



(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)



1-0032108

(51)⁷ C12P 13/06; C12N 9/02; C12N 9/06

(13) B

(21) 1-2017-04983

(22) 09/06/2016

(86) PCT/EP2016/063172 09/06/2016

(87) WO 2016/198529 15/12/2016

(30) 62/174,529 12/06/2015 US; 62/180,081 16/06/2015 US

(45) 25/06/2022 411

(43) 27/08/2018 365A

(73) BASF SE (DE)

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

(72) JAITZIG, Jennifer (DE); KUMAR, Mukesh (IN); BLANKSCHEN, Matthew David (US); RATANI, Shakir Siraj (US); WANG, Qingzhao (CN).

(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 CỦA
ALANIN CAO TRONG SẢN XUẤT LÊN MEN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
ALANIN TỪ VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic tái tổ hợp, vi sinh vật tái tổ hợp, phương pháp sản xuất alanin và việc sử dụng phân tử axit nucleic tái tổ hợp hoặc vi sinh vật tái tổ hợp này để sản xuất lên men alanin.

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, phương pháp sản xuất alanin và sử dụng phân tử axit nucleic tái tổ hợp hoặc vi sinh vật tái tổ hợp này để sản xuất lên men 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 công nghiệp thực phẩm, thức ăn gia súc và công nghiệp dược phẩm. Hơn nữa, alanin còn là nguyên liệu thô để sản xuất alanin, N,N-bis(carboxymetyl)-, muối trinati (MGDA, tên thương mại Trilon M) là chất chelat mạnh ở quy mô công nghiệp, có tính chất hòa tan ở mức độ hữu cơ và vô cơ rất tốt (WO94/29421, WO2012/150155). Các mức trilon M dễ bị phân hủy sinh học theo các thử nghiệm OECD chuẩn. Do lo ngại về mặt sinh thái học và độc tố nổi trội, các mức Trilon M đặc biệt thích hợp để sử dụng cho các sản phẩm đối với người tiêu dùng sau cùng và nhu cầu về các chất tạo phức có thể phân hủy sinh học như vậy đang tăng liên tục.

Alanin có thể được tạo ra 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).

Việc sản sinh alanin trong 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 cho ngành công nghiệp hóa chất. Do nhu cầu về alanin trong công nghiệp hóa chất đang ngày một tăng, nên cần có 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 các vi sinh vật có thể được sử dụng trong sản xuất lên men alanin với hiệu suất và hiệu quả cao.

Để đạt được mục đích nêu trên, có sự đóng góp của vi sinh vật tái tổ hợp thuộc họ *Escherichia coli* (*E. coli*), so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng, có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza trong vi sinh vật này được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường so với vi sinh vật đối chứng tương ứng không có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1

Sự tạo thành alanin trong quá trình lên men theo mẻ của *E. coli* QZ20 với đối chứng không có plasmit và *E. coli* QZ20/pACYC-*asd* trong 500 mL môi trường AM 1 với 120 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH bằng 6,8 với NH₄OH 5N không có sự sục khí.

Fig.2

Sự tạo thành alanin trong quá trình lên men theo mẻ của *E. coli* QZ20 với đối chứng không có plasmit và *E. coli* QZ20/pACYC-*gdhA* in 500 mL môi trường AM 1 with 120 g/L glucoza. Việc lên men được kiểm soát ở nhiệt độ 37°C, 400 vòng/phút, ở độ pH bằng 6,8 với NH₄OH 5N không có sự sục khí.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo đó, một phương án của sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường và so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng có hiệu suất và/hoặc năng suất của alanin cao hơn trong sản xuất lên men.

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

mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính hoặc hiệu suất hoặc năng suất cao hơn, được làm tăng hoặc tăng cường đáng kể khi so với vi sinh vật tham chiếu hoặc vi sinh vật đối chứng.

Thuật ngữ “mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa”, nghĩa là mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa đáng kể và cũng bao gồm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym tương ứng không phát hiện được trong vi sinh vật tham chiếu hoặc vi sinh vật đối chứng.

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 này 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, trong trường hợp này 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 thể 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 này sau 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 trong 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 tăng bằng cách làm tăng hoặc đưa vào các hoạt tính của enzym nhất định hoặc bằng cách làm bất hoạt gen hoặc làm giảm hoạt tính của enzym nhất định.

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

Ví dụ, để sử dụng vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế để tạo ra suxinat, các gen ldh, pfl, pta và adhE phải được làm 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.

Theo đó, phương án khác của sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen asd hoặc gdhA mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường và so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng có hiệu suất và/hoặc năng suất của pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin cao hơn trong sản xuất lên men.

Phương án khác nữa của sáng chế là vi sinh vật tái tổ hợp so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen asd và gdhA được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường và so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng có hiệu suất và/hoặc năng suất của alanin cao hơn trong sản xuất lên men.

Theo một số phương án, vi sinh vật này là tế bào không nhân. 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 saperae*, *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 azotiformans*, *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 madaurae*, *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 ammoniophilum*, *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 này 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. achromogenes*, *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 này 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 việc có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường, 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, trong đó việc làm giảm, ức chế hoặc xóa hoạt

tính và/hoặc sự biểu hiện của gen *pflB* 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 *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn có (b) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *adhE* mã hóa axetaldehyt-CoA dehydrogenaza/rượu dehydrogenaza phụ thuộc sắt/pyruvat-format lyaza deactivaza hai chức bị giảm, bị ức chế hoặc bị xóa, trong đó việc làm giảm, ức chế hoặc xóa hoạt tính và/hoặc sự biểu hiện của gen *adhE* 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 *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn 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 triệt tiêu, trong đó việc làm giảm, ức chế hoặc triệt tiêu hoạt tính và/hoặc sự 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 *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn có (d) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *pta* mã hóa phosphat axetyl-transferaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ackA* mã hóa axetat kinaza A và propionat kinaza 2 bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu, trong đó việc làm giảm, ức chế hoặc triệt tiêu hoạt tính và/hoặc sự biểu hiện của gen *pta* và/hoặc 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 *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn có (e) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *frdA* mã hóa fumarat reductaza

bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu, trong đó việc làm giảm, ức chế hoặc triệt tiêu hoạt tính và/hoặc sự 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 *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn có (f) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *alaD* mã hóa alanin dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường, trong đó việc làm tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc sự 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 *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có thể còn có (g) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *dadX* mã hóa alanin raxemaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu, trong đó việc làm giảm, ức chế hoặc triệt tiêu hoạt tính và/hoặc sự biểu hiện của gen *dadX* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Tốt hơn là, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có thêm ít nhất hai, tốt hơn nữa là ít nhất ba, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất bốn, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất năm, tốt nhất là tất cả các đặc tính nêu trên được chọn từ nhóm

(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 triệt tiêu và

(b) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *adhE* mã hóa axetaldehyt-CoA dehydrogenaza/rượu dehydrogenaza phụ thuộc sắt/pyruvat-format lyaza deactivaza hai chức) bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu 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 triệt tiêu và

(d) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *pta* mã hóa phosphat axetyl-transferaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu và/hoặc hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ackA* mã hóa axetat kinaza A và propionat kinaza 2 bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu và

(e) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *frdA* mã hóa fumarat reductaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu và

(f) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *alaD* mã hóa alanin dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường,

(g) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *dadX* mã hóa alanin raxemaza bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu

trong đó việc làm giảm, ức chế, triệt tiêu, đưa vào, việc làm tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc sự 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 là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin. Ví dụ, vi sinh vật theo sáng chế có thể còn có mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *ygaW* từ *E.coli* hoặc dạng đồng nhất hoặc đương lượng chức của chúng được làm

tăng cường hoặc làm tăng gần đây được mô tả để cải thiện năng suất sản xuất alanin của vi sinh vật khi được biểu hiện quá mức (WO2012/172822).

Theo ví dụ khác nữa, vi sinh vật theo sáng chế có thể ngoài ra còn có bất kỳ một trong số, bất kỳ sự kết hợp của hoặc tất cả các gen cụ thể và được mô tả chi tiết trong các đơn PCT/IB2014/064426 và PCT/IB2014/066686 và có lợi trong việc sản xuất alanin, pyruvat, suxinat, aspartat, malat, lactat, valin và/hoặc leuxin, tốt hơn là suxinat hoặc alanin, tốt hơn nữa là alanin.

Theo một phương án gen asd mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza, được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 25, 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%, thậm chí 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: 25, hoặc

(iii) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 25 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: 26, hoặc

(v) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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: 26,

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%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 26.

Theo một phương án gen *gdhA* mã hóa glutamat dehydrogenaza, được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 37, 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%, thậm chí 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: 37, hoặc

(iii) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 37 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: 38, hoặc

(v) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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: 38,

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%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 38.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có thể còn có bất kỳ một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc tất cả các tính chất như được xác định ở trên từ mục (a) đến (g),

trong đó gen *pflB* được chọn từ nhóm bao 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%, thậm chí 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 đồng nhất 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%, thậm chí 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%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 6 và

trong đó gen adhE được chọn từ nhóm bao 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%, thậm chí 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: 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 đồng nhất 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%, thậm chí 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%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 8 và

trong đó gen ldhA được chọn từ nhóm bao 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%, thậm chí 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 đồng nhất 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%, thậm chí 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%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 10 và

trong đó gen pta được chọn từ nhóm bao gồm:

(P1) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 11, hoặc

(Q1) 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%, thậm chí 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

(R1) 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

(S1) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 12, hoặc

(T1) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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 (Q1), (R1) hoặc (T1) có ít nhất 10%, 20% tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 12 và

trong đó gen ackA được chọn từ nhóm bao gồm:

(P2) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 32, hoặc

(Q2) 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%, thậm chí 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: 32, hoặc

(R2) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 32 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

(S2) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 33, hoặc

(T2) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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: 33,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (Q2), (R2) hoặc (T2) có ít nhất 10%, 20% tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 33 và

trong đó gen *frdA* được chọn từ nhóm bao gồm:

(U) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 13, 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%, thậm chí 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

(W) 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

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

(Y) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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 (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%, thậm chí tốt

hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 14 và

trong đó gen alaD được chọn từ nhóm bao gồm:

(Z) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, 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%, thậm chí 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

(BB) 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

(CC) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc

(DD) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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 (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%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 2 và

trong đó gen dadX được chọn từ nhóm bao 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%, thậm chí 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 đồng nhất 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%, thậm chí 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%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 16.

Theo ví dụ khác nữa, vi sinh vật theo sáng chế có thể ngoài ra còn có bất kỳ một trong số, bất kỳ sự kết hợp của hoặc tất cả các gen cụ thể và được mô tả chi tiết trong các đơn WO2015/044818 và PCT/IB2014/066686 và có lợi trong sự sản xuất alanin.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có thể còn có (h) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính vận chuyển axit amin mạch nhánh bị giảm, bị ức chế hoặc bị triệt tiêu, trong đó việc làm giảm, ức chế hoặc triệt tiêu hoạt tính và/hoặc sự biểu hiện của gen *brnQ* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có thể còn có (i) 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 triệt tiêu, trong đó việc làm giảm, ức chế hoặc triệt tiêu hoạt tính

và/hoặc sự biểu hiện của gen *gcvB* được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có thể còn có (j) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *zipA* mã hóa protein phân chia tế bào liên quan đến sự ghép vòng Z được làm tăng hoặc được làm tăng cường, trong đó hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *zipA* được làm tăng hoặc được làm tăng cường được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có thể còn có (k) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *lpd* mã hóa lipoamit dehydrogenaza được làm tăng hoặc được làm tăng cường, trong đó hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *lpd* được làm tăng hoặc được làm tăng cường được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có thể còn có (l) gen *lpxD* bị đột biến mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-axyl-transferaza, trong đó gen *lpxD* bị đột biến so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có thể còn có (m) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được làm tăng hoặc được làm tăng cường, trong đó hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* được làm tăng hoặc được làm tăng cường được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có thể còn có (n) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ygaW* mã hóa chất vận chuyển alanin được làm tăng hoặc được làm tăng cường, trong đó hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ygaW* được làm tăng hoặc được làm tăng cường được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Tốt hơn là, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có các đặc tính như được xác định ở trên từ mục a) đến g) có thêm ít nhất một, tốt hơn là ít nhất hai, tốt hơn nữa là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất bốn, tốt hơn nữa là ít nhất năm, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất sáu, tốt nhất là tất cả các đặc tính được chọn từ nhóm

(h) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính vận chuyển axit amin mạch nhánh và

(i) 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 triệt tiêu và

(j) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *zipA* mã hóa protein phân chia tế bào liên quan đến sự ghép vòng Z được làm tăng và/hoặc được làm tăng cường và

(k) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *lpd* mã hóa lipoprotein dehydrogenaza được làm tăng và/hoặc được làm tăng cường và

(l) hoạt tính được thay đổi của gen *lpxD* mã hóa mã hóa protein UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-glucosamin N-acyltransferaza và

(m) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN được làm tăng và/hoặc được làm tăng cường và

(n) hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *ygaW* mã hóa chất vận chuyển alanine được làm tăng và/hoặc được làm tăng cường,

trong đó việc làm giảm, ức chế, triệt tiêu, làm tăng, làm tăng cường hoặc thay đổi hoạt tính và/hoặc sự biểu hiện của gen được xác định so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường và có bất kỳ một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc tất cả các đặc tính như được xác định ở trên từ mục (a) đến (g) và/hoặc (A) đến (II), có thể còn có any một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc tất cả các đặc tính như được xác định ở trên từ mục (h) đến (n)

trong đó gen *brnQ* được chọn từ nhóm bao gồm:

(1) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 23, 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%, thậm chí 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: 23, hoặc

(3) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 23 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: 24, hoặc

(5) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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: 24,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (2), (3) hoặc (5) có ít nhất 10%, 20% tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 23 và

trong đó gen gcvB được chọn từ nhóm bao gồm:

(6) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 31, 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%, thậm chí 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: 31, hoặc

trong đó phân tử axit nucleic mục (7) có ít nhất 10%, 20% tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 31 và

trong đó gen zipA được chọn từ nhóm bao gồm:

(8) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 19, hoặc

(9) 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%, thậm chí 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: 19, hoặc

(10) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 19 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

(11) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 20, hoặc

(12) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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: 20,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (9), (10) hoặc (12) có ít nhất 10%, 20% tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, thậm chí tốt

hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 20 và

trong đó gen lpd được chọn từ nhóm bao gồm:

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

(14) 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%, thậm chí 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: 21, hoặc

(15) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 21 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

(16) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 22, hoặc

(17) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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: 22,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (14), (15) hoặc (17) có ít nhất 10%, 20% tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 22 và

trong đó lpxD gen được chọn từ nhóm bao gồm:

(23) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 27, hoặc

(24) 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%, thậm chí 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: 27, hoặc

(25) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 27 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

(26) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 28, hoặc

(27) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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: 28,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (24), (25) hoặc (27) có ít nhất 10%, 20% tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 28 và

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (24) đến (27) có ở vị trí tương đương với vị trí 15 được nêu trong SEQ ID NO: 28 threonin, và

trong đó gen *gcvA* được chọn từ nhóm bao gồm:

(28) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 29, hoặc

(29) 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%, thậm chí 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: 29, hoặc

(30) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 29 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

(31) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 30, hoặc

(32) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%,

thậm chí 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: 30,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (29), (30) hoặc (32) có ít nhất 10%, 20% tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 30 và

trong đó gen ygaW được chọn từ nhóm bao gồm:

(33) phân tử axit nucleic chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 17, hoặc

(34) 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%, thậm chí 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: 17, hoặc

(35) phân tử axit nucleic lai với phân tử axit nucleic có SEQ ID NO: 17 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

(36) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 18, hoặc

(37) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất 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%, thậm chí 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: 18,

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (34), (35) hoặc (37) có ít nhất 10%, 20% tốt hơn là ít nhất 30% hoặc 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 60% hoặc 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85% hoặc 90 %, được ưu tiên nhất là ít nhất 95% hoạt tính như polypeptit có SEQ ID NO: 18 và

trong đó polypeptit được mã hóa bởi (34) to (37) tốt hơn là có ở vị trí tương đương với vị trí 5 được nêu trong SEQ ID NO: 18 tốt hơn là histidin, asparagin, arginin hoặc tyrosin.

Tốt hơn là vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc *gdhA* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza hoặc glutamat dehydrogenaza được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường có tất cả các đặc tính như được xác định ở trên từ mục (a) đến (g) hoặc (A) đến (II) và (j), (k) và (n) hoặc (13) đến (17) và (33) đến (37).

Phương án khác theo 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 có thể còn có môi trường cho phép vi sinh vật tái tổ hợp phát triển theo sáng chế. Môi trường này có thể còn chứa nguồn cacbon như hexoza, pentoza hoặc polyol ví dụ sucroza, glucoza, fructoza, galactoza, manosa, rafinoza, xyloza, arabinoza, xyluloza, glyxerol, manitol, arabitol, xylitol, tinh bột, xenluloza, lignoxenluloza hoặc sự kết hợp của chúng. Tốt hơn là nguồn cacbon này là glucoza của sucroza, tốt hơn nữa là nguồn cacbon này là glucoza.

Theo 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 là chế phẩm này còn chứa nguồn cacbon, tốt hơn là đường. Các thành phần của các môi trường này được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật.

Tốt hơn là 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 chứa 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 mỗi lít 0,01-1 M, tốt hơn là 0,1 M HCL.

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

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 mỗi lít nguồn kim loại vi lượng chứa 0,01-1 M, tốt hơn là 0,12 M HCL, 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 là 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

0,05-5 g, 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 mỗi lít nguồn kim loại vi lượng chứa 10-100 mM, tốt hơn là 60 mM axit sulfuric, 1-10g, tốt hơn là 3,48g $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{II})(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1-1g, tốt hơn là

0,35g $\text{CoSO}_4 - 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1-1g, tốt hơn là 0,31g $\text{CuSO}_4 - 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,1-5g, tốt hơn là 0,63g $\text{ZnSO}_4 - 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1-1g, tốt hơn là 0,27g $\text{MnSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$; 0,01-1g, tốt hơn là 0,07g $\text{NaMoO}_4 - 2 \text{H}_2\text{O}$ 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 trong mỗi lít môi trường.

Phương án khác theo sáng chế là phương pháp để sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp có hiệu suất hoặc năng suất alanin được tăng cường, phương pháp này bao gồm các bước dưới đây:

đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường một hoặc nhiều hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc gen *gdhA* hoặc như được xác định ở trên từ mục (i) đến (v) ở vi sinh vật; và

tạo ra, nhận diện và phân lập vi sinh vật tái tổ hợp với hiệu suất hoặc năng suất alanin được tăng cường so với vi sinh vật tương ứng mà không có hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *asd* hoặc gen *gdhA* được đưa vào, làm tăng hoặc làm tăng cường hoặc như được xác định ở trên từ mục (i) đến (v).

Theo phương án được ưu tiên của phương pháp để sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế phương pháp này còn bao gồm bước làm giảm, ức chế hoặc triệt tiêu hoạt tính và/hoặc sự biểu hiện của ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu hoặc tất cả gen *pflB*, gen *adhE*, gen *ldhA*, gen *pta*, gen *ackA*, gen *frdA* hoặc gen *dadX* ví dụ như được xác định ở trên từ mục (A) đến (Y) và (EE) đến (II) và/hoặc bước đưa vào, làm tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *alaD*, gen *lpd*, gen *zipA* và gen *ygaW* ví dụ như được xác định ở trên từ mục (Z) đến (DD), (8) đến (17) và (33) đến (37).

Phương pháp được ưu tiên hơn để sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế gồm bước làm giảm, ức chế hoặc triệt tiêu hoạt tính và/hoặc sự biểu hiện của tất cả gen *pflB*, gen *adhE*, gen *ldhA*, gen *ackA* và gen *frdA* và bước đưa vào, làm tăng hoặc tăng cường hoạt tính và/hoặc mức độ biểu hiện của gen *alaD*, gen *lpd*, gen *zipA* và gen *ygaW*.

Theo một phương án của phương pháp để sản xuất vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm: các loài thuộc chi *Corynebacterium*, ví dụ *C. acetophilum*, *C. glutamicum*, *C. callunae*, *C. acetoacidophilum*, *C. acetoglutamicum*, các 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*, các loài thuộc chi *Erwinia*, ví dụ, *E. uredovora*, *E. carotovora*, *E. ananas*, *E. herbicola*, *E. punctata*, *E. terreus*, các loài thuộc chi *Escherichia*, ví dụ, *E. coli*, các loài thuộc chi *Pantoea*, ví dụ, *P. citrea*, *P. agglomerans*, các loài thuộc chi *Streptomyces*, ví dụ, *S. ambofaciens*, *S. achromogenes*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *S. aureofaciens*, *S. aureus*, *S. fungicidicus*, *S. griseus*, *S. lividans*, các loài thuộc chi *Zymomonas*, ví dụ, *Z. mobilis* hoặc *Z. lipolytica* các loài thuộc chi *Rhodococcus*, ví dụ *R. opacus*, các loài thuộc chi *Saccharomyces* spec, như *Saccharomyces cerevisiae*, các loài thuộc chi *Hansenula* spec, như *Hansenula polymorpha*, các loài thuộc chi *Schizosaccharomyces* spec, như *Schizosaccharomyces pombe*, các loài thuộc chi *Kluyveromyces* spec, như *Kluyveromyces lactis* và *Kluyveromyces marxianus*, các loài thuộc chi *Yarrowia* spec, như *Yarrowia lipolytica*, các loài thuộc chi *Pichia* spec, như *Pichia methanolica*, *Pichia stipites* và *Pichia pastoris*, các loài thuộc chi *Zygosaccharomyces* spec, như *Zygosaccharomyces rouxii* và *Zygosaccharomyces bailii*, các loài thuộc chi *Candida* spec, như *Candida boidinii*, *Candida utilis*, *Candida freyschussii*, *Candida glabrata* và *Candida sonorensis*, các loài thuộc chi *Schwanniomyces* spec, như *Schwanniomyces occidentalis*, các loài thuộc chi *Arxula* spec, như *Arxula adenivorans*, các loài thuộc chi *Ogataea* spec như *Ogataea minuta*, các loài thuộc chi *Klebsiella* spec, như *Klebsiella pneumoniae*.

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 theo sáng chế là phương pháp sản xuất alanin, tốt hơn 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, tốt hơn 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 thay 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 bằng nhau 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 cố gắng để 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, tốt hơn nữa là L-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 12% đến 18% (trọng lượng/thể tích) đường. Tốt hơn là, vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường chứa khoảng từ 13% đến 15% (trọng lượng/thể tích) đường.

Theo phương án khác của phương pháp sản xuất alanine, tốt hơn nữa là L-alanin, hiệu suất của alanin 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 tốt hơn là L-alanin là phương án khác của sáng chế.

Vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế khác biệt ở chỗ, so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng ví dụ kiểu dại hoặc chủng sản xuất alanin cao, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym that được mã hóa bởi *gen asd* hoặc *gen gdhA* được làm tăng hoặc tăng cường.

Hơn thế nữa, vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế khác biệt ở chỗ, so với vi sinh vật tham chiếu tương ứng ví dụ kiểu dại hoặc chủng sản xuất alanin cao mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính của cả hai enzym được mã hóa bởi *gen asd* và *gen gdhA* được làm tăng hoặc tăng cường.

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 gen 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 gen khởi đầu của gen bằng cách, ví dụ xóa hoặc gây đột biến hộp gen khởi đầu như phía đi vào ribosom, hộp TATA và tương tự. Việc giảm này cũng có thể đạt được bằng cách phá hủy sản phẩm phiên mã của gen, ví dụ bằng cách đưa vào các ribozym, dsARN, ARN đối mã hoặc oligonucleotit 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.

Mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính giảm của enzym được bộc lộ trong bản mô tả này có thể là sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 50%, so với mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym của 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 enzym ít nhất 95%, hoặc tốt hơn nữa là sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 98%, hoặc còn tốt hơn nữa là sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 99% hoặc còn tốt hơn nữa là sự giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 99,9%. Theo phương án được ưu tiên nhất, mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym không thể phát hiện trong vi sinh vật theo sáng chế.

Mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym được làm tăng cường hoặc làm tăng được bộc lộ trong bản mô tả này có thể là sự tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 25%, so với mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym này ở vi sinh vật tham chiếu tương ứng ví dụ kiểu đại của vi sinh vật, hoặc sự tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 50%, hoặc tốt hơn nữa là sự tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 100%, hoặc tốt hơn nữa là sự tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 3 lần, ví dụ ít nhất 5 lần, hoặc thậm chí tốt hơn nữa là sự tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 10 lần hoặc thậm chí tốt hơn nữa là sự tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính enzym ít nhất 20 lần.

Sự tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *asd* hoặc gen *gdhA* dẫn đến năng suất và/hoặc hiệu suất của 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 tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của gen *asd* hoặc gen *gdhA* có thể được xác định bằng cách đo năng suất hoặc hiệu suất 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 việc tăng sự biểu hiện và hoặc hoạt tính của gen *asd* hoặc gen *gdhA*.

Phương pháp xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính 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 pyruvat format lyaza I (*pflB*) được, ví dụ, bộc lộ trong Knappe J, Blaschkowski HP, Grobner 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 rượu dehydrogenaza/pyruvat-format lyaza deactivaza (*adhE*) phụ thuộc vào axetaldehyt-CoA dehydrogenaza hai chức năng/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 phosphat axetyltransferaza (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 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 và characterization of *Escherichia 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 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, mức độ 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 mức độ 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 một 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 gen khởi đầu mạnh hoặc gen khởi đầu ức chế), protein cải biến (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 trong lĩnh vực (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, việc 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, 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 gen gây hại 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 gây hại theo cách sử dụng này là đột biến bất kỳ bên trong gen bao gồm gen khởi đầu và vùng mã hóa dẫn đến hoạt tính protein bị giảm hoặc bị triệt tiêu của protein được mã hóa bởi vùng mã hóa của gen. Các đột biến gây hại này bao gồm, ví dụ sự xê dịch khung, việc đưa codon kết thúc trong vùng mã hóa, gây đột biến các yếu tố gen khởi đầu như hộp TATA ngăn sự phiên mã và tương tự.

Vi sinh vật có mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym được mã hóa bởi gen *asd* hoặc gen *gdhA* được làm tăng hoặc được làm tăng cường có thể xảy ra tự nhiên, nghĩa là do đột biến ngẫu nhiên. Vi sinh vật có thể được biến đổi để có hoạt tính của enzym được làm tăng đáng kể 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 của enzym được làm tăng 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 đồng nhất nhằm thay thế một hoặc nhiều gen nêu trên bằng gen tương ứng mã hóa enzym mà, so với enzym được mã hóa bởi gen kiểu dại, có mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính được làm tăng.

Theo một phương án của vi sinh vật tái tổ hợp theo sáng chế, việc tăng mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của enzym được mã hóa bởi gen *asd* hoặc gen *gdhA*

có thể đạt được bằng cách cải biến gen *asd* hoặc gen *gdhA*, trong đó (các) cải biến gen này tốt hơn là được thực hiện bằng cách nhân số lượng bản sao của gen *asd* hoặc gen *gdhA* trong bộ gen vi sinh vật lên, bằng cách đưa gen trên vector biểu hiện tự sao chép vào vi sinh vật, bằng cách trao đổi gen khởi đầu của gen *asd* hoặc gen *gdhA* dựa trên gen khởi đầu mạnh hơn hoặc bằng cách chuyển gen khởi đầu nội sinh của gen vào gen khởi đầu mạnh hơn, ví dụ bằng cách đưa các đột biến điểm vào trình tự gen khởi đầu.

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

Việc gây đột biến gen nêu trên có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách gây đột biến 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.

Sau đây, kỹ thuật tái tổ hợp thích hợp cụ thể là để 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 plasmit) được kết hợp vào nhiễm sắc thể bằng quy trình tái tổ hợp đồng nhất đơn (quy trình cross in), và tạo ra hiệu quả trong việc cài xen phiên bản thẳng của phân tử ADN vòng tròn nêu trên vào trình tự ADN thứ nhất của nhiễm sắc thể đồng nhất 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 trình tự ADN đồng nhất thứ nhất, mỗi bản bao gồm và bao quanh bản điểm giao đồng nhất tái tổ hợp.

“Campbell ra”, như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ sự giảm dần tế bào từ thể biến nạp “Campbell vào”, trong đó quy trình tái tổ hợp đồng nhất 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, đồng nhất với trình tự ADN thứ hai của đoạn cài xen thẳng nêu trên, quy trình tái tổ hợp thứ hai dẫn đến việc xóa (vứt 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 Campbell đã kết hợp vào ADN 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 đồng nhất hoặc gen đồng nhất 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 được mong muốn vứt bỏ) của trình tự ADN “Campbell 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 đồng nhất dẫn đến “Campbell vào” hoặc “Campbell ra” có thể xảy ra trên khoảng bazơ ADN bên trong trình tự ADN đồng nhất, và vì các trình tự đồng nhất sẽ giống nhau 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 đồng nhất thứ nhất và trình tự ADN đồng nhất thứ hai thường được tách biệt bởi vùng không đồng nhất một phần, và chính vùng không đồng nhất này vẫn nằm trên nhiễm sắc thể của tế bào “Campbell ra”.

Tốt hơn là, trình tự ADN đồng nhất 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 đồng nhất 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 đồng nhất 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 hai cặp bazơ là 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 *asd* đạt được bằng cách hoạt hóa gen *asd* mã hóa aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza. Theo một phương án việc giảm mức độ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của *gdhA* đạt được bằng cách hoạt hóa gen *gdhA* mã hóa glutamat dehydrogenaza.

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 muối amoni hoặc 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 kỵ khí cũng có thể được sử dụng.

Vi hiếu khí nghĩa là ở 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 27mmHg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 20 Hg (Megan Falsetta et al. (2011), Chế phẩm và kiểu hình chuyển hóa của màng sinh học *Neisseria gonorrhoeae*, Frontiers trong 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 kỵ 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 kỵ khí bằng cách đưa vào khí cacbon dioxide hoặc nitơ hoặc hỗn hợp của chúng và tùy ý hydro ở lưu lượng dòng 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 dòng 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, glycerin, 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.

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 bong bóng và thiết bị phản ứng vòng. Đánh giá toàn diện về các loại phương pháp có thể có bao gồm 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 đioxit, hydro, nitơ hoặc hỗn hợp khí thích hợp có thể được thực hiện để đạt được hiệu suất tốt (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
Độ 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 lên men dưới dạng cái gọi là "sinh khối". Quy trình loại bỏ sinh khối đã biết với người có hiểu biết trung bình trong 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 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 lên men có thể được khử trùng hoặc thanh trùng. Theo phương pháp khác, canh 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 nên được lựa chọn sao cho trước tiên không xảy ra tổn hại về sản phẩm, và thứ hai là việc sử dụng tối thiểu thiết bị và năng lượng là cần thiết. Việc lựa chọn khéo léo mức áp suất và nhiệt độ để bay hơi nhiều giai đoạn cụ thể là giúp 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 trong 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.

Định nghĩa

Cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở phương pháp học cụ thể hoặc các giao thức cụ thể. Cũng nên 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 mà sẽ chỉ được giới hạn ở các điểm yêu cầu bảo hộ. Cần lưu ý rằng như được sử dụng trong 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 vector" nghĩa là chỉ dẫn đến một hoặc nhiều vector 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 trên và biên 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 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, trên 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

suôn 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 chứa các trình tự nucleotit kháng 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 kháng 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 phù hợp. Tính bổ sung "toàn bộ" hoặc "hoàn toàn" giữa các phân tử axit nucleic là khi mỗi và mọi bazơ axit nucleic 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 nucleic như được sử dụng trong mô tả này đề cập đến một trình tự nucleotit mà các phân tử axit nucleic của nó cho thấy sự bổ sung toàn bộ đối với các phân tử axit nucleic 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 cao hơn, tốt hơn là cao hơn đáng kể so với mức độ biểu hiện của phân tử axit nucleic được biểu hiện. Như được sử dụng trong bản mô tả, "sự tăng cường" hoặc "sự tăng" hàm lượng của một chất như protein, mRNA hoặc ARN có nghĩa là hàm lượng được tăng so với sinh vật vi sinh 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, mRNA, 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 gây ra, hoạt tính của nó hoặc tầm ảnh hưởng đến 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" chỉ sự sinh tổng hợp sản phẩm gen, tốt hơn là mã 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 là có nghĩa là, ví dụ, sự sắp xếp tuần tự yếu tố điều hòa (ví dụ, gen khởi đầu) với trình tự axit nucleic cần được thể hiện và, nếu thích hợp, các yếu tố điều hòa khác nữa (ví dụ, một 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 kiểm soát 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 xa hơn, 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 các trình tự đóng vai trò là gen 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 gen 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 và Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), Ausubel et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. và Wiley Interscience, Gelvin và những người khác (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 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 gen khởi đầu và axit nucleic cần được biểu hiện, có thể tồn tại ở dạng kết hợp với vectơ 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, polypeptit hoặc ARN chức năng) theo một cách nhất định. Gen bao gồm vùng điều hòa chưa được dịch mã của ADN (ví dụ, gen khởi đầu, gen tăng cường, gen kìm hãm, v.v.) trước (xuôi chiều) và sau (ngược chiều) vùng mã hóa (khung đọc mở, ORF). Thuật ngữ "gen cấu trúc" như được sử dụng trong 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 nucleoid và cả ADN của plasmid 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 gen 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 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 gen 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 gen khởi đầu, mà không phải là gen khởi đầu tự nhiên của phân tử này, được xem là khác loại với gen 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 mã hóa khác loại mã hóa ARN hoặc protein thường không được tạo ra bởi tế bào trong 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). Việc 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 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 dịch ở 1M NaCl [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 chất 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 chất 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, 0,1% SDS 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 chất 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 nêu trên có cùng độ đồng nhất trình tự ở mức nhất định, các trình tự này giống nhau một phần.

Để xác định phần trăm độ đồng nhất (độ đồng nhất được sử dụng thay thế nếu chỉ 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 đồng nhất" 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 đồng nhất chỉ các axit amin đồng nhất tại một vị trí cụ thể trong một trình tự. Axit amin đồng nhất 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 đồng nhất với protein theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách đưa một hoặc nhiều thay thế, bổ sung hoặc xóa nucleotit vào trình tự nucleotit sao cho một hoặc nhiều 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.

Ngoài ra, 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 phần 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 trong phiên bản fasta 3 (WR Pearson và DJ Lipman, PNAS 85, 2444 (1988), WR Pearson, Methods in Enzymology 183, 63 (1990), WR Pearson và 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 bao gồm trong phần mềm Biomax Pedant (Biomax, Munich, Cộng hòa Liên bang 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 sấp 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 et al., 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 et al., (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 phạt khoảng trống: 10,0, điểm phạt 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 hoá 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 chứa 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 gen 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, metylphosphonat, 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 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 nucleic tương đối ngắn, thường có chiều dài ít hơn 100 nucleotit. Thông thường, đoạn dò axit 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.

Gen khởi đầu: Thuật ngữ "gen khởi đầu", hoặc "trình tự gen 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. Gen 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. Gen khởi đầu không bao gồm vùng mã hóa hoặc vùng không được dịch mã 5'. Gen khởi đầu có thể, ví dụ khác loại hoặc đồng nhất 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, gen khởi đầu liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa khác loại chỉ trình tự mã hóa từ loài khác với loài từ đó thu được gen khởi đầu này, hoặc, nếu từ cùng một loài, trình tự mã hóa mà không được kết hợp tự nhiên với gen khởi đầu (ví dụ trình tự mã hóa 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 mức độ 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 "về cơ bản được tinh chế" là không chứa ít nhất 60%, tốt hơn là không chứa ít nhất 75%, và tốt hơn nữa 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 đối chứng hoặc mức độ biểu hiện trong tế bào đối chứng, hiệu suất hoặc năng suất của tế bào đối chứng, 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% là 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 một "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 gen 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

khiến trong bản mô tả này được gọi là "vector biểu hiện". Trong bản mô tả này, "plasmid" 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 "việc sản xuất" hoặc "hiệu 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 của việc 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).

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.

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.

Ví dụ về ADN tái tổ hợp này là plasmit trong trình tự ADN đồng nhất được chèn hoặc gen hoặc gen khởi đầu bị đột biến so với gen hoặc gen khởi đầu từ ADN tái tổ hợp thu được. Sự đột biến có thể được đưa vào bằng kỹ thuật gây đột biến gen trực tiếp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật hoặc bằng kỹ thuật gây đột biến ngẫu nhiên như kỹ thuật gây đột biến bằng hóa chất, ánh sáng của tia UV hoặc tia x hoặc các kỹ thuật gây tiến hóa trực tiếp.

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 mARN. 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 laser (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*, *adhE*, *frdABCD* và *pflB* ORF và thay thế *ldhA* orF bằng biến thể được tối ưu hóa codon của gen *alaD* (*alaD-gstear*).

ackA, *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 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.

Quy trình này đã được mô tả trước đây ví dụ trong WO2015/044818 được nêu trong phần mô tả này bằng cách viễn dẫn.

Sự đứt gãy của ackA đã được mô tả trước đây ví dụ trong Causey et al (2004), PNAS, 101 (8) trang 2235 – 2240.

Hơn nữa, trong chủng này bao gồm ackA, adhE, frdABCD, pflB và ldhA và hoạt tính alaD được đưa vào chưa được hoạt hóa, hoạt tính của gens lpd, zipA và ygaW được làm tăng như đã được mô tả trước đây trong WO2015/044818 và hoạt tính của alaD còn được làm tăng cường bằng cách gây đột biến gen khởi đầu kiểm soát gen này như đã được mô tả trước đây trong WO2015/044818.

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 (tetraxyclin).

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 đỏ 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% (v/v) 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 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 mồi 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. Thẻ biến nạp KanR CmR hoặc ZeoR CmR được dùng để cấy vào 0,2ml môi trường nuôi cấy LB, sau đó 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) *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 by 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	Gen Bridges
708-FLPe	plasmit biểu hiện FLP recombinaza, gốc pSC101, Cm ^R	Gen Bridges
đoạn mồi (BioSpring)	SEQ ID NO	
pACYC-asd-F	35	
pACYC-asd-R	36	

pACYC-gdhA-F	40
pACYC-gdhA-R	41

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

Lưu lượng dòng: 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 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 dòng: 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 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. Hiệu quả của mức độ biểu hiện của gen asd tăng đối với năng suất alanin

Bản sao khác của gen asd (SEQ ID NO: 25) được đưa vào plasmit pACYC184 dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu P_{trc} có thể cảm ứng được IPTG. Vector, được thiết kế làm pACYC-asd (SEQ ID NO: 34), được cấu tạo nhờ kỹ thuật nhân dòng InFusion thương mại (Clontech, Mountain View, CA, USA). Vector pACYC184 (NEB) được tạo mạch thẳng bằng HindIII và SalI endonucleaza giới hạn (NEB). Mạch chính vector đã tạo thành được tinh sạch bằng cách chiết gel agarosa. Gen asd này được khuếch đại bằng PCR từ bộ gen ADN kiểu dại của E. coli W bằng đoạn mồi asd-pACYC_F (SEQ ID NO: 35) và asd-pACYC_R (SEQ ID NO: 36). Đoạn mồi chứa 15 bp đồng dạng khác nhô ra khỏi mạch chính vector và mảnh ADN mạch kép có gen khởi đầu P_{trc} được tổng hợp bởi IDT. Gen asd đã khuếch đại, hướng xuôi của gen khởi đầu P_{trc} và mạch chính vector pACYC184 được nhân dòng cùng nhau theo phương pháp nhân dòng InFusion. Vector pACYC-asd tạo thành được biến nạp vào E. coli nhờ kỹ thuật xung điện và được chọn trên đĩa LB chloramphenicol. Cấu trúc dương được xác nhận bởi kỹ thuật giải trình tự ADN.

Hiệu quả của việc biểu hiện quá mức asd đối với năng suất alanin được kiểm tra bằng việc nuôi cấy so sánh E. coli với vector pACYC đối chứng trống và E. coli chứa sự biểu hiện quá mức asd plasmit pACYC-asd (SEQ ID NO: 34). Các giống tiền nuôi cấy được cho phát triển trong bình lắc có môi trường LB, 20% thể tích nạp đầy ở nhiệt độ 37°C và 200 vòng/phút qua đêm. Việc lên men được thực hiện trong hệ thiết bị phản ứng sinh học song song 1,5 L DASGIP (Eppendorf) trong 500 mL môi

trường AM 1 (2,6 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,87 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,15 g/L Kill, 0,37 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, betain 1 mM, 1ml/L dung dịch nguồn kim loại vi lượng). Nguồn kim loại vi lượng gồm 1,6g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1g/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2g/L ZnCl_2 ; 0,2g/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,05g/L H_3BO_3 , 0,1 M HCL. 120 g/L Glucoza được sử dụng làm nguồn cacbon trong môi trường lên men. 25 ug/mL chloramphenicol được bổ sung vào để duy trì ổn định plasmit. Mức độ biểu hiện của gen asd từ gen khởi đầu P_{trc} được gây ra bởi 250 uM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) trong giai đoạn tăng trưởng loga ban đầu. Mỗi chủng được thực hiện nhân đôi ở nhiệt độ 37°C và tốc độ khuấy ở 400 vòng/phút. NH_4OH 5N được sử dụng để kiểm soát pH đến 6,8 và cung cấp nuôi cấy với amoni làm tiền chất alanin qua quá trình lên men. Không có không khí trong quá trình lên men và ống này không được tạo áp lực sao cho sau khi tiêu thụ ban đầu oxy hòa tan trong môi trường bởi các tế bào trong các quá trình lên men được thực hiện trong điều kiện vi hiếu khí. Các mẫu được thực hiện qua quá trình lên men và được phân tích bằng HPLC cho nồng độ alanin và glucoza.

Sau 72 giờ lên men *E. coli* QZ20 trong đó gen asd (SEQ ID NO: 25) được biểu hiện quá mức từ plasmit pACYC-asd (SEQ ID NO: 34) hướng đến độ chuẩn L-alanin cao hơn đáng kể $66,58 \pm 0,50$ g/L so với chủng chứa plasmit đối chứng trồng với $46,00 \pm 1,85$ g/L (Fig.1).

Ví dụ 5. Hiệu quả của mức độ biểu hiện tăng của gen *gdhA* đối với năng suất alanin

Bản sao khác của gen *gdhA* (SEQ ID NO: 37) được đưa vào plasmit pACYC184 dưới sự kiểm soát của IPTG-có thể cảm ứng được gen khởi đầu P_{trc}. Vector này được thiết kế làm pACYC-*gdhA* (SEQ ID NO: 39), được cấu tạo nhờ kỹ thuật nhân dòng InFusion thương mại (Clontech, Mountain View, CA, USA). Vector pACYC184 (NEB) được tạo mạch thẳng bằng HindIII và SalI endonucleaza giới hạn (NEB). Mạch chính vector được tạo thành được tinh chế bằng cách chiết gel thạch tinh thể. Gen *gdhA* được khuếch đại bằng PCR từ bộ gen ADN *E. coli* W kiểu dại với đoạn mồi *gdhA*-pACYC_F (SEQ ID NO: 40) và *gdhA*-pACYC_R (SEQ ID NO: 41). Đoạn mồi này chứa 15 bp đồng dạng khác nhau ra khỏi mạch chính vector và mảnh

ADN mạch kép có khởi đầu P_{trc} được tổng hợp bằng IDT. Gen *gdhA* đã khuếch đại, hướng xuôi gen khởi đầu P_{trc} và mạch chính vector pACYC184 được nhân dòng cùng nhau theo phương pháp nhân dòng InFusion. Vector pACYC-*gdhA* tạo thành được biến nạp vào *E. coli* nhờ kỹ thuật xung điện và được chọn trên đĩa LB chloramphenicol. Cấu trúc dương được xác nhận bởi kỹ thuật giải trình tự ADN.

Hiệu quả của sự biểu hiện quá mức *gdhA* đối với năng suất alanin được kiểm tra bằng cách nuôi cấy so sánh *E. coli* với vector pACYC đối chứng trống và *E. coli* chứa plasmid pACYC-*gdhA* biểu hiện quá mức *gdhA* (SEQ ID NO: 39). Các giống tiền nuôi cấy được cho phát triển trong bình lắc có môi trường LB, 20% thể tích nạp đầy ở nhiệt độ 37°C và 200 vòng/phút qua đêm. Việc lên men được thực hiện trong hệ thiết bị phản ứng sinh học song song 1,5 L DASGIP (Eppendorf) trong 500 mL môi trường AM 1 (2,6 g/L (NH₄)₂HPO₄, 0,87 g/L NH₄H₂PO₄, 0,15 g/L KCl, 0,37 g/L MgSO₄·7H₂O, 15 g/L (NH₄)₂SO₄, betain 1 mM, 1ml/L dung dịch nguồn kim loại vi lượng). Nguồn kim loại vi lượng chứa 1,6g/L FeCl₃·6H₂O; 0,2g/L CoCl₂·6H₂O; 0,1g/L CuCl₂·2H₂O; 0,2g/L ZnCl₂; 0,2g/L NaMoO₄·2H₂O; 0,05g/L H₃BO₃, 0,1 M HCL. 120 g/L Glucoza được sử dụng làm nguồn cacbon trong môi trường lên men. 25 ug/mL chloramphenicol được bổ sung vào để duy trì ổn định plasmid. Mức độ biểu hiện của gen *gdhA* từ gen khởi đầu P_{trc} được gây ra bởi 250 uM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) trong pha sinh trưởng loga ban đầu. Mỗi chủng được cho nhân đôi ở nhiệt độ 37°C và 400 vòng/phút. NH₄OH 5N được sử dụng để kiểm soát pH đến 6,8 và cung cấp cho nuôi cấy amoni như là tiền chất alanin trong suốt quá trình lên men. Không khí không được phun trong quá trình lên men và ống này không được tạo áp lực sao cho sau khi tiêu thụ oxy được hòa tan ban đầu trong môi trường bởi các tế bào, sự lên men được thực hiện trong điều kiện ít oxy. Các mẫu được lấy trong quá trình lên men và được phân tích bởi HPLC cho nồng độ alanin và glucoza.

Sau 72 giờ lên men *E. coli* QZ20 trong đó gen *gdhA* (SEQ ID NO: 37) được biểu hiện quá mức từ plasmid pACYC-*gdhA* (SEQ ID NO: 39) dẫn đến độ chuẩn L-alanin cao hơn đáng kể bằng 62,18 ± 0,37 g/L so với chủng chứa plasmid đối chứng trống bằng 50,96 ± 3,41 g/L (Fig.2).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật tái tổ hợp có hiệu suất và/hoặc năng suất của alanin cao hơn trong sản xuất lên men so với vi sinh vật đối chứng tương ứng, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp này chứa:
 - a) gen *asd* mã hóa và biểu hiện aspartat-beta-semialdehyt dehydrogenaza, trong đó gen *asd* được đưa vào vi sinh vật tái tổ hợp hoặc sự biểu hiện của gen *asd* được làm tăng khi so với vi sinh vật mà không có sự biểu hiện của gen *asd* tăng;
 - b) gen *alaD* mã hóa và biểu hiện alanin dehydrogenaza, trong đó gen *alaD* được đưa vào vi sinh vật tái tổ hợp hoặc sự biểu hiện gen *alaD* được làm tăng khi so với vi sinh vật mà không có sự biểu hiện của gen *alaD* tăng; và
 - c) gen *ldhA* mã hóa D-lactat dehydrogenaza lên men phụ thuộc NAD, trong đó gen *ldhA* bị xóa hoặc sự biểu hiện gen *ldhA* được làm giảm khi so với vi sinh vật mà không có sự biểu hiện của gen *ldhA* giảm.
2. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen *asd* thu được từ bộ gen ADN của *E. coli* W kiểu dại.
3. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen *asd* được chọn từ nhóm bao gồm:
 - (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 25,
 - (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 25,
 - (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 26, và
 - (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 26.
4. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen *alaD* được chọn từ nhóm bao gồm:
 - (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 1,
 - (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 1,
 - (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 2, và

(d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 2.

5. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen *ldhA* được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 9, hoặc
- (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 9,
- (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 10, và
- (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 10.

6. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật tái tổ hợp này còn bao gồm ít nhất một trong số gen bị xóa hoặc gen có sự biểu hiện giảm khi so với vi sinh vật mà không có sự biểu hiện gen giảm, trong đó gen này được chọn từ:

- (a) gen *pflB* mã hóa pyruvat format lyaza I,
- (b) gen *adhE* mã hóa axetaldehyt-CoA dehydrogenaza hai chức/rượu dehydrogenaza phụ thuộc sắt/pyruvat-format lyaza deactivaza,
- (c) gen *pta* mã hóa phosphat axetyltransferaza,
- (d) gen *ackA* mã hóa axetat kinaza A và propionat kinaza 2,
- (e) gen *frdA* mã hóa fumarat reductaza,
- (f) gen *dadX* mã hóa alanin raxemaza,
- (g) gen *brnQ* mã hóa protein *brnQ* có hoạt tính vận chuyển axit amin mạch nhánh, và
- (h) gen *gcvB* mã hóa ARN mã hóa không phải protein;

và/hoặc ít nhất một trong số gen được đưa vào vi sinh vật tái tổ hợp hoặc gen có sự biểu hiện tăng khi so với vi sinh vật mà không có sự biểu hiện gen tăng, trong đó gen này được chọn từ:

- (i) gen *zipA* mã hóa protein phân chia tế bào liên quan đến sự ghép vòng Z,

- (j) gen *lpd* mã hóa lipoamit dehydrogenaza,
 - (k) gen *gcvA* mã hóa protein liên kết ADN, và
 - (l) gen *ygaW* mã hóa protein vận chuyển alanin.
7. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen *pflB* được chọn từ nhóm bao gồm:
- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 5,
 - (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 5,
 - (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 6, và
 - (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 6.
8. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen *adhE* được chọn từ nhóm bao gồm:
- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 7,
 - (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 7,
 - (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 8, và
 - (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 8.
9. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen *pta* được chọn từ nhóm bao gồm:
- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 11,
 - (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 11,
 - (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 12, và
 - (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 12.

10. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen ackA được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 32,
- (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 32,
- (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 33, và
- (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 33.

11. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen frdA được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 13,
- (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 13,
- (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 14, và
- (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 14.

12. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen dadX được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 15,
- (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 15,
- (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 16, và
- (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 16.

13. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen brnQ được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 23,
 - (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 23,
 - (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 24, và
 - (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 24.
14. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen gcvB được chọn từ nhóm bao gồm:
- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 31, và
 - (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 31.
15. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen zipA được chọn từ nhóm bao gồm:
- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 19,
 - (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 19,
 - (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 20, và
 - (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 20.
16. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen lpd được chọn từ nhóm bao gồm:
- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 21,
 - (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 21,
 - (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 22, và
 - (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 22.

17. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen *gcvA* được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 29,
- (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 29,
- (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 30, và
- (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 30.

18. Vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 6, trong đó gen *ygaW* được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) phân tử axit nucleic chứa trình tự của SEQ ID NO: 17,
- (b) phân tử axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất bằng 80% với phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 17,
- (c) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 18, và
- (d) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất bằng 60% với polypeptit của SEQ ID NO: 18.

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

20. Phương pháp sản xuất alanin bao gồm bước nuôi cấy một hoặc nhiều vi sinh vật tái tổ hợp theo điểm 1 trong điều kiện cho phép sản xuất alanin.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho một hoặc nhiều vi sinh vật tái tổ hợp phát triển trong thiết bị lên men để thu được canh trường lên men, và
- (b) thu hồi alanin từ canh trường lên men.

Fig. 1

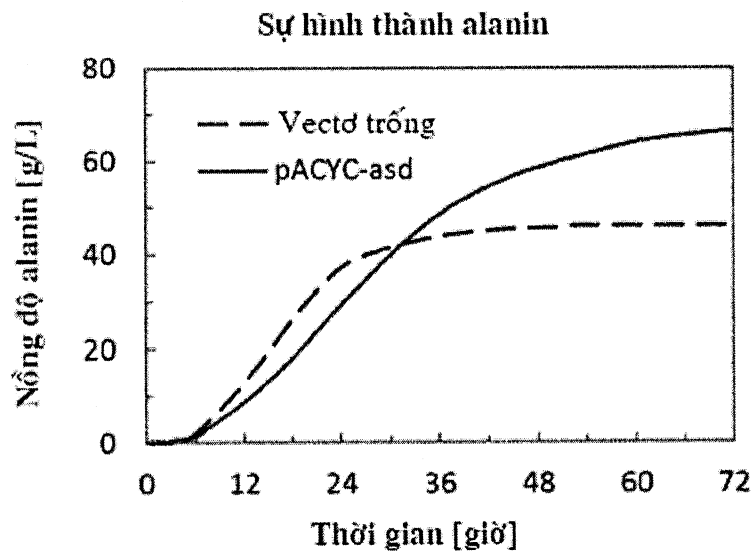
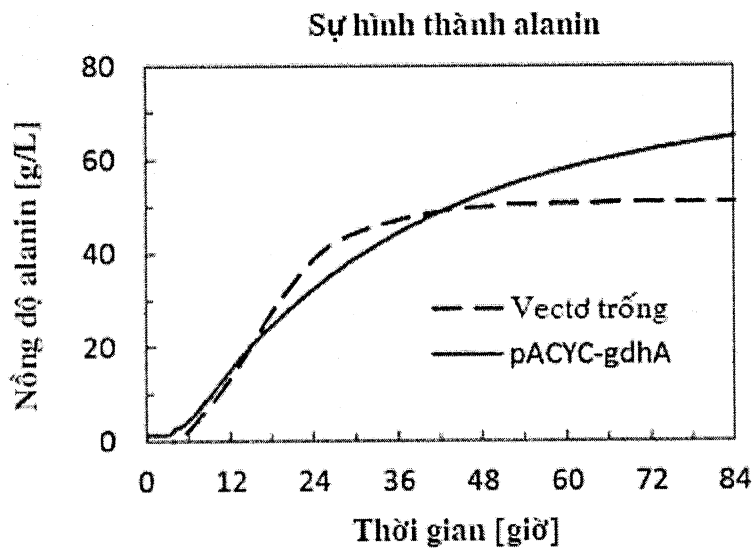


Fig. 2



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BASF SE

<120> VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP CÓ HIỆU SUẤT VÀ/HOẶC NĂNG SUẤT CỦA ALANIN CAO TRONG SẢN XUẤT LÊN MEN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ALANIN TỪ VI SINH VẬT NÀY

<130> 0000078637

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1119

<212> ADN

<213> G.stearothermophilus

<220>

<223> alaD

<400> 1

atgaaaattg gcatccctaa agagattaag aacaatgaaa accgtgtagc aatcaccgccg
60

gcaggtgtta tgactctggt taaagcgggc cacgatgtgt acgtcgaaac cgaagcgggt
120

gccggcagcg gcttcagcga cagcgagtat gagaaggcgg gtgcgggttat tgtgactaag
180

gcggaggacg cttgggcagc cgaaatggtt ctgaagggtga aagaaccgct ggcggaggag
240

tttcgctatt ttcgtccggg tctgattttg ttcacctacc tgcacctggc tgcggccgag
300

gcgctgacca aggcactggt ggagcagaag gttgttggca tcgcgtacga aacggttcaa
360

ctggcgaatg gttccctgcc gctgctgacc cctatgtctg aagttgcggg tcgcatgagc
420

gttcaagtcg gcgctcagtt tctggagaaa ccgcacggtg gcaagggcat tttgctgggt
480

ggtgttccgg gtgtccgccg tggtaaagtg acgatcattg gcggtggtac ggccggtacg
540

aacgcggcca agattgccgt aggtctgggt gcagatgtga ccattctgga catcaacgcg
600

gaacgtttgc gtgagctgga cgacctgttt ggcgaccaag tcaccaccct gatgagcaac
660

agctaccaca tcgcggagtg cgtccgtgaa agcgatttgg tcgttggtgc ggtgctgac
720

ccgggtgcaa aagccccgaa actggtgacc gaggagatgg tccgtagcat gaccccggt
780

tcggttcttg tcgacgtggc aattgaccag ggcggtatct tcgaaaccac cgaccgcgtc
840

acgacccatg atgacccgac ctatgtgaaa catggcgtgg ttcactatgc ggtcgcgaa
900

atgccgggtg cagtgccgcg cacgtccacg ttcgcgctga cgaacgtgac gattccatac
960
gctctgcaga tcgccaataa gggctatcgt gcggcgctgtc tggataatcc ggcattgctg
1020
aaaggcatca ataccctgga tgggtcatatc gttttacgagg ctgtggctgc agcacacaac
1080
atgccgtaca ctgatgtcca tagcttgctg caaggctaa
1119

<210>	2
<211>	372
<212>	PRT
<213>	G.stearothermophilus
<220>	
<223>	alaD

 $\langle 400 \rangle$ 2

Met 1	Lys	Ile	Gly	Ile 5	Pro	Lys	Glu	Ile	Lys 10	Asn	Asn	Glu	Asn	Arg 15	Val
Ala	Ile	Thr	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Thr	Leu	Val	Lys	Ala	Gly	His	Asp
Val	Tyr	Val	Glu	Thr	Glu	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Phe	Ser	Asp	Ser
Glu	Tyr	Glu	Lys	Ala	Gly	Ala	Val	Ile	Val	Thr	Lys	Ala	Glu	Asp	Ala
Trp 65	Ala	Ala	Glu	Met	Val	Leu	Lys	Val	Lys	Glu	Pro	Leu	Ala	Glu	Glu
Phe	Arg	Tyr	Phe	Arg	Pro	Gly	Leu	Ile	Leu	Phe	Thr	Tyr	Leu	His	Leu
Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Leu	Thr	Lys	Ala	Leu	Val	Glu	Gln	Lys	Val	Val
Gly	Ile	Ala	Tyr	Glu	Thr	Val	Gln	Leu	Ala	Asn	Gly	Ser	Leu	Pro	Leu
Leu	Thr	Pro	Met	Ser	Glu	Val	Ala	Gly	Arg	Met	Ser	Val	Gln	Val	Gly
Ala 145	Gln	Phe	Leu	Glu	Lys	Pro	His	Gly	Gly	Lys	Gly	Ile	Leu	Leu	Gly
Gly	Val	Pro	Gly	Val	Arg	Arg	Gly	Lys	Val	Thr	Ile	Ile	Gly	Gly	Gly
Thr	Ala	Gly	Thr	Asn	Ala	Ala	Lys	Ile	Ala	Val	Gly	Leu	Gly	Ala	Asp
Val	Thr	Ile	Leu	Asp	Ile	Asn	Ala	Glu	Arg	Leu	Arg	Glu	Leu	Asp	Asp
Leu	Phe	Gly	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Leu	Met	Ser	Asn	Ser	Tyr	His	Ile
Ala 225	Glu	Cys	Val	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	Val	Val	Gly	Ala	Val	Leu	Ile
Pro	Gly	Ala	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Val	Thr	Glu	Glu	Met	Val	Arg	Ser
Met	Thr	Pro	Gly	Ser	Val	Leu	Val	Asp	Val	Ala	Ile	Asp	Gln	Gly	Gly
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> 3
<211> 269
<212> ADN
<213> E.coli
<220>
<223> Gen khởi đầu ldhA mut

```

```

<400> 3
catagtaaatt tccccaccca gtttaaccgg cggctgattt tcaaacgcga cgacatccag
60
ttcgtgact gtaagttggt gccctttcag ctggccttga aatttaactt tttcgccctg
120
ataacgcagt tgctggatat cagagggttaa tgcgagagag agttttccct gccattcctg
180
ccagggagaa aaaatcagtt tatcgatatt gattttgtaa aatattttta gtagcttaaa
240
tgtgattcaa catcactgga gaaagtctt
269

```

```

<210> 4
<211> 269
<212> ADN
<213> E.coli
<220>
<223> Đoạn gen khởi đầu ldhA mut

```

```

<400> 4
tattgatttt gtaaaatatt tttagtagct taaatgtgat tcaacatcac

```

50

```

<210> 5
<211> 2283
<212> ADN
<213> E.coli
<220>
<223> pflB
<400> 5

```

atgtccgagc ttaatgaaaa gttagccaca gcctgggaag gttttaccaa aggtgactgg
 60
 cagaatgaag taaacgtccg tgacttcatt cagaaaaact acactccgta cgaggggtgac
 120
 gagtccttcc tggctggcgc tactgaagcg accaccaccc tgtgggacaa agtaatggaa
 180
 ggcgttaaac tggaaaaccg cactcacgcg ccagttgact ttgacaccgc tgttgcttcc
 240
 accatcacct ctcacgacgc tggctacatc aacaaagcgt tggaaaaagt tgttggtcta
 300
 cagactgaag ctccgctgaa acgtgctctt atcccgttcg gtggtatcaa aatgatcgag
 360
 ggttcctgca aagcgtacaa ccgcgaactg gacccgatga tcaaaaaaat cttcactgaa
 420
 taccgtaaaa ctcaacaacca gggcgtgttc gacgtttaca ctccggacat cctgcgttgc
 480
 cgtaaataccg gtgttctgac cggctctgcc gatgcttatg gccgtggccg tatcatcggt
 540
 gactaccgtc gcgttgcgct gtacggtatc gactacctga tgaaagacaa atacgctcag
 600
 ttcacctctc tgcaggctga tctgaaaaac ggcgtaaacc tggaacagac tatccgctctg
 660
 cgcaagaaa tcgctgaaca gcaccgcgct ctgggtcaga tgaaagaaat ggctgcgaaa
 720
 tacggctacg acatctctgg tccggctacc aacgctcagg aagctatcca gtggacttac
 780
 ttgggtacc tggctgctgt taagtctcag aacggtgctg caatgtcctt cggtcgtacc
 840
 tccaccttcc tggatgtgta catcgaacgt gacctgaaag ctggcaagat caccgaacaa
 900
 gaagcgcagg aaatggttga ccacctggct atgaaactgc gtatggttcg cttcctgcgt
 960
 actccggaat acgatgaact gttctctggc gacccgatct gggcaaccga atctatcggt
 1020
 ggtatgggcc tcgacggtcg taccctggtt accaaaaaca gttccgttt cctgaacacc
 1080
 ctgtacacca tgggtccgct tccggaaccg aacatgacca ttctgtggtc tgaaaaactg
 1140
 ccgctgaact tcaagaaatt cgccgctaaa gtgtccatcg acacctctt tctgcaatat
 1200
 gagaacgatg acctgatgcg tccggacttc aacaacgatg actacgctat tgcttgctgc
 1260
 gtaagcccga tgatcgttgg taaacaaatg cagttcttcg gtgcgcgtgc aaacctggcg
 1320
 aaaaccatgc tgtacgcaat caacggcggc gttgacgaaa aactgaaaat gcaggttggt
 1380
 ccgaagtctg aaccgatcaa aggcgatgtc ctgaactatg atgaagtgat ggagcgcgatg
 1440
 gatcacttca tggactggct ggctaaacag tacatcactg cactgaacat catccactac
 1500
 atgcacgaca agtacagcta cgaagcctct ctgatggcgc tgcacgaccg tgacgttata
 1560

cgcacccatgg cgtgtggtat cgctgggtctg tccgttgctg ctgactccct gtctgcaatc
 1620
 aaatatgcga aagttaaacc gattcgtgac gaagacggtc tggctatcga cttcgaaatc
 1680
 gaagcgcaat acccgagtt tggtaacaat gatccgctg tagatgacct ggctgttgac
 1740
 ctggtagaac gtttcatgaa gaaaattcag aaactgcaca cctaccgtga cgctatccccg
 1800
 actcagtctg ttctgaccat cacttctaac gttgtgtatg gtaagaaaac tggtaacacc
 1860
 ccagacggtc gtcgtgctgg cgcgccgttc ggaccgggtg ctaacccgat gcacggctgt
 1920
 gaccagaaag gtgctgtagc gtctctgact tccgttgcta aactaccgtt tgcttacgt
 1980
 aaagatggta tctcctacac cttctctatc gttccgaacg cactgggtaa agacgacgaa
 2040
 gttcgtaaga ccaacctggc tgggtctgatg gatggttact tccaccacga agcatccatc
 2100
 gaaggtggtc agcacctgaa cgtaaacgtg atgaaccgtg aaatgctgct cgacgcgatg
 2160
 gaaaaccggg aaaaatatcc gcagctgacc atccgtgtat ctggctacgc agtacgtttc
 2220
 aactcgctga ctaaagaaca gcagcaggac gttattactc gtaccttcac tcaatctatg
 2280
 taa
 2283

<210> 6
 <211> 760
 <212> PRT
 <213> E.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> E.coli
<220>
<223> adhE
```

```
<400>      7
atggctgtta ctaatgtcgc 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 ctaacccgac ttcaactgct
360
atcttcaaat cgctgatcag tctgaagacc cgtaacgcca ttatcttctc cccgcacccg
420
cgtgcaaaaag atgccaccaa caaagcggct gatatcgttc tgcaggctgc tatcgctgcc
480
```

ggtgctccga aagatctgat cggctggatc gatcaacctt ctgttgaact gtctaacgca
 540
 ctgatgcacc acccagacat caacctgatc ctgcgcgactg gtgggtccggg catgggttaa
 600
 gccgcataca gctccggtaa accagctatc ggtgtaggcg cgggcaacac tccagttggt
 660
 atcgaatgaaa ctgctgatat caaacgtgca gttgcactctg tactgatgtc caaaccttc
 720
 gacaacggcg taatctgtgc ttctgaacag tctgttggtg ttgttgactc tgtttatgac
 780
 gctgtacgtg aacgttttgc aaccacggc ggctatctgt tgcagggtaa agagctgaaa
 840
 gctgttcagg atgttatcct gaaaaacggg gcgctgaacg cggctatcgt tggtcagcca
 900
 gcctataaaa ttgctgaact ggcaggcttc tctgtaccag aaaacaccaa gattctgac
 960
 ggtgaagtga ccgttggtga tgaaagcgaa ccgttcgcac atgaaaaact gtccccgact
 1020
 ctggcaatgt accgcgctaa agatttcgaa gacgcggtag aaaaagcaga gaaactgggt
 1080
 gctatgggcg gtatcggta tacctcttgc ctgtacactg accaggataa ccaaccggct
 1140
 cgcgtttctt acttcggta gaaaatgaaa acggctcgta tcttgattaa caccacggc
 1200
 tctcagggtg gtatcggta cctgtataac ttcaaacctc caccttcctt gactctgggt
 1260
 tgtggttctt ggggtggtaa ctccatctct gaaaacgttg gtccgaaaca cctgatcaac
 1320
 aagaaaaccg ttgctaagcg agctgaaaac atgttggtggc acaaacttcc gaaatctatc
 1380
 tacttccgcc gtggctccct gccaatcgcg ctggatgaag tgattactga tggccacaaa
 1440
 cgtgcgctca tcgtgactga ccgcttcctg ttcaacaatg gttatgctga tcagatcact
 1500
 tccgtactga aagcagcagg cgttgaaact gaagtcttct tcgaagtaga agcggacccg
 1560
 accctgagca tcgttcgtaa aggtgcagaa ctggcaaact cttcaaacc agacgtgatt
 1620
 atcgcgctgg gtgggtggtc cccgatggac gccgcgaaga tcatgtgggt tatgtacgaa
 1680
 catccggaaa ctacttcga agagctggcg ctgcgcttta tggatatccg taaacgtatc
 1740
 tacaagttcc cgaaaatggg cgtgaaagcg aaaatgatcg ctgtcaccac cacttctggt
 1800
 acaggttctg aagtcactcc gtttgcggtt gtaactgacg acgctactgg tcagaaatat
 1860
 ccgctggcag actatgcgct gactccggat atggcgattg tcgacgcaa cctggttatg
 1920
 gacatgccga agtccctgtg tgctttcggg ggtctggacg cagtaactca cgccatggaa
 1980
 gcttatgttt ctgtactggc atctgagttc tctgatggtc aggtcttgca ggcactgaaa
 2040

ctgctgaaag aatatctgcc agcgtcctac cacgaagggt ctaaaaatcc ggtagcgcgt
 2100
 gaacgtgttc acagtgcagc gactatcgcg ggtatcgcg ttgcgaacgc cttcctgggt
 2160
 gtatgtcact caatggcgca caaactgggt tcccagttcc atattccgca cggctctggca
 2220
 aacgccctgc tgatttgtaa cgttattcgc tacaatgcga acgacaaccc gaccaagcag
 2280
 actgcattca gccagtatga ccgtccgcag gctcgccgctc gttatgctga aattgccgac
 2340
 cacttggggtc tgagcgcacc gggcgaccgt actgctgcta agatcgagaa actgctggca
 2400
 tggctggaaa cgctgaaagc tgaactgggt attccgaaat ctatccgtga agctggcggt
 2460
 caggaagcag acttcctggc gaacgtggat aaactgtctg aagatgcgtt cgatgaccag
 2520
 tgcaccggcg ctaaccgcg ttaccgcgtg atctccgagc tgaaacagat cctgctggat
 2580
 acctactacg gtcgtgatta tgtagaaggt gaaactgcag cgaaaaaaga agccgctccg
 2640
 gctaaagctg agaaaaaagc gaaaaaatcc gcttaa
 2676

<210> 8
 <211> 891
 <212> PRT
 <213> E.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	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> E.coli

<220>

<223> ldhA

<400> 9

atgaaactcg ccgtttatag cacaaaacag tacgacaaga agtacctgca acaggtgaac
60

gagtcctttg gctttgagct ggaatttttt gactttctgc tgacggaaaa aaccgctaaa
120

actgccaatg gctgcgaagc ggtatgtatt ttcgtaaacg atgacggcag ccgcccgggtg
 180
 ctggaagagc tgaaaaagca cggcgttaaa tatatcgccc tgcgctgtgc cggtttcaat
 240
 aacgtcgacc ttgacgcggc aaaagaactg gggctgaaag tagtccgtgt tccagcctat
 300
 gatccagagg ccgttgctga acacgccatc ggtatgatga tgacgctgaa ccgccgtatt
 360
 caccgcgcgt atcagcgtac ccgtgacgct aacttctctc tggaaggctc gaccggcctt
 420
 actatgtatg gcaaaacggc aggcgttatc ggtaccggta aaatcgggtg ggcgatgctg
 480
 cgcattctga aagggttttg tatgctctg ctggcgcttc atccgtatcc aagtgcagcg
 540
 gcgctggaac tcggtgtgga gtatgtcgat ctgccaaacc tgttctctga atcagacgtt
 600
 atctctctgc actgcccgt gacaccggaa aactaccatc tgttgaacga agccgccttc
 660
 gatcagatga aaaatggcgt gatgatcgtc aataccagtc gcggtgcatt gattgattct
 720
 caggcagcaa ttgaagcgt gaaaaatcag aaaattggtt cgttggttat ggacgtgtat
 780
 gagaacgaac gcgatctatt ctttgaagat aaatccaacg acgtaattca ggatgacgta
 840
 ttccgtcgcc tgtctgcctg ccacaacgtg ctatttaccg ggcaccagge attcctgaca
 900
 gcagaagctc tgaccagtat ttctcagact acgctgcaaa acttaagcaa tctggaaaaa
 960
 ggcgaaacct gcccgaaacga actgggttaa
 990

<210> 10
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> E.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
      245                      250                      255
Met Asp Val Tyr Glu Asn Glu Arg Asp Leu Phe Phe Glu Asp Lys Ser
      260                      265                      270
Asn Asp Val Ile Gln Asp Asp Val Phe Arg Arg Leu Ser Ala Cys His
      275                      280                      285
Asn Val Leu Phe Thr Gly His Gln Ala Phe Leu Thr Ala Glu Ala Leu
      290                      295                      300
Thr Ser Ile Ser Gln Thr Thr Leu Gln Asn Leu Ser Asn Leu Glu Lys
305                      310                      315                      320
Gly Glu Thr Cys Pro Asn Glu Leu Val
      325

```

```

<210> 11
<211> 2145
<212> ADN
<213> E.coli
<220>
<223> pta

```

```

<400> 11
gtgtcccgtga ttattatgct gatccctacc ggaaccagcg tcggtctgac cagcgtcagc
60
cttggcgtga tccgtgcaat ggaacgcaaa ggcgttcgctc tgagcgtttt caaacctatc
120
gctcagccgc gtaccggtgg cgatgcgccc gatcagacta cgactatcgt gcgtgcgaac
180
tcttccacca cgacggccgc tgaaccgctg aaaatgagct acgttgaagg tctgctttcc
240
agcaatcaga aagatgtgct gatggaagag atcgctcgcaa actaccacgc taacaccaaa
300
gacgctgaag tcgttctggt tgaaggctctg gtcccgcacac gtaagcacca gtttgcccag
360

```

tctctgaact acgaaatcgc taaaacgctg aatgcggaaa tcgtcttcgt tatgtctcag
420
ggcactgaca ccccggaaca gctgaaagag cgtatcgaac tgacccgcaa cagcttcggc
480
ggtgccaaaa acaccaacat caccggcggtt atcgттаааа aactgaacgc accggttgat
540
gaacagggtc gtactcgccc ggatctgtcc gagattttcg acgactcttc caaagctaaa
600
gtaaacaatg ttgatccggc gaagctgcaa gaatccagcc cgctgccggt tctcggcgct
660
gtgccgtgga gctttgacct gatcgcgact cgtgcgatcg atatggctcg ccacctgaat
720
gcgaccatca tcaacgaagg cgacatcaat actcgccgcg ttaaатccgt cactttctgc
780
gcacgcagca ttccgcacat gctggagcac ttccgtgccg gttctctgct ggtgacttcc
840
gcagaccgtc ctgacgtgct ggtggccgct tgccctggcag ccatgaacgg cgtagaaatc
900
ggtgccctgc tgctgactgg cggtacgaa atggacgcgc gcattttctaa actgtgcgaa
960
cgtgctttcg ctaccggcct gccgggtattt atggtgaaca ccaacacctg gcagacctct
1020
ctgagcctgc agagcttcaa cctggaagtt ccggttgacg atcacgagcg tatcgagaaa
1080
gttcaggaat acgttgctaa ctacatcaac gctgactgga tcgaatctct gactgccact
1140
tctgagcgca gccgtcgtct gtctccgcct gcgttccggt atcagctgac tgaacttgcg
1200
cgcaaagcgg gcaaacgtat cgtactgccg gaagggtgacg aaccgcgtac cgttaaagca
1260
gccgtatct gtgctgaacg tggtatcgca acttgcgtag tgctgggtaa tccggcagag
1320
atcaaccgtg ttgcagcgtc tcagggtgta gaactgggtg cagggtattga aatcggtgat
1380
ccagaagtgg ttcgcgaaag ctatgttggg cgtctgggtc aactgcgtaa gaacaaaggc
1440
atgaccgaaa ccgttgcccg cgaacagctg gaagacaacg tgggtgctcg tacgctgatg
1500
ctggaacagg atgaagttga tggctctggt tccggtgctg ttcacactac cgcaaacacc
1560
atccgtccgc cgctgcagct gatcaaaact gcaccgggca gctccctggg atcttccgtg
1620
ttcttcatgc tgctgccgga acagggttac gtttacgggt actgtgcgat caaccggat
1680
ccgaccgctg aacagctggc agaaatcgcg attcagtcgg ctgattccgc tgcggccttc
1740
ggtatcgaac cgcgcgttgc tatgctctcc tactccaccg gtacttctgg tgcaggtagc
1800
gacgtagaaa aagttcgcga agcaactcgt ctggcgagc aaaaacgtcc tgacctgatg
1860
atcgacgggtc cgctgcagta cgacgctgcg gtaatgggtg acgttgcgaa atccaaagcg
1920

ccgaactctc cggttgcagg tcgcgctacc gtgttcatct tcccggatct gaacaccggt
 1980
 aacaccacct acaaagcggg acagcgttct gccgacctga tctccatcgg gccgatgctg
 2040
 cagggtatgc gcaagccggg taacgacctg tcccgtggcg cactgggtga cgatatcgct
 2100
 tacaccatcg cgctgactgc gattcagtct gcacagcagc agtaa
 2145

<210> 12
 <211> 714
 <212> PRT
 <213> E.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
			500					505					510		
Ala	Val	His	Thr	Thr	Ala	Asn	Thr	Ile	Arg	Pro	Pro	Leu	Gln	Leu	Ile
		515					520					525			
Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Ser	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Phe	Met	Leu
	530					535					540				
Leu	Pro	Glu	Gln	Val	Tyr	Val	Tyr	Gly	Asp	Cys	Ala	Ile	Asn	Pro	Asp
545					550					555					560
Pro	Thr	Ala	Glu	Gln	Leu	Ala	Glu	Ile	Ala	Ile	Gln	Ser	Ala	Asp	Ser
				565					570					575	
Ala	Ala	Ala	Phe	Gly	Ile	Glu	Pro	Arg	Val	Ala	Met	Leu	Ser	Tyr	Ser
			580					585					590		
Thr	Gly	Thr	Ser	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Lys	Val	Arg	Glu	Ala
		595				600						605			
Thr	Arg	Leu	Ala	Gln	Glu	Lys	Arg	Pro	Asp	Leu	Met	Ile	Asp	Gly	Pro
	610					615					620				
Leu	Gln	Tyr	Asp	Ala	Ala	Val	Met	Ala	Asp	Val	Ala	Lys	Ser	Lys	Ala
625															

Leu Thr Ala Ile Gln Ser Ala Gln Gln Gln
 705 710

<210> 13
 <211> 1809
 <212> ADN
 <213> E.coli
 <220>
 <223> frdA

<400> 13
 gtgcaaacct ttcaagccga tcttgccatt gtaggcgccg gtggcgcggg attacgtgct
 60
 gcaattgctg ccgcgagggc aaatccgaat gcaaaaatcg cactaatctc aaaagtatac
 120
 ccgatgcgta gccataccgt tgctgcagaa gggggctccg ccgctgtcgc gcaggatcat
 180
 gacagcttcg aatatcactt tcacgataca gtagcgggtg gcgactgggt gtgtgagcag
 240
 gatgtcgtgg attatttcgt ccaccactgc ccaaccgaaa tgaccaact ggaactgtgg
 300
 ggatgcccat ggagccgtcg cccggatggt agcgtcaacg tacgtcgctt cggcggcatg
 360
 aaaatcgagc gcacctgggt cgccgccgat aagaccggct tccatatgct gcacacgctg
 420
 ttccagacct ctctgcaatt cccgcagatc cagcgttttg acgaacattt cgtgctggat
 480
 attctgggtg atgatggtca tgttcgcggc ctggtagcaa tgaacatgat ggaaggcacg
 540
 ctggtgcaga tccgtgctaa cgcggtcggt atggctactg gcggtgcggg tcgcgtttat
 600
 cgttacaaca ccaacggcgg catcgttacc ggtgacggta tgggtatggc gctaagccac
 660
 ggcgttccgc tgcgtgacat ggaattcggt cagtatcacc caaccggtct gccaggttcc
 720
 ggtatcctga tgaccgaagg ctgccgcggt gaaggcggtg ttctgggtcaa caaaaatggc
 780
 taccgttatc tgcaagatta cggcatgggc ccggaaactc cgctgggcga gccgaaaaac
 840
 aaatatatgg aactgggtcc acgcgacaaa gtttctcagg ctttctggca cgaatggcgt
 900
 aaaggcaaca ccatctccac gccgcgtggc gatgtggttt atctcgacct gcgtcacctc
 960
 ggcgagaaaa aactgcatga acgtctgccg ttcattctgcg aactggcgaa agcgtacgtt
 1020
 ggcgtcgatc cggttaaaga accgattccg gtacgtccga ccgcacacta caccatgggc
 1080
 ggtatcgaaa ccgatcagaa ctgtgaaacc cgcattaaag gtctgttcgc cgtgggtgaa
 1140
 tgttcctctg ttggtctgca cggtgcaaac cgtctggggt ctaactccct ggcggaactg
 1200

gtggtcttcg gccgtctggc cggatgaacaa gcgacagagc gtgcagcaac tgccggtaat
 1260
 ggcaacgaag cggcaattga agcgcaggca gctggcggtg aacaacgtct gaaagatctg
 1320
 gttaaccagg atggcgggcga aaactgggcg aagatccgcg acgaaatggg cctggcaatg
 1380
 gaagaagggt gcggtatcta ccgtacgccg gaactgatgc agaaaacat cgacaagctg
 1440
 gcagagctgc aggaacgctt caagcgcgtg cgcatacccg acacctccag cgtgttcaac
 1500
 accgacctgc tctacacat tgaactgggc cacggtctga acgttgctga atgtatggcg
 1560
 cactccgcaa tggcacgtaa agagtccgcg ggcgcacacc agcgtctgga cgaagggtgc
 1620
 accgagcgtg acgacgtcaa cttcctcaaa cacaccctcg cttccgcga 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> E.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	Gly	Gly	Ile	Glu	Thr	Asp	Gln	Asn	Cys		
			355				360					365					
Glu	Thr	Arg	Ile	Lys	Gly	Leu	Phe	Ala	Val	Gly	Glu	Cys	Ser	Ser	Val		
			370			375					380						
Gly	Leu	His	Gly	Ala	Asn	Arg	Leu	Gly	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala	Glu	Leu		
385					390					395				400			
Val	Val	Phe	Gly	Arg	Leu	Ala	Gly	Glu	Gln	Ala	Thr	Glu	Arg	Ala	Ala		
				405					410					415			
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> 1071
 <212> ADN
 <213> E. coli
 <220>
 <223> dadX

<400> 15
 atgaccgctc cgatacaggc cagcctcgat ctgcaggcat taaaacagaa tctgtccatt
 60
 gtccgccagg ccgcgccgca cgcgcgcgctc tggtcggtgg taaaagcgaa cgcttacggg
 120
 catggtattg 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 gtgcattttt
 480
 gccgaagcgg aacatcctga tggaatttcc agcgcgatgg cgcgtattga gcaggcggcg
 540
 gaagggtgg agtgtcggcg ttcgttgtcc aattcggcgg cgactctgtg gcacccggaa
 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 gggtagccg acggttatcc gcgccacgcg
 840
 cctaccggta cccctgtttt agtggacggc gtgcgcacca tgacggtggg gaccgtctcg
 900
 atggatatgc tagcggtcga tttaacgcct tgcccgagg cggggattgg tacgccggtt
 960
 gagctgtggg gcaaggagat caaaattgat gatgtcgccg ccgctgccgg aacggtgggc
 1020
 tatgagttga tgtgcgcgct ggcgttacgc gtcccgggtg tgacagtgta a
 1071

<210> 16
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> E. coli
 <220>

<223> dadX

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 450

<212> ADN
 <213> E.coli
 <220>
 <223> ygaW

<400> 17
 atgttctcac cgcagtcacg cttgctcat gcagttgcag atacgttcgc gatggttgtt
 60
 tactgttctg tcgtgaacat gtgtattgaa gttttcctct ccggaatgag cttcgaacag
 120
 tctttttatt ccagattggg agcgattccg gtgaacatct taattgcatg gccatacggg
 180
 atgtaccgtg atctgtttat gcgcgcggca cgcaaagtta gcccgtcggg ctggataaaa
 240
 aatctggctg atatcctggc ttatgtgacg ttccagtcac cgggtgatgt ggcgatcttg
 300
 ttagtgggtg gcgcagactg gcatcagatt atggcggcgg tcagttcaaa catcgttgtt
 360
 tcgatgttga tggggggcgg ttatggctac ttcctcgatt attgccgccg actgtttaaa
 420
 gtcagccggt accagcaggt aaaagcctga
 450

<210> 18
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> E.coli
 <220>
 <223> ygaW

<400> 18

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> 19
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> E.coli
 <220>
 <223> zipA

<400> 19
 atgatgcagg atttgcgctct gatattaatc attggttgcg cgatcgccat aatcgcttta
 60
 ctggtacatg gtttctggac cagccgtaaa gaacgatctt ctatgttccg cgatcggcca
 120
 ttaaaacgaa tgaagtcaaa acgtgacgac gattcttatg acgaggatgt cgaagatgat
 180
 gagggcggtg gtgagggttcg tgttcaccgc gtgaatcatg ccccggttaa cgctcaggag
 240
 catgaggctg ctcgctccgtc gccgcaacac cagtaccaac cgccttatgc gtctgcgcag
 300
 ccgcgtcaac cgggtccagca gccgcctgaa gcgcaggtag cgcgcgaaca tgctccgcgt
 360
 ccagcgcagc cgggtgcagca gcctgcctat cagcgcgagc ctgaacagcc gttgcagcag
 420
 ccagtttctgc cacagggtcgc gccagcgccg cagcctgtgc attcagcacc gcaaccggca
 480
 caacaggctt tccagcctgc agaaccgcta gcggcaccac agcctgagcc tgtagcggaa
 540
 ccggctccag ttatggataa accgaagcgc aaagaagcgg tgattatcat gaacgtcgcg
 600
 gcgcatcacg gtagcgagct aaacggtgaa ctgcttctta acagcattca acaagcgggc
 660
 ttcatttttg gcgatatgaa tatttaccat cgtcatctta gcccggtagg cagcggcccc
 720
 gcgttattca gcctggcgaa tatggtgaaa ccgggaacct ttgatcctga aatgaaggat
 780
 ttcactactc cgggtgtcac catctttatg caggtaccgt cttacggtga cgagctgcag
 840
 aacttcaagc tgatgctgca atctgcgcag catattgccg atgaagtggg cgggtgtcgtg
 900
 cttgacgata agcgccgtat gatgactccg cagaaattgc gcgagtagca ggacatcatc
 960
 cgcgaagtca aagacgcaa cgcctga
 987

<210> 20
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> E.coli
 <220>
 <223> zipA

<400> 20

```

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> 21

<211> 1425

<212> ADN

<213> E.coli

<220>

<223> lpd

<400> 21

atgagtactg aaatcaaaac tcaggtcgtg gtacttgggg caggccccgc aggttactcc
60

gctgccttcc gttgcgctga tttaggtctg gaaaccgtaa tcgtagaacg ttacaacacc
 120
 cttggcggtg tttgcctgaa cgtcggctgt atcccttcta aagcactgct gcacgtagca
 180
 aaagttatcg aagaagccaa agcgctggct gaacacggta tcgtcttcgg cgaaccgaaa
 240
 accgatattg acaagattcg tacctggaaa gagaaagtga tcaatcagct gaccgggtggt
 300
 ctggctggta tggcgaaagg ccgcaaagtc aaagtgggtca acggtctggg taaatttacc
 360
 ggggctaaca ccctggaagt tgaaggtgag aacggtaaaa ccgtgatcaa cttcgacaac
 420
 gcgatcattg cagcgggttc tcgcccgatc caactgccgt ttattccgca tgaagatccg
 480
 cgtatctggg actccactga cgcgctggaa ctgaaagaag taccagaacg cctgctggta
 540
 atgggtggcg gtatcatcgg tctggaaatg ggcaccgtat accacgcgct gggttcacag
 600
 attgacgtgg ttgaaatggt cgaccagggt atcccggcag ctgacaaaga catcgttaaa
 660
 gtcttcacca agcgtatcag caagaaattc aacctgatgc tggaaccaa agttaccgcc
 720
 gttgaagcga aagaagacgg tatttatgtg acgatggaag gcaaaaaagc acccgctgaa
 780
 ccgcagcgtt acgacgccgt gctggtagcg attggctcgtg tgccgaacgg taaaaacctc
 840
 gacgcaggca aagctggcgt ggaagtggac gaccgtgggt tcatccgcgt tgacaaacag
 900
 ctgcgtacca acgtaccgca catctttgct atcggcgata tcgtcgggtca gccgatgctg
 960
 gcacacaaag gtgttcacga aggtcacgtt gccgctgaag ttatcgccgg taagaaacac
 1020
 tacttcgatc cgaaagttat cccgtccatc gcctataaccg aaccagaagt tgcattgggt
 1080
 ggtctgactg agaaagaagc gaaagagaaa ggcattcagct atgaaaccgc caccttcccg
 1140
 tgggctgctt ctggctcgtgc tatcgcttcc gactgcgcag acggtatgac caagctgatt
 1200
 ttcgacaaag aatctcaccg tgtgatcggg ggtgcgattg tcggtaccaa cggcggcgag
 1260
 ctgctgggtg aaatcggcct ggcaatcgaa atgggttgtg atgctgaaga catcgactg
 1320
 accatccacg cgcacccgac tctgcacgag tctgtggggc tggcggcaga agtggttcgaa
 1380
 ggtagcatta ccgacctgcc gaacccgaaa gcgaagaaga agtaa
 1425

<210> 22
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> E.coli
 <220>
 <223> lpd

<400> 22

```

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

```

[illegible]

```
<210> 23
<211> 1320
<212> ADN
<213> E. coli
<220>
<223> brnQ
```

<400> 23

atgaccatc	aattaagatc	gcgcgatatc	atcgctctgg	gctttatgac	atttgcgttg	60
ttcgtcggcg	caggtaacat	tattttccct	ccaatggtcg	gcttgcaggc	aggcgaacac	120
gtctggactg	cggcattcgg	cttcctcatt	actgccgttg	gcctgccggt	attaacggta	180
gtggcgctgg	caaaagttgg	cggcggtggt	gacagcctca	gcacgccaat	cggtaaagtc	240
gctggcgctgc	tgctggcaac	ggtttgttac	ctggcggtgg	ggccgctttt	cgctacgccg	300
cgtacagcta	cggtttccct	tgaagtggg	attgcgccgc	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	tggcgggtgt	tggctcgact	720
ctgctgtacc	tggcgctggt	ccgtctgggt	tcagacagcg	cgtcgctggt	cgatcagtct	780
gcaaacggcg	ctgctattct	gcatgcttac	gttcagcaca	cctttggcgg	cggcggtagc	840
ttcctgctgg	cggcggttaat	cttcacgcgc	tgcttggtaa	cggcagttgg	cctgacctgt	900
gcttgtgcag	aattctttgc	ccagtacgta	ccgctctctt	atcgtagcgt	ggtgtttatc	960
ctcggcggct	tctcgatggt	ggtttctaac	ctcggcttaa	gccagctgat	ccagatctcc	1020
gtaccggtgc	tgaccgctat	ttatccgcgc	tgtatcgcac	tggttgatt	aagttttaca	1080
cgctcatggt	ggcataattc	gtccgcgctg	attgctccgc	cgatgtttat	cagcctgctt	1140
tttggtattc	tcgacgggat	caaagcatct	gcattcagcg	atatcttacc	gtcctgggcg	1200
cagcgtttac	cgctggccga	acaaggtctg	gcgtggttaa	tgccaacagt	ggtgatggtg	1260
gttctggcca	ttatctggga	tcgcgcggca	ggtcgtcagg	tgacctccag	cgctcactaa	1320

```
<210> 24
<211> 439
<212> PRT
<213> E. coli
<220>
<223> brnQ
```

<400> 24

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> 25

<211> 1104

<212> ADN

<213> E. coli

<220>

<223> asd

<400> 25

atgaaaaaatg	ttggttttat	cggtcggcgc	ggtatggtcg	gctccgttct	catgcaacgc	60
atggttgaag	agcgcgactt	cgacgccatt	cgccctgtct	tcttttctac	ttctcagctt	120
ggccaggctg	cgccgtcttt	tggcggaacc	actggcacac	ttcaggatgc	ctttgatctg	180
gaggcgctaa	aggccctcga	tatcattgtg	acctgtcagg	gcggcgatta	taccaacgaa	240
atctatccaa	agcttcgtga	aagcggatgg	caaggttact	ggattgacgc	agcatcgtct	300
ctgcgcatga	aagatgacgc	catcatcatt	cttgaccccg	tcaatcagga	cgtcattacc	360
gacggattaa	ataatggcat	caggactttt	gttggcggtg	actgtaccgt	aagcctgatg	420
ttgatgtcgt	tgggtggttt	attcgccaat	gatcttggtg	attgggtgtc	cgttgcaacc	480
taccaggccg	cttccggcgg	tggcgcgcga	catatgcgtg	agttattaac	ccagatgggc	540
catctgtatg	gccatgtggc	agatgaactc	gcgaccccg	cctctgctat	tctcgatata	600
gaacgcaaag	tcacaacctt	aacccgtagc	ggtgagctgc	cggtggataa	ctttggcgtg	660
ccgctggcgg	gtagcctgat	tccgtggatc	gacaaacagc	tcgataacgg	tcagagccgc	720
gaagagtggg	aagggcaggc	ggaaaccaac	aagatcctca	acacatcttc	cgtaattccg	780
gtagatgggt	tatgtgtgcg	tgtcggggca	ttgcgctgcc	acagccaggc	attcactatt	840
aaattgaaaa	aagatgtgtc	tattccgacc	gtggaagaac	tgctggctgc	gcacaatccg	900
tgggcgaaaag	tcgttccgaa	cgatcgggaa	atcactatgc	gtgagctaac	cccagctgcc	960
gttaccggca	cgctgaccac	gccggtaggc	cgctgcgta	agctgaatat	gggaccagag	1020
ttcctgtcag	cctttaccgt	gggcgaccag	ctgctgtggg	gggccgcgga	gccgctgcgt	1080
cggatgcttc	gtcaactggc	gtaa				1104

<210> 26

<211> 367

<212> PRT

<213> E. coli

<220>

<223> asd

<400> 26

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

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

```
<210> 27
<211> 1026
<212> ADN
<213> E. coli
<220>
<223> lpxD bị đột biến
```

<400> 27

atgccttcaa	ttcgactggc	tgatttagcg	cagcagttgg	atacagaact	acacggtgat	60
ggcgaatcgc	tcatcaccgc	cgttgcgtcc	atgcaatctg	cacaaacagg	tcacattacg	120
ttcatggtta	acccaaaata	cgtgagcat	ttaggcttgt	gccaggcgtc	cgcggttgtc	180
atgaccagg	acgatcttcc	tttcgcgaaa	agtgccgcgc	tggtagttaa	gaatccctac	240
ctgacttacg	cgcgcattgc	gcaaatttta	gataccacgc	cgcagccgcg	gcagaacatt	300
gcacccagt	cggatgatcg	cgcgacggcg	aagctgggta	acaacgtatc	gattggcgct	360
aacgcggtga	ttgagtcg	cgttgaactg	ggcgataacg	tgattatcgg	tgccggttgc	420
ttcgtaggta	aaaacagcaa	aatcggtgca	ggttcgcgtc	tctgggcgaa	cgtaaccatt	480
taccatgaga	tccagatcgg	tcagaattgc	ctgatccagt	ccggaacagt	ggtaggcgca	540
gacggctttg	gttatgccaa	cgatcgtggg	aactgggtga	agatcccaca	gattggtcgc	600
gtaattattg	gcgatcgcgt	ggagatcggg	gcctgcacaa	ccatcgatcg	cggcgcgctg	660
gatgacacta	ttattggcaa	tggcgtgata	attgataacc	agtgccagat	tgcacataac	720


```

gtcgtgattg gcgacaatac ggcgggttgcc ggtggcggtca ttatggcggg cagcctgaaa 780
attggtcggt actgcatgat cggcgggagcc agcgtaatca acgggcatat ggaaatatgc 840
gacaaagtga cggttacggg catgggtatg gtgatgcgtc ccatcactga accaggcgtc 900
tattcctcag gcattccgct gcaacccaac aaagtctggc gcaaaaccgc tgcactgggtg 960
atgaacattg atgacatgag caagcgtctg aaatcgcttg agcgcaagggt taatcaacaa 1020
gactaa 1026

```

<210> 28

<211> 341

<212> PRT

<213> E. coli

<220>

<223> lpxD bị đột biến

<400> 28

```

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> 29
<211> 918
<212> ADN
<213> E. coli
<220>
<223> gcvA

```

```

<400> 29

```

```

atgtctaaac gattaccacc gctaaatgcc ttacgagttt ttgatgccgc agcacgccat      60
ttaagtttca ctgcgcgagc agaagagctt tttgtgaccc aggccgcagt aagtcaccaa      120
atcaagtctc ttgaggattt tctggggcta aaactgttcc gccgccgtaa tcgttcactc      180
ctgctgaccg aggaagggtca aagctatttc ctcgatatca aagagatatt ttcgcaatta      240
accgaagcga cgcgtaaact ccaggcccggt agcgccaagg gggcgttgac ggtcagttta      300
ctccccagtt tcgccattca ttggttggtt ccgcgacttt ccagctttaa ttcagcttat      360
ccgggaattg acgttcgaat ccaggcggtt gatcgtcagg aagataagct ggcggtgat      420
gttgatgtgg cgatatctta tggtcggggc aactggccgg ggctacgggt ggaaaaactg      480
tacgccgaat atttattgcc ggtgtgttcg ccgctactgc tgacaggcga aaaacccttg      540
aagaccccgg aagatctggc taaacatacg ttattacatg atgcgtcacg ccgtgactgg      600
cagacatata cccgacagtt ggggttaaat catatcaacg ttcagcaagg gccaattttt      660
agtcatagcg ccatggtgct gcaagcggct attcacgggc agggagtggc gctggcaaat      720
aacgtgatgg cgcaatctga aatcgaggcc ggacgtcttg tttgcccggt taatgatgtt      780
ctggtcagta aaaacgcttt ttatctggtt tgtcatgaca gccaggcaga actgggtaaa      840
atagccgcct ttcgccaatg gatcctggcg aaagccgctg ctgaacaaga aaaattccgc      900
tttcgttatg aacaataa

```

```

<210> 30
<211> 305
<212> PRT
<213> E. coli
<220>
<223> gcvA

```

```

<400> 30

```

```

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> 31
 <211> 206
 <212> ADN
 <213> E. coli
 <220>
 <223> gcvB

<400> 31

acttcctgag	ccggaacgaa	aagttttatc	ggaatgcgtg	ttctggtgaa	cttttggcct	60
acggttgtga	tggtgtgttg	ttgtgtttgc	aattggtctg	cgattcagac	catggttagca	120
aagctacctt	ttttcacttc	ctgtacattt	accctgtctg	tccatagtga	ttaatgtagc	180
accgcctaata	tgcggtgctt	tttttt				206

<210> 32
 <211> 1203
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<220>
 <223> ackA

<400> 32

atgtcgagta agttagtact ggttctgaac tgcggtagtt cttcactgaa atttgccatc
 60
 atcgaatgcag taaatggtga agagtacctt tctgggttag ccgaatgttt ccacctgccc
 120
 gaagcacgta tcaaattggaa aatggacggc aataaacagg aagcggcttt aggtgcaggc
 180
 gccgctcaca gcgaagcgct caactttatc gttaatacta ttctggcaca aaaaccagaa
 240
 ctgtctgcgc agctgactgc tatcgggtcac cgtatcgtac acggcggcga aaagtatacc
 300
 agctccgtag tgatcgaatga gtctgttatt cagggtatca aagatgcagc ttcttttgca
 360
 ccgctgcaca acccggctca cctgatcggc atcgaagaag ctctgaaatc tttcccacag
 420
 ctgaaagaca aaaacgttgc tgtatttgac accgcgttcc accagactat gccggaagag
 480
 tcttacctct acgccctgcc ttacaacctg tacaagagc acggcatccg tcgttacggc
 540
 gcgcacggca ccagccactt ctatgtaacc caggaagcgg caaaatgct gaacaaaccg
 600
 gtagaagaac tgaacatcat cacctgccac ctgggcaacg gtggttccgt ttctgctatc
 660
 cgcaacggta aatgcgttga cacctctatg ggctgaccc cgctggaagg tctggtcatg
 720
 ggtaccggtt ctggtgatat cgatccggcg atcatcttcc acctgcacga caccctgggc
 780
 atgagcgttg acgcaatcaa caaactgctg accaaagagt ctggcctgct gggctctgacc
 840
 gaagtgaaca gcgactgccg ctatgttgaa gacaactacg cgacgaaaga agacgcgaag
 900
 cgcgcaatgg acgtttactg ccaccgcctg gcgaaatata tcggtgccta cactgcgctg
 960
 atggatggtc gtctggacgc tgttgtattc actggtggta tcggtgaaaa tgccgcaatg
 1020
 gttcgtgaac tgtctctggg caaactgggc gtgctgggct ttgaagttga tcatgaacgc
 1080
 aacctggctg cacgtttcgg caaatctggt ttcatacaaa aagaaggtag ccgtcctgcg
 1140
 gtggttatcc caaccaacga agaactgggt atcgcgcaag acgcgagccg cctgactgcc
 1200
 tga
 1203

<210> 33

<211> 400

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<223> ackA

<400> 33

```

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> 34
 <211> 5003
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Plasmid pACYC-asd

<400> 34
 gaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt
 60
 gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cggctctgggt
 120
 ataggtacat tgagcaactg actgaaatgc ctcaaaatgt tctttacgat gccattggga
 180
 tatatcaacg gtggtatatc cagtgatattt tttctccatt ttagcttcct tagctcctga
 240
 aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt
 300
 ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgcca aagttggccc agggcttccc
 360
 ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttcctg tcacaggtat
 420
 ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaaactta ctgatttagt gtatgatggt
 480
 gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg
 540
 acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact
 600
 ggcttactat gttggcactg atgagggtgt cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa
 660
 aaggctgcac cgggtgcgtca gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttctcgcctc
 720
 actgactcgc tacgctcggg cgttcgactg cggcgagcgg aaatggctta cgaacggggc
 780
 ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa
 840
 agccgttttt ccataggctc cgccccctg acaagcatca cgaaatctga cgctcaaate
 900
 agtggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggcggctccc
 960
 tcgtgcgctc tcctgttcct gcctttcggg ttaccgggtg cattccgctg ttatggccgc
 1020
 gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg cagttcgcct caagctggac
 1080
 tgtatgcacg aacccccctg tcagtccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt
 1140
 gagtccaacc cggaagaca tgcaaaagca ccactggcag cagccactgg taattgattt
 1200
 agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg
 1260
 tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt
 1320

cgaaaaaccg ccctgcaagg cggttttttc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc
 1380
 aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa tatttctaga tttcagtgca
 1440
 atttatctct tcaaattgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc
 1500
 atgtttgaca gcttatcatc gataagcttc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt
 1560
 caggcagcca tcggaagctg tggatatggct gtgcaggctc taaatcactg cataattcgt
 1620
 gtcgctcaag gcgcactccc gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacggttc
 1680
 tggcaaatat tctgaaatga gctgttgaca attaatcatc cggctcgtat aatgtgtgga
 1740
 attgtgagcg gataacaatt tcagaattca aaagatcttt taagaaggag atatacatat
 1800
 gaaaaatgtt ggttttatcg gctggcgcg g tatggtcggc tccgttctca tgcaacgcat
 1860
 ggttgaagag cgcgacttcg acgccattcg ccctgtcttc ttttctactt ctcagcttgg
 1920
 ccaggctgcg ccgtcttttg gcggaaccac tggcacactt caggatgcct ttgatctgga
 1980
 ggcgctaaag gccctcgata tcattgtgac ctgtcagggc ggcgattata ccaacgaaat
 2040
 ctatccaaag cttcgtgaaa gcggatggca aggttactgg attgacgcag catcgtctct
 2100
 gcgcatgaaa gatgacgcca tcatcattct tgaccccgtc aatcaggacg tcattaccga
 2160
 cggattaaat aatggcatca ggacttttgt tggcggtaac tgtaccgtaa gcctgatgtt
 2220
 gatgtcgttg ggtggtttat tcgccaatga tcttgttgat tgggtgtccg ttgcaaccta
 2280
 ccaggccgct tccggcggtg gtgcgcgaca tatgcgtgag ttattaaccc agatgggcca
 2340
 tctgtatggc catgtggcag atgaactcgc gaccccgctc tctgctattc tcgatatcga
 2400
 acgcaaagtc acaaccttaa cccgtagcgg tgagctgccg gtggataact ttggcgtgcc
 2460
 gctggcgggt agcctgattc cgtggatcga caaacagctc gataacggtc agagccgcga
 2520
 agagtggaaa gggcaggcgg aaaccaacaa gacccctaac acatcttccg taattccggt
 2580
 agatggttta tgtgtgcgtg tcggggcatt gcgctgccac agccaggcat tcactattaa
 2640
 attgaaaaaa gatgtgtcta ttccgaccgt ggaagaactg ctggctgcgc acaatccgtg
 2700
 ggcgaaagtc gttccgaacg atcgggaaat cactatgcgt gagctaaccc cagctgccgt
 2760
 taccggcacg ctgaccacgc cggtaggccg cctgcgtaag ctgaatatgg gaccagagtt
 2820
 cctgtcagcc ttaccgtgg gcgaccagct gctgtggggg gccgcggagc cgctgcgtcg
 2880

gatgcttcgt caactggcgt aatgtcgacc gatgcccttg agagccttca acccagtcag
 2940
 ctccctccgg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat
 3000
 catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc gctctgggtc attttcggcg aggaccgctt
 3060
 tcgctggagc gcgacgatga tcggcctgtc gcttgcggtg ttcggaatct tgcacgccct
 3120
 cgctcaagcc ttcgtcactg gtcccggcac caaacgtttc ggcgagaagc aggccattat
 3180
 cgccggcatg gcggccgacg cgctgggcta cgtcttgctg gcgttcgca cgcgaggctg
 3240
 gatggccttc cccattatga ttcttctcgc ttccggcggc atcgggatgc ccgcgttgca
 3300
 ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga ccatcaggga cagcttcaag gatcgctcgc
 3360
 ggctcttacc agcctaactt cgatcactgg accgctgacg gtcacggcga tttatgccgc
 3420
 ctcggcgagc acatggaacg ggttggcatg gattgtaggc gccgccctat accttgctctg
 3480
 cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag ccggggccacc tcgacctgaa tggaagccgg
 3540
 cggcacctcg ctaacggatt caccactcca agaattggag ccaatcaatt cttgcggaga
 3600
 actgtgaatg cgcaaaccaa cccttggcag aacatatcca tcgcgtccgc catctccagc
 3660
 agccgcacgc ggcgcatctc gggcagcgtt gggtcctggc cacgggtgcg catgatcgtg
 3720
 ctctgtctgt tgaggaccg gctaggctgg cggggttgcc ttactggtta gcagaatgaa
 3780
 tcaccgatac gcgagcgaac gtgaagcgac tgctgctgca aaacgtctgc gacctgagca
 3840
 acaacatgaa tggctcttcg tttccgtggt tcgtaaagtc tggaacgcg gaagtccct
 3900
 acgtgctgct gaagttgccc gcaacagaga gtggaaccaa ccggtgatac cacgatacta
 3960
 tgactgagag tcaacgccat gagcggcctc atttcttatt ctgagttaca acagtccgca
 4020
 ccgctgtccg gtagctcctt ccggtgggcg cggggcatga ctatcgtcgc cgcacttatg
 4080
 actgtcttct ttatcatgca actcgtagga caggtgccgg cagcgcccaa cagtccccc
 4140
 gccacggggc ctgccaccat acccacgccg aaacaagcgc cctgcaccat tatgttccgg
 4200
 atctgcatcg caggatgctg ctggctaccc tgtggaacac ctacatctgt attaacgaag
 4260
 cgctaaccgt ttttatcagg ctctgggagg cagaataaat gatcatatcg tcaattatta
 4320
 cctccacggg gagagcctga gcaaactggc ctcaggcatt tgagaagcac acggtcacac
 4380
 tgcttccggg agtcaataaa ccggtaaacc agcaatagac ataagcggct atttaacgac
 4440

cctgccctga accgacgacc gggtcgaatt tgctttcgaa tttctgccat tcattccgctt
 4500
 attatcactt attcaggcgt agcaccaggc gtttaagggc accaataact gccttaaaaa
 4560
 aattacgccc cgccctgccca ctcatcgag tactgttgta attcattaag cattctgccg
 4620
 acatggaagc catcacagac ggcatgatga acctgaatcg ccagcggcat cagcaccttg
 4680
 tcgccttgcg tataatatatt gcccatgggtg aaaacggggg cgaagaagtt gtccatattg
 4740
 gccacgttta aatcaaaaact ggtgaaactc acccagggat tggctgagac gaaaaacata
 4800
 ttctcaataa acccttttagg gaaataggcc aggttttcac cgtaacacgc cacatcttgc
 4860
 gaatatatgt gtagaaactg ccggaaatcg tcgtgggtatt cactccagag cgatgaaaac
 4920
 gtttcagttt gctcatggaa aacggtgtaa caagggtgaa cactatocca tatcaccagc
 4980
 tcaccgtctt tcattgccat acg
 5003

<210> 35
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> pACYC-asd-F

<400> 35
 gaaggagata tacatatgaa aaatgttggt tttatcgg
 38

<210> 36
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> pACYC-asd_R

<400> 36
 aagggcatcg gtcgacatta cgccagttga cgaagc
 36

<210> 37
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> E. coli
 <220>
 <223> gdhA

<400> 37

```

atggatcaga catattctct ggagtcattc ctcaaccatg tccaaaagcg cgaccccaat 60
caaaccgagt tcgcgcaagc cgttcgtgaa gtaatgacca cactctggcc ttttcttgaa 120
caaaatccaa aatatcgcca gatgtcatta ctggagcgtc tggttgaacc ggagcgcgatg 180
atccagtttc gcggtggtatg gggtgatgat cgcaatcagg tacaggtcaa ccgtgcatgg 240
cgtgtgcagt tcagctctgc catcggcccg tacaagggcg gtatgcgctt ccattccgtca 300
gttaacctct ccattctcaa attcctcggc ttcgaacaaa ccttcaaaaa tgccctgact 360
accctgccga tgggcggtgg taaaggcggt agcgattttg acccgaaagg taaaagcgaa 420
ggcgaagtga tgcgtttctg ccaggcgctg atgaccgagc tttatcgtca tctgggcgcg 480
gataccgacg ttccggcagg tgatatcggc gttgggtggc gtgaagtcgg ctttatggcg 540
gggatgatga aaaagctctc caacaatacc gcctgcgtct tcaccggtaa gggcctttca 600
tttggcggta gtcttattcg cccggaagct accggctacg gtctggttta tttcacagaa 660
gcaatgttaa aagccacgg tatgggtttt gaagggatgc gcgtttccgt ttctggctcc 720
ggcaaccatc cccagtcacg tatcgaaaaa gcgatggaat ttggtgctcg tgtgatcact 780
gcgtcagact ccagcggcac tgtagttgat gaaagcggat tcacgaaaga gaaactggca 840
cgtcttatcg aaatcaaagc cagccgcgat ggtcgagtgg cagattacgc caaagaattt 900
ggtctggtct atctcgaagg ccaacagccg tggctgttac cggttgatat cgccctgcct 960
tgcgccaccc agaacgaact ggatgttgac gccgcgcac agcttatcgc caatggcggtt 1020
aaagccgctg ctgaaggggc aaatatgccg accaccatcg aagcgactga actgttccag 1080
caggcaggcg tactgtttgc accgggtaaa gcggctaata ctggcgggtg agcaacgctg 1140
ggcctggaaa tggcacaaaa cgctgcgcgc ctgggctgga aagccgagaa agttgacgca 1200
cgtttgcatc acatcatgct ggatatccac catgcctgtg ttgagcatgg tggatgaagg 1260
gagcaaacca actacgtgca gggcgcgcaac attgccgggt ttgtgaagg tgcgatgacg 1320
atgctggcgc aggggtgtgat ttaa 1344

```

<210> 38

<211> 447

<212> PRT

<213> E. coli

<220>

<223> gdhA

<400> 38

```

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

```

```

145          150          155          160
Asp Thr Asp Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Gly Gly Arg Glu Val
          165          170          175
Gly Phe Met Ala Gly Met Met Lys Lys Leu Ser Asn Asn Thr Ala Cys
          180          185          190
Val Phe Thr Gly Lys Gly Leu Ser Phe Gly Gly Ser Leu Ile Arg Pro
          195          200          205
Glu Ala Thr Gly Tyr Gly Leu Val Tyr Phe Thr Glu Ala Met Leu Lys
          210          215          220
Arg His Gly Met Gly Phe Glu Gly Met Arg Val Ser Val Ser Gly Ser
225          230          235          240
Gly Asn Val Ala Gln Tyr Ala Ile Glu Lys Ala Met Glu Phe Gly Ala
          245          250          255
Arg Val Ile Thr Ala Ser Asp Ser Ser Gly Thr Val Val Asp Glu Ser
          260          265          270
Gly Phe Thr Lys Glu Lys Leu Ala Arg Leu Ile Glu Ile Lys Ala Ser
          275          280          285
Arg Asp Gly Arg Val Ala Asp Tyr Ala Lys Glu Phe Gly Leu Val Tyr
          290          295          300
Leu Glu Gly Gln Gln Pro Trp Ser Val Pro Val Asp Ile Ala Leu Pro
305          310          315          320
Cys Ala Thr Gln Asn Glu Leu Asp Val Asp Ala Ala His Gln Leu Ile
          325          330          335
Ala Asn Gly Val Lys Ala Val Ala Glu Gly Ala Asn Met Pro Thr Thr
          340          345          350
Ile Glu Ala Thr Glu Leu Phe Gln Gln Ala Gly Val Leu Phe Ala Pro
          355          360          365
Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala Thr Ser Gly Leu Glu Met
          370          375          380
Ala Gln Asn Ala Ala Arg Leu Gly Trp Lys Ala Glu Lys Val Asp Ala
385          390          395          400
Arg Leu His His Ile Met Leu Asp Ile His His Ala Cys Val Glu His
          405          410          415
Gly Gly Glu Gly Glu Gln Thr Asn Tyr Val Gln Gly Ala Asn Ile Ala
          420          425          430
Gly Phe Val Lys Val Ala Asp Ala Met Leu Ala Gln Gly Val Ile
          435          440          445

```

<210> 39

<211> 5242

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> pACYC-gdhA plasmit

<400> 39

```

gaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt
60
gtgcttatttt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cgggtctggtt
120
ataggtacat tgagcaactg actgaaatgc ctcaaaatgt tctttacgat gccattggga
180

```

tatatcaacg gtggtatatc cagtgatttt tttctccatt ttagcttcct tagctcctga
 240
 aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt
 300
 ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgcca aagttggccc agggcttccc
 360
 ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttcog tcacaggtat
 420
 ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt
 480
 gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg
 540
 acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact
 600
 ggcttactat gttggcactg atgaggggtg cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa
 660
 aaggctgcac cgggtgcgtc gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttccctcgctc
 720
 actgactcgc tacgctcggg cgttcgactg cggcgagcgg aaatggctta cgaacggggc
 780
 ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa
 840
 agccgttttt ccataggctc cgccccctg acaagcatca cgaaatctga cgctcaaate
 900
 agtggtgccg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggccggtccc
 960
 tcgtgcgctc tcctgttcct gcctttcggg ttaccgggtg cattccgctg ttatggccgc
 1020
 gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg cagttcgctc caagctggac
 1080
 tgtatgcacg aacccccgt tcagtcgcac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt
 1140
 gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca ccactggcag cagccactgg taattgattt
 1200
 agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg
 1260
 tgactgcgct cctccaagcc agttacctg gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt
 1320
 cgaaaaaccg ccctgcaagg cggttttttc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc
 1380
 aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa ttttctaga tttcagtga
 1440
 atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc
 1500
 atgtttgaca gcttatcatc gataagcttc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt
 1560
 caggcagcca tcggaagctg tggtagggt gtgcaggctg taaatcactg cataattcgt
 1620
 gtcgctcaag gcgcactccc gttctggata atgttttttg cgccgacatc ataacggttc
 1680
 tggcaaatat tctgaaatga gctgttgaca attaatcatc cggctcgtat aatgtgtgga
 1740

attgtgagcg gataacaatt tcagaattca aaagatcttt taagaaggag atatacatat
 1800
 ggatcagaca tatttctctgg agtcattcct caaccatgtc caaaagcgcg acccgaatca
 1860
 aaccgagttc gcgcaagccg ttcgtgaagt aatgaccaca ctctggcctt ttcttgaaca
 1920
 aaatccaaaa tatcgccaga tgtcattact ggagcgtctg gttgaaccgg agcgcgtgat
 1980
 ccagtttcgc gtggtatggg ttgatgatcg caatcaggta caggtcaacc gtgcatggcg
 2040
 tgtgcagttc agctctgcc tgcggccgta caaaggcggg atgcgcttcc atccgtcagt
 2100
 taacctctcc attctcaaat tcctcggctt cgaacaaacc ttcaaaaatg ccctgactac
 2160
 cctgccgatg ggcggtggta aaggcggtag cgattttgac ccgaaaggta aaagcgaagg
 2220
 cgaagtgatg cgtttctgcc aggcgctgat gaccgagctt tatcgtcatc tgggcgcgga
 2280
 taccgacgtt ccggcagggtg atatcggcgt tgggtggtcgt gaagtcggct ttatggcggg
 2340
 gatgatgaaa aagctctcca acaataccgc ctgcgtcttc accggttaagg gcctttcatt
 2400
 tggcggtagt cttattcgcc cggaagctac cggctacggt ctggtttatt tcacagaagc
 2460
 aatgttaaaa cgccacggta tgggttttga agggatgcgc gtttccgttt ctggctccgg
 2520
 caacgtcgcc cagtacgcta tcgaaaaagc gatggaatth ggtgctcgtg tgatcactgc
 2580
 gtcagactcc agcggcactg tagttgatga aagcggattc acgaaagaga aactggcacg
 2640
 tcttatcgaa atcaaagcca gccgcgatgg tcgagtggca gattacgcca aagaatttgg
 2700
 tctggtctat ctcgaaggcc aacagccgtg gtctgtaccg gttgatatcg ccctgccttg
 2760
 cgccacccag aacgaactgg atgttgacgc cgcgcacatcag cttatcgcca atggcgtaa
 2820
 agccgtcgct gaaggggcaa atatgccgac caccatcgaa gcgactgaac tgttccagca
 2880
 ggcaggcgta ctgtttgcac cgggttaaagc ggctaattgct ggcggtgtag caacgtcggg
 2940
 cctggaaatg gcacaaaacg ctgcgcgcct gggctggaaa gccgagaaag ttgacgcacg
 3000
 tttgcatcac atcatgctgg atatccacca tgcctgtggt gagcatggtg gtgaagggtga
 3060
 gcaaaccaac tacgtgcagg gcgcgaacat tgccggtttt gtgaagggtg ccgatgcgat
 3120
 gctggcgcag ggtgtgatth aagtcgaccg atgcccttga gagccttcaa ccagtcagc
 3180
 tccttccggg gggcgcgggg catgactatc gtcgcgcgac ttatgactgt cttctttatc
 3240
 atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg ctctgggtca ttttcggcga ggaccgctth
 3300

cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg cttgcggtat tcggaatctt gcacgccctc
 3360
 gctcaagcct tcgtcactgg tcccgccacc aaacgtttcg gcgagaagca ggccattatc
 3420
 gccggcatgg cggccgacgc gctgggctac gtcttgctgg cgttcgacgc gcgaggctgg
 3480
 atggccttcc ccattatgat tcttctcgct tccggcggca tcgggatgcc cgcgttgacg
 3540
 gccatgctgt ccaggcaggt agatgacgac catcaggagc agcttcaagg atcgctcgcg
 3600
 gctcttacca gcctaacttc gatcactgga ccgctgatcg tcacggcgat ttatgccgcc
 3660
 tcggcgagca catggaacgg gttggcatgg attgtaggcg ccgccctata ccttgtctgc
 3720
 ctccccgcgt tgcgtcgcgg tgcattggagc cgggccacct cgacctgaat ggaagccggc
 3780
 ggcacctcgc taacggattc accactccaa gaattggagc caatcaattc ttgcggagaa
 3840
 ctgtgaatgc gcaaaccaac ccttggcaga acatatccat cgcgtccgcc atctccagca
 3900
 gccgcacgcg gcgcatctcg ggcagcgttg ggtcctggcc acgggtgcgc atgatcgtgc
 3960
 tcctgtcgtt gaggaccggg ctaggctggc ggggttgccct tactggttag cagaatgaat
 4020
 caccgatacg cgagcgaacg tgaagcgact gctgctgcaa aacgtctgcg acctgagcaa
 4080
 caacatgaat ggtcttcggt ttccgtgttt cgtaaagtct ggaaacgcgg aagtccccta
 4140
 cgtgctgctg aagttgcccg caacagagag tggaaccaac cggtgatacc acgatactat
 4200
 gactgagagt caacgccatg agcggcctca tttcttattc tgagttacaa cagtccgcac
 4260
 cgctgtccgg tagctccttc cgggtgggcgc ggggcatgac tatcgctcgc gcacttatga
 4320
 ctgtcttctt tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgccggc agcgcccaac agtccccgg
 4380
 ccacggggcc tgccaccata cccacgccga aacaagcgcc ctgcaccatt atgttccgga
 4440
 tctgcatcgc aggatgctgc tggctaccct gtggaacacc tacatctgta ttaacgaagc
 4500
 gctaaccggt tttatcaggc tctgggaggc agaataaatg atcatatcgt caattattac
 4560
 ctccacgggg agagcctgag caaactggcc tcaggcattt gagaagcaca cggtcacact
 4620
 gcttccggta gtcaataaac cggtaaacca gcaatagaca taagcggcta tttaacgacc
 4680
 ctgccctgaa ccgacgaccg ggtcgaattt gctttcgaat ttctgccatt catccgctta
 4740
 ttatcactta ttcaggcgta gcaccaggcg ttttaaggga ccaataactg ccttaaaaaa
 4800
 attacgcccc gccctgccac tcacgcagc actgttgtaa ttcattaagc attctgccga
 4860

catggaagcc atcacagacg gcatgatgaa cctgaatcgc cagcggcatc agcaccttgt
 4920
 cgccttgcgt ataatatattg cccatggtga aaacgggggc gaagaagttg tccatatattg
 4980
 ccacgtttta atcaaaactg gtgaaactca cccaggggatt ggctgagacg aaaaacatat
 5040
 tctcaataaa cccttttaggg aaataggcca ggttttcacc gtaacacgcc acatcttgcg
 5100
 aatatatgtg tagaaactgc cggaaatcgt cgtgggtattc actccagagc gatgaaaacg
 5160
 ttctcagtttg ctcatggaaa acggtgtaac aaggggtgaac actatcccat atcaccagct
 5220
 caccgtcttt cattgccata cg
 5242

<210> 40
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi pACYC-gdhA_F

<400> 40
 gaaggagata tacatatgga tcagacatat tctctggagt
 40

<210> 41
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi pACYC-gdhA_R

<400> 41
 aagggcatcg gtcgacttaa atcacaccct gcgcc
 35