



(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)



1-0032575

(51)⁷ C12N 15/09; C12P 1/00; C12N 1/21

(13) B

(21) 1-2015-02358

(22) 23/01/2014

(86) PCT/JP2014/051402 23/01/2014

(87) WO 2014/115815 31/07/2014

(30) 2013-011538 24/01/2013 JP; 2013-011536 24/01/2013 JP

(45) 25/07/2022 412

(43) 26/10/2015 331A

(73) Mitsui Chemicals, Inc. (JP)

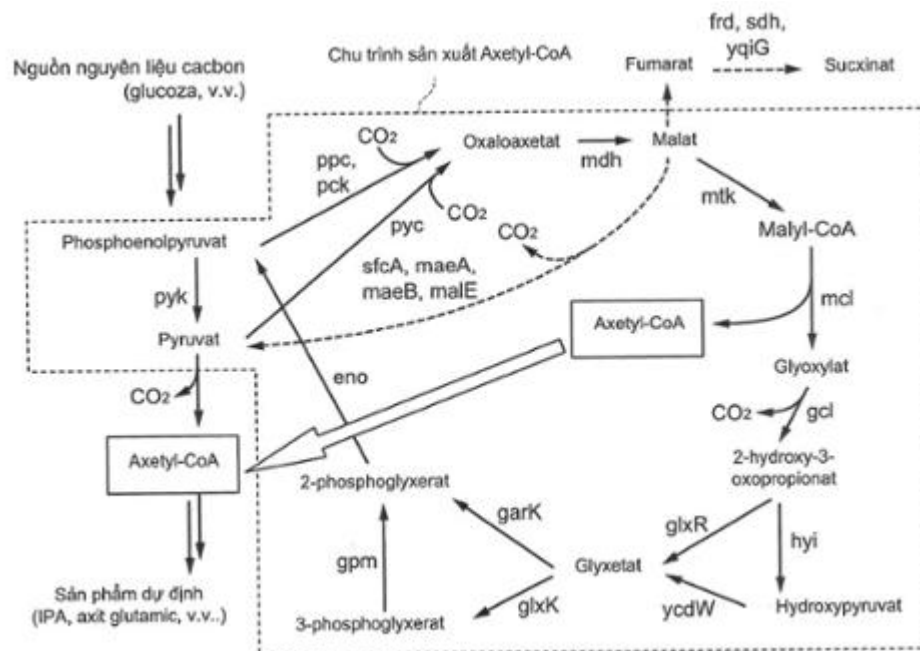
5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-7117, Japan

(72) HIDEAKI, Tomonori (JP); FUJII, Ryota (JP); MATSUMOTO, Yoshiko (JP);
MADHAVAN, Anjali (IN); CHONG, SU SUN (MY).

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

(54) VI SINH VẬT SẢN XUẤT AXETYL-COA, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
AXETYL-COA, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT RƯỢU ISOPROPYLIC, PHƯƠNG
PHÁP SẢN XUẤT AXETON, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT GLUTAMIC
VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT XITRIC

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, maly-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số: (a) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3 -hydroxypropionat; (b) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat; (c) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA; (d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format; hoặc (e) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và maly-CoA lyaza. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất axetyl-CoA, rượu isopropyllic, axeton và axit glutamic, vi sinh vật, phương pháp sản xuất axit xitric, axit itaconic và axit (poly)3-hydroxybutyric.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật có chu trình cố định cacbon dioxit được đưa vào và phương pháp sản xuất chất sử dụng vi sinh vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

Ở hầu hết vi sinh vật, axetyl-CoA được sản xuất sử dụng đường như glucoza làm nguồn cacbon. Đầu tiên, đường được chuyển hóa thành pyruvat qua tiến trình chuyển hóa được gọi là tiến trình glycolytic, như tiến trình Embden-Meyerhof, tiến trình Entner-Doudoroff, hoặc tiến trình pentoza phosphat. Sau đó, pyruvat được chuyển hóa thành axetyl-CoA nhờ tác động của enzym pyruvat decarboxylaza, pyruvat format-lyaza, và chất tương tự. Trong quy trình này, vì cacbon dioxit (CO_2) và format được sinh ra ở dạng sản phẩm phụ, nên không phải tất cả các cacbon có nguồn gốc từ đường được cố định làm axetyl-CoA. Do đó, một số nghiên cứu đã được tiến hành với mục đích đạt được sự cố định lại CO_2 để làm tăng hiệu suất axetyl-CoA.

Ở vi sinh vật, có một vài tiến trình đã biết để cố định cacbon dioxit làm nguồn cacbon (Applied and Environmental Microbiology, 2011; 77(6), 1925-1936). Các ví dụ cụ thể về các tiến trình này bao gồm chu trình Calvin-Benson, chu trình TCA khử, tiến trình Wood-Ljungdahl, chu trình 3-hydroxypropionat, và chu trình 4-hydroxybutyrat. Chu trình Calvin-Benson là tiến trình cố định CO_2 tồn tại ở thực vật và vi khuẩn quang hợp, và chứa khoảng 12 loại enzym. Trong chu trình Calvin-Benson, CO_2 được cố định bởi ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza (RubisCO) và, cuối cùng là, glyxeraldehyt

3-phosphat được sản xuất. Chu trình TCA khử được tìm thấy trong vi khuẩn ưa vi khí và vi khuẩn kỵ khí bao gồm vi khuẩn lưu huỳnh màu lục, và chứa 11 loại enzym. Chu trình TCA khử này bao gồm các enzym cố định CO_2 là axetyl-CoA carboxylaza và 2-oxoglutarat synthaza mà đòi hỏi ferredoxin làm coenzym. Trong chu trình TCA khử, pyruvat được sản xuất từ CO_2 bởi phản ứng ngược của chu trình TCA thông thường. Tiến trình Wood-Ljungdahl được tìm thấy trong các vi sinh vật kỵ khí như vi khuẩn sản xuất axit axetic, và chứa 9 loại enzym. Trong tiến trình Wood-Ljungdahl, CO_2 và format trên coenzym được khử bởi format dehydroaza, CO dehydroaza, v.v., và, cuối cùng được chuyển hóa thành axetyl-CoA. Chu trình 3-hydroxypropionat được tìm thấy trong vi khuẩn *Chloroflexus* và các vi khuẩn tương tự, và chứa 13 loại enzym. Trong chu trình 3-hydroxypropionat, CO_2 được cố định bởi tác động của axetyl-CoA (propionyl-CoA) carboxylaza và axetyl-CoA được sản xuất thông qua malonyl-CoA và các chất tương tự. Chu trình 4-hydroxybutyrat tồn tại trong vi khuẩn cổ và các vi khuẩn tương tự. Trong chu trình 4-hydroxybutyrat, CO_2 được cố định bởi các tác động của pyruvat synthaza, axetyl-CoA (propionyl-CoA) carboxylaza, và phosphoenolpyruvat carboxylaza, nhờ đó axetyl-CoA được sản xuất thông qua 4-hydroxybutyryl CoA và các chất tương tự.

Một vài phương pháp sản xuất chất hữu dụng bằng cách đưa tiến trình cố định cacbon dioxit vào vi sinh vật mà sản xuất hợp chất hữu dụng được đề xuất. Ví dụ, các công bố đơn quốc tế WO 2009/094485 và WO 2010/071697 bộc lộ các phương pháp sản xuất axetyl-CoA từ CO_2 bằng cách sử dụng vi sinh vật mà tiến trình tương tự với tiến trình Wood-Ljungdahl của vi khuẩn axit axetic được đưa vào. WO 2009/046929 bộc lộ phương pháp sản xuất axit lactic từ CO_2 bằng cách sử dụng vi sinh vật mà hydrogenaza và tetrahydrofolat lyaza được đưa vào. WO 2011/099006 đề xuất chu trình trong đó CO_2 được cố định qua phản ứng cố định cacbon dioxit thành axetyl-CoA hoặc phản ứng khử malonyl-CoA. Công bố đơn Đức số 102007059248 đề xuất quá trình sản xuất axetyl-CoA qua tiến trình tương tự với chu trình 4-hydroxybutyrat.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế

Tuy nhiên, các chu trình cố định cacbon dioxit đã biết tất yếu không có hiệu quả xét về sự cố định CO_2 và sản xuất các hợp chất hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA. Ví dụ, chu trình Calvin-Benson là chu trình cố định cacbon dioxit nổi tiếng nhất được tìm thấy trong tự nhiên, nhưng RubisCO liên quan đến sự cố định cacbon dioxit là không

hiệu quả làm enzym, vì RubisCO có tốc độ phản ứng thấp và gây ra các phản ứng phụ như sự phân rã oxy hóa (Journal of Bioscience and Bioengineering 2002, 94(6) 497-505). Trong tiến trình Wood-Ljungdahl và các tiến trình được mô tả trong WO 2009/094485, WO 2010/071697, WO 2009/046929, tiến trình để khử CO₂ thành CO hoặc format được bao gồm. Tuy nhiên, thông thường enzym xúc tác loại phản ứng khử mạnh này chỉ tác dụng trong môi trường khử, và do đó, phản ứng khử khó xảy ra trong các điều kiện bình thường. Hơn nữa, khó đưa enzym này vào vi sinh vật không phải là vi sinh vật kỵ khí nghiêm ngặt. Trong chu trình TCA khử, phản ứng khử bằng pyruvat synthaza hoặc phản ứng khử bằng 2-oxoglutarat synthaza đòi hỏi năng suất khử mạnh sử dụng ferredoxin làm chất nhận điện tử, và khó tiến hành phản ứng. Chu trình 4-hydroxybutyrat, chu trình 3-hydroxypropionat, và các tiến trình được mô tả trong WO 2009/046929 và WO 2011/099006 sử dụng các phản ứng khử axit carboxylic hoặc (thio)este của nó, như khử succinyl-CoA hoặc khử malonyl-CoA. Tuy nhiên, nhìn chung khó tiến hành loại phản ứng này dưới dạng phản ứng enzym, và mong muốn tránh loại phản ứng này trong các tiến trình lên men khi có thể (Nature, 2008; 451: 86-89; Nature Chemical Biology, 2011; 7: 445-452). Chu trình 4-hydroxybutyrat diễn ra thông qua phản ứng khử nước như sự khử nước của 4-hydroxybutyryl CoA hoặc sự khử nước của 3-hydroxypropionat, nhưng chu trình này có nhược điểm ở chỗ loại phản ứng khử nước này thường cạnh tranh với phản ứng ngược (hydrat hóa) trong nước. Trong chu trình 4-hydroxybutyrat, chu trình 3-hydroxypropionat, và chu trình TCA khử, axetyl-CoA đã được sản xuất được chuyển hóa thành các chất khác trong chu trình bởi tác động của malonyl-CoA synthaza hoặc pyruvat synthaza. Do đó, các chu trình này không tất yếu có hiệu quả từ quan điểm về sự sản xuất axetyl-CoA.

Khi cố gắng sản xuất chất nhất định bằng cách đưa các chu trình được mô tả ở trên vào vi sinh vật, cần xem xét số lượng các enzym tạo thành chu trình và số lượng hoạt tính enzym mới được truyền vào. Khi số lượng enzym tạo thành chu trình hoặc số lượng hoạt tính enzym mới được truyền vào tăng lên, cấu trúc và sự điều hòa của chu trình trở nên khó khăn hơn cũng như gánh nặng trên vi sinh vật tăng. Ví dụ, để đưa tiến trình Wood-Ljungdahl vào *Escherichia coli*, ít nhất 9 gen cần được đưa vào. Trên thực tế, sẽ là nhiệm vụ rất khó khăn để tạo cấu trúc tiến trình sản xuất chất bằng cách đưa quá nhiều gen vào theo cách có thể kiểm soát được. Rõ ràng sẽ có lợi nếu tạo cấu trúc chu trình bao gồm số lượng nhỏ enzym bằng cách đưa vào số lượng nhỏ gen, về mặt tạo cấu trúc chu trình cũng như về mặt kết hợp nó với tiến trình sản xuất chất nội tại của vi sinh vật.

Do đó, để cố định CO_2 và chuyển hóa nó thành axetyl-CoA, sẽ tốt hơn là (1) mỗi enzym tạo thành tiến trình có hoạt tính đủ cao; (2) chu trình không bao gồm enzym tiêu thụ axetyl-CoA; và (3) chu trình có cấu hình đơn giản với số lượng nhỏ các enzym mới được truyền. Tuy nhiên, không có chu trình nào sản xuất axetyl-CoA từ CO_2 được báo cáo cho đến nay thỏa mãn tất cả các điều kiện từ (1) đến (3), và khả năng thực hiện là thấp. Trên thực tế, hầu như không có ví dụ thực tế về việc tạo cấu trúc chu trình cố định cacbon dioxid bằng cách truyền hoạt tính enzym như được đề xuất trong các tài liệu tham khảo nêu trên, vào vi sinh vật có thể sử dụng được về mặt công nghiệp, chuyển hóa CO_2 thành axetyl-CoA, và chuyển hóa tiếp axetyl-CoA thành hợp chất hữu dụng.

Sáng chế được thực hiện trong các điều kiện nêu trên.

Mục đích của sáng chế thứ nhất là đề xuất vi sinh vật hữu dụng để sản xuất hiệu quả axetyl-CoA sử dụng cacbon dioxid. Ngoài ra, mục đích khác của sáng chế thứ nhất là đề xuất phương pháp sản xuất axetyl-CoA và chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA sử dụng vi sinh vật có hiệu suất cao.

Mục đích của sáng chế thứ hai là đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc vi sinh vật thuộc chi *Cupriavidus* mà có thể chuyển hóa hiệu quả cacbon dioxid thành chất chuyển hóa hữu dụng qua axetyl-CoA. Ngoài ra, mục đích khác của sáng chế thứ hai là đề xuất phương pháp sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng sử dụng vi sinh vật.

Giải quyết vấn đề

Sáng chế thứ nhất, có khả năng giải quyết vấn đề nêu trên, bao gồm các khía cạnh sau.

[A1] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d) hoặc (e) sau:

- (a) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;
- (b) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO_2 thành pyruvat;
- (c) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO_2

thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA;

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

(e) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza,

thu được vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c), hoặc (d) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a), (b), (c), hoặc (d) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c), hoặc (d) được truyền vào vi sinh vật,

trong đó, ở vi sinh vật: ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat kinaza, pyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxykinaza, malat dehydrogenaza, malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, hydroxypyruvat isomeraza, hydroxypyruvat reductaza, glyxerat 2-kinaza, glyxerat 3-kinaza, phosphoglyxerat mutaza, và enolaza, được tăng cường; ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm enzym malic và fumarat reductaza được làm bất hoạt hoặc được làm giảm; hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

[A2] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d) hoặc (e) sau:

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

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

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

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

(e) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza,

thu được vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c), hoặc (d) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a), (b), (c), và (d) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c), hoặc (d) được truyền vào vi sinh vật,

trong đó, ở vi sinh vật, ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat kinaza, pyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxykinaza, malat dehydrogenaza, malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, hydroxypyruvat isomeraza, hydroxypyruvat reductaza, glyxerat 2-kinaza, glyxerat 3-kinaza, phosphoglyxerat mutaza, và enolaza được tăng cường.

[A3] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo [A1] hoặc [A2], trong đó hoạt tính enzym của malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza được truyền.

[A4] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A3], trong đó hoạt tính enzym của 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza và glyxerat 3-kinaza được tăng cường.

[A5] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A4], trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA trong đó:

phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat được chuyển hóa thành oxaloaxetat;

oxaloaxetat được chuyển hóa thành 2-hydroxy-3-oxopropionat bằng malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza;

2-hydroxy-3-oxopropionat được chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat; và

2-phosphoglyxerat được chuyển hóa thành phosphoenolpyruvat.

[A6] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A5], trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA bao gồm (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l) và (m) sau:

(f) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza; phosphoenolpyruvat carboxylaza; và phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

(g) malat dehydrogenaza;

(h) malat thiokinaza;

(i) malyl-CoA lyaza;

(j) glyoxylat carboligaza;

(k) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza; và hydroxypyruvat isomeraza và hydroxypyruvat reductaza;

(l) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: glyxerat 2-kinaza; và glyxerat 3-kinaza và phosphoglyxerat mutaza; và

(m) enolaza.

[A7] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A6], trong đó vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d), hoặc (e), là vi sinh vật thuộc vi khuẩn Enterobacteriaceae hoặc vi sinh vật thuộc vi khuẩn coryneform.

[A8] Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A7], trong đó vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d), hoặc (e), là vi khuẩn *Escherichia* hoặc vi khuẩn *Pantoea* thuộc Enterobacteriaceae, hoặc là vi khuẩn *Corynebacterium* thuộc vi khuẩn coryneform.

[A9] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA, phương pháp này bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A8] trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, và bước thu gom để thu sản phẩm dự tính thu được nhờ sự tiếp xúc này.

[A10] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo [A9], phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp để cung cấp ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat, ion bicarbonat, khí cacbon dioxit, và chất khử, cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

[A11] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo [A9] hoặc [A10], phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp khí để thu khí chứa cacbon dioxit được tạo ra từ quá trình nuôi cấy và cung cấp khí cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

[A12] Phương pháp sản xuất chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian, phương pháp này bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A8] trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, và bước thu gom chất chuyển hóa sản

xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian thu được nhờ sự tiếp xúc này.

[A13] Phương pháp sản xuất chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian theo [A12], phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp để cung cấp ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat, ion bicarbonat, khí cacbon dioxit, và chất khử, cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

[A14] Phương pháp sản xuất chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian theo [A12] hoặc [A13], phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp khí để thu khí chứa cacbon dioxit được tạo ra từ quá trình nuôi cấy và cung cấp khí cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

[A15] Phương pháp sản xuất chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian theo bất kỳ trong số từ [A12] đến [A14], trong đó chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian là rượu isopropylic, axeton, hoặc axit glutamic.

[A16] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA bao gồm:

bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d) hoặc (e) sau:

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

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

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

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

(e) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza,

thu được vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c), hoặc (d) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a), (b),

(c), hoặc (d) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c), hoặc (d) được truyền vào vi sinh vật; và

bước cung cấp để cung cấp ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat hoặc ion bicarbonat với tổng lượng cấp là 150 mmol/L hoặc hơn, khí cacbon dioxid với đường kính bột trung bình là 100 μ m hoặc hơn, và natri sulfit với tổng lượng cấp từ 0,01 g/l đến 50 g/L, cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

[A17] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo [A16], phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp khí để thu khí chứa cacbon dioxid được tạo ra từ quá trình nuôi cấy và cung cấp khí vào môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

[A18] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo [A16] hoặc [A17], trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA trong đó phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat được chuyển hóa thành oxaloaxetat, oxaloaxetat được chuyển hóa thành 2-hydroxy-3-oxopropionat bằng malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat được chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat, và 2-phosphoglyxerat được chuyển hóa thành phosphoenolpyruvat.

[A19] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A16] đến [A18], trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA bao gồm (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l), và (m) sau:

(f) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza; phosphoenolpyruvat carboxylaza; và phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

(g) malat dehydrogenaza;

(h) malat thiokinaza;

(i) malyl-CoA lyaza;

(j) glyoxylat carboligaza;

(k) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza; và hydroxypyruvat isomeraza và hydroxypyruvat reductaza;

(l) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: glyxerat 2-kinaza; và glyxerat 3-kinaza và phosphoglyxerat mutaza; và

(m) enolaza.

[A20] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A16] đến [A19], trong đó vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d), hoặc (e), là vi sinh vật thuộc Enterobacteriaceae hoặc vi sinh vật thuộc vi khuẩn coryneform.

[A21] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A16] đến [A20], trong đó vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d), hoặc (e), là vi khuẩn *Escherichia* hoặc vi khuẩn *Pantoea* thuộc Enterobacteriaceae, hoặc là vi khuẩn *Corynebacterium* thuộc vi khuẩn coryneform.

[A22] Phương pháp sản xuất rượu isopropylic, bao gồm cho phép vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA sản xuất rượu isopropylic, sử dụng axetyl-CoA được sản xuất bằng phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A16] đến [A21] làm chất trung gian.

[A23] Phương pháp sản xuất axeton, bao gồm cho phép vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA sản xuất axeton, sử dụng axetyl-CoA được sản xuất bằng phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A16] đến [A21] làm chất trung gian.

[A24] Phương pháp sản xuất axit glutamic, bao gồm cho phép vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA để sản xuất axit glutamic, sử dụng axetyl-CoA được sản xuất bằng phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A16] đến [A21] làm chất trung gian.

[A25] Phương pháp sản xuất rượu isopropylic bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A8] trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, và bước thu gom rượu isopropylic thu được nhờ sự tiếp xúc này.

[A26] Phương pháp sản xuất axeton bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A8] trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, và bước thu gom axeton thu được nhờ sự tiếp xúc này.

[A27] Phương pháp sản xuất axit glutamic bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo bất kỳ trong số từ [A1] đến [A8] trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, và bước thu gom để thu axit glutamic thu được nhờ sự tiếp xúc này.

Sáng chế thứ hai giải quyết vấn đề nêu trên như sau.

[B1] Vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc chi *Cupriavidus* thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và maly-CoA

lyaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a2), (b2), (c2), (d2) hoặc (e2) sau:

(a2) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;

(b2) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat;

(c2) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA;

(d2) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format; hoặc

(e2) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza,

thu được vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc chi *Cupriavidus* mà không truyền bất kỳ trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) được truyền vào vi sinh vật.

[B2] Vi sinh vật theo [B1], bao gồm khả năng sản xuất axetyl-CoA.

[B3] Thu được vi sinh vật theo [B1] hoặc [B2], vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc chi *Cupriavidus* bằng cách truyền tiếp ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza.

[B4] Vi sinh vật theo bất kỳ trong số từ [B1] đến [B3], bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA trong đó:

phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat được chuyển hóa thành oxaloaxetat;

oxaloaxetat được chuyển hóa thành 2-hydroxy-3-oxopropionat bằng malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza;

2-hydroxy-3-oxopropionat được chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat; và

2-phosphoglyxerat được chuyển hóa thành phosphoenolpyruvat.

[B5] Vi sinh vật theo bất kỳ trong số từ [B1] đến [B4], bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA bao gồm (f2), (g2), (h2), (i2), (j2), (k2), (l2), và (m2) sau:

(f2) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza; phosphoenolpyruvat carboxylaza; và phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

(g2) malat dehydrogenaza;

(h2) malat thiokinaza;

(i2) malyl-CoA lyaza;

(j2) glyoxylat carboligaza;

(k2) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza; và hydroxypyruvat isomeraza và hydroxypyruvat reductaza;

(l2) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: glyxerat 2-kinaza; và glyxerat 3-kinaza và phosphoglyxerat mutaza; và

(m2) enolaza.

[B6] Vi sinh vật theo bất kỳ trong số từ [B1] đến [B5], bao gồm chu trình chứa:

ít nhất một phản ứng enzym được chọn từ nhóm bao gồm (a3) và (b3) sau;

các phản ứng enzym (c3), (d3), (e3), (f3), và (g3) sau; và

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm phản ứng enzym (h3) sau, các phản ứng enzym (i3), (j3), (k3) và (n3) sau, và các phản ứng enzym (i3), (j3), (l3), (m3) và (n3) sau:

(a3) phản ứng enzym từ phosphoenolpyruvat thành oxaloaxetat;

(b3) phản ứng enzym từ pyruvat thành oxaloaxetat;

(c3) phản ứng enzym từ oxaloaxetat thành malat;

(d3) phản ứng enzym từ malat thành malyl-CoA;

(e3) phản ứng enzym từ malyl-CoA thành glyoxylat và axetyl-CoA;

(f3) phản ứng enzym từ glyoxylat thành glyxin;

(g3) phản ứng enzym từ glyxin thành serin;

(h3) phản ứng enzym từ serin thành pyruvat;

(i3) phản ứng enzym từ serin thành 3-hydroxypyruvat;

(j3) phản ứng enzym từ 3-hydroxypyruvat thành glyxerat;

(k3) phản ứng enzym từ glyxerat thành 2-phosphoglyxerat;

(l3) phản ứng enzym từ glyxerat thành 3-phosphoglyxerat;

(m3) phản ứng enzym từ 3-phosphoglyxerat thành 2-phosphoglyxerat; và

(n3) phản ứng enzym từ 2-phosphoglyxerat thành phosphoenolpyruvat.

[B7] Vi sinh vật theo bất kỳ trong số từ [B1] đến [B6], chứa:

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm (a4) và (b4) sau;

các enzym (c4), (d4), (e4), (f4), và (g4) sau; và

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm enzym (h4) sau, các enzym (i4), (j4), (k4), và (n4) sau, và các enzym (l4), (m4) và (n4) sau:

(a4) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza; phosphoenolpyruvat carboxylaza; và phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

(b4) pyruvat carboxylaza;

(c4) malat dehydrogenaza;

(d4) malat thiokinaza;

(e4) malyl-CoA lyaza;

(f4) glyxin transaminaza;

(g4) hệ phân tách glyxin và serin hydroxymetyltransferaza;

(h4) serin dehydrataza;

(i4) serin transaminaza;

(j4) hydroxypyruvat reductaza;

(k4) glyxerat 2-kinaza;

(l4) glyxerat 3-kinaza;

(m4) phosphoglyxerat mutaza; và

(n4) enolaza.

[B8] Vi sinh vật theo bất kỳ trong số từ [B1] đến [B7], trong đó vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a2), (b2), (c2), (d2), hoặc (e2) là *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, hoặc *Cupriavidus necator*.

[B9] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA bao gồm: bước nuôi cấy vi sinh vật theo bất kỳ trong số từ [B1] đến [B8] trong khi cho vi sinh vật tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, và bước thu gom để thu sản phẩm dự tính thu được nhờ sự tiếp xúc này.

[B10] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo [B9], còn bao gồm bước cung cấp để cung cấp ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat, ion bicarbonat, khí cacbon dioxit, và chất khử, cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

[B11] Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo [B9] hoặc [B10], phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp khí để thu khí chứa cacbon dioxit được tạo ra từ quá trình nuôi cấy và cung cấp khí cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

[B12] Phương pháp sản xuất axit xitric, bao gồm việc sản xuất axit xitric từ nguồn nguyên liệu cacbon sử dụng vi sinh vật theo bất kỳ trong số từ [B1] đến [B8].

[B13] Phương pháp sản xuất axit itaconic, bao gồm việc sản xuất axit itaconic từ nguồn nguyên liệu cacbon sử dụng vi sinh vật theo bất kỳ trong số từ [B1] đến [B8].

[B14] Phương pháp sản xuất axit (poly)3-hydroxybutyric, bao gồm việc sản xuất axit (poly)3-hydroxybutyric từ nguồn nguyên liệu cacbon sử dụng vi sinh vật theo bất kỳ trong số từ [B1] đến [B8].

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo sáng chế thứ nhất, có thể đề xuất vi sinh vật hữu dụng để sản xuất hiệu quả axetyl-CoA using cacbon dioxit. Theo sáng chế thứ nhất, còn có thể đề xuất phương pháp sản xuất axetyl-CoA hoặc chất chuyển hóa hữu dụng của axetyl-CoA sử dụng vi sinh vật có hiệu suất cao.

Theo sáng chế thứ hai, có thể đề xuất vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc vi sinh vật thuộc chi *Cupriavidus* có thể chuyển hóa hiệu quả cacbon dioxit thành chất chuyển hóa hữu dụng qua axetyl-CoA. Theo sáng chế thứ hai, có thể đề xuất phương pháp sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng sử dụng vi sinh vật.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ chu trình để minh họa nét chính của chu trình cố định cacbon dioxit theo sáng chế thứ nhất (nghĩa là, chu trình sản xuất axetyl-CoA).

Fig. 2 là sơ đồ tiến trình để minh họa nét chính của tiến trình glyxin theo sáng chế thứ hai.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một phương án của sáng chế được mô tả dưới đây. Được hiểu là phần mô tả và các ví dụ sau chỉ để minh họa sáng chế, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở phần mô tả và các ví dụ dưới đây.

Thuật ngữ "quy trình" như được sử dụng ở đây không chỉ bao gồm quy trình riêng rẽ mà còn bao gồm quy trình mà không thể được phân biệt rõ ràng với các quy trình khác miễn là thu được hiệu quả mong muốn từ quy trình này.

Trong bản mô tả này, mỗi khoảng bằng số được cụ thể bằng cách sử dụng "(từ) ... đến ..." thể hiện khoảng này bao gồm các giá trị bằng số được lưu ý trước và sau "đến" lần lượt là giá trị tối thiểu và giá trị tối đa.

Hơn nữa, khi có mặt hai hoặc nhiều chất, mỗi chất tương ứng với một thành phần cụ thể của chế phẩm, thì lượng của thành phần cụ thể trong chế phẩm được nêu trong sáng chế này nghĩa là tổng lượng của hai hoặc nhiều chất có mặt trong chế phẩm, trừ khi có quy định khác.

Sáng chế thứ nhất

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ nhất là vi sinh vật bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d) hoặc (e):

thu được vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c), hoặc (d) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a), (b), (c), hoặc (d) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c), hoặc (d) được truyền vào vi sinh vật,

trong đó, ở vi sinh vật: ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat kinaza, pyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxykinaza, malat dehydrogenaza, malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, hydroxypyruvat isomeraza, hydroxypyruvat reductaza, glyxerat 2-kinaza, glyxerat 3-kinaza, phosphoglyxerat mutaza, và enolaza, được tăng cường; ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm enzym malic và fumarat reductaza được làm bất hoạt hoặc được

làm giảm; hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

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

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

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

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

(e) Ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza.

Vi sinh vật theo sáng chế thứ nhất, được truyền hoạt tính enzym định trước, có chu trình cố định cacbon dioxit trong đó CO₂ được sinh ra trong suốt sự chuyển hóa carbohydrat hoặc CO₂ được cung cấp từ bên ngoài có thể được chuyển hóa thành axetyl-CoA. Hơn nữa, vi sinh vật theo sáng chế thứ nhất, trong đó hoạt tính enzym định trước được tăng cường, và/hoặc hoạt tính enzym định trước được làm bất hoạt hoặc được làm giảm, có thể chuyển hóa hiệu quả CO₂ thành axetyl-CoA.

Ví dụ về phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ nhất là phương pháp sản xuất axetyl-CoA trong đó CO₂ có thể được chuyển hóa hiệu quả thành axetyl-CoA bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế thứ nhất.

Ví dụ khác về phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ nhất là phương pháp sản xuất axetyl-CoA, bao gồm:

bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d) hoặc (e) được mô tả ở trên,

thu được vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c), hoặc (d) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a), (b), (c), hoặc (d) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c), hoặc (d) được truyền vào vi sinh vật; và

bước cung cấp để cung cấp ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat hoặc ion bicarbonat với tổng lượng cấp là 150 mmol/L hoặc hơn, khí cacbon dioxid với đường kính bột trung bình là 100 μm hoặc hơn, và natri sulfit với tổng lượng cấp từ 0,01 g/l đến 50 g/L, cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

Theo ví dụ khác, axetyl-CoA có thể được sản xuất hiệu quả sử dụng vi sinh vật, trong đó chu trình cố định cacbon dioxid được tạo cấu trúc, bằng cách cung cấp ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat, ion bicarbonat, khí cacbon dioxid, và natri sulfit, vào môi trường nuôi cấy.

Bằng cách sử dụng vi sinh vật hoặc phương pháp sản xuất theo sáng chế thứ nhất, hoặc thêm việc truyền hoạt tính enzym định trước vào vi sinh vật, axetyl-CoA và các chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA (như rượu isopropylic, etanol, axeton, axit xitric, axit itaconic, axit axetic, axit butyric, axit (poly)3-hydroxybutyric, axit 3-hydroxyisobutyric, axit 3-aminoisobutyric, axit 2-hydroxyisobutyric, axit methacrylic, axit (poly)glutamic, glutamin, arginin, ornithin, xitruilin, leuxin, isoleuxin, hoặc prolin) có thể được sản xuất hiệu quả.

Sáng chế thứ hai

Vi sinh vật theo sáng chế thứ hai là vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc chi *Cupriavidus* thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a2), (b2), (c2), (d2) hoặc (e2),

thu được vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc chi *Cupriavidus* mà không truyền bất kỳ trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) được truyền vào vi sinh vật.

[0035] (a2) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat.

(b2) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO_2 thành pyruvat.

(c2) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO_2 thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA.

(d2) chu trình cố định cacbon dioxid có phản ứng enzym từ CO_2 đến format.

(e2) Ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza.

Vi sinh vật theo sáng chế thứ hai có tiến trình bao gồm hoạt tính enzym định trước, và do đó CO₂ được sinh ra trong suốt sự chuyển hóa carbohydrat hoặc CO₂ được cung cấp từ bên ngoài có thể được cố định hiệu quả. Hơn nữa, vi sinh vật theo sáng chế thứ hai có thể chuyển hóa hiệu quả CO₂ thành axetyl-CoA.

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ hai là phương pháp sản xuất axetyl-CoA trong đó CO₂ có thể được chuyển hóa hiệu quả thành axetyl-CoA bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế thứ hai.

Bằng cách sử dụng vi sinh vật hoặc phương pháp sản xuất theo sáng chế thứ hai, hoặc thêm việc truyền hoạt tính enzym định trước vào vi sinh vật, axetyl-CoA và các chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA (như axit xitric, axit itaconic, axit (poly)3-hydroxybutyric, prolin, leuxin, isoleuxin, valin, arginin, xitruilin, ornithin, axit axetic, axit (poly)3-hydroxybutyric, axit itaconic, axit xitric, axit butyric, axit polyglutamic, axit 4-aminobutyric, axit 4-hydroxybutyric, axit 3-hydroxyisobutyric, axit 2-hydroxyisobutyric, hoặc axit 3-aminoisobutyric) có thể được sản xuất hiệu quả.

Sau đây mô tả nghĩa của thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả và sáng chế này.

Thuật ngữ "chu trình" như được sử dụng ở đây đề cập đến tiến trình mà bắt đầu từ một chất bất kỳ của tiến trình, và qua đó chất này được chuyển hóa thành chất khác, và cuối cùng chuyển hóa thành cùng chất như chất bắt đầu.

Thuật ngữ "tiến trình" như được sử dụng ở đây đề cập đến hàng loạt phản ứng bao gồm các phản ứng enzym và/hoặc các phản ứng hóa học tự phát trong thiết bị lên men. Tiến trình có thể là tiến trình theo chu trình hoặc tiến trình không theo chu trình. Do đó, tiến trình cố định cacbon dioxit bao gồm chu trình cố định cacbon dioxit.

"Sự cố định cacbon dioxit (CO₂)" trong sáng chế đề cập đến sự chuyển hóa CO₂ được tạo ra trong sự chuyển hóa carbohydrat và/hoặc CO₂ được cung cấp từ bên ngoài vào hợp chất hữu cơ. CO₂ có thể là HCO₃⁻. Do đó, "sự cố định cacbon dioxit (CO₂)" cũng có thể được đề cập đến là "sự cố định cacbon dioxit".

"Enzym" theo sáng chế bao gồm "yếu tố" mà tự nó không bộc lộ hoạt tính enzym, trừ khi có quy định khác.

Thuật ngữ “sự bất hoạt” của hoạt tính enzym theo sáng chế đề cập đến tình trạng trong đó hoạt tính của enzym khi được đo bởi hệ thống đo sẵn có bất kỳ là không lớn hơn 1/10 hoạt tính của vi sinh vật trước khi bất hoạt, giả sử hoạt tính vi sinh vật trước khi bất hoạt là 100.

"Sự khử" của hoạt tính enzym theo sáng chế nghĩa là tình trạng trong đó hoạt tính của enzym giảm đi đáng kể khi gen mã hóa enzym được xử lý sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen, so với hoạt tính của enzym trước khi xử lý.

"Sự tăng cường" của hoạt tính enzym theo sáng chế hiểu rộng ra nghĩa là hoạt tính enzym trong vi sinh vật trở nên cao hơn sau khi tăng cường so với hoạt tính enzym trước khi tăng cường. Phương pháp tăng cường không bị giới hạn cụ thể miễn là hoạt tính của enzym của vi sinh vật được tăng cường. Ví dụ về chúng bao gồm sự tăng cường bằng cách đưa gen enzym vào tế bào từ bên ngoài tế bào, tăng cường bằng sự biểu hiện tăng của gen enzym trong tế bào, và sự kết hợp bất kỳ của nó.

Các ví dụ cụ thể về sự tăng cường bằng cách đưa gen enzym vào tế bào từ bên ngoài tế bào bao gồm: đưa gen mã hóa enzym có hoạt tính cao hơn gen của enzym nội tại của tế bào chủ từ bên ngoài tế bào vào tế bào chủ sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen, nhờ đó thêm hoạt tính enzym của gen enzym được đưa vào hoặc thay thế hoạt tính enzym được đưa vào đối với hoạt tính enzym mà tế bào chủ có ban đầu; tăng số gen enzym mà tế bào chủ vốn có hoặc số gen enzym đưa vào tế bào từ bên ngoài tế bào; và sự kết hợp bất kỳ của nó.

Ví dụ cụ thể về sự tăng cường bằng cách biểu hiện tăng của gen enzym trong tế bào bao gồm: đưa trình tự bazơ làm tăng cường biểu hiện của gen enzym vào tế bào chủ từ bên ngoài tế bào; tăng cường biểu hiện của gen enzym bằng cách tăng hoạt tính gen khởi đầu của gen enzym mà vật chủ có ban đầu trên bộ gen; tăng cường biểu hiện của gen enzym bằng cách thay thế gen khởi đầu khác đối với gen khởi đầu của gen enzym mà vật chủ có trên bộ gen; và sự kết hợp bất kỳ của nó.

Việc "truyền" hoạt tính enzym theo sáng chế hiểu rộng ra nghĩa là sự cung cấp hoạt tính của enzym dự tính bằng cách đưa gen enzym từ bên ngoài vào tế bào của vi sinh vật mà không bộc lộ hoạt tính enzym dự tính. Phương pháp truyền hoạt tính không bị giới hạn cụ thể miễn là hoạt tính enzym dự tính có thể được truyền vào vi sinh vật, và có thể thực hiện việc truyền sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Các ví dụ cụ thể của nó bao gồm sự biến đổi bằng plasmid mang gen enzym, đưa gen enzym vào bộ gen, và sự kết hợp bất kỳ

của nó. Gen enzym được đưa vào có thể là giống hoặc khác loại với gen của tế bào chủ.

Việc "truyền" hoạt tính enzym tập trung ở tiến trình hoặc chu trình chuyển hóa chất nghĩa là tiến trình hoặc chu trình chuyển hóa chất được tạo cấu trúc về mặt chức năng dẫn đến truyền hoạt tính enzym, và phương pháp truyền có thể được lựa chọn theo vật chủ.

Trong bản mô tả này, "không bộc lộ chức năng nào" của chu trình cố định cacbon dioxit "dù được truyền" nghĩa là chu trình cố định cacbon dioxit không bộc lộ chức năng ngay cả khi hoạt tính enzym thích hợp được truyền bằng cách đưa gen enzym từ bên ngoài vào vi sinh vật không bộc lộ hoạt tính enzym thích hợp. "Chu trình cố định cacbon dioxit không chức năng" có thể được xác nhận gián tiếp, ví dụ, bằng ký hiệu bắt nguồn từ CO₂ không dò thấy trong chất chuyển hóa trong chu trình hoặc trong chất có nguồn gốc từ chất chuyển hóa trong thử nghiệm sử dụng CO₂ được đánh dấu, hoặc bằng cách tăng hiệu suất chất có nguồn gốc từ chất chuyển hóa trong chu trình đối với mỗi lượng đường tiêu thụ không dò thấy.

Gen khởi đầu có thể được sử dụng để "tăng cường" hoặc "truyền" hoạt tính enzym không bị giới hạn cụ thể miễn là gen khởi đầu cho phép biểu hiện gen, và gen khởi đầu cơ định hoặc gen khởi đầu cảm ứng có thể được sử dụng.

Dù vi sinh vật có gen mã hóa enzym dự định hay không, nó có thể được xác định dựa vào, ví dụ, thông tin về gen của các chủng tương ứng được đăng ký ở KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>) hoặc NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Theo sáng chế, chỉ có sự tạo thành gen của các chủng tương ứng được đăng ký ở KEGG hoặc NCBI được sử dụng.

Phương pháp điều chế ADN bộ gen cần thiết để đưa gen từ bên ngoài tế bào vào tế bào, phân cắt và nối ADN, biến nạp, PCR (Phản ứng chuỗi polymeraza), thiết kế và tổng hợp các oligonucleotit được sử dụng làm đoạn mồi, v.v. có thể được thực hiện bởi các phương pháp thông thường đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này được mô tả trong Sambrook, J., et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), v.v..

Sự biểu hiện như "bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen" theo sáng chế bao gồm sự thay

đổi bất kỳ đối với trình tự bazơ do chèn ADN khác vào trình tự bazơ của gen tự nhiên, thay thế hoặc xóa vị trí gen nhất định, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ, sự thay đổi này có thể là sự thay đổi do đột biến.

Theo sáng chế, vi sinh vật trong đó hoạt tính của yếu tố hoặc enzym bị bất hoạt đề cập đến vi sinh vật trong đó hoạt tính tự nhiên của yếu tố hoặc enzym được truyền bằng phương pháp nhất định. Vi sinh vật này có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, phá vỡ gen mã hóa yếu tố hoặc enzym (phá vỡ gen).

Ví dụ về sự phá vỡ gen theo sáng chế bào gồm việc chèn ADN khác vào gen, và đưa sự đột biến vào trình tự bazơ bằng cách thay thế hoặc xóa một phần gen nhất định, để ngăn chức năng của gen khỏi bị ảnh hưởng. Kết quả của sự phá vỡ gen, ví dụ, gen trở thành không thể được phiên mã vào ARN thông tin và do đó protein không được dịch mã. Theo cách khác, do sự không đầy đủ của ARN thông tin được phiên mã, trình tự axit amin của protein được dịch mã bị biến đổi hoặc xóa đi, và, do đó, các chức năng vốn có của nó không bị ảnh hưởng.

Sự đột biến phá vỡ gen có thể được tạo ra bởi phương pháp bất kỳ miễn là sự đột biến phá vỡ trong đó enzym hoặc protein không được biểu hiện có thể thu được. Các phương pháp khác nhau để phá vỡ gen đã được báo cáo (lai tự nhiên, bổ sung tác nhân gây đột biến, chiếu xạ UV, chiếu xạ bức xạ, sự phát sinh đột biến ngẫu nhiên, chèn hoặc hoặc chuyển vị của transposon, hoặc sự phá vỡ gen định hướng vị trí). Sự phá vỡ gen bằng tái tổ hợp tương đồng được ưu tiên do khả năng chỉ phá vỡ gen đặc hiệu. Các phương pháp phá vỡ gen bằng sự tái tổ hợp tương đồng được mô tả trong tài liệu *Journal of Bacteriology*, 1985; 161(3): 1219-1221, *Journal of Bacteriology*, 1995; 177(6): 1511-1519, và *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000; 97(12): 6640-6645, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng thực hiện sự tái tổ hợp tương đồng sử dụng các phương pháp này hoặc áp dụng các phương pháp này.

Sự biểu hiện "không có (tự nhiên)" theo sáng chế nghĩa là thiếu sự có mặt vốn có của vi sinh vật chủ trong tự nhiên.

"Vật chủ" theo sáng chế nghĩa là vi sinh vật đích mà một hoặc nhiều gen được đưa vào từ bên ngoài.

"Vật chủ" theo sáng chế ở trạng thái trong đó hiệu quả gen có thể được sử dụng

như là kết quả của việc đưa một hoặc nhiều gen vào từ bên ngoài.

"Vật chủ" theo sáng chế có thể có quá trình để sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng. "Chất chuyển hóa hữu dụng" theo sáng chế được sử dụng làm tên chung đối với các chất chuyển hóa chính trong tiến trình chuyển hóa của vi sinh vật, như rượu, các axit amin, các axit hữu cơ, và terpen. "Vật chủ" có thể là vi sinh vật bất kỳ miễn là nó có thể được tạo ra để có khả năng sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng bằng cách sử dụng các phương pháp nhất định, bất chấp vi sinh vật về bản chất có hoặc không có khả năng bẩm sinh sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng.

Sự phân loại enzyme được sử dụng ở đây là sự phân loại dựa trên báo cáo của Tiểu ban Enzyme của Hội hóa sinh quốc tế (Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry (IUB.)), và "số Tiểu ban Enzyme" là số enzyme dựa trên báo cáo của Tiểu ban Enzyme của IUB.

Đối với sáng chế thứ nhất, mỗi trong số các thuật ngữ "chất chuyển hóa có thể sản xuất từ axetyl-CoA làm chất trung gian" và "chất chuyển hóa (hữu dụng) có nguồn gốc từ axetyl-CoA" được sử dụng làm tên chung đối với các chất chuyển hóa (hữu dụng) được sản xuất qua axetyl-CoA trong các tiến trình chuyển hóa. Các ví dụ về chúng bao gồm rượu như rượu isopropyl, etanol, hoặc butanol; các axit amin như axit L-glutamic, L-glutamin, L-arginin, L-ornithin, L-citrulin, L-leucin, L-isoleucin, hoặc L-prolin; các axit hữu cơ như axit 3-hydroxybutyric, axit poly-3-hydroxybutyric, axit polyglutamic, axit 3-hydroxyisobutyric, axit 3-aminoisobutyric, axit 2-hydroxyisobutyric, axit metacrylic, axit citric, axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit caproic, hoặc axit mevalonic; và các terpen như isopren, squalen, steroid, hoặc carotenoid. Các ví dụ về chúng còn bao gồm axeton.

Đối với sáng chế thứ hai, mỗi trong số các thuật ngữ "chất chuyển hóa có thể sản xuất từ axetyl-CoA làm chất trung gian" và "chất chuyển hóa (hữu dụng) có nguồn gốc từ axetyl-CoA" được sử dụng làm tên chung cho các chất chuyển hóa (hữu dụng) được sản xuất qua axetyl-CoA trong các tiến trình chuyển hóa. Các ví dụ về chúng bao gồm các axit hữu cơ như axit citric, axit itaconic, hoặc axit (poly-)3-hydroxybutyric. Các ví dụ về chúng còn bao gồm axit 3-hydroxybutyric, axit polyglutamic, axit 3-hydroxyisobutyric, axit 3-aminoisobutyric, axit 2-hydroxyisobutyric, axit metacrylic, axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit caproic, hoặc axit mevalonic.

"Sản xuất axetyl-CoA" theo sáng chế đề cập đến sự chuyển hóa chất nhất định

thành axetyl-CoA trong tiến trình chuyển hóa. Vì axetyl-CoA là chất trung gian chuyển hóa và được chuyển hóa nhanh chóng thành các chất khác nhau trong các tiến trình chuyển hóa, lượng axetyl-CoA biểu kiến không nhất thiết tăng. Tuy nhiên, hiệu quả có thể được xác nhận gián tiếp bằng cách dò tìm nhãn có nguồn gốc CO_2 trong chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA, bằng cách tăng hiệu suất của chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA tương ứng với sự tiêu thụ đường, hoặc tương tự. Vì nhiều yếu tố (ví dụ, lượng coenzym, lượng cơ chất, hoặc sự thay đổi trong việc chuyển hóa gây ra bởi sự ức chế phản hồi) tập trung vào sự chuyển hóa axetyl-CoA thành chất khác, nên lượng axetyl-CoA sản xuất luôn không tỷ lệ với tổng lượng chất có nguồn gốc từ axetyl-CoA. Tuy nhiên, trong trường hợp trong đó tiến trình sản xuất chất cụ thể từ axetyl-CoA được tăng cường hoặc trong trường hợp trong đó tiến trình này về bản chất là mạnh (ví dụ, trong trường hợp vi sinh vật sản xuất axit glutamic được mô tả dưới đây), hiệu quả chuyển hóa axetyl-CoA thành chất xuôi dòng ít có khả năng bị tác động bởi các yếu tố bên ngoài, và, do đó, hiệu quả sản xuất chất cụ thể có thể được đánh giá là chỉ số hiệu quả sản xuất axetyl-CoA.

Dưới đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ nhất là vi sinh vật bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d) hoặc (e) được mô tả ở trên,

thu được vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c), hoặc (d) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a), (b), (c), hoặc (d) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c), hoặc (d) được truyền vào vi sinh vật,

trong đó, ở vi sinh vật: ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat kinaza, pyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxykinaza, malat dehydrogenaza, malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, hydroxypyruvat isomeraza, hydroxypyruvat reductaza, glyxerat 2-kinaza, glyxerat 3-kinaza, phosphoglyxerat mutaza, và enolaza, được tăng cường; ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm enzym malic và fumarat reductaza được làm bất hoạt hoặc được

làm giảm; hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, vi sinh vật theo sáng chế thứ nhất tốt hơn là được truyền bằng hoạt tính enzym của malat thiokinaza, tốt hơn nữa là các hoạt tính enzym của malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza, còn tốt hơn nữa là các hoạt tính enzym của malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza, và thậm chí tốt hơn nữa là các hoạt tính enzym của malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, và 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và/hoặc hydroxypyruvat reductaza.

Vi sinh vật theo sáng chế thứ nhất có chu trình sản xuất axetyl-CoA đơn giản và thực tế, chu trình này cố định CO₂ và chuyển hóa thành axetyl-CoA. Chu trình này được mô tả chi tiết hơn dựa vào Fig. 1.

Chu trình sản xuất axetyl-CoA được minh họa trên Fig. 1 thể hiện một ví dụ ưu tiên về chu trình sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ nhất (dưới đây còn được đề cập đến là "chu trình của Fig. 1").

Như được minh họa trên Fig. 1, chu trình sản xuất axetyl-CoA bao gồm các mục từ (f) đến (m) sau:

(f) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: pyruvat kinaza (Pyk) và pyruvat carboxylaza (Pyc); phosphoenolpyruvat carboxylaza (Ppc); và phosphoenolpyruvat carboxykinaza (Pck);

(g) malat dehydrogenaza (Mdh);

(h) malat thiokinaza (Mtk);

(i) malyl-CoA lyaza (Mcl);

(j) glyoxylat carboligaza (Gcl);

(k) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (GlxR); và hydroxypyruvat isomeraza (Hyi) và hydroxypyruvat reductaza (YcdW);

(l) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: glyxerat 2-kinaza (GarK); và glyxerat 3-kinaza (GlxK) và phosphoglyxerat mutaza (Gpm); và

(m) enolaza (Eno).

Theo sáng chế, chu trình sản xuất axetyl-CoA tốt hơn là thực sự chỉ bao gồm các

mục từ (f) đến (m) được mô tả ở trên. Chu trình sản xuất axetyl-CoA mà tốt hơn là vi sinh vật theo sáng chế là chu trình sản xuất axetyl-CoA chỉ bao gồm các mục từ (f) đến (m) được mô tả ở trên.

Trong số các enzym được mô tả ở trên, Pyc, Ppc, và Pck được bao gồm trong sự cố định CO₂. CO₂ là liên kết đầu tiên với phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat nhờ tác động của Ppc, Pck, hoặc Pyc, và được chuyển hóa thành oxaloaxetat. Oxaloaxetat được chuyển hóa thành malat nhờ tác động của Mdh. Malat được chuyển hóa thành malyl-CoA (malat CoA) bằng tác động của Mtk. Malyl-CoA (malat CoA) được chuyển hóa thành axetyl-CoA và glyoxylat bằng tác động của Mcl. Glyoxylat được chuyển hóa thành 2-hydroxy-3-oxopropionat bằng tác động của Gcl. 2-hydroxy-3-oxopropionat được chuyển hóa thành glyxerat bằng tác động của GlxR, hoặc theo cách khác, chuyển hóa thành hydroxypyruvat bằng tác động của Hyi và sau đó thành glyxerat bằng tác động của YcdW. Glyxerat được chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat bằng tác động của GarK, hoặc theo cách khác, chuyển hóa thành 3-phosphoglyxerat bằng tác động của GlxK và sau đó chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat bằng tác động của Gpm. 2-phosphoglyxerat được chuyển hóa thành phosphoenolpyruvat bằng tác động của Eno. Trong trường hợp trong đó Pyk và Pyc được bao gồm trong chu trình, phosphoenolpyruvat được chuyển hóa thành pyruvat bằng tác động của Pyk.

Vi sinh vật theo sáng chế thứ hai là vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc chi *Cupriavidus* thu được bằng cách truyền ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza, vào vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a2), (b2), (c2), (d2) hoặc (e2) được mô tả ở trên,

vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc chi *Cupriavidus* thu được mà không truyền bất kỳ trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) được truyền vào vi sinh vật. Do đó, (a2), (b2), (c2), (d2), và (e2) lần lượt có các định nghĩa như (a), (b), (c), (d), và (e) theo sáng chế thứ nhất.

Đối với ví dụ được ưu tiên về vi sinh vật theo sáng chế thứ hai, vi sinh vật bao gồm tiến trình qua glyxin (dưới đây còn được đề cập đến là "tiến trình glyxin") được mô tả. Vi sinh vật có ít nhất một kiểu hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm glyxin transaminaza và hệ phân tách glyxin. Tiến trình glyxin được mô tả dựa vào Fig. 2.

Như được mô tả trên Fig. 2, tiến trình glyxin bao gồm:

ít nhất một phản ứng enzym được chọn từ nhóm bao gồm (a3) và (b3);

các phản ứng enzym của (c3), (d3), (e3), (f3), và (g3); và

ít nhất một phản ứng enzym được chọn từ nhóm bao gồm: phản ứng enzym của (h3); các phản ứng enzym của (i3), (j3), (k3), và (n3); và các phản ứng enzym của (i3), (j3), (l3), (m3), và (n3).

(a3) phản ứng enzym từ phosphoenolpyruvat thành oxaloaxetat.

(b3) phản ứng enzym từ pyruvat thành oxaloaxetat.

(c3) phản ứng enzym từ oxaloaxetat thành malat.

(d3) phản ứng enzym từ malat thành malyl-CoA.

(e3) phản ứng enzym từ malyl-CoA thành glyoxylat và axetyl-CoA.

(f3) phản ứng enzym từ glyoxylat thành glyxin.

(g3) phản ứng enzym từ glyxin thành serin.

(h3) phản ứng enzym từ serine thành pyruvat.

(i3) phản ứng enzym từ serin thành 3-hydroxypyruvat.

(j3) phản ứng enzym từ 3-hydroxypyruvat thành glyxerat.

(k3) phản ứng enzym từ glyxerat thành 2-phosphoglyxerat.

(l3) phản ứng enzym từ glyxerat thành 3-phosphoglyxerat.

(m3) phản ứng enzym từ 3-phosphoglyxerat thành 2-phosphoglyxerat.

(n3) phản ứng enzym từ 2-phosphoglyxerat thành phosphoenolpyruvat.

Các ví dụ về (a3) bao gồm phản ứng enzym tham gia vào một phản ứng bất kỳ trong số phản ứng gây ra bởi phosphoenolpyruvat carboxylaza, phản ứng gây ra bởi phosphoenolpyruvat carboxykinaza, hoặc phản ứng gây ra bởi pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza.

Các ví dụ về (b3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi pyruvat carboxylaza.

Các ví dụ về (c3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi malat dehydrogenaza.

Các ví dụ về (d3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi malat thiokinaza.

Các ví dụ về (e3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi malyl-CoA lyaza.

Các ví dụ về (f3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi glyxin transaminaza.

Các ví dụ về (g3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi hệ phân tách glyxin và serin hydroxymethyltransferaza.

Các ví dụ về (h3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi serin dehydrataza.

Các ví dụ về (i3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi serin transaminaza.

Các ví dụ về (j3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi hydroxypyruvat reductaza.

Các ví dụ về (k3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi glyxerat 2-kinaza.

Các ví dụ về (l3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi glyxerat 3-kinaza.

Các ví dụ về (m3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi phosphoglyxerat mutaza.

Các ví dụ về (n3) bao gồm phản ứng enzym gây ra bởi enolaza.

Trong tiến trình glyxin, sự chuyển hóa serin thành pyruvat có thể được thực hiện bằng phản ứng enzym mà trực tiếp chuyển hóa serin thành pyruvat (phản ứng (h3) nêu trên), hoặc các phản ứng enzym mà chuyển hóa serin thành pyruvat qua 3-hydroxypyruvat (các phản ứng bao gồm phản ứng (i3) nêu trên và các phản ứng cùng hướng với nó).

Trong trường hợp trong đó sự chuyển hóa serin thành pyruvat đạt được bằng phản ứng enzym mà chuyển hóa serin thành pyruvat qua 3-hydroxypyruvat (các phản ứng bao gồm phản ứng (i3) nêu trên và các phản ứng cùng hướng với nó), sự chuyển hóa glyxerat thành 2-phosphoglyxerat có thể là phản ứng enzym mà trực tiếp chuyển hóa glyxerat thành 2-phosphoglyxerat (phản ứng (k3) nêu trên), hoặc bằng các phản ứng enzym mà chuyển hóa glyxerat thành 2-phosphoglyxerat qua 3-phosphoglyxerat (các phản ứng bao gồm phản ứng (l3) và (m3) nêu trên).

Ví dụ được ưu tiên về vi sinh vật theo sáng chế thứ hai có:

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm (a4) và (b4);

các enzym của (c4), (d4), (e4), (f4), và (g4); và

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm:

(h4);

(i4), (j4), (k4), và (n4); và

(i4), (j4), (l4), (m4), và (n4).

(a4) Ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza; phosphoenolpyruvat carboxylaza; và phosphoenolpyruvat carboxykinaza.

(b4) Pyruvat carboxylaza.

(c4) Malat dehydrogenaza.

(d4) Malat thiokinaza.

(e4) Malyl-CoA lyaza.

(f4) Glyxin transaminaza.

(g4) Hệ phân tách glyxin và serin hydroxymetyltransferaza.

(h4) Serin dehydrataza.

(i4) Serin transaminaza.

(j4) Hydroxypyruvat reductaza.

(k4) Glyxerat 2-kinaza.

(l4) glyxerat 3-kinaza.

(m4) Phosphoglyxerat mutaza.

(n4) Enolaza.

Sự chuyển hóa các chất trong chu trình của Fig. 1 và tiền trình glyxin trên Fig. 2 được mô tả chi tiết dưới đây.

Pyruvat carboxylaza (Pyc) và phosphoenolpyruvat carboxylaza (Ppc) là các enzym cố định cacbon dioxit có hoạt tính cao. Ví dụ, RubisCO được sử dụng trong sự quang hợp ở thực vật hoặc tương tự được biết đến có hoạt tính đặc hiệu từ khoảng 3 U/mg đến khoảng 20 U/mg (Journal of Biological Chemistry, 1999; 274(8): 5078-5082, Salvucci M. E. et al., Analytical Biochemistry, 1986; 153(1): 97-101). Mặt khác, pyruvat carboxylaza và phosphoenolpyruvat carboxylaza được báo cáo có hoạt tính đặc hiệu là 30 U/mg ở *Escherichia coli*, hoặc cao bằng 100 U/mg đến 150 U/mg (Journal of Biological Chemistry, 1972; 247(18): 5785-5792, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995; 59(1): 140-142, Biochimica et Biophysica Acta, 2000; 1475(3): 191-206).

Hơn nữa, không phải chu trình của Fig. 1 mà cũng không phải tiền trình glyxin

của Fig. 2 chứa enzym tiêu thụ axetyl-CoA. Do đó, có thể nói rằng chu trình của Fig. 1 và tiến trình glyxin của Fig. 2 là các chu trình lý tưởng để cố định CO_2 và chuyển hóa nó thành axetyl-CoA.

Enzym tiêu thụ axetyl-CoA như được mô tả ở trên đề cập đến enzym mà sử dụng axetyl-CoA làm cơ chất và chuyển hóa axetyl-CoA thành chất khác, và các ví dụ về chúng bao gồm axetyl-CoA carboxylaza và pyruvat synthaza.

Chu trình không bao gồm enzym tiêu thụ axetyl-CoA nghĩa là chu trình không phải là chu trình kín trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa trở lại thành axetyl-CoA thông qua chu trình do hoạt tính enzym tiêu thụ axetyl-CoA. Trường hợp trong đó chất được sản xuất bởi sự chuyển hóa do enzym tiêu thụ axetyl-CoA được chuyển hóa tiếp thành sản phẩm khác mà không quay trở lại axetyl-CoA (ví dụ, trường hợp chuyển hóa thành glutamat ở dạng sản phẩm cuối trong tiến trình sản xuất glutamat), không được bao gồm trong phạm vi của "chu trình chứa enzym tiêu thụ axetyl-CoA", vì tiến trình không phải là chu trình kín. Chu trình kín đề cập đến tiến trình mà bắt đầu từ một chất bất kỳ của tiến trình, và qua đó chất được chuyển hóa thành chất khác, và cuối cùng chuyển hóa thành chất giống như chất ban đầu.

Axetyl-CoA carboxylaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 6.4.1.2, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa axetyl-CoA và CO_2 thành malonyl-CoA.

Pyruvat synthaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.2.7.1, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa axetyl-CoA thành pyruvat.

Ưu điểm khác của chu trình của Fig. 1 và tiến trình glyxin của Fig. 2 là, vì các tiến trình này là độc lập với tiến trình glycolytic, mỗi tiến trình có thể được kết hợp tùy ý với các tiến trình glycolytic khác nhau. Ví dụ, chu trình của Fig. 1 và tiến trình glyxin của Fig. 2 có thể được kết hợp dễ dàng với tiến trình pentoza phosphat, mà sản xuất NADPH với tốc độ sản xuất cao và thường được sử dụng trong việc sản xuất các chất (công bố đơn Nhật Bản số (JP-A) 2007-510411), vì chu trình của Fig. 1 và tiến trình glyxin của Fig. 2 là độc lập với tiến trình pentoza phosphat.

Trong chu trình của Fig. 1, malat dehydrogenaza (Mdh), 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (GlxR), và hydroxypyruvat reductaza (YcdW) tiêu thụ NADH (hoặc NADPH) ở dạng khả năng khử; malat thiokinaza (Mtk), glyxerat

2-kinaza (GarK), glyxerat 3-kinaza (GlxK), và pyruvat carboxylaza (Pyc) tiêu thụ ATP; và pyruvat kinaza (Pyk) sản xuất pyruvat.

Trong trường hợp trong đó phosphoenolpyruvat được sử dụng làm chất ban đầu, phương trình cân bằng đối với chu trình của Fig. 1 là: "phosphoenolpyruvat + 2CoA + CO₂ + 3NAD(P)H + 3ATP → 2axetyl-CoA + 3NAD(P)⁺ + 3ADP". Trong trường hợp trong đó pyruvat được sử dụng làm chất ban đầu, thì phương trình cân bằng là: "pyruvat + 2CoA + CO₂ + 3NAD(P)H + 4ATP → 2axetyl-CoA + 3NAD(P)⁺ + 4ADP".

Nghĩa là, chu trình của Fig. 1 cần cung cấp phosphoenolpyruvat (hoặc pyruvat), NAD(P)H, và ATP để cố định CO₂ và chuyển hóa nó thành axetyl-CoA.

Trong tiến trình glyxin của Fig. 2, malat dehydrogenaza (Mdh) và hydroxypyruvat reductaza (YcdW) tiêu thụ NADH (hoặc NADPH) ở dạng khả năng khử. Trong trường hợp trong đó glyoxylat được chuyển hóa thành glyxin, khả năng khử tương ứng với một phân tử NADH (hoặc NADPH) được tiêu thụ trực tiếp bằng glyxin dehydrogenaza hoặc gián tiếp qua axit amin khác với trung gian là aminotransferaza như glyoxylat aminotransferaza. Hệ phân tách glyxin tiêu thụ NAD⁺ (hoặc NADP⁺) và chuyển hóa nó thành NADH (hoặc NADPH). Trong trường hợp trong đó serin được chuyển hóa thành 3-hydroxypyruvat, NAD⁺ (hoặc NADP⁺) được tiêu thụ và được chuyển hóa thành NADH (hoặc NADPH) trực tiếp bằng serin dehydrogenaza hoặc gián tiếp qua axit amin khác với trung gian là aminotransferaza như serin aminotransferaza.

Malat thiokinaza (Mtk), glyxerat 2-kinaza (GarK), glyxerat 3-kinaza (GlxK), và pyruvat carboxylaza (Pyc) tiêu thụ ATP. Trong trường hợp trong đó amoniac được kết hợp vào hệ chuyển hóa, đôi khi ATP được tiêu thụ. Pyruvat kinaza (Pyk) sản xuất pyruvat.

Trong trường hợp trong đó phosphoenolpyruvat được sử dụng làm chất ban đầu, phương trình cân bằng đối với tiến trình của Fig. 2 là: "phosphoenolpyruvat + 2CoA + CO₂ + 3NAD(P)H + 3 đến 5ATP → 2axetyl-CoA + 3NAD(P)⁺ + 3 đến 5ADP". Trong trường hợp trong đó pyruvat được sử dụng làm chất ban đầu, phương trình cân bằng là: "pyruvat + 2CoA + CO₂ + 3NAD(P)H + 4 đến 6ATP → 2axetyl-CoA + 3NAD(P)⁺ + 4 đến 6ADP".

Trong số các quá trình lên men sản xuất axetyl-CoA làm chất trung gian, các phương trình cân bằng của các quá trình tiêu thụ oxy trong khi lên men được liệt kê trong

Bảng 1. Giả thiết là, trong các quá trình lên men này, coenzym khử như NADH được sản xuất trong suốt quá trình lên men và coenzym khử được chuyển hóa thành dạng được oxy hóa bằng tác động của oxy. Do đó, nếu coenzym khử được sản xuất được tiêu thụ bởi chu trình của Fig. 1 và/hoặc tiến trình glyxin của Fig. 2 thay cho oxy, có thể mong đợi rằng khả năng khử được tạo ra trong suốt quá trình lên men có thể được sử dụng hiệu quả trong chu trình sản xuất axetyl-CoA để cố định CO₂ và chuyển hóa nó thành sản phẩm.

Do đó, coenzym khử đề cập đến coenzym ở trạng thái khử mà được bao gồm trong phản ứng oxy hóa - khử, và các ví dụ về chúng bao gồm NADH, NADPH, FADH₂, FMNH₂, và quinon coenzym khử. Tốt hơn, nếu coenzym khử là NADH hoặc NADPH, và tốt hơn nữa là NADH. Coenzym được oxy hóa đề cập đến dạng được oxy hóa của coenzym khử, và các ví dụ về chúng bao gồm NAD⁺, NADP⁺, FAD, FMN, và quinon coenzym được oxy hóa. Tốt hơn, nếu coenzym được oxy hóa là NAD⁺ hoặc NADP⁺, và tốt hơn nữa là NAD⁺.

Bảng 1

Tên hợp chất	Phương trình lên men
Rượu isopropylic	$C_6H_{12}O_6 + H_2O + 3/2O_2 \rightarrow C_3H_8O + 3CO_2 + 3H_2O$
Axeton	$C_6H_{12}O_6 + 2O_2 \rightarrow C_3H_6O + 3H_2O + 3CO_2$
Axit glutamic	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 + NH_3 \rightarrow C_5H_9NO_4 + CO_2 + 3H_2O$
Glutamin	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 + 2NH_3 \rightarrow C_5H_{10}N_2O_3 + CO_2 + 4H_2O$
Arginin	$C_6H_{12}O_6 + 1/2O_2 + 4NH_3 \rightarrow C_6H_{14}N_2O_2 + 5H_2O$
Ornithin	$C_6H_{12}O_6 + 1/2O_2 + 2NH_3 \rightarrow C_5H_{12}N_2O_2 + 3H_2O + CO_2$
Citrullin	$C_6H_{12}O_6 + 1/2O_2 + 3NH_3 \rightarrow C_6H_{13}N_3O_3 + 4H_2O$
Prolin	$C_6H_{12}O_6 + 1/2O_2 + NH_3 \rightarrow C_5H_9NO_2 + 3H_2O + CO_2$
Axit axetic	$C_6H_{12}O_6 + 2O_2 \rightarrow 2C_2H_4O_2 + 2CO_2 + 2H_2O$
Axit (poly-)3-hydroxybutyric	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 \rightarrow C_4H_8O_3 + 2CO_2 + 2H_2O$
Axit itaconic	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 \rightarrow C_5H_6O_4 + CO_2 + 3H_2O$
Axit xitric	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 \rightarrow C_6H_8O_7 + 2H_2O$

Axit butyric	$C_6H_{12}O_6 + O_2 \rightarrow C_4H_8O_2 + 2H_2O + 2CO_2$
Leuxin (Isoleuxin)	$3/2C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 + NH_3 \rightarrow C_6H_{13}NO_2 + 4H_2O + 3CO_2$
Axit 4-aminobutyric	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 + NH_3 \rightarrow C_4H_9NO_2 + 3H_2O + 2CO_2$
Axit 4-hydroxybutyric	$C_6H_{12}O_6 + 3/2O_2 \rightarrow C_4H_8O_3 + 2H_2O + 2CO_2$

Như được minh họa trong Bảng 1, sự lên men trong đó oxy có mặt ở vị trí bên trái của phương trình lên men thường cần lượng lớn oxy. Trong các trường hợp này, đôi khi cần sục khí rộng và/hoặc khuấy mạnh, dẫn đến làm tăng chi phí thiết bị và chi phí năng lượng điện. Do đó, bằng cách đưa chu trình của Fig. 1 hoặc tiến trình glyxin của Fig. 2 vào hệ sản xuất chất, có thể tiêu thụ năng lượng khử dư bằng chu trình của Fig. 1 hoặc tiến trình glyxin của Fig. 2 thay vì bằng oxy, và có thể điều tiết việc sục khí rộng/khuấy, và có thể mong đợi giảm được chi phí quá trình sản xuất lên men.

Để cung cấp khả năng khử cho chu trình của Fig. 1 hoặc tiến trình glyxin của Fig. 2, khả năng khử có thể được thực hiện bằng cách thêm chất mà có thể tạo ra năng lượng khử hoặc bằng cách truyền năng lượng từ bên ngoài. Cách thức cụ thể bao gồm sử dụng chất mà có độ khử cao (ví dụ, hydro, sulfit, rượu, hoặc parafin) làm cơ chất; cung cấp năng lượng khử trực tiếp bằng cách nuôi cấy bằng điện; và cung cấp năng lượng khử bằng phản ứng quang hóa của sinh vật. Cung cấp năng lượng khử từ bên ngoài cho phép tiến trình cố định cacbon dioxit theo sáng chế được thực hiện ngay cả trong các trường hợp khi sự lên men không bao gồm việc sinh ra coenzym khử, khác với các quá trình lên men được chỉ ra ở Bảng 1.

Các enzym được bao gồm trong chu trình của Fig. 1 và các enzym được bao gồm trong tiến trình glyxin trên Fig. 2 được mô tả chi tiết dưới đây.

Pyruvat kinaza (Pyk), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 2.7.1.40, là tên chung đối với các enzym mà chuyển hóa phosphoenolpyruvat và ADP thành pyruvat và ATP. Các ví dụ về pyruvat kinaza bao gồm các loại thuộc vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Đối với gen mã hóa pyruvat kinaza (pyk), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa pyruvat kinaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình

tự ADN tổng hợp được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Pyruvat carboxylaza (Pyc), được phân loại theo Tiêu bản Enzym số: 6.4.1.1, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa pyruvat và cacbon dioxid thành oxaloaxetat. Phản ứng tiêu thụ ATP, và sản xuất ADP và phosphat. Các ví dụ về pyruvat carboxylaza bao gồm các loại thuộc vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, hoặc vi khuẩn *Mycobacterium* như *Mycobacterium smegmatis*.

Đối với gen mã hóa pyruvat carboxylaza (pyc), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa pyruvat carboxylaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, hoặc vi khuẩn *Mycobacterium* như *Mycobacterium smegmatis*.

Phosphoenolpyruvat carboxylaza (Ppc), được phân loại theo Tiêu bản Enzym số: 4.1.1.31, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa phosphoenolpyruvat và cacbon dioxid thành oxaloaxetat và phosphat. Các ví dụ về phosphoenolpyruvat carboxylaza bao gồm các loại thuộc vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*, vi khuẩn *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum*, vi khuẩn *Starkeya* như *Starkeya novella*, vi khuẩn *Rhodopseudomonas* như *Rhodopseudomonas sp.*, hoặc vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces coelicolor*.

Đối với gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza (ppc), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxylaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*, vi khuẩn *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum*, vi khuẩn *Starkeya* như *Starkeya novella*, vi khuẩn *Rhodopseudomonas* như *Rhodopseudomonas sp.*,

hoặc vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces coelicolor*.

Phosphoenolpyruvat carboxykinaza (Pck), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.1.1.32, Tiểu ban Enzym số: 4.1.1.38, hoặc Tiểu ban Enzym số: 4.1.1.49, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa phosphoenolpyruvat và cacbon dioxit thành oxaloaxetat. Trong số các enzym này, enzym được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.1.1.32 được bao gồm trong phản ứng chuyển hóa GDP thành GTP; enzym được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.1.1.38 được bao gồm trong phản ứng chuyển hóa phosphat thành pyrophosphat; và enzym được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.1.1.49 được bao gồm trong phản ứng chuyển hóa ADP thành ATP. Các ví dụ về phosphoenolpyruvat carboxykinaza bao gồm các loại thuộc vi khuẩn *Actinobacillus* như *Actinobacillus succinogenes*, vi khuẩn *Mycobacterium* như *Mycobacterium smegmatis*, hoặc vi khuẩn *Trypanosoma* như *Trypanosoma brucei*.

Đối với gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxykinaza (pck), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa phosphoenolpyruvat carboxykinaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ *Actinobacillus* như *Actinobacillus succinogenes*, vi khuẩn *Mycobacterium* như *Mycobacterium smegmatis*, hoặc vi khuẩn *Trypanosoma* như *Trypanosoma brucei*.

Malat dehydrogenaza (Mdh), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.1.1.37, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác cho phản ứng tạo thành malat từ oxaloaxetat sử dụng NADH làm coenzym. Các ví dụ về malat dehydrogenaza bao gồm các loại thuộc vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Đối với gen mã hóa malat dehydrogenaza (mdh), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa malat dehydrogenaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Malat thiokinaza (Mtk), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 6.2.1.9, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng gắn kết malat thành CoA tạo ra

maly-CoA. Trong phản ứng này, một phân tử của ATP được tiêu thụ, và một phân tử của ADP và một phân tử của phosphat được tạo ra. Malat thiokinaza gồm có cấu trúc siêu phân tử lớn có khoảng 400 axit amin và cấu trúc siêu phân tử nhỏ có 300 axit amin. Trong gen, cấu trúc siêu phân tử lớn thường được theo sau bởi cấu trúc siêu phân tử nhỏ. Ở đây, để thuận tiện, cấu trúc siêu phân tử lớn được gọi là mtkB, và cấu trúc siêu phân tử nhỏ được gọi là mtkA. Đã có báo cáo là hoạt tính đặc hiệu của malat thiokinaza được tinh chế là, ví dụ, 2,5 U/mg (Analytical Biochemistry, 1995; 227(2): 363-367).

Chủ yếu, malat thiokinaza được tìm thấy trong tiến trình đồng hóa đối với các nguồn cacbon C1 như metan (Journal of Bacteriology, 1994; 176(23): 7398-7404) và tiến trình 3-hydroxypropionat (Archives of Microbiology, 1989; 151: 252-256). Gen mã hóa maly-CoA lyaza có mặt ở vùng lân cận của gen mã hóa malat thiokinaza trong bộ gen, và tốt hơn là gen mã hóa malat thiokinaza và có mặt ở vị trí này được sử dụng.

Các ví dụ về malat thiokinaza bao gồm từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens* (các SEQ ID NO: 1 và 2), từ *Granulibacter* như *Granulibacter bethesdensis* (các SEQ ID NO: 3 và 4), từ *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* (các SEQ ID NO: 5 và 6) hoặc *Hyphomicrobium denitrificans* (các SEQ ID NO: 7 và 8), từ *Rhizobium* như *Rhizobium* sp. NGR234 (các SEQ ID NO: 9 và 10), từ *Nitrosomonas* như *Nitrosomonas europaea* (các SEQ ID NO: 11 và 12), từ *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus* (các SEQ ID NO: 13 và 14), và từ Gammaproteobacteria (các SEQ ID NO: 15 và 16).

Xét về hiệu quả sản xuất các chất hữu dụng được sản xuất qua axetyl-CoA, các ví dụ được ưu tiên về malat thiokinaza bao gồm từ *Hyphomicrobium* (các SEQ ID NO: 5 và 6, và các SEQ ID NO: 7 và 8), từ *Rhizobium* (các SEQ ID NO: 9 và 10), từ *Nitrosomonas* (các SEQ ID NO: 11 và 12), từ *Methylococcus* (các SEQ ID NO: 13 và 14), và từ Gammaproteobacteria (các SEQ ID NO: 15 và 16).

Malat thiokinaza từ *Hyphomicrobium* (các SEQ ID NO: 5 và 6, và các SEQ ID NO: 7 và 8), malat thiokinaza từ *Rhizobium* (các SEQ ID NO: 9 và 10) và malat thiokinaza từ *Nitrosomonas* (các SEQ ID NO: 11 và 12) có chung 65% đến 80% tính tương đồng trình tự với nhau. Malat thiokinaza từ *Methylococcus* (các SEQ ID NO: 13 và 14) có chung 70% đến 80% tính tương đồng trình tự với malat thiokinaza từ Gammaproteobacteria (ví dụ, các SEQ ID NO: 15 và 16).

Các protein có ít nhất 70% trình tự axit amin tương đồng với bất kỳ trong số các

trình tự amino của malat thiokinaza từ *Hyphomicrobium*, malat thiokinaza từ *Rhizobium*, malat thiokinaza từ *Nitrosomonas*, malat thiokinaza từ *Methylococcus*, hoặc malat thiokinaza từ Gammaproteobacteria được bộc lộ trong sáng chế, và có hoạt tính malat thiokinaza có thể được sử dụng thích hợp để sản xuất axetyl-CoA hoặc các chất hữu dụng sản xuất được từ axetyl-CoA.

Đối với gen mã hóa malat thiokinaza (mtk), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa malat thiokinaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens* (các SEQ ID NO: 17 và 18), *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* hoặc *Hyphomicrobium denitrificans*, *Rhizobium* như *Rhizobium* sp. NGR234, *Granulibacter* như *Granulibacter bethesdensis*, *Nitrosomonas* như *Nitrosomonas europaea*, *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*, hoặc Gammaproteobacterium. Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ *Hyphomicrobium* (các SEQ ID NO: 19 và 20, và các SEQ ID NO: 21 và 22), *Rhizobium* như *Rhizobium* trong đó việc sử dụng codon được tối ưu (ví dụ, SEQ ID NO: 23), *Granulibacter* (các SEQ ID NO: 24 và 25), *Nitrosomonas* (các SEQ ID NO: 26 và 27), *Methylococcus* (các SEQ ID NO: 28 và 29), hoặc Gammaproteobacteria (các SEQ ID NO: 30 và 31).

Các ví dụ về chúng được ưu tiên hơn bao gồm trình tự bazơ của gen từ *Hyphomicrobium* (các SEQ ID NO: 19 và 20, và các SEQ ID NO: 21 và 22), *Rhizobium* như *Rhizobium* trong đó việc sử dụng codon được tối ưu (ví dụ, SEQ ID NO: 23), *Nitrosomonas* (các SEQ ID NO: 26 và 27), *Methylococcus* (các SEQ ID NO: 28 và 29), hoặc Gammaproteobacteria (các SEQ ID NO: 30 và 31).

Các vi sinh vật methanotrophic như *Methylobacterium extorquens* thực chất có malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza. Tuy nhiên, vì các hệ vectơ thích hợp cho vi sinh vật methanotrophic hoặc các kỹ thuật để biến đổi gen bộ gen của vi sinh vật methanotrophic không được phát triển, việc thao tác gen vi sinh vật bằng tay thông thường khó được so sánh với vi sinh vật công nghiệp như *Escherichia coli* và *Corynebacterium*. Hơn nữa, các vi sinh vật methanotrophic phát triển chậm trong nhiều trường hợp và do đó không thích hợp để sản xuất các chất chuyển hóa hữu dụng.

Malyl-CoA lyaza (Mcl), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.1.3.24, là enzym mà làm xúc tác phản ứng sản xuất glyoxylat và axetyl-CoA từ malyl-CoA. Các ví dụ về malyl-CoA lyaza bao gồm từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens*, *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* hoặc *Hyphomicrobium denitrificans*, *Chloroflexus* như *Chloroflexus aurantiacus*, *Nitrosomonas* như *Nitrosomonas europaea*, hoặc *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*. Được báo cáo là hoạt tính cụ thể của malyl-CoA lyaza được tinh chế trong *Methylobacterium extorquens* là, ví dụ, 28,1 U/mg (Biochemical Journal, 1974; 139(2): 399-405).

Xét về hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, các ví dụ được ưu tiên về malyl-CoA lyaza bao gồm enzym có trình tự axit amin từ *Methylobacterium* (SEQ ID NO: 32), *Hyphomicrobium* (SEQ ID NO: 33 và 34), *Nitrosomonas* (SEQ ID NO: 35), hoặc *Methylococcus* (SEQ ID NO: 36).

Đối với gen mã hóa malyl-CoA lyaza (mcl), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa malyl-CoA lyaza thu được từ sinh vật nói trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ *Methylobacterium* như *Methylobacterium extorquens*, *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium methylovorum* hoặc *Hyphomicrobium denitrificans*, hoặc *Chloroflexus* như *Chloroflexus aurantiacus*. Xét về hiệu quả sản xuất của axetyl-CoA, các ví dụ về chúng được ưu tiên hơn bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ *Methylobacterium* và gen có trình tự bazơ của gen từ *Hyphomicrobium*.

Các ví dụ cụ thể về các trình tự bazơ được ưu tiên của gen từ *Methylobacterium* bao gồm trình tự bazơ của gen từ *Methylobacterium extorquens* (SEQ ID NO: 37). Các ví dụ cụ thể về các trình tự bazơ được ưu tiên của gen từ *Hyphomicrobium* bao gồm trình tự bazơ của gen từ *Hyphomicrobium methylovorum* (SEQ ID NO: 38) hoặc *Hyphomicrobium denitrificans* (SEQ ID NO: 39). Các ví dụ cụ thể về các trình tự bazơ được ưu tiên của gen từ *Nitrosomonas* bao gồm trình tự bazơ của gen từ *Nitrosomonas europaea* (SEQ ID NO: 40). Các ví dụ cụ thể về các trình tự bazơ được ưu tiên của gen từ *Methylococcus* bao gồm trình tự bazơ của gen từ *Methylococcus capsulatus* (SEQ ID NO: 41).

Glyoxylat carboligaza (Gcl), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.1.1.47, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa hai phân tử glyoxylat

thành một phân tử 2-hydroxy-3-oxopropionat. Phản ứng này được thực hiện bằng cách decarboxyl hóa một phân tử cacbon dioxid. Các ví dụ về glyoxylat carboligaza bao gồm từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Rhodococcus* như *Rhodococcus jostii*.

Đối với gen mã hóa glyoxylat carboligaza (gcl), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa glyoxylat carboligaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Rhodococcus* như *Rhodococcus jostii*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.1.1.60, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa 2-hydroxy-3-oxopropionat thành glyxerat sử dụng NADH làm coenzym. Các ví dụ về 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza bao gồm từ vi khuẩn *Rhodococcus* như *Rhodococcus jostii*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Đối với gen mã hóa 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (glxR), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Rhodococcus* như *Rhodococcus jostii*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Hydroxypyruvat isomeraza (Hyi), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 5.3.1.22, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng isome hóa 2-hydroxy-3-oxopropionat thành hydroxypyruvat. Các ví dụ về hydroxypyruvat isomeraza bao gồm từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Đối với gen mã hóa hydroxypyruvat isomeraza (hyi), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa hydroxypyruvat isomeraza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Hydroxypyruvat reductaza (YcdW), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.1.1.81, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa hydroxypyruvat thành glyxerat sử dụng NADH hoặc NADPH làm coenzym. Các ví dụ về hydroxypyruvat reductaza bao gồm từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Đối với gen mã hóa hydroxypyruvat reductaza (ycdW), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa hydroxypyruvat reductaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Glyxerat 2-kinaza (GarK), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 2.7.1.165, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa glyxerat thành 2-phosphoglycerat. Trong phản ứng này, một phân tử ATP được tiêu thụ, và một phân tử ADP và một phân tử phosphat được tạo ra. Các ví dụ về glyxerat 2-kinaza bao gồm từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Đối với gen mã hóa glyxerat 2-kinaza (garK), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa glyxerat 2-kinaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, và vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Glyxerat 3-kinaza (GlxK), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 2.7.1.31 là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa glyxerat thành 3-phosphoglycerat. Trong phản ứng này, một phân tử ATP được tiêu thụ, và một phân tử ADP và một phân tử phosphat được tạo ra. Các ví dụ về glyxerat 3-kinaza bao gồm từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Đối với gen mã hóa glyxerat 3-kinaza (glxK), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa glyxerat 3-kinaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có

thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Phosphoglyxerat mutaza (Gpm), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 5.4.2.1, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa 3-phosphoglyxerat thành 2-phosphoglycerat. Các ví dụ về phosphoglyxerat mutaza bao gồm từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Đối với gen mã hóa phosphoglyxerat mutaza (gpm), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa phosphoglyxerat mutaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Enolaza (Eno), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.2.1.11, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa 2-phosphoglyxerat thành phosphoenolpyruvat. Các ví dụ về enolaza bao gồm từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Đối với gen mã hóa enolaza (eno), ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa enolaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết, có thể được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Glyxin transaminaza (Gta) là enzym làm xúc tác phản ứng chuyển nhóm amino từ hợp chất có nhóm amino (amin bậc hai hoặc amin bậc một) đến glyoxylat và chuyển hóa nó thành glyxin. Các ví dụ về chúng bao gồm, trong số các enzym được phân loại trong nhóm của Tiểu ban Enzym số: 2.6.1, enzym sử dụng glyoxylat làm cơ chất. Các ví dụ cụ thể về chúng bao gồm các enzym được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 2.6.1.*, trong đó * là 4, 35, 44, 45, 60, 63, hoặc 73. Hơn nữa, các hoạt tính enzym tương tự được báo cáo trong một số trường hợp liên quan đến enzym được phân loại theo Tiểu ban

Enzym số: 2.6.1.*, trong đó * là 2, 7, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 27, 38, 40, 42, 57, 64, 72, hoặc 78. Các ví dụ về glyxin transaminaza bao gồm từ *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger*, hoặc *Cupriavidus* như *Cupriavidus necator*. Glyxin transaminaza có thể có hoạt tính serin transaminaza được mô tả dưới đây. Theo sáng chế, glyxin dehydrogenaza (Gdh) được xem là bao gồm trong phạm vi của glyxin transaminaza.

Đối với gen mã hóa glyxin transaminaza (gta), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa glyxin transaminaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger*, hoặc *Cupriavidus* như *Cupriavidus necator*. Theo sáng chế, gen mã hóa glyxin dehydrogenaza được xem là bao gồm trong phạm vi của gen mã hóa glyxin transaminaza.

Đối với gen mã hóa glyxin dehydrogenaza (gdh), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa glyxin dehydrogenaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Mycobacterium* như *Mycobacterium tuberculosis* hoặc *Mycobacterium smegmatis*, hoặc vi khuẩn *Hyphomicrobium* như *Hyphomicrobium vulgare*.

Hệ phân tách glyxin (Gcs) là tên chung của một số enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa glyxin, tetrahydrofolat, và NAD^+ thành 5,10-metylentetrahydrofolat, NH_3 , CO_2 , và NADH. Hệ phân tách glyxin gồm có các protein được gọi là H-protein, P-protein, L-protein, và T-protein (Molecular and Cellular Biochemistry, 1973; 1(2): 169-187). P-protein, L-protein, và T-protein lần lượt được phân loại theo Tiêu bản Enzym số: 1.4.4.2, 1.8.1.4, và 2.1.2.10. Các ví dụ về hệ phân tách glyxin bao gồm từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger*, hoặc *Cupriavidus* như *Cupriavidus necator*.

Đối với các gen mã hóa hệ phân tách glyxin (gcs), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa hệ phân tách glyxin thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea*

ananatis, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger*, hoặc *Cupriavidus* như *Cupriavidus necator*.

Bằng tác động của serin hydroxymethyltransferaza, 5,10-metylentetrahydrofolat được sản xuất bởi hệ phân tách glyxin được phản ứng với glyxin khác và chuyển hóa thành serin. Nghĩa là, bằng tác động của serin hydroxymethyltransferaza, hai phân tử glyxin và NAD^+ được chuyển hóa thành serin, NH_3 , CO_2 , và NADH .

Serin hydroxymethyltransferaza (Shmt), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 2.1.2.1, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa 5,10-metylentetrahydrofolat và glyxin thành serin và tetrahydrofolat. Các ví dụ về serin hydroxymethyltransferaza bao gồm từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Đối với gen mã hóa serin hydroxymethyltransferaza (shmt), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa serin hydroxymethyltransferaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, hoặc vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Serin dehydrataza (Sda), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.3.1.17, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng sản xuất pyruvat và amoniac từ serin. Hơn nữa, các hoạt tính enzym tương tự đôi khi được báo cáo liên quan đến các enzym được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.3.1.19. Các ví dụ về serin dehydrataza bao gồm từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger*, hoặc *Cupriavidus* như *Cupriavidus necator*.

Đối với gen mã hóa serin dehydrataza (sda), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa serin dehydrataza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Corynebacterium* như *Corynebacterium glutamicum*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, vi khuẩn *Pantoea* như *Pantoea ananatis*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger*, hoặc *Cupriavidus* như *Cupriavidus necator*.

Serin transaminaza (Sga) là enzym làm xúc tác cho phản ứng chuyển nhóm amino từ serin vào hợp chất có nhóm carbonyl (nhóm keton hoặc nhóm aldehyt) và chuyển hóa nó thành 3-hydroxypyruvat. Các ví dụ về chúng bao gồm, trong số các enzym được phân loại từ Tiểu ban Enzym số: 2.6.1, enzym mà sử dụng serin làm cơ chất. Các ví dụ cụ thể về chúng bao gồm các enzym được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 2.6.1.51 hoặc 2.6.1.45. Hơn nữa, các hoạt tính enzym tương tự được báo cáo trong một số trường hợp liên quan đến enzym được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 2.6.1.44 hoặc 2.6.1.35. Serin transaminaza có thể có glyxin transaminaza được mô tả ở đây. Các ví dụ về serin transaminaza bao gồm từ *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger*, hoặc *Cupriavidus* như *Cupriavidus necator*. Theo sáng chế, serin 2-dehydrogenaza được xem là bao gồm trong phạm vi của serin transaminaza.

Đối với gen mã hóa serin transaminaza (sga), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa serin transaminaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ *Methylococcus* như *Methylococcus capsulatus*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger*, hoặc *Cupriavidus* như *Cupriavidus necator*. Theo sáng chế, gen mã hóa serin 2-dehydrogenaza được xem là bao gồm trong phạm vi của gen mã hóa serin transaminaza.

Serin 2-dehydrogenaza (Sdh), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.4.1.7, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng sản xuất 3-hydroxypyruvat và amoniac từ serin. Các ví dụ về serin 2-dehydrogenaza bao gồm từ thực vật như *Petroselinum crispum*.

Đối với gen mã hóa serin 2-dehydrogenaza (sdh), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa serin 2-dehydrogenaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ thực vật như *Petroselinum crispum*.

Ở vi sinh vật trong đó chu trình của Fig. 1 không được tạo ra bởi vì vi sinh vật không có một số enzym có trong chu trình của Fig. 1, (các) enzym thiếu hụt này có thể được cung cấp.

Trong số vi khuẩn *Escherichia*, *Escherichia coli*, ví dụ, không có malat

thiokinaza, malyl-CoA lyaza, hoặc glyxin transaminaza, và do đó, ít nhất malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyxin transaminaza có thể được truyền vào.

Trong số vi khuẩn *Pantoea*, *Pantoea ananatis*, ví dụ, không có malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, hoặc glyxin transaminaza, và do đó, ít nhất malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyxin transaminaza có thể được truyền vào.

Trong số vi khuẩn *coryneform*, *Corynebacterium glutamicum*, ví dụ, không có malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, hoặc hydroxypyruvat reductaza, và do đó, ít nhất malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, và 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và/hoặc hydroxypyruvat reductaza có thể được truyền vào.

Ở vi sinh vật trong đó không có chu trình của Fig. 1 hoặc tiến trình glyxin của Fig. 2 được tạo ra bởi vì vi sinh vật không có một số enzym trong chu trình của Fig. 1 và tiến trình glyxin của Fig. 2, (các) enzym thiếu hụt này có thể được cung cấp. Trong trường hợp *Aspergillus niger*, các loài nấm dạng sợi, tiến trình của Fig. 2 có thể được tạo ra bằng cách truyền malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza.

Ở vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ nhất, tốt hơn là ít nhất một loại hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat kinaza, pyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxykinaza, malat dehydrogenaza, malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, hydroxypyruvat isomeraza, hydroxypyruvat reductaza, glyxerat 2-kinaza, glyxerat 3-kinaza, phosphoglyxerat mutaza, và enolaza được tăng cường. Điều này cho phép sản xuất axetyl-CoA hiệu quả hơn.

Pyruvat kinaza, pyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, phosphoenolpyruvat carboxykinaza, malat dehydrogenaza, malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, hydroxypyruvat isomeraza, hydroxypyruvat reductaza, glyxerat 2-kinaza, glyxerat 3-kinaza, phosphoglyxerat mutaza, và enolaza, có thể trở thành các mục tiêu cho sự tăng cường, là các enzym cấu thành chu trình của Fig. 1.

Ở vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ nhất, tốt hơn là ít nhất một loại hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm enzym malic và fumarat reductaza được làm bất hoạt hoặc được làm giảm. Điều này cho phép sản xuất axetyl-CoA hiệu quả

hơn.

Malic enzym là tên chung đối với các enzym mà được phân loại theo Tiêu ban Enzym số: 1.1.1.38, 1.1.1.39, và 1.1.1.40 và làm xúc tác phản ứng chuyển hóa malat thành pyruvat và cacbon dioxit. Xét hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, tốt hơn là làm bất hoạt hoặc khử hoạt tính enzym của malic enzym.

Fumarat reductaza là tên chung đối với các enzym mà được phân loại theo Tiêu ban Enzym số: 1.3.99.1 và làm xúc tác cho phản ứng chuyển hóa fumarat thành succinat. Hơn nữa, succinat dehydrogenaza được phân loại theo Tiêu ban Enzym số: 1.3.99.1 đôi khi có hoạt tính fumarat reductaza chuyển hóa fumarat thành succinat. Do đó, theo sáng chế, succinat dehydrogenaza có hoạt tính fumarat reductaza được bao gồm trong phạm vi của fumarat reductaza. Xét hiệu quả sản xuất axetyl-CoA, tốt hơn là làm bất hoạt hoặc khử hoạt tính enzym của fumarat reductaza. Việc này cho phép ngăn khử lượng malat do sự chuyển hóa malat thành fumarat hoặc succinat, và dẫn đến sản xuất axetyl-CoA hiệu quả.

Đối với gen mã hóa malic enzym (trong nhiều trường hợp, được gọi là *sfcA*, *maeA*, *maeB*, hoặc *malE*, nhưng không bị giới hạn), một số vi sinh vật có thể có nhiều chất đồng phân của chúng trong bộ gen. *Pantoea ananatis* có *sfcA* và *maeB*. *Corynebacterium glutamicum* có *malE*.

Đối với gen mã hóa fumarat reductaza (*frd*, *sdh*, *yqiG*, và tương tự), một số vi sinh vật có thể có nhiều chất đồng phân của chúng trong bộ gen. *Pantoea ananatis* có *yqiG*. *Corynebacterium glutamicum* có *sdh*.

Vi sinh vật được sử dụng làm vật chủ theo sáng chế thứ nhất không bị giới hạn cụ thể miễn là nó là vi sinh vật mà không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d), hoặc (e).

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

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

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

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

(e) Ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza.

Ở đây, "(a) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat" đề cập đến các chu trình (1) đến (7) sau:

(1) chu trình được minh họa trên Fig. 1 của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua malonyl-CoA, 3-hydroxypropionat, propionyl-CoA, malat, và malyl-CoA;

(2) chu trình được minh họa trên Fig. 4A của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua malonyl-CoA, malonat semialdehyt, β -alanin, malat, và malyl-CoA;

(3) chu trình được minh họa trên Fig. 4B, 16, hoặc 18 của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua malonyl-CoA, hydroxypropionat, (R)-lactat hoặc (S)-lactat, malat, và malyl-CoA;

(4) chu trình được minh họa trên Fig. 8 của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua malonyl-CoA, malonat semialdehyt hoặc hydroxypropionat, pyruvat, malat, và malyl-CoA;

(5) chu trình được minh họa trên Fig. 9A, 9B, hoặc 9C của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua malonyl-CoA, hydroxypropionat, 2-ketoglutarat, malat, và malyl-CoA;

(6) chu trình được minh họa trên Fig. 9D hoặc 9F của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua malonyl-CoA, hydroxypropionat, metylmalonyl-CoA, malat, và malyl-CoA; và

(7) chu trình được minh họa trên Fig. 17 của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua malonyl-CoA, malonat semialdehyt hoặc hydroxypropionat, metylmalonyl-CoA, pyruvat, oxaloaxetat, malat, và malyl-CoA.

Tất cả các chu trình cố định cacbon dioxit từ (1) đến (7) được mô tả ở trên có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc từ malonyl-CoA thành 3-hydroxypropionat. Loại phản ứng này được xúc tác bằng malonat semialdehyt dehydrogenaza hoặc malonyl-CoA reductaza (WO 2011/099006). Được hiểu là phản ứng

khử của axit carboxylic hoặc (thio)este của nó, như khử succinyl-CoA hoặc khử malonyl-CoA, thường khó thực hiện ở dạng các phản ứng enzym và việc bao gồm phản ứng này trong quá trình lên men nên được tránh nhiều nhất có thể (Nature, 2008; 451: 86-89, Nature Chemical Biology, 2011; 7: 445-452).

"(b) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat" trong bản mô tả sáng chế đề cập đến các chu trình (8) đến (10) sau:

(8) chu trình được minh họa trên Fig. 1 của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua pyruvat, phosphoenolpyruvat, oxaloaxetat, malat, và malyl-CoA;

(9) chu trình được minh họa trên Fig. 7C, 7D hoặc 7E của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua pyruvat, malat, và malyl-CoA; và

(10) chu trình được minh họa trên Fig. 9M của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua pyruvat, 2-ketoglutarat, malat, và malyl-CoA.

Tất cả chu trình cố định cacbon dioxit từ (8) đến (10) có phản ứng enzym chuyển hóa axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat. Phản ứng này được xúc tác bằng pyruvat synthaza (WO 2011/099006). Phản ứng tổng hợp pyruvat bằng pyruvat synthaza cần năng lượng khử mạnh từ ferredoxin và tiến hành chậm, và chỉ tiến hành trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt bởi vì phản ứng nhạy với oxy.

"(c) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA" trong bản mô tả này đề cập đến chu trình được minh họa trên Fig. 9H hoặc Fig. 9J của WO 2011/099006, trong đó axetyl-CoA được chuyển hóa lại thành axetyl-CoA qua crotonyl-CoA, ethylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA, oxaloaxetat, malat, và malyl-CoA.

Chuyển hóa crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA được xúc tác bằng crotonyl-CoA carboxylaza-reductaza hoặc methylcrotonyl-CoA carboxylaza. Vì giá trị Km của crotonyl-CoA carboxylaza-reductaza đối với carbonat là cao (14 mM; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007; 104(25): 10631-10636), nên hoạt tính thích hợp ở nồng độ cơ chất thấp có thể được mong đợi. Crotonyl-CoA, là cơ chất của crotonyl-CoA

carboxylaza-reductaza, được sản xuất từ 3-hydroxybutyryl-CoA bằng phản ứng dehydrat hóa. Nói chung, enzym bao gồm trong phản ứng dehydrat hóa chủ yếu xúc tác cho phản ứng nghịch đảo (nghĩa là, phản ứng hydrat hóa) trong môi trường trong nước. Do đó, tốc độ không thể mong đợi độ sản xuất crotonyl-CoA đủ cao. Hơn nữa, hoạt tính đặc hiệu của methylcrotonyl-CoA carboxylaza được báo cáo không quá cao (0,2 U/mg đến 0,6 U/mg; Archives of Biochemistry and Biophysics, 1994; 310(1): 64-75). Ngoài ra, không thể mong đợi tốc độ sản xuất crotonyl-CoA đủ cao làm cơ chất, tương tự như trên.

[0159] "(d) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format" trong bản mô tả này đề cập đến chu trình được minh họa trên các Fig. 5, 6, 13 hoặc 14 của WO 2009/046929, tức là, chu trình là sự kết hợp của tiến trình trong đó 5,10-methenyltetrahydrofolat được sản xuất từ CO₂ qua format và 5-formyltetrahydrofolat; tiến trình trong đó 5,10-methenyltetrahydrofolat được phản ứng với glyxin tạo ra serin, và serin được chuyển hóa lại thành glyxin qua 3-hydroxypyruvat, glycerat, 3-phosphoglyxerat, phosphoenol pyruvat, oxaloaxetat, malat, malyl-CoA, và glyoxylat; và tiến trình trong đó axetyl-CoA được tạo ra qua malat và malyl-CoA được chuyển hóa lại thành malat qua chu trình TCA và phản ứng liên quan đến isoxitrat lyaza.

Phản ứng enzym từ CO₂ thành format cần năng lượng khử mạnh và tiến hành chậm, và chỉ thực hiện trong các điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt bởi vì phản ứng nhạy với oxy.

Malonat semialdehyt dehydrogenaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.2.1.18, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa malonyl-CoA thành malonat semialdehyt.

Malonyl-CoA reductaza là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat.

Pyruvat synthaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.2.7.1, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác cho phản ứng chuyển hóa axetyl-CoA thành pyruvat.

Crotonyl-CoA carboxylaza-reductaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.3.1.85, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác cho sự chuyển hóa crotonyl-CoA thành etylmalonyl-CoA.

Methylcrotonyl-CoA carboxylaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 6.4.1.4, là tên chung đối với các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa crotonyl-CoA thành

glutaconyl-CoA.

Các ví dụ về vi sinh vật không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d), hoặc (e) bao gồm các vi sinh vật thuộc Enterobacteriaceae, các vi sinh vật thuộc vi khuẩn *Corynebacterium*, các vi sinh vật thuộc nấm dạng sợi, và actinomycete.

Các ví dụ cụ thể về vi sinh vật thuộc Enterobacteriaceae bao gồm vi khuẩn thuộc *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, hoặc *Morganella*. Trong số đó, các vi sinh vật thuộc *Escherichia* và vi sinh vật thuộc *Pantoea* được ưu tiên xét về hiệu quả sản xuất các chất chuyển hóa hữu dụng. Vi khuẩn *Escherichia* và vi khuẩn *Pantoea* là các loài có liên quan mật thiết (Journal of General and Applied Microbiology, 1997; 43(6): 355-361, International Journal of Systematic Bacteriology, 1997; 47(4): 1061-1067).

Vi khuẩn *Escherichia* không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ về chúng bao gồm *Escherichia coli*. Các chủng đặc hiệu của *Escherichia coli* bao gồm chủng kiểu đại kiểu chuẩn *Escherichia coli* B (ATCC 11303); và *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325) và *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076), có nguồn gốc từ chủng kiểu đại kiểu chuẩn K12.

Các ví dụ về các chủng vi khuẩn *Pantoea* tiêu biểu bao gồm *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Pantoea agglomerans*, và *Pantoea citrea*. Các ví dụ cụ thể về chúng bao gồm các chủng sau.

·*Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614) (đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 0952221)

·*Pantoea ananatis* AJ13356 (FERM BP-6615) (đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 0952221)

Mặc dù các chủng này được mô tả ở dạng *Enterobacter agglomerans* trong đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 0952221, các chủng này được phân loại lại thành *Pantoea ananatis* như được mô tả ở trên dựa vào sự phân tích trình tự bazơ của 16S rRNA và tương tự.

Trong những năm gần đây, một số vi khuẩn thuộc *Enterobacter* được phân loại lại thành *Pantoea agglomerans*, *Pantoea dispersa*, hoặc tương tự (International Journal of Systematic Bacteriology, 1989; 39(3): 337-345). Hơn nữa, một số vi khuẩn thuộc *Erwinia* được phân loại lại thành *Pantoea ananas* hoặc *Pantoea stewartii* (International

Journal of Systematic Bacteriology, 1993; 43(1): 162-173).

Các ví dụ về vi khuẩn *Enterobacter* bao gồm *Enterobacter agglomerans* và *Enterobacter aerogenes*. Cụ thể hơn, các chủng làm ví dụ trong đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 952221 có thể được sử dụng. Các ví dụ về các chủng *Enterobacter* tiêu biểu bao gồm *Enterobacter agglomerans* ATCC 12287.

"Vi khuẩn coryneform" theo sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, hoặc *Microbacterium*, như được định nghĩa trong Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8, 599 (1974).

Ví dụ về vi khuẩn coryneform còn bao gồm vi sinh vật mà đã được phân loại thành *Brevibacterium* nhưng được phân loại lại thành *Corynebacterium* (International Journal of Systematic Bacteriology, 1991; 41(2): 255-260), và các vi khuẩn có liên quan như vi sinh vật thuộc *Brevibacterium*. Ví dụ về vi khuẩn coryneform được liệt kê dưới đây.

Ví dụ về vi khuẩn coryneform bao gồm *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium melassecola*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium herculis*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium saccharolyticum*, *Brevibacterium thiogenitalis*, *Corynebacterium amoniacgenes*, *Brevibacterium album*, *Brevibacterium cerinum*, và *Microbacterium amoniacphilum*.

Ví dụ cụ thể về vi khuẩn *Corynebacterium* bao gồm các chủng sau.

Tức là, ví dụ về chúng bao gồm *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511, *Corynebacterium callunae* ATCC 15991, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13020, ATCC 13032 và ATCC 13060, *Corynebacterium lilium* ATCC 15990, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12340 (FERM BP-1539), *Corynebacterium herculis* ATCC13868, *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020, *Brevibacterium flavum* ATCC 13826, ATCC 14067, và AJ 12418 (FERM BP-2205), *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068, *Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869,

Brevibacterium roseum ATCC 13825, *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240, *Corynebacterium amoniacgenes* ATCC 6871 và ATCC 6872, *Brevibacterium album* ATCC 15111, *Brevibacterium cerinum* ATCC 15112, và *Microbacterium amoniacphilum* ATCC 15354.

Theo sáng chế thứ hai, vi sinh vật thuộc chi *Aspergillus* hoặc chi *Cupriavidus* mà không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d), hoặc (e) nêu trên được sử dụng làm vật chủ. Các ví dụ về nấm *Aspergillus* bao gồm *Aspergillus niger* (bao gồm các biến thể như *Aspergillus awamori* hoặc *Aspergillus kawachii*), *Aspergillus terreus*, và *Aspergillus itaconicus*. Các ví dụ về vi khuẩn *Cupriavidus* bao gồm *Cupriavidus necator* (còn được biết đến là *Alcaligenes eutropha*, *Ralstonia eutropha*, hoặc *Wautersia eutropha*). Theo sáng chế thứ hai, trong trường hợp trong đó axit xitric được tạo ra, tốt hơn là sử dụng nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger*. Trong trường hợp trong đó axit itaconic được tạo ra, tốt hơn là sử dụng nấm *Aspergillus* như *Aspergillus terreus* hoặc *Aspergillus itaconicus*. Trong trường hợp trong đó axit (poly)3-hydroxybutyric được tạo ra, tốt hơn là sử dụng vi khuẩn *Cupriavidus* như *Cupriavidus necator*.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế có thể bao gồm tiến trình của loại bất kỳ mà sản xuất chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian, hoặc có thể là vi sinh vật trong đó hoạt tính enzym được kết hợp với tiến trình được tăng cường. Ví dụ về tiến trình này bao gồm tiến trình sản xuất rượu isopropylic, tiến trình sản xuất axeton, và tiến trình sản xuất axit glutamic. Dưới đây, vi sinh vật bao gồm tiến trình như được mô tả ở đây và có thể sản xuất chất chuyển hóa hữu dụng có nguồn gốc từ axetyl-CoA được giải thích.

Vi sinh vật bao gồm trong quá trình sản xuất rượu isopropylic và vi sinh vật bao gồm trong quá trình sản xuất axeton

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế bao gồm tiến trình sản xuất rượu isopropylic có thể thu được bằng cách tạo cấu trúc vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế sử dụng vi sinh vật có tiến trình sản xuất rượu isopropylic làm vật chủ, hoặc truyền hoặc tăng cường một hoặc nhiều hoạt tính enzym liên quan đến tiến trình sản xuất rượu isopropylic trong vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế. Dưới đây, vi sinh vật có tiến trình sản xuất rượu isopropylic có thể được đề cập đến ở dạng "vi sinh vật sản xuất rượu isopropylic", và *Escherichia coli* có tiến trình sản xuất rượu isopropylic có thể được đề cập đến ở dạng "*Escherichia coli* sản xuất rượu isopropylic".

Escherichia coli sản xuất rượu isopropylic là *Escherichia coli* có tiến trình sản xuất rượu isopropylic, và có khả năng sản xuất rượu isopropylic mà được đưa vào bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Tiến trình sản xuất rượu isopropylic có thể là tiến trình bất kỳ cho phép *Escherichia coli* mong muốn sản xuất rượu isopropylic. Ở *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropylic theo sáng chế, tốt hơn là bốn hoạt tính enzym — hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, và hoạt tính rượu isopropylic dehydrogenaza — được truyền hoặc được tăng cường.

Trong trường hợp trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế được sử dụng để sản xuất axeton, vi sinh vật có hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, và hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza trong số các vi sinh vật có trong tiến trình sản xuất rượu isopropylic có thể được sử dụng. Vi sinh vật không có hoạt tính rượu isopropylic dehydrogenaza trong số các vi sinh vật có trong tiến trình sản xuất rượu isopropylic.

Trong trường hợp trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế là vi sinh vật được tạo cấu trúc sử dụng vi khuẩn *Escherichia* làm vật chủ, các phương án sau được ưu tiên.

Ví dụ về các phương án được ưu tiên của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, và hoạt tính rượu isopropylic dehydrogenaza được truyền hoặc được tăng cường. Vi sinh vật này cho phép sản xuất rượu isopropylic hiệu quả.

Ví dụ khác về các phương án được ưu tiên của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA là vi khuẩn *Escherichia* trong đó hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, và hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza được truyền hoặc được tăng cường. Vi sinh vật này cho phép sản xuất axeton hiệu quả.

Chi tiết về tiến trình sản xuất rượu isopropylic và enzym tạo cấu trúc tiến trình được mô tả dưới đây.

Thiolaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 2.3.1.9, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng sản xuất axetoaxetyl-CoA từ axetyl-CoA. Ví dụ về thiolaza bao gồm từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Clostridium beijerinckii*, vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, *Halobacterium* sp., vi khuẩn *Zoogloea* như *Zoogloea ramigera*, *Rhizobium* sp., vi khuẩn *Bradyrhizobium* như *Bradyrhizobium japonicum*, *Candida* như *Candida tropicalis*, vi khuẩn *Caulobacter* như

Caulobacter crescentus, vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces collinus*, hoặc vi khuẩn *Enterococcus* như *Enterococcus faecalis*.

Đối với gen mã hóa thiolaza, có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa thiolaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Clostridium beijerinckii*; vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*, *Halobacterium* sp., vi khuẩn *Zoogloea* như *Zoogloea ramigera*, *Rhizobium* sp., vi khuẩn *Bradyrhizobium* như *Bradyrhizobium japonicum*, *Candida* như *Candida tropicalis*, vi khuẩn *Caulobacter* như *Caulobacter crescentus*, vi khuẩn *Streptomyces* như *Streptomyces collinus*, hoặc vi khuẩn *Enterococcus* như *Enterococcus faecalis*. Các ví dụ về chúng được ưu tiên hơn bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ sinh vật chưa có nhân điển hình như vi khuẩn *Clostridium* hoặc vi khuẩn *Escherichia* và ADN có trình tự bazơ của gen từ *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Escherichia coli* là được ưu tiên hơn nữa.

CoA transferaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 2.8.3.8, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng sản xuất axetoaxetat từ axetoaxetyl-CoA. Ví dụ về CoA transferaza bao gồm từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Clostridium beijerinckii*, vi khuẩn *Roseburia* như *Roseburia intestinalis*, vi khuẩn *Faecalibacterium* như *Faecalibacterium prausnitzii*, vi khuẩn *Coprococcus*, trùng trypanosoma như *Trypanosoma brucei*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Đối với gen mã hóa CoA transferaza, có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa CoA transferaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum*, vi khuẩn *Roseburia* như *Roseburia intestinalis*, vi khuẩn *Faecalibacterium* như *Faecalibacterium prausnitzii*, vi khuẩn *Coprococcus*, trùng trypanosoma như *Trypanosoma brucei*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*. Các ví dụ về chúng được ưu tiên hơn bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Clostridium* hoặc vi khuẩn *Escherichia*, và ADN có trình tự bazơ của gen từ *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Escherichia coli* là được ưu tiên hơn nữa.

Axetoaxetat decarboxylaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 4.1.1.4, là tên chung đối với các enzym xúc tác phản ứng sản xuất axeton từ axetoaxetat. Ví dụ về axetoaxetat decarboxylaza bao gồm từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Clostridium beijerinckii*, hoặc vi khuẩn *Bacillus* như *Bacillus polymyxa*.

Đối với gen mã hóa axetoaxetat decarboxylaza, có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa axetoaxetat decarboxylaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium acetobutylicum* hoặc vi khuẩn *Bacillus* như *Bacillus polymyxa*. Tốt hơn nữa nếu ADN là ADN có trình tự bazơ của gen từ *Clostridium acetobutylicum*.

Rượu isopropylic dehydrogenaza, được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.1.1.80, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng sản xuất rượu isopropylic từ axeton. Ví dụ về rượu isopropylic dehydrogenaza bao gồm từ vi khuẩn *Clostridium* như *Clostridium beijerinckii*.

Đối với gen mã hóa rượu isopropylic dehydrogenaza, có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa rượu isopropylic dehydrogenaza thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Clostridium*, như *Clostridium beijerinckii*.

Xét về hoạt tính enzym, tốt hơn nếu mỗi trong số bốn loại enzym là enzym từ ít nhất một vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn *Clostridium*, vi khuẩn *Bacillus*, và vi khuẩn *Escherichia*. Cụ thể, tốt hơn nếu thiolaza và CoA transferaza là từ vi khuẩn *Escherichia*, và axetoaxetat decarboxylaza và rượu isopropylic dehydrogenaza là từ vi khuẩn *Clostridium* hoặc vi khuẩn *Clostridium*.

Xét về hoạt tính enzym, tốt hơn nếu mỗi trong số bốn loại enzym ở trên là từ ít nhất một vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, và *Escherichia coli*. Tốt hơn nữa nếu mỗi trong số thiolaza và CoA transferaza là từ *Clostridium acetobutylicum* hoặc *Escherichia coli*, axetoaxetat decarboxylaza là từ *Clostridium acetobutylicum*, và rượu isopropylic dehydrogenaza là từ *Clostridium beijerinckii*. Còn tốt hơn nữa nếu thiolaza và CoA transferaza là từ

Escherichia coli, axetoaxetat decarboxylaza là từ *Clostridium acetobutylicum*, và rượu isopropylic dehydrogenaza là từ *Clostridium beijerinckii*.

Gen CoA transferaza (atoD và atoA) và gen thiolaza (atoB) từ *Escherichia coli* tạo thành operon trên bộ gen của *Escherichia coli* theo thứ tự atoD, atoA, và atoB (Journal of Bacteriology, 1987; 169(1): 42-52). Do đó, việc biểu hiện gen CoA transferaza và gen thiolaza có thể được kiểm soát đồng thời bằng cách biến đổi gen khởi đầu atoD.

Trong trường hợp trong đó hoạt tính CoA transferaza và hoạt tính thiolaza thu được từ gen trong bộ gen của vật chủ *Escherichia coli*, tốt hơn nếu tăng cường biểu hiện của cả hai gen enzym bằng cách, ví dụ, thay thế gen khởi đầu chịu trách nhiệm cho sự biểu hiện của cả hai gen enzym bằng một gen khởi đầu khác, xét về việc thu được đủ khả năng sản xuất rượu isopropylic. Ví dụ về gen khởi đầu có thể được sử dụng để tăng cường biểu hiện của hoạt tính CoA transferaza và hoạt tính thiolaza bao gồm gen khởi đầu glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza (GAPDH) từ *Escherichia coli*. Gen khởi đầu GAPDH từ *Escherichia coli* được mô tả trong Base Nos. 397 đến 440 trong thông tin trình tự bazơ có số truy cập GenBank: X02662.

Ví dụ về rượu *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropylic bao gồm biến thể pIPA/B và biến thể pIaaa/B được mô tả trong WO 2009/008377, có khả năng sản xuất rượu isopropylic từ nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật. Các ví dụ về chúng bao gồm biến thể trong đó hoạt tính CoA transferaza và hoạt tính thiolaza được tăng cường bằng cách tăng cường biểu hiện của gen tương ứng trên bộ gen *Escherichia coli*, và trong đó hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza và hoạt tính rượu isopropylic dehydrogenaza được tăng cường thông qua việc đưa vào plasmid hoặc các plasmid (còn được gọi là "biến thể pIa/B::atoDAB" trong bản mô tả này). Ví dụ khác về *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropylic bao gồm vi sinh vật được mô tả trong WO 2009/094485, WO 2009/094485, WO 2009/046929, hoặc WO 2009/046929.

Escherichia coli sản xuất rượu isopropylic có thể là *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropylic trong đó gen kìm hãm phiên mã GntR bị bất hoạt và có tiến trình sản xuất rượu isopropylic và nhóm enzym phụ trợ thể hiện mô hình hoạt tính enzym duy trì hoặc tăng cường khả năng sản xuất rượu isopropylic được cải thiện kết hợp với sự bất hoạt hoạt tính GntR. *Escherichia coli* này dẫn đến việc sản xuất rượu isopropylic tốt hơn.

Thuật ngữ "nhóm các enzym phụ trợ" theo sáng chế đề cập đến một enzym hoặc

hai hoặc nhiều enzym, tác động đến khả năng sản xuất rượu isopropylic. Nhóm các enzym phụ trợ không cần thiết được cấu thành từ nhiều enzym và có thể được cấu thành từ một loại enzym. Hoạt tính của mỗi enzym bao gồm trong nhóm enzym phụ trợ được bất hoạt, hoạt hóa, hoặc tăng cường. Cụm từ "mô hình hoạt tính enzym" của "nhóm các enzym phụ trợ" như được sử dụng ở đây đề cập đến mô hình hoạt tính enzym của enzym tương ứng có khả năng duy trì và tăng cường lượng sản xuất rượu isopropylic cải thiện chỉ đạt được bằng cách bất hoạt hoạt tính GntR, và có thể đề cập đến một enzym hoặc kết hợp của hai hoặc nhiều enzym.

Ví dụ về mô hình hoạt tính enzym được ưu tiên của nhóm các enzym phụ trợ bao gồm như sau:

- (i) duy trì hoạt tính kiểu đại của glucoza-6-phosphat isomeraza (Pgi), glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf), và phosphogluconat dehydrogenaza (Gnd);
- (ii) sự bất hoạt của hoạt tính glucoza-6-phosphat isomeraza (Pgi), và sự tăng cường của hoạt tính glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf); và
- (iii) sự bất hoạt của hoạt tính glucoza-6-phosphat isomeraza (Pgi), tăng cường hoạt tính của glucoza-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf), và sự bất hoạt của hoạt tính phosphogluconat dehydrogenaza (Gnd).

Trong số chúng, mô hình hoạt tính enzym của nhóm các enzym phụ trợ mô tả trong mục (iii) ở trên là được ưu tiên hơn, xét về khả năng sản xuất rượu isopropylic.

Nhóm các enzym phụ trợ và mô hình hoạt tính enzym của chúng bị giới hạn ở những enzym được liệt kê ở trên. Sáng chế bao gồm nhóm các enzym phụ trợ và mô hình hoạt tính enzym bất kỳ của chúng cũng như hoạt tính GntR bị bất hoạt và lượng sản xuất rượu isopropylic trong *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropylic có thể tăng do nhóm các enzym phụ trợ và mô hình hoạt tính enzym của chúng.

GntR đề cập đến yếu tố phiên mã điều hòa âm tính operon tham gia vào sự chuyển hóa gluconat thông qua con đường Entner-Doudoroff. GntR là tên gọi chung đối với gen kìm hãm phiên mã GntR ức chế chức năng của hai nhóm gen (GntI và GntII), chịu trách nhiệm thu nạp và chuyển hóa axit gluconic.

Glucoza-6-phosphat isomeraza (Pgi), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 5.3.1.9, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng sản xuất D-fructoza-6-phosphat từ D-glucoza-6-phosphat.

Glucosa-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.1.1.49, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng sản xuất D-glucono-1,5-lacton-6-phosphat từ D-glucosa-6-phosphat. Ví dụ về glucosa-6-phosphat-1-dehydrogenaza bao gồm từ vi khuẩn *Deinococcus* như *Deinococcus radiophilus*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger* hoặc *Aspergillus aculeatus*, vi khuẩn *Acetobacter* như *Acetobacter hansenii*, vi khuẩn *Thermotoga* như *Thermotoga maritima*, nấm *Cryptococcus* như *Cryptococcus neoformans*, nấm *Dictyostelium* như *Dictyostelium discoideum*, *Pseudomonas* như *Pseudomonas fluorescens* hoặc *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces* như *Saccharomyces cerevisiae*; vi khuẩn *Bacillus* như *Bacillus megaterium*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*.

Đối với gen mã hóa glucosa-6-phosphat-1-dehydrogenaza (Zwf), có thể sử dụng ADN có trình tự bazơ của gen mã hóa Zwf thu được từ vi sinh vật bất kỳ trong số các vi sinh vật nêu trên, hoặc trình tự ADN tổng hợp mà được tổng hợp dựa trên trình tự bazơ của gen đã biết. Các ví dụ được ưu tiên về chúng bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ vi khuẩn *Deinococcus* như *Deinococcus radiophilus*, nấm *Aspergillus* như *Aspergillus niger* hoặc *Aspergillus aculeatus*; vi khuẩn *Acetobacter* như *Acetobacter hansenii*, vi khuẩn *Thermotoga* như *Thermotoga maritima*, nấm *Cryptococcus* như *Cryptococcus neoformans*, nấm *Dictyostelium* như *Dictyostelium discoideum*, *Pseudomonas* như *Pseudomonas fluorescens* hoặc *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces* như *Saccharomyces cerevisiae*, vi khuẩn *Bacillus* như *Bacillus megaterium*, hoặc vi khuẩn *Escherichia* như *Escherichia coli*. Các ví dụ về chúng được ưu tiên hơn bao gồm ADN có trình tự bazơ của gen từ sinh vật chưa có nhân điển hình như vi khuẩn *Deinococcus*, nấm *Aspergillus*, vi khuẩn *Acetobacter*, vi khuẩn *Thermotoga*, *Pseudomonas*, vi khuẩn *Bacillus*, hoặc vi khuẩn *Escherichia*. Tốt hơn nữa nếu ADN là ADN có trình tự bazơ của gen từ *Escherichia coli*.

Phosphogluconat dehydrogenaza (Gnd), được phân loại theo Tiểu ban Enzym số: 1.1.1.44, là tên chung đối với các enzym làm xúc tác phản ứng sản xuất D-ribuloza-5-phosphat và CO₂ từ 6-phospho-D-gluconat.

Việc truyền hoặc tăng cường hoạt tính enzym nêu trên có thể đạt được bằng cách đưa gen vào trong vật chủ, hoặc tăng cường hoạt tính gen khởi đầu đối với gen enzym mà vật chủ có trên bộ gen, hoặc thay gen khởi đầu bằng một gen khởi đầu khác; hoặc sự kết

hợp bất kỳ của chúng.

Gen khởi đầu trong *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic là vùng mà ARN polymeraza có yếu tố sigma gắn vào để bắt đầu phiên mã. Gen khởi đầu có thể là gen khởi đầu bất kỳ miễn là nó có thể kiểm soát biểu hiện gen và tốt hơn là gen khởi đầu có hiệu lực có chức năng không đổi trong vi sinh vật và mà không dễ bị ức chế biểu hiện ngay cả khi có mặt glucoza. Các ví dụ cụ thể về chúng bao gồm gen khởi đầu GAPDH và gen khởi đầu của serin hydroxymetyltransferaza.

Ở *Escherichia coli* sản xuất rượu isopropyllic, gen (*ldhA*) mã hóa lactat dehydrogenaza (*LdhA*) có thể bị gián đoạn. Sự gián đoạn của lactat dehydrogenaza ức chế sản xuất lactat ngay cả trong các điều kiện nuôi cấy trong đó việc cung cấp oxy bị hạn chế, kết quả là rượu isopropyllic có thể được sản xuất hiệu quả. "Điều kiện trong đó cung cấp oxy bị hạn chế" nói chung có nghĩa là, trong trường hợp trong đó riêng không khí được sử dụng làm khí để nạp khí kèm khuấy chất lỏng nuôi cấy, điều kiện là 0,02 vvm đến 2,0 vvm (vvm: thể tích nạp khí [mL]/thể tích chất lỏng [mL]/thời gian [phút]) và tốc độ khuấy từ 200 đến 600 vòng/phút (rpm: revolutions per minute). Lactat dehydrogenaza (*LdhA*) đề cập đến enzym sản xuất D-lactat và NAD từ pyruvat và NADH.

Vi sinh vật tham gia vào sản xuất Glutamat

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế có thể có tiến trình theo cách bất kỳ mà sản xuất glutamat được sản sinh từ axetyl-CoA làm chất trung gian. Theo cách khác, hoạt tính của một hoặc nhiều enzym tham gia vào tiến trình sản xuất glutamat có thể tạo ra từ axetyl-CoA làm chất trung gian có thể được tăng cường trong vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế có tiến trình sản xuất glutamat có thể thu được bằng cách xây dựng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế sử dụng vi sinh vật có tiến trình sản xuất glutamat làm vật chủ hoặc tác động hoặc tăng cường hoạt tính enzym liên quan đến tiến trình sản xuất glutamat ở vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế. Sau đây, vi sinh vật có tiến trình sản xuất glutamat có thể được gọi là "vi sinh vật sản xuất glutamat".

Ví dụ về vi sinh vật sản xuất glutamat bao gồm vi sinh vật có khả năng sản xuất axit amin L.

Các ví dụ cụ thể về vi sinh vật sản xuất glutamat được ưu tiên bao gồm vi khuẩn *Enterobacteriaceae* như vi khuẩn *Escherichia* và vi khuẩn *Pantoea*, và vi khuẩn coryneform như *Corynebacterium glutamicum* trong đó tiến trình sản xuất glutamat được truyền hoặc tăng cường.

Phương pháp truyền khả năng sản xuất glutamat vào vi sinh vật hoặc tăng cường khả năng sản xuất glutamat trong vi sinh vật bao gồm, ví dụ, biến đổi vi sinh vật sao cho sự biểu hiện gen mã hóa enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp L-glutamat được tăng lên và/hoặc biểu hiện quá mức. Ví dụ về enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp L-glutamat bao gồm glutamat dehydrogenaza, glutamin synthetaza, glutamat syntaza, isoxitrat dehydrogenaza, aconitat hydratasa, xitrat syntaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, pyruvat carboxylaza, pyruvat dehydrogenaza, pyruvat kinaza, phosphoenolpyruvat syntaza, enolaza, phosphoglyceromutaza, phosphoglyxerat kinaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, trioza-phosphat isomeraza, fructoza-bisphosphat aldolaza, phosphofructokinaza, và glucoza-phosphat isomeraza. Trong các enzym này, tốt hơn nếu tăng cường hoạt tính của một hoặc nhiều xitrat syntaza, phosphoenolpyruvat carboxylaza, hoặc glutamat dehydrogenaza, và tốt hơn nữa nếu tăng cường hoạt tính của tất cả ba enzym. Ví dụ về vi sinh vật sản xuất glutamat bao gồm vi sinh vật sản xuất glutamat được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số (JP-A) 2005-278643.

Đối với vi sinh vật sản xuất L-glutamat, vi sinh vật có khả năng tích tụ L-glutamat ở lượng vượt quá nồng độ bão hòa của L-glutamat trong môi trường lỏng khi vi sinh vật được nuôi cấy trong điều kiện axit (sau đây gọi là "Khả năng tích tụ L-glutamat trong điều kiện axit") có thể được sử dụng. Ví dụ, biến thể tăng sự kháng lại L-glutamat trong môi trường pH thấp có thể thu được bằng phương pháp được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 1078989, nhờ đó khả năng tích tụ L-glutamat ở lượng vượt quá nồng độ bão hòa được truyền vào vi sinh vật theo sáng chế.

Các ví dụ cụ thể về vi sinh vật có khả năng tích tụ L-glutamat thực chất trong điều kiện axit bao gồm *Pantoea ananatis* AJ13356 (FERM BP-6615) và AJ13601 (FERM BP-7207) (xem đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 0952221). *Pantoea ananatis* AJ13356 được nộp lưu vào National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (tên hiện tại: International Patent Organism Depositary, National Institute of

Technology and Evaluation (NITE- IPOD)) với số truy cập FERM P-16645 ngày 19/02/1998, và sau đó được chuyển đến Cơ quan nộp lưu quốc tế theo Hiệp ước Budapest với số truy cập FERM BP-6615 ngày 11/01/1999. Chủng này được xác định là *Enterobacter agglomerans* và được nộp lưu ở dạng *Enterobacter agglomerans* AJ13355 khi được tách lần đầu, nhưng, theo phân tích trình tự bazơ mới đây đối với 16S rRNA và tương tự, chủng được phân loại lại là *Pantoea ananatis* (xem ví dụ dưới đây). Tương tự, AJ13356 và AJ13601, chủng có nguồn gốc từ AJ13355, được nộp lưu vào Cơ quan nộp lưu nói trên ở dạng *Enterobacter agglomerans*, nhưng các chủng này được mô tả là *Pantoea ananatis* trong bản mô tả này. AJ13601 được nộp lưu vào National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (tên hiện tại: International Patent Organism Depositary, National Institute of Technology and Evaluation (NITE- IPOD) với số truy cập No. FERM P-17156 vào ngày 18/8/1999, và sau đó được chuyển đến Cơ quan nộp lưu quốc tế theo Hiệp ước Budapest với số truy cập FERM BP-7207 vào ngày 7/6/2000.

Ví dụ khác về phương pháp truyền hoặc tăng cường khả năng sản xuất L-glutamat bao gồm phương pháp truyền tính kháng cho chất tương tự axit hữu cơ hoặc chất ức chế hô hấp, và phương pháp truyền độ nhạy cho chất ức chế tổng hợp thành tế bào. Các ví dụ cụ thể về chúng bao gồm: phương pháp truyền tính kháng cho axit monofloaxetic (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S50-113209); phương pháp truyền tính kháng cho adenin hoặc tính kháng cho thymin (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S57-065198); phương pháp làm yếu ureaza (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S52-038088); phương pháp truyền tính kháng cho axit malonic (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S52-038088); phương pháp truyền tính kháng cho benzopyron hoặc naphthoquinon (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S56-001889); phương pháp truyền tính kháng cho HOQNO (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S56-140895); phương pháp truyền tính kháng cho axit α -ketomalonic (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S57-002689 A); phương pháp truyền tính kháng cho guanidin (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S56-035981), và phương pháp truyền tính kháng cho penicillin (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số H04-088994).

Ví dụ cụ thể về vi sinh vật có tính kháng bao gồm các chủng sau.

- *Brevibacterium flavum* AJ3949 (FERM BP-2632; xem JP-A số S50-113209)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11628 (FERM P-5736; xem JP-A số S57-065198)
- *Brevibacterium flavum* AJ11355 (FERM P-5007; xem JP-A số S56-001889)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11368 (FERM P-5020; xem JP-A S56-001889)
- *Brevibacterium flavum* AJ11217 (FERM P-4318; xem JP-A số S57-002689)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11218 (FERM P-4319; xem JP-A số S57-002689)
- *Brevibacterium flavum* AJ11564 (FERM P-5472; xem JP-A số S56-140895)
- *Brevibacterium flavum* AJ11439 (FERM P-5136; xem JP-A số S56-035981)
- *Corynebacterium glutamicum* H7684 (FERM BP-3004; xem JP-A số H04-088994)
- *Brevibacterium lactofermentum* AJ11426 (FERM P-5123; xem JP-A số S56-048890)
- *Corynebacterium glutamicum* AJ11440 (FERM P-5137; xem JP-A số S56-048890)
- *Brevibacterium lactofermentum* AJ11796 (FERM P-6402; xem JP-A số S58-158192)

Ví dụ được ưu tiên về vi sinh vật có khả năng sản xuất L-glutamin bao gồm vi sinh vật trong đó hoạt tính glutamat dehydroaza được tăng cường, vi sinh vật trong đó hoạt tính glutamin synthetaza (glnA) được tăng cường, và vi sinh vật trong đó gen mã hóa glutaminaza bị phá vỡ (các đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 1229121 và 1424398). Việc tăng cường hoạt tính glutamin synthetaza cũng có thể đạt được bằng cách phá vỡ glutamin adenylyl transferaza (glnE) hoặc phá vỡ protein điều hòa PII (glnB). Ví dụ được ưu tiên khác về vi sinh vật sản xuất L-glutamin bao gồm biến thể thuộc giống *Escherichia* mang đột biến glutamin synthetaza trong đó gốc tyrosin ở vị trí 397 của glutamin synthetaza được thay thế bằng gốc axit amin khác (Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003-0148474).

Các ví dụ khác về phương pháp truyền hoặc tăng cường khả năng sản xuất L-glutamin bao gồm: phương pháp truyền tính kháng 6-diazo-5-oxo-norleuxin (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số H03-232497); phương pháp truyền tính kháng chất tương tự purin và kháng methionin sulfoxit (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S61-202694); và phương pháp truyền tính kháng axit α -ketomaleic (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số S56-151495). Các ví dụ cụ thể về vi khuẩn coryneform có khả năng sản xuất L-glutamin

bao gồm các vi sinh sau.

·*Brevibacterium flavum* AJ11573 (FERM P-5492; JP-A số S56-161495)

·*Brevibacterium flavum* AJ11576 (FERM BP-10381; JP-A số S56-161495)

·*Brevibacterium flavum* AJ12212 (FERM P-8123; JP-A số S61-202694)

Các ví dụ được ưu tiên về vi sinh vật sản xuất prolin, leuxin, isoleuxin, valin, arginin, citrullin, ornithin, và/hoặc axit polyglutamic bao gồm vi sinh vật được mô tả trong JP-A No. 2010-41920. Các vi sinh vật sản xuất axit axetic, axit (poly)3-hydroxybutyric, axit itaconic, axit xitric, và/hoặc axit butyric được mô tả trong Fermentation Handbook (Kyoritsu Shuppan Co., Ltd.). Các ví dụ về vi sinh vật sản xuất axit 4-aminobutyric bao gồm vi sinh vật thu được bằng cách đưa glutamat decarboxylaza vào vi sinh vật sản xuất glutamat (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số 2011-167097). Các ví dụ về vi sinh vật sản xuất axit 4-hydroxybutyric bao gồm vi sinh vật thu được bằng cách đưa glutamat decarboxylaza, transaminaza, và/hoặc aldehyt dehydrogenaza vào vi sinh vật sản xuất glutamat (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số 2009-171960).

Các ví dụ về vi sinh vật sản xuất axit 3-hydroxyisobutyric bao gồm vi sinh vật mà tiến trình được mô tả trong WO 2009/135074 hoặc tiến trình được mô tả trong WO 2008/145737 được đưa vào. Các ví dụ về vi sinh vật sản xuất axit 2-hydroxyisobutyric bao gồm vi sinh vật mà tiến trình được mô tả trong WO 2009/135074 hoặc tiến trình được mô tả trong WO 2009/156214 được đưa vào. Các ví dụ về vi sinh vật sản xuất axit 3-aminoisobutyric và/hoặc axit methacrylic bao gồm vi sinh vật mà tiến trình được mô tả trong WO 2009/135074 được đưa vào.

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA và phương pháp sản xuất chất chuyển hóa sản xuất được từ Axetyl-CoA làm chất trung gian

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA và phương pháp sản xuất chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian theo sáng chế thứ nhất bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ nhất trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon; và bước thu gom để thu sản phẩm dự kiến (axetyl-CoA, hoặc chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian) thu được nhờ sự tiếp xúc này. Các ví dụ về các chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian bao gồm axeton, rượu isopropylic, và axit glutamic. Theo sáng chế, axetyl-CoA và chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA

làm chất trung gian cũng có thể được gọi chung là "sản phẩm dự kiến".

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA và phương pháp sản xuất chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian theo sáng chế thứ hai bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế thứ hai trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon; và bước thu gom để thu sản phẩm dự kiến (axetyl-CoA, hoặc chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian) thu được nhờ sự tiếp xúc này. Các ví dụ về các chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian bao gồm axit xitric, axit itaconic, và axit (poly)3-hydroxybutyric. Theo sáng chế, axetyl-CoA và chất chuyển hóa sản xuất được từ axetyl-CoA làm chất trung gian cũng có thể được gọi chung là "sản phẩm dự kiến".

Theo các phương pháp sản xuất được mô tả ở trên, vì mỗi vi sinh vật được nuôi cấy trong khi cho vi sinh vật tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, nguồn nguyên liệu cacbon được tiêu hóa bởi vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA và cacbon dioxid được cố định, nhờ đó, sản phẩm dự kiến có thể được sản xuất hiệu quả.

Nguồn nguyên liệu cacbon không bị giới hạn cụ thể miễn là nguyên liệu chứa nguồn cacbon mà có thể được tiêu hóa bởi vi sinh vật, và nguyên liệu này tốt hơn là nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật. Nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật đề cập đến cơ quan ví dụ như rễ, cuống, thân, nhánh, lá, hoa, và hạt; thân thực vật chứa cơ quan; và sản phẩm phân hủy của cơ quan thực vật. Hơn nữa, trong các nguồn cacbon thu được từ thân thực vật, cơ quan thực vật, hoặc sản phẩm phân hủy của chúng, các sản phẩm mà có thể được sử dụng là các nguồn cacbon cho vi sinh vật trong quá trình nuôi cấy cũng được bao gồm trong phạm vi của nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật.

Các ví dụ thông thường về nguồn cacbon chứa trong nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật bao gồm đường ví dụ như tinh bột, sucroza, glucoza, fructoza, xyloza, và arabinoza; sản phẩm phân hủy của thực vật thân thảo hoặc thân gỗ chứa các thành phần nêu trên với số lượng lớn; xenluloza hydrolysat; và sự kết hợp bất kỳ của chúng. Phạm vi của nguồn cacbon theo sáng chế còn bao gồm glyxerin hoặc axit béo có nguồn gốc từ dầu thực vật.

Các ví dụ thích hợp về nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật bao gồm các cây trồng nông nghiệp, ví dụ như ngũ cốc, cụ thể là, ngô, gạo, lúa mì, đậu nành, mía, củ cải, hoặc bông, và sự kết hợp bất kỳ của chúng. Các dạng nguyên liệu thô không bị giới hạn cụ thể, và có thể là sản phẩm thô, nước hoa quả ép, sản phẩm được nghiền, hoặc tương tự.

Theo cách khác, nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật có thể ở dạng mà chỉ bao gồm nguồn cacbon được mô tả ở trên.

Sự tiếp xúc giữa vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA và nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật trong bước nuôi cấy thường đạt được bằng cách nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong môi trường nuôi cấy chứa nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật.

Mật độ tiếp xúc giữa nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật và vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có thể thay đổi tùy thuộc vào hoạt động của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA. Nói chung, hàm lượng nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật trong môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh để nồng độ đường ban đầu liên quan đến nồng độ đường tương đương glucoza được đặt đến 20% theo khối lượng hoặc ít hơn so với tổng khối lượng của hỗn hợp (hỗn hợp chứa vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA và nguồn nguyên liệu cacbon). Xét về sự dung nạp đường của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, nồng độ đường ban đầu tốt hơn là được đặt đến 15% theo khối lượng hoặc ít hơn. Hàm lượng bổ sung của các thành phần khác không bị giới hạn cụ thể miễn là chúng là các lượng mà thường được thêm vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế có thể còn bao gồm bước cung cấp ion cacbonat, ion bicarbonat, khí cacbon dioxit (cacbon dioxit), và/hoặc chất khử, vào môi trường nuôi cấy được dùng cho nuôi cấy. Trong trường hợp mà trong đó ion cacbonat, ion bicarbonat, và/hoặc khí cacbon dioxit được cung cấp vào môi trường nuôi cấy được dùng cho nuôi cấy, hoạt động của enzym ví dụ như phosphoenolpyruvat carboxylaza, pyruvat carboxylaza, hoặc phosphoenolpyruvat cacboxykinaza được tăng cường và lượng cacbon dioxit cố định được tăng lên, nhờ đó sản phẩm dự kiến có thể được sản xuất hiệu quả. Các điều kiện ví dụ như nhiệt độ, pH, và tương tự trong bước cung cấp là giống như các điều kiện trong bước nuôi cấy trừ khi có quy định khác.

Ion cacbonat hoặc ion bicarbonat bất kỳ có thể được dùng miễn là nó có nguồn gốc từ thành phần có khả năng tạo ra ion cacbonat và/hoặc ion bicarbonat khi được cung cấp vào môi trường nuôi cấy. Các ví dụ về thành phần có khả năng tạo ra ion cacbonat và/hoặc ion bicarbonat bao gồm natri cacbonat, natri hydro cacbonat, kali cacbonat, kali hydro cacbonat, amoni cacbonat, amoni hydro cacbonat, magie cacbonat, và canxi cacbonat.

Lượng ion cacbonat và/hoặc ion bicarbonat được cung cấp cho môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là sản phẩm dự kiến có thể được sản xuất hiệu quả.

Tổng lượng cung cấp cho mỗi 1L môi trường nuôi cấy tốt hơn là 50 mmol hoặc nhiều hơn. Trong trường hợp mà trong đó 150 mmol ion cacbonat và/hoặc ion bicarbonat hoặc nhiều hơn được cung cấp, năng suất của sản phẩm dự kiến có thể tăng một cách thích hợp. Tổng lượng ion cacbonat và/hoặc ion bicarbonat cung cấp cho mỗi 1L môi trường nuôi cấy tốt hơn là 200 mmol hoặc nhiều hơn.

Tổng lượng ion cacbonat và/hoặc ion bicarbonat cung cấp cho mỗi 1L môi trường nuôi cấy tốt hơn là 5 mol hoặc ít hơn. Trong trường hợp mà trong đó tổng lượng cung cấp cho mỗi 1L của môi trường nuôi cấy là 5 mol hoặc ít hơn, ít có khả năng lượng dư thừa của ion cacbonat và ion bicarbonat, mà không được sử dụng bởi tế bào vi sinh vật trong bước nuôi cấy, được tạo ra. Tổng lượng ion cacbonat và/hoặc ion bicarbonat cung cấp cho mỗi 1L môi trường nuôi cấy tốt hơn nữa là 3 mol hoặc ít hơn, và còn tốt hơn nữa là 2 mol hoặc ít hơn.

Phương pháp cung cấp ion cacbonat và/hoặc ion bicarbonat có thể là phương pháp đã biết. Thời gian cung cấp không bị giới hạn cụ thể, và có thể là lúc bắt đầu nuôi cấy hoặc trong quá trình nuôi cấy. Ion cacbonat và/hoặc ion bicarbonat có thể được cung cấp theo mẻ, hoặc có thể được cung cấp không liên tục.

Đối với khí cacbon dioxit, khí cacbon dioxit bất kỳ có thể được dùng miễn nó là khí bao gồm cacbon dioxit. Ví dụ, khí cacbon dioxit có thể là không khí. Hàm lượng cacbon dioxit của khí cacbon dioxit tốt hơn là cao hơn hàm lượng cacbon dioxit trong không khí, tốt hơn nữa là 0,1% thể tích hoặc nhiều hơn, và còn tốt hơn nữa là 1% thể tích hoặc nhiều hơn.

Hàm lượng cacbon dioxit tốt hơn là 75% thể tích hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 50% thể tích hoặc ít hơn, và còn tốt hơn nữa là 25% thể tích hoặc ít hơn.

Khí cacbon dioxit có thể được hòa tan trong môi trường nuôi cấy bằng cách sục khí hoặc tương tự. Đường kính bọt trung bình của khí cacbon dioxit cung cấp cho môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là sản phẩm dự kiến có thể được sản xuất hiệu quả. Ví dụ, khí cacbon dioxit với đường kính bọt trung bình là 100 μm hoặc lớn hơn là tốt hơn. Trong trường hợp mà trong đó khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 100 μm hoặc lớn hơn, ít có khả năng rằng khả năng tạo bọt của môi trường nuôi cấy tăng lên mạnh, và sự tăng khả năng tạo bọt gây khó khăn cho việc tiếp tục lên men. Khí cacbon dioxit tốt hơn nữa là khí có đường kính bọt trung bình là 200 μm hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 500 μm hoặc lớn hơn.

Khí cacbon dioxit tốt hơn là khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 100 cm hoặc nhỏ hơn. Khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 100 cm hoặc nhỏ hơn là tốt hơn, vì cacbon dioxit có thể hòa tan đủ trong môi trường nuôi cấy. Khí cacbon dioxit tốt hơn nữa là khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 50 cm hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là khí cacbon dioxit có đường kính bọt trung bình là 20 cm hoặc nhỏ hơn.

Khí cacbon dioxit có thể được cung cấp cho môi trường nuôi cấy sử dụng máy tạo bọt thường được dùng. Các ví dụ về máy tạo bọt bao gồm cả máy sục khí.

Các ví dụ về phương pháp đo đường kính bọt trung bình bao gồm: phương pháp đo bằng phương pháp nhiễu xạ/tán xạ tia laze sử dụng thiết bị đo phân bố kích thước hạt (ví dụ, LS 13 320 được sản xuất bởi Beckman Coulter); phương pháp đo dựa trên phương pháp điện trở khe lỗ sử dụng thiết bị đo phân bố kích thước hạt chính xác (ví dụ, MULTISIZER 3 được sản xuất bởi Beckman Coulter); và phương pháp trong đó ảnh thang độ xám được xử lý để tạo ra hình ảnh nhị phân sử dụng máy quay tốc độ cao.

Chất khử không bị giới hạn cụ thể miễn là nó là thành phần mà có thể khử các thành phần trong môi trường nuôi cấy hoặc tế bào vi sinh vật trong quá trình nuôi cấy trong khi bản thân chất khử bị oxy hóa. Các ví dụ về chúng bao gồm sulfua, các hợp chất cacbon, và hydro. Các ví dụ cụ thể về sulfua bao gồm sulfit (như natri sulfit, natri hydro sulfit, kali sulfit, hoặc amoni sulfit); thiosulfat (như natri thiosulfat hoặc kali thiosulfat); muối của ion sulfua (như natri sulfua, natri hydro sulfua, kali sulfua, hoặc amoni sulfua); xystein, lưu huỳnh dioxit, và hydro sulfua. Các ví dụ cụ thể về các hợp chất cacbon bao gồm rượu, axit béo, parafin, và cacbon oxit. Chất khử tốt hơn là sulfua, tốt hơn nữa là natri sulfit, natri hydro sulfit, natri sulfua, hoặc xystein, và còn tốt hơn nữa là natri sulfit.

Hàm lượng của chất khử được cung cấp vào môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là sản phẩm dự kiến có thể được sản xuất hiệu quả, và có thể được thiết lập thích hợp theo thành phần được cung cấp. Ví dụ, hàm lượng của natri sulfit cho mỗi 1L môi trường nuôi cấy tốt hơn là 0,01 g/L hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 0,1 g/L hoặc nhiều hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là 1 g/L hoặc nhiều hơn. Hàm lượng của chất khử được cung cấp tốt hơn là 50 g/L hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là 20 g/L hoặc ít hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là 10 g/L hoặc ít hơn.

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế có thể còn bao gồm bước cung cấp khí để thu khí chứa cacbon dioxit được tạo ra từ quá trình nuôi cấy và cung cấp khí cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy. Nghĩa là, khí cacbon dioxit không

được sử dụng trong môi trường nuôi cấy và được giải phóng như khí thải có thể được tuần hoàn và được tái sử dụng bằng cách cung cấp lại cho môi trường nuôi cấy.

Phương pháp cung cấp khí cho môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể miễn là nó là phương pháp thường được dùng. Các ví dụ về chúng bao gồm phương pháp trong đó khí được nén và xả vào chất lỏng từ bộ phận hình tròn hoặc giống như đĩa có các lỗ mịn (trong trường hợp mà trong đó khí là không khí, phương pháp được gọi là phương pháp sục khí hoặc phương pháp nạp khí); phương pháp trong đó khí được cung cấp từ ống rỗng, được gọi là ống sục khí, mà có các lỗ rỗng trên bề mặt chu vi của toàn bộ một bên; và phương pháp sử dụng máy sục khí (thiết bị phân tán khí trong đó nguyên liệu rỗng có nhiều lỗ để tạo ra bọt không khí mịn, hoặc tương tự, được gắn vào đầu nhọn của ống nhựa hoặc ống không gỉ.

Thành phần của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong môi trường nuôi cấy có thể thay đổi tùy theo loại và hoạt động của vi sinh vật. Thông thường, dịch vi khuẩn tiền nuôi cấy ($OD_{660nm} = 4$ đến 8) có thể được thêm vào thời điểm bắt đầu của quá trình nuôi cấy với lượng từ 0,1% theo khối lượng đến 30% theo khối lượng đối với dịch nuôi cấy, và tốt hơn là với lượng từ 1% theo khối lượng đến 10% theo khối lượng xét về việc điều chỉnh các điều kiện nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA không bị giới hạn cụ thể miễn là nó là môi trường nuôi cấy thường được dùng và bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, và ion vô cơ, và còn cả yếu tố vi lượng vô cơ, axit nucleic, và vitamin, v.v., là cần thiết cho vi sinh vật sản xuất sản phẩm dự kiến.

Theo sáng chế thứ nhất, điều kiện nuôi cấy trong quy trình nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể, và việc nuôi cấy có thể được tiến hành, ví dụ, trong các điều kiện yếm khí ở độ pH và nhiệt độ được điều chỉnh thích hợp nằm trong khoảng pH=4 đến 9 (tốt hơn là pH=6 đến 8) và trong khoảng nhiệt độ từ 20°C đến 50°C (tốt hơn là 25°C đến 42°C).

Theo sáng chế thứ hai, điều kiện nuôi cấy trong quy trình nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể. Trong trường hợp nấm *Aspergillus*, việc nuôi cấy có thể được tiến hành, ví dụ, trong điều kiện yếm khí ở độ pH và nhiệt độ được điều chỉnh thích hợp nằm trong khoảng pH=1 đến 10 (tốt hơn là pH=3 đến 7) và trong khoảng nhiệt độ từ 20°C đến 50°C (tốt hơn là 25°C đến 42°C). Trong trường hợp vi khuẩn *Cupriavidus*, việc nuôi cấy có thể được tiến hành, ví dụ, trong điều kiện yếm khí ở độ pH và nhiệt độ được điều chỉnh thích hợp nằm trong khoảng pH=4 đến 9 (tốt hơn là pH=6 đến 8) và trong khoảng nhiệt độ từ

20°C đến 50°C (tốt hơn là 25°C đến 42°C).

Thể tích sục khí vào hỗn hợp chứa vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA và nguồn nguyên liệu cacbon không bị giới hạn cụ thể. Trong trường hợp mà trong đó chỉ có không khí được sử dụng làm khí thông, thể tích sục khí thường từ 0,02 vvm đến 2,0 vvm (vvm: thể tích sục khí [mL]/thể tích chất lỏng [mL]/thời gian [phút]) ở 50 đến 600 vòng/phút. Xét về việc kìm hãm tổn thất về mặt vật lý đối với vi sinh vật, sự sục khí được tiến hành tốt hơn là ở 0,1 vvm to 2,0 vvm, và tốt hơn nữa là ở 0,1 vvm đến 1,0 vvm.

Quy trình nuôi cấy có thể được liên tục từ lúc bắt đầu của quá trình nuôi cấy đến khi nguồn nguyên liệu cacbon trong hỗn hợp bị cạn kiệt, hoặc đến khi hoạt động của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA không còn. Thời gian của quy trình nuôi cấy có thể thay đổi tùy theo số lượng và hoạt động của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong hỗn hợp và lượng nguồn nguyên liệu cacbon. Nói chung, thời gian có thể là ít nhất 1 giờ, và tốt hơn là ít nhất 4 giờ. Trong quy trình nuôi cấy, thời gian của quy trình nuôi cấy có thể là liên tục không xác định bởi sự bổ sung của nguồn nguyên liệu cacbon hoặc vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA. Tuy nhiên, xét về hiệu quả của quy trình, thời gian có thể thường được thiết lập là 5 ngày hoặc ít hơn, tốt hơn là 72 giờ hoặc ít hơn. Đối với các điều kiện khác, các điều kiện được sử dụng cho nuôi cấy thông thường có thể được áp dụng như bình thường.

Phương pháp thu sản phẩm dự kiến được tích lũy trong môi trường nuôi cấy không bị giới hạn cụ thể. Vì dịch nuôi cấy thu được bởi quy trình nuôi cấy là hỗn hợp của sản phẩm dự kiến và (các) thành phần khác, phương pháp trong đó tế bào vi sinh vật được loại bỏ khỏi môi trường nuôi cấy bởi sự phân tách bằng ly tâm hoặc tương tự, và sau đó sản phẩm dự kiến được tách riêng sử dụng phương pháp phân tách thông thường ví dụ như chưng cất hoặc sự phân tách màng trong các điều kiện phù hợp với loại sản phẩm dự kiến, ví dụ, có thể được áp dụng.

Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo sáng chế có thể còn bao gồm, trước quy trình nuôi cấy, quy trình tiền nuôi cấy để đạt được lượng tế bào thích hợp và/hoặc trạng thái kích hoạt phù hợp của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được sử dụng. Quy trình tiền nuôi cấy có thể là quy trình nuôi cấy bất kỳ được thực hiện trong các điều kiện thích hợp thường được dùng đối với loại vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA.

Phương pháp sản xuất rượu isopropylic và phương pháp sản xuất axeton

Phương pháp sản xuất rượu isopropylic và phương pháp sản xuất axeton theo sáng chế bao gồm sản xuất sản phẩm dự kiến, lần lượt là rượu isopropylic hoặc axeton, từ nguồn nguyên liệu cacbon sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA. Nghĩa là, mỗi phương pháp sản xuất rượu isopropylic và phương pháp sản xuất axeton theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon; và bước thu gom để thu sản phẩm dự kiến (rượu isopropylic hoặc axeton) thu được nhờ sự tiếp xúc này.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được sử dụng trong phương pháp sản xuất rượu isopropylic tốt hơn là vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có hoạt tính thiolaza, hoạt tính CoA transferaza, hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, và rượu isopropylic có hoạt tính dehydroaza, được mô tả ở trên làm ví dụ ưu tiên của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, xét về hiệu quả sản xuất rượu isopropylic.

Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được sử dụng trong phương pháp sản xuất axeton tốt hơn là vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA có hoạt tính thiolaza, hoạt tính của CoA transferaza, và hoạt tính axetoaxetat decarboxylaza, được mô tả ở trên làm ví dụ ưu tiên của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, xét về hiệu quả sản xuất axeton.

Mỗi phương pháp sản xuất rượu isopropylic và phương pháp sản xuất axeton tốt hơn là bao gồm bước nuôi cấy trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được nuôi cấy trong khi cung cấp khí vào hỗn hợp chứa vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA và nguồn nguyên liệu cacbon (còn được gọi là "bước nuôi cấy sục khí"); và bước thu sản phẩm dự kiến trong đó sản phẩm dự kiến (rượu isopropylic hoặc axeton) được tạo ra bởi bước nuôi cấy được tách riêng và được thu hồi từ hỗn hợp. Trong quá trình nuôi cấy sục khí trong bước nuôi cấy sục khí, sản phẩm dự kiến được giải phóng vào hỗn hợp, và bay hơi ra khỏi hỗn hợp. Kết quả là, sản phẩm dự kiến có thể được tách ra dễ dàng ra khỏi hỗn hợp. Hơn nữa, vì sản phẩm dự kiến được tách liên tục ra khỏi hỗn hợp, nên sự tăng hàm lượng của sản phẩm dự kiến trong hỗn hợp có thể được kìm hãm. Do đó, không cần thiết phải quan tâm đến khả năng dung nạp của vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA đối với sản phẩm dự kiến. Đối với điều kiện nuôi cấy, các điều kiện được mô tả ở trên có thể áp dụng bình thường.

Phương pháp thu sản phẩm dự kiến trong bước thu sản phẩm dự kiến có thể là phương pháp bất kỳ miễn là sản phẩm dự kiến ở trạng thái khí hoặc giọt nhỏ mà bay hơi ra khỏi hỗn hợp trong quá trình nuôi cấy có thể được thu hồi. Các ví dụ về chúng bao

gồm phương pháp thu sản phẩm dự kiến vào bộ phận thu ví dụ như thùng chứa kín thường được dùng. Cụ thể, phương pháp tốt hơn là bao gồm bước cho dung dịch bẫy để bẫy sản phẩm dự kiến tiếp xúc với sản phẩm dự kiến được tách ra từ hỗn hợp, xét về việc chỉ thu sản phẩm dự kiến với độ tinh lọc cao.

Theo phương pháp sản xuất rượu isopropylic và phương pháp sản xuất axeton, sản phẩm dự kiến có thể được thu ở dạng trong đó sản phẩm dự kiến được hòa tan trong dung dịch bẫy hoặc hỗn hợp. Các ví dụ của phương pháp thu bao gồm phương pháp được mô tả trong WO 2009/008377. Trong trường hợp mà trong đó sản phẩm dự kiến được thu là trong trạng thái dung dịch chứa nước, phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm quá trình khử nước. Việc khử nước của sản phẩm dự kiến có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường. Sản phẩm dự kiến thu được có thể được xác nhận bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện thông thường ví dụ như HPLC. Sản phẩm dự kiến được thu có thể còn được tinh lọc, nếu cần. Các ví dụ về phương pháp tinh lọc bao gồm chưng cất.

Các ví dụ về các thiết bị có thể dùng được cho phương pháp sản xuất sản phẩm dự kiến trong đó sản phẩm dự kiến có thể thu được ở trạng thái được hòa tan trong dung dịch bẫy hoặc hỗn hợp bao gồm thiết bị sản xuất được mô tả trên Fig. 1 của WO 2009/008377. Trong thiết bị sản xuất này, ống tiêm để phun khí từ bên ngoài vào thiết bị được kết nối với bể nuôi cấy chứa môi trường nuôi cấy bao gồm vi sinh vật được dùng và nguyên liệu thô có nguồn gốc thực vật, từ đó, cho phép sự khuếch tán vào môi trường nuôi cấy. Bể bẫy mà chứa dung dịch bẫy (chất lỏng bẫy) được kết nối với bể nuôi cấy thông qua ống kết nối. Sản phẩm dự kiến, mà được sản xuất trong bể nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy sự khuếch tán, bay hơi do sự khuếch tán, và, do đó, có thể được tách ra dễ dàng ra khỏi môi trường nuôi cấy. Khí hoặc chất lỏng mà được chuyển đến bể bẫy tiếp xúc dung dịch bẫy, và sự khuếch tán xảy ra. Kết quả là, khí hoặc chất lỏng bị giữ trong dung dịch bẫy. Bằng cách sử dụng thiết bị sản xuất này, sản phẩm dự kiến có thể được tạo ra ở trạng thái tinh lọc hơn theo cách đơn giản và liên tục.

Phương pháp sản xuất glutamat

Phương pháp sản xuất glutamat theo sáng chế bao gồm sản xuất glutamat là sản phẩm dự kiến từ nguồn nguyên liệu cacbon sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA. Cụ thể, phương pháp sản xuất glutamat theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với

nguồn nguyên liệu cacbon; và bước thu gom để thu sản phẩm dự kiến (glutamat) thu được nhờ sự tiếp xúc này.

Theo phương pháp sản xuất glutamat theo sáng chế, vì vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được nuôi cấy trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, nguồn nguyên liệu cacbon được tiêu hóa bởi vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, nhờ đó glutamat có thể được sản xuất hiệu quả trong khi cacbon dioxit được cố định.

Môi trường nuôi cấy được dùng để nuôi cấy có thể là môi trường nuôi cấy bất kỳ thường được sử dụng mà bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, và muối vô cơ, và chất dinh dưỡng vi lượng hữu cơ ví dụ như axit amin và vitamin. Môi trường nuôi cấy tổng hợp và/hoặc môi trường nuôi cấy tự nhiên có thể được sử dụng. Mỗi nguồn cacbon và nguồn nitơ được sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể là kiểu bất kỳ mà có thể được sử dụng bởi vi sinh vật được nuôi cấy.

Các ví dụ về nguồn cacbon bao gồm: đường ví dụ như glucoza, glyxerol, fructoza, sucroza, maltoza, mannoza, galactoza, chất thủy phân tinh bột, hoặc rỉ đường; axit hữu cơ ví dụ như axit axetic hoặc axit citric, và rượu ví dụ như etanol. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với các nguồn cacbon khác. Các ví dụ về nguồn nitơ bao gồm amoniac, muối amoni ví dụ như amoni sulfat, amoni cacbonat, amoni clorua, amoni phosphat, hoặc amoni axetat, và muối của axit nitric. Các ví dụ về muối vô cơ bao gồm muối của axit phosphoric, muối magie, muối canxi, muối sắt, và muối mangan. Các ví dụ về dinh dưỡng vi lượng hữu cơ bao gồm: axit amin, vitamin, axit béo, và axit nucleic; và pepton, axit casamin, phần chiết của nấm men, và các chất thủy phân protein đậu nành, mà chứa các thành phần ở trên. Trong trường hợp mà trong đó thể đột biến khuyết dưỡng cần có axit amin hoặc tương tự để sinh trưởng được sử dụng, tốt hơn là cung cấp chất dinh dưỡng cần thiết.

Việc nuôi cấy tốt hơn là tiến hành ở nhiệt độ lên men từ 20°C đến 45°C và độ pH từ 3 đến 9 kèm sục khí. Để điều chỉnh độ pH, chất axit hoặc kiềm, vô cơ hoặc hữu cơ, khí amoniac, v.v. có thể được sử dụng. Axit amin L được tích lũy trong môi trường nuôi cấy hoặc trong tế bào vi khuẩn khi vi sinh vật được nuôi cấy tốt hơn là trong khoảng 10 giờ đến khoảng 120 giờ trong các điều kiện này.

Trong trường hợp mà trong đó axit amin L được quan tâm là L-glutamat, việc nuôi cấy có thể được tiến hành trong khi L-glutamat được kết tủa trong môi trường nuôi

cây, bằng cách sử dụng môi trường lỏng ở đó các điều kiện được điều chỉnh để kết tủa L-glutamat. Ví dụ, các điều kiện để kết tủa L-glutamat có thể là điều kiện axit với độ pH 4,0 đến 5,0, tốt hơn là độ pH 4,0 đến 4,5, tốt hơn nữa là độ pH 4,0 đến 4,3, và còn tốt hơn nữa là độ pH=4,0. Để đạt được cả sự sinh trưởng tăng ở các điều kiện axit và sự kết tủa hiệu quả của L-glutamat, độ pH tốt hơn là từ 4,0 đến 5,0, tốt hơn nữa là từ 4,0 đến 4,5, và còn tốt hơn nữa là từ 4,0 đến 4,3. Việc nuôi cấy ở độ pH nêu trên có thể được tiến hành trong toàn bộ giai đoạn nuôi cấy hoặc trong một phần của quá trình nuôi cấy.

Axit amin L có thể được thu từ dịch nuôi cấy theo phương pháp thu đã biết sau khi hoàn thành quá trình nuôi cấy. Ví dụ, việc thu gom có thể được thực hiện bằng phương pháp trong đó sự kết tinh cô đặc được tiến hành sau khi loại bỏ tế bào vi khuẩn ra khỏi môi trường nuôi cấy, hoặc bằng sắc ký trao đổi ion. Trong trường hợp mà trong đó, việc nuôi cấy được thực hiện trong các điều kiện mà cho phép kết tủa L-glutamat trong môi trường nuôi cấy, L-glutamat được kết tủa trong môi trường nuôi cấy có thể thu được bằng phân tách bằng ly tâm, lọc, hoặc tương tự. Trong các trường hợp đó, L-glutamat được hòa tan trong môi trường nuôi cấy có thể được thu cùng nhau, sau khi được kết tinh.

Phương pháp sản xuất axit xitric, phương pháp sản xuất axit itaconic và phương pháp sản xuất axit (poly)3-hydroxybutyric

Mỗi phương pháp sản xuất axit xitric, phương pháp sản xuất axit itaconic, và phương pháp sản xuất axit (poly)3-hydroxybutyric theo sáng chế bao gồm bước sản xuất sản phẩm dự kiến tương ứng (axit xitric, axit itaconic, hoặc axit (poly)3-hydroxybutyric) từ nguồn nguyên liệu cacbon sử dụng vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA. Cụ thể, phương pháp sản xuất axit xitric, phương pháp sản xuất axit itaconic, và phương pháp sản xuất axit (poly)3-hydroxybutyric theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon; và bước thu gom để thu sản phẩm dự kiến (axit xitric, axit itaconic, hoặc axit (poly)3-hydroxybutyric) thu được nhờ sự tiếp xúc này.

Theo các phương pháp tương ứng ở trên, vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được nuôi cấy trong khi vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA được tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, nguồn nguyên liệu cacbon được tiêu hóa bởi vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, nhờ đó sản phẩm dự kiến (axit xitric, axit itaconic, hoặc axit (poly)3-hydroxybutyric) có thể được sản xuất hiệu quả trong khi cacbon dioxit được cố định.

Môi trường nuôi cấy được dùng cho nuôi cấy có thể là môi trường nuôi cấy bất

kỳ thường được dùng mà bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, và muối vô cơ, và chất dinh dưỡng vi lượng hữu cơ ví dụ như axit amin và vitamin. Môi trường nuôi cấy tổng hợp và/hoặc môi trường nuôi cấy tự nhiên có thể được sử dụng. Mỗi nguồn cacbon và nguồn nitơ được sử dụng trong môi trường nuôi cấy có thể là kiểu bất kỳ mà có thể được sử dụng bởi vì sinh vật được nuôi cấy.

Các ví dụ về nguồn cacbon bao gồm: đường ví dụ như glucoza, glyxerol, fructoza, sucroza, maltoza, manosa, galactoza, các chất thủy phân tinh bột, hoặc rỉ đường; axit hữu cơ ví dụ như axit axetic hoặc axit xitric, và rượu ví dụ như etanol. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với các nguồn cacbon khác. Các ví dụ về nguồn nitơ bao gồm amoniac, muối amoni ví dụ như amoni sulfat, amoni cacbonat, amoni clorua, amoni phosphat, hoặc amoni axetat, và muối của axit nitric. Các ví dụ về muối vô cơ bao gồm muối của axit phosphoric, muối magie, và muối canxi, muối sắt, và muối mangan. Các ví dụ về chất dinh dưỡng vi lượng hữu cơ bao gồm: axit amin, vitamin, axit béo, và axit nucleic; và pepton, axit casamin, phần chiết của nấm men, và các chất thủy phân protein của đậu nành, mà chứa các thành phần ở trên. Trong trường hợp mà trong đó thể đột biến khuyết dưỡng cần có axit amin hoặc tương tự để sinh trưởng được sử dụng, tốt hơn là cung cấp chất dinh dưỡng cần thiết.

Theo phương pháp sản xuất axit xitric, phương pháp sản xuất axit itaconic, và phương pháp sản xuất axit (poly)3-hydroxybutyric theo sáng chế, sản phẩm dự kiến (axit xitric, axit itaconic, hoặc axit (poly)3-hydroxybutyric) có thể thu được ở trạng thái trong đó sản phẩm dự kiến được hòa tan trong dịch nuôi cấy, ở trạng thái trong đó sản phẩm dự kiến được kết tủa, ở thể rắn, từ dịch nuôi cấy, hoặc ở trạng thái trong đó sản phẩm dự kiến được tích lũy trong tế bào vi khuẩn. Trong trường hợp mà trong đó sản phẩm dự kiến thu được ở trạng thái dung dịch chứa nước, phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm quá trình khử nước. Khử nước của sản phẩm dự kiến có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường. Sản phẩm dự kiến thu được có thể được xác nhận bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện thông thường ví dụ như HPLC. Sản phẩm dự kiến thu được có thể được tinh chế tiếp, nếu cần. Các ví dụ về phương pháp tinh chế bao gồm kết tinh, và tinh chế bằng cột ví dụ như nhựa trao đổi ion.

Các ví dụ về phương pháp sản xuất prolin, leuxin, isoleuxin, valin, arginin, xitrulin, ornitin, axit axetic, axit (poly)3-hydroxybutyric, axit itaconic, axit xitric, axit butyric, hoặc axit polyglutamic mà vi sinh vật theo sáng chế có thể được áp dụng bao

gồm các phương pháp lần lượt được mô tả trong các trang 363 - 364, trang 61 - 63, trang 61 - 63, trang 61 - 63, trang 40 - 42, trang 40 - 42, trang 40 - 42, trang 189 - 192, trang 377 - 378, trang 64 - 65, trang 124 - 125, trang 19 - 23, và trang 373 của Sổ tay lên men (Fermentation Handbook (Kyoritsu Shuppan Co., Ltd.)).

Các ví dụ về phương pháp sản xuất axit 4-aminobutyric mà vi sinh vật theo sáng chế có thể được áp dụng bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật thu được bằng cách đưa glutamat decarboxylaza vào vi sinh vật sản xuất glutamat (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số 2011-167097).

Các ví dụ về phương pháp sản xuất axit 4-hydroxybutyric mà vi sinh vật theo sáng chế có thể được áp dụng bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật thu được bằng cách đưa glutamat decarboxylaza, aminotransferaza, và aldehyt dehydroaza vào vi sinh vật sản xuất glutamat (đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số 2009-171960).

Các ví dụ về phương pháp sản xuất axit 3-hydroxyisobutyric mà vi sinh vật theo sáng chế có thể được áp dụng bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật với quy trình được mô tả trong WO 2009/135074 hoặc quy trình được mô tả trong WO 2008/145737 được đưa vào.

Các ví dụ về phương pháp sản xuất axit 2-hydroxyisobutyric mà vi sinh vật theo sáng chế có thể được áp dụng bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật với quy trình được mô tả trong WO 2009/135074 hoặc quy trình được mô tả trong WO 2009/156214 được đưa vào.

Các ví dụ về phương pháp sản xuất axit 3-aminoisobutyric hoặc axit metacrylic mà vi sinh vật theo sáng chế có thể được áp dụng bao gồm phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật với quy trình được mô tả trong WO 2009/135074 được đưa vào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng cách viện dẫn đến các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Gen khởi đầu glyxeraldehyt-3-phosphat dehydroaza (GAPDH) từ *Escherichia coli* có thể được sử dụng làm gen khởi đầu cần thiết để biểu hiện gen được đưa vào từ bên ngoài tế bào. Trình tự bazơ của gen khởi đầu GAPDH từ *Escherichia coli* được chỉ ra trong các bazơ từ 397 đến 440 trong thông tin về trình tự bazơ có số đăng ký ngân hàng gen X02662. Trong các ví dụ tiếp theo, thuật ngữ “gen khởi đầu GAPDH” đề cập đến gen

khởi đầu GAPDH như được chỉ rõ ở trên.

Escherichia coli MG1655 có từ ATCC (American Type Culture Collection - Bảo tàng giống chuẩn của Mỹ).

Escherichia coli B (ATCC 11303) có từ ATCC.

ADN bộ gen (ATCC 33009D-5) của *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009 có từ ATCC.

Corynebacterium DSM 1412 có từ DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures - Bảo tàng Vi sinh vật và Nuôi cấy Tế bào của Đức).

Rhodococcus jostii NBRC 16295 có từ NBRC (National Institute of Technology and Evaluation, Biological Resource Center – Trung tâm Quốc gia về Kỹ thuật và Đánh giá, Trung tâm nguồn sinh học).

Aspergillus niger ATCC 1015 có từ ATCC.

Aspergillus terreus NBRC 6365 có từ NBRC.

Cupriavidus necator JMP 134 (DSM 4058) có từ DSMZ.

Ví dụ 1

Sự tạo thành Plasmid pMWGKC

Để thu được gen khởi đầu GAPDH, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của *Escherichia coli* MG1655 làm mẫu và sử dụng CGAGCTACATATGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO:42) và CGCGCGCATGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO:43) làm đoạn mồi. Cắt mảnh ADN thu được bằng enzym giới hạn NdeI và SphI để thu được mảnh ADN khoảng 110 bp tương ứng với gen khởi đầu GAPDH. Trộn mảnh ADN này với mảnh thu được bằng cách cắt plasmid pBR322 (số đăng ký ngân hàng gen J01749) bằng enzym giới hạn NdeI và SphI, và nối lại các mảnh được trộn sử dụng ligaza. Sau đó, biến nạp tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5α (ADN-903, TOYOBO Co., Ltd.) với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 µg/mL ampicilin. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 50 µg/mL ampicilin, và plasmid được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được để thu plasmid pBRgapP.

Thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng plasmid pBRgapP này làm mẫu và sử dụng CCGCTCGAGCATATGCTGTCGCAATGATTGACACG (SEQ ID NO:44) và

GCTATTCCATATGCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO:45) làm đoạn môi. Phosphoryl hóa mảnh ADN thu được bằng T4 Polynucleotit Kinaza (Takara) để thu được mảnh ADN chứa gen khởi đầu GAPDH.

Xử lý plasmit pMW119 (số đăng ký ngân hàng gen AB005476) bằng enzym giới hạn NdeI, và làm cùn các đầu của các mảnh ADN thu được bằng Polymeraza ADN cộng KOD (Takara), từ đó thu được mảnh ADN chứa vùng sao chép pMW119.

Trộn và nối mảnh ADN chứa gen khởi đầu GAPDH và mảnh ADN chứa vùng sao chép pMW119 sử dụng ligaza. Sau đó, biến nạp tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 50 μ g/mL ampicilin, và plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được để thu plasmit pMWG.

Để thu được gen kháng cloramphenicol, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng pTH18cs1 (số đăng ký ngân hàng gen AB019610) làm mẫu và sử dụng TCGGCACGTAAGAGGTTCC (SEQ ID NO:46) và CGGGTCGAATTTGCTTTCG (SEQ ID NO:47) làm đoạn môi. Phosphoryl hóa mảnh ADN thu được bằng T4 Polynucleotit Kinaza (Takara) để thu được mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol. Sau đó, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng pMWG làm mẫu và sử dụng CTAGATCTGACAGTAAGACGGGTAAGCC (SEQ ID NO:48) và CTAGATCTCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO:49) làm đoạn môi, và trộn và nối mảnh ADN thu được với mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol sử dụng ligaza. Sau đó, biến nạp tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL cloramphenicol. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 25 μ g/mL cloramphenicol, và plasmit thu được được đặt tên là "pMWGC".

Sự khuếch đại được tiến hành bằng PCR sử dụng plasmit pMWGC làm mẫu và sử dụng CCTTTGGTTAAAGGCTTTAAGATCTTCCAGTGGACAAACTATGCC (SEQ ID NO:50) và GGCATAGTTTGTCCACTGGAAGATCTTAAAGCCTTTAACC AAAGG (SEQ ID NO:51) làm đoạn môi. Sau đó, biến nạp tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α với sản phẩm của sự khuếch đại, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL cloramphenicol. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong

môi trường LB lỏng chứa 25 µg/mL cloramphenicol, và plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được để thu plasmit pMWGKC.

Ví dụ 2

Xây dựng plasmit biểu hiện pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) cho mtk và mcl từ *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009

Tiến hành PCR sử dụng ADN bộ gen của *Methylococcus capsulatus* làm mẫu và sử dụng GGAATTCCATATGGCTGTAAAAATCGTCTAC (SEQ ID NO:52) và GCTCTAGATCAGAATCTGATTCCGTGTTC (SEQ ID NO:53) làm đoạn mồi, từ đó thu được mảnh *Methylococcus* mcl-mtk. Mảnh thu được bằng cách cắt mảnh mcl-mtk này được nối với mảnh thu được bằng cách cắt plasmit pMWGKC được tạo ra trong Ví dụ 1. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 µg/mL cloramphenicol. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 30°C trong môi trường LB lỏng chứa 25 µg/mL cloramphenicol, và plasmit thu được được đặt tên là "pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc)".

pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) bao gồm trình tự bazơ của gen malyl-CoA lyaza (mcl) (SEQ ID NO:41), trình tự bazơ của gen cấu trúc siêu phân tử malat thiokinaza α (mtkA) (SEQ ID NO:28) và trình tự bazơ của gen cấu trúc siêu phân tử malat thiokinaza β (mtkB) (SEQ ID NO:29) từ *Methylococcus capsulatus*. Trình tự axit amin của malyl-CoA lyaza (Mcl), trình tự axit amin của cấu trúc siêu phân tử malat thiokinaza α (MtkA) và trình tự axit amin của cấu trúc siêu phân tử malat thiokinaza β (MtkB) từ *Methylococcus capsulatus* lần lượt được chỉ ra trong SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:13 và SEQ ID NO:14.

Ví dụ 3

Sự tạo thành plasmit pCASET

Thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng pHSG298 (Takara) làm mẫu và sử dụng CGCCTCGAGTGACTCATACCAGGCCTG (SEQ ID NO:54) và CGCCTCGAGGCAACACCTTCTTCACGAG (SEQ ID NO:55) làm đoạn mồi, và mảnh ADN thu được được cắt bởi enzym giới hạn XhoI và được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5α (ADN-903, TOYOBO Co., Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 µg/mL kanamycin. Plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, và plasmit, trong đó

trình tự nhận biết XhoI được chèn vào pHSG298, được đặt tên là "pHSG298-XhoI".

Để thu được gen khởi đầu tac, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng pKK223-3 (Pharmacia) làm mẫu và sử dụng ATCATCCAGCTGTCAGGCAGCCATCGGAAG (SEQ ID NO:56) và ATCCCCGGGAATTCTGTT (SEQ ID NO:57) làm đoạn mồi. Cắt mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn PvuII và SmaI để thu được mảnh ADN khoảng 0,2 kbp mã hóa gen khởi đầu tac.

Trộn mảnh ADN mã hóa gen khởi đầu tac này với mảnh ADN khoảng 2,4 kbp được tạo ra nhờ việc cắt plasmit pHSG298-XhoI bằng enzym giới hạn PvuII và xử lý tiếp mảnh thu được bằng kiềm phosphatase, và nối các mảnh ADN này sử dụng ligaza. Sau đó, biến nạp tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α (ADN-903, TOYOBO Co., Ltd.) với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL kanamycin. Plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, kết quả là thu được plasmit pHSGT1 trong đó gen khởi đầu lac của pHSG298-XhoI được thay thế bởi gen khởi đầu tac, gen khởi đầu tac có cùng hướng với gen khởi đầu lac gốc.

Để nối vị trí đa tách dòng của pHSG298 với vị trí trong pHSGT1 thu được cùng hướng với gen khởi đầu tac, cắt pHSG298 bằng enzym giới hạn EcoRI và ClaI để thu được mảnh ADN khoảng 1,0 kbp chứa vị trí đa tách dòng của pHSG298. Trộn mảnh ADN thu được với mảnh ADN khoảng 1,7 kbp được tạo ra bằng cách cắt plasmit pHSGT1 bằng enzym giới hạn EcoRI và ClaI và xử lý tiếp mảnh thu được với kiềm phosphatase, và các mảnh ADN này được nối sử dụng ligaza. Sau đó, biến nạp tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α (ADN-903, TOYOBO Co., Ltd.) với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL kanamycin. Plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, kết quả là thu được plasmit pHSGT2 trong đó vị trí đa tách dòng của pHSG298 được nối với vị trí cùng hướng với gen khởi đầu tac.

Mảnh ADN (SEQ ID NO:58) chứa vùng sao chép, repA và repB của pCASE1 (Applied Microbiology and Biotechnology, 2009; 81: 1107-1115) được phân lập từ *Corynebacterium casei* JCM12072 được tạo ra bằng cách tổng hợp ADN. Trình tự của chúng được chỉ ra bên dưới.

SEQ ID NO:58:

CGCCTCGAGCACTGGAAGGGTTCTTCAGGGGAACCCCCGGAAACCGGGGAA
 ACATCTGACTTGGTTAAATGTCGTATTATGAACACGCCGAGGAATGAAAACCG
 ACCGTGCACGCTCGTGTGAGAAAGTCAGCTACATGAGACCAACTACCCGCCC
 TGAGGGACGCTTTGAGCAGCTGTGGCTGCCGCTGTGGCCATTGGCAAGCGAT
 GACCTCCGTGAGGGCATTACCGCACCTCACGGAAGAACGCGCTGGATAAGC
 GCTACGTCTGAAGCCAATCCCGACGCGCTCTCTAACCTCCTGGTCGTTGACATC
 GACCAGGAGGACGCGCTTTTGGCGCTCTTTGTGGGACAGGGAGGACTGGAGAC
 CTAACGCGGTGGTTGAAAACCCCTTAAACGGGCACGCACACGCTGTCTGGGC
 GCTCGCGGAGCCATTACCCGCACCGAATACGCCAAACGCAAGCCTTTGGCCT
 ATGCCGCGGCTGTCACCGAAGGCCTACGGCGCTCTGTTCGATGGCGATAGCGGA
 TACTCCGGGCTGATCACCAAAAACCCCGAGCACACTGCATGGGATAGTCACTG
 GATCACCGATAAGCTGTATACGCTCGATGAGCTGCGCTTTTGGCTCGAAGAAA
 CCGGCTTTATGCCGCCTGCGTCCTGGAGGAAAACGCGGGCGGTTCTCGCCAGTT
 GGTCTAGGTCGTAATTGCGCACTCTTTGAAAGCGCACGTACGTGGGCATATCG
 GGAGGTCAGAAAGCATTTTGGAGACGCTGACGGCCTAGGCCGCGCAATCCAA
 ACCACCGCGCAAGCACTTAACCAAGAGCTGTTTGATGAACCACTACCTGTGGC
 CGAAGTTGACTGTATTGCCAGGTCAATCCATAAATGGATCATCACCAAGTCAC
 GCATGTGGACAGACGGCGCCGCGTCTACGACGCCACATTCACCGCAATGCAA
 TCCGCACGCGGGAAGAAAGGCTGGCAACGAAGCGCTGAGGTGCGTCGTGAG
 GCTGGACATACTCTTTGGAGGAACATTGGCTAAGGTTTATGCACGTTATCCACG
 CAACGGAAAAACAGCCCGCGAGCTGGCAGAACGTGCCGGTATGTCGGTGAGA
 ACAGCTCAACGATGGACTTCCGAACCGCGTGAAGTGTTTATTAAACGTGCCAA
 CGAGAAGCGTGCTCGCGTCCAGGAGCTGCGCGCCAAAGGTCTGTCCATGCGC
 GCTATCGCGGCAGAGATTGGTTGCTCGGTGGGCACGGTTCACCGCTACGTCAA
 AGAAGTTGAAGAGAAGAAAACCGCGTAAATCCAGCGGTTTAGTCAACCCTCGG
 CGTGTTCAAAGTCCATCGTAACCAAGTCAGCTCGAGGCG

Do đó, mảnh ADN thu được bằng cách cắt mảnh ADN được tạo ra bằng enzym giới hạn XhoI được trộn với mảnh ADN được tạo ra bằng cách cắt plasmit pHSGT2 bằng enzym giới hạn XhoI và xử lý tiếp mảnh thu được với kiềm phosphataza, và các mảnh ADN này được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α (ADN-903, TOYOBO Co., Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 μ g/mL kanamycin. Plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, và plasmit, trong đó mảnh ADN chứa vùng sao chép, repA và

repB của pCASE1 được chèn vào vị trí nhận biết XhoI của pHSGT2, được đặt tên là "pCASET". Trong pCASET thu hồi được, hướng của repA từ pCASE1 là ngược với hướng của gen khởi đầu tac.

Ví dụ 4

Xây dựng plasmit biểu hiện pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc) đối với mtk và mcl từ *Methylococcus capsulatus*

Tiến hành PCR sử dụng pMWGKC_mcl(Mc)_mtk(Mc) (gen chứa mcl và mtk từ *Methylococcus capsulatus*) làm mẫu và sử dụng cặp mồi GGAATTCACAAAAAGGATAAAACAATGGCTGTCAAGAACCGTCTAC (SEQ ID NO:59) và CGAATTCTCAGAATCTGATTCCGTGTTTCCTG (SEQ ID NO:60), từ đó thu được mảnh ADN chứa *Methylococcus* mcl-mtk. Mỗi đoạn mồi SEQ ID NO: 59 và SEQ ID NO:60 có vị trí nhận biết EcoRI ở vùng đầu 5' của chúng.

Mảnh ADN chứa *Methylococcus* mcl-mtk và mảnh thu được bằng cách tách plasmit pCASET được tạo ra ở Ví dụ 3 bằng EcoRI và khử phosphoryl hóa mảnh thu được được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* JM109 (ADN-900, TOYOBO Co., Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 µg/mL kanamycin. Plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, và plasmit, trong đó mảnh mcl-mtk được chèn vào theo hướng thích hợp để biểu hiện dựa trên gen khởi đầu của plasmit, được đặt tên là "pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)".

Plasmit pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc) bao gồm trình tự bazơ của mcl (SEQ ID NO:41), trình tự bazơ của mtkA (SEQ ID NO:28) và trình tự bazơ của mtkB (SEQ ID NO:29) từ *Methylococcus capsulatus*.

Ví dụ 5

Xây dựng plasmit biểu hiện mtk, mcl, gcl và glxR đối với *Corynebacterium*

Nuôi cấy *Rhodococcus jostii* NBRC 16295 trong môi trường NBRC số 802, và thu được ADN bộ gen sử dụng DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Tiến hành PCR sử dụng ADN bộ gen này làm mẫu và sử dụng CGAGCTCAAGCTTACAAAAAGGATAAAACAATGAGCACCATTGCATTCATCGG (SEQ ID NO:61) và CGGGATCCCTAGTCCAGCAGCATGAGAG (SEQ ID NO:62) làm đoạn mồi, từ đó thu được mảnh *Rhodococcus* glxR-gcl (SEQ ID NO:63).

Mảnh thu được bằng cách cắt mảnh *Rhodococcus* glxR-gcl bằng enzym giới hạn SacI và BamHI được nối với mảnh thu được bằng cách cắt pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc) được xây dựng ở Ví dụ 4 bằng SacI và BamHI. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* JM109 (ADN-900, TOYOBO Co., Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 µg/mL kanamycin. Plasmid được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, và plasmid, trong đó mảnh glxR-gcl được chèn vào pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc), được đặt tên là "pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj)".

Plasmid pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj) bao gồm trình tự bazơ của 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (glxR) (SEQ ID NO:64) và trình tự bazơ của glyoxylat carboligaza (gcl) (SEQ ID NO:65) từ *Rhodococcus jostii* ngoài trình tự bazơ của mcl (SEQ ID NO:41), trình tự bazơ của mtkA (SEQ ID NO:28) và trình tự bazơ của mtkB (SEQ ID NO:29) từ *Methylococcus capsulatus*. Trình tự axit amin của 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (GlxR) và trình tự axit amin của glyoxylat carboligaza (Gcl) từ *Rhodococcus jostii* lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:66 và SEQ ID NO:67.

Ví dụ 6

Sự tạo thành plasmid pMWCBL

Thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng pMWGKC được tạo thành ở Ví dụ 1 làm mẫu và sử dụng ATCGATCTCGAGTTACCCGTCTTACTGTCAGATCTAG (SEQ ID NO:68) và ATCGATCTCGAGGCCTGTTGATGATACCGCTGCCTTA (SEQ ID NO:69) làm đoạn mồi, và mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn XhoI và được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5α (ADN-903, TOYOBO Co., Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/mL cloramphenicol. Plasmid được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, và plasmid, trong đó trình tự nhận biết XhoI được chèn vào pMWGKC, được đặt tên là "pMWGKC-XhoI".

Plasmid pBL1 (Journal of General Microbiology, 1984; 130: 2237-2246) được tạo ra từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, và PCR được thực hiện sử dụng plasmid thu được làm mẫu và sử dụng cặp mồi của CCGCTCGAGTCAACAACAAGACCCATCA (SEQ ID NO:70) và CCGCTCGAGCATGCACATGCAGTCATGT (SEQ ID NO:71), từ đó khuếch đại mảnh

ADN khoảng 1,8 kb chứa vùng sao chép và repA (SEQ ID NO:72). Trình tự của chúng được thể hiện bên dưới.

SEQ ID NO:72:

```
CCGCTCGAGTCAACAACAAGACCCATCATAGTTTGCCCCCGCGACATTGACCA
TAAATTCATCGCACAAAATATCGAACGGGGTTTATGCCGCTTTTAGTGGGTGCG
AAGAATAGTCTGCTCATTACCCGCGAACACCGCCGCATTCAGATCACGCTTAGT
AGCGTCCCCATGAGTAGGCAGAACCGCGTCCAAGTCCACATCATCCATAACGA
TCATGCACGGGGTGGAATCCACACCCAGACTTGCCAGCACCTCATTAGCGACA
CGTTGCGCAGCGGCCACGTCCTTAGCCTTATCCACGCAATCTAGAACGTACTG
CCTAACCGCGAAATCAGACTGAATCAGTTTCCAATCATCGGGCTTCACCAAAG
CAACAGCAACGCGGGTTGATTCGACCCGTTCCGGTGCTTCCAGACCGGCGAG
CTTGTACAGTTCTTCTTCCATTTACGACGTACATCAGCGTCTATGTAATCAATG
CCCAAAGCACGCTTAGCCCCACGTGACCAGGACGAACGCAGGTTTTTGAAC
CAACCTCATACTACGCCACCGAGCCACCAAAACAGCGTCCATATCCTCGCCG
GCGTCGCTTTGATCGGCCAACATATCCAACATCTGAAACGGCGTGTACGACCC
CTTAGACGCGGTTTTAGTAGCGGAGCCAGTCAGTTCCTGAGACATGCCCTTAG
CGAGGTAGGTTGCCATTTTCGCAGCGTCTCCACCCCAGGTAGACACCTGATCA
AGTTTGACCCCGTGCTCACGCAGTGGCGCGTCCATACCGGCCTTAACCACACC
AGCAGACCAGCGGGAAAACATGGAATCCTCAAACGCCTTGAGTTCATCGTCA
GACAGTGGACGATCCAAGAACAACAGCATGTTGCGGTGCAAGTGCCAACCGT
TCGCCCCAAGAGTCTGTGACCTCATAGTCACTATAGGTGTGCTCCACCCCGTACC
GTGCACGTTCTTTCTTCCACTGAGATGTTTTTACCATCGAAGAGTACGCAGTCT
TAATACCCGCTTCAACCTGCGCAAATGACTGTGAGCGGTTGTGTCGAACAGTG
CCCACAAACATCATGAGCGCGCCACCCGCCGCAAGTGATTCTTAGTAGCAAT
AGCCAGCTCAATGCGGCGTTCGCCCATGACTTCCAATTCAGCCAGAGGTGACC
CCCAGCGAGAGTGAGAGTTTTGCAGACCCTCAAACCTGCGAAGCACCGTTAGA
CGACCAGGACACCGCAACAGCTTCGTCCCTGCGCCACCTATGGCACCCCGCC
AGAGCCTTACTATTGGTGATCTTGTACATGACGTTTTGCCTACGCCACGCCCTA
GCGCGAGTGACCTTAGAACCTCATTGACCTGCGGTTCCCTTAGAGGTGTTTAC
TTCTATTTTCAGTGTTACCTAGACCCGATGTTGTGCGGGGTTGCGCAGTGCGAGT
TTGTGCGGGTGTTGTGCCCCGTTGTCTTAGCTAGTGCTATGGTTGTCAATTGAAA
CCCCTTCGGGTTATGTGGCCCCCGTGCAATATGAGTTGGTAGCTCGCACGGGGG
TTTGTCTTGTCTAGGGACTATTAATTTTTAGTGGTGTGGTGGCCGCCTAGCTT
```


GGCTATGCGTGCCAGCTTACCCGTACTCAATGTTAAAGATTTGCATCGACATGG
 GAGGGTTACGTGTCCGATACCTAGGGGGGGTATCCGCGACTAGGTGCCCCGGT
 GCTCACTGTCTGTACCGGCGGGGCAAGCCCCACACCCCGCATGGACAGGGTG
 GCTCCGCCCCCTGCACCCCCAGCAATCTGCATGTACATGTTTTACACATTAGCA
 CGACATGACTGCATGTGCATGCTCGAGCGG

Mảnh ADN thu được bằng cách cắt mảnh ADN được khuếch đại bằng enzym giới hạn XhoI được trộn với mảnh ADN thu được bằng cách cắt plasmit pMWGKC-XhoI bằng enzym giới hạn XhoI và xử lý tiếp mảnh thu được với kiềm phosphatase, và các mảnh ADN này được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* JM109 (ADN-900, TOYOBO Co., Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/mL cloramphenicol. Plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, và plasmit, trong đó mảnh ADN chứa vùng sao chép và repA của pBL1 được chèn vào vị trí nhận biết XhoI của pMWGKC-XhoI, được đặt tên là "pMWCBL".

Ví dụ 7

Xây dựng plasmit biểu hiện pMWCBL_pyc cho pyc từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Đối với trình tự bazơ của gen pyruvat carboxylaza từ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (số đăng ký ngân hàng gen BA000036 GI:21323455), mà đã được công khai, hai đoạn môi AAGCGAGCTCACAAAAGGATAAAACAATGTCGACTCACACATCTTCA (SEQ ID NO:73) và ATACATGCATGCTTAGGAAACGACGACGATCAA (SEQ ID NO:74) được tổng hợp. Đoạn môi SEQ ID NO:73 có vị trí nhận biết SacI ở vùng đầu 5' của chúng, và đoạn môi SEQ ID NO:74 có vị trí nhận biết SphI ở vùng đầu 5' của chúng.

ADN bộ gen của *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 được tạo thành, và PCR được thực hiện sử dụng ADN bộ gen thu được làm mẫu và sử dụng cặp môi SEQ ID NO:73 và SEQ ID NO:74, từ đó khuếch đại mảnh ADN khoảng 3,5 kb. Mảnh ADN này được cắt bằng SacI và SphI, và mảnh ADN thu được được phân tách bằng điện di gel agarosa và được thu hồi. Các mảnh ADN được thu hồi được trộn với pMWCBL mà được cắt bằng SacI và SphI và được xử lý tiếp với kiềm phosphatase, và các mảnh đã trộn được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* JM109 (được sản xuất bởi TOYOBO Co., Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể

biến nạp phát triển ở 30°C trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/mL cloramphenicol. Từ thể biến nạp thu được, thu hồi được plasmit pMWCBL_pyc trong đó gen pyruvat carboxylaza được chèn vào pMWCBL.

Plasmit pMWCBL_pyc chứa trình tự bazơ của gen pyruvat carboxylaza (pyc) từ *Corynebacterium glutamicum* (SEQ ID NO:75). Trình tự axit amin của pyruvat carboxylaza (Pyc) từ *Corynebacterium glutamicum* được thể hiện trong SEQ ID NO:76.

Ví dụ 8

Xây dựng các biến thể của *Corynebacterium glutamicum* để đánh giá

Plasmit được xây dựng ở các ví dụ 3, 5 và 7 được sử dụng riêng biệt để biến nạp *Corynebacterium glutamicum* DSM 1412 (sau đây được gọi là "chủng CG"), đóng vai trò vật chủ, bằng cách điện di. Mỗi biến thể thu được được cấy lên môi trường thạch LB chứa 15 µg/mL kanamycin và/hoặc 10 µg/mL cloramphenicol, và các biến thể mà phát triển ở đó được dùng để đánh giá. Các biến thể này được tổng hợp trong Bảng 2.

Bảng 2

Tên biến thể	Tên chủng/Plasmid	Đặc tính
CG/vec1	<i>C. glutamicum</i> /pCASET	Sở hữu vector đối chứng
CG/mtk_mcl/gcl_glxR	<i>C. glutamicum</i> /pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj)	Sự biểu hiện của mtk, mcl, gcl và glxR
CG/mtk_mcl/gcl_glxR/vec2	<i>C. glutamicum</i> /pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj)/pMWCBCL	Sự biểu hiện của mtk, mcl, gcl và glxR Sở hữu vector đối chứng
CG/mtk_mcl/gcl_glxR/pyc	<i>C. glutamicum</i> /pCASET_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj)/pMWCBCL_pyc	Sự biểu hiện của mtk, mcl, gcl và glxR Sự biểu hiện của pyc

32575

Ví dụ tham khảo 1

Đánh giá các biến thể *Corynebacterium* được truyền cho các gen mtk, mcl, gcl và glxR

Các biến thể CG/vec1 và CG/mtk_mcl/gcl_glxR được xây dựng trong Ví dụ 8 được nuôi cấy riêng biệt trong 2-mL môi trường LB lỏng chứa 15 µg/mL kanamycin ở 30°C kèm khuấy ở tốc độ 280 vòng/phút đến khi đủ đạt đến sự sinh trưởng. Sau đó, trong bình Erlenmeyer 100-mL được trang bị các vách ngăn khuấy trộn, 10 ml môi trường tối thiểu cho *Corynebacterium* chứa 20 g/L glucoza và 15 µg/mL kanamycin (30 g/L (NH₄)₂SO₄, 3 g/L Na₂HPO₄, 6 g/L KH₂PO₄, 2 g/L NaCl, 84 mg/L CaCl₂, 3,9 mg/L FeCl₃, 0,9 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0,3 mg/L CuCl₂·H₂O, 5,56 mg/L MnSO₄·5H₂O, 0,1 mg/L (NH₄)₆MO₇O₂₄·4H₂O, 0,3 mg/L Na₂B₄O₇·10H₂O, 0,4 g/L MgSO₄·7H₂O, 40 mg/L FeSO₄·7H₂O, 500 µg/L vitamin B1·HCl, 0,1 g/L EDTA và 10 µg/L biotin) được chuẩn bị. 1 mL dịch nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy trong môi trường LB lỏng được mô tả ở trên được bổ sung vào đó, và việc nuôi cấy được tiến hành trong từ 1 đến 4 ngày đến khi đủ đạt đến sự sinh trưởng, nhờ đó thu được dịch tiền nuôi cấy. Từ dịch tiền nuôi cấy này, tế bào vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm (5000 vòng/phút trong 5 phút).

Tiếp theo, chuẩn bị 2 mL môi trường tối thiểu cho *Corynebacterium* (hàm lượng biotin cuối cùng được thay đổi thành 2 µg/L) chứa 100 mM natri hydro cacbonat (được đánh dấu bằng ¹³C), 20 g/L glucoza, 1,5% (khối lượng/thể tích) Tween 60 (được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Co. LLC.) và 15 µg/mL kanamycin, và bổ sung tế bào vi khuẩn tiền nuôi cấy vào đó sao cho OD được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 1 đến 5. Sau khi đây nắp kín, tế bào vi khuẩn được nuôi cấy ở 30°C kèm khuấy ở tốc độ 150 vòng/phút trong từ 1 đến 2 ngày. Dịch nuôi cấy được lấy mẫu định kỳ, và tế bào vi khuẩn được loại bỏ ra khỏi mẫu bằng ly tâm (sử dụng máy ly tâm được sản xuất bởi Millipore Corporation ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 3 phút). Dịch nổi được lọc qua màng lọc ưa nước (MSGVN2B50, Millipore Corporation) để thu được mẫu nuôi cấy.

Để định lượng axit glutamic trong mẫu nuôi cấy, sử dụng HPLC (2695, được sản xuất bởi Waters Corporation) được trang bị cột NN-814 (Showa Denko K.K.) và máy phát hiện UV/Vis (2489, Waters Corporation). Để định lượng glucoza trong mẫu nuôi cấy, sử dụng HPLC (2695, Waters Corporation) được trang bị cột ULTRON PS-80H (Shinwa Chemical Industries Ltd.) và máy phát hiện RI (2414, Waters Corporation).

Kết quả là, biến thể được truyền cho gen mtk, mcl, gcl và glxR (CG/mtk_mcl/gcl_glxR) thể hiện năng suất tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ cao

hơn biến thể đối chứng (CG/vec1). Năng suất tăng tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ có thể dự đoán bởi vì chu trình cố định CO₂ mới được truyền bằng cách đưa gen mtk, mcl, gcl và glxR vào *Corynebacterium* và CO₂ được cố định bởi chu trình này được đưa vào glutamat qua axetyl-CoA. Năng suất tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ được tính toán như sau.

(Năng suất tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ) = (Lượng axit glutamic (g) được tạo ra) / (Lượng glucoza (g) được tiêu thụ)

Ví dụ 9

Đánh giá biến thể *Corynebacterium* được truyền gen mtk, mcl, gcl và glxR và trong đó gen pyc được tăng cường

Tiến hành nuôi cấy và phân tích theo cùng phương pháp như trong Ví dụ tham khảo 1, trừ khi các biến thể CG/mtk_mcl/gcl_glxR/vec2 và CG/mtk_mcl/gcl_glxR/pyc được xây dựng trong Ví dụ 8 được dùng để đánh giá và 15 µg/mL kanamycin và 10 µg/mL chloramphenicol được sử dụng làm thuốc kháng sinh bổ sung vào môi trường. Kết quả phân tích, biến thể trong đó pyc được tăng cường (CG/mtk_mcl/gcl_glxR/pyc) thể hiện năng suất tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ cao hơn biến thể đối chứng (CG/mtk_mcl/gcl_glxR/vec2). Điều này gợi ý rằng, trong các biến thể *Corynebacterium* được truyền bằng chu trình cố định CO₂, sự tăng cường của gen pyc có hiệu quả trong việc nâng cao năng suất tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ.

Ví dụ 10

Đánh giá sự sản xuất axit glutamic trong điều kiện có bổ sung natri sunfit

Biến thể CG/mtk_mcl/gcl_glxR được xây dựng ở Ví dụ 8, đóng vai trò như biến thể được đánh giá, được cấy vào môi trường LB chứa 25 µg/mL kanamycin, và được nuôi cấy ở 30°C trong 2 ngày. Sau đó, 100 µL của dịch nuôi cấy thu được được cấy lên đĩa LB chứa 25 µg/mL kanamycin và có đường kính 9 cm, và việc nuôi cấy được tiến hành ở 30°C trong 2 ngày. Sau đó, tế bào vi khuẩn ở vùng mà bằng 1/8 tổng diện tích của đĩa được thu bằng cách cạo, và được cấy vào 5 mL môi trường tối thiểu cho các chủng *Corynebacterium* (60 g/L glucoza, 30 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 0,4 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,01 g/L FeSO₄·7H₂O, 0,01 g/L MnSO₄·5H₂O, 200 µg/L thiamin·HCl, 5,1 g/L SOYTON (Bacto Laboratories Pty Ltd.) và 25 µg/mL kanamycin; pH 8,0) chứa 20 µg/L biotin. Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy với 0,25 g canxi cacbonat trong bình

Erlenmeyer 125-mL được trang bị vách ngăn trong một ngày ở 31,5°C kèm khuấy ở tốc độ 270 vòng/phút, từ đó thu được dịch tiền nuôi cấy.

0,25 mL dịch tiền nuôi cấy được cấy vào 5 mL môi trường tối thiểu cho các chủng *Corynebacterium*, và natri sulfit (chất khử) được cung cấp tiếp vào đó sao cho hàm lượng cuối cùng của natri sulfit sẽ là 5 g/L. Việc nuôi cấy được tiến hành với 0,25 g canxi cacbonat trong bình Erlenmeyer 125-mL được trang bị vách ngăn trong 2 ngày ở 31,5°C kèm khuấy ở tốc độ 270 vòng/phút, từ đó thu được dịch tiền nuôi cấy.

Nhóm thử nghiệm có sự cung cấp natri sulfit được đặt tên là "nhóm thử nghiệm có sự cung cấp natri sulfit". "Nhóm thử nghiệm không có sự cung cấp natri sulfit" cũng được chuẩn bị như đối chứng, cũng tuân theo các quy trình giống như được mô tả ở trên trừ khi natri sulfit không được bổ sung.

Kết quả phân tích, trong khi năng suất tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ ở nhóm thử nghiệm không có sự cung cấp natri sulfit là 44%, năng suất tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ quan sát được ở nhóm thử nghiệm có sự cung cấp natri sulfit là 50%. Từ các kết quả này đã xác nhận được năng suất tăng do sự bổ sung natri sulfit.

Do các giá trị OD_{620nm} của dịch nuôi cấy. Bất ngờ là, OD bằng 50 ở nhóm thử nghiệm không có sự cung cấp natri sulfit trong khi OD bằng 29 ở nhóm thử nghiệm có sự cung cấp natri sulfit. Do đó, cũng xác nhận được việc bổ sung natri sulfit có hiệu quả ức chế sự tăng số lượng tế bào vi khuẩn. Sự ức chế việc tăng số lượng tế bào vi khuẩn cho phép ức chế việc tăng chi phí phát sinh cho việc xử lý tế bào vi khuẩn thải.

Ví dụ 11

Sự tạo thành biến thể tăng cường bộ gen *atoD* của chủng *Escherichia coli* B

Toàn bộ trình tự bazơ của ADN bộ gen của *Escherichia coli* MG1655 là đã biết (số đăng ký ngân hàng gen U00096), và trình tự bazơ của gen mã hóa cấu trúc siêu phân tử CoA transferaza α của *Escherichia coli* MG1655 (sau đây còn gọi là "*atoD*") cũng được báo cáo. Cụ thể, *atoD* được thể hiện trong các bazơ số 2321469 đến 2322131 của trình tự bộ gen của *Escherichia coli* MG1655 được đăng ký với số đăng ký ngân hàng gen là U00096.

Để thu được gen khởi đầu GAPDH, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của *Escherichia coli* MG1655 làm mẫu và sử dụng CGCTCAATTGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO:77) và

ACAGAATTCGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO:78) làm đoạn môi. Mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn MfeI và EcoRI để thu được mảnh ADN khoảng 100 bp mã hóa gen khởi đầu GAPDH.

Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách cắt plasmid pUC19 (số đăng ký ngân hàng gen X02514) với enzym giới hạn EcoRI và xử lý tiếp mảnh thu được với kiềm phosphatase, và các mảnh đã trộn được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α (ADN-903, TOYOBO Co., Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Mười khuẩn lạc thu được được nuôi cấy riêng biệt qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 50 μ g/mL ampicilin, và plasmid được thu hồi. Plasmid từ gen khởi đầu GAPDH không được cắt khi nó được cắt bằng enzym giới hạn EcoRI và KpnI được chọn, và trình tự ADN của chúng được giải mã. Plasmid trong đó gen khởi đầu GAPDH được chèn vào một cách chính xác được đặt tên là "pUCgapP". Plasmid pUCgapP thu được được cắt bằng enzym giới hạn EcoRI và KpnI.

Để thu được atoD, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của *Escherichia coli* MG1655 làm mẫu và sử dụng CGAATTCGCTGGTGGAAACATATGAAAACAAAATTGATGACATTACAAGAC (SEQ ID NO:79) và GCGGTACCTTATTTGCTCTCCTGTGAAACG (SEQ ID NO:80) làm đoạn môi. Mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn EcoRI và KpnI để thu được mảnh atoD khoảng 690 bp. Mảnh ADN này được trộn với mảnh thu được bằng cách cắt pUCgapP bằng enzym giới hạn EcoRI và KpnI, và các mảnh này được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α (ADN-903, TOYOBO Co., Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Plasmid được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được, và atoD được xác nhận rằng đã được chèn vào một cách chính xác. Plasmid này được đặt tên là "pGAPatoD".

PCR được thực hiện sử dụng ADN bộ gen của *Escherichia coli* MG1655 làm mẫu và sử dụng GCTCTAGATGCTGAAATCCACTAGTCTTGTC (SEQ ID NO:81) và TACTGCAGCGTTCCAGCACCTTATCAACC (SEQ ID NO:82) làm đoạn môi, mà được tạo ra dựa trên thông tin di truyền của vùng bên 5' của atoD của *Escherichia coli* MG1655. Kết quả là, mảnh ADN khoảng 1,1 kbp được khuếch đại.

PCR cũng được thực hiện sử dụng plasmid pGAPatoD làm mẫu và sử dụng đoạn

mồi GGTCTAGAGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO:83) được tạo ra dựa trên thông tin trình tự của gen khởi đầu GAPDH của *Escherichia coli* MG1655, và đoạn mồi GCGGTACCTTATTTGCTCTCCTGTGAAACG (SEQ ID NO:84) được tạo ra dựa trên thông tin trình tự của *atoD* của *Escherichia coli* MG1655. Kết quả là, thu được mảnh ADN khoảng 790 bp chứa gen khởi đầu GAPDH và *atoD*.

Mảnh ADN khoảng 1,1 kbp được cắt bằng enzym giới hạn PstI và XbaI, và mảnh ADN khoảng 790 bp được cắt bằng enzym giới hạn XbaI và KpnI. Các mảnh thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách cắt plasmid nhạy nhiệt độ pTH18cs1 (số đăng ký ngân hàng gen AB019610) (Gen, 2000; 241: 185-191) bằng enzym giới hạn PstI và KpnI, và các mảnh đã trộn được nối sử dụng ligaza. Sau đó, chủng DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển ở 30°C trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 30°C trong môi trường LB lỏng chứa 10 μ g/mL cloramphenicol, và plasmid được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được. *Escherichia coli* B (ATCC 11303) được biến nạp với plasmid này, và sau đó được nuôi cấy qua đêm ở 30°C trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol, kết quả là thu được thể biến nạp. Thể biến nạp được cấy vào môi trường LB lỏng chứa 10 μ g/mL cloramphenicol, và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy thu được được cấy lên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol, và được nuôi cấy ở 42°C, và thu được khuẩn lạc. Khuẩn lạc thu được được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng không có thuốc kháng sinh ở 30°C trong 2 giờ, và sau đó được cấy lên đĩa thạch LB không có thuốc kháng sinh, kết quả là thu được khuẩn lạc phát triển ở 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, chọn ngẫu nhiên 100 khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc được để phát triển trên đĩa thạch LB không có thuốc kháng sinh và trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol, và các dòng nhạy cloramphenicol được chọn. Hơn nữa, từ ADN nhiễm sắc thể của các dòng này, mảnh khoảng 790 bp chứa gen khởi đầu GAPDH và *atoD* được khuếch đại bằng PCR, và biến thể trong đó vùng gen khởi đầu *atoD* được thay thế bởi gen khởi đầu GAPDH được chọn. Dòng đáp ứng các điều kiện được mô tả ở trên được đặt tên là "biến thể tăng cường bộ gen *atoD* của chủng *Escherichia coli* B" (sau đây còn được gọi là "biến thể B::*atoDAB*").

Ví dụ 12

Sự tạo thành biến thể tăng cường bộ gen *atoD* và xóa gen *pgi* của chủng *Escherichia coli* B

Toàn bộ trình tự bazơ của ADN bộ gen của *Escherichia coli* MG1655 là đã biết (số đăng ký ngân hàng gen U00096), và trình tự bazơ của gen (pgi) mã hóa phosphoglucosa isomerase của *Escherichia coli* cũng được báo cáo (số đăng ký ngân hàng gen X15196).

Để nhân dòng các vùng hai bên của gen mã hóa pgi (1650 bp), bốn đoạn môi, cụ thể là, CAGGAATTCGCTATATCTGGCTCTGCACG (SEQ ID NO:85), CAGTCTAGAGCAATACTCTTCTGATTTTGAG (SEQ ID NO:86), CAGTCTAGATCATCGTCGATATGTAGGCC (SEQ ID NO:87) và GACCTGCAGATCATCCGTCAGCTGTACGC (SEQ ID NO:88), được tổng hợp. Đoạn môi SEQ ID NO:85 có vị trí nhận biết EcoRI ở vùng đầu 5' của nó; mỗi đoạn môi SEQ ID NO:86 và SEQ ID NO:87 có vị trí nhận biết XbaI ở vùng đầu 5' của nó; và đoạn môi SEQ ID NO:88 có vị trí nhận biết PstI ở vùng đầu 5' của nó.

ADN bộ gen của *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 700926) được tạo ra, và thực hiện PCR sử dụng ADN bộ gen thu được làm mẫu và cặp mỗi SEQ ID NO:85 và SEQ ID NO:86, từ đó khuếch đại mảnh khoảng ADN 1,0 kb (sau đây còn được gọi là "mảnh pgi-L"). Hơn nữa, PCR cũng được thực hiện sử dụng cặp mỗi SEQ ID NO:87 và SEQ ID NO:88, từ đó khuếch đại mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây còn được gọi là "mảnh pgi-R"). Các mảnh ADN này được phân tách bằng điện di gel agarosa và được thu hồi. Mảnh pgi-L được cắt bằng EcoRI và XbaI, và mảnh pgi-R được cắt bằng XbaI và PstI. Hai kiểu mảnh cắt thu được và mảnh được tạo ra bằng cách cắt plasmit nhạy nhiệt độ pTH18cs1 (số đăng ký ngân hàng gen AB019610) bằng EcoRI và PstI được trộn và được cho nối sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α (TOYOBO Co, Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, thu được thể biến nạp phát triển ở 30°C trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol. Plasmit được thu hồi từ thể biến nạp thu được, và hai mảnh được xác nhận rằng chúng là mảnh có vùng bên ngược hướng 5' và mảnh có vùng bên cùng hướng 3' của gen mã hóa pgi, được chèn một cách chính xác vào pTH18cs1. Plasmit thu được được cắt bằng XbaI và sau đó được đưa vào bước xử lý làm cùn với T4 ADN polymeraza. Sử dụng T4 ADN ligaza, mảnh ADN thu được được nối với mảnh ADN thu được bằng cách cắt plasmit pUC4K (số đăng ký ngân hàng gen X06404) (Pharmacia) bằng EcoRI và xử lý làm cùn gen kháng kanamycin thu được với T4 ADN polymeraza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển ở 30°C trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol và 50 μ g/mL kanamycin. Plasmit được thu

hồi từ thể biến nạp thu được, và gen kháng kanamycin được xác nhận là được chèn vào một cách chính xác giữa mảnh vùng bên ngược hướng 5' và mảnh vùng bên cùng hướng 3' của gen mã hóa *pgi*. Plasmid này được đặt tên là "pTH18cs1-*pgi*".

Biến thể B::atoDAB được tạo ra trong Ví dụ 11 được biến nạp với plasmid thu được pTH18cs1-*pgi* và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/mL chloramphenicol và 50 µg/mL kanamycin, từ đó thu được thể biến nạp. Thể biến nạp thu được được cấy trong môi trường LB lỏng chứa 50 µg/mL kanamycin, và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Sau đó, một phần của dịch nuôi cấy được cấy lên đĩa thạch LB chứa 50 µg/mL kanamycin, kết quả là thu được khuẩn lạc phát triển ở 42°C. Khuẩn lạc thu được còn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng chứa 50 µg/mL kanamycin ở 30°C trong 24 giờ, và được cấy lên đĩa thạch LB chứa 50 µg/mL kanamycin, kết quả là thu được khuẩn lạc phát triển ở 42°C.

Từ các khuẩn lạc xuất hiện, chọn ngẫu nhiên 100 khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc được để phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 µg/mL kanamycin và trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/mL chloramphenicol, và các dòng nhạy chloramphenicol chỉ phát triển trên đĩa thạch LB chứa kanamycin được chọn. Hơn nữa, PCR được thực hiện sử dụng ADN nhiễm sắc thể của các dòng này làm mẫu, và mảnh khoảng 3,3 kbp từ biến thể có thể được khuếch đại tùy vào sự thay thế của gen *pgi* bằng gen kháng kanamycin được chọn. Biến thể thu được được đặt tên là "biến thể tăng cường bộ gen *atoD* và xóa gen *pgi* của chủng *Escherichia coli* B" (sau đây còn được gọi là "biến thể B::atoDABΔ*pgi*").

Ví dụ 13

Sự tạo thành biến thể tăng cường bộ gen *atoD*, xóa gen *pgi* và xóa gen *gntR* của chủng *Escherichia coli* B

Toàn bộ trình tự bazơ của ADN bộ gen của *Escherichia coli* B là đã biết (số đăng ký ngân hàng gen CP000819), và trình tự bazơ của gen mã hóa chất ức chế phiên mã *GntR* được thể hiện trong các bazơ số từ 3509184 đến 3510179 của trình tự bộ gen của *Escherichia coli* B được đăng ký với số đăng ký ngân hàng gen CP000819.

Để nhân dòng vùng bên của gen mã hóa *GntR* (*gntR*), bốn đoạn mồi, cụ thể là, GGAATTCGGGTCAATTTTCACCCTCTATC (SEQ ID NO:89), GTGGGCCGTCCTGAAGGTACAAAAGAGATAGATTCTC (SEQ ID NO:90), CTCTTTTGTACCTTCAGGACGGCCCAAAATTGAAG (SEQ ID NO:91) và

GGAATTCCCAGCCCCGCAAGGCCGATGGC (SEQ ID NO:92), được tổng hợp. Mỗi đoạn môi SEQ ID NO:89 và SEQ ID NO:92 có vị trí nhận biết EcoRI ở vùng đầu 5' của chúng.

ADN bộ gen của chủng *Escherichia coli* B (số đăng ký ngân hàng gen CP000819) được chuẩn bị, và PCR được thực hiện sử dụng ADN bộ gen thu được làm mẫu và cặp môi SEQ ID NO:89 và SEQ ID NO:90, từ đó khuếch đại mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây còn được gọi là "mảnh gntR-L"). Ngoài ra, PCR còn được thực hiện sử dụng cặp môi SEQ ID NO:91 và SEQ ID NO:92 để khuếch đại mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây còn được gọi là "mảnh gntR-R"). Các mảnh ADN này được phân tách bằng điện di gel agarosa và được thu hồi, và PCR được thực hiện sử dụng mảnh gntR-L và mảnh gntR-R làm mẫu và cặp môi SEQ ID NO:89 và SEQ ID NO:92, từ đó khuếch đại mảnh ADN khoảng 2,0 kbp (sau đây còn được gọi là "mảnh gntR-LR"). Mảnh gntR-LR này được phân tách bằng điện di gel agarosa, được thu hồi, được cắt bằng EcoRI, và sau đó được trộn với mảnh thu được bằng cách cắt plasmit nhạy nhiệt độ pTH18cs1 (số đăng ký ngân hàng gen AB019610) bằng EcoRI và khử phosphoryl hóa sản phẩm phân cắt. Sau khi cho các mảnh đã trộn phản ứng với nhau sử dụng T4 ADN ligaza, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α (TOYOBO Co, Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển ở 30°C trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol. Plasmit được thu hồi từ thể biến nạp thu được, và mảnh gntLR được xác nhận rằng đã được chèn một cách chính xác vào pTH18cs1. Plasmit này được đặt tên là "pTH18cs1-gntR".

Biến thể B::atoDAB Δ pgi được tạo thành trong Ví dụ 12 được biến nạp với plasmit thu được pTH18cs1-gntR, và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol, từ đó thu được thể biến nạp. Thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường LB lỏng chứa 10 μ g/mL cloramphenicol và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Sau đó, một phần của dịch nuôi cấy được cấy lên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol, kết quả là thu được khuẩn lạc phát triển ở 42°C. Khuẩn lạc thu được còn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 30°C trong 24 giờ, và được cấy lên đĩa thạch LB, kết quả là thu được khuẩn lạc phát triển ở 42°C.

Từ khuẩn lạc đã phát triển, chọn ngẫu nhiên 100 khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc được để phát triển trên đĩa thạch LB và trên đĩa thạch LB chứa 10 μ g/mL cloramphenicol, và các dòng nhạy cloramphenicol được chọn. Hơn nữa, PCR được thực hiện sử dụng ADN

nhuộm sắc thể của các dòng này làm mẫu, và mảnh khoảng 2,0 kbp từ biến thể có thể được khuếch đại tùy vào sự xóa gen *gntR* được chọn. Biến thể thu được được đặt tên là "biến thể tăng cường bộ gen *atoD*, xóa gen *pgi* và xóa gen *gntR* của chủng *Escherichia coli* B" (sau đây còn được gọi là "biến thể B::atoDABΔ*pgi*Δ*gntR*").

Ví dụ 14

Sự tạo thành biến thể tăng cường bộ gen *atoD*, xóa gen *pgi*, xóa gen *gntR* và xóa gen *gnd* của chủng *Escherichia coli* B

Để nhân dòng vùng bên của gen (*gnd*) mã hóa phosphogluconat dehydroaza, bốn đoạn môi, cụ thể là, CGCCATATGAATGGCGCGGCGGGCCGGTGG (SEQ ID NO:93), TGGAGCTCTGTTTACTCCTGTCAGGGGG (SEQ ID NO:94), TGGAGCTCTCTGATTTAATCAACAATAAAATTG (SEQ ID NO:95) và CGGGATCCACCACCATAACCAAACGACGG (SEQ ID NO:96), được tổng hợp. Đoạn môi SEQ ID NO:93 có vị trí nhận biết *NdeI* trong vùng đầu 5' của chúng; mỗi đoạn môi SEQ ID NO:94 và SEQ ID NO:95 có vị trí nhận biết *SacI* trong vùng đầu 5' của chúng; và đoạn môi SEQ ID NO:96 có vị trí nhận biết *BamHI* trong vùng đầu 5' của chúng.

ADN bộ gen của chủng *Escherichia coli* B (số đăng ký ngân hàng gen CP000819) được tạo ra, và PCR của nó được thực hiện sử dụng cặp môi SEQ ID NO:93 và SEQ ID NO:94, từ đó khuếch đại mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây còn được gọi là "mảnh *gnd*-L"). Ngoài ra, PCR cũng được thực hiện sử dụng cặp môi SEQ ID NO:95 và SEQ ID NO:96 để khuếch đại mảnh ADN khoảng 1,0 kb (sau đây còn được gọi là "mảnh *gnd*-R"). Các mảnh ADN này được phân tách bằng điện di gel agarosa và được thu hồi. Mảnh *gnd*-L được cắt bằng *NdeI* và *SacI*, và mảnh *gnd*-R được cắt bằng *SacI* và *BamHI*. Hai loại mảnh đã cắt thu được và một mảnh thu được bằng cách cắt plasmit nhạy nhiệt độ pTH18cs1 (số đăng ký ngân hàng gen AB019610) bằng *NdeI* và *BamHI* được trộn và cho phép nối sử dụng T4 ADN ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5α (TOYOBO Co, Ltd.) được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển ở 30°C trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/mL cloramphenicol. Plasmit được thu hồi từ thể biến nạp thu được, và hai mảnh, là mảnh vùng bên ngược hướng 5' và mảnh vùng bên cùng hướng 3' của gen mã hóa *gnd*, được xác nhận là được chèn một cách chính xác vào pTH18cs1. Plasmit này được đặt tên là "pTH18cs1- *gnd*".

Biến thể B::atoDABΔ*pgi*Δ*gntR* được tạo thành trong Ví dụ 13 được biến nạp với plasmit thu được pTH18cs1-*gnd*, và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C trên đĩa thạch LB

chứa 10 µg/mL cloramphenicol, từ đó thu được thể biến nạp. Thể biến nạp thu được được cấy vào môi trường LB lỏng chứa 10 µg/mL cloramphenicol, và được nuôi cấy qua đêm ở 30°C. Sau đó, một phần của dịch nuôi cấy được cấy lên đĩa thạch LB chứa 10 µg/mL cloramphenicol, kết quả là thu được khuẩn lạc phát triển ở 42°C. Khuẩn lạc thu được còn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 30°C trong 24 giờ, và môi trường nuôi cấy thu được được cấy lên đĩa thạch LB, kết quả là thu được khuẩn lạc phát triển ở 42°C.

Từ khuẩn lạc đã phát triển, chọn ngẫu nhiên 100 khuẩn lạc. Mỗi khuẩn lạc được để phát triển trên đĩa thạch LB và trên đĩa thạch LB chứa 10 µg/mL cloramphenicol, và các dòng nhạy cloramphenicol được chọn. Hơn nữa, PCR được thực hiện sử dụng các ADN nhiễm sắc thể của các dòng này làm mẫu, và mảnh khoảng 2,0 kbp từ biến thể có thể được khuếch đại tùy vào sự xóa gen *gnd* được chọn. Biến thể thu được được đặt tên là "Biến thể tăng cường bộ gen *atoD*, xóa gen *pgi*, xóa gen *gntR* và xóa gen *gnd* của chủng *Escherichia coli* B" (sau đây còn được gọi là "biến thể B::*atoDABΔpgiΔgntRΔgnd*").

Ví dụ 15

Sự tạo thành plasmit plaz

Axetoaxetat decarboxylaza của vi khuẩn *Clostridium* được mô tả trong số đăng ký ngân hàng gen M55392, và rượu isopropylic dehydroaza của vi khuẩn *Clostridium* được mô tả trong số đăng ký ngân hàng gen AF157307.

Plasmit pBRgapP được tạo ra theo cùng phương pháp giống như trong Ví dụ 1.

Để thu được gen rượu isopropylic dehydroaza, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 làm mẫu và sử dụng AATATGCATGCTGGTGGAAACATATGAAAGGTTTTGCAATGCTAGG (SEQ ID NO:97) và ACGCGTCGACTTATAATATACTACTGCTTTAATTAAGTC (SEQ ID NO:98) làm các đoạn mồi. Mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn SphI và SalI để thu được mảnh kbp rượu isopropylic dehydroaza khoảng 1,1. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách cắt plasmit pUC119 bằng enzym giới hạn SphI và SalI, và các mảnh này được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 µg/mL ampicilin. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 50 µg/mL ampicilin, và plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được. IPAdh được xác nhận là được chèn vào một cách chính xác,

và plasmit này được đặt tên là "pUC-I".

Mảnh chứa IPAdh thu được bằng cách cắt plasmit pUC-I bằng enzym giới hạn SphI và EcoRI được trộn với mảnh thu được bằng cách cắt plasmit pBRgapP bằng enzym giới hạn SphI và EcoRI, và các mảnh này được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 50 μ g/mL ampicilin, và plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được. IPAdh được xác nhận là được chèn vào một cách chính xác, và plasmit này được đặt tên là "pGAP-I".

Để thu được gen axetoaxetat decarboxylaza, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 làm mẫu và sử dụng ACGCGTCGACGCTGGTGG AACATATGTTAAAGGATGAAGTAATTAAACAAATT AGC (SEQ ID NO:99) và GCTCTAGAGGTACCTTACTTAAGATAATCATATATAACTTCAGC (SEQ ID NO:100) làm đoạn mồi. Mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn SalI và XbaI để thu được mảnh axetoaxetat decarboxylaza khoảng 700 bp. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách cắt plasmit pGAP-I bằng enzym giới hạn SalI và XbaI, và các mảnh này được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 50 μ g/mL ampicilin, và plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được. Adc được xác nhận là được chèn vào một cách chính xác, và plasmit này được đặt tên là "pIa".

Để thu được gen glucoza-6-phosphat-1-dehydroaza (zwf), thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng *Escherichia coli* B (số đăng ký ngân hàng gen CP000819) làm mẫu và sử dụng GCTCTAGACGGAGAAAGTCTTATGGCGGTAACGCAAACAGCCCAGG (SEQ ID NO:101) và CGGGATCCCGGAGAAAGTCTTATGAAGCAAACAGTTTATATCGCC (SEQ ID NO:102) làm đoạn mồi. Mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn XbaI và BamHI để thu được mảnh glucoza-6-phosphat-1-dehydroaza khoảng 1500 bp. Mảnh ADN thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách cắt plasmit pIa bằng enzym giới hạn XbaI và BamHI, và các mảnh này được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả

biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 50 μ g/mL ampicilin, và plasmit thu được được đặt tên là "pIaz".

Ví dụ 16

Sự tạo thành plasmit pMWGC2 và pMWGKC2

Để thu được gen khởi đầu GAPDH, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của *Escherichia coli* MG1655 làm mẫu và sử dụng CTACTAGTCTGTCGCAATGATTGACACGATTCCG (SEQ ID NO:103) và GCTCGAATTCCCATATGTTCCACCAGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGG (SEQ ID NO:104) làm đoạn mồi. Mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn EcoRI, và các đầu của sản phẩm phân cắt được phosphoryl hóa với T4 Polynucleotit Kinaza để thu được mảnh ADN chứa gen khởi đầu GAPDH.

Plasmit pMW119 (số đăng ký ngân hàng gen AB005476) được cắt bằng enzym giới hạn NdeI, và các đầu của chúng được làm cùn. Sau đó, mảnh này còn được cắt bằng EcoRI, tiếp đó khử phosphoryl hóa của các đầu của chúng. Mảnh ADN thu được của pMW119 được trộn với mảnh ADN chứa gen khởi đầu GAPDH được mô tả ở trên, và các mảnh này được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 50 μ g/mL ampicilin, và plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được để thu được plasmit pMWG2.

Để thu được gen kháng cloramphenicol, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng pTH18cs1 (số đăng ký ngân hàng gen AB019610) làm mẫu và sử dụng TCGGCACGTAAGAGGTTCC (SEQ ID NO:46) và CGGGTCGAATTTGCTTTCCG (SEQ ID NO:47) làm đoạn mồi. Mảnh ADN thu được được phosphoryl hóa với T4 Polynucleotit Kinaza (Takara) để thu được mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol. Sau đó, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng pMWG2 làm mẫu và sử dụng CTAGATCTGACAGTAAGACGGGTAAGCC (SEQ ID NO:48) và CTAGATCTCAGGGTTATTGTCTCATGAGC (SEQ ID NO:49) làm đoạn mồi, và mảnh ADN thu được được trộn với mảnh ADN chứa gen kháng cloramphenicol. Các mảnh đã trộn được nối sử dụng ligaza. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5 α

được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 µg/mL cloramphenicol. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 25 µg/mL cloramphenicol, và plasmit thu được được đặt tên là "pMWGC2".

Thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng plasmit pMWGC2 làm mẫu và sử dụng CCTTTGGTTAAAGGCTTTAAGATCTTCCAGTGGACAAACTATGCC (SEQ ID NO:50) và GGCATAGTTTGTCCACTGGAAGATCTTAAAGCCTTTAACCAAAGG (SEQ ID NO:51) làm đoạn mồi. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm khuếch đại, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 µg/mL cloramphenicol. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 37°C trong môi trường LB lỏng chứa 25 µg/mL cloramphenicol, và plasmit được thu hồi từ tế bào vi khuẩn thu được để thu plasmit pMWGKC2.

Ví dụ 17

Xây dựng plasmit biểu hiện pMWGC2_mtk(Mc)_mcl và pMWGKC2_mtk(Mc)_mcl cho mtk và mcl từ *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009

PCR được thực hiện sử dụng ADN bộ gen của *Methylococcus capsulatus* (ATCC33009D-5) làm mẫu và sử dụng GGAATTCCATATGGCTGTAAATAATCGTCTAC (SEQ ID NO:52) và GCTCTAGATCAGAATCTGATTCCGTGTTC (SEQ ID NO:53) làm đoạn mồi, từ đó thu được mảnh *Methylococcus* mcl-mtk. Mảnh thu được bằng cách tách mảnh mcl-mtk này bằng NdeI và XbaI được nối với mảnh thu được bằng cách tách plasmit pMWGC2 hoặc pMWGKC2 được tạo ra trong Ví dụ 16 bằng NdeI và XbaI. Sau đó, tế bào khả biến của chủng *Escherichia coli* DH5α được biến nạp với sản phẩm nối, và thu được thể biến nạp phát triển trên đĩa thạch LB chứa 25 µg/mL cloramphenicol. Nuôi cấy khuẩn lạc thu được qua đêm ở 30°C trong môi trường LB lỏng chứa 25 µg/mL cloramphenicol. Các plasmit thu được lần lượt được đặt tên là "pMWGC2_mtk(Mc)_mcl" và "pMWGKC2_mtk(Mc)_mcl".

Các plasmit pMWGC2_mtk(Mc)_mcl và pMWGKC2_mtk(Mc)_mcl bao gồm trình tự bazơ của mcl (SEQ ID NO:41), trình tự bazơ của mtkA (SEQ ID NO:28) và trình tự bazơ của mtkB (SEQ ID NO:29), từ *Methylococcus capsulatus*. Trình tự axit amin của Mcl, trình tự axit amin của MtkA và trình tự axit amin của MtkB từ *Methylococcus capsulatus* được thể hiện lần lượt ở SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:13 và SEQ ID NO:14.

Ví dụ 18

Xây dựng plasmit biểu hiện glxR và glxK

Để thu được gen 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (glxR) từ *Escherichia coli*, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng *Escherichia coli* B (số đăng ký ngân hàng gen CP000819) làm mẫu và sử dụng

GCTCTAGACGGAGAAAGTCTTATGAAACTGGGATTATTGGC (SEQ ID NO:105)

và AACTGCAGTCAGGCCAGTTTATGGTTAG (SEQ ID NO:106) làm đoạn mồi.

Mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn XbaI và PstI để thu mảnh glxR khoảng 900 bp. Để thu được gen glyxerat 3-kinaza (glxK) từ *Escherichia coli*, thực hiện khuếch đại bằng PCR sử dụng ADN bộ gen của chủng *Escherichia coli* B (số đăng ký ngân hàng gen CP000819) làm mẫu và sử dụng

AACTGCAGCGGAGAAAGTCTTATGAAGATTGTCATTGCGCCA (SEQ ID NO:107)

và GGAATTCAAGCTTTCAGTTTTTAATTCCCTGACC (SEQ ID NO:108) làm đoạn mồi. Mảnh ADN thu được được cắt bằng enzym giới hạn PstI và HindIII để thu mảnh

glxK khoảng 1100 bp. Mảnh glxR và mảnh glxK thu được được trộn với mảnh thu được bằng cách tách plasmit pMWGC2_mtk(Mc)_mcl được xây dựng trong Ví dụ 17 bằng

XbaI và HindIII, và được nối vào vị trí cùng hướng với trình tự malat thiokinaza (mtk) của plasmit pMWGC2_mtk(Mc)_mcl. Plasmit thu được được đặt tên là

"pMWGC2_mtk(Mc)_mcl_glxR_glxK".

Ví dụ 19

Sự tạo thành biến thể đưa mtk và mcl vào, sản xuất rượu isopropyllic, tăng cường bộ gen atoD, xóa gen pgi, xóa gen gntR và xóa gen gnd

Tế bào khả biến của biến thể được tạo ra trong Ví dụ 14 (biến thể B::atoDABΔpgiΔgntRΔgnd) được biến nạp với plasmit plaz được tạo ra trong Ví dụ 15 và một trong các plasmit được tạo ra trong các ví dụ từ 16 đến 18, và được cấy lên môi trường thạch LB chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicilin. Các tế bào được cho phát triển trên môi trường thạch LB chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicilin, kết quả là thu được các biến thể. Các biến thể này được tổng kết trong Bảng 3.

Bảng 3

Tên biến thể	Plasmit/Tên chủng	Đặc tính
vec/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd	pIaz, pMWGC2 /B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd	bao gồm cả hệ thống sản xuất IPA không có MtkAB Δ pgi, Δ gntR, Δ gnd
MtkAB/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd	pIaz, pMWGC2_mtk(Mc)_mcl /B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd	bao gồm cả hệ thống sản xuất IPA biểu hiện MtkAB Δ pgi, Δ gntR, Δ gnd
MtkAB, glxR, glxK/ atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd	pIaz, pMWGC2_mtk(Mc)_mcl_glxR_glxK /B::atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd	bao gồm cả hệ thống sản xuất IPA biểu hiện MtkAB biểu hiện glxR biểu hiện glxK Δ pgi, Δ gntR, Δ gnd

Ví dụ 20

Sản xuất rượu isopropyllic

Như quy trình tiền nuôi cấy, mỗi biến thể để đánh giá được xây dựng trong Ví dụ 19 được cấy riêng biệt vào 2 mL dịch nuôi cấy Miller lỏng LB (DIFCO 244620) chứa 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicilin trong ống thử nghiệm, và tiến hành nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ nuôi cấy là 30°C kèm khuấy ở tốc độ 120 vòng/phút. Sau đó, đo OD của quá trình tiền nuôi cấy, và thu hồi các tế bào ở lượng tương ứng với OD bằng 3,0. Các tế bào đã thu hồi được tạo huyền phù trong 300 μ l dung dịch NaCl 0,9%, và 20 μ l huyền phù thu được được cấy vào 20 mL dịch nuôi cấy Miller lỏng LB chứa 5% glucoza, 25 mg/L cloramphenicol và 100 mg/L ampicilin trong bình 100 mL được trang bị vách ngăn, và tiến hành nuôi cấy trong 48 giờ ở nhiệt độ 30°C kèm khuấy ở tốc độ 120

vòng/phút. Lấy mẫu dịch nuôi cấy vi khuẩn thu được, và loại bỏ tế bào vi khuẩn bằng cách ly tâm. Sau đó, đo lượng rượu isopropylic (IPA), axeton và các sản phẩm phụ chủ yếu khác (các axit hữu cơ ví dụ như axit suxinic) được tích lũy trong dịch nổi nuôi cấy thu được bằng HPLC sử dụng phương pháp thông thường. Các kết quả của chúng được thể hiện trong Bảng 4 và 5.

Bảng 4

Tên biến thể	Sản phẩm được hình thành (g/L/48 giờ)		Glucosa được tiêu thụ (g/L/48 giờ)	Năng suất tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ (48 giờ)	
	IPA	Axeton		IPA	IPA + Axeton
vec/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd	4,8	0,1	33,2	14,4	14,8
MtkAB/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd	7,2	0,2	42,7	17,0	17,3
MtkAB,glxR,glxK/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd	7,9	0,3	43,9	18,1	18,8

Lượng rượu isopropylic được sản xuất trong thời gian 48 giờ là 4,8 g trong trường hợp của biến thể đối chứng (vec/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd), 7,2 g trong trường hợp của biến thể có mtk+mcl được đưa vào (MtkAB/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd) và 7,9 g trong trường hợp của biến thể có glxR+glxK+mtk+mcl được đưa vào (MtkAB,glxR,glxK/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd).

Lượng axeton được sản xuất trong thời gian 48 giờ là 0,1 g trong trường hợp của biến thể đối chứng (vec/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd), 0,2 g trong trường hợp của biến thể có mtk+mcl được đưa vào (MtkAB/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd) và 0,3 g trong trường hợp của biến thể có glxR+glxK+mtk+mcl được đưa vào (MtkAB,glxR,glxK/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd).

Từ các kết quả này, đã nhận thấy là lượng sản xuất rượu isopropylic và axeton cao hơn khi glxR và glxK được đưa vào ngoài việc đưa mtk và mcl vào.

Năng suất của rượu isopropylic và axeton tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ trong thời gian 48 giờ là 14,8% trong trường hợp của biến thể đối chứng (vec/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd), 17,3% trong trường hợp của biến thể có mtk+mcl được đưa vào (MtkAB/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd) và 18,8% trong trường hợp của biến thể có glxR+glxK+mtk+mcl được đưa vào (MtkAB,glxR,glxK/atoDAB Δ pgi Δ gntR Δ gnd). Từ các kết quả này, đã chứng minh được rằng hiệu quả của sự chuyển hóa đường thành rượu isopropylic hoặc axeton được tăng lên nhờ đưa glxR và glxK vào, ngoài việc đưa mtk và mcl vào.

Bảng 5

Tên biến thể	Axit succinic (mg/L/48 giờ)	Axit lactic (mg/L/48 giờ)	Axit axetic (mg/L/48 giờ)	Axit formic (mg/L/48 giờ)	Axit pyruvic (mg/L/48 giờ)
vec/atoDABΔpgiΔgntRΔgnd	11,7	525,0	73,4	17,7	184,0
MtkAB/atoDABΔpgiΔgntRΔgnd	0,0	311,0	89,9	24,7	1458,0
MtkAB, glxR, glxK/atoDABΔpgiΔgntRΔgnd	0,0	247,0	129,0	21,1	1045,0

Lượng axit lactic được tạo ra trong thời gian 48 giờ trong trường hợp biến thể có mtk+mcl được đưa vào (MtkAB/atoDABΔpgiΔgntRΔgnd) ít hơn so với trong trường hợp biến thể đối chứng (vec/atoDABΔpgiΔgntRΔgnd). Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng lượng axit lactic giảm bất ngờ ngay cả trong trường hợp biến thể có glxR và glxK được đưa vào ngoài việc đưa mtk và mcl (MtkAB,glxR,glxK/atoDABΔpgiΔgntRΔgnd) vào.

Ví dụ 21

Sự tạo thành các biến thể *Aspergillus niger* để đánh giá

Từ bộ gen của *Aspergillus niger* ATCC 1015, gen của vùng gen khởi đầu (GlaPr) và vùng kết thúc phiên mã (GlaTt) của glucoamylaza thu được bằng cách PCR sử dụng phương pháp được mô tả trong tài liệu (Plasmit, 2005; 53: 191-204).

Gen malyl-CoA lyaza (SEQ ID NO:41), gen cấu trúc siêu phân tử malat thiokinaza α (SEQ ID NO:28) và gen cấu trúc siêu phân tử malat thiokinaza β (SEQ ID NO:29) từ *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009 được khuếch đại bằng PCR cùng với trình tự Shine-Dalgarno thích hợp (trình tự SD). Các mảnh đã khuếch đại được thiết kế để mỗi vùng mã hóa protein được kẹp giữa vùng gen khởi đầu (GlaPr) và vùng kết thúc phiên mã (GlaTt), và các mảnh được chèn vào vị trí HindIII của plasmit pPTRII (Takara). Plasmit thu được được đặt tên là "pPTRII_mcl(Mc)_mtk(Mc)".

Từ bộ gen của *Rhodococcus jostii* NBRC 16295, gen 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza (glxR) (SEQ ID NO:64) và gen glyoxylat carboligaza (gcl) (SEQ ID NO:65) được khuếch đại bằng PCR cùng với trình tự SD thích hợp. Các mảnh đã khuếch đại được thiết kế để mỗi vùng mã hóa protein được kẹp giữa vùng gen khởi đầu (GlaPr) và vùng kết thúc phiên mã (GlaTt), và các mảnh được chèn vào pPTRII_mcl(Mc)_mtk(Mc). Plasmit thu được được đặt tên là "pPTRII_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj)".

pPTRII, pPTRII_mcl(Mc)_mtk(Mc) và pPTRII_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj) được dùng riêng biệt để biến nạp *Aspergillus niger* ATCC 1015, nhờ đó lần lượt tạo ra biến thể đối chứng (sau đây còn được gọi là "AN/vec"), biến thể có mtk+mcl được đưa vào (sau đây còn được gọi là "AN/mtk_mcl") và biến thể có mtk+mcl+glxR+gcl được đưa vào (sau đây còn được gọi là "AN/mtk_mcl_gcl_glxR") *Aspergillus niger*.

Ví dụ 22

Thử nghiệm sản xuất axit xitric sử dụng *Aspergillus niger*

Khi mỗi biến thể *Aspergillus niger* được tạo ra ở Ví dụ 21 (AN/vec, AN/mtk_mcl

và AN/mtk_mcl_gcl_glxR) được nuôi cấy ở 30°C sử dụng môi trường chứa nguồn cacbon và pyridoxamin hydrobromua, AN/mtk_mcl và AN/mtk_mcl_gcl_glxR tạo ra axit xitric với năng suất cao hơn năng suất được thể hiện ở biến thể đối chứng AN/vec. Bằng cách nuôi cấy sử dụng natri hydro cacbonat được đánh dấu ^{13}C và xác định hàm lượng ^{13}C trong axetyl-CoA, là chất trung gian, và hàm lượng ^{13}C trong axit xitric, là sản phẩm cuối, đã có thể xác nhận rằng cacbonat được cố định được đưa vào axetyl-CoA và axit xitric.

Ví dụ 23

Sự tạo thành các biến thể *Aspergillus terreus* để đánh giá

Với cùng phương pháp như ở Ví dụ 21, pPTRII, pPTRII_mcl(Mc)_mtk(Mc) và pPTRII_mcl(Mc)_mtk(Mc)_glxR(Rj)_gcl(Rj) được dùng riêng rẽ để biến nạp *Aspergillus terreus* NBRC 6365 theo hướng dẫn của pPTRII (Takara), nhờ đó lần lượt tạo ra biến thể đối chứng (sau đây còn được gọi là "AT/vec"), biến thể có mtk+mcl được đưa vào (sau đây còn được gọi là "AT/mtk_mcl") và biến thể có mtk+mcl+glxR+gcl được đưa vào (sau đây còn được gọi là "AT/mtk_mcl_gcl_glxR") *Aspergillus terreus*.

Ví dụ 24

Thử nghiệm sản xuất axit itaconic sử dụng *Aspergillus terreus*

Khi mỗi biến thể *Aspergillus terreus* được tạo ra Ví dụ 23 (AT/vec, AT/mtk_mcl và AT/mtk_mcl_gcl_glxR) được nuôi cấy ở 30°C sử dụng môi trường chứa nguồn cacbon và pyridoxamin hydrobromua, AT/mtk_mcl và AT/mtk_mcl_gcl_glxR sản xuất axit itaconic với năng suất cao hơn năng suất được thể hiện ở biến thể đối chứng AT/vec. Bằng cách nuôi cấy sử dụng natri hydro cacbonat được đánh dấu ^{13}C và xác định hàm lượng ^{13}C trong axetyl-CoA, là chất trung gian, và hàm lượng ^{13}C trong axit itaconic, là sản phẩm cuối, có thể xác nhận rằng cacbonat được cố định được đưa vào axetyl-CoA và axit itaconic.

Việc nuôi cấy và phân tích được tiến hành theo cùng phương pháp sử dụng AT/mtk_mcl_gcl_glxR làm biến thể để đánh giá và cung cấp cacbonat, khí cacbon dioxit hoặc chất khử làm chất phụ gia cho môi trường. Kết quả phân tích, nhóm thử nghiệm được cung cấp cacbonat, khí cacbon dioxit hoặc chất khử làm chất phụ gia lần lượt thể hiện năng suất cao hơn tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ so với năng suất của nhóm thử nghiệm không được cung cấp cacbonat, khí cacbon dioxit hoặc chất khử. Nghĩa là, có thể cho rằng, trong các biến thể được truyền cho chu trình cố định CO_2 , việc

cung cấp cacbonat, khí cacbon dioxid hoặc chất khử có hiệu quả trong sự cải thiện năng suất tính cho mỗi lượng đường được tiêu thụ.

Ví dụ 25

Sản xuất các biến thể *Cupriavidus necator* để đánh giá

Gen cấu trúc siêu phân tử malat thiokinaza α (SEQ ID NO:28) và gen cấu trúc siêu phân tử malat thiokinaza β (SEQ ID NO:29), từ *Methylococcus capsulatus* ATCC 33009, được khuếch đại bằng PCR cùng với trình tự SD thích hợp. Các mảnh khuếch đại được nối vào vector có khoảng vật chủ rộng pBBR1-MCS2 (số đăng ký ngân hàng gen U23751) để gen chịu sự điều tiết của gen khởi đầu lac. Plasmid thu được được đặt tên là "pBBR-MCS2_mtk(Mc)".

pBBR1-MCS2 và pBBR-MCS2_mtk(Mc) được dùng riêng biệt để biến nạp *Cupriavidus necator* JMP 134 (DSM 4058), từ đó lần lượt tạo ra biến thể đối chứng (sau đây còn được gọi là "CP/vec") và biến thể có mtk được đưa vào (sau đây còn được gọi là "CP/mtk") *Cupriavidus necator*.

Ví dụ 26

Thử nghiệm sản xuất axit poly-3-hydroxybutyric sử dụng *Cupriavidus necator*

Khi mỗi biến thể để đánh giá được tạo ra trong Ví dụ 25 (CP/vec và CP/mtk) được nuôi cấy ở 30°C sử dụng môi trường chứa nguồn cacbon và kanamycin, biến thể CP/mtk có mtk được đưa vào sản xuất axit poly-3-hydroxybutyric với năng suất cao hơn năng suất của biến thể đối chứng CP/vec. Bằng cách nuôi cấy sử dụng natri hydro cacbonat được đánh dấu ^{13}C và xác định hàm lượng ^{13}C trong axetyl-CoA, là chất trung gian, và hàm lượng ^{13}C trong axit poly-3-hydroxybutyric, là sản phẩm cuối, có thể xác nhận rằng cacbonat được cố định được đưa vào axetyl-CoA và axit poly-3-hydroxybutyric.

Bản mô tả của Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số 2013-011536, nộp ngày 24 tháng 1, 2013, và bản mô tả của Đơn yêu cầu cấp Patent Nhật Bản số 2013-011538, nộp ngày 24 tháng 1, 2013, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng.

Tất cả các công bố, đăng ký sáng chế, và tiêu chuẩn kỹ thuật được nêu ra trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến cùng khía cạnh như thể là mỗi công bố, đơn đăng ký sáng chế và tiêu chuẩn kỹ thuật riêng biệt được kết hợp cụ thể và riêng rẽ để tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền các hoạt tính enzym của ít nhất là malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza vào vi sinh vật là *Escherichia coli* hoặc *Corynebacterium glutamicum* và không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d) hoặc (e) sau:

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

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

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

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

(e) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza,

thu được vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c), hoặc (d) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a), (b), (c), hoặc (d) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c), hoặc (d) được truyền vào vi sinh vật,

trong đó, trong trường hợp của *Corynebacterium glutamicum*, ít nhất hoạt tính enzym của pyruvat carboxylaza được tăng cường, và trong trường hợp của *Escherichia coli*, ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza và glyxerat 3-kinaza được tăng cường,

và trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA bao gồm (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l) và (m) sau:

(f) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza; phosphoenolpyruvat carboxylaza; và phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

(g) malat dehydrogenaza;

(h) malat thiokinaza;

(i) malyl-CoA lyaza;

(j) glyoxylat carboligaza;

(k) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza; và hydroxypyruvat isomeraza và hydroxypyruvat reductaza;

(l) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: glyxerat 2-kinaza; và glyxerat 3-kinaza và phosphoglyxerat mutaza; và

(m) enolaza.

2. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm 1, trong đó ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malic enzym và fumarat reductaza được làm bất hoạt hoặc được làm giảm.

3. Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA này bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA trong đó:

phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat được chuyển hóa thành oxaloaxetat;

oxaloaxetat được chuyển hóa thành 2-hydroxy-3-oxopropionat bằng malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza;

2-hydroxy-3-oxopropionat được chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat; và

2-phosphoglyxerat được chuyển hóa thành phosphoenolpyruvat.

4. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA, phương pháp này bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, và bước thu gom để thu sản phẩm dự tính thu được nhờ sự tiếp xúc này.

5. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo điểm 4, phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp để cung cấp ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat, ion bicarbonat, khí cacbon dioxit, và chất khử, cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

6. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo điểm 4 hoặc điểm 5, phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp khí để thu khí chứa cacbon dioxit được tạo ra từ quá trình nuôi cấy và cung cấp khí cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

7. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA bao gồm:

bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA thu được bằng cách truyền các hoạt tính enzym của ít nhất là malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza vào vi sinh vật là *Escherichia coli* hoặc *Corynebacterium glutamicum* và không có bất kỳ trong số (a), (b), (c), (d) hoặc (e) sau:

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

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

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

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

(e) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza,

thu được vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA mà không truyền bất kỳ trong số (a), (b), (c), hoặc (d) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a), (b), (c), hoặc (d) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a), (b), (c), hoặc (d) được truyền vào vi sinh vật; và

vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA bao gồm (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l) và (m) sau:

(f) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza; phosphoenolpyruvat carboxylaza; và phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

(g) malat dehydrogenaza;

(h) malat thiokinaza;

(i) malyl-CoA lyaza;

(j) glyoxylat carboligaza;

(k) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza; và hydroxypyruvat isomeraza và hydroxypyruvat reductaza;

(l) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: glyxerat 2-kinaza; và glyxerat 3-kinaza và phosphoglyxerat mutaza; và

(m) enolaza; và

bước cung cấp để cung cấp ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat hoặc ion bicarbonat với tổng lượng cấp là 150 mmol/L hoặc hơn, khí cacbon dioxid với đường kính bột trung bình là 100 μ m hoặc hơn, và natri sulfit với tổng lượng cấp từ 0,01 g/l đến 50 g/L, cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

8. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo điểm 7, phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp khí để thu khí chứa cacbon dioxid được tạo ra từ quá trình nuôi cấy và cung cấp khí cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

9. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo điểm 7 hoặc điểm 8, trong đó vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA trong đó phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat được chuyển hóa thành oxaloaxetat, oxaloaxetat được chuyển hóa thành 2-hydroxy-3-oxopropionat bằng malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat được chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat, và 2-phosphoglyxerat được chuyển hóa thành phosphoenolpyruvat.

10. Phương pháp sản xuất rượu isopropylic, phương pháp này bao gồm bước cho phép vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA sản xuất rượu isopropylic, sử dụng, làm chất trung gian, axetyl-CoA được sản xuất bằng phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 9.

11. Phương pháp sản xuất axeton, phương pháp này bao gồm bước cho phép vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA sản xuất axeton, sử dụng, làm chất trung gian, axetyl-CoA được sản xuất bằng phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 9.

12. Phương pháp sản xuất axit glutamic, phương pháp này bao gồm bước cho phép vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA sản xuất axit glutamic, sử dụng, làm chất trung gian, axetyl-CoA được sản xuất bằng phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 9.

13. Phương pháp sản xuất axit glutamic bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 trong khi cho vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, và bước thu gom để thu axit glutamic thu được nhờ sự tiếp xúc này.

14. Vi sinh vật bao gồm chu trình chứa:

ít nhất một phản ứng enzym được chọn từ nhóm bao gồm (a3) và (b3) sau;

các phản ứng enzym (c3), (d3), (e3), (f3), và (g3) sau; và

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm phản ứng enzym (h3) sau, các phản ứng enzym (i3), (j3), (k3) và (n3) sau, và các phản ứng enzym (i3), (j3), (l3), (m3) và (n3) sau:

(a3) phản ứng enzym từ phosphoenolpyruvat thành oxaloacetat;

(b3) phản ứng enzym từ pyruvat thành oxaloacetat;

(c3) phản ứng enzym từ oxaloacetat thành malat;

(d3) phản ứng enzym từ malat thành malyl-CoA;

(e3) phản ứng enzym từ malyl-CoA thành glyoxylat và axetyl-CoA;

(f3) phản ứng enzym từ glyoxylat thành glyxin;

(g3) phản ứng enzym từ glyxin thành serin;

(h3) phản ứng enzym từ serin thành pyruvat;

(i3) phản ứng enzym từ serin thành 3-hydroxypyruvat;

(j3) phản ứng enzym từ 3-hydroxypyruvat thành glyxerat;

(k3) phản ứng enzym từ glyxerat thành 2-phosphoglyxerat;

(l3) phản ứng enzym từ glyxerat thành 3-phosphoglyxerat;

(m3) phản ứng enzym từ 3-phosphoglyxerat thành 2-phosphoglyxerat; và

(n3) phản ứng enzym từ 2-phosphoglyxerat thành phosphoenolpyruvat,

thu được vi sinh vật bằng cách truyền hoạt tính enzym vào vi sinh vật là *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, hoặc *Cupriavidus necator* và không có bất kỳ trong số (a2), (b2), (c2), (d2) hoặc (e2) sau, hoạt tính enzym là ít nhất một hoạt tính enzym mà không có mặt trong *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, hoặc *Cupriavidus*

necator và là ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza:

(a2) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ malonyl-CoA thành malonat semialdehyt hoặc 3-hydroxypropionat;

(b2) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ axetyl-CoA và CO₂ thành pyruvat;

(c2) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ crotonyl-CoA và CO₂ thành etylmalonyl-CoA hoặc glutaconyl-CoA;

(d2) chu trình cố định cacbon dioxit có phản ứng enzym từ CO₂ thành format; hoặc

(e2) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm malat thiokinaza và malyl-CoA lyaza,

thu được vi sinh vật mà không truyền bất kỳ trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) vào vi sinh vật, hoặc vi sinh vật không bộc lộ chức năng nào trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) ngay cả khi một hoặc nhiều trong số (a2), (b2), (c2), hoặc (d2) được truyền vào vi sinh vật.

15. Vi sinh vật theo điểm 14, vi sinh vật này bao gồm khả năng sản xuất axetyl-CoA.

16. Vi sinh vật theo điểm 14 hoặc 15, thu được vi sinh vật bằng cách truyền tiếp ít nhất một hoạt tính enzym được chọn từ nhóm bao gồm glyoxylat carboligaza, 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza, và hydroxypyruvat reductaza.

17. Vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 16, bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA trong đó:

phosphoenolpyruvat hoặc pyruvat được chuyển hóa thành oxaloaxetat;

oxaloaxetat được chuyển hóa thành 2-hydroxy-3-oxopropionat bằng malat thiokinaza, malyl-CoA lyaza, và glyoxylat carboligaza;

2-hydroxy-3-oxopropionat được chuyển hóa thành 2-phosphoglyxerat; và

2-phosphoglyxerat được chuyển hóa thành phosphoenolpyruvat.

18. Vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, bao gồm chu trình sản xuất axetyl-CoA bao gồm (f2), (g2), (h2), (i2), (j2), (k2), (l2), và (m2) sau:

(f2) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza; phosphoenolpyruvat carboxylaza; và phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

(g2) malat dehydrogenaza;

(h2) malat thiokinaza;

(i2) malyl-CoA lyaza;

(j2) glyoxylat carboligaza;

(k2) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: 2-hydroxy-3-oxopropionat reductaza; và hydroxypyruvat isomeraza và hydroxypyruvat reductaza;

(l2) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm: glyxerat 2-kinaza; và glyxerat 3-kinaza và phosphoglyxerat mutaza; và

(m2) enolaza.

19. Vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 18, bao gồm:

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm (a4) và (b4) sau;

các enzym (c4), (d4), (e4), (f4), và (g4) sau; và

ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm enzym (h4) sau, các enzym (i4), (j4), (k4), và (n4) sau, và các enzym (i4), (j4), (l4), (m4) và (n4) sau:

(a4) ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm pyruvat kinaza và pyruvat carboxylaza; phosphoenolpyruvat carboxylaza; và phosphoenolpyruvat carboxykinaza;

(b4) pyruvat carboxylaza;

(c4) malat dehydrogenaza;

(d4) malat thiokinaza;

(e4) malyl-CoA lyaza;

(f4) glyxin transaminaza;

(g4) hệ phân tách glyxin và serin hydroxymetyltransferaza;

(h4) serin dehydrataza;

(i4) serin transaminaza;

(j4) hydroxypyruvat reductaza;

(k4) glyxerat 2-kinaza;

(l4) glyxerat 3-kinaza;

(m4) phosphoglyxerat mutaza; và

(n4) enolaza.

20. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA bao gồm: bước nuôi cấy để nuôi cấy vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 19 trong khi cho vi sinh vật tiếp xúc với nguồn nguyên liệu cacbon, và bước thu gom để thu sản phẩm dự tính thu được nhờ sự tiếp xúc này.

21. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo điểm 20, phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp để cung cấp ít nhất một enzym được chọn từ nhóm bao gồm ion carbonat, ion bicarbonat, khí cacbon dioxit, và chất khử, cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

22. Phương pháp sản xuất axetyl-CoA theo điểm 20 hoặc điểm 21, phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp khí để thu khí chứa cacbon dioxit được tạo ra từ quá trình nuôi cấy và cung cấp khí cho môi trường nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy.

23. Phương pháp sản xuất axit xitric, phương pháp này bao gồm bước sản xuất axit xitric từ nguồn nguyên liệu cacbon sử dụng vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 19.

24. Phương pháp sản xuất axit itaconic, phương pháp này bao gồm bước sản xuất axit itaconic từ nguồn nguyên liệu cacbon sử dụng vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 19.

25. Phương pháp sản xuất axit (poly)3-hydroxybutyric, phương pháp này bao gồm bước sản xuất axit (poly)3-hydroxybutyric từ nguồn nguyên liệu cacbon sử dụng vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 19.

FIG.1

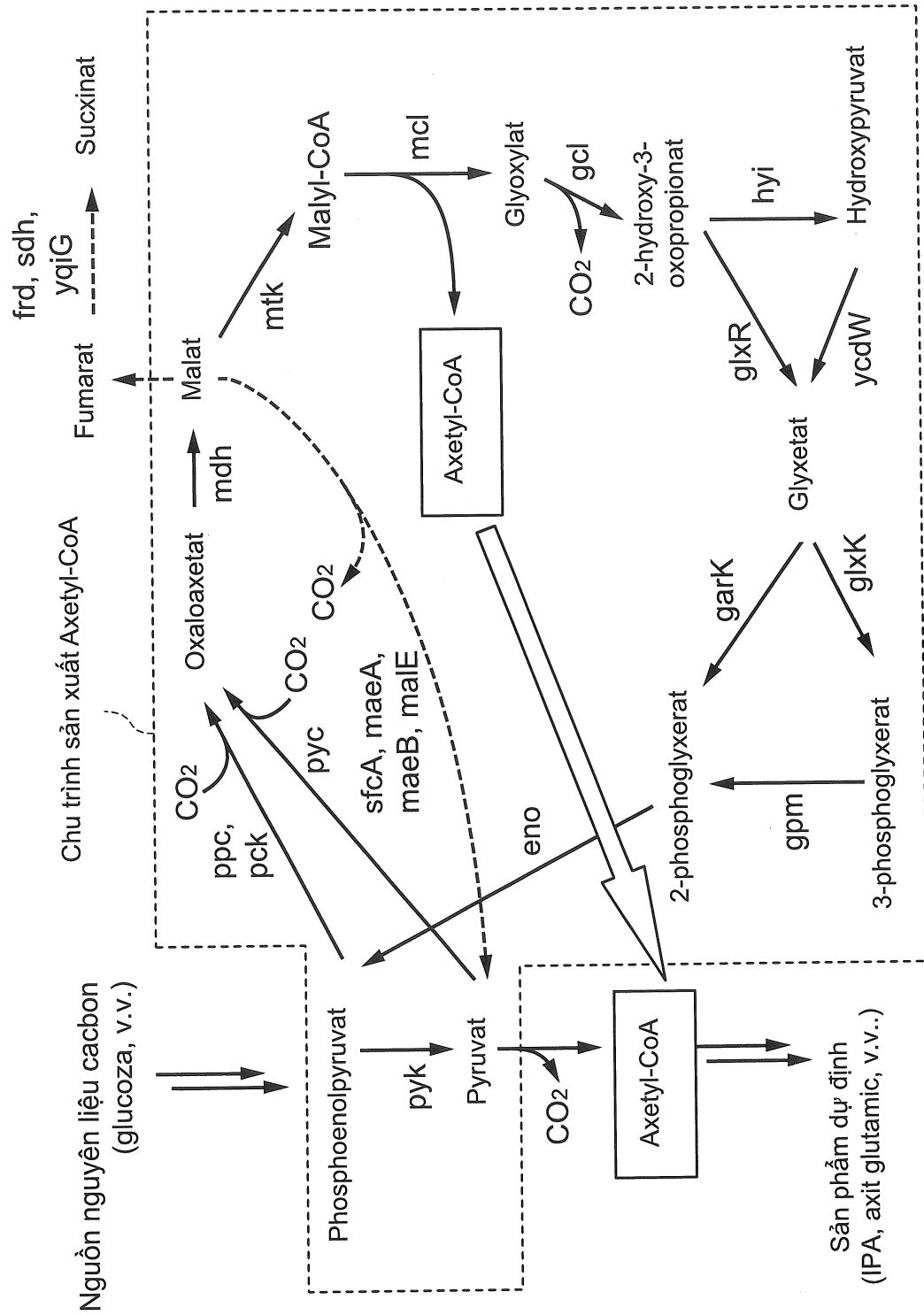
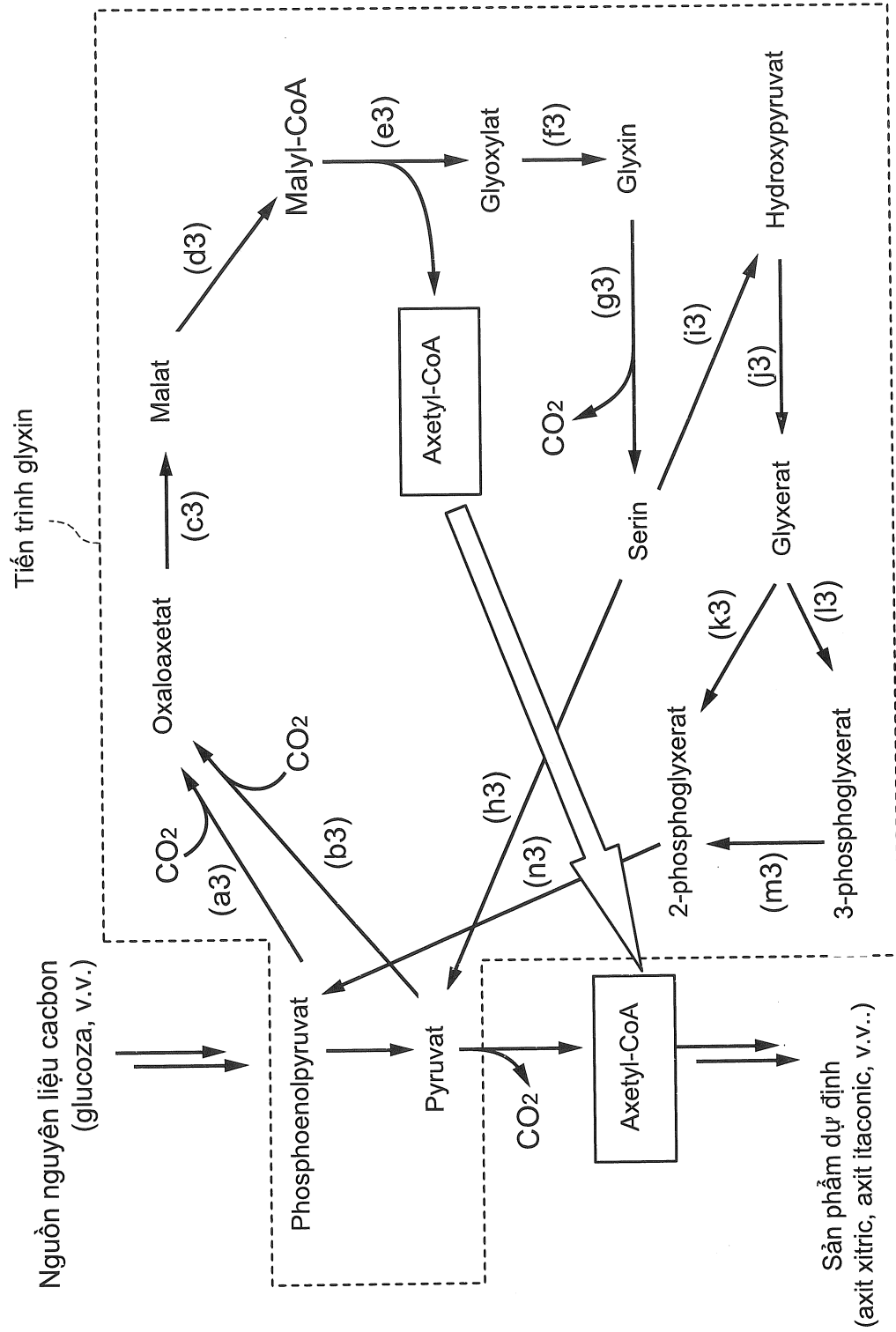


FIG.2



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> Vi sinh vật sản xuất axetyl-CoA, phương pháp sản xuất axetyl-CoA, phương pháp sản xuất rượu isopropyllic, phương pháp sản xuất axeton, phương pháp sản xuất axit glutamic và phương pháp sản xuất axit xitric

<130> P001301429

<150> JP 2013-011536

<151> 2013-01-24

<150> JP 2013-011538

<151> 2013-01-24

<160> 108

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 296

<212> PRT

<213> Methylobacterium extorquens

<400> 1

Met	Ser	Ile	Leu	Ile	Asp	Glu	Lys	Thr	Pro	Ile	Leu	Val	Gln	Gly	Ile
1				5					10					15	

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

Ser	Asn	Val	Val	Gly	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Lys	Thr	His
		35					40					45			

Cys	Gly	Val	Pro	Val	Phe	Asn	Thr	Val	Lys	Glu	Ala	Val	Glu	Ala	Thr
	50					55					60				

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

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

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

Tyr Gly Leu Thr Val Ala Pro Asp Pro Gly Ser Phe Gly Ser Thr Val
 275 280 285

Ala Asp Val Leu Ala Arg Ala Ala
 290 295

<210> 2
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Methylobacterium extorquens

<400> 2

Met Asp Val His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Ala Ser Phe Gly
 1 5 10 15

Val Ala Val Pro Lys Gly Ala Val Ala Phe Ser Pro Asp Gln Ala Val
 20 25 30

Tyr Ala Ala Thr Glu Leu Gly Gly Ser Phe Trp Ala Val Lys Ala Gln
 35 40 45

Ile His Ala Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Ile Lys Leu Cys Arg
 50 55 60

Thr Tyr Asn Glu Val Arg Asp Ala Ala Arg Asp Leu Leu Gly Lys Arg
 65 70 75 80

Leu Val Thr Leu Gln Thr Gly Pro Glu Gly Lys Pro Val Gln Arg Val
 85 90 95

Tyr Val Glu Thr Ala Asp Pro Phe Glu Arg Glu Leu Tyr Leu Gly Tyr
 100 105 110

Val Leu Asp Arg Lys Ala Glu Arg Val Arg Val Ile Ala Ser Gln Arg
 115 120 125

Gly Gly Met Asp Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Glu Pro Glu Ala Leu
 130 135 140

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

Arg Glu Ile Ala Phe Gln Leu Gly Leu Asn Ile Lys Gln Val Ser Ala
 165 170 175

Ala Val Lys Thr Ile Met Asn Ala Tyr Arg Ala Phe Arg Asp Cys Asp
 180 185 190

Gly Thr Met Leu Glu Ile Asn Pro Leu Val Val Thr Lys Asp Asp Arg
 195 200 205

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

Arg Arg Arg Asn Ile Ala Asp Met His Asp Pro Ser Gln Gly Asp Pro
 225 230 235 240

Arg Glu Ala Gln Ala Ala Glu His Asn Leu Ser Tyr Ile Gly Leu Glu
 245 250 255

Gly Glu Ile Gly Cys Ile Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Ala Thr
 260 265 270

Met Asp Met Ile Lys His Ala Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp
 275 280 285

Val Gly Gly Gly Ala Ser Pro Asp Arg Val Ala Thr Ala Phe Arg Leu
 290 295 300

Val Leu Ser Asp Arg Asn Val Lys Ala Ile Leu Val Asn Ile Phe Ala
 305 310 315 320

Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Val Ala Glu Gly Val Val Lys Ala Ala
 325 330 335

Arg Glu Val Lys Ile Asp Val Pro Leu Ile Val Arg Leu Ala Gly Thr
 340 345 350

Asn Val Asp Glu Gly Lys Lys Ile Leu Ala Glu Ser Gly Leu Asp Leu
 355 360 365

Ile Thr Ala Asp Thr Leu Thr Glu Ala Ala Arg Lys Ala Val Glu Ala
 370 375 380

Cys His Gly Ala Lys His
 385 390

<210> 3
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Granulibacter bethesdensis
 <400> 3

Met Ser Ile Leu Ile Asn Lys Gln Thr Lys Ile Ile Ile Gln Gly Phe
 1 5 10 15

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

Thr Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Gln Thr His
 35 40 45

Leu Gly Arg Pro Val Phe Asn Thr Val Glu Asp Ala Val Arg Glu Thr
 50 55 60

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

Ala Ile Met Glu Gly Ala Asp Ala Gly Leu Glu Leu Ile Cys Thr Ile
 85 90 95

Thr Asp Gly Ile Pro Ala Gln Asp Met Met Arg Val Lys Arg Tyr Leu
 100 105 110

Arg Arg Tyr Gln Lys Asp Arg Arg Thr Arg Leu Val Gly Pro Asn Cys
 115 120 125

Ala Gly Ile Ile Ser Pro Gly Gln Ala Met Leu Gly Ile Met Pro Gly
 130 135 140

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

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Ala Gln Leu Lys Glu Leu Gly Ile Gly Val
 165 170 175

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

Leu Asp His Leu Gln Leu Phe Glu Ala Asp Pro Glu Thr His Ala Val
 195 200 205

Leu Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Ala Glu Ala Ala Lys
 210 215 220

Trp Ile Ser Glu Asn Met Ser Lys Pro Val Val Gly Tyr Val Ala Gly
 225 230 235 240

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

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

Tyr Gly Leu Thr Val Ala Pro Ser Pro Gly Glu Leu Gly Ser Thr Val
 275 280 285

Ala Ala Val Leu Ala Gly Arg Gln Ala Ala
 290 295

<210> 4
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Granulibacter bethesdensis

<400> 4

Met Asp Val His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Val Ala Val Pro Arg Gly Ala Ile Ala Phe Ser Ala Asp Gln Ala Val
20 25 30

Tyr Ala Ala Thr Glu Leu Gly Gly Trp His Trp Ala Val Lys Ala Gln
35 40 45

Ile His Ala Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Ile Lys Leu Cys Lys
50 55 60

Thr Tyr His Glu Val Arg Glu Ala Ala Ala Gly Met Leu Gly Lys Arg
65 70 75 80

Leu Val Thr His Gln Thr Gly Pro Glu Gly Lys Pro Val Gln Arg Val
85 90 95

Tyr Val Glu Val Ala Asp Pro Phe Glu Lys Glu Phe Tyr Leu Gly Phe
100 105 110

Val Leu Asp Arg Lys Leu Glu Arg Val Arg Val Ile Ala Ser Ala Glu
115 120 125

Gly Gly Met Glu Ile Glu Glu Ile Ala Ser Lys His Pro Glu Lys Leu
130 135 140

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

Arg Gln Ile Ala Phe Lys Leu Gly Leu Ser Ser Arg Gln Val Gln Arg
165 170 175

Ala Val Thr Ser Ile Met Gly Ala Tyr Arg Ala Phe Arg Asp His Asp
180 185 190

Ala Thr Met Leu Glu Ile Asn Pro Leu Val Leu Thr Lys Asp Asp Arg
 195 200 205

Ile Leu Ala Leu Asp Ala Lys Met Ser Phe Asp Asp Asn Ala Leu Phe
 210 215 220

Arg Arg Asn Asn Val Ala Asn Met His Asp Pro Ser Gln Asp Asp Pro
 225 230 235 240

Arg Glu Ala Gln Ala Ala Glu His Asn Leu Asn Tyr Val Gly Leu Glu
 245 250 255

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

Met Asp Val Ile Lys Tyr Ala Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp
 275 280 285

Val Gly Gly Gly Ala Ser Pro Glu Arg Thr Ala Thr Ala Phe Arg Leu
 290 295 300

Val Leu Ser Asp Lys Asn Val Lys Val Val Leu Val Asn Ile Phe Ala
 305 310 315 320

Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Ile Ala Glu Gly Val Val His Ala Val
 325 330 335

Lys Glu Val Asp Leu Lys Leu Pro Leu Val Val Arg Leu Ala Gly Thr
 340 345 350

Asn Val Glu Glu Gly Arg Arg Ile Leu Lys Glu Ser Gly Ile Ser Val
 355 360 365

Ile Met Ala Glu Ser Leu Thr Glu Ala Ala Glu Lys Ala Val Glu Ala
 370 375 380

Ala Lys Ala Ala Ala
 385

<210> 5
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Hyphomicrobium methylovorum

<400> 5

Met Asp Val His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Ala Lys Phe Gly
 1 5 10 15

Val Pro Ile Ala Arg Gly Gly Leu Ala Tyr Ser Pro Glu Gln Ala Thr
 20 25 30

Tyr Arg Ala Ser Glu Leu Gly Gly Thr Val Val Val Lys Ala Gln Ile
 35 40 45

His Ser Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Cys Lys Asn
 50 55 60

Glu Lys Glu Ile Glu Asp Ala Ala Glu Phe Met Leu Gly Arg Lys Leu
 65 70 75 80

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

Ile Glu Glu Ala Thr Asn Ile Asp Arg Glu Ile Tyr Leu Gly Phe Val
 100 105 110

Met Asp Arg Ala Ser Glu Arg Ile Val Val Val Ala Ser Ala Ala Gly
 115 120 125

Gly Met Asp Ile Glu Glu Ile Ser Ala Ser Gln Pro Asp Thr Ile Ile
 130 135 140

Arg Val Ser Val Asp Pro Ala Val Gly Met Gln Gln Phe Gln Ala Arg
 145 150 155 160

Glu Leu Ala Phe Gly Leu Gly Val Asp Pro Glu Ile Val Asn Lys Leu
 165 170 175

Val Pro Ala Ile Met Gly Cys Tyr Arg Ala Phe Arg Asp Leu Asp Ala
 180 185 190

Thr Met Val Glu Val Asn Pro Leu Val Ile Thr Lys Glu Lys Gln Val
 195 200 205

Leu Ala Leu Asp Ala Lys Met Ser Phe Asp Asp Asn Ala Leu Phe Arg
 210 215 220

Arg Pro His Ile Ala Glu Leu Arg Asp Lys Ser Gln Glu Asp Pro Arg
 225 230 235 240

Glu Thr Tyr Ala Ser Asp Arg Gly Leu Ser Tyr Val Gly Leu Asp Gly
 245 250 255

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

Asp Met Ile Lys Leu Ala Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp Ile
 275 280 285

Gly Gly Gly Ala Ser Pro Glu Arg Val Thr Lys Ser Phe Lys Ala Val
 290 295 300

Leu Arg Asp Lys Asn Val Lys Ala Ile Leu Val Asn Val Phe Ala Gly
 305 310 315 320

Ile Asn Arg Cys Asp Trp Val Ala Lys Gly Val Val Asp Ala Val Lys
 325 330 335

Glu Leu Glu Ile Lys Met Pro Ile Val Val Arg Leu Ala Gly Thr Asn
 340 345 350

Val Glu Glu Gly Arg Lys Ile Ile Asp Asn Ser Gly Leu Thr Val Ile
 355 360 365

Ser Ala Asp Thr Leu Ala Asp Ala Ala Lys Gln Ala Val Asp Ala Ala
 370 375 380

Lys Lys Ala
 385

<210> 6
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Hyphomicrobium methylovorum

<400> 6

Met Ala Ile Phe Ile Asn Glu Lys Thr Pro Ile Leu Ile Gln Gly Phe
 1 5 10 15

Thr Gly Arg Ile Gly Thr Phe His Ala Gln Glu Met Ile Asp Tyr Gly
 20 25 30

Ser Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Thr Ser His
 35 40 45
 Leu Gly Arg Pro Val Phe Asn Thr Val Lys Gly Ala Ala Asp Glu Thr
 50 55 60
 Gly Ala Glu Ala Ser Ile Val Phe Val Pro Pro Pro Phe Ala Ala Asp
 65 70 75 80
 Ala Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Lys Tyr Cys Val Cys Ile
 85 90 95
 Thr Asp Gly Ile Pro Ala Gln Asp Met Ile Arg Val Lys Arg Tyr Met
 100 105 110
 Arg Arg Tyr Lys Lys Glu Ser Arg Met Val Leu Thr Gly Pro Asn Cys
 115 120 125
 Ala Gly Thr Ile Ser Pro Gly Lys Ala Met Leu Gly Ile Met Pro Gly
 130 135 140
 His Ile Phe Leu Pro Gly Arg Val Gly Ile Val Gly Arg Ser Gly Thr
 145 150 155 160
 Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Ala Gln Leu Lys Ala Leu Gly Ile Gly Val
 165 170 175
 Ser Thr Ser Val Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Asn Gly Ser Ser His
 180 185 190
 Arg Asp Ile Leu Glu Ala Phe Glu Ser Asp Pro Glu Thr Asp Ala Val
 195 200 205

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

Phe Ala Lys Glu His Met Lys Lys Pro Val Ile Ala Tyr Ile Ala Gly
 225 230 235 240

Leu Ser Ala Pro Lys Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Val
 245 250 255

Ser Ala Phe Gly Glu Ser Ala Ala Glu Lys Val Glu Ile Leu Lys Gly
 260 265 270

Cys Asn Val Thr Ile Ala Ala Thr Pro Ser Glu Met Gly Ser Thr Val
 275 280 285

Ala Gln Val Leu Asn Gln Arg Lys Lys Val Ala
 290 295

<210> 7
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Hyphomicrobium denitrificans

<400> 7

Met Ala Ile Phe Ile Asn Glu Lys Thr Pro Ile Leu Ile Gln Gly Phe
 1 5 10 15

Thr Gly Arg Ile Gly Thr Phe His Ala Gln Glu Met Ile Asp Tyr Gly
 20 25 30

Ser Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Thr Ser His
 35 40 45

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

Gly Ala Glu Ala Ser Ile Val Phe Val Pro Pro Pro Phe Ala Ala Asp
 65 70 75 80

Ala Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Lys Tyr Cys Val Cys Ile
 85 90 95

Thr Asp Gly Ile Pro Ala Gln Asp Met Ile Arg Val Lys Arg Tyr Met
 100 105 110

Arg Arg Tyr Lys Lys Glu Ala Arg Met Ile Leu Thr Gly Pro Asn Cys
 115 120 125

Ala Gly Thr Ile Ser Pro Gly Lys Ala Met Leu Gly Ile Met Pro Gly
 130 135 140

His Ile Tyr Leu Pro Gly Arg Val Gly Ile Val Gly Arg Ser Gly Thr
 145 150 155 160

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Ala Gln Leu Lys Ala Leu Gly Ile Gly Val
 165 170 175

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

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

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

Phe Ala Lys Glu His Met Lys Lys Pro Val Ile Ala Tyr Ile Ala Gly
 225 230 235 240

Leu Ser Ala Pro Lys Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Val
 245 250 255

Ser Ala Phe Gly Glu Ser Ala Ala Glu Lys Val Glu Ile Leu Lys Gly
 260 265 270

Cys Gly Val Ala Ile Ala Pro Thr Pro Ser Glu Met Gly Ser Thr Val
 275 280 285

Ala Gln Val Leu Gly Lys Gln Lys Lys Val Ala
 290 295

<210> 8
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Hyphomicrobium denitrificans

<400> 8

Met Asp Ile His Glu Tyr Gln Ala Lys Glu Leu Leu Ala Lys Phe Gly
 1 5 10 15

Val Pro Ile Ala Arg Gly Gly Leu Ala Tyr Ser Pro Glu Gln Ala Thr
 20 25 30

Tyr Arg Ala Ser Glu Leu Gly Gly Thr Val Val Val Lys Ala Gln Ile
 35 40 45

His Ser Gly Ala Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Cys Lys Thr
 50 55 60

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

Glu Thr Tyr Ala Ser Asp Arg Gly Leu Ser Tyr Val Gly Leu Asp Gly
 245 250 255

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

Asp Met Ile Lys Leu Ala Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp Ile
 275 280 285

Gly Gly Gly Ala Ser Pro Glu Arg Val Thr Lys Ser Phe Lys Ala Val
 290 295 300

Leu Arg Asp Lys Asn Val Lys Ala Ile Leu Val Asn Val Phe Ala Gly
 305 310 315 320

Ile Asn Arg Cys Asp Trp Val Ala Lys Gly Val Val Asp Ala Val Lys
 325 330 335

Glu Leu Asp Ile Lys Leu Pro Ile Val Val Arg Leu Ala Gly Thr Asn
 340 345 350

Val Glu Glu Gly Arg Lys Ile Ile Asp Asn Ser Gly Leu Thr Val Ile
 355 360 365

Ser Ala Glu Thr Leu Ala Asp Ala Ala Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala
 370 375 380

Lys Lys Ala
 385

<210> 9
 <211> 299
 <212> PRT

<213> Rhizobium sp.

<400> 9

Met Ser Ile Leu Leu Asp Lys Asn Thr Arg Val Ile Val Gln Gly Phe
1 5 10 15

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

Thr Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Gln Ala His
35 40 45

Leu Gly Met Pro Val Phe Asn Thr Val Lys Gly Ala Val Gln Glu Thr
50 55 60

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

Ser Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Arg Leu Cys Val Cys Ile
85 90 95

Thr Asp Gly Ile Pro Ser Gln Asp Met Ile Arg Val Lys Arg Tyr Met
100 105 110

Arg Arg Tyr Arg Phe Glu Asp Arg Met Thr Leu Ile Gly Pro Asn Cys
115 120 125

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

Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Arg Ile Gly Ile Val Gly Arg Ser Gly Thr
145 150 155 160

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Ser Gln Met Lys Ala Leu Gly Val Gly Val
 165 170 175

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

Lys Asp Met Leu Glu Leu Phe Glu Lys Asp Pro Gly Thr Asp Ala Val
 195 200 205

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

Trp Ala Arg Asp His Met Lys Lys Pro Leu Ile Ala Tyr Ile Ala Gly
 225 230 235 240

Leu Ser Ala Pro Lys Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Ile
 245 250 255

Ser Ala Phe Gly Glu Ser Ala Gln Glu Lys Val Glu Ile Leu Lys Ser
 260 265 270

Ala Gly Val Thr Ile Val Pro Thr Pro Ser Ser Phe Gly Glu Thr Val
 275 280 285

Ala Asp Val Leu Ser Ala Met Ser Lys Ala Ala
 290 295

<210> 10
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Rhizobium sp.

<400> 10

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

Ala Thr Gln Thr Leu Leu Gly Cys Tyr Arg Ala Phe Val Asp Tyr Asp
 180 185 190

Ala Ser Met Leu Glu Ile Asn Pro Leu Val Val Thr Arg Arg Gly Asp
 195 200 205

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

Arg Arg Pro His Ile Ala Glu Met Arg Asp Lys Ser Gln Glu Asp Gln
 225 230 235 240

Arg Glu Thr Tyr Ala Ser Asp Arg Gly Leu Ser Tyr Val Gly Leu Asp
 245 250 255

Gly Asn Ile Gly Cys Ile Ile Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Ala Thr
 260 265 270

Met Asp Met Ile Lys Ile Ala Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp
 275 280 285

Ile Gly Gly Gly Ala Ser Pro Asp Arg Val Ala Lys Ser Phe Arg Ala
 290 295 300

Val Leu Thr Asp Arg Gln Val Glu Thr Ile Leu Val Asn Ile Phe Ala
 305 310 315 320

Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Val Ala Glu Gly Val Ile Lys Ala Leu
 325 330 335

Arg Glu Val Gly Val Pro Val Pro Leu Val Val Arg Leu Ser Gly Thr
 340 345 350

Asn Met Glu Glu Gly Arg Arg Ile Leu Ala Glu Ser Gly Glu Asn Ile
 355 360 365

Ile Val Ala Glu Thr Leu Ala Glu Ala Ala Asp Lys Ala Val Ala Ala
 370 375 380

Trp Arg Ser Phe Thr Ala Asn Lys Ala Ala
 385 390

<210> 11
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Nitrosomonas europaea

<400> 11

Met Ala Ile Leu Ile Asn Glu Gln Thr Arg Ile Ile Val Gln Gly Phe
 1 5 10 15

Thr Gly Arg Ile Gly Thr Phe His Ala Gln Glu Met Ile Asp Tyr Gly
 20 25 30

Ser Asn Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Gln Lys His
 35 40 45

Leu Gly Leu Pro Val Phe Asn Thr Val Arg Glu Ala Val Glu Gln Ala
 50 55 60

Gly Ala Glu Ala Ser Ile Val Phe Val Pro Pro Ala Phe Ala Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Ile Met Glu Ala Ala Asp Ala Gly Ile Lys Tyr Cys Val Ser Ile
 85 90 95

Thr Asp Gly Ile Pro Thr Gln Asp Met Met Thr Val Lys Asn Phe Leu
 100 105 110

Arg Leu Phe Pro Glu Glu Asp Arg Met Met Leu Thr Gly Pro Asn Cys
 115 120 125

Ser Gly Thr Ile Ser Pro Gly Arg Ala Met Leu Gly Ile Met Pro Gly
 130 135 140

His Ile Tyr Ser Arg Gly Val Val Gly Val Val Gly Arg Ser Gly Thr
 145 150 155 160

Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Asp Gln Met Arg Arg Leu Asn Ile Gly Ile
 165 170 175

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

Arg Asn Val Leu Gln Lys Leu Glu Glu Asp Pro Glu Thr Lys Val Thr
 195 200 205

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

Phe Ala Lys Glu Asn Met Ser Lys Pro Leu Val Ala Tyr Ile Ala Gly
 225 230 235 240

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

Ser Ser Ala Gly Glu Ser Ala Ala Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys Glu
 260 265 270

Leu Gly Val Thr Ile Cys Pro Thr Pro Ser Leu Met Gly Glu Thr Val
 275 280 285

Ala Lys Val Leu Ala Gly Leu
 290 295

<210> 12
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Nitrosomonas europaea

<400> 12

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

Ile Lys Leu Ala Glu Gly Gly Leu Ala His Thr Val Glu Glu Ala Val
 20 25 30

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

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

Thr His Glu Glu Ile Glu Val Ala Ala Glu Ser Leu Leu Gly Lys Lys
 65 70 75 80

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

Tyr Ile Glu Ala Gly Thr Glu Ile Ala Arg Glu Val Tyr Leu Ala Phe
 100 105 110

Met Ile Asp Arg Ser His Glu Arg Ile Val Met Val Gly Ser Ala Gln
 115 120 125

Gly Gly Met Asp Ile Glu Thr Leu Ala Ala Thr Asn Pro Asp Ala Ile
 130 135 140

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

Arg Thr Met Ala Phe Ala Leu Gly Leu Glu Asp Val Leu Leu Asn His
 165 170 175

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

Ala Asn Ile Leu Glu Ile Asn Pro Leu Val Val Thr Arg Asn Asn Glu
 195 200 205

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

Arg Arg His Arg Ile Ser Glu Leu Arg Asp Asn Ser Gln Ile Asp Ser
 225 230 235 240

Arg Glu Ile Ala Ala Ala Glu Ala Gly Leu Ser Tyr Val Gly Leu Asp
 245 250 255

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

Met Asp Met Ile Lys Leu Ala Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp
 275 280 285

Val Gly Gly Gly Ala Ser Ala Glu Arg Thr Glu Lys Ala Phe Arg Leu
 290 295 300

Val Leu Ala Asp Asn Asn Val Lys Ala Met Leu Val Asn Ile Phe Ala
 305 310 315 320

Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Ile Ala Glu Gly Val Val Gln Ala Val
 325 330 335

Arg Asn Ile Gly Met Thr Val Pro Leu Val Val Arg Leu Ser Gly Thr
 340 345 350

Asn Val Glu Glu Gly Arg Arg Ile Ile Ala Asp Ser Gly Leu Pro Ile
 355 360 365

Ile Thr Ala Glu Thr Leu Ala Asp Ala Ala Glu Lys Val Val His Ala
 370 375 380

Arg Asn Gln Ala Ala Val
 385 390

<210> 13
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 13

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

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

Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Thr	Arg	His	
		35					40					45				
Pro	Asp	Pro	Glu	Leu	Ala	His	Leu	Pro	Val	Phe	Asp	Thr	Val	Ala	Glu	
	50					55					60					
Ala	Val	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Asp	Val	Ser	Ala	Val	Phe	Val	Pro	Pro	
65					70					75					80	
Pro	Phe	Asn	Ala	Asp	Ala	Leu	Met	Glu	Ala	Ile	Asp	Ala	Gly	Ile	Arg	
				85					90					95		
Val	Ala	Val	Thr	Ile	Ala	Asp	Gly	Ile	Pro	Val	His	Asp	Met	Ile	Arg	
			100					105					110			
Leu	Gln	Arg	Tyr	Arg	Val	Gly	Lys	Asp	Ser	Ile	Val	Ile	Gly	Pro	Asn	
		115					120						125			
Thr	Pro	Gly	Ile	Ile	Thr	Pro	Gly	Glu	Cys	Lys	Val	Gly	Ile	Met	Pro	
	130					135						140				
Ser	His	Ile	Tyr	Lys	Lys	Gly	Asn	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	Ala	Thr	Glu	Gln	Met	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	
				165					170					175		
Ile	Thr	Thr	Ser	Val	Gly	Ile	Gly	Gly	Asp	Pro	Ile	Asn	Gly	Thr	Asp	
			180					185					190			
Phe	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Ala	Phe	Glu	Ala	Asp	Pro	Glu	Thr	Glu	Ile	
		195					200					205				

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

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

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

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

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

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

<210> 14
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Methylococcus capsulatus

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ile Val Leu Glu Asp Pro Asn Val Arg Cys Ile Leu Val Asn Ile
 305 310 315 320

Phe Ala Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Ile Ala Lys Gly Leu Ile Gln
 325 330 335

Ala Cys Asp Ser Leu Gln Ile Lys Val Pro Leu Ile Val Arg Leu Ala
 340 345 350

Gly Thr Asn Val Asp Glu Gly Arg Lys Ile Leu Ala Glu Ser Gly Leu
 355 360 365

Ser Phe Ile Thr Ala Glu Asn Leu Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ala Val
 370 375 380

Ala Ile Val Lys Gly
 385

<210> 15
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Uncultured gamma proteobacterium

<400> 15

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

Thr Gly Gln His Ala Thr Phe His Ala Ser Glu Ala Ile Arg Tyr Gly
 20 25 30

Thr Gln Val Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Ser Lys His
 35 40 45

Leu Gly Leu Pro Val Phe Asp Thr Val Ser Glu Ala Val Ser Glu Thr
 50 55 60

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

Ala Ile Met Glu Ala Ile Glu Ala Gly Ile Arg Val Ile Val Val Ile
 85 90 95

Ala Asp Gly Ile Pro Val Gln Asp Met Ile Arg Val Gln Arg Tyr Arg
 100 105 110

Leu Gly Arg Asp Cys Leu Val Leu Gly Pro Asn Thr Pro Gly Ile Ile
 115 120 125

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

Pro Gly Arg Ile Gly Val Val Ser Arg Ser Gly Thr Leu Asn Tyr Glu
 145 150 155 160

Ala Val Glu Gln Leu Gly Lys Leu Gly Leu Gly Gln Ser Thr Ala Val
 165 170 175

Gly Ile Gly Gly Asp Pro Val Asn Gly Thr Asp Phe Val Thr Val Leu
 180 185 190

Lys Ala Phe Glu Gln Asp Pro Asp Thr Asp Ala Ile Val Met Ile Gly
 195 200 205

Glu Ile Gly Gly Pro Gln Glu Val Ala Ala Ala Arg Trp Ala Lys Glu
 210 215 220

Asn Met Gln Lys Pro Leu Ile Gly Phe Val Ala Gly Ala Ser Ala Pro
 225 230 235 240

Pro Gly Arg Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Ile Glu Gly Glu Glu
 245 250 255

Asp Thr Ala Lys Ala Lys Met Asp Ala Met Glu Glu Leu Gly Val Tyr
 260 265 270

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

Lys Glu Arg Leu Gly Ser Ala Val Ser Gly
 290 295

<210> 16
 <211> 392
 <212> PRT

<213> Uncultured gamma proteobacterium

<400> 16

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

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

Ala Val Ala Glu Gln Ile Gly Gly Asp Gly Trp Val Val Lys Ala Gln
35 40 45

Ile His Thr Gly Gly Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Leu Ala Gln
50 55 60

Ser Leu Glu Glu Val Arg Lys Ile Ala Asp Glu Met Ile Gly Lys Thr
65 70 75 80

Leu Val Thr Pro Gln Thr Gly Pro Lys Gly Lys Val Val Arg Arg Val
85 90 95

Leu Val Glu Glu Ala Val Ser Pro Gln Arg Glu Leu Tyr Leu Gly Leu
100 105 110

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

Gly Gly Val Glu Ile Glu Glu Val Ala Ala Arg Ser Pro Glu Lys Ile
130 135 140

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

Arg Lys Val Ala Ala Ala Ile Gly Leu Arg Asp Lys His Leu Met Ala
 165 170 175

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

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

Pro Lys Leu Val Cys Leu Asp Ala Lys Phe Asn Phe Asp Pro Asn Ala
 210 215 220

Leu Phe Arg His Pro Glu Ile Asn Glu Leu Arg Asp Leu Glu Glu Glu
 225 230 235 240

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

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

Ala Thr Met Asp Ala Ile Val Phe His Gly Gly Trp Pro Ala Asn Phe
 275 280 285

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

Arg Ile Val Ile Gln Asp Gln Asn Val Lys Thr Leu Leu Val Asn Ile
 305 310 315 320

Phe Ala Gly Ile Asn Arg Cys Asp Trp Ile Ala Thr Gly Leu Val Gln
 325 330 335

Ala Tyr Thr Ser Leu Arg Ile Asp Lys Pro Cys Val Val Arg Leu Ala
 340 345 350

Gly Thr Asn Val Glu Glu Gly Leu Arg Ile Leu Thr Asp Ser Gly Leu
 355 360 365

Ala Phe Val Lys Ala Ser Asn Leu Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ala Val
 370 375 380

Ala Ile Ala His Gly Arg Asn Val
 385 390

<210> 17
 <211> 891
 <212> ADN
 <213> Methylobacterium extorquens

<400> 17
 atgagcattc tcatcgacga gaagaccccg atcctggtcc agggcatcac gggcgacaag 60
 ggcaccttcc acgccaagga gatgatcgcc tacggctcga acgtcgtcgg cggcgtcacc 120
 ccgggcaagg gcggcaagac ccattgcggc gtgccggtgt tcaacaccgt caaggaggcc 180
 gtggaggcga ccggcgccac cacctcgatc accttcgtgg cgccccctt cgcggcggac 240
 gcgatcatgg aggcggccga cgccggcctc aagctcgtct gctcgatcac cgacggcatc 300
 cccgctcagg acatgatgcg ggtgaaacgc tacctccggc gctatccgaa ggagaagcgc 360
 acgatggtgg tgggccccgaa ctgcgcgggc atcatctcgc ccggcaagtc gatgctcggc 420
 atcatgcccg gccacatcta cctcccgggc aaggtcggcg tcatctcccg ttccggcacg 480
 ctgggctacg aggccgccgc gcagatgaag gagctcggca tcggcatctc gacctccgtc 540

ggcatcggcg gcgatccgat caacggctcc tccttcctcg accacctcgc tctgttcgag 600
 caggatcccc agacggaagc cgtgctgatg atcggcgaga tcggcggggc gcaggaggcc 660
 gaggcctcgg cctggatcaa ggagaacttt tccaagcccg tgatcggctt cgtggcgggc 720
 ctcaccgccc ccaagggccg ccgcatgggg catgccggcg cgatcatctc ggcgaccggc 780
 gacagcgccg cggagaaggc cgagatcatg cgctcctatg gcctgaccgt ggcgcccgat 840
 ccgggctcct tcggcagcac cgtggccgac gtgctcgccc gcgcggcggtg a 891

<210> 18

<211> 1173

<212> ADN

<213> *Methylobacterium extorquens*

<400> 18

atggacgttc acgagtacca agccaaggag ctgctcgcg a gcttcgggggt cgccgtcccg 60
 aagggcgccg tggctttcag cccgatcaa gcggtctatg cggcgaccga gctcggcggc 120
 tcgttctggg cggatgaaggc tcagatccat gccggcgcg gcggaaggc gggcgggatc 180
 aagctttgcc gcacctacaa tgaagtggc gacgccgccc gcgacctgct gggaaaacgc 240
 ctcgtgacgc tccagaccgg ccccgagggc aagccggtgc agcgcgctta cgtcgagacc 300
 gccgaccgt tcgagcgtga actctatctc ggctacgtgc tcgatcggaa ggccgagcgc 360
 gtccgtgtca tcgcctccca gcgcggcggc atggatatcg aggagatcgc cgccaaggag 420
 cccgaggcgc tgatccaggt cgtggtcgag ccggcggtgg gcctgcagca gttccaggcc 480
 cgcgagatcg cgttccagct cggcctcaac atcaagcagg tctcggccgc ggtgaagacc 540
 atcatgaacg cctaccgggc gttccgcgac tgcgacggca ccatgctgga gatcaaccg 600
 ctcgtcgtca ccaaggacga ccgggttctg gcaactcgacg ccaagatgtc cttcgacgac 660
 aacgccctgt tccgccgccg caacatcgcg gacatgcacg atccatcgca gggcgatccc 720
 cgcgaggccc aggctgccga gcacaatctc agctatatcg gcctcgaggg cgaaattggc 780

```

tgcacgtca acggcgcggg tctggccatg gcgaccatgg acatgatcaa gcacgcgggc 840
ggcgagccgg caaacttcct ggatgtgggc ggcggtgccg gcccgaccg cgctgccacg 900
gccttcgcc tcgttctgtc ggaccgcaac gtgaaggcga tcctcgtcaa catcttcgcc 960
ggcatcaacc gctgcgactg ggtcgcgag ggcgtggtca aggccgcgcg cgaggtgaag 1020
atcgacgtgc cgctcatcgt gcggctcgcc ggcacgaacg tcgatgaagg caagaagatc 1080
ctcgccgaga gcgggctcga cctcatcacc gccgacaccc ttacggaagc cgcgcgcaag 1140
gctgtcgaag cctgccacgg cgccaagcac tga 1173

```

```

<210> 19
<211> 1161
<212> ADN
<213> Hyphomicrobium methylovorum

```

```

<400> 19
atggacgttc acgagtatca ggccaaagag cttctcgcga agttcggcgt gccgatcgcg 60
cgcgggcgggc ttgcttacag cccggagcag gcaacatatc gtgcaagcga gcttggcggc 120
accgtcgtcg tcaaggcgca gattcactct ggcgcgcgcg gcaaagctgg cggcgtcaaa 180
gtctgcaaga acgagaaaga gatcgaagac gcggctgagt tcatgctcgg ccgcaagctg 240
gtcacgcata agaccggccc ggcgggcaag ctctgtctcg gtctttacat cgaagaagcg 300
accaacatcg atcgcgagat ctatctcggc ttcgtgatgg atcgcgctc cgagcgtatc 360
gtcgtcgttg catccgccgc tggcggcacg gacatcgagg aaatctctgc gagccagccc 420
gacacgatca tccgcgtgag cgttgatccg gccgtcggca tgcagcagtt ccaggcgcg 480
gaactcgcgt tcggtctcgg cgtcgatccg gagatcgtca acaagctcgt tccggcgatc 540
atgggatgct accgcgcatt ccgcgatctc gacgcgacca tggttgaggt caaccgcgtc 600
gtcatcacca aggaaaagca ggttctcgcg ctcgacgcta agatgtcgtt cgatgacaac 660

```


gcgctgttcc gccgtccgca catcgagag ctgcgggaca agagccagga agacccgcgc 720
 gaaacctacg cgtcggatcg tggcctctcc tacgttggtc tcgatggcga catcggctgc 780
 atcgtcaacg gcgcaggtct cgccatggcg acgctcgaca tgatcaagct cgcaggcggt 840
 gagccggcga acttcctcga cattggcggc ggagcgtctc cggaacgcgt caccaagtcg 900
 ttcaaggctg ttcttcgcga caagaacgtc aaggcgatcc tcgtgaacgt cttcgccggt 960
 atcaaccgtt gcgactgggt tgccaagggc gtggtcgatg ccgtgaagga actcgagatc 1020
 aagatgccga tcgtcgttcg cctcgcaggc acgaacgtcg aagaaggccg caagatcatc 1080
 gacaacagcg gcttgaccgt catcagtgcg gatactctcg ctgacgcggc caagcaggcc 1140
 gtcgacgctg cgaaaaaagc g 1161

<210> 20

<211> 897

<212> ADN

<213> Hyphomicrobium methylovorum

<400> 20

atggctatct tcatcaatga aaagacgccg atcctgatcc agggcttcac cggacgtatc 60
 ggcaccttcc acgctcaaga aatgatcgac tacggctcca atgttgctcg cgggtgttacg 120
 cccggcaaag gcggtacctc gcacctcggc cgtccggtgt tcaacaccgt gaagggcgcg 180
 gccgatgaaa ccggcgccga agcctcgatc gtattcgtgc cgccgccgtt cgcggcggac 240
 gcgatcatgg aagcagcaga cgctggcatc aaatactgcg tctgcatcac ggacggcatt 300
 cctgctcagg atatgatccg cgtgaagcgc tacatgcgcc gctacaagaa agagagccgc 360
 atggtttctca ccggcccga ctgcgccggc acgatctcgc ccggttaaggc gatgctcggc 420
 attatgccgg gacacatctt ccttcgggt cgcgtcggca tcgtcggacg ctcgggcacg 480
 ctgggctatg aagccgcagc gcagctcaag gcgctgggca tcggcgtttc gacctcggtc 540
 ggtatcggcg gcgatccgat caacggttcg tcgcatcgtg acattctcga agcgttcgag 600

agcgatcccc agaccgatgc ggtgctcatg atcgggtgaaa tcggcggacc gcaggaagcg 660
gaagccggtc tcttcgcgaa agagcacatg aagaagccgg tcatcgcta catcgaggc 720
ctttcggcac cgaagggtcg ccgcatgggc cacgcaggcg ctatcgtttc ggcattcggt 780
gaatcggccg ctgagaaggt cgagatcctg aaaggctgca acgtgacgat cgccgcgacg 840
ccgtcggaga tgggttcgac ggtcgcgcag gttctcaacc agcgtaagaa agtcgcg 897

<210> 21

<211> 900

<212> ADN

<213> *Hyphomicrobium denitrificans*

<400> 21

atggcaatct ttatcaatga aaagacgccg atcctgatcc agggctttac cggtcgcatac 60
ggcacgttcc acgcccagga aatgatcgac tacgggtcca acgtcgttgg cggcgtgacg 120
cccggtaaag gcggcacctc gcattctggc cgtccggtgt tcaacaccgt caagggcgcc 180
gtcgacgaga cgggcgctga agcctccatc gtgttcgtgc cgccgccgtt cgcggctgac 240
gcgatcatgg aagcggccga cgctgggatc aaatactgcg tctgcatcac ggacggcatt 300
cctgctcagg atatgatccg cgtgaagcgc tacatgcgcc gctacaagaa agaagcgcgc 360
atgatcctga ccggcccga ctgcgccggc acgatctcgc caggcaaggc gatgctcggc 420
atcatgccgg gacacatcta ccttcggggc cgcgtcggca tcgtcggccg ctccggtacg 480
ctcggctacg aagccgcgc gcagctcaag gcccttggca tcggcgtctc gacgtcggtt 540
ggtatcggcg gcgaccgat caacggctcg tcgcatcgtg acgtcctcga gcacttcgag 600
aacgatcccc agaccgacgc gatcctgatg atcggcgaaa tcggtggtcc gcaggaagcc 660
gaagccggcc tcttcgcaa agagcacatg aagaagcctg tcatcgcta catcgccggt 720
ctgtcggccc cgaagggccg ccgcatgggc cacgctggcg ccatcgtttc ggcattcggc 780

gagtcggctg ctgagaaggt cgagatcctg aagggctgcg gcgtcgctat cgcgccgacg 840
 ccgtcggaaa tgggctcgac cgtcgcgacg gttctcggca agcagaaaaa agttgcctga 900

<210> 22
 <211> 1164
 <212> ADN
 <213> *Hyphomicrobium denitrificans*

<400> 22
 atggacattc atgaatacca ggccaaagag cttcttgca agttcggcgt gccgatcgcc 60
 cgcggcggac ttgcctacag ccctgaacag gccacctatc gcgccagcga gcttggcggc 120
 acggtcgtcg tcaaggcgca gattcactcc ggcgcgcgcg gtaaagccgg cggcgtcaag 180
 gtctgcaaga cggaaaagga aatcgaggat gcagccgagt tcatgctcgg ccgcaagctc 240
 gtcacgcacc aaacgggatc ggccggcaag ctggtctcgc gcctctacat cgaagaagcg 300
 acgaacatcg atcgcgaaat ctatctcggg ttcgtgatgg accgcgcttc ggagcgcacg 360
 gtcgtcgtgg cctcggccgc gggcggcatg gacatcgagg aaatctcggc gtcgcagccc 420
 gacacgatca tccgcgtcgc cgtcgaccog gcggtcggca tgcagcagtt ccaggcacgt 480
 gagctggcat tcggacttgg cgtcgatcct gagatcgtca acaagctcgt gcccgcgatc 540
 atgggctgct atcgcgccct ccgcgatctc gatgcgatga tgggtgaaat caaccgcgtc 600
 gtcatcacca aggaaaagca ggtcgttgcg ctcgacgcca agatgtcgtt cgacgacaac 660
 gcgctgttcc gccgtccgca catcgccgag ctgcgcgaca agagccagga agatccccgc 720
 gaaacctacg cgtcggatcg tgggtctctcg tacgtcggtc tcgatggcga catcggctgc 780
 atcgtcaacg gtgccggtct cgcgatggcg acgctcgaca tgatcaagct tgcgggcggc 840
 gagcctgcga acttcctcga catcggcggc ggcgccctct ccgagcgcgt caccaagtcg 900
 ttcaaggcgg ttctgcgcga caagaacgtc aaggccatcc tgggtcaacgt cttcgccggc 960
 atcaaccgtt gcgactgggt tgccaagggt gtcgtcgacg ccgtcaagga actcgatatc 1020

aagctgccga tcgtcgttcg cctcgcaggc accaacgtcg aagaaggccg caagatcatc 1080
gacaacagcg gcctgacggt catcagcgcg gaaactctcg ccgatgctgc caagcaggcg 1140
gtcgaagcgg ccaaaaaagc ctaa 1164

<210> 23
<211> 2105
<212> ADN
<213> Rhizobium sp. NGR234

<400> 23
catatggaca ttcacgaata tcaagcgaaa gaactgctga gccgttatca aattcacatc 60
ccgcgtggtg gtctggccta ctccccggaa caagctgcct atcgtgcacg cgaaatcggc 120
ggtgatcgct ggggtggttaa agctcagatt catagcgggt cacgtggcaa agctggcggt 180
atcaaactgt gctctaccga tcacgaaatt gttgaagcgg ccgacagtat gctgggccgc 240
accatcgtga cgcacagac cggtcgcgaa ggcaaactgg tttctcgctt gtatgtcgaa 300
gaagcgatgg atattgcccg tgaaatttac atcggttttg ttctggaccg taaaagtgaa 360
cgcattatga tcgtcgcgag ctctagtggc ggtatggaaa ttgaagaaat cgcagaagct 420
gaaccggata gcattatccg cgccacggtg gatccgggtg ttggcatgca ggactttcaa 480
gcacgtgaaa ttgcttttcg tctgggcacg gataacgcgc tgattggccg cgccacccaa 540
acgctgctgg gttgttatcg tgcattcggt gattacgacg cttctatgct ggaaattaac 600
ccgctgggtc tgaccgcgtc cggatgatctg gtggcgctgg acgccaaaat gtcgtttgat 660
gaaaatgcac tgttccgtcg cccgcacatc gctgaaatgc gcgataaaag ccaggaagac 720
caacgcgaaa cgtatgcacg cgatcgtggt ctgtcatatc ttggtctgga cggcaacatt 780
ggttgcatta tcaatggtgc cggcctggcg atggccacca tggatatgat taaaatcgca 840
ggcgggtgaac cggctaattt tctggatatc ggcgggtggcg catcgccgga ccgtgtcgca 900

```

aaaagcttcc ggcgcgtgct gacggatcgt caggtggaaa ccattctggt taacatcttt 960
gcgggcatta atcgttgtga ctgggtcgcg gaaggcgtga tcaaagcact gcgtgaagtg 1020
ggtgttccgg tcccgtggtg tgtccgtctg tccggtacga acatggaaga aggtcgtcgc 1080
attctggcgg aatcaggtga aaatattatc gtggccgaaa ccctggcaga agctgctgat 1140
aaagcagtgg ctgcgtggcg ttcgttcacc gctaataaag ctgcgtaagg tcgcctccca 1200
tgtccattct gctggataaa aatacccgtg tgatcgtgca aggctttacc ggcaaaatcg 1260
gctcattcca tgctgaagat atgaaacgct acggcaccaa cgtgggttggc ggtgttacgc 1320
cgggcaaagg cggtcaggca catctgggta tgccggtggt taataccgtt aaaggcgcgg 1380
tccaagaaac ggggtgcggat gccagtatta tctttgtccc gccgccgttc gcggccgatt 1440
ccattatgga agcagctgac gcgggcatcc gtctgtgcgt gtgtattacc gatggtatcc 1500
cgagtcagga catgattcgt gttaaacgct atatgcgtcg ctaccgtttc gaagaccgca 1560
tgaccctgat tgggccgaac tgcgcaggca tgatcacgcc gggatgaagct atgatgggta 1620
ttatgccggg ctctatctat ctgccgggcc gtattggtat cgttggtcgt agcggtagcc 1680
tggtgttacga agcagcctct caaatgaaag cgctgggcgt cggtgtgagt acgtccattg 1740
gcatcggcgg tgatccggtc aatggtagct cttttaaaaga catgctggaa ctgttcgaaa 1800
aagatccggg caccgacgcc gtgctgatga ttggtgaaat cggcgggtccg caggaagcgg 1860
aagcagctct gtgggcccgc gatcacatga aaaaaccgct gatcgcgtat atcgcaggtc 1920
tgtcagcacc gaaaggctcg cgcatgggtc acgcaggcgc tattatctca gcatttggcg 1980
aatcggctca agaaaaagtg gaaattctga aatcggcagg tgttacgatc gtcccgaacc 2040
cgtcctcttt tggatgaaacc gttgcggatg tgctgtcggc tatgagtaaa gcggcttaat 2100
ctaga 2105

```

<210> 24

<211> 897

<212> ADN

<213> Granulibacter bethesdensis

<400> 24

atgagcattc tgatcaataa gcagaccaag atcatcattc agggcttcac cggcgacaag	60
ggcacgttcc acggtcgcga gatgatcgat tacggcacca atgtcgtcgg tggcgtgacg	120
cccggtaaag gcggccagac ccatctgggt cgtcccggtg tcaacacggt cgaggacgcg	180
gtgctgaaa ccggtgcccc ggctcgcgat acctttgtgg cacctgcctt ttgcgccgat	240
gcgatcatgg aaggcgccga tgcggggctg gagctgatct gcaccatcac ggacggtatt	300
ccggcgcagg atatgatgcg cgtgaagcgt tatctgcgcc gctaccagaa ggatcgtcgc	360
acgcgtctgg tggggccgaa ctgcgcgggc atcatcagcc cgggccaggc catgctgggc	420
atcatgccgg gccatatcta caaggaaggc catgtcggca ttgtttcccg ctcaggcacg	480
ctcggctatg aagccgccgc gcagctgaag gagctgggca tcggtgtgtc caccagtgtg	540
ggtatcgggtg gtgacccgat caatggttct tccttccttg atcaccttca gctgttcgaa	600
gccgaccccg agactcatgc cgtgctgatg atcggcgaga tcggtggccc gcaggaagcc	660
gaagcggcga agtggatcag cgagaacatg tcgaagccgg tggttggcta cgttgccggc	720
ctgaccgctc cgaaggggcg tcgtatgggc catgccggtg cgatcatctc tggcgaaggc	780
gacagcgccg ccgaaaagag cgagatcatg cgctcctacg gtctgacggt tgctcccagc	840
ccgggtgaac tcggctcgac cgttgccgcg gtgctggctg ggcgtcaggc agcctga	897

<210> 25

<211> 1170

<212> ADN

<213> Granulibacter bethesdensis

<400> 25

atggacgtcc atgagtacca ggcaaaagaa ttgcttgcca gcgccggtgt ggccgtgccc	60
---	----

```

cgcggtgcaa tcgctttcag cgctgatcag gccgtgtatg ccgcgaccga actgggtggc 120
tggcactggg cgggtgaaagc ccagattcat gccggtgcgc gcggcaaggc cggcggcatc 180
aagctgtgca agacgtatca tgaagtgcgc gaggctgctg ccggtatgct cggcaagcgt 240
ctggtcacgc atcagaccgg tccggaaggc aagcctgtcc agcgcgtgta tgtcgaggtc 300
gccgatccct tcgagaaaga attctatctg ggctttgtgc tggatcgtaa gctggagcgc 360
gtgctgtgta tcgcctccgc cgagggcggc atggagatcg aggaaatcgc ttccaagcat 420
ccggaaaagc tgatccaggt gatcgtggag ccggcggttg gtcttcagca gttccaggcc 480
cgccagatcg ccttcaagct gggcctgtcc agccgtcagg tacagcgtgc ggtgaccagc 540
atcatgggcg cttatcgcgc attccgcgat cacgacgcga ccatgctgga aatcaatcct 600
ctggttctga ccaaggatga ccgtattctg gcgctcgatg cgaagatgag cttcgacgac 660
aacgccttgt tccgtcgcaa caacgtcgcc aacatgcatg acccctctca ggacgatccg 720
cgtgaggcgc aggctgccga gcacaacctc aactatgtgg gtctggaagg cgatatcggc 780
tgctgtgtga atggcgccgg cctggcgatg gcgaccatgg acgtcatcaa atatgcgggc 840
ggtgagcctg ccaacttcct cgatgtcggc ggcggggcaa gccccgagcg taccgcgacg 900
gcgttccgtc tgggtgctgtc cgacaagaac gtgaaggttg ttctgggtcaa catcttcgcc 960
ggcatcaacc gctgcgactg gatcgcgga ggcgtggtgc acgcggtgaa agaagtcgat 1020
ctgaagcttc cgctgggtggc gcgtctggca ggcaccaatg tggaggaagg ccgccgtatt 1080
ctgaaagaaa gcggcatttc cgtcatcatg gccgaaagcc tgaccgaagc ggccgaaaag 1140
gccgtcgagg ccgcgaaggc cgcggcgtaa 1170

```

```

<210> 26
<211> 888
<212> ADN
<213> Nitrosomonas europaea

```

<400> 26

```

gtggcaattc tcatcaatga gcagacgcgg atcatcgtac agggctttac cggccggatc      60
ggcaccttcc atgctcagga aatgatcgat tacggatcta atgtagtggg aggcgtaacg      120
cccggcaaag gcgggcagaa acacctgggg ctgccagtat tcaataccgt ccgggaagca      180
gtcgagcagg caggtgcgga agccagcatt gtattcgtcc cgccggcatt tgcggctgat      240
tcgattatgg aagcagccga tgccggatat aaatattgcg tatccatcac cgatggcatt      300
ccaacccagg acatgatgac cgtcaaaaac ttcttacgcc tcttcctga ggaggacaga      360
atgatgctga cgggccccaa ctgttcaggc actatcagcc ccggacgggc gatgttgggc      420
atcatgccgg ggcatattta cagccgtggg gtcgttggtg tcgtcggccg ttccggtaca      480
ctgggttatg aagctgccga ccagatgcga cggctgaata tcgggatttc gacttcggta      540
ggtattggcg gagaccgat catcggcagt tcgcaccgga atgtgctgca aaagctggaa      600
gaagatccgg aaaccaaagt cacgctgatg attggtgaaa ttggtggccc aatggaagta      660
gaagccggac tgttcgcaaa ggaaaacatg agcaaaccgc tggttgccta cattgccggc      720
ctgactgcac ctcccggaag acggatgggg cacgccggag caatcatctc ttcagccggc      780
gaaagcgcag cagaaaaagt ggaaagactg aaagaactgg gcgtcaccat ctgcccgact      840
ccgtctctga tgggtgaaac cgtcgcaaaa gttctggccg gactctaa      888

```

<210> 27

<211> 1173

<212> ADN

<213> Nitrosomonas europaea

<400> 27

```

ttggatatcc atgaatatca ggccaaggaa atcctggctg aatacggat caagctggct      60
gaaggcggat tggcgcacac tgtggaagaa gcggtacaac gcagccggga aatcgatggc      120
aatgtgtggg tcgtcaaggc acaaatccat tccggcgccc gtggtaaagc aggcggtgtc      180

```



```

aaagtatgcc ggacacatga agaaatcgaa gtcgcagctg aatcactgct ggggaaaaaa 240
ctggtcacac accaaaccgg cccggcgggg aaactctgct ccagactgta tatcgaagcc 300
ggtaccgaaa ttgcccgga agtgtatctc gctttcatga tcgatcgag tcatgaacgt 360
atcgtcatgg tgggttccgc acagggggga atggatatcg agaccctggc agccacgaat 420
cctgatgcca tcaaaaaaat tcacatcgag cctgctgtcg gcctgcagga tttccaggca 480
agaaccatgg cttttgcaact ggggtctggaa gatgttctgc tcaatcacgc cgtcaagacg 540
atcagaggtt gctaccgcg ccatgcgcgat ctggatgcga acatactcga aatcaaccgg 600
ctggttgatca cgcgcaacaa cgagctgac gcactggatg cgaagatgag ctttgatgaa 660
aatgcactgt tccggcgcca ccggatttcc gaattgctg acaactcaca aatcgattcg 720
cgcgaaattg ctgcagcgga agcaggcttg agctacgtcg ggctggatgg agacatcggc 780
tgcatgatca atggcgccgg gctggcaatg gccaccatgg acatgatcaa actggccggc 840
ggcgaaccgg ccaattttct ggatgtcggc ggcggcgcat ctgccgagcg aactgaaaaa 900
gcattccggc tggactggc ggataacaac gtaaaagcca tgctgggtcaa tatctttgcc 960
ggtattaacc gctgtgactg gattgccgaa ggtgtggttc aggctgtacg gaatatcgga 1020
atgacgggcc ctctggctgt ggcctgtct ggcaccaacg tggaagaagg ccgccgtatc 1080
atcgctgaca gcggggtgcc gatcattact gcagaaaccc tggccgatgc agcagagaaa 1140
gtagtgcacg ctgcgaacca ggctgcagtt tga 1173

```

<210> 28

<211> 903

<212> ADN

<213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 28

```

atgagcgtat tcgttaacaa gcactccaag gtcattcttc agggcttcac cggcgagcac 60

```

```

gccaccttcc acgccaagga cgccatgcgg atgggcaccc ggggtggcgg cgggtgtcacc 120

```

cctggcaaag gcggcacccg ccatcccgat cccgaactcg ctcatctgcc ggtgttcgac	180
accgtggctg aagccgtggc cgccaccggc gccgacgtct ccgccgtggt cgtgccgccc	240
cccttcaatg cggacgcgtt gatggaagcc atagacgccg gcatccgggt cgccgtgacc	300
atcgccgacg gcatcccggt acacgacatg atccgactgc agcgctaccg ggtgggtaag	360
gattccatcg tgatcggacc gaacaccccc ggcatcatca cgccggggcg gtgcaagggtg	420
ggcatcatgc cttcgcacat ttacaagaag ggcaacgtcg gcatcgtgtc gcgctccggc	480
accctcaatt acgaggcgac ggaacagatg gccgcgcttg ggctgggcat caccacctcg	540
gtcgggtatcg gcggtgaccc catcaacgga accgatttcg tcaactgtcct gcgcgccttc	600
gaagccgacc cggaaaccca gatcgtggtg atgatcggcg aaatcggcgg cccccaggaa	660
gtcgccgccc cccgctgggc caaggaaaac atgacaaagc cggtcatcgg cttcgtcgca	720
ggccttgccg caccgaccgg ccgacgcatg ggccatgccg gcgccatcat ctccagcgag	780
gccgacaccg ccggagccaa gatggacgcc atggaagcct tggggctgta tgtcgcccgc	840
aaccgggcac agatcggcca gaccgtgcta cgcgccgcgc aggaacacgg aatcagattc	900
tga	903

<210> 29
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 29	
gtgaatatcc atgagtacca ggccaaggag ctgctcaaga cctatggcgt gcccggtgcc	60
gacggcgccc ttgcctattc cgacgcgcag gccgccagcg tcgccgagga gatcggcggc	120
agccgctggg tggtaaggc gcagatccat gccggcggtc gcggcaaggc cgggggcgta	180
aaggtcgccc actccatcga ggaagtccgc caatacgccg acgcatgct cggcagccac	240

```

ctcgtcaccc atcagaccgg cccgggaggg tcgctgggtc agcgtctgtg ggtggaacag 300
gccagccata tcaaaaagga atactacctg ggcttcgtga tcgatcgcgg caatcaacgc 360
atcaccttga tcgcctccag cgagggcggc atggaaatcg aggaagtcgc aaaggaaacc 420
ccggagaaaa tcgtcaagga agtcgtcgat ccggccatag gcctgctgga cttccagtgc 480
cgcaagggtc ccacggcgat cggcctgaaa ggcaaactga tgccccaggc cgtcagggtg 540
atgaaggcca tctaccgctg catgcgcgac aaagatgccc tgcaggccga aatcaatcct 600
ctggccatcg tgggcgaaag cgacgaatcg ctcatgggtc tggatgccaa gttcaacttc 660
gacgacaacg ccctgtaccg gcagcgcacc atcaccgaga tgcgcgacct ggccgaggaa 720
gacccgaaag aggtcgaagc ctccggccac ggtctcaatt acatcgccct cgacggcaac 780
atcgggtgca tcgtcaatgg cgccggcctc gccatggctt cgctcgacgc catcacctg 840
catggcgggc gtccggccaa cttcctcgac gtgggcggcg gcgcctcccc cgagaaggtc 900
accaatgcct gccgcatcgt actggaagat cccaacgtcc gctgcatact ggtcaacatc 960
tttgccggca tcaaccgctg tgactggatc gccaaggggc tgatccaggc ctgcgacagc 1020
ctgcagatca aggtgccgct gatcgtgcgc ctggccggga cgaacgtcga cgagggccgc 1080
aagatcctgg ccgaatccgg cctctccttc atcaccgcgg aaaatctgga cgacgcggcc 1140
gccaaggccg tcgccatcgt caagggataa 1170

```

<210> 30

<211> 897

<212> ADN

<213> Uncultured gamma proteobacterium

<400> 30

```

atgagtatth ttgtcaaccg ccattcgcgg gtgatcatcc agggattcac cggccaacac 60
gctacgtttc acgccagcga ggcgattcgg tacggcactc aagtggtcgg cggcgtcacc 120
ccgggcaagg gaggaagtaa gcaccttgga ttgccggtgt tcgatacagt ttctgaagcg 180

```

gtttcagaga cgggcgccga tgtctctggg atttttgtgc cccagcggtt tgctgccgac 240
 gccatcatgg aagcgatcga agccgggatc cgggtaatcg tggatgattgc cgatggcatc 300
 ccggtgcaag acatgattcg agtgcagcgc taccggctcg gacgcgactg tctggtgctt 360
 gggccaaaca cgcctggaat catcactcct ggagagtgcg aggtggggat catgcctgct 420
 ggaatttacc gtccaggaag aattggggta gtgtcgcggt ccggaacgct gaattacgag 480
 gccgtcgaac aattgggcaa actgggtttg ggtcaatcca ccgcggttgg catcggtggg 540
 gatccggtca acggcaccga ctttgtgact gtgctcaaag ctttcgaaca agatccggac 600
 accgatgcga tcgtcatgat cggcgaaatc ggcggggccgc aagaagtcgc cgctgcccgc 660
 tgggccaaag aaaatatgca aaagccgctc atcggttttg tggcgggggc ctcggctcca 720
 ccggggcggc gcatggggca tgctggggcg atcatcgaag gtgaggaaga caccgcaaaa 780
 gccaagatgg acgcgatgga ggagcttggg gtatacgtgg tcagaaatcc cgcccggatc 840
 ggcgaaacgg ttttaagggc gctcaaggag cgcctgggat ctgcagtttc tggctaa 897

<210> 31

<211> 1179

<212> ADN

<213> Uncultured gamma proteobacterium

<400> 31

atgaacattc acgaatatca ggccaaggag ctgcttcggt cttacggtgt ccccggtcca 60
 gccgggaacg tcgcctattc cgatcgccaa ggcgaggcag tggccgaaca gatcggcggg 120
 gacggatggg tagtaaaagc gcaaattccat accggcgggc gaggcaaggc cggcggcggtt 180
 aaactcgccc aatccttggg ggaagtccgc aagatagccg acgaaatgat cggcaaaaact 240
 ttggtgactc ctcaaaccgg gcccaaaggc aaagtgggtcc ggcgcgtatt ggtggaagaa 300
 gcggttagtc cgcaacggga attgtacctt gggttgggtca tcgaccggcg cagccaacgc 360

```

atcaccatcg tggcttccgc ggaaggaggg gtagagatcg aggaagtggc ggccaggagt 420
ccggagaaaa tcgtgcggga ggcgatcgac ccggccatcg gtctgcgcga ttttcaatgc 480
cgtaagggtcg ccgccgccat tggcctgcgc gacaaacatc taatggcgca ggcggtgcgc 540
ctcatgcagc gcattctatcg cctgtttcgt gacaaggatg ccctccaggt ggagatcaat 600
cctctaggca tcgtcggcag cgagccaaag ctggtttggt tggacgcaa attcaatttc 660
gaccccaacg cccttttccg acatccggaa atcaacgagc tgcgcgattt ggaagaggaa 720
gacccgcggg aggtggaagc cttaggtcac gggctcaact acatcgcttt agacggcgat 780
atcggtcgca tcgtcaacgg cgccggcctg gccatggcga ccatggacgc catcgtgttt 840
catggtgggt ggccggcgaa tttcctggat atcgggggtg gggcctcgcc ggagaaagtg 900
caaaacgctt gtcggatcgt gattcaggac cagaacgtca agactttggt ggtcaatatc 960
tttgccggca tcaaccgctg cgattggatc gctaccggtc tagtccaggc ttacaccagc 1020
ttgcgcacatc acaagccctg cgtcgtgcgc cttgcaggaa cgaatgtaga ggaggggcta 1080
aggatthtga ccgactcggg tcttgctttc gtaaaagcga gcaatctgga cgatgcggca 1140
gctaaagccg tcgccatcgc tcatgggagg aacgtatga 1179

```

```

<210> 32
<211> 324
<212> PRT
<213> Methylobacterium extorquens

```

```
<400> 32
```

```

Met Ser Phe Thr Leu Ile Gln Gln Ala Thr Pro Arg Leu His Arg Ser
1           5           10           15

```

```

Glu Leu Ala Val Pro Gly Ser Asn Pro Thr Phe Met Glu Lys Ser Ala
          20           25           30

```

Ala	Ser	Lys	Ala	Asp	Val	Ile	Phe	Leu	Asp	Leu	Glu	Asp	Ala	Val	Ala
		35					40					45			
Pro	Asp	Asp	Lys	Glu	Gln	Ala	Arg	Lys	Asn	Ile	Ile	Gln	Ala	Leu	Asn
	50					55					60				
Asp	Leu	Asp	Trp	Gly	Asn	Lys	Thr	Met	Met	Ile	Arg	Ile	Asn	Gly	Leu
65					70					75					80
Asp	Thr	His	Tyr	Met	Tyr	Arg	Asp	Val	Val	Asp	Ile	Val	Glu	Ala	Cys
				85					90					95	
Pro	Arg	Leu	Asp	Met	Ile	Leu	Ile	Pro	Lys	Val	Gly	Val	Pro	Ala	Asp
			100					105					110		
Val	Tyr	Ala	Ile	Asp	Val	Leu	Thr	Thr	Gln	Ile	Glu	Gln	Ala	Lys	Lys
		115					120					125			
Arg	Glu	Lys	Lys	Ile	Gly	Phe	Glu	Val	Leu	Ile	Glu	Thr	Ala	Leu	Gly
	130					135					140				
Met	Ala	Asn	Val	Glu	Ala	Ile	Ala	Thr	Ser	Ser	Lys	Arg	Leu	Glu	Ala
145					150					155					160
Met	Ser	Phe	Gly	Val	Ala	Asp	Tyr	Ala	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Arg	Ser
				165					170					175	
Thr	Val	Ile	Gly	Gly	Val	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ser	Val	Leu	Thr	Asp	Lys
			180					185					190		
Asp	Glu	Ala	Gly	Asn	Arg	Gln	Thr	His	Trp	Gln	Asp	Pro	Trp	Leu	Phe
		195					200					205			

Ala Gln Asn Arg Met Leu Val Ala Cys Arg Ala Tyr Gly Leu Arg Pro
 210 215 220

Ile Asp Gly Pro Phe Gly Asp Phe Ser Asp Pro Asp Gly Tyr Thr Ser
 225 230 235 240

Ala Ala Arg Arg Cys Ala Ala Leu Gly Phe Glu Gly Lys Trp Ala Ile
 245 250 255

His Pro Ser Gln Ile Asp Leu Ala Asn Glu Val Phe Thr Pro Ser Glu
 260 265 270

Ala Glu Val Thr Lys Ala Arg Arg Ile Leu Glu Ala Met Glu Glu Ala
 275 280 285

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

Ile Ala Ser Ile Arg Met Ala Glu Ala Leu Ile Gln Lys Ala Asp Ala
 305 310 315 320

Met Gly Gly Lys

<210> 33
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Hyphomicrobium methylovorum

<400> 33

Met Ser Tyr Thr Leu Tyr Pro Thr Arg Lys Gln Arg Leu Gln Arg Ser
 1 5 10 15

Tyr Leu Ala Val Pro Gly Ser Asn Pro Ser Met Ile Asp Arg Ala Leu
 20 25 30

Lys Ser Ala Ala Asp Tyr Val Phe Leu Asp Cys Glu Asp Ala Val Ala
 35 40 45

Pro Pro Glu Lys Glu Gln Ala Arg Lys Asn Ile Ile Gln Ala Leu Asn
 50 55 60

Asp Leu Asp Trp Lys Gly Ala Gly Lys Ser Val Ser Val Arg Ile Asn
 65 70 75 80

Gly Leu Asp Thr His Tyr Met Tyr Arg Asp Val Val Asp Ile Val Glu
 85 90 95

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

Pro Ala Asp Val Tyr Thr Val Glu Cys Ile Val Ser Gln Ile Glu Val
 115 120 125

Ala Lys Gly Leu Pro His Gln Ile Gly Thr Glu Ala Leu Ile Glu Thr
 130 135 140

Pro Leu Gly Met Ala Asn Val Glu Ala Ile Ala Ser Ala Ser Ser Arg
 145 150 155 160

Leu Glu Ser Met His Phe Gly Val Ala Asp Tyr Ser Ala Phe Asn Lys
 165 170 175

Ala Arg Thr Val Val Ile Gly Gly Leu Asn Pro Asp Tyr Pro Gly Asp
 180 185 190

Gln Trp His Phe Pro Leu Ser Arg Met Thr Val Ala Cys Arg Ala Phe
 195 200 205

Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe Gly Gly Ile Asp Asp Pro Glu
 210 215 220

Gly Tyr Lys Ala Ala Ala Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly Met Glu Gly
 225 230 235 240

Lys Trp Ala Ile His Pro Ser Gln Ile Glu Leu Ala Asn Glu Ile Tyr
 245 250 255

Ser Pro Thr Ala Lys Glu Val Glu Arg Ala Glu Arg Ile Leu Val Ala
 260 265 270

Leu Lys Glu Ala Glu Ala Gln Gly Lys Gly Ala Ala Ser Leu Asp Gly
 275 280 285

Lys Met Ile Asp Ala Ala Ser Glu Lys Met Ala Arg Asn Leu Leu Ser
 290 295 300

Thr Ala Glu Gln Ile Lys Lys Ala Glu Ala Ala His Ala Ala Gln Lys
 305 310 315 320

Lys

<210> 34
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Hyphomicrobium denitrificans

<400> 34

Met Ser Tyr Thr Leu Tyr Pro Asn Arg Lys Gln Arg Leu Gln Arg Ser
1 5 10 15

Tyr Leu Ala Val Pro Gly Ser Asn Pro Thr Met Ile Asp Arg Ala Leu
20 25 30

Lys Ser Ala Ala Asp Tyr Val Phe Leu Asp Cys Glu Asp Ala Val Ala
35 40 45

Pro Pro Glu Lys Glu Gln Ala Arg Lys Asn Ile Ile Gln Ala Leu Asn
50 55 60

Asp Leu Asp Trp Lys Gly Ala Gly Lys Ser Val Ser Val Arg Ile Asn
65 70 75 80

Gly Leu Asp Thr His Tyr Cys Tyr Arg Asp Val Val Asp Ile Val Glu
85 90 95

Gln Ala Gly Ala Lys Leu Asp Thr Ile Leu Ile Pro Lys Val Gly Val
100 105 110

Pro Ala Asp Val Tyr Ala Ile Glu Ser Phe Val Ser Gln Ile Glu Val
115 120 125

Ala Lys Gly Leu Pro His Gln Ile Gly Met Glu Ala Leu Ile Glu Thr
130 135 140

Pro Leu Gly Met Ala Asn Val Glu Ala Ile Ala Ser Ala Asn Ser Arg
145 150 155 160

Leu Glu Ser Met His Phe Gly Val Ala Asp Tyr Ser Ala Phe Asn Lys
165 170 175

Ala Arg Thr Val Val Ile Gly Gly Leu Asn Pro Asp Tyr Pro Gly Asp
 180 185 190

Gln Trp His Phe Pro Leu Ser Arg Met Thr Val Ala Cys Arg Ala Phe
 195 200 205

Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe Gly Gly Ile Asp Asp Pro Glu
 210 215 220

Gly Tyr Lys Ala Ala Ala Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly Met Glu Gly
 225 230 235 240

Lys Trp Ala Ile His Pro Ser Gln Ile Glu Leu Ala Asn Glu Ile Tyr
 245 250 255

Ser Pro Thr Ala Lys Glu Ile Glu Arg Ala Glu Arg Ile Leu Val Ala
 260 265 270

Leu Lys Glu Ala Glu Ala Gln Gly Lys Gly Ala Ala Ser Leu Asp Gly
 275 280 285

Lys Met Ile Asp Ala Ala Ser Glu Lys Met Ala Lys Asn Leu Leu Val
 290 295 300

Thr Ala Ala Ala Ile Lys Ala Gly Glu Glu Ala Arg Ala Lys Ser Lys
 305 310 315 320

<210> 35

<211> 316

<212> PRT

<213> Nitrosomonas europaea

<400> 35

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

Asn Arg Ala Arg Thr Thr Asn Ile Gly Gly Leu Asn Pro Asp Tyr Pro
 180 185 190

Gly Asp Gln Trp His Ala Ala Ile Ser Arg Met Thr Val Ala Cys Arg
 195 200 205

Ala Phe Gly Leu Arg Pro Ile Asp Gly Pro Phe Gly Asp Ile Gln Asp
 210 215 220

Pro Glu Gly Tyr Lys Gln Ala Ala Arg Arg Ala Ala Ala Leu Gly Cys
 225 230 235 240

Glu Gly Lys Trp Ala Ile His Pro Thr Gln Ile Ala Leu Ala Asn Glu
 245 250 255

Val Phe Thr Pro Pro Thr Ala Glu Val Asp Lys Ala Lys Arg Ile Leu
 260 265 270

Thr Ala Leu Lys Glu Ala Ala Ala Gln Gly Lys Gly Ala Ala Ser Leu
 275 280 285

Asp Gly Arg Leu Ile Asp Ala Ala Ser Glu Arg Met Ala Asn Asn Ile
 290 295 300

Val Lys Met Ala Glu Ala Ile Ala Ala Lys Ser Lys
 305 310 315

<210> 36
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Methylococcus capsulatus

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 975

<212> ADN

<213> Methylobacterium extorquens

<400> 37

atgagcttca ccctgatcca gcaggccacc ccgcgcctgc accgctcgga actcgcggtt

60

```

cccggtcca acccgacctt catggagaag tcggctgcct cgaaggccga cgtgatcttc 120
ctcgacctcg aggacgcggt cgcgcccga cacaaggagc agggccgcaa gaacatcatc 180
caggctctta acgacctgga ttggggcaac aagaccatga tgatccgcat caacggtctc 240
gacacccact acatgtaccg cgacgtggtg gacatcgtgg aggccctgcc gcgcctcgac 300
atgatcctga tccccaaagg cggcgtgccg gccgacgtct acgccatcga cgtgctgacg 360
acgcagatcg agcaggccaa gaagcgcgag aagaagatcg gcttcgaggt gctgatcgag 420
accgcgctcg gcatggccaa tgtcgaggcg atcgcgacct cgtccaagcg cctcgaggcg 480
atgtccttcg gtgtcgccga ctacgccgc tccactcgcg cccgctccac cgtgatcggc 540
ggcgtcaacg ccgattacag cgtgctcacc gacaaggacg aggcgggcaa ccgccagacc 600
cactggcagg atccgtggct gttegccag aaccgcatgc tggtcgcctg ccgcgcctac 660
ggcctgcgcc cgatcgacgg tcccttcggc gacttctccg atccggacgg ctacacctcg 720
gccgctcgcc gctgcgccgc gctcggcttc gagggcaagt gggcgatcca cccctcgag 780
atcgatctgg ccaacgaggt gttcaccccc tccgaggccg aggtcaccaa ggcccgccgc 840
atcctggaag ccatggaaga ggccgccaag gccggccgcg gcgccgtctc gctcgacggc 900
cgccatcg acatcgctc gatccgcatg gccgaggcgc tgatccagaa ggccgacgcg 960
atgggcggga agtaa 975

```

```

<210> 38
<211> 963
<212> ADN
<213> Hyphomicrobium methylovorum

```

```

<400> 38
atgagctaca cgctttaccc gaccgcgaag cagcgccctgc agcgctcgta cctcgcagtg 60
ccgggctcca acccgagcat gatcgatcgc gcactcaaga gcgcagccga ctatgtgttt 120

```



```

ctcgattgcg aagacgccgt cgcgccgccc gagaaagaac aggctcgcaa gaacatcatt 180
caggcgctga acgatctcga ctggaagggc gcaggcaaga gcgtctcggt tcgcatcaac 240
ggcctcgaca cgcactacat gtaccgcgac gttgtcgaca tcgtggagca ggctggctcc 300
aagctcgaca cgatcctcat tcccaaggtc ggcgttccgg ctgacgtcta cacggtcgaa 360
tgcatcgtga gccagatcga agtcgcgaag ggtcttccgc accagatcgg caccgaagcg 420
ctcatcgaaa cgccgctcgg catggcaaac gtcgaagcca tcgcgtcggc aagcagccgc 480
ctcgagtcca tgcaattcgg cgttgctgac tactccgcct tcaacaaggc acgcaccgtc 540
gtcatcggcg gcttgaacct tgattaccgg ggtgaccagt ggcaattccc gctgtcgcgt 600
atgaccgttg cctgccgcgc attcggcctt cgtccgatcg acggcccgtt cgggtggcatc 660
gacgatccgg aaggctacaa ggccgccgct cgccgtggcg ctgctctcgg catggaaggc 720
aagtgggcca tccatccgtc gcagatcgaa ctcgccaacg aaatctattc gccgacggcg 780
aaggaagtcg aacgcgctga acgcatcctc gttgcactga aggaagctga agctcaaggc 840
aagggcgag cgtcgcttga cggcaagatg atcgacgccg catctgaaaa gatggcgcg 900
aacctgctct cgactgccga gcagatcaag aaggccgagg ccgctcacgc agctcagaag 960
aaa 963

```

<210> 39

<211> 963

<212> ADN

<213> *Hyphomicrobium denitrificans*

<400> 39

```

atgagctata ccctctaccc gaaccgtaag cagcgtctgc agcgttctta tctcgccgtg 60
ccgggctcca acccgacgat gatcgaccgc gccctcaaga gcgccgccga ctacgttttc 120
cttgattgcg aagacgccgt cgcgccgccc gagaaagagc aggctcgcaa gaacatcatc 180

```

caggctctga acgatctcga ctggaagggc gcgggcaaga gcgtctcggc ccgcatcaac	240
ggcctcgaca cgcattattg ctaccgcgac gtcgtcgaca tcgtcgagca ggctggtgcc	300
aagctcgata cgatcctcat tccgaaggtc ggcgttccgg ccgacgtcta cgccatcgaa	360
agcttcgtca gccagatcga agtcgcgaag ggtctcccgc accagatcgg catggaagcc	420
ctcatcgaaa cgccgctcgg catggccaac gtcgaagcca tcgctgtctgc caacagccgc	480
cttgagtcga tgcacttcgg cgttgccgac tactccgcat tcaacaaggc ccgcaccgtc	540
gtcatcggcg gcttgaaccc cgactatccg ggtgaccagt ggcacttccc gctgtcgcgc	600
atgacggtcg cctgccgcgc attcgggtctc cgtccgatcg acggcccgtt cggcgggcatc	660
gacgatccgg aaggctacaa ggccgctgcg cgccgtggtg ccgctctcgg catggaaggc	720
aagtgggcga tccaccctc gcagatcgaa ctgcgaacg aaatctactc tccgacggcg	780
aaggaaatcg aacgcgccga gcgcatcctg gtcgcactca aggaagccga agcgcagggc	840
aagggcgcag catcgctcga cggcaagatg atcgacgcgg catctgaaaa gatggcgaag	900
aacctgctgg tcacggcagc ggcgatcaag gcaggcgaag aagctcgcgc aaagagcaaa	960
taa	963

<210> 40
 <211> 951
 <212> ADN
 <213> Nitrosomonas europaea

<400> 40	
atgagtcata ccctgtatga aaccaaaca ccgcgtgtac agcgtcgcga actggctggt	60
ccgggttccc gtcccgaat gtttgaaaaa gcgtgaaaa gcggagtgga cttcatattt	120
ctggatctgg aggatgcagt cgcaccagat gacaagatcc aggcaagaaa aaatatcatt	180
caggcaatca atgatctgga ctggaaaagt cacggtgtca cgctttctgt acgcatcaat	240

```

ggtctcgata cccaatatat ggtgctgat gtggtcgatc tggtagagca ggccggggcac 300
aagatcgata cgttgctgat tcccaaagta ggtgtttatg ctgatgttta catggtcgaa 360
gccatgctca gccagcttga aatgcagcag gggctgaaaa accgaattgg tgtggaagca 420
ctgatcgaaa cggcactggg gatggccaat gttgaagata tcgcccgcag aggaacggcc 480
gggctgtctgg aagcattgca tttcgggtgta gctgactacg ctgccagcaa tcgtgcacgt 540
accaccaata tcggcggggct caatccggat tatccagggg atcagtggca cgcagccatc 600
agcagaatga ccgttgccctg ccgcgcattc ggccctgcgac caatcgatgg cccatttggt 660
gacattcagg atcccgaagg ttacaaacag gcagccagac gtgctgcagc actgggttgt 720
gaaggtaaata gggcaattca tccgacacag atcgcgctgg ccaatgaagt ctttacgccg 780
cccacagcag aagtcgacaa agccaaacgc attctgacag cattgaagga agctgcagct 840
caaggtaaag gtgcagcctc acttgatggc cgccctgatcg atgccgcttc ggaaagaatg 900
gcaaataaca tcgtcaaaat ggcggaagca attgctgcca aaagcaaata a 951

```

<210> 41

<211> 963

<212> ADN

<213> *Methylococcus capsulatus*

<400> 41

```

atggctgtca agaaccgtct acaccgcagc gaactcgcgg tgccggggcag caatccacgc 60
atgctcgaga aagcgccgga agccggcgcc gacatcgtct ttctggacct ggaagatgcg 120
gttgcgccgg atgacaagga gcaagcgcg cgggaacatcg tcttcgcgct caacacctac 180
gactggtcca gatgcgcggt ctccgtccgc atcaacggcc tcgacacca ttacgcctac 240
cgggacctcg ttgagatcgt cgagtcctgc ggcgacaagc tcgacaccat tctggtgccg 300
aaagtcggca gcgcctcgga cgttctgttc gtcgcgactt tactttccca gatcgaggcc 360
taciaaaggtt tcaaaccgat caatatccac gtgctgatcg aaacggccat gggcatggcc 420

```

aacgtggagg agatcgcccg cacctgtcct gaacgcatgg aggccatggg gttcggcggtg 480
 gccgactacg ctgcgtcggt gcgcgcccgc acgaccaaca tcggcgggcg caacccggat 540
 tacggcatgc tgaccgaccc tgacgaaagc ggtacccgcg cctatcactg ggccgaccag 600
 tggcattttcg gcatttcccg catggtcgcg gcctgccgcg cctatgggct tcgccccatc 660
 gacggcccct tcggcgatth cagcgatccg gaaggattcc gcgcgcgagc ccgccgtgcc 720
 gcggcactgg gctgcgaagg gaagtgggcg atccatccct cccagattcc actgtgcaac 780
 gaaatcttca caccacgga aaaagaggtc acgcgggcct accgcatcct ggaagccatg 840
 gagcaggcgg caaaggaggg caaaggcgcg gtgtctctgg atgggcggct gatcgatgcc 900
 gcctcgatcc ggatggcgga gaacgtggtc cgccagatga agcagatcga gtcgcgtcgg 960
 tag 963

<210> 42
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 42 33
 cgagctacat atgcaatgat tgacacgatt ccg

<210> 43
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 43 32
 cgcgcgcatg ctatttggtta gtgaataaaa gg

<210> 44
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 44
 ccgctcgagc atatgctgtc gcaatgattg acacg

35

<210> 45
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 45
 gctattccat atgcaggggtt attgtctcat gagc

34

<210> 46
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 46
 tcggcacgta agaggttcc

19

<210> 47
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 47

cgggtcgaat ttgctttcg

19

<210> 48

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 48

ctagatctga cagtaagacg ggtaagcc

28

<210> 49

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 49

ctagatctca gggttattgt ctcattgagc

29

<210> 50

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 50

ccttttggtta aaggctttaa gatcttccag tggacaaact atgcc

45

<210> 51

<211> 45

<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	51	
	ggcatagttt gtccactgga agatcttaaa gcctttaacc aaagg	45
<210>	52	
<211>	32	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	52	
	ggaattccat atggctgtta aaaatcgtct ac	32
<210>	53	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	53	
	gctctagatc agaatctgat tccgtgttc	29
<210>	54	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	54	
	cgccctgagt gactcatacc aggcctg	27

<210> 55
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 55
 cgcctcgagg caacaccttc ttcacgag

28

<210> 56
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 56
 atcatccagc tgtcaggcag ccatcggaag

30

<210> 57
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 57
 atccccggga attctgtt

18

<210> 58
 <211> 1352
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mảnh pCASE1

<400> 58

cgctcgcagc actggaaggg ttcttcaggg gaacccccgg aaaccgggga aacatctgac	60
ttggttaaat gtcgtattat gaacacgccg aggaatgaaa accgaccgtg cacgctcgtg	120
tgagaaagtc agctacatga gaccaactac ccgccctgag ggacgctttg agcagctgtg	180
gctgccgctg tggccattgg caagcgatga cctccgtgag ggcatttacc gcacctcacg	240
gaagaacgcg ctggataagc gctacgtcga agccaatccc gacgcgctct ctaacctcct	300
ggtcgttgac atcgaccagg aggacgcgct tttgcgctct ttgtgggaca gggaggactg	360
gagacctaac gcggtggttg aaaacccctt aaacgggcac gcacacgctg tctgggcgct	420
cgcgagacca ttaccgcga ccgaatacgc caaacgcaag cctttggcct atgccgcggc	480
tgtcaccgaa ggcctacggc gctctgtcga tggcgatagc ggatactccg ggctgatcac	540
caaaaacccc gagcacactg catgggatag tcaactggatc accgataagc tgtatacgct	600
cgatgagctg cgcttttggc tcgaagaaac cggctttatg ccgcctgcgt cctggaggaa	660
aacgcggcgg ttctcgccag ttggtctagg tcgtaattgc gcaactctttg aaagcgcacg	720
tacgtgggca tatcgggagg tcagaaagca ttttgagac gctgacggcc taggccgcgc	780
aatccaaacc accgcgcaag cacttaacca agagctgttt gatgaaccac tacctgtggc	840
cgaagttgac tgtattgcca ggtcaatcca taaatggatc atcaccaagt cacgcatgtg	900
gacagacggc gccgccgtct acgacgccac attcacgcga atgcaatccg cacgcgggaa	960
gaaaggctgg caacgaagcg ctgaggtgcg tcgtgaggct ggacatactc tttggaggaa	1020
cattggctaa ggtttatgca cgttatccac gcaacggaaa aacagcccgc gagctggcag	1080

aacgtgccgg tatgtcgggtg agaacagctc aacgatggac ttccgaaccg cgtgaagtgt 1140
 tcattaaacg tgccaacgag aagcgtgctc gcgtccagga gctgcgcgcc aaaggtctgt 1200
 ccatgcgcgc tatcgcggca gagattggtt gctcgggtggg cacggttcac cgctacgtca 1260
 aagaagttga agagaagaaa accgcgtaaa tccagcggtt tagtcaccct cggcgtgttc 1320
 aaagtcctac gtaaccaagt cagctcgagg cg 1352

<210> 59
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 59
 ggaattcaca aaaaggataa aacaatggct gtcaagaacc gtctac 46

<210> 60
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 60
 cgaattctca gaatctgatt ccgtgttcct g 31

<210> 61
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400>	61	
cgagctcaag	cttacaaaaa	ggataaaaca atgagcacca ttgcattcat cgg 53
<210>	62	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mồi	
<400>	62	
cgggatccct	agtccagcag	catgagag 28
<210>	63	
<211>	2727	
<212>	ADN	
<213>	Rhodococcus jostii	
<400>	63	
atgagcacca	ttgcattcat	cggactcgga atcatgggca gccccatggc cgttcatctc 60
gccaaggccg	gccaccaggt	ggtcggatac aaccgctcgc ccgagcgcac cgcggcgctc 120
gtcgacgccg	ggggcaccgc	ggccgactcc atcgccaagg ccgttgccgg cgccgacgtc 180
gtggccgtga	tggtccccga	ctccccggac gtccaggccg tactcgccgg cgaggacgga 240
gtcttcgagc	acgccccggc	cggcgccctg atcatcgact tctccagcat ccggccccgac 300
gtcaccaccg	ccctcgccgc	gcaggcaacc gagcgggggt tccggctgat cgacgccccg 360
gtatcgggtg	gcgaggccgg	tgcggtcaac gccgcactgt cgatcatggt cggcggcgcg 420
ccggaggatt	tcgaggcggc	caagccgata ctcgacaccg tcggcaagac cgtggtgcac 480
gtggggcccga	acggttccgg	gcagacggtg aaggccgcga accagctgat cgtcgcgggc 540
aacatccaac	tcctcgccga	ggcgatcatc ttctcgagg cctacggtgt cgacaccgcg 600

gctgcggtcg aggtgctcgg cggcgggctg gccggatcgg ccgtcctgaa ccagaaggca	660
cagaagatgc tggaccggtc cttcgaaccg ggattccgca tcgaactgca ccacaaggac	720
ctcggcatcg tgaccagcgc cgctcgcgag gccggtgtcg tgacaccctt cggcgcggtc	780
gtcgcccagc tgatggcctc cgcccgtgcg aacggtgatg gtggcctgga ccattcgggc	840
ctgctgcgtg gagtggagcg gctgtccggc cgcccctccc agtgaccctt tccaactcgt	900
aatcctcgat ggagaagtga tatgcctcgt atgcgcgccg ctgacgcagc ggtcaagatt	960
ctggaactcg aaggtgccac tcaggccttc ggccttcccg gtgcggcgat caacccttc	1020
tacgcagcaa tgcgtaacca cggaggaatc aagcacatcc tcgcccgccca cgtcgagggc	1080
gcctcccaca tggccgaggg attcaccgcg gccaaaggccg gaaacatcgg agtctgcac	1140
ggcacctccg ggcccgcgg aaccgacatg atcaccggtc tgtattcggc catggcggac	1200
tcgatcccga tcctcgcgat caccggccaa gctcccgtgg cgcgcctgca caaggaagac	1260
ttccaggccg tcgacatcgc ctcgatcgca ggcccgggtca cgaagatggc gatgacggtg	1320
ctcgagccgg cccaggttcc gggagcgttc gcgcaggcat ttcacttgat gcggtctggt	1380
cggccaggac cgggtgctcat cgacctgccg atcgacgtgc agttggcgga gatcgacttc	1440
gacccgata cctaccagcc gctgcccgtg tacaagccgg ccgcgacccg cgcgcaggcg	1500
gagaaggcac tcgacatgct gggtgccgcc gaacgcccgc tgatcgttgc gggcgggtggc	1560
atcatcaacg ccgacgccgc ggacctgctg gtggaactgg ccgaactgct ggacattccg	1620
gtcgtgccga cgctgatggg ctggggcacc atcccggacg accaccgtct cgccgccggg	1680
atggtcggac tgcagaccgc ccaccgatac ggcaacgcc a gatgctggc gtcggacttc	1740

gtcctcggca tcggaaccg gtgggccaac cggcacacgg gcggtctcga cacctaccgg	1800
aagggccgca agttcggttca cgtcgacatc gaaccacccc agatcggtcg cgtgttcgcg	1860
cccgactacg ggatcgtgtc cgacgccaag gctgcgctcg aactgttcgt cgccgtcgcg	1920
aaggagcgca aggccgcccg aaccctggcg gaccgcagca cctgggtcga ggactgtgcc	1980
accggaagc ggaccatgca gcgcaagacc cacttcgacg acgtcccggc caaaccgcag	2040
cgcgtgtacg aggagatgaa ccgctcttc gggcgcgaca cccggtacgt gagcacgac	2100
gggctctcgc agatcgccgg cggccagttc ctgcacgtct acaaggcccc caactggatc	2160
aactgcgggc aggccggggc gctcggctgg acgatccccg ccgctctcgg agtggttgcc	2220
gcggagccgg agacgcccgt cgtggcgctg tccggtgact acgacttcca gttcatgatc	2280
gaggaactgg ccgtgggccc ccagttcaac ctgccgtaca tccacgtcgt ggtgaacaac	2340
tcctacctgg gactgatccg tcaggcacag cgcgcgttcg acatggactt ctgcgtgcaa	2400
ctgggcttcg acaacatcaa caccaggag cggagcgagc acgagacgat gcccgcggtc	2460
ccgaaggggt acggcgtcga tcacgtcaag gtcgccgagg gcctgggctg caaggccctg	2520
cgggtcaccg agccgggcca gatcgccggc gccctggaga aggccgcga actcgccgga	2580
gaacacaagg tgccggtggt cgtcgaggtc ttcctcgagc gggtcaccaa catcgcgatg	2640
ggcaccgaac tcgacaacgt cgccgagttc gaggatctgg cggagagctg ggagcacgct	2700
cccacagccc tcatgctgct ggactag	2727

<210> 64
 <211> 885
 <212> ADN

<213> Rhodococcus jostii

<400> 64

atgagcacca ttgcattcat cggactcgga atcatgggca gcccacatggc cgttcatctc	60
gccaaggccg gccaccaggt ggtcggatac aaccgctcgc ccgagcgcac cgcggcgctc	120
gtcgacgccg ggggcaccgc ggccgactcc atcgccaagg ccgttgccgg cgccgacgtc	180
gtggccgtga tgggtccccga ctccccggac gtccaggccg tactcgccgg cgaggacgga	240
gtcttcgagc acgccccggc cggcgccctg atcatcgact tctccagcat ccggccccgac	300
gtcaccaccg ccctcgccgc gcaggcaacc gagcgggggt tccggctgat cgacgccccg	360
gtatcgggtg gcgaggccgg tgcgggtcaac gccgcactgt cgatcatggg cggcggcgcg	420
ccggaggatt tcgaggcggc caagccgatc ctcgacaccg tcggcaagac cgtggtgcac	480
gtggggcccga acggttccgg gcagacggtg aaggccgcga accagctgat cgtcgcgggc	540
aacatccaac tcctcgccga ggcgatcatc ttctcgagg cctacggtgt cgacaccgcg	600
gctgcggtcg aggtgctcgg cggcgggctg gccggatcgg ccgtcctgaa ccagaaggca	660
cagaagatgc tggaccggtc cttcgaaccg ggattccgca tcgaactgca ccacaaggac	720
ctcggcatcg tgaccagcgc cgctcgcgag gccggtgtcg tgacaccctt cggcgcggtc	780
gtcgcccagc tgatggcctc cgcccgtgcg aacggtgatg gtggcctgga ccattcgggc	840
ctgctgcgtg gaggggagcg gctgtccggc cgcccctccc agtga	885

<210> 65

<211> 1806

<212> ADN

<213> Rhodococcus jostii

<400> 65

atgcctcgta	tgcgcgccgc	tgacgcagcg	gtcaagattc	tggaactcga	aggtgccact	60
caggccttcg	gccttcccgg	tgcggcgatc	aaccggttct	acgcagcaat	gcgtaaccac	120
ggaggaatca	agcacatcct	cgcgcgccac	gtcgagggcg	cctcccacat	ggccgagggg	180
ttcaccgcg	ccaaggccgg	aaacatcgga	gtctgcatcg	gcacctccgg	gcccgcggga	240
accgacatga	tcaccggtct	gtattcggcc	atggcggact	cgatcccgat	cctcgcgatc	300
accggccaag	ctcccgtggc	gcgcctgcac	aaggaagact	tccaggccgt	cgacatcgcc	360
tcgatcgag	gcccggtcac	gaagatggcg	atgacggtgc	tcgagccggc	ccaggttccg	420
ggagcgttcg	cgcaggcatt	tcacttgatg	cggctctggc	ggccaggacc	ggtgctcatc	480
gacctgccga	tcgacgtgca	gttggcggag	atcgacttcg	acccgatac	ctaccagccg	540
ctgcccgtgt	acaagccggc	cgcgaccgc	gcgcaggcgg	agaaggcact	cgacatgctg	600
ggtgccgccg	aacgcccgtc	gatcgttgcg	ggcgggtggc	tcataaacgc	cgacgccgcg	660
gacctgctgg	tggaactggc	cgaactgctg	gacattccgg	tcgtgccgac	gctgatgggc	720
tggggcacca	tcccggacga	ccaccgtctc	gccgccggga	tggtcggact	gcagaccgcc	780
caccgatacg	gcaacgccac	gatgctggcg	tcggacttcg	tcctcggcat	cggcaaccgg	840
tggggccaacc	ggcacacggg	cggctctgac	acctaccgga	agggccgcaa	gttcgttcac	900
gtcgacatcg	aaccaccca	gatcggtcgc	gtgttcgcgc	ccgactacgg	gatcgtgtcc	960
gacgccaagg	ctgcgctcga	actgttcgtc	gccgtcgcga	aggagcgcaa	ggccgccgga	1020
accctggcgg	accgcagcac	ctgggtcgag	gactgtgcca	cccgaagcg	gaccatgcag	1080
cgcaagaccc	acttcgacga	cgtcccggtc	aaaccgcagc	gcgtgtacga	ggagatgaac	1140

```

cgcgctcttcg ggcgcgacac ccggtacgtg agcacgatcg ggctctcgca gatcgccggc 1200
ggccagttcc tgcacgtcta caaggcccgc aactggatca actgcgggca ggccggggccg 1260
ctcggctgga cgatccccgc cgctctcgga gtgggtgccg cggagccgga gacgcccgtc 1320
gtggcgctgt ccggtgacta cgacttccag ttcatgatcg aggaactggc cgtgggcgcc 1380
cagttcaacc tgccgtacat ccacgtcgtg gtgaacaact cctacctggg actgatccgt 1440
caggcacagc gcgcgttcga catggacttc tgcgtgcaac tgggcttcga caacatcaac 1500
acccaggagc ggagcgagca cgagacgatg cccgcgggtcc cgaaggggta cggcgtcgat 1560
cacgtcaagg tcgccgaggg cctgggctgc aaggccctgc gggtcaccga gccgggagag 1620
atcgccggcg ccctggagaa ggcccgcgaa ctcgccggag aacacaaggc gccggtggtc 1680
gtcgaggtct tcctcgagcg ggtcaccaac atcgcgatgg gcaccgaact cgacaacgtc 1740
gccgagttcg aggatctggc ggagagctgg gagcacgctc ccacagccct catgctgctg 1800
gactag 1806

```

```

<210> 66
<211> 294
<212> PRT
<213> Rhodococcus jostii

```

```
<400> 66
```

```

Met Ser Thr Ile Ala Phe Ile Gly Leu Gly Ile Met Gly Ser Pro Met
1           5           10           15

```

```

Ala Val His Leu Ala Lys Ala Gly His Gln Val Val Gly Tyr Asn Arg
          20           25           30

```


Ser Pro Glu Arg Thr Ala Ala Leu Val Asp Ala Gly Gly Thr Ala Ala
 35 40 45

Asp Ser Ile Ala Lys Ala Val Ala Gly Ala Asp Val Val Ala Val Met
 50 55 60

Val Pro Asp Ser Pro Asp Val Gln Ala Val Leu Ala Gly Glu Asp Gly
 65 70 75 80

Val Phe Glu His Ala Pro Ala Gly Ala Leu Ile Ile Asp Phe Ser Ser
 85 90 95

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

Gly Phe Arg Leu Ile Asp Ala Pro Val Ser Gly Gly Glu Ala Gly Ala
 115 120 125

Val Asn Ala Ala Leu Ser Ile Met Val Gly Gly Ala Pro Glu Asp Phe
 130 135 140

Glu Ala Ala Lys Pro Ile Leu Asp Thr Val Gly Lys Thr Val Val His
 145 150 155 160

Val Gly Pro Asn Gly Ser Gly Gln Thr Val Lys Ala Ala Asn Gln Leu
 165 170 175

Ile Val Ala Gly Asn Ile Gln Leu Leu Ala Glu Ala Ile Ile Phe Leu
 180 185 190

Glu Ala Tyr Gly Val Asp Thr Ala Ala Ala Val Glu Val Leu Gly Gly
 195 200 205

Gly Leu Ala Gly Ser Ala Val Leu Asn Gln Lys Ala Gln Lys Met Leu
 210 215 220

Asp Arg Ser Phe Glu Pro Gly Phe Arg Ile Glu Leu His His Lys Asp
 225 230 235 240

Leu Gly Ile Val Thr Ser Ala Ala Arg Glu Ala Gly Val Val Thr Pro
 245 250 255

Leu Gly Ala Val Val Ala Gln Leu Met Ala Ser Ala Arg Ala Asn Gly
 260 265 270

Asp Gly Gly Leu Asp His Ser Gly Leu Leu Arg Gly Val Glu Arg Leu
 275 280 285

Ser Gly Arg Pro Ser Gln
 290

<210> 67
 <211> 601
 <212> PRT
 <213> Rhodococcus jostii

<400> 67

Met Pro Arg Met Arg Ala Ala Asp Ala Ala Val Lys Ile Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Glu Gly Ala Thr Gln Ala Phe Gly Leu Pro Gly Ala Ala Ile Asn Pro
 20 25 30

Phe Tyr Ala Ala Met Arg Asn His Gly Gly Ile Lys His Ile Leu Ala
 35 40 45

Arg His Val Glu Gly Ala Ser His Met Ala Glu Gly Phe Thr Arg Ala
 50 55 60

Lys Ala Gly Asn Ile Gly Val Cys Ile Gly Thr Ser Gly Pro Ala Gly
 65 70 75 80

Thr Asp Met Ile Thr Gly Leu Tyr Ser Ala Met Ala Asp Ser Ile Pro
 85 90 95

Ile Leu Ala Ile Thr Gly Gln Ala Pro Val Ala Arg Leu His Lys Glu
 100 105 110

Asp Phe Gln Ala Val Asp Ile Ala Ser Ile Ala Gly Pro Val Thr Lys
 115 120 125

Met Ala Met Thr Val Leu Glu Pro Ala Gln Val Pro Gly Ala Phe Ala
 130 135 140

Gln Ala Phe His Leu Met Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile
 145 150 155 160

Asp Leu Pro Ile Asp Val Gln Leu Ala Glu Ile Asp Phe Asp Pro Asp
 165 170 175

Thr Tyr Gln Pro Leu Pro Val Tyr Lys Pro Ala Ala Thr Arg Ala Gln
 180 185 190

Ala Glu Lys Ala Leu Asp Met Leu Gly Ala Ala Glu Arg Pro Leu Ile
 195 200 205

Val Ala Gly Gly Gly Ile Ile Asn Ala Asp Ala Ala Asp Leu Leu Val
 210 215 220

Glu Leu Ala Glu Leu Leu Asp Ile Pro Val Val Pro Thr Leu Met Gly
 225 230 235 240

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

Leu Gln Thr Ala His Arg Tyr Gly Asn Ala Thr Met Leu Ala Ser Asp
 260 265 270

Phe Val Leu Gly Ile Gly Asn Arg Trp Ala Asn Arg His Thr Gly Gly
 275 280 285

Leu Asp Thr Tyr Arg Lys Gly Arg Lys Phe Val His Val Asp Ile Glu
 290 295 300

Pro Thr Gln Ile Gly Arg Val Phe Ala Pro Asp Tyr Gly Ile Val Ser
 305 310 315 320

Asp Ala Lys Ala Ala Leu Glu Leu Phe Val Ala Val Ala Lys Glu Arg
 325 330 335

Lys Ala Ala Gly Thr Leu Ala Asp Arg Ser Thr Trp Val Glu Asp Cys
 340 345 350

Ala Thr Arg Lys Arg Thr Met Gln Arg Lys Thr His Phe Asp Asp Val
 355 360 365

Pro Val Lys Pro Gln Arg Val Tyr Glu Glu Met Asn Arg Val Phe Gly
 370 375 380

Arg Asp Thr Arg Tyr Val Ser Thr Ile Gly Leu Ser Gln Ile Ala Gly
 385 390 395 400

Gly Gln Phe Leu His Val Tyr Lys Ala Arg Asn Trp Ile Asn Cys Gly
 405 410 415

Gln Ala Gly Pro Leu Gly Trp Thr Ile Pro Ala Ala Leu Gly Val Val
 420 425 430

Ala Ala Glu Pro Glu Thr Pro Val Val Ala Leu Ser Gly Asp Tyr Asp
 435 440 445

Phe Gln Phe Met Ile Glu Glu Leu Ala Val Gly Ala Gln Phe Asn Leu
 450 455 460

Pro Tyr Ile His Val Val Val Asn Asn Ser Tyr Leu Gly Leu Ile Arg
 465 470 475 480

Gln Ala Gln Arg Ala Phe Asp Met Asp Phe Cys Val Gln Leu Gly Phe
 485 490 495

Asp Asn Ile Asn Thr Gln Glu Arg Ser Glu His Glu Thr Met Pro Ala
 500 505 510

Val Pro Lys Gly Tyr Gly Val Asp His Val Lys Val Ala Glu Gly Leu
 515 520 525

Gly Cys Lys Ala Leu Arg Val Thr Glu Pro Gly Glu Ile Ala Gly Ala
 530 535 540

Leu Glu Lys Ala Arg Glu Leu Ala Gly Glu His Lys Val Pro Val Val
 545 550 555 560

Val Glu Val Phe Leu Glu Arg Val Thr Asn Ile Ala Met Gly Thr Glu
565 570 575

Leu Asp Asn Val Ala Glu Phe Glu Asp Leu Ala Glu Ser Trp Glu His
580 585 590

Ala Pro Thr Ala Leu Met Leu Leu Asp
595 600

<210> 68
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 68
atcgatctcg agttaccctg cttactgtca gatctag

37

<210> 69
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 69
atcgatctcg aggctgttg atgataccgc tgcctta

37

<210> 70
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400>	70	
ccgctcgagt	caacaacaag	acccatca
		28
<210>	71	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mỗi	
<400>	71	
ccgctcgagc	atgcacatgc	agtcatgt
		28
<210>	72	
<211>	1838	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	mảnh pBL1	
<400>	72	
ccgctcgagt	caacaacaag	acccatcata gtttgcccc gcgacattga ccataaatc
		60
atcgcacaaa	atatcgaacg	gggttttatgc cgcttttagt gggcgcgaag aatagtctgc
		120
tcattaccgc	cgaacaccgc	cgcattcaga tcacgcttag tagcgtcccc atgagtaggc
		180
agaaccgcgt	ccaagtccac	atcatccata acgatcatgc acggggtgga atccacaccc
		240
agacttgcca	gcacctcatt	agcgacacgt tgcgcagcgg ccacgtcctt agccttatcc
		300
acgcaatcta	gaacgtactg	cctaaccgcg aaatcagact gaatcagttt ccaatcatcg
		360
ggcttcacca	aagcaacagc	aacgcggggt gattcgaccc gttccggtgc ttccagaccg
		420
gcgagcttgt	acagttcttc	ttccatttca cgacgtacat cagcgtctat gtaatcaatg
		480
cccaaagcac	gcttagcccc	acgtgaccag gacgaacgca gggtttttaga accaacctca
		540

tactcacgcc accgagccac caaaacagcg tccatatcct cgccggcgctc gctttgatcg	600
gccaacatat ccaacatctg aaacggcggtg tacgaccctt tagacgcggt tttagtagcg	660
gagccagtca gttcctgaga catgccctta gcgaggtagg ttgccatttt cgcagcgtct	720
ccaccccagg tagacacctg atcaagtttg accccgtgct cacgcagtgg cgcgtccata	780
ccggccttaa ccacaccagc agaccagcgg gaaaacatgg aatcctcaaa cgccttgagt	840
tcatcgtcag acagtggacg atccaagaac aacagcatgt tgcggtgcaa gtgccaaccg	900
ttcgcccaag agtctgtgac ctcatagtca ctataggtgt gtcacacccc gtaccgtgca	960
cgttctttct tccactgaga tgttttcacc atcgaagagt acgcagtctt aatacccgct	1020
tcaacctgcg caaatgactg tgagcggttg tgtcgaacag tgcccacaaa catcatgagc	1080
gcgccacccg ccgccaagtg attcttagta gcaatagcca gctcaatgcg gcgttcgccc	1140
atgacttcca attcagccag aggtgacccc cagcgagagt gagagttttg cagaccctca	1200
aactgcgaag caccgttaga cgaccaggac accgcaacag cttcgtccct gcgccaccta	1260
tggcaccccg ccagagcctt actattggtg atcttgtaca tgacgttttg cctacgccac	1320
gccctagcgc gagtgacctt agaaccctca ttgacctgcg gttccttaga ggtgttcact	1380
tctatttcag tgttacctag acccgatggt gtgcgggggt gcgcagtgcg agtttgtgcg	1440
ggtgttgtgc ccgttgtctt agctagtgct atggttgtca attgaaaccc cttcgggtta	1500
tgtggccccc gtgcatatga gttggtagct cgcacggggg tttgtcttgt ctagggacta	1560
ttaattttta gtggtgtttg gtggccgcct agcttggcta tgcgtgccag cttaccgta	1620
ctcaatgtta aagatttgca tcgacatggg agggttacgt gtccgatacc taggggggggt	1680

atccgcgact aggtgccccg gtgctcactg tctgtaccgg cggggcaagc cccacacccc 1740

gcatggacag ggtggctccg cccctgcac cccagcaat ctgcatgtac atgttttaca 1800

cattagcacg acatgactgc atgtgcatgc tcgagcgg 1838

<210> 73

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 73

aagcgagctc acaaaaagga taaaacaatg tcgactcaca catcttca 48

<210> 74

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 74

atacatgcat gcttaggaaa cgacgacgat caa 33

<210> 75

<211> 3423

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 75

gtgtcgactc acacatcttc aacgcttcca gcattcaaaa agatcttggt agcaaaccgc 60

ggcgaaatcg cgggccgtgc tttccgtgca gcactcgaaa ccgggtgcagc cacggtagct 120

atttaccccc gtgaagatcg gggatcattc caccgctctt ttgcttctga agctgtccgc 180

attggtaccg aaggctcacc agtcaaggcg tacctggaca tcgatgaaat tatcggtgca	240
gctaaaaaag ttaaagcaga tgccatttac ccgggatacg gcttcctgtc tgaaaatgcc	300
cagcttgccc gcgagtgtgc ggaaaacggc attactttta ttggcccaac cccagagggtt	360
cttgatctca ccggtgataa gtctcgcgcg gtaaccgccg cgaagaaggc tggctctgcca	420
gttttggcgg aatccacccc gagcaaaaac atcgatgaga tcgttaaaag cgctgaaggc	480
cagacttacc ccatctttgt gaaggcagtt gccggtggtg gcggacgcgg tatgcgtttt	540
gttgcttcac ctgatgagct tcgcaaatta gcaacagaag catctcgtga agctgaagcg	600
gctttcggcg atggcgcggt atatgtcgaa cgtgctgtga ttaaccctca gcatattgaa	660
gtgcagatcc ttggcgatca cactggagaa gttgtacacc tttatgaacg tgactgctca	720
ctgcagcgtc gtcacaaaaa agttgtcgaa attgcgccag cacagcattt ggatccagaa	780
ctgcgtgatc gcatttgtgc ggatgcagta aagttctgcc gctccattgg ttaccagggc	840
gcgggaaccg tggaattctt ggtcgatgaa aagggcaacc acgtcttcat cgaaatgaac	900
ccacgtatcc aggttgagca caccgtgact gaagaagtca ccgaggtgga cctggtgaag	960
gcgcagatgc gcttggctgc tgggtgcaacc ttgaaggaat tgggtctgac ccaagataag	1020
atcaagaccc acggtgcagc actgcagtgc cgcataacca cggaagatcc aaacaacggc	1080
ttccgcccag ataccggaac tatcaccgcg taccgctcac caggcggagc tggcgttcgt	1140
cttgacggtg cagctcagct cggtggcgaa atcaccgcac actttgactc catgctggtg	1200
aaaatgacct gccgtggttc cgactttgaa actgctgttg ctcgatgcaca gcgcgcgttg	1260
gctgagttca ccgtgtctgg tgttgcaacc aacattgggt tcttgctgctg gttgctgcgg	1320

gaagaggact	tcacttccaa	gcgcatcgcc	accggattca	ttgccgatca	cccgcacctc	1380
cttcaggctc	cacctgctga	tgatgagcag	ggacgcatcc	tggattactt	ggcagatgtc	1440
accgtgaaca	agcctcatgg	tgtgcgtcca	aaggatgttg	cagctcctat	cgataagctg	1500
cctaacatca	aggatctgcc	actgccacgc	ggttcccgtg	accgcctgaa	gcagcttggc	1560
ccagccgctg	ttgctcgtga	tctccgtgag	caggacgcac	tggcagttac	tgataccacc	1620
ttccgcgatg	cacaccagtc	tttgcttgcg	acccgagtc	gctcattcgc	actgaagcct	1680
gcggcagagg	ccgtcgcaaa	gctgactcct	gagcttttgt	ccgtggaggc	ctggggcggc	1740
gcgacctacg	atgtggcgat	gcgtttcctc	tttgaggatc	cgtgggacag	gctcgacgag	1800
ctgcgcgagg	cgatgccgaa	tgtaaacatt	cagatgctgc	ttcgcgcccg	caacaccgtg	1860
ggatacaccc	cgtaccaga	ctccgtctgc	cgcgcgtttg	ttaaggaagc	tgccagctcc	1920
ggcgtggaca	tcttccgcat	cttcgacgcg	cttaacgacg	tctcccagat	gcgtccagca	1980
atcgacgcag	tcttgagac	caacaccgcg	gtagccgagg	tggctatggc	ttattctggt	2040
gatctctctg	atccaaatga	aaagctctac	accctggatt	actacctaaa	gatggcagag	2100
gagatcgta	agtctggcgc	tcacatcttg	gccattaagg	atatggctgg	tctgcttcgc	2160
ccagctgcgg	taaccaagct	ggtcaccgca	ctgcgccgtg	aattcgatct	gccagtgcac	2220
gtgcacaccc	acgacactgc	gggtggccag	ctggcaacct	actttgctgc	agctcaagct	2280
ggtgcagatg	ctgttgacgg	tgcttccgca	ccactgtctg	gcaccacctc	ccagccatcc	2340
ctgtctgcca	ttgttgctgc	attcgcgcac	acccgtcgcg	ataccggttt	gagcctcgag	2400
gctgtttctg	acctcgagcc	gtactgggaa	gcagtgcgcg	gactgtacct	gccatttgag	2460

tctggaaccc caggcccaac cggtcgcgtc taccgccacg aaatcccagg cggacagttg	2520
tccaacctgc gtgcacaggc caccgcactg ggccttgcg atcgtttcga actcatcgaa	2580
gacaactacg cagccgttaa tgagatgctg ggacgccc aa ccaaggtcac cccatcctcc	2640
aaggttggtg gcgacctgc actccacctc gttggtgcg gtgtggatcc agcagacttt	2700
gctgccgatc cacaaaagta cgacatccca gactctgtca tcgcgttcct gcgcggcgag	2760
cttggttaacc ctccagggtg ctggccagag ccaactgcga cccgcgcact ggaaggccgc	2820
tccgaaggca aggcacctct gacggaagtt cctgaggaag agcaggcgca cctcgacgct	2880
gatgattcca aggaacgtcg caatagcctc aaccgcctgc tgttcccgaa gccaaccgaa	2940
gagttcctcg agcaccgtcg ccgcttcggc aacacctctg cgctggatga tcgtgaattc	3000
ttctacggcc tggtcgaagg ccgcgagact ttgatccgcc tgccagatgt gcgcacccca	3060
ctgcttggtc gcctggatgc gatctctgag ccagacgata agggatatgc caatgttgtg	3120
gccaacgtca acggccagat ccgccc aatg cgtgtgcgtg accgctccgt tgagtctgtc	3180
accgcaaccg cagaaaaggc agattcctcc aacaagggcc atgttgctgc accattcgct	3240
ggtgttgtca ccgtgactgt tgctgaaggt gatgaggtca aggctggaga tgcagtcgca	3300
atcatcgagg ctatgaagat ggaagcaaca atcactgctt ctgttgacgg caaaatcgat	3360
cgcgttgtgg ttctgctgc aacgaaggtg gaaggtggcg acttgatcgt cgtcgtttcc	3420
taa	3423

<210> 76
 <211> 1140
 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 76

Val	Ser	Thr	His	Thr	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro	Ala	Phe	Lys	Lys	Ile	Leu
1				5					10					15	

Val	Ala	Asn	Arg	Gly	Glu	Ile	Ala	Val	Arg	Ala	Phe	Arg	Ala	Ala	Leu
			20					25					30		

Glu	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ile	Tyr	Pro	Arg	Glu	Asp	Arg	Gly
		35					40					45			

Ser	Phe	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Ser	Glu	Ala	Val	Arg	Ile	Gly	Thr	Glu
	50					55					60				

Gly	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Tyr	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Ile	Ile	Gly	Ala
65					70					75					80

Ala	Lys	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Gly	Phe	Leu
				85					90					95	

Ser	Glu	Asn	Ala	Gln	Leu	Ala	Arg	Glu	Cys	Ala	Glu	Asn	Gly	Ile	Thr
			100					105					110		

Phe	Ile	Gly	Pro	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Asp	Leu	Thr	Gly	Asp	Lys	Ser
		115					120					125			

Arg	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Glu
	130					135					140				

Ser	Thr	Pro	Ser	Lys	Asn	Ile	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Ser	Ala	Glu	Gly
145					150					155					160

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Arg
 165 170 175

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr
 180 185 190

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr
 195 200 205

Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu
 210 215 220

Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser
 225 230 235 240

Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His
 245 250 255

Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe
 260 265 270

Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val
 275 280 285

Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln
 290 295 300

Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys
 305 310 315 320

Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu
 325 330 335

Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile
 340 345 350

Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile
 355 360 365

Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala
 370 375 380

Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val
 385 390 395 400

Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala
 405 410 415

Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile
 420 425 430

Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg
 435 440 445

Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro
 450 455 460

Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val
 465 470 475 480

Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro
 485 490 495

Ile Asp Lys Leu Pro Asn Ile Lys Asp Leu Pro Leu Pro Arg Gly Ser
 500 505 510

Arg Asp Arg Leu Lys Gln Leu Gly Pro Ala Ala Phe Ala Arg Asp Leu
 515 520 525

Arg Glu Gln Asp Ala Leu Ala Val Thr Asp Thr Thr Phe Arg Asp Ala
 530 535 540

His Gln Ser Leu Leu Ala Thr Arg Val Arg Ser Phe Ala Leu Lys Pro
 545 550 555 560

Ala Ala Glu Ala Val Ala Lys Leu Thr Pro Glu Leu Leu Ser Val Glu
 565 570 575

Ala Trp Gly Gly Ala Thr Tyr Asp Val Ala Met Arg Phe Leu Phe Glu
 580 585 590

Asp Pro Trp Asp Arg Leu Asp Glu Leu Arg Glu Ala Met Pro Asn Val
 595 600 605

Asn Ile Gln Met Leu Leu Arg Gly Arg Asn Thr Val Gly Tyr Thr Pro
 610 615 620

Tyr Pro Asp Ser Val Cys Arg Ala Phe Val Lys Glu Ala Ala Ser Ser
 625 630 635 640

Gly Val Asp Ile Phe Arg Ile Phe Asp Ala Leu Asn Asp Val Ser Gln
 645 650 655

Met Arg Pro Ala Ile Asp Ala Val Leu Glu Thr Asn Thr Ala Val Ala
 660 665 670

Glu Val Ala Met Ala Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Asp Pro Asn Glu Lys
675 680 685

Leu Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Leu Lys Met Ala Glu Glu Ile Val Lys
690 695 700

Ser Gly Ala His Ile Leu Ala Ile Lys Asp Met Ala Gly Leu Leu Arg
705 710 715 720

Pro Ala Ala Val Thr Lys Leu Val Thr Ala Leu Arg Arg Glu Phe Asp
725 730 735

Leu Pro Val His Val His Thr His Asp Thr Ala Gly Gly Gln Leu Ala
740 745 750

Thr Tyr Phe Ala Ala Ala Gln Ala Gly Ala Asp Ala Val Asp Gly Ala
755 760 765

Ser Ala Pro Leu Ser Gly Thr Thr Ser Gln Pro Ser Leu Ser Ala Ile
770 775 780

Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu
785 790 795 800

Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr
805 810 815

Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg
820 825 830

His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr
 835 840 845

Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala
 850 855 860

Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser
 865 870 875 880

Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp
 885 890 895

Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser
 900 905 910

Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp
 915 920 925

Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys
 930 935 940

Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala
 945 950 955 960

Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro
 965 970 975

Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr
 980 985 990

Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg
 995 1000 1005

Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val
 1010 1015 1020

Arg Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn
 1025 1030 1035

Val Val Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg
 1040 1045 1050

Asp Arg Ser Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp
 1055 1060 1065

Ser Ser Asn Lys Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val
 1070 1075 1080

Thr Val Thr Val Ala Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala
 1085 1090 1095

Val Ala Ile Ile Glu Ala Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala
 1100 1105 1110

Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr
 1115 1120 1125

Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile Val Val Val Ser
 1130 1135 1140

<210> 77

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 77

cgctcaattg caatgattga cacgattccg

30

<210> 78

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 78

acagaattcg ctatttggtta gtgaataaaa gg

32

<210> 79

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 79

cgaattcgct ggtggaacat atgaaaacaa aattgatgac attacaagac

50

<210> 80

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 80

gcggtacctt atttgctctc ctgtgaaacg

30

<210> 81

<211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 81
 gctctagatg ctgaaatcca ctagtcttgt c

31

<210> 82
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 82
 tactgcagcg ttccagcacc ttatcaacc

29

<210> 83
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 83
 ggtctagagc aatgattgac acgattccg

29

<210> 84
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 84

gcggtacctt atttgctctc ctgtgaaacg

30

<210> 85
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 85
 caggaattcg ctatatctgg ctctgcacg

29

<210> 86
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 86
 cagtctagag caatactctt ctgattttga g

31

<210> 87
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 87
 cagtctagat catcgtcgat atgtaggcc

29

<210> 88
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 88

gacctgcaga tcattccgtca gctgtacgc

29

<210> 89

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 89

ggaattcggg tcaatttttca ccctctatc

29

<210> 90

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 90

gtgggccgctc ctgaaggtac aaaagagata gattctc

37

<210> 91

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 91

ctctttttgta ccttcaggac ggcccacaaa tttgaag

37

<210> 92

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 92
 ggaattccca gccccgcaag gccgatggc

29

<210> 93
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 93
 cgccatatga atggcgcggc ggggccggtg g

31

<210> 94
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 94
 tggagctctg tttactcctg tcaggggg

28

<210> 95
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 95

tggagctctc tgatttaatc aacaataaaa ttg

33

<210> 96
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 96
 cgggatccac caccataacc aaacgacgg

29

<210> 97
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 97
 aatatgcatg ctggtggaac atatgaaagg ttttgcaatg ctagg

45

<210> 98
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 98
 acgcgtcgac ttataatata actactgctt taattaagtc

40

<210> 99
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 99

acgcgtcgac gctggtggaa catatgttaa aggatgaagt aattaaaca attagc

56

<210> 100

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 100

gctctagagg taccttactt aagataatca tatataactt cagc

44

<210> 101

<211> 46

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 101

gctctagacg gagaaagtct tatggcggta acgcaaacag cccagg

46

<210> 102

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 102

cgggatcccg gagaaagtct tatgaagcaa acagtttata tcgcc

45

<210> 103

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

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 103
 ctactagtct gtcgcaatga ttgacacgat tccg

34

<210> 104
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 104
 gctcgaattc ccatatgttc caccagctat ttgttagtga ataaaagg

48

<210> 105
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 105
 gctctagacg gagaaagtct tatgaaactg ggatttattg gc

42

<210> 106
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 106

aactgcagtc aggccagttt atggtttag

28

<210> 107

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 107

aactgcagcg gagaaagtct tatgaagatt gtcattgcgc ca

42

<210> 108

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 108

ggaattcaag ctttcagttt ttaattccct gacc

34