaacgtg	ctatttaccg	ggcaccaggc	attcctgaca	900
gcagaagctc	tgaccagtat	ttctcagact	acgctgcaaa	acttaagcaa	tctggaaaaa	960
ggcgaaacct	gcccgaacga	actggtttta				990

<210> 10
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> ldhA
 <400> 10

Met	Lys	Leu	Ala	Val	Tyr	Ser	Thr	Lys	Gln	Tyr	Asp	Lys	Lys	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Gln	Gln	Val	Asn	Glu	Ser	Phe	Gly	Phe	Glu	Leu	Glu	Phe	Phe	Asp	Phe
			20					25					30		
Leu	Leu	Thr	Glu	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Ala	Asn	Gly	Cys	Glu	Ala	Val
		35					40					45			
Cys	Ile	Phe	Val	Asn	Asp	Asp	Gly	Ser	Arg	Pro	Val	Leu	Glu	Glu	Leu
	50					55					60				
Lys	Lys	His	Gly	Val	Lys	Tyr	Ile	Ala	Leu	Arg	Cys	Ala	Gly	Phe	Asn
65					70					75					80
Asn	Val	Asp	Leu	Asp	Ala	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Lys	Val	Val	Arg
				85				90						95	
Val	Pro	Ala	Tyr	Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Ala	Glu	His	Ala	Ile	Gly	Met
			100					105					110		
Met	Met	Thr	Leu	Asn	Arg	Arg	Ile	His	Arg	Ala	Tyr	Gln	Arg	Thr	Arg
		115					120					125			
Asp	Ala	Asn	Phe	Ser	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Gly	Phe	Thr	Met	Tyr	Gly
	130					135					140				
Lys	Thr	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Thr	Gly	Lys	Ile	Gly	Val	Ala	Met	Leu
145					150					155					160
Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Phe	Gly	Met	Arg	Leu	Leu	Ala	Phe	Asp	Pro	Tyr
			165					170						175	
Pro	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Gly	Val	Glu	Tyr	Val	Asp	Leu	Pro
			180					185					190		
Thr	Leu	Phe	Ser	Glu	Ser	Asp	Val	Ile	Ser	Leu	His	Cys	Pro	Leu	Thr
		195					200					205			
Pro	Glu	Asn	Tyr	His	Leu	Leu	Asn	Glu	Ala	Ala	Phe	Asp	Gln	Met	Lys
	210						215				220				
Asn	Gly	Val	Met	Ile	Val	Asn	Thr	Ser	Arg	Gly	Ala	Leu	Ile	Asp	Ser
225					230					235					240
Gln	Ala	Ala	Ile	Glu	Ala	Leu	Lys	Asn	Gln	Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Gly

[illegible]

```
<210> 11
<211> 2145
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<220>
<223> pta
<400> 11
```

gtgtcccgta	ttattatgct	gatccctacc	ggaaccagcg	tcggtctgac	cagcgctcagc	60
cttggcgtga	tccgtgcaat	ggaacgcaaa	ggcggttcgtc	tgagcggtttt	caaacctatc	120
gctcagccgc	gtaccggtgg	cgatgcgccc	gatacagacta	cgactatcgt	gogtgcggaac	180
tcttccacca	cgacggccgc	tgaaccgctg	aaaatgagct	acgttgaagg	tctgctttcc	240
agcaatcaga	aagatgtgct	gatggaagag	atcgtcgcaa	actaccacgc	taacacccaaa	300
gacgctgaag	tgtttctggt	tgaaggctctg	gtcccgacac	gtaagcacca	gtttgcccg	360
tctctgaact	acgaaatcgc	taaaacgctg	aatgcggaaa	tctgtcttgt	tatgtctcag	420
ggcactgaca	ccccggaaca	gctgaaagag	cgtatcgaa	tgaccgcga	cagcttcggc	480
ggtgccaaaa	acaccaacat	caccggcggt	atcgttaaca	aactgaacgc	accggttgat	540
gaacagggtc	gtactcgccc	ggatctgtcc	gagattttcg	acgactcttc	caaagctaaa	600
gtaaacaatg	ttgatccggc	gaagctgcaa	gaatccagcc	cgctgccggt	tctcggcgct	660
gtgccgtgga	gctttgacct	gatcgcgact	cgctgcgatcg	atatggctcg	ccacctgaat	720
gcgaccatca	tcaacgaagg	cgacatcaat	actcgccgcg	ttaaatccgt	cactttctgc	780
gcacgcagca	ttccgcacat	gctggagcac	ttcogtgccg	gttctctgct	ggtgactttc	840
gcagaccgtc	ctgacgtgct	ggtggccgct	tgcctggcag	ccatgaacgg	cgtagaaatc	900
ggtgccctgc	tgtctgactgc	cggtctacga	atggacgcgc	gcatttctaa	actgtgcgaa	960
cgtgcttttcg	ctaccggcct	gcoggtatatt	atggtgaaca	ccaacacctg	gcagacctct	1020
ctgagccctgc	agagctttcaa	cctggaagtt	ccggttgacg	atcacgagcg	tatcgagaaa	1080
gttcagggaat	acggttgctaa	ctacatcaac	gctgactgga	tccaatctct	gactgccact	1140
tctgagcgca	gccgtcgtct	gtctccgcct	gcgttccggt	atcagctgac	tgaacttgcg	1200
cgcaaagcgg	gcaaacgtat	cgtactgccg	gaaggtgacg	aaccgcgtac	cgtaaagca	1260
gccgctatct	gtgctgaacg	tggatatcgca	acttgcgta	tgtctgggtaa	tccggcagag	1320
atcaaccgtg	ttgcagcgtc	tcagggtgta	gaactgggtg	cagggaattga	aatcgttgat	1380
ccagaagtgg	ttcgcgaaa	ctatgttggt	cgtctggctg	aactgcgtaa	gaacaaaggc	1440
atgaccgaaa	cogttgcccg	cgaacagctg	gaagacaacg	tggtgctcgg	tacgctgatg	1500
ctggaacagg	atgaagttga	tggctcgtgt	tccgggtgctg	ttcacactac	cgcaaacacc	1560
atccgtccgc	cgctgcagct	gatcaaaact	gcaccgggca	gtccctggt	atcttccgtg	1620
ttcttcatgc	tgtctgccgga	acagggtttac	gtttacggtg	actgtgcgat	caaccgggat	1680
ccgaccgctg	aacagctggc	agaaatcgcg	attcagtcgg	ctgattccgc	tgcggccttc	1740
ggtatcgaa	cgcgcgttgc	tatgctctcc	tactccaccg	gtacttctg	tgcaggtagc	1800
gacgtagaaa	aagttcgcga	agcaactcgt	ctggcgcag	aaaaacctcc	tgacctgatg	1860
atcgacggtc	cgctgcagta	cgacgctgcg	gtaatgctg	acgttgcgaa	atccaaagcg	1920
ccgaactctc	cgaatgcagg	tcgcgtctacc	gtgttcactc	tcccgatct	gaacaccggt	1980
aacaccacct	acgaagcggg	acagcgttct	gccgacctga	tctccatcgg	gccgatgctg	2040
cagggtatgc	gcaagccggt	taacgacctg	tcccggtggc	cactggttga	cgatatcgtc	2100
tacaccatcg	cgctgactgc	gattcagctc	gcacagcagc	agtaa		2145

```
<210> 12
<211> 714
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<220>
<223> pta
<400> 12
```

Met	Ser	Arg	Ile	Ile	Met	Leu	Ile	Pro	Thr	Gly	Thr	Ser	Val	Gly	Leu
1				5					10					15	
Thr	Ser	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Ile	Arg	Ala	Met	Glu	Arg	Lys	Gly	Val
			20					25					30		
Arg	Leu	Ser	Val	Phe	Lys	Pro	Ile	Ala	Gln	Pro	Arg	Thr	Gly	Gly	Asp
		35					40					45			
Ala	Pro	Asp	Gln	Thr	Thr	Thr	Ile	Val	Arg	Ala	Asn	Ser	Ser	Thr	Thr
	50					55					60				
Thr	Ala	Ala	Glu	Pro	Leu	Lys	Met	Ser	Tyr	Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser
65					70					75					80
Ser	Asn	Gln	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Tyr	His
				85					90					95	
Ala	Asn	Thr	Lys	Asp	Ala	Glu	Val	Val	Leu	Val	Glu	Gly	Leu	Val	Pro
			100					105					110		
Thr	Arg	Lys	His	Gln	Phe	Ala	Gln	Ser	Leu	Asn	Tyr	Glu	Ile	Ala	Lys
	115						120					125			
Thr	Leu	Asn	Ala	Glu	Ile	Val	Phe	Val	Met	Ser	Gln	Gly	Thr	Asp	Thr
	130					135					140				
Pro	Glu	Gln	Leu	Lys	Glu	Arg	Ile	Glu	Leu	Thr	Arg	Asn	Ser	Phe	Gly
145					150					155					160
Gly	Ala	Lys	Asn	Thr	Asn	Ile	Thr	Gly	Val	Ile	Val	Asn	Lys	Leu	Asn
				165					170					175	
Ala	Pro	Val	Asp	Glu	Gln	Gly	Arg	Thr	Arg	Pro	Asp	Leu	Ser	Glu	Ile
			180					185					190		
Phe	Asp	Asp	Ser	Ser	Lys	Ala	Lys	Val	Asn	Asn	Val	Asp	Pro	Ala	Lys
	195						200					205			
Leu	Gln	Glu	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Trp	Ser
	210					215					220				
Phe	Asp	Leu	Ile	Ala	Thr	Arg	Ala	Ile	Asp	Met	Ala	Arg	His	Leu	Asn
225					230					235					240
Ala	Thr	Ile	Ile	Asn	Glu	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg	Arg	Val	Lys	Ser
				245					250					255	
Val	Thr	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Ile	Pro	His	Met	Leu	Glu	His	Phe	Arg
			260					265					270		
Ala	Gly	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Ala	Asp	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Val
	275						280					285			
Ala	Ala	Cys	Leu	Ala	Ala	Met	Asn	Gly	Val	Glu	Ile	Gly	Ala	Leu	Leu
	290					295					300				
Leu	Thr	Gly	Gly	Tyr	Glu	Met	Asp	Ala	Arg	Ile	Ser	Lys	Leu	Cys	Glu
305					310					315					320
Arg	Ala	Phe	Ala	Thr	Gly	Leu	Pro	Val	Phe	Met	Val	Asn	Thr	Asn	Thr
				325					330					335	
Trp	Gln	Thr	Ser	Leu	Ser	Leu	Gln	Ser	Phe	Asn	Leu	Glu	Val	Pro	Val
			340					345					350		
Asp	Asp	His	Glu	Arg	Ile	Glu	Lys	Val	Gln	Glu	Tyr	Val	Ala	Asn	Tyr
		355					360					365			
Ile	Asn	Ala	Asp	Trp	Ile	Glu	Ser	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	Arg	Ser
	370					375					380				
Arg	Arg	Leu	Ser	Pro	Pro	Ala	Phe	Arg	Tyr	Gln	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala
385					390					395					400
Arg	Lys	Ala	Gly	Lys	Arg	Ile	Val	Leu	Pro	Glu	Gly	Asp	Glu	Pro	Arg
				405					410					415	
Thr	Val	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Cys	Ala	Glu	Arg	Gly	Ile	Ala	Thr	Cys
			420					425					430		
Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Val	Ala	Ala	Ser	Gln
		435					440					445			
Gly	Val	Glu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ile	Glu	Ile	Val	Asp	Pro	Glu	Val	Val
	450					455					460				
Arg	Glu	Ser	Tyr	Val	Gly	Arg	Leu	Val	Glu	Leu	Arg	Lys	Asn	Lys	Gly
465					470					475					480
Met	Thr	Glu	Thr	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Glu	Asp	Asn	Val	Val	Leu
				485					490					495	
Gly	Thr	Leu	Met	Leu	Glu	Gln	Asp	Glu	Val	Asp	Gly	Leu	Val	Ser	Gly

[illegible]

```
<210> 13
<211> 1809
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<220>
<223> frdA
<400> 13
```

gtgcaaacct	ttcaagccga	tcttgccatt	gtaggcgccg	gtggcgcggg	attacgtgct	60
gcaattgctg	ccgcgcaggc	aaatccgaat	gcaaaaatcg	cactaatctc	aaaagtatac	120
ccgatgcgta	gccataccgt	tgctgcagaa	gggggctccg	ccgctgtcgc	gcaggatcat	180
gacagcttcg	aatatcactt	tcacgataca	gtagcgggtg	gcgactgggt	gtgtgagcag	240
gatgtcgtgg	attattttcgt	ccaccactgc	ccaaccgaaa	tgaccaact	ggaactgtgg	300
ggatgcccat	ggagccgtcg	ccgggatggt	agcgtcaacg	tacgtcgctt	cggcggcatg	360
aaaatcgagc	gcacctgggt	cgccgcgcgat	aagaccggct	tccatatgct	gcacacgctg	420
ttccagacct	ctctgcaatt	ccgcgagatc	cagcgttttg	acgaacattt	cgtgctggat	480
attctggttg	atgatgggtca	tgttcgcggc	ctggtagcaa	tgaacatgat	ggaaggcacg	540
ctgggtgcaga	tccgtgctaa	cgcggtcggt	atggctactg	gcggtgcggg	tcgcgtttat	600
cgttacaaca	ccaacggcgg	catcgttacc	ggtgacggta	tgggtatggc	gctaagccac	660
ggcggttccgc	tgcgtgacat	ggaattcggt	cagtatcacc	caaccgggtc	gccaggttcc	720
ggtatcctga	tgaccgaagg	ctgccgcggg	gaaggcggtg	ttctgggtcaa	caaaaatggc	780
taccgttatc	tgcaagatta	cggcatgggc	ccggaaactc	cgctgggcga	gccgaaaaac	840
aaatatatgg	aactgggtcc	acgcgacaaa	gtttctcagg	ccttctggca	cgaatggcgt	900
aaaggcaaca	ccatctccac	gcgcgctggc	gatgtggttt	atctcgacct	gcgtcacctc	960
ggcgagaaaa	aactgcatga	acgtctgccg	ttcatctgcg	aactggcgaa	agcgtacgtt	1020
ggcgctcgatc	cggttaaaga	accgattccg	gtacgtccga	ccgcacacta	caccatgggc	1080
ggtatcgaaa	ccgatcagaa	ctgtgaaacc	cgcattaaag	gtctgttcgc	cgtgggtgaa	1140
tgttcctctg	ttggtctgca	cggtgcaaac	cgtctggggt	ctaactccct	ggcggaactg	1200
gtggtcttcg	gccgtctggc	cggtgaacaa	gcgacagagc	gtgcagcaac	tgccggtaat	1260
ggcaacgaag	cggcaattga	agcgcaggca	cgtggcggtg	aacaaagtct	gaaagatctg	1320
gttaaccagg	atggcggcga	aaactgggcg	aagatccgcg	acgaaatggg	cctggcaatg	1380
gaagaagggt	gcggtatcta	ccgtacggcg	gaactgatgc	agaaaaccat	cgacaagctg	1440
gcagagctgc	aggaaacgct	caagcgcgtg	cgcatacccg	acacctccag	cgtgttcaac	1500
accgacctgc	tctacaccat	tgaactgggc	cacgggtctga	acgttgctga	atgtatggcg	1560
cactccgcaa	tggcacgtaa	agagtccgc	ggcgcacacc	agcgtctgga	cgaaggttgc	1620
accgagcgtg	acgacgtcaa	cttcctcaaa	cacaccctcg	ccttcgcgca	tgctgatggc	1680

```
acgactcgcc tggagtacag cgacgtgaag attactacgc tgccgccagc taaacgcgtt 1740
tacggtggcg aagcggatgc agccgataag gcggaagcag ccaataagaa ggagaaggcg 1800
aatggctga                                     1809
```

```
<210> 14
<211> 602
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<220>
<223> frdA
<400> 14
```

Met	Gln	Thr	Phe	Gln	Ala	Asp	Leu	Ala	Ile	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala
1				5					10					15	
Gly	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Gln	Ala	Asn	Pro	Asn	Ala	Lys
			20					25					30		
Ile	Ala	Leu	Ile	Ser	Lys	Val	Tyr	Pro	Met	Arg	Ser	His	Thr	Val	Ala
		35					40					45			
Ala	Glu	Gly	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Gln	Asp	His	Asp	Ser	Phe	Glu
	50					55					60				
Tyr	His	Phe	His	Asp	Thr	Val	Ala	Gly	Gly	Asp	Trp	Leu	Cys	Glu	Gln
65					70					75					80
Asp	Val	Val	Asp	Tyr	Phe	Val	His	His	Cys	Pro	Thr	Glu	Met	Thr	Gln
				85					90					95	
Leu	Glu	Leu	Trp	Gly	Cys	Pro	Trp	Ser	Arg	Arg	Pro	Asp	Gly	Ser	Val
			100					105					110		
Asn	Val	Arg	Arg	Phe	Gly	Gly	Met	Lys	Ile	Glu	Arg	Thr	Trp	Phe	Ala
		115					120					125			
Ala	Asp	Lys	Thr	Gly	Phe	His	Met	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gln	Thr	Ser
	130					135					140				
Leu	Gln	Phe	Pro	Gln	Ile	Gln	Arg	Phe	Asp	Glu	His	Phe	Val	Leu	Asp
145					150					155					160
Ile	Leu	Val	Asp	Asp	Gly	His	Val	Arg	Gly	Leu	Val	Ala	Met	Asn	Met
				165					170					175	
Met	Glu	Gly	Thr	Leu	Val	Gln	Ile	Arg	Ala	Asn	Ala	Val	Val	Met	Ala
			180					185					190		
Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Arg	Val	Tyr	Arg	Tyr	Asn	Thr	Asn	Gly	Gly	Ile
		195					200					205			
Val	Thr	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Met	Ala	Leu	Ser	His	Gly	Val	Pro	Leu
	210					215					220				
Arg	Asp	Met	Glu	Phe	Val	Gln	Tyr	His	Pro	Thr	Gly	Leu	Pro	Gly	Ser
225					230					235					240
Gly	Ile	Leu	Met	Thr	Glu	Gly	Cys	Arg	Gly	Glu	Gly	Gly	Ile	Leu	Val
				245					250					255	
Asn	Lys	Asn	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Gln	Asp	Tyr	Gly	Met	Gly	Pro	Glu
			260					265					270		
Thr	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Lys	Asn	Lys	Tyr	Met	Glu	Leu	Gly	Pro	Arg
		275					280					285			
Asp	Lys	Val	Ser	Gln	Ala	Phe	Trp	His	Glu	Trp	Arg	Lys	Gly	Asn	Thr
	290					295					300				
Ile	Ser	Thr	Pro	Arg	Gly	Asp	Val	Val	Tyr	Leu	Asp	Leu	Arg	His	Leu
305					310					315					320
Gly	Glu	Lys	Lys	Leu	His	Glu	Arg	Leu	Pro	Phe	Ile	Cys	Glu	Leu	Ala
				325					330					335	
Lys	Ala	Tyr	Val	Gly	Val	Asp	Pro	Val	Lys	Glu	Pro	Ile	Pro	Val	Arg
			340					345					350		
Pro	Thr	Ala	His	Tyr	Thr	Met</									

Thr Ala Gly Asn Gly Asn Glu Ala Ala Ile Glu Ala Gln Ala Ala Gly
 420 425 430
 Val Glu Gln Arg Leu Lys Asp Leu Val Asn Gln Asp Gly Gly Glu Asn
 435 440 445
 Trp Ala Lys Ile Arg Asp Glu Met Gly Leu Ala Met Glu Glu Gly Cys
 450 455 460
 Gly Ile Tyr Arg Thr Pro Glu Leu Met Gln Lys Thr Ile Asp Lys Leu
 465 470 475 480
 Ala Glu Leu Gln Glu Arg Phe Lys Arg Val Arg Ile Thr Asp Thr Ser
 485 490 495
 Ser Val Phe Asn Thr Asp Leu Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Gly His Gly
 500 505 510
 Leu Asn Val Ala Glu Cys Met Ala His Ser Ala Met Ala Arg Lys Glu
 515 520 525
 Ser Arg Gly Ala His Gln Arg Leu Asp Glu Gly Cys Thr Glu Arg Asp
 530 535 540
 Asp Val Asn Phe Leu Lys His Thr Leu Ala Phe Arg Asp Ala Asp Gly
 545 550 555 560
 Thr Thr Arg Leu Glu Tyr Ser Asp Val Lys Ile Thr Thr Leu Pro Pro
 565 570 575
 Ala Lys Arg Val Tyr Gly Gly Glu Ala Asp Ala Ala Asp Lys Ala Glu
 580 585 590
 Ala Ala Asn Lys Lys Glu Lys Ala Asn Gly
 595 600

<210> 15

<211> 1119

<212> ADN

<213> G. stearothermophilus

<220>

<223> alaD

<400> 15

atgaaaattg	gcatccctaa	agagattaag	aacaatgaaa	accgtgtagc	aatcaccctcg	60
gcaggtgtta	tgactctggt	taaagcgggc	cacgatgtgt	acgtcgaaac	cgaagcgggt	120
gccggcagcg	gcttcagcga	cagcgagtat	gagaaggcgg	gtgcggttat	tgtgactaag	180
gcggaggacg	cttgggcagc	cgaaatgggt	ctgaagggtga	aagaaccgct	ggcggaggag	240
tttcgctatt	ttcgtccggg	tctgattttg	ttcacctacc	tgacactggc	tgcgcccgag	300
gcgctgacca	aggcactggg	ggagcagaag	gttggtggca	tcgcgtacga	aacggttcaa	360
ctggcgaatg	gttccctgcc	gctgctgacc	cctatgtctg	aagttgcggg	tcgcatgagc	420
gttcaagtcg	gcgctcagtt	tctggagaaa	cgcacgggtg	gcaagggcat	tttgctgggt	480
ggtgtttccg	gtgtccgcgc	tggtaaagtg	acgatcattg	gcggtggtac	ggccggtacg	540
aacgcggcca	agattgccgt	aggtctgggt	gcagatgtga	ccattctgga	catcaacgcg	600
gaacgtttgc	gtgagctgga	cgacctgttt	ggcgaccaag	tcaccaccct	gatgagcaac	660
agctaccaca	tcgcggagtg	cgtccgtgaa	agcgatttgg	tcgttggtgc	ggtgctgata	720
ccgggtgcaa	aagccccgaa	actggtgacc	gaggagatgg	tcgtagcat	gaccccggtg	780
tcggttctgg	tcgacgtggc	aattgaccag	ggcggtatct	tcgaaaccac	cgaccgcgtc	840
acgacccatg	atgacccgac	ctatgtgaaa	catggcggtg	ttcactatgc	ggtcgcgaat	900
atgccgggtg	cagtgcgcgc	cacgtccacg	ttcgcgctga	cgaacgtgac	gattccatac	960
gctctgcaga	tcgccaataa	gggctatcgt	gcggcggtgc	tggtataatc	ggcattgctg	1020
aaaggcatca	ataccctgga	tggtcatatc	gtttacgagg	ctgtggctgc	agcacacaac	1080
atgccgtaca	ctgatgtcca	tagcttgctg	caaggctaa			1119

<210> 16

<211> 372

<212> PRT

<213> G. stearothermophilus

<220>

<223> alaD

<400> 16

Met	Lys	Ile	Gly	Ile	Pro	Lys	Glu	Ile	Lys	Asn	Asn	Glu	Asn	Arg	Val
1				5					10					15	
Ala	Ile	Thr	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Thr	Leu	Val	Lys	Ala	Gly	His	Asp
			20					25					30		

Val Tyr Val Glu Thr Glu Ala Gly Ala Gly Ser Gly Phe Ser Asp Ser
 35 40 45
 Glu Tyr Glu Lys Ala Gly Ala Val Ile Val Thr Lys Ala Glu Asp Ala
 50 55 60
 Trp Ala Ala Glu Met Val Leu Lys Val Lys Glu Pro Leu Ala Glu Glu
 65 70 75 80
 Phe Arg Tyr Phe Arg Pro Gly Leu Ile Leu Phe Thr Tyr Leu His Leu
 85 90 95
 Ala Ala Ala Glu Ala Leu Thr Lys Ala Leu Val Glu Gln Lys Val Val
 100 105 110
 Gly Ile Ala Tyr Glu Thr Val Gln Leu Ala Asn Gly Ser Leu Pro Leu
 115 120 125
 Leu Thr Pro Met Ser Glu Val Ala Gly Arg Met Ser Val Gln Val Gly
 130 135 140
 Ala Gln Phe Leu Glu Lys Pro His Gly Gly Lys Gly Ile Leu Leu Gly
 145 150 155 160
 Gly Val Pro Gly Val Arg Arg Gly Lys Val Thr Ile Ile Gly Gly Gly
 165 170 175
 Thr Ala Gly Thr Asn Ala Ala Lys Ile Ala Val Gly Leu Gly Ala Asp
 180 185 190
 Val Thr Ile Leu Asp Ile Asn Ala Glu Arg Leu Arg Glu Leu Asp Asp
 195 200 205
 Leu Phe Gly Asp Gln Val Thr Thr Leu Met Ser Asn Ser Tyr His Ile
 210 215 220
 Ala Glu Cys Val Arg Glu Ser Asp Leu Val Val Gly Ala Val Leu Ile
 225 230 235 240
 Pro Gly Ala Lys Ala Pro Lys Leu Val Thr Glu Glu Met Val Arg Ser
 245 250 255
 Met Thr Pro Gly Ser Val Leu Val Asp Val Ala Ile Asp Gln Gly Gly
 260 265 270
 Ile Phe Glu Thr Thr Asp Arg Val Thr Thr His Asp Asp Pro Thr Tyr
 275 280 285
 Val Lys His Gly Val Val His Tyr Ala Val Ala Asn Met Pro Gly Ala
 290 295 300
 Val Pro Arg Thr Ser Thr Phe Ala Leu Thr Asn Val Thr Ile Pro Tyr
 305 310 315 320
 Ala Leu Gln Ile Ala Asn Lys Gly Tyr Arg Ala Ala Cys Leu Asp Asn
 325 330 335
 Pro Ala Leu Leu Lys Gly Ile Asn Thr Leu Asp Gly His Ile Val Tyr
 340 345 350
 Glu Ala Val Ala Ala Ala His Asn Met Pro Tyr Thr Asp Val His Ser
 355 360 365
 Leu Leu Gln Gly
 370

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi P395-ackA-pta-check1

<400> 17

actgcggttag ttcttcactg

20

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi P395-ackA-pta-check2

<400> 18

agtacctttc tggtttagcc g

21

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-ackA-pta-check3
 <400> 19
 gatagcagaa acggaaccac 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-ackA-pta-check4
 <400> 20
 ggtgctgttc acactaccgc 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-ackA-pta-check5
 <400> 21
 tgacgagatt actgctgctg 20

<210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-ackA-pta-check6
 <400> 22
 atttccgggt cagatatccg c 21

<210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-adhE-check1
 <400> 23
 ggggttgacca gcgcaaataa c 21

<210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-adhE-check2
 <400> 24
 cagaagtggag taatcttgct tac 23

<210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-adhE-check3
 <400> 25
 gatcacttta tcttcgacga tac 23

<210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-adhE-check4
 <400> 26
 gcgaacgtgg ataaactgtc tg 22

<210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-adhE-check5
 <400> 27
 gctcttaagc accgacgttg ac 22

<210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-adhE-check6
 <400> 28
 gtcggctcat taacggctat tc 22

<210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-frd-check1
 <400> 29
 gacggatctc cgccataatc 20

<210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-frd-check2
 <400> 30
 tcgccaccgc ctactgtatc 20

<210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-frd-check3
 <400> 31
 caaagcgttc tgacgaaccg g 21

<210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-frd-check4
 <400> 32
 tgtgcgatgc acaatatcgt tg 22

<210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-pflB-check1
 <400> 33
 ttggttggtg tgacatactg g 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-pflB-check2
 <400> 34
 tgaacttcac cactgataac c 21

<210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-pflB-check3
 <400> 35
 ttcaaaggag tgaatgacgac c 21

<210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-pflB-check4
 <400> 36
 gtcgcgggta tgacaatata gg 22

<210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-ldhA-check1
 <400> 37
 taccgtgccg acgttcaata ac 22

<210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-ldhA-check2
 <400> 38
 catcagcagg cttagcgcaa c 21

<210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi P395-ldhA-check3
 <400> 39
 acctttacgc gtaatgcgtg 20

```

<210> 40
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi P395-ldhA-check4
<400> 40
accgttttacg ctttccagca c 21

<210> 41
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi P395-csc-check1
<400> 41
cgaattatcg atctcgctca ac 22

<210> 42
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi P395-csc-check2
<400> 42
cgtctatatatt gctgaaggta cag 23

<210> 43
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi P395-csc-check3
<400> 43
tcgaaggtcc attcacgcaa c 21

<210> 44
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi P395-csc-check4
<400> 44
gattcccacc gcaacgttag 20

<210> 45
<211> 894
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<220>
<223> argP
<400> 45
atgaaacgcc cggactacag aacattacag gcactggatg cggtgatacg tgaacgagga 60
tttgagcgcg cggcacaaaa gctgtgcatt acacaatcag ccgtctcaca gcgcattaag 120
caactggaaa atatgttcgg gcagccgctg ttggtgcgta ccgtaccgcc gcgcccgcacg 180
gaacaagggc aaaaactgct ggcactgctg cgccagggtg agttgctgga agaagagtgg 240
ctgggcgatg aacaaaccgg ttcgactccg ctgctgcttt cactggcggt caacgccgcac 300
agtctggcga cgtggttgct tcctgcaactg gtcctgtgtg ttggtgattc gcctatccgc 360
ctcaacttgc aggtagaaga tgaaacccgc actcaggaac gtctgcgccg cggcgaagtg 420
gtcggcgcgg tgagtattca acatcaggcg ctgccgagtt gtcttgtcga taaacttggg 480
gcgctcgact atctgttcgt cagctcaaaa ccctttgccg aaaaatattt ccctaacggc 540
gtaacgcggt cggcattact gaaagcgcca gtggtcgcg ttgaccatct tgacgatatg 600
caccaggcct ttttgcagca aaacttcgat ctgcctccag gcagcgtgcc ctgccatata 660

```

```

gttaattctt cagaagcgtt cgtacaactt gctcgccagg gcaccacctg ctgtatgatc 720
ccgcacctgc aaatcgagaa agaactggcc agcgggtgaac tgattgactt aacgccgggg 780
ctatttcaac gccggatgct ctactggcac cgctttgctc ctgaaagccg catgatgcgt 840
aaagtcactg atgcgttgct cgattatggt cacaaagtcc ttcgtcagga ttaa 894

```

<210> 46

<211> 297

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> argP

<400> 46

```

Met Lys Arg Pro Asp Tyr Arg Thr Leu Gln Ala Leu Asp Ala Val Ile
1          5          10          15
Arg Glu Arg Gly Phe Glu Arg Ala Ala Gln Lys Leu Cys Ile Thr Gln
20          25          30
Ser Ala Val Ser Gln Arg Ile Lys Gln Leu Glu Asn Met Phe Gly Gln
35          40          45
Pro Leu Leu Val Arg Thr Val Pro Pro Arg Pro Thr Glu Gln Gly Gln
50          55          60
Lys Leu Leu Ala Leu Leu Arg Gln Val Glu Leu Leu Glu Glu Glu Trp
65          70          75          80
Leu Gly Asp Glu Gln Thr Gly Ser Thr Pro Leu Leu Leu Ser Leu Ala
85          90          95
Val Asn Ala Asp Ser Leu Ala Thr Trp Leu Leu Pro Ala Leu Ala Pro
100         105         110
Val Leu Ala Asp Ser Pro Ile Arg Leu Asn Leu Gln Val Glu Asp Glu
115         120         125
Thr Arg Thr Gln Glu Arg Leu Arg Arg Gly Glu Val Val Gly Ala Val
130         135         140
Ser Ile Gln His Gln Ala Leu Pro Ser Cys Leu Val Asp Lys Leu Gly
145         150         155         160
Ala Leu Asp Tyr Leu Phe Val Ser Ser Lys Pro Phe Ala Glu Lys Tyr
165         170         175
Phe Pro Asn Gly Val Thr Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ala Pro Val Val
180         185         190
Ala Phe Asp His Leu Asp Asp Met His Gln Ala Phe Leu Gln Gln Asn
195         200         205
Phe Asp Leu Pro Pro Gly Ser Val Pro Cys His Ile Val Asn Ser Ser
210         215         220
Glu Ala Phe Val Gln Leu Ala Arg Gln Gly Thr Thr Cys Cys Met Ile
225         230         235         240
Pro His Leu Gln Ile Glu Lys Glu Leu Ala Ser Gly Glu Leu Ile Asp
245         250         255
Leu Thr Pro Gly Leu Phe Gln Arg Arg Met Leu Tyr Trp His Arg Phe
260         265         270
Ala Pro Glu Ser Arg Met Met Arg Lys Val Thr Asp Ala Leu Leu Asp
275         280         285
Tyr Gly His Lys Val Leu Arg Gln Asp
290         295

```

<210> 47

<211> 894

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> argP Mut

<400> 47

```

atgaaacgcc cggactacag aacattacag gcactggatg cggtgatacg tgaacgagga 60
tttgagcgcg cggcacaaaa gctgtgcatt acacaatcag ccgtctcaca gcgcattaag 120
caactggaaa atatgttcgg gcagccgctg ttggtgcgta ccgtaccgcc gcgcccgcac 180
gaacaagggc aaaaactgct ggcactgctg cgccagggtg agttgctgga agaagagtgg 240
ctgggcgcatg aacaaaccgg ttcgactccg ctgctgcttt cactggaggt caacgccgac 300

```

```

agtctggcga cgtgggttgct tcctgcactg gctcctgtgt tggctgattc gcctatccgc 360
ctcaacttgc aggtagaaga tgaaacccgc actcaggaac gtctgcgccg cggcgaagtg 420
gtcggcgccg tgagtattca acatcaggcg ctgccgagtt gtcttgtcga taaacttggt 480
gcgctcgact atctgttcgt cagctcaaaa ccccttgccg aaaaatattt ccctaacggc 540
gtaacgcggt cggcattact gaaagcgcca gtggtcgcgt ttgaccatct tgacgatatg 600
caccaggcct ttttgcagca aaacttcgat ctgcctccag gcagcgtgcc ctgccatatc 660
gttaattctt cagaagcggt cgtacaactt gctcgccagg gcaccacctg ctgtatgatc 720
ccgcacctgc aaatcgagaa agaactggcc agcggtgaac tgattgactt aacgccgggg 780
ctatttcaac gccggatgct ctactggcac cgctttgctc ctgaaagccg catgatgcgt 840
aaagtcactg atgcgttgct cgattatggt cacaaagtcc ttcgtcagga ttaa 894

```

<210> 48

<211> 297

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> argP Mut

<400> 48

```

Met Lys Arg Pro Asp Tyr Arg Thr Leu Gln Ala Leu Asp Ala Val Ile
1          5          10          15
Arg Glu Arg Gly Phe Glu Arg Ala Ala Gln Lys Leu Cys Ile Thr Gln
          20          25          30
Ser Ala Val Ser Gln Arg Ile Lys Gln Leu Glu Asn Met Phe Gly Gln
          35          40          45
Pro Leu Leu Val Arg Thr Val Pro Pro Arg Pro Thr Glu Gln Gly Gln
          50          55          60
Lys Leu Leu Ala Leu Leu Arg Gln Val Glu Leu Leu Glu Glu Glu Trp
65          70          75          80
Leu Gly Asp Glu Gln Thr Gly Ser Thr Pro Leu Leu Leu Ser Leu Glu
          85          90          95
Val Asn Ala Asp Ser Leu Ala Thr Trp Leu Leu Pro Ala Leu Ala Pro
          100          105          110
Val Leu Ala Asp Ser Pro Ile Arg Leu Asn Leu Gln Val Glu Asp Glu
          115          120          125
Thr Arg Thr Gln Glu Arg Leu Arg Arg Gly Glu Val Val Gly Ala Val
          130          135          140
Ser Ile Gln His Gln Ala Leu Pro Ser Cys Leu Val Asp Lys Leu Gly
145          150          155          160
Ala Leu Asp Tyr Leu Phe Val Ser Ser Lys Pro Phe Ala Glu Lys Tyr
          165          170          175
Phe Pro Asn Gly Val Thr Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ala Pro Val Val
          180          185          190
Ala Phe Asp His Leu Asp Asp Met His Gln Ala Phe Leu Gln Gln Asn
          195          200          205
Phe Asp Leu Pro Pro Gly Ser Val Pro Cys His Ile Val Asn Ser Ser
          210          215          220
Glu Ala Phe Val Gln Leu Ala Arg Gln Gly Thr Thr Cys Cys Met Ile
225          230          235          240
Pro His Leu Gln Ile Glu Lys Glu Leu Ala Ser Gly Glu Leu Ile Asp
          245          250          255
Leu Thr Pro Gly Leu Phe Gln Arg Arg Met Leu Tyr Trp His Arg Phe
          260          265          270
Ala Pro Glu Ser Arg Met Met Arg Lys Val Thr Asp Ala Leu Leu Asp
          275          280          285
Tyr Gly His Lys Val Leu Arg Gln Asp
          290          295

```

<210> 49

<211> 1026

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> lpxD

<400> 49

```

atgccttcaa ttcgactggc tgatttagcg cagcagttgg atgcagaact acacggtgat      60
ggcgatatcg tcatcaccgg cgttgcgctcc atgcaatctg cacaaacagg tcacattacg      120
ttcatggtta acccaaaata ccgtgagcat ttaggcttgt gccaggcgtc cgcggttgct      180
atgaccagg acgatcttcc tttcgcgaaa agtgccgcgc tggtagtgaa gaatccctac      240
ctgacttacg cgcgcatggc gcaaatttta gataccacgc cgcagcccgc gcagaacatt      300
gcacccagtg cgtgatcga cgcgacggcg aagctgggta acaacgtatc gattggcgct      360
aacgcggtga ttgagtcgg cgttgaactg ggcgataacg tgattatcgg tgccggttgc      420
ttcgtaggta aaaacagcaa aatcggtgca ggttcgcgct tctgggcgaa cgtaaccatt      480
taccatgaga tccagatcgg tcagaattgc ctgatccagt ccggaacagt ggtaggcgca      540
gacggctttg gttatgccaa cgatcgtggt aactgggtga agatcccaca gattggtcgc      600
gtaattattg gcgatcgcgt ggagatcggg gcctgcacaa ccatcgatcg cggcgcgctg      660
gatgacacta ttattggcaa tggcgtgacg attgataacc agtgccagat tgcacataac      720
gtcgtgattg gcgacaatac ggcggttgcc ggtggcgctc ttatggcggg cagcctgaaa      780
attggtcgtt actgcatgat cggcggagcc agcgtaatca acgggcatat ggaaatatgc      840
gacaaaagtg cgtttacggg catgggtatg gtgatgcgtc ccatcactga accaggcgctc      900
tattcctcag gcattccgct gcaacccaac aaagtctggc gcaaaaccgc tgcactggtg      960
atgaacattg atgacatgag caagcgtctg aaatcgcttg agcgcaaggt taatcaacaa     1020
gactaa                                     1026

```

<210> 50

<211> 341

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> lpxD

<400> 50

```

Met Pro Ser Ile Arg Leu Ala Asp Leu Ala Gln Gln Leu Asp Ala Glu
1          5          10          15
Leu His Gly Asp Gly Asp Ile Val Ile Thr Gly Val Ala Ser Met Gln
          20          25          30
Ser Ala Gln Thr Gly His Ile Thr Phe Met Val Asn Pro Lys Tyr Arg
          35          40          45
Glu His Leu Gly Leu Cys Gln Ala Ser Ala Val Val Met Thr Gln Asp
          50          55          60
Asp Leu Pro Phe Ala Lys Ser Ala Ala Leu Val Val Lys Asn Pro Tyr
65          70          75          80
Leu Thr Tyr Ala Arg Met Ala Gln Ile Leu Asp Thr Thr Pro Gln Pro
          85          90          95
Ala Gln Asn Ile Ala Pro Ser Ala Val Ile Asp Ala Thr Ala Lys Leu
          100         105         110
Gly Asn Asn Val Ser Ile Gly Ala Asn Ala Val Ile Glu Ser Gly Val
          115         120         125
Glu Leu Gly Asp Asn Val Ile Ile Gly Ala Gly Cys Phe Val Gly Lys
          130         135         140
Asn Ser Lys Ile Gly Ala Gly Ser Arg Leu Trp Ala Asn Val Thr Ile
145         150         155         160
Tyr His Glu Ile Gln Ile Gly Gln Asn Cys Leu Ile Gln Ser Gly Thr
          165         170         175
Val Val Gly Ala Asp Gly Phe Gly Tyr Ala Asn Asp Arg Gly Asn Trp
          180         185         190
Val Lys Ile Pro Gln Ile Gly Arg Val Ile Ile Gly Asp Arg Val Glu
          195         200         205
Ile Gly Ala Cys Thr Thr Ile Asp Arg Gly Ala Leu Asp Asp Thr Ile
          210         215         220
Ile Gly Asn Gly Val Ile Ile Asp Asn Gln Cys Gln Ile Ala His Asn
225         230         235         240
Val Val Ile Gly Asp Asn Thr Ala Val Ala Gly Gly Val Ile Met Ala
          245         250         255
Gly Ser Leu Lys Ile Gly Arg Tyr Cys Met Ile Gly Gly Ala Ser Val
          260         265         270
Ile Asn Gly His Met Glu Ile Cys Asp Lys Val Thr Val Thr Gly Met
          275         280         285

```

Gly Met Val Met Arg Pro Ile Thr Glu Pro Gly Val Tyr Ser Ser Gly
 290 295 300
 Ile Pro Leu Gln Pro Asn Lys Val Trp Arg Lys Thr Ala Ala Leu Val
 305 310 315 320
 Met Asn Ile Asp Asp Met Ser Lys Arg Leu Lys Ser Leu Glu Arg Lys
 325 330 335
 Val Asn Gln Gln Asp
 340

<210> 51
 <211> 1026
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> lpxD Mut
 <400> 51

```

atgccttcaa ttcgactggc tgatttagcg cagcagttgg atacagaact acacggtgat      60
ggcgatatcg tcatcaccgg cgttgcgtcc atgcaatctg cacaaacagg tcacattacg      120
ttcatgggta acccaaaata ccgtgagcat ttaggcttgt gccaggcgct cgcggttgct      180
atgacccagg acgatcttcc tttcgcgaaa agtgccgcgc tggtagtgaa gaatccctac      240
ctgacttacg cgcgcatggc gcaaatttta gataccacgc cgcagccgcg gcagaacatt      300
gcacccagtg cggtagatga cgcgacggcg aagctgggta acaacgtatc gattggcgct      360
aacgcggtga ttgagtcggg cgttgaactg ggcgataacg tgattatcgg tgccggttgc      420
ttcgtaggta aaaacagcaa aatcggtgca ggttcgcgct tctgggcgaa cgtaaccatt      480
taccatgaga tccagatcgg tcagaattgc ctgatccagt ccggaacagt ggtaggcgca      540
gacggccttg gttatgccaa cgatcgtggt aactgggtga agatcccaca gattggtcgc      600
gtaattattg gcgatcgcgt ggagatcggt gcctgcacaa ccatcgatcg cggcgcgctg      660
gatgacacta ttattggcaa tggcgtgatc attgataacc agtgccagat tgcacataac      720
gtcgtgattg gcgacaatac ggcggttgcc ggtggcgctc ttatggcggg cagcctgaaa      780
attggtcggt actgcatgat cggcgagacc agcgtaatca acgggcatat ggaaatatgc      840
gacaaagtga cggttacggg catgggtatg gtgatgcgtc ccatcactga accaggcgct      900
tattcctcag gcattccgct gcaacccaac aaagtctggc gcaaaaccgc tgcactggtg      960
atgaacattg atgacatgag caagcgtctg aaatcgcttg agcgcaaggt taatcaacaa     1020
gactaa                                           1026

```

<210> 52
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> lpxD Mut
 <400> 52

```

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

```

```

                165                170                175
Val Val Gly Ala Asp Gly Phe Gly Tyr Ala Asn Asp Arg Gly Asn Trp
                180                185                190
Val Lys Ile Pro Gln Ile Gly Arg Val Ile Ile Gly Asp Arg Val Glu
                195                200                205
Ile Gly Ala Cys Thr Thr Ile Asp Arg Gly Ala Leu Asp Asp Thr Ile
                210                215                220
Ile Gly Asn Gly Val Ile Ile Asp Asn Gln Cys Gln Ile Ala His Asn
225                230                235                240
Val Val Ile Gly Asp Asn Thr Ala Val Ala Gly Gly Val Ile Met Ala
                245                250                255
Gly Ser Leu Lys Ile Gly Arg Tyr Cys Met Ile Gly Gly Ala Ser Val
                260                265                270
Ile Asn Gly His Met Glu Ile Cys Asp Lys Val Thr Val Thr Gly Met
                275                280                285
Gly Met Val Met Arg Pro Ile Thr Glu Pro Gly Val Tyr Ser Ser Gly
                290                295                300
Ile Pro Leu Gln Pro Asn Lys Val Trp Arg Lys Thr Ala Ala Leu Val
305                310                315                320
Met Asn Ile Asp Asp Met Ser Lys Arg Leu Lys Ser Leu Glu Arg Lys
                325                330                335
Val Asn Gln Gln Asp
                340

```

```

<210> 53
<211> 918
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<220>
<223> gcvA
<400> 53

```

```

atgtctaaac gattaccacc gctaaatgcc ttacgagttt ttgatgccgc agcacgccat      60
ttaagtttca ctgcgcgcagc agaagagctt tttgtgaccc aggcgcgcagt aagtcaccaa      120
atcaagtctc ttgaggattt tctggggcta aaactgttcc gccgcgtaa tcgttcactc      180
ctgctgaccg aggaaggtca aagctatttc ctogatatca aagagatatt ttcgcaatta      240
accgaagcga cgcgtaaact ccaggcccggt agcgccaagg gggcggtgac ggtcagttta      300
ctccccagtt tcgccattca ttggttggtt ccgcgacttt ccagctttta ttcagcttat      360
ccgggaattg acgttcgaat ccaggcggtt gatcgtcagg aagataagct ggcggatgat      420
gttgatgtgg cgatatatta tggtcggggc aactggccgg ggctacgggt ggaaaaactg      480
tacgccgaat atttattgcc ggtgtgttcg ccgctactgc tgacaggcga aaaacccttg      540
aagaccccgg aagatctggc taaacatacg ttattacatg atgcgtcacg ccgtgactgg      600
cagacatata cccgacagtt ggggtttaa catatcaacg ttcagcaagg gccaattttt      660
agtcatagcg ccatggtgct gcaagcggct attcacgggc agggagtggc gctggcaa at      720
aacgtgatgg cgcaatctga aatcgaggcc ggacgtcttg tttgcccggt taatgatgtt      780
ctggctcagta aaaacgcttt ttatctgggt tgatcatgaca gccaggcaga actgggtaaa      840
atagccgcct ttcgccaatg gatcctggcg aaagccgctg ctgaacaaga aaaattccgc      900
tttcgttatg aacaataa

```

```

<210> 54
<211> 305
<212> PRT
<213> Escherichia coli
<220>
<223> gcvA
<400> 54

```

```

Met Ser Lys Arg Leu Pro Pro Leu Asn Ala Leu Arg Val Phe Asp Ala
1          5          10          15
Ala Ala Arg His Leu Ser Phe Thr Arg Ala Ala Glu Glu Leu Phe Val
20          25          30
Thr Gln Ala Ala Val Ser His Gln Ile Lys Ser Leu Glu Asp Phe Leu
35          40          45
Gly Leu Lys Leu Phe Arg Arg Arg Asn Arg Ser Leu Leu Leu Thr Glu
50          55          60

```

Glu Gly Gln Ser Tyr Phe Leu Asp Ile Lys Glu Ile Phe Ser Gln Leu
 65 70 75 80
 Thr Glu Ala Thr Arg Lys Leu Gln Ala Arg Ser Ala Lys Gly Ala Leu
 85 90 95
 Thr Val Ser Leu Leu Pro Ser Phe Ala Ile His Trp Leu Val Pro Arg
 100 105 110
 Leu Ser Ser Phe Asn Ser Ala Tyr Pro Gly Ile Asp Val Arg Ile Gln
 115 120 125
 Ala Val Asp Arg Gln Glu Asp Lys Leu Ala Asp Asp Val Asp Val Ala
 130 135 140
 Ile Phe Tyr Gly Arg Gly Asn Trp Pro Gly Leu Arg Val Glu Lys Leu
 145 150 155 160
 Tyr Ala Glu Tyr Leu Leu Pro Val Cys Ser Pro Leu Leu Leu Thr Gly
 165 170 175
 Glu Lys Pro Leu Lys Thr Pro Glu Asp Leu Ala Lys His Thr Leu Leu
 180 185 190
 His Asp Ala Ser Arg Arg Asp Trp Gln Thr Tyr Thr Arg Gln Leu Gly
 195 200 205
 Leu Asn His Ile Asn Val Gln Gln Gly Pro Ile Phe Ser His Ser Ala
 210 215 220
 Met Val Leu Gln Ala Ala Ile His Gly Gln Gly Val Ala Leu Ala Asn
 225 230 235 240
 Asn Val Met Ala Gln Ser Glu Ile Glu Ala Gly Arg Leu Val Cys Pro
 245 250 255
 Phe Asn Asp Val Leu Val Ser Lys Asn Ala Phe Tyr Leu Val Cys His
 260 265 270
 Asp Ser Gln Ala Glu Leu Gly Lys Ile Ala Ala Phe Arg Gln Trp Ile
 275 280 285
 Leu Ala Lys Ala Ala Ala Glu Gln Glu Lys Phe Arg Phe Arg Tyr Glu
 290 295 300
 Gln
 305

<210> 55

<211> 350

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Trình tự khởi đầu gcvA WT

<400> 55

ttcgcgatcg	caaggtaaaa	aaaagcaccg	caattaggcg	gtgctacatt	aatcactatg	60
gacagacagg	gtaaatgtac	aggaagtga	aaaaggtagc	tttgctacca	tggtctgaat	120
cgcagaccaa	ttgcaaacac	aacaacacaa	catcacaacc	gtaagccaaa	agttcaccag	180
aacacgcatt	ccgataaaaac	ttttcgttcc	ggctcaggaa	gtgccgccac	tataggtatt	240
tgctggtaga	agctcaacgg	acaattttata	atggctcaga	ttaaaaaac	taatagggtta	300
cacagtgtga	tctaattggt	aaattcattt	aacatcaaag	tttaaaagcc		350

<210> 56

<211> 349

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Trình tự khởi đầu 1 gcvA Mut

<400> 56

ttcgcgatcg	caaggtaaaa	aaaagcaccg	caattaggcg	gtgctacatt	aatcactatg	60
gacagacagg	gtaaatgtac	aggaagtga	aaaaggtagc	tttgctacca	tggtctgaat	120
cgcagaccaa	ttgcaaacac	aacaacacaa	catcacaacc	gtaagccaaa	agttcaccag	180
aacacgcatt	ccgataaaaac	ttttcgttcc	ggctcaggaa	gtgccgccac	tataggtatt	240
tgctggtaga	agctcaacgg	acaattttata	atggctcaga	ttaaaaaac	aataggttac	300
acagtgtgat	ctaattgtta	aattcattta	acatcaaagt	ttaaaagcc		349

<210> 57

<211> 350

<212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> Trình tự khởi đầu 2 gcvA Mut
 <400> 57
 ttcgcgatcg caaggtaaaa aaaagcaccg caattaggcg gtgctacatt aatcactatg 60
 gacagacagg gtaaatgtac aggaagtga aaaaggtagc ttgctacca tggctctgaat 120
 cgcagaccaa ttgcaaacac aacaacacaa catcacaacc gtaagccaaa agttcaccag 180
 aacacgcatt ccgataaaaac ttttcgttcc ggctcaggaa gtgccgccac tatagggtatt 240
 tgctggtaga agctcaacgg acaatttata atggctcaga ttaaaaaaac aaatagggtta 300
 cacagtgtga tctaattgtt aaattcattt aacatcaaag tttaaaagcc 350

 <210> 58
 <211> 206
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> gcvB
 <400> 58
 acttcctgag ccggaacgaa aagttttatc ggaatgcgtg ttctggtgaa cttttggctt 60
 acggttgtaga tgttggtgtg ttgtgtttgc aattggtctg cgattcagac catggtagca 120
 aagctacctt ttttcacttc ctgtacattt accctgtctg tccatagtga ttaatgtagc 180
 accgcctaatt tgcggtgctt tttttt 206

 <210> 59
 <211> 128
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> Trình tự khởi đầu gcvB WT
 <400> 59
 ggctttttaa ctttgatggt aaatgaattt aacaattaga tcacactgtg taacctatta 60
 gtttttttaa tctgagccat tataaattgt ccgttgagct tctaccagca aataacctata 120
 gtggcggc 128

 <210> 60
 <211> 127
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> Trình tự khởi đầu gcvB Mut1
 <400> 60
 ggctttttaa ctttgatggt aaatgaattt aacaattaga tcacactgtg taacctatta 60
 gttttttaat ctgagccatt ataaattgtc cggttgagct ctaccagcaa atacctatag 120
 tggcggc 127

 <210> 61
 <211> 128
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> Trình tự khởi đầu gcvB Mut2
 <400> 61
 ggctttttaa ctttgatggt aaatgaattt aacaattaga tcacactgtg taacctattt 60
 gtttttttaa tctgagccat tataaattgt ccgttgagct tctaccagca aataacctata 120
 gtggcggc 128

 <210> 62
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi argP_1_F

<400> 62
 ttgctggaag aagagtggct gggcgatgaa caaacccggtt cgactccgct gatatcggaa 60
 gccctgggcc aac 73

<210> 63
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi argP_1_R
 <400> 63
 tcagccaaca caggagccag tgcaggaagc aaccacgtcg ccagactgtc cacctgagac 60
 aacttggttac agctc 75

<210> 64
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi argP_2_F
 <400> 64
 actggatgcg gtgatacgtg aacg 24

<210> 65
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi argP_2_R
 <400> 65
 accactggcg ctttcagtaa tgcc 24

<210> 66
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi argP_seq_F
 <400> 66
 ttaccaggag cagacaacag c 21

<210> 67
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi argP_seq_R
 <400> 67
 ggcagatcga agttttgctg c 21

<210> 68
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi argP-pACYC_F
 <400> 68
 tatcatcgat aagcttatgt taccgccga cggcttcg 38

<210> 69
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi argP-pACYC_R
 <400> 69
 aagggcatcg gtcgacgtga ggataacgcc tgatatgtgc 40

<210> 70
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA_1_F
 <400> 70
 taataggtta cacagtgtga tctaattggt aaattcattt aacatcaaag gatatcggaa 60
 gccctgggcc aac 73

<210> 71
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA_1_R
 <400> 71
 aaactcgtaa ggcatttagc ggtggtaatc gtttagacat ggcttttaaa cacctgagac 60
 aacttggtac agctc 75

<210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA_2_F
 <400> 72
 cgagaccaa ttgcaaacac 20

<210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA_2_R
 <400> 73
 ctgcgcagc agaagagctt 20

<210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA_seq_F
 <400> 74
 agcagatcaa ccgtactgac 20

<210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA_seq_R
 <400> 75
 agttttacgcg tcgcttcggt 20

<210> 76
 <211> 41

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA-pACYC_F
 <400> 76
 tatcatcgat aagcttaagt gccgccacta taggtatttg c 41

<210> 77
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA-pACYC_R
 <400> 77
 aagggcatcg gtcgactggg catggtcgta ccctacg 37

<210> 78
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvB_1_F
 <400> 78
 tgacgtgaaa gagatggtcg aactggatca gtaattcgcg atcgcaaggt gatatcgga 60
 gccctgggcc aac 73

<210> 79
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvB_1_R
 <400> 79
 attataaatt gtccgttgag cttctaccag caaataccta tagtggcggc cacctgagac 60
 aacttgttac agtc 75

<210> 80
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvB_seq_F
 <400> 80
 gccgcaatta tttctgctg tatgc 25

<210> 81
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvB_seq_R
 <400> 81
 cacaaaaagc tcttctgctg cgcg 24

<210> 82
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvB-pACYC_F
 <400> 82
 tatcatcgat aagcttggtc gaactggatc agtaattcg 40

<210> 83
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvB-pACYC_R
 <400> 83
 aagggcatcg gtcgaccggt ggtaatcggt tagacatggc 40

<210> 84
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi brnQ_1_F
 <400> 84
 tatcggtatt gttaacgcgg cgcgttctcg tggcggtacc gaagcgcgtc gatatcgga 60
 gccctgggcc aac 73

<210> 85
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi brnQ_1_R
 <400> 85
 gaacgtaagc atgcagaata gcagcgccgt ttgcagactg atcgaccagc cacctgagac 60
 aacttgttac agctc 75

<210> 86
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi brnQ_2_F
 <400> 86
 ggataccgtg ggcaacttcc ttgc 24

<210> 87
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi brnQ_2_R
 <400> 87
 gttagaaacc accatcgaga agccg 25

<210> 88
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi brnQ_seq_F
 <400> 88
 cgctgtttat ctacagcctg g 21

<210> 89
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi brnQ_seq_R
 <400> 89

ggataaatag cggtcagcac c 21

<210> 90
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi lpxD_1C_F
 <400> 90
 catcggtaaa acctggtgtaag tgttctccac aaaggaatgt agtggttagtg tagcgatatc 60
 ggaagccctg ggccaac 77

<210> 91
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi lpxD_1C_R
 <400> 91
 ggtgcagttc ttgctgtggc ccggcgatct tatattgatc gcctaaagtc atccacctga 60
 gacaacttgt tacagctc 78

<210> 92
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi lpxD_fix_F
 <400> 92
 cgatcaacga atataactcg ctgcg 25

<210> 93
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi lpxD_fix_R
 <400> 93
 ataataacac ggctgcccgc aatcg 25

<210> 94
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi lpxD_flank_F
 <400> 94
 atgctgtagg cggtaacgcc at 22

<210> 95
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi lpxD_flank_R
 <400> 95
 atacgttggt acccagcttc gc 22

<210> 96
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Đoạn mỗi lpxD-pACYC_F
 <400> 96
 tatcatcgat aagcttaaat ccgttgccaa cagccagg 38

<210> 97
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi lpxD-pACYC_R
 <400> 97
 aaggcgatcg gtcgacaaca cggcctgccg caatcg 36

<210> 98
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> gcvB_KO_Fix
 <400> 98
 tgccctgagc gcctgttccg gttcgaacta tgtgatgcac accaatgacg gacgtaccat 60
 cgtctctgac ggcaaaccac agactgataa cgataccggg atgatttcgt ataaagacgc 120
 taatggcaac aaacagcaga tcaaccgtac tgacgtgaaa gagatgggtcg aactggatca 180
 gtaattcgcg atcgcaaggt gccgccacta taggtatttg ctggtagaag ctcaacggac 240
 aattttataat ggctcagatt aaaaaaacta ataggttaca cagtgtgatc taattgttaa 300
 attcatttaa catcaaagtt taaaagccat gtctaaacga ttaccaccgc taaatgcctt 360
 acgagttttt gatgccgcag cagccattt aagtttctact 400

<210> 99
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi argP_RT_F
 <400> 99
 gcccggacta cagaacatta cagg 24

<210> 100
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi argP_RT_R
 <400> 100
 tgagacggct gattgtgtaa tgc 23

<210> 101
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA_RT_F
 <400> 101
 ccattttaagt ttcactcgcg cagc 24

<210> 102
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvA_RT_R
 <400> 102
 ggcggcggaa cagtttttagc 20

<210> 103
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvB_RT_F
 <400> 103
 taggcggtgc tacattaatc actatgg 27

<210> 104
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi gcvB_RT_R
 <400> 104
 tgttgtgttt gcaattgggc tgc 23

<210> 105
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi lpxD_RT_F
 <400> 105
 gatatcgctca tcaccggcgt tgc 23

<210> 106
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi lpxD_RT_R
 <400> 106
 gcacaagcct aaatgctcac gg 22

<210> 107
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi rrsA_RT_F
 <400> 107
 ctcttgccat cggatgtgcc cag 23

<210> 108
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi rrsA_RT_R
 <400> 108
 ccagtgtggc tggatcatcct ctca 24

<210> 109
 <211> 450
 <212> ADN
 <213> E.coli
 <220>
 <223> ygaW
 <400> 109

```

atgtttctcac cgcagtcacg cttgcgtcat gcagttgcag atacgttcgc gatggttggt      60
tactgtttctg tcgtgaacat gtgtattgaa gttttcctct ccggaatgag cttcgaacag      120
tcttttttatt ccagattggt agcgattccg gtgaacatct taattgcatg gccatacggg      180
atgtaccgtg atctgtttat gcgcgcggca cgcaaagtta gcccgtcggg ctggataaaa      240
aatctggctg atatcctggc ttatgtgacg ttccagtcac cgggtgatgt ggcgatcttg      300
ttagtggtgg gcgcagactg gcatcagatt atggcggcgg tcagttcaaa catcgttggt      360
tcgatgttga tgggggcggg ttatggctac ttctctgatt attgccgccg actgtttaaa      420
gtcagccggt accagcaggt aaaagcctga                                         450

```

```

<210> 110
<211> 149
<212> PRT
<213> E.coli
<220>
<223> ygaW

```

```

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

```

```

<210> 111
<211> 987
<212> ADN
<213> E.coli
<220>
<223> zipA

```

```

<400> 111
atgatgcagg atttgcgtct gatattaatc attggtggcg cgatcgccat aatcgcttta      60
ctggtacatg gtttctggac cagcogtaaa gaacgatctt ctatgttccg cgatcggcca      120
ttaaaacgaa tgaagtcaaa acgtgacgac gattcttatg acgaggatgt cgaagatgat      180
gagggcggtg gtgagggtcg tgttcaccgc gtgaatcatg ccccggctaa cgctcaggag      240
catgaggctg ctcgcccgtc gccgcaaac cagtaccaac cgccttatgc gtctgcgcag      300
ccgcgtcaac cgggtccagca gccgcctgaa gcgcaggtag cgcgcgaaca tgctccgcgt      360
ccagcgcagc cgggtgcagca gcctgcctat cagccgcagc ctgaacagcc gttgcagcag      420
ccagtttctg cacaggctgc gccagcgccg cagcctgtgc attcagcacc gcaaccggca      480
caacaggctt tccagcctgc agaaccgta gcggcaccac agcctgagcc tgtagcggaa      540
ccggtccag ttatggataa accgaagcgc aaagaagcgg tgattatcat gaacgtcgcg      600
gcgcatcacg gtagcgagct aaacggtgaa ctgcttctta acagcattca acaagcgggc      660
ttcatttttg gcgatatgaa tatttaccat cgtcatctta gcccggtatg cagcggccccg      720
gogttattca gcctggcgaa tatggtgaaa ccgggaacct ttgatcctga aatgaaggat      780
ttcactactc cgggtgtcac catctttatg caggtaccgt cttacggtga cgagctgcag      840
aacttcaagc tgatgctgca atctgcccag catattgccg atgaagtggg cgggtgctgtg      900
cttgacgatc agcgccgtat gatgactccg cagaaattgc gcgagtacca ggacatcatc      960
cgcgaaagtca aagacgcca cgcctga                                         987

```

<210> 112
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> E.coli
 <220>
 <223> zipA

<400> 112
 Met Met Gln Asp Leu Arg Leu Ile Leu Ile Ile Val Gly Ala Ile Ala
 1 5 10 15
 Ile Ile Ala Leu Leu Val His Gly Phe Trp Thr Ser Arg Lys Glu Arg
 20 25 30
 Ser Ser Met Phe Arg Asp Arg Pro Leu Lys Arg Met Lys Ser Lys Arg
 35 40 45
 Asp Asp Asp Ser Tyr Asp Glu Asp Val Glu Asp Asp Glu Gly Val Gly
 50 55 60
 Glu Val Arg Val His Arg Val Asn His Ala Pro Ala Asn Ala Gln Glu
 65 70 75 80
 His Glu Ala Ala Arg Pro Ser Pro Gln His Gln Tyr Gln Pro Pro Tyr
 85 90 95
 Ala Ser Ala Gln Pro Arg Gln Pro Val Gln Gln Pro Pro Glu Ala Gln
 100 105 110
 Val Pro Pro Gln His Ala Pro Arg Pro Ala Gln Pro Val Gln Gln Pro
 115 120 125
 Ala Tyr Gln Pro Gln Pro Glu Gln Pro Leu Gln Gln Pro Val Ser Pro
 130 135 140
 Gln Val Ala Pro Ala Pro Gln Pro Val His Ser Ala Pro Gln Pro Ala
 145 150 155 160
 Gln Gln Ala Phe Gln Pro Ala Glu Pro Val Ala Ala Pro Gln Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Ala Glu Pro Ala Pro Val Met Asp Lys Pro Lys Arg Lys Glu
 180 185 190
 Ala Val Ile Ile Met Asn Val Ala Ala His His Gly Ser Glu Leu Asn
 195 200 205
 Gly Glu Leu Leu Leu Asn Ser Ile Gln Gln Ala Gly Phe Ile Phe Gly
 210 215 220
 Asp Met Asn Ile Tyr His Arg His Leu Ser Pro Asp Gly Ser Gly Pro
 225 230 235 240
 Ala Leu Phe Ser Leu Ala Asn Met Val Lys Pro Gly Thr Phe Asp Pro
 245 250 255
 Glu Met Lys Asp Phe Thr Thr Pro Gly Val Thr Ile Phe Met Gln Val
 260 265 270
 Pro Ser Tyr Gly Asp Glu Leu Gln Asn Phe Lys Leu Met Leu Gln Ser
 275 280 285
 Ala Gln His Ile Ala Asp Glu Val Gly Gly Val Val Leu Asp Asp Gln
 290 295 300
 Arg Arg Met Met Thr Pro Gln Lys Leu Arg Glu Tyr Gln Asp Ile Ile
 305 310 315 320
 Arg Glu Val Lys Asp Ala Asn Ala
 325

<210> 113
 <211> 1425
 <212> ADN
 <213> E.coli
 <220>
 <223> lpd

<400> 113
 atgagtactg aaatcaaaac tcaggtcgtg gtacttgggg caggccccgc aggttactcc 60
 gctgccttcc gttgcgctga tttaggtctg gaaaccgtaa tcgtagaacg ttacaacacc 120
 cttggcgggtg tttgcctgaa cgtcggctgt atcccttcta aagcactgct gcacgtagca 180

```

aaagttatcg aagaagccaa agcgctggct gaacacggta tcgtcttcgg cgaaccgaaa 240
accgatattg acaagattcg tacctggaaa gagaaagtga tcaatcagct gaccgggtgg 300
ctggctggta tggcgaaaagg ccgcaaagtc aaagtgggtca acggtctggg taaatttacc 360
ggggctaaca ccctggaagt tgaagggtgag aacggtaaaa ccgtgatcaa cttcgacaac 420
gcgatcattg cagcgggttc tcgcccgatc caactgccgt ttattccgca tgaagatccg 480
cgtatctggg actccactga cgcgctggaa ctgaaagaag taccagaacg cctgctggta 540
atgggtggcg gtatcatcgg tctggaaatg ggcaccgat accacgcgct gggttcacag 600
attgacgtgg ttgaaatgtt cgaccaggtt atcccggcag ctgacaaaga catcggtaaa 660
gtcttcacca agcgtatcag caagaaattc aacctgatgc tggaaaccaa agttaccgcc 720
gttgaagcga aagaagacgg tatttatgtg acgatggaag gcaaaaaagc acccgctgaa 780
ccgcagcgtt acgacgccgt gctggtagcg attggtcgtg tgccgaacgg taaaaacctc 840
gacgcaggca aagctggcgt ggaagtggac gaccgtgggt tcatccgctg tgacaaacag 900
ctgcgtacca acgtaccgca catctttgct atcggcgata tcgtcgggtc gccgatgctg 960
gcacacaaag gtgttcacga aggtcacgtt gccgtgaag ttatcgccgg taagaaacac 1020
tacttcgatc cgaaagtatt cccgtccatc gcctataccg aaccagaagt tgcattggta 1080
ggtctgactg agaaagaagc gaaagagaaa ggcatacagc atgaaaccgc caccttccc 1140
tgggctgctt ctggctgtgc tatcgcttcc gactgcgcag acggtatgac caagctgatt 1200
ttcgacaaag aatctcaccg tgtgatcggg ggtgcgattg tcggtaccaa cggcggcgag 1260
ctgctgggtg aaatcggcct ggcaatcgaa atgggttgtg atgctgaaga catcgactg 1320
accatccacg cgcaccgcac tctgcacgag tctgtgggcc tggcggcaga agtggttcgaa 1380
ggtagcatta ccgacctgcc gaaccgaaa gcgaagaaga agtaa 1425

```

```

<210> 114
<211> 474
<212> PRT
<213> E.coli
<220>
<223> lpd

```

```

<400> 114
Met Ser Thr Glu Ile Lys Thr Gln Val Val Val Leu Gly Ala Gly Pro
1 5 10 15
Ala Gly Tyr Ser Ala Ala Phe Arg Cys Ala Asp Leu Gly Leu Glu Thr
20 25 30
Val Ile Val Glu Arg Tyr Asn Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn Val
35 40 45
Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Leu His Val Ala Lys Val Ile Glu
50 55 60
Glu Ala Lys Ala Leu Ala Glu His Gly Ile Val Phe Gly Glu Pro Lys
65 70 75 80
Thr Asp Ile Asp Lys Ile Arg Thr Trp Lys Glu Lys Val Ile Asn Gln
85 90 95
Leu Thr Gly Gly Leu Ala Gly Met Ala Lys Gly Arg Lys Val Lys Val
100 105 110
Val Asn Gly Leu Gly Lys Phe Thr Gly Ala Asn Thr Leu Glu Val Glu
115 120 125
Gly Glu Asn Gly Lys Thr Val Ile Asn Phe Asp Asn Ala Ile Ile Ala
130 135 140
Ala Gly Ser Arg Pro Ile Gln Leu Pro Phe Ile Pro His Glu Asp Pro
145 150 155 160
Arg Ile Trp Asp Ser Thr Asp Ala Leu Glu Leu Lys Glu Val Pro Glu
165 170 175
Arg Leu Leu Val Met Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu Glu Met Gly Thr
180 185 190
Val Tyr His Ala Leu Gly Ser Gln Ile Asp Val Val Glu Met Phe Asp
195 200 205
Gln Val Ile Pro Ala Ala Asp Lys Asp Ile Val Lys Val Phe Thr Lys
210 215 220
Arg Ile Ser Lys Lys Phe Asn Leu Met Leu Glu Thr Lys Val Thr Ala
225 230 235 240
Val Glu Ala Lys Glu Asp Gly Ile Tyr Val Thr Met Glu Gly Lys Lys
245 250 255
Ala Pro Ala Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val Leu Val Ala Ile Gly

```

260 265 270
 Arg Val Pro Asn Gly Lys Asn Leu Asp Ala Gly Lys Ala Gly Val Glu
 275 280 285
 Val Asp Asp Arg Gly Phe Ile Arg Val Asp Lys Gln Leu Arg Thr Asn
 290 295 300
 Val Pro His Ile Phe Ala Ile Gly Asp Ile Val Gly Gln Pro Met Leu
 305 310 315 320
 Ala His Lys Gly Val His Glu Gly His Val Ala Ala Glu Val Ile Ala
 325 330 335
 Gly Lys Lys His Tyr Phe Asp Pro Lys Val Ile Pro Ser Ile Ala Tyr
 340 345 350
 Thr Glu Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Leu Thr Glu Lys Glu Ala Lys
 355 360 365
 Glu Lys Gly Ile Ser Tyr Glu Thr Ala Thr Phe Pro Trp Ala Ala Ser
 370 375 380
 Gly Arg Ala Ile Ala Ser Asp Cys Ala Asp Gly Met Thr Lys Leu Ile
 385 390 395 400
 Phe Asp Lys Glu Ser His Arg Val Ile Gly Gly Ala Ile Val Gly Thr
 405 410 415
 Asn Gly Gly Glu Leu Leu Gly Glu Ile Gly Leu Ala Ile Glu Met Gly
 420 425 430
 Cys Asp Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Ile His Ala His Pro Thr Leu
 435 440 445
 His Glu Ser Val Gly Leu Ala Ala Glu Val Phe Glu Gly Ser Ile Thr
 450 455 460
 Asp Leu Pro Asn Pro Lys Ala Lys Lys Lys
 465 470

<210> 115
 <211> 269
 <212> ADN
 <213> E.coli
 <220>
 <223> Trình tự khởi đầu ldhA mut

<400> 115
 catagtaaat tccccacca gtttaaccgg cggctgattt tcaaacgoga cgacatccag 60
 ttcgctgact gtaagttggt gccctttcag ctggccttga aatttaactt tttcgccctg 120
 ataacgcagt tgctggatat cagaggttaa tgogagagag agttttccct gccattcctg 180
 ccaggagaaa aaaatcagtt tatcgatatt gattttgtaa aatattttta gtagcttaaa 240
 tgtgattcaa catcactgga gaaagtctt 269

<210> 116
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> E.coli
 <220>
 <223> Đoạn trình tự khởi đầu ldhA mut

<400> 116
 tattgatttt gtaaaatatt tttagtagct taaatgtgat tcaacatcac 50

<210> 117
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> E.coli
 <220>
 <223> brnQ_KO_fix

<400> 117
 gtgattttctt atcgctatat acctctgggt tttagatccc tccttgcttt aaaacgttat 60
 aagcgtttaa attgcgcttc agtgctgctc atactgactg cattaacgcg gtaaactgaa 120

```

aaactatttct tcgccgcgcc tgggttgagg tatttcccgc taaaattggt taaatataacc 180
gctgtatcat cccagggat tggcacaaaa atttaacgtt acaacaccac atccacaggc 240
agtatgattt atcactgaac atttgtttta accacggggc tgcgatgccc cgtgggtttt 300
tattgtgttg atgggttagg aattgatgga aagtaagaac aagctaaagc gtgggctaag 360
taccgcacc atacgcttta tggcactggg ttcagcaatt ggcaccgggc tgttttacgg 420
ttcggcagac gccatcaaaa tggccgggtc gagcgtgttg ttggcctata ttatcggtgg 480
tatcgcggcg tatatcatta 500

```

```

<210> 118
<211> 1071
<212> ADN
<213> E. coli
<220>
<223> dadX

```

```

<400> 118
atgacccgtc cgatacaggc cagcctcgat ctgcaggcat taaaacagaa tctgtccatt 60
gtccgccagg ccgcgccgca cgcgcgcgtc tggtcgggtg taaaagcgaa cgcttacggg 120
catggatttg agcgtatctg gagcgcgctc ggggccaccg atggctttgc attacttaac 180
ctggaagagg caataacgtt acgtgagcgc ggctggaagg ggccgatcct gatgctggaa 240
ggatttttcc atgctcagga tctggagatt tatgaccagc accgcctgac cacctgcgta 300
cacagcaact ggcagctcaa agcactgcaa aatgcgcggc taaaagcacc gttggatatt 360
tatcttaaag tgaacagtgg gatgaatcgg ttgggcttcc agcccgatcg cgtgcttacc 420
gtctggcagc agttgcgggc aatggcgaat gttggcgaga tgaccctgat gtcgcatttt 480
gccgaagcgg aacatcctga tggaaatttcc agcgcgatgg cgcgtattga gcaggcggcg 540
gaagggctgg agtgtcggcg ttcgttgtcc aattcggcgg cgactctgtg gcaccgggaa 600
gcgcattttg actgggttcg gcctggcatt attttgtatg gcgcttcgcc gtccggtcag 660
tggcgtgata tcgccaatac cggattacgt ccggtgatga cgctaagcag tgagattatt 720
ggtgtccaga cgctaaaagc gggtgagcgt gtgggctacg gcggtcgcta tactgcgcgc 780
gatgaacagc gaatcggcat tgtcgccgca gggtaacgcg acggttatcc gcgccacgcg 840
cctaccggta cccctgtttt agtggacggc gtgcgcacca tgacgggtgg gaccgtctcg 900
atggatatgc tagcggtcga tttaacgcct tgcccgcagg cggggatttg taocccgggt 960
gagctgtggg gcaaggagat caaaattgat gatgtcgccg ccgctgccgg aacgggtggc 1020
tatgagttga tgtgcgcgct ggcgttaacg gtcccgggtg tgacagtgta a 1071

```

```

<210> 119
<211> 356
<212> PRT
<213> E. coli
<220>
<223> dadX

```

```

<400> 119

```

```

Met Thr Arg Pro Ile Gln Ala Ser Leu Asp Leu Gln Ala Leu Lys Gln
1          5          10          15
Asn Leu Ser Ile Val Arg Gln Ala Ala Pro His Ala Arg Val Trp Ser
20          25          30
Val Val Lys Ala Asn Ala Tyr Gly His Gly Ile Glu Arg Ile Trp Ser
35          40          45
Ala Leu Gly Ala Thr Asp Gly Phe Ala Leu Leu Asn Leu Glu Glu Ala
50          55          60
Ile Thr Leu Arg Glu Arg Gly Trp Lys Gly Pro Ile Leu Met Leu Glu
65          70          75          80
Gly Phe Phe His Ala Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Asp Gln His Arg Leu
85          90          95
Thr Thr Cys Val His Ser Asn Trp Gln Leu Lys Ala Leu Gln Asn Ala
100         105         110
Arg Leu Lys Ala Pro Leu Asp Ile Tyr Leu Lys Val Asn Ser Gly Met
115         120         125
Asn Arg Leu Gly Phe Gln Pro Asp Arg Val Leu Thr Val Trp Gln Gln

```

130	135	140
Leu Arg Ala Met Ala Asn Val Gly Glu Met Thr Leu Met Ser His Phe		
145	150	155
Ala Glu Ala Glu His Pro Asp Gly Ile Ser Ser Ala Met Ala Arg Ile		160
	165	170
Glu Gln Ala Ala Glu Gly Leu Glu Cys Arg Arg Ser Leu Ser Asn Ser		175
	180	185
Ala Ala Thr Leu Trp His Pro Glu Ala His Phe Asp Trp Val Arg Pro		190
	195	200
Gly Ile Ile Leu Tyr Gly Ala Ser Pro Ser Gly Gln Trp Arg Asp Ile		205
	210	215
Ala Asn Thr Gly Leu Arg Pro Val Met Thr Leu Ser Ser Glu Ile Ile		220
225	230	235
Gly Val Gln Thr Leu Lys Ala Gly Glu Arg Val Gly Tyr Gly Gly Arg		240
	245	250
Tyr Thr Ala Arg Asp Glu Gln Arg Ile Gly Ile Val Ala Ala Gly Tyr		255
	260	265
Ala Asp Gly Tyr Pro Arg His Ala Pro Thr Gly Thr Pro Val Leu Val		270
	275	280
Asp Gly Val Arg Thr Met Thr Val Gly Thr Val Ser Met Asp Met Leu		285
	290	295
Ala Val Asp Leu Thr Pro Cys Pro Gln Ala Gly Ile Gly Thr Pro Val		300
305	310	315
Glu Leu Trp Gly Lys Glu Ile Lys Ile Asp Asp Val Ala Ala Ala Ala		320
	325	330
Gly Thr Val Gly Tyr Glu Leu Met Cys Ala Leu Ala Leu Arg Val Pro		335
	340	345
Val Val Thr Val		350
355		

<210> 120
 <211> 1203
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<220>
 <223> ackA

<400> 120	
atgtcgagta agttagtact ggttctgaac tgcggtagtt cttcactgaa atttgccatc	60
atcgatgcag taaatggtga agagtacott tctggtttag ccgaatgttt ccacctgccc	120
gaagcacgta tcaaattggaa aatggacggc aataaacagg aagcggcttt aggtgcaggc	180
gccgctcaca gcgaagcgct caactttatc gttaatacta ttctggcaca aaaaccagaa	240
ctgtctgcgc agctgactgc tatcggtcac cgtatcgtac acggcggcga aaagtatacc	300
agctccgtag tgatcgatga gtctgttatt cagggtatca aagatgcagc ttcttttgca	360
ccgctgcaca acccggtcca cctgatcggt atcgaagaag ctctgaaatc tttcccacag	420
ctgaaagaca aaaacggtgc tgtatttgac accgcgttcc accagactat gccggaagag	480
tcttacctct acgccctgcc ttacaacctg tacaaagagc acggcatccg tcgttacggc	540
gcgcacggca ccagccactt ctatgtaacc caggaagcgg caaaaatgct gaacaaaccg	600
gtagaagaac tgaacatcat cacctgccac ctgggcaacg gtggttccgt ttctgctatc	660
cgcaacggta aatgcgttga cacctctatg ggctgaccc cgctggaagg tctggtcatg	720
ggtaccggtt ctggtgatat cgatccggcg atcatcttcc acctgcacga caccctgggc	780
atgagcggtg acgcaatcaa caaactgctg accaaagagt ctggcctgct gggtctgacc	840
gaagtgacca gcgactgccg ctatgttgaa gacaactacg cgacgaaaga agacgcgaag	900
cgcgcaatgg acgtttactg ccaccgcctg gcgaaatata tcggtgccta cactgcgctg	960
atggatggtc gtctggacgc tgttgatttc actgggtgta tcggtgaaaa tgccgcaatg	1020
gttcgtgaac tgtctctggg caaactgggc gtgctgggct ttgaagttga tcatgaacgc	1080
aaactggctg cacgtttcgg caaatctggt ttcatacaaa aagaaggtag ccgtcctgcg	1140
gtggttatcc caaccaacga agaactgggt atcgcgcaag acgcgagccg cctgactgcc	1200
tga	1203

<210> 121
 <211> 400

<212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <223> ackA

<400> 121

```

Met Ser Ser Lys Leu Val Leu Val Leu Asn Cys Gly Ser Ser Ser Leu
1      5      10      15
Lys Phe Ala Ile Ile Asp Ala Val Asn Gly Glu Glu Tyr Leu Ser Gly
      20      25      30
Leu Ala Glu Cys Phe His Leu Pro Glu Ala Arg Ile Lys Trp Lys Met
      35      40      45
Asp Gly Asn Lys Gln Glu Ala Ala Leu Gly Ala Gly Ala Ala His Ser
      50      55      60
Glu Ala Leu Asn Phe Ile Val Asn Thr Ile Leu Ala Gln Lys Pro Glu
65      70      75      80
Leu Ser Ala Gln Leu Thr Ala Ile Gly His Arg Ile Val His Gly Gly
      85      90      95
Glu Lys Tyr Thr Ser Ser Val Val Ile Asp Glu Ser Val Ile Gln Gly
      100      105      110
Ile Lys Asp Ala Ala Ser Phe Ala Pro Leu His Asn Pro Ala His Leu
      115      120      125
Ile Gly Ile Glu Glu Ala Leu Lys Ser Phe Pro Gln Leu Lys Asp Lys
      130      135      140
Asn Val Ala Val Phe Asp Thr Ala Phe His Gln Thr Met Pro Glu Glu
145      150      155      160
Ser Tyr Leu Tyr Ala Leu Pro Tyr Asn Leu Tyr Lys Glu His Gly Ile
      165      170      175
Arg Arg Tyr Gly Ala His Gly Thr Ser His Phe Tyr Val Thr Gln Glu
      180      185      190
Ala Ala Lys Met Leu Asn Lys Pro Val Glu Glu Leu Asn Ile Ile Thr
      195      200      205
Cys His Leu Gly Asn Gly Gly Ser Val Ser Ala Ile Arg Asn Gly Lys
      210      215      220
Cys Val Asp Thr Ser Met Gly Leu Thr Pro Leu Glu Gly Leu Val Met
225      230      235      240
Gly Thr Arg Ser Gly Asp Ile Asp Pro Ala Ile Ile Phe His Leu His
      245      250      255
Asp Thr Leu Gly Met Ser Val Asp Ala Ile Asn Lys Leu Leu Thr Lys
      260      265      270
Glu Ser Gly Leu Leu Gly Leu Thr Glu Val Thr Ser Asp Cys Arg Tyr
      275      280      285
Val Glu Asp Asn Tyr Ala Thr Lys Glu Asp Ala Lys Arg Ala Met Asp
      290      295      300
Val Tyr Cys His Arg Leu Ala Lys Tyr Ile Gly Ala Tyr Thr Ala Leu
305      310      315      320
Met Asp Gly Arg Leu Asp Ala Val Val Phe Thr Gly Gly Ile Gly Glu
      325      330      335
Asn Ala Ala Met Val Arg Glu Leu Ser Leu Gly Lys Leu Gly Val Leu
      340      345      350
Gly Phe Glu Val Asp His Glu Arg Asn Leu Ala Ala Arg Phe Gly Lys
      355      360      365
Ser Gly Phe Ile Asn Lys Glu Gly Thr Arg Pro Ala Val Val Ile Pro
      370      375      380
Thr Asn Glu Glu Leu Val Ile Ala Gln Asp Ala Ser Arg Leu Thr Ala
385      390      395      400

```

<210> 122
 <211> 72
 <212> ADN

```

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi dadX_KO_F
<400> 122
catggtattg agcgtatctg gagcgcgctc ggggccaccg atggctttgc aattaaccct 60
cactaaaggg cg 72

<210> 123
<211> 73
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi dadX_KO_R
<400> 123
accaataccc gcctgcgggc aaggcggttaa atcgaccgct agcatatcca taatacgact 60
cactataggg ctc 73

<210> 124
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi dadX_seq_F
<400> 124
ggctggacga tggcttgcg 20

<210> 125
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi dadX_seq_R
<400> 125
gtgcggtgag ttcaggttcc 20

```